

Procjena energetskeg potencijala mikroalgi iz rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis*

Jelenčić, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:672392>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**PROCJENA ENERGETSKOG POTENCIJALA MIKROALGI IZ
RODOVA *NANNOCHLOROPSIS* I *ISOCHRYSIS***

DIPLOMSKI RAD

Anamarija Jelenčić

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi

**PROCJENA ENERGETSKOG POTENCIJALA MIKROALGI IZ
RODOVA *NANNOCHLOROPSIS* I *ISOCHRYSIS***

DIPLOMSKI RAD

Anamarija Jelenčić

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Ana Gavrilović

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Anamarija Jelenčić**, JMBAG 0178109336, rođena 15.06.1997. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PROCJENA ENERGETSKOG POTENCIJALA MIKROALGI IZ RODOVA *NANNOCHLOROPSIS I ISOCHRYSIS*

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Anamarije Jelenčić**, JMBAG 0178109336, naslova

**PROCJENA ENERGETSKOG POTENCIJALA MIKROALGI IZ RODOVA *NANNOCHLOROPSIS* I
*ISOCHRYSIS***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | |
|----|------------------------------------|--------|
| 1. | Izv. prof. dr. sc. Ana Gavrilović | mentor |
| 2. | Izv. prof. . dr. sc. Vanja Jurišić | član |
| 3. | Prof. dr. sc. Marina Piria | član |

Zahvala

Ovim putem se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Gavrilović na pruženoj pomoći prilikom izrade diplomskog rada. Također se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Vanji Jurišić i Mislavu Konteku na pomoći pri laboratorijskoj analizi te Cromaris-u i Aquarium Pula na uzorcima. Zahvaljujem se svim profesorima i kolegama koje sam imala priliku upoznati na Agronomskom fakultetu.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i dečku na pružanju potpore tijekom studiranja i pisanja diplomskog rada.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
2. PROIZVODNJA BIOGORIVA OD MIKROALGI	3
2.1. Biogoriva od mikroalgi.....	3
2.1.1. Proizvodnja biodizela	4
2.1.2. Proizvodnja bioplina.....	5
2.2. Uzgoj mikroalgi za proizvodnju goriva	6
2.2.1. Uzgojni sustavi za proizvodnju mikroalgi	10
2.2.2. Odabir vrste mikroalgi za proizvodnju biogoriva.....	13
2.2.2.1. Nannochloropsis sp.	14
2.2.2.2. Isochrysis galbana.....	15
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1 Materijali	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Mjerenje saliniteta medija s mikroalgama	17
3.2.2. Određivanje broja stanica mikroalgi	17
3.2.3. Sadržaj vode i suhe tvari	18
3.2.4. Sadržaj pepela	20
3.2.5. Priprema i određivanje sadržaja masti	22
3.2.6. Utvrđivanje bioplinskog potencijala	24
3.2.6.1. Anaerobna digestija	24
3.2.6.2. Teorijsko određivanje bioplinskog potencijala	24
4. REZULTATI	25
4.1. Salinitet medija s kulturom mikroalgi	25
4.2. Broj stanica mikroalgi	25
4.3. Sadržaj vode i suhe tvari.....	26
4.4. Sadržaj pepela	27
4.5. Sadržaj masti	28
4.6. Utvrđivanje potencijala za bioplin.....	28

5. RASPRAVA.....	30
6. ZAKLJUČAK.....	34
7. LITERATURA.....	35

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Anamarije Jelenčić**, naslova

PROCJENA ENERGETSKOG POTENCIJALA MIKROALGI IZ RODOVA *NANNOCHLOROPSIS* I *ISOCHRYSIS*

Mikroalge rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis* predstavljaju sirovinu koja se može koristiti za proizvodnju energije.

Cilj ovog rada bio je opisati uzgoj mikroalgi rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis* u različitim tehnološkim sustavima te laboratorijskim metodama istražiti njihove kemijske i fizikalne karakteristike za preliminarnu procjenu energetskog potencijala za proizvodnju bioplina i biodizela.

Analizom uzoraka mikroalgi *Nannochloropsis oculata*, utvrđene su srednje vrijednosti sadržaja vode 95,28 %, sadržaja pepela 76,5 %, sadržaja masti 0,3271 %. Salinitet otopine uzoraka mikroalge *N. oculata* iznosio je 37,114 ppt. Utvrđena je kemijska potrošnja kisika (KPK), od ostataka mikroalgi nakon proizvodnje biodizela, koja je iznosila 1244 mg/L.

Analizom uzoraka mikroalgi *Isochrysis galbana*, utvrđene su srednje vrijednosti sadržaja vode 95,42 %, sadržaja pepela 77,91 %, sadržaja masti 0,3395 %. Salinitet otopine uzoraka mikroalge *I. galbana* je iznosio 36,516 ppt. Utvrđena je kemijska potrošnja kisika (KPK), od ostataka mikroalgi nakon proizvodnje biodizela, koja je iznosila 999 mg/L.

Može se zaključiti da postoji potencijal u proizvodnji biogoriva iz mikroalgi, te da je moguća integrirana kružna proizvodnja. Međutim, potrebno je optimizirati sustav proizvodnje kako bi prinosi bili što veći, a troškovi proizvodnje što manji.

Ključne riječi: uzgoj mikroalgi, *Nannochloropsis* sp. , *Isochrysis* sp. , biodizel, bioplin

Summary

Of the master's thesis – student **Anamarija Jelenčić**, entitled

ESTIMATION OF ENERGY POTENTIAL OF MICROALGA FROM THE GENERA *NANNOCHLOROPSIS* AND *ISOCHRYSIS*

Nannochloropsis and *Isochrysis* microalgae represent a raw material that can be used for energy production.

The aim of this research was to describe the cultivation of the *Nannochloropsis* and *Isochrysis* microalgae in different technological systems and to determine their chemical and physical characteristics using laboratory methods for a preliminary assessment of the energy potential for the production of biogas and biodiesel.

Analysing the *Nannochloropsis* samples, the average values of water content was measured at 95.28 %, ash content at 76.5 %, fat content at 0.3271 % were determined. The solution salinity of the *Nannochloropsis* samples was measured at 37.114 ppt. The chemical oxygen consumption (COD) of microalgae residues after biodiesel production was determined, which was 1244 mg/L.

Through the analysis of the *Isochrysis galbana* samples, the average values of water content was measured at 95.42 %, ash content at 77.91 %, fat content at 0.3395 % were determined. The solution salinity of the *I. galbana* samples was measured at 36,516 ppt. The chemical oxygen consumption (COD) of microalgae residues after biodiesel production was determined, which was 999 mg/L.

It can be concluded that there is potential in the production of biofuel from microalgae, and that integrated circular production is possible. However, it is necessary to optimize the production system so that yields are as high as possible and production costs are as low as possible.

Key words: microalgae, *Nannochloropsis sp.*, *Isochrysis sp.*, biodiesel, biogas

1. Uvod

Posljednjih godina, uporaba tekućih biogoriva u sektoru prometa je pokazala brzi globalni rast, vođen uglavnom politikom energetske sigurnosti i stabilnosti te ublažavanja emisija stakleničkih plinova. Predviđa se da će se proizvodnja biodizela na globalnoj razini dodatno povećati zbog sve veće potražnje za gorivima i "čistijom" energijom (Huang i sur., 2010).

Sukladno definiciji iz Čl. 3. Zakona o energiji (NN 68/2001, 177/2004, 76/2007, 152/2008 i 127/2010), biogoriva su tekuća ili plinska goriva za potrebe prijevoza, proizvedena iz biomase koju možemo definirati kao biorazgradivi dio proizvoda, otpada i ostataka proizvedenih u poljoprivredi (uključujući tvari biljnoga i životinjskoga podrijetla), u šumarstvu, ribarstvu, akvakulturi, drvanoj industriji i srodnim industrijama, kao biorazgradivi dio industrijskoga i komunalnoga otpada.

Sirovine za proizvodnju biogoriva razlikuju se od zemlje do zemlje, a sukladno korištenoj sirovini sama biogoriva dijele se na tri generacije. Biogoriva prve generacije uključuju ona koja se temelje na šećernim i škrobnim sirovinama koje se mogu koristiti za ljudsku prehranu (npr. zrno kukuruza, šećerna trska, palminog ulje, šećerna repa itd.). Prijelaz na drugu generaciju sirovina temelji se na neposrednoj konkurenciji ovih sirovina s prehrambenom industrijom (Zhu L., 2015.). Biogoriva druge generacije su ona dobivena iz lignoceluloznih sirovina i nejestivih dijelova prehrambenih usjeva, koji se obično odbacuju kao što su stabljike, lišće i ljuske (npr. kukuruzovina) (Zhu L., 2015.). Međutim, njihova upotreba je još uvijek ograničena zbog visoke cijene proizvodnje (Konda i sur., 2015).

Iako prve dvije generacije biogoriva mogu djelomično zadovoljiti globalnu potražnju za energijom, one ovise o dostupnoj obradivoj zemlji pa prostor potreban za njihovu proizvodnju konkurira proizvodnji poljoprivrednih usjeva namijenjenih ljudskoj prehrani, što je njihov glavni nedostatak. Zato se biogoriva dobivena iz jestivih ili nejestivih usjeva ne smatraju optimalnom alternativom fosilnim gorivima odnosno potpunom alternativom fosilnim gorivima (Zhu L-D, 2016.).

Gore navedeni problem moguće je djelomično riješiti proizvodnjom i korištenjem treće generacije biogoriva, dobivena uzgojem makroalgi i mikroalgi koje se mogu uzgajati na marginalnim površinama, odnosno na površinama neadekvatnim za poljoprivredu. Mikroalge su mikroorganizmi koji proizvode gotovo polovicu atmosferskog kisika te su odgovorni za najmanje 32 % globalne fotosinteze. Karakterizirane su brzom stopom rasta i mogu akumulirati do 80 % sadržaja lipida u biomasi. Lipidi skladišteni u mikroalgama uglavnom su triacilgliceroli, koji se mogu koristiti kao sirovina za biogoriva (Ma i sur., 2016.). One su jednostanični biljni vodeni organizmi, čiji se potencijal sve češće istražuje zahvaljujući brzom stopi rasta, relativno jednostavnoj tehnologiji uzgoja i velikoj sposobnosti fiksiranja ugljikovog dioksida (CO₂). Mikroalge su osjetljivi mikroorganizmi koji zahtijevaju kontrolu relevantnih čimbenika prilikom uzgoja, koja ovisi o uzgajanoj vrsti i krajnjoj namjeni. Uzgajaju se kao

monokulture u različitim sustavima, koji se dijele na otvorene i zatvorene sustave. Također je moguća kombinacija ovih dvaju sustava, ali se ona rjeđe primjenjuje (Gavrilović i sur., 2021.). Iako je velik dio istraživanja biogoriva algi usredotočen na odabir i optimizaciju produktivnosti uzgoja mikroalgi, makroalge se također mogu koristiti kao sirovina za proizvodnju biogoriva (Ghadiryafar i sur., 2016.).

Budući da različite vrste imaju različit kemijski sastav, ovisan i o fazi rasta te uzgojnim uvjetima, potrebno je procijeniti energetske potencijale za svaku kulturu i uzgojne uvjete zasebno. U ovom radu su opisane mikroalge iz rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis* te je laboratorijskim analizama istražen njihov energetske potencijal u proizvodnji biodizela i bioplina.

1.1. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog rada su:

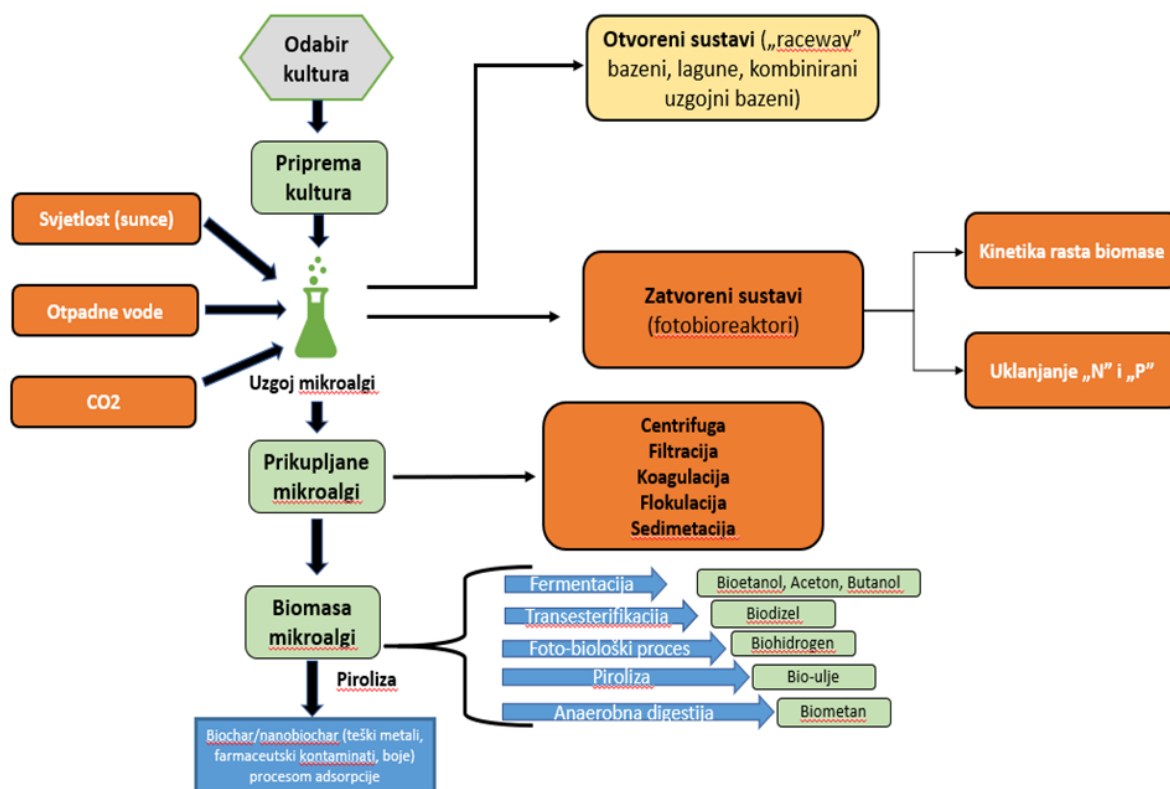
1. Pregledom literature opisati uzgoj mikroalgi rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis* u različitim tehnološkim sustavima
2. Laboratorijskom analizom uzoraka kulture algi iz rodova *Nannochloropsis* i *Isochrysis* istražiti njihove karakteristike nužne za preliminarnu procjenu energetske potencijale za proizvodnju biodizela i bioplina od ostataka proizvodnje biodizela.

2. Proizvodnja biogoriva od mikroalgi

2.1. Biogoriva od mikroalgi

Biogoriva predstavljaju alternativni izvor energije koja koriste različite države svijeta za djelomičnu zamjenu uporabe fosilnih goriva, kao primjerice Brazil koji proizvodi biogoriva prvenstveno od šećerne trske. Također dijelovi Azije koriste palmino ulje kao sirovinu, dok su u slučaju biogoriva proizvedenih iz mikroalgi vodeće zemlje Brazil, Japan, Kina i Sjedinjene Američke Države (Zhu i sur., 2015; Aratboni i sur., 2019). Biomasa mikroalgi dobiva sve veću pozornost kao potencijalna sirovina za održivu i proizvodnju biogoriva iz obnovljivih izvora. Općenito, mikroalge su svestrane vrste jer se mogu održati i nastaviti rasti čak i u nepovoljnim uvjetima okoliša s niskom koncentracijom hranjivih tvari (Suresh, 2019.;Peter i sur., 2021.).

Interes za proizvodnju bioplina iz mikroalgi započeo je prije 60 godina međutim, prva zabilježena istraživanja pokazala su niske prinose bioplina koji se mogu pripisati dvama glavnim razlozima: (i) strukturom staničnih stijenki mikroalgi, koja ograničava pristup mikroorganizmima za biorazgradnju organskih tvari i (ii) niskom omjeru ugljika i dušika (C/N) koji često dovodi do nakupljanja amonijaka i u konačnici inhibira rast metanogenih bakterija tijekom procesa proizvodnje bioplina. Iako anaerobna digestija (AD) predstavlja jednostavan put za dobivanje energije iz biomase mikroalgi, proizvodnja biodizela ili visokovrijednih proizvoda iz mikroalgi i dalje je predmet brojnih istraživanja. Naime, visoki operativni troškovi i troškovi potrošnje energije glavne su prepreke komercijalizaciji ovog procesa te je potrebna njegova optimizacija (Slika 2.1.1.) (Vargas-Estrada i sur., 2021.).



Slika 2.1.1. Prikaz procesa za uzgoj mikroalgi i proizvodnju biogoriva

Izvor: Kumar, 2021.

2.1.1. Proizvodnja biodizela

Biodizel se dobiva iz triacilglicerola dugih masnih kiselina u obliku mono-alkil estera koji se podvrgavaju transesterifikaciji ili esterifikaciji u prisutnosti alkohola (metanola). Ima slične karakteristike kao i fosilni dizel u smislu viskoznosti, energetskeg sadržaja, cetanskog broja i faznih promjena. Zbog ove sličnosti, lako se može umješavati s fosilnim dizelom kako bi se koristio u konvencionalnim dizelskim motorima. Velika prednost biodizela od mikroalgi, u odnosu na biodizel prve generacije, su poboljšana fizikalna svojstva koja uvjetuju bolju kvalitetu izgaranja u dizelskim motorima. U tablici 2.1.1.1. navedene su tehničke i ekološke prednosti biodizela. Cetanski broj označava kvalitetu goriva i za biodizel je u usporedbi s konvencionalnim dizelom veći i iznosi 52,4. Nadalje, motorno ulje pri upotrebi biodizela može se koristiti nakon preporučene kilometraže te modifikacija motora nije potrebna. Također biodizel ima ekološku prednost radi manjih emisija ispušnih plinova (Hassain i sur., 2020.).

Ukupna svjetska proizvodnja biodizela procijenjena je na oko 1,8 milijardi litara 2003. godine. Strukturna karakteristika biodizela određuje da je biodizel izvediva zamjena za konvencionalnu energiju. Ipak, trošak njegove proizvodnje još uvijek je visok. Cijena biodizela je bila otprilike dvostruko veća od cijene konvencionalnog dizela u 2010. godini. Trošak njegove proizvodnje sastoji se od dvije glavne komponente: cijene sirovina (masti i ulja; u ovom slučaju mikroalgi) i cijene prerade (Huang i sur., 2010.). Očekuje se da će tržišta biogoriva i dalje biti pod velikim

utjecajem nacionalnih politika potpore i potražnje za fosilnim gorivima. Predviđa se da će cijene biodizela pasti nakon 2024. godine (OECD/FAO, 2021).

Tablica 2.1.1.1. Tehničke i ekološke prednosti biodizela

DESKRIPCija	PREDNOSTI
CETANSKI BROJ	52,4 za biodizel; 37,7 za dizel iz Europe.
MOTORNO ULJE	Može se koristiti nakon preporučene kilometraže.
EMISIJA ISPUŠNIH PLINOVA	Mnogo čistije (smanjenje sadržaja ugljikovodika, CO, CO ₂ , SO ₂).
MODIFIKACIJA KONVENCIONALNOG DIZEL MOTORA	Nije potrebna
PERFORMANSE/IZVEDBA MOTORA	Dobra
POKRETANJE MOTORA	Kratko i jednostavno

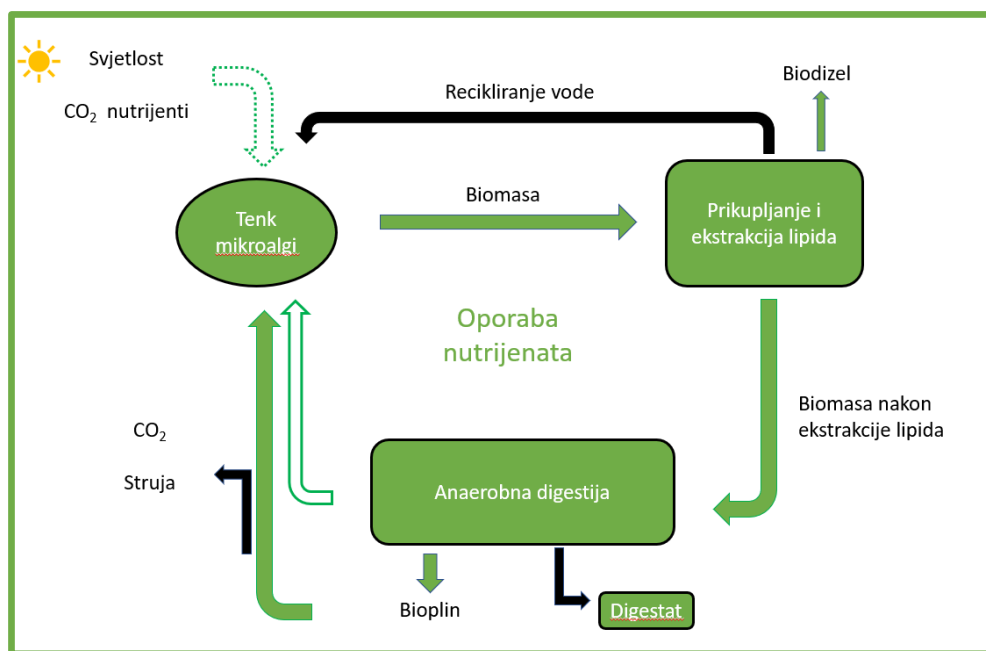
Izvor: Hassain i sur., 2020.; Yatish i sur., 2018.

2.1.2. Proizvodnja bioplina

Bioplin se smatra jednim od najperspektivnijih biogoriva koji ima potencijal za ublažavanje, u određenoj mjeri, rastuće zabrinutosti oko fosilnih goriva. To je mješavina uglavnom metana (CH₄) i ugljikovog dioksida (CO₂), koji se nakon pročišćavanja do CH₄ može koristiti za proizvodnju topline ili električne energije, ukapljivanje u metanol, kompresiju u gorivo za automobile i pročišćavanje u dovodni plin. Procesom AD uz bioplin dobiva se i kruti organski ostatak bogat dušikom zvan digestatom (Zabed i sur., 2020.).

AD se koristi kao tretman otpadnih voda od 1950-ih, ali u posljednjih nekoliko desetljeća korištena je kao potencijalna tehnologija za proizvodnju energije (Vargas-Estrada i sur., 2021.). Bioplin se može proizvesti iz različitih izvora biomase, uključujući mikroalge, odnosno neiskoristive dijelove nakon izdvajanja masti pri proizvodnji biodizela. Anaerobna digestija je ključni korak u stvaranju bioplina, koji je vrlo star i prirodan biološki proces. U AD, organske komponente se razgrađuju u bioplin djelovanjem različitih mikroorganizama odnosno bakterijskih i arhealnih vrsta bez prisutnosti kisika (Harun i sur., 2010.). Mikroorganizmi rade zajedno kako bi razgradili složene organske tvari u jednostavne i kemijski stabilne spojeve, kroz niz biokemijskih reakcija, uključujući hidrolizu, acidogenezu, acetogenezu i metanogenezu (González-González i sur., 2018.). Biomasa mikroalgi je prikladan supstrat za anaerobnu digestiju jer mineralni sastav stanica mikroalgi odgovara potrebama anaerobnih bakterija za hranjivim tvarima (Sialve i sur., 2018.).

Na Slici 2.1.2.1. shematski je prikazan primjer modela integrirane zatvorene proizvodnje biodizela i bioplina korištenjem mikroalgi. Dijagram prikazuje minimalne inpute u integriranom sustavu za proizvodnju biodizela i bioplina. U ovom sustavu lipidi se ekstrahiraju iz koncentrirane biomase dok se voda ponovno koristi za ponavljanje uzgoja algi. Odmašćena biomasa koristi se kao supstrat za anaerobnu digestiju za proizvodnju bioplina. Biometan se spaljuje za proizvodnju električne energije potrebne za održavanje samog sustava, dok se hranjive tvari i CO₂ recikliraju. Tekuća faza digestata koristi se kao kultura za alge, a čvrsta faza se može koristiti kao gnojivo za tlo. Recikliranje hranjivih tvari istaknuto je zelenom bojom (González-González i sur., 2018.).



Slika 2.1.2.1. Shematski prikaz integrirane proizvodnje biodizela i bioplina od mikroalgi

Izvor: González-González i sur., 2018.

2.2. Uzgoj mikroalgi za proizvodnju goriva

Mikroalge su raznolika skupina jednostaničnih organizama koje žive u morskom i slatkovodnom okruženju. Njihov fotosintetski mehanizam sličan je biljkama na kopnu, a zbog jednostavne stanične strukture i činjenice da su suspendirane u vodenom okruženju, gdje imaju direktan pristup vodi, ugljičnom dioksidu (CO₂) i hranjivim tvarima, učinkovitije su u pretvorbi sunčeve energije u biomasu (Gouveia, 2011.).

Uzgoj mikroalgi prvenstveno se donedavno koristio u proizvodnji hrane za rast i razvoj ličinki riba i školjkaša u mrijestilištima zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i zbog mogućnosti postizanja visoke gustoće kultura u relativno kratkom vremenskom periodu. Međutim isti

principi uzgoja mikroalgi, s manjim naglaskom na nutritivne vrijednosti, mogu se koristiti za proizvodnju biogoriva (Gavrilović i sur., 2021.; Hoff i Snell, 1993.).

Prilikom uzgoja, alge zahtijevaju neprekidno osiguranje optimalnih uvjeta potrebnih za rast. Postoji nekoliko čimbenika koji utječu na rast algi (Mata i sur., 2010.):

- abiotički čimbenici kao što su svjetlost (kvaliteta, količina), temperatura, koncentracija hranjivih tvari, O₂, CO₂, pH, salinitet i otrovne kemikalije
- biotički čimbenici kao što su patogeni (bakterije, gljivice, virusi) i konkurencija drugih algi
- operativni čimbenici kao što su optimalno miješanje kulture pri čemu sve mikroalge jednako izlažu izvoru svjetlosti, brzina razrjeđivanja, dubina, učestalost i faza iskorištavanja (pobiranja) i dodavanje bikarbonata.

Kao i sve biljke, mikroalge fotosintetiziraju, tj. asimiliraju anorganski ugljik za pretvaranje u organsku tvar. Svjetlost je izvor energije koji pokreće ovu reakciju te treba uzeti u obzir intenzitet svjetlosti, spektralnu kvalitetu i fotoperiodnost mikroalgi. Intenzitet svjetlosti igra važnu ulogu, ali zahtjevi se uvelike razlikuju s dubinom i veličinom uzgojnog prostora, te gustoćom algi. Naime, na većim dubinama i koncentracijama stanica intenzitet svjetla se mora povećati da prođe kroz kulturu (Lavens i Sorgeloos, 1996.). Izvori svjetla mogu biti sunčeva svjetlost, fluorescentna svjetla, diode koje emitiraju svjetlost (LED) i drugo (Price i Farag, 2013.).

Temperatura je najvažniji ograničavajući faktor, nakon svjetlosti, za uzgoj algi u zatvorenim i otvorenim vanjskim sustavima (Mata i sur., 2010.). Optimalan uzgoj mikroalgi zahtijeva klimatiziran prostor, sa stabilnom temperaturom, tako da toplinska amplituda omogućuje aktivnosti koje su nužne stanicama. Atmosfera mora imati kontrolirani pristup kako bi se smanjila izmjena topline i kontaminacija te ujedno kultura snabdijela potrebnom količinom CO₂. Budući da temperatura utječe na brzinu metabolizma organizama, mora se odabrati prema vrsti koja se uzgaja i ovisno o čemu uzgoj služi (Cruz i sur., 2018.).

Morski fitoplankton izuzetno je tolerantan na promjene saliniteta. Većina vrsta najbolje raste na koncentraciji saliniteta koja je nešto niža od one u njihovom prirodnom staništu. Dobiva se razrjeđivanjem morske vode s pitkom vodom (Price i Farag, 2013.). Pri tome morska voda mora proći kroz mehanički filter, zatim se sterilizira UV svjetlom i/ili klorira/deklorira natrijevim tiosulfatom (Gavrilović i sur., 2021.).

U donjoj tablici (tablica 2.2.1.) uspoređeni su određeni optimalni uvjeti za uzgoj mikroalgi *I. galbana* i *N. oculata* koje su proučavane u ovom istraživanju.

Tablica 2.2.1. Optimalna temperatura, svjetlost i salinitet za uzgoj *I. galbana* i *N. oculata*

Vrsta	Temperatura (°C)	Jačina svjetlosti (luks)	Salinitet (ppt)
<i>Isochrysis galbana</i>	25 - 30	2.500 - 10.000	10 - 30
<i>Nannochloropsis oculata</i>	20 - 30	2.500 - 8.000	0 - 36

Izvor: Hoff i Snell, 1993.

Raspon pH za većinu uzgojenih vrsta algi je između 7 i 9, s optimalnim rasponom od 8,2 do 8,7 ovisno o vrsti mikroalge. Potpuni kolaps kulture zbog poremećaja brojnih staničnih procesa može biti rezultat neuspjeha u održavanju prihvatljivog pH koji raste fotosintetskim aktivnostima algi, a opada prilikom dodavanja određenim nutrijenata poput ugljikovog dioksida. Dodavanje ugljikovog dioksida i natrijevog bikarbonata povisuje eksponencijalni rast ali samo ako je dolazak svjetla konstantan. Ukoliko prozračivanje (prirodna aeracija) nije dovoljna, može se dodati tekući CO₂ injektiranjem u aeracijske cijevi ili dodavanjem u obliku tableta (Gavrilović i sur., 2021.).

Dodavanje nutrijenata odnosno hranjivih tvari ima jako važnu ulogu kada se alge uzgajaju za ishranu školjkaša i ličinki. Pomoću dodavanja nutrijenata mikroalge kao hrana dobivaju na nutritivnoj vrijednosti što je važno kod ishrane zooplanktona ili ličinki. U uzgoju mikroalgi za proizvodnju biodizel potrebno je osigurati dovoljno nutrijenata za kontinuirani optimalni rast i razvoj i optimalne količine lipida u algama kako bi se proizvelo što više ulja. Za rast mikroalgi, glavne nutritivne tvari su dušik (N) i fosfor (P). Tijekom uzgoja, N i P predstavljaju ograničavajuće faktore. Oni zajedno sudjeluju u upravljanju proizvodnje lipida i brzini rasta mikroalgi. Znači, rast, razmnožavanje i ostali fiziološki procesi su pod jakim utjecajem dušika, koji je jedan od bitnih elemenata. Fosfor je još jedna nužna komponenta važna u uzgoju mikroalgi (Enamala i sur., 2018.).

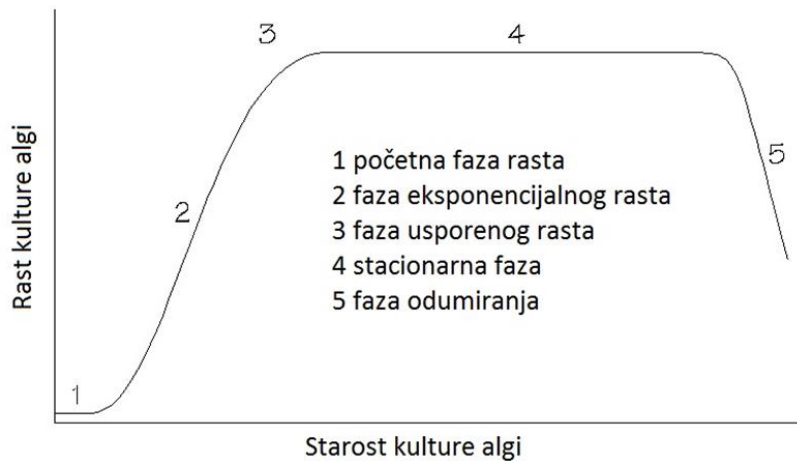
Također od visoke je važnosti stalno održavanje higijene uzgojnog prostora i medija kako ne bi došlo do kontaminacije. Mikroalge kao i svi mikroorganizmi su jako osjetljive i vrlo lagano se kontaminiraju, bilo drugim algalnim kulturama koje se uzgajaju u istom prostoru ili pak bakterijama, parazitima i gljivicama (Gavrilović i sur., 2021.).

Uzgoj mikroalgi započinje od inokulacije i stvaranja početnih čistih kultura (250 mL) koje se dobivaju iz matičnih kultura. Kada populacije početnih kultura dostignu stacionarnu fazu nakon 7 – 14 dana iz njih se razvijaju supkulture većeg volumena (2 – 5 l). One se daljnjim razvojem i dostizanjem stacionarne faze, rasađuju u veće volumene, najčešće u tankove, vreće, cilindre većih uzgojih volumena (iznad 50 l) (Gavrilović i sur., 2021.).

Za optimalan uzgoj potrebno je poznavati dinamiku rasta mikroalgi. Rast kulture mikroalgi može se podijeliti u pet razvojnih faza (Slika 2.2.1.) (Lavens i Sorgeloos, 1996.):

- 1) Faza indukcije/ lag faza
- 2) Eksponencijalna faza

- 3) Faza usporavanja rasta
- 4) Stacionarna faza
- 5) Faza odumiranja/smrti



Slika 2.2.1. Faze rasta uzgajanih mikroalgi

Izvor : Price i Farag, 2013.

U lag fazi koja slijedi odmah nakon inokulacije, rast je odgođen zbog prisutnosti neživih stanica ili fizioloških prilagodbi inokulata novoj uzgojnoj sredini. U toj fazi stanice prvenstveno rastu samo veličinom. Zaostajanje u rastu populacije pripisuje se fiziološkoj prilagodbi staničnog metabolizma rastu, primjerice povećanoj razini enzima i metabolita koji sudjeluju u diobi stanica i fiksaciji ugljika (Lavens i Sorgeloos, 1996.). Nakon toga slijedi eksponencijalna faza, u kojoj se populacija brzo umnožava. Tijekom tog razdoblja intenzitet svjetlosti i hranjive tvari ne ograničavaju rast mikroalgi. Specifična stopa rasta uglavnom ovisi o vrsti algi, intenzitetu svjetlosti i temperaturi. U fazi usporavanja rasta, dioba stanica mikroalgi se usporava jer svjetlost postaje ograničavajuća, pa se biomasa mikroalgi akumulira konstantnom brzinom sve dok hranjive tvari ili inhibitori u mediju kulture ne postanu ograničavajući čimbenici. Fazu opadanja/usporenog rasta karakterizira smanjenje stope diobe stanica zbog ograničavajućih čimbenika, kao što su hranjive tvari, CO₂ i drugi. U četvrtoj fazi odnosno stacionarnoj fazi ograničavajući faktor i stopa rasta su u ravnotežni, što rezultira u relativno konstantnoj gustoći stanica. Brzina rasta doseže nulu u stacionarnoj fazi jer su hranjive tvari iscrpljene. Koncentracija stanica mikroalgi brzo opada u fazi smrti zbog iscrpljivanja hranjivih tvari, pregrijavanja, poremećaja pH vrijednosti ili kontaminacije (Lee i sur., 2015.).

Ključ uspjeha proizvodnje algi je održavanje svih kultura u eksponencijalnoj fazi rasta. Štoviše, nutritivna vrijednost proizvedenih algi je inferiorna nakon što je kultura prošla treću fazu zbog smanjene probavljivosti, deficita u kemijskom sastavu i moguće proizvodnje toksičnih metabolita (Lavens i Sorgeloos, 1996.). Potrebno je naglasiti da na početku stacionarne faze mikroalge imaju najvišu nutritivnu vrijednost, te je daljnjim stajanjem kulture gube na kvaliteti (Gavrilović i sur., 2021.).

2.2.1 Uzgojni sustavi za proizvodnju mikroalgi

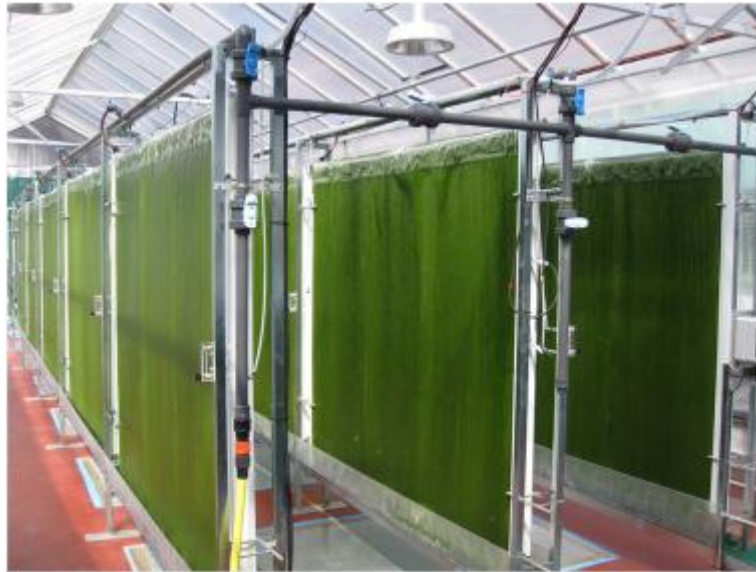
Uzgojni sustavi baziraju se početno na laboratorijskom uzgoju te kasnije mogu prerasti u industrijski uzgoj velikih razmjera. Razlikujemo više sustava proizvodnje koji se prvenstveno dijele na (i) otvorene sustave koji mogu biti umjetni ili integrirani u prirodu i (ii) zatvorene sustave (fotobioreaktori). Također je moguća kombinacija otvorenih i zatvorenih sustava, međutim puno rjeđe radi moguće kontaminacije u otvorenim sustavima (Cruz i sur., 2018.).

Zatvoreni sustavi su kontrolirani sustavi visokog prinosa koji omogućuju optimalni pristup svjetlosti i savršeno miješanje kulture. Fotobioreaktori dolaze u različitim izvedbama, a najčešće se koriste cjevasti fotobioreaktori (Slika 2.2.1.1.). Mogu se izraditi i kao plastične ili staklene vrećice, spremnici ili tornjevi (Slika 2.2.1.2.). Iako je kontaminacija minimizirana, glavni nedostatak ovih kontroliranih sustava je njihova visoka cijena. Ostali izazovi uključuju pregrijavanje, nakupljanje kisika, biološko zarastanje, prekovremeno oštećenje stanica i drugo. Također kod određenih sustava uzgoja poput cjevastih tornjeva može doći do poteškoća prilikom održavanja higijene odnosno alge se mogu taložiti na stjenkama cijevi, koagulirati i raspadati. Ukoliko se cijevi ne mogu očistiti, svjetlost ne prodire kroz cijevi te je automatski rast algi usporen. Iako su početni i operativni troškovi puno veći od troškova otvorenih sustava, zainteresiranost za uzgoj u zatvorenim sustavima raste radi visokih prinosa i mogućnosti postizanja potpune kontrole uzgojnih uvjeta te uzgoja većeg spektra vrsta mikroalgi (Saad i sur., 2019.). U ovim sustavima umjetno se uključuje izvor svjetlosti, upuhuju plinovi i automatski dodaju hranjivi mediji. Pravilnim upravljanjem zatvorenim sustavom može se uspostaviti kontinuirana produkcija mikroalgi (Gavrilović i sur., 2021.).



Slika 2.2.1.1. Zatvoreni sustav uzgoja - cjevasti fotobioreaktor

Izvor: Jerney i Spilling, 2018.

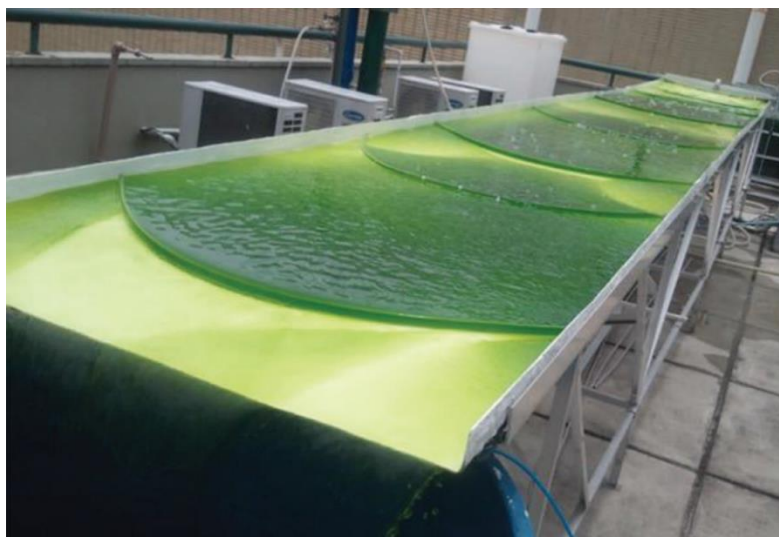


Slika 2.2.1.2. Zatvoreni sustav uzgoja - pločasti bioreaktor

Izvor: Martín-Girela i sur., 2017.

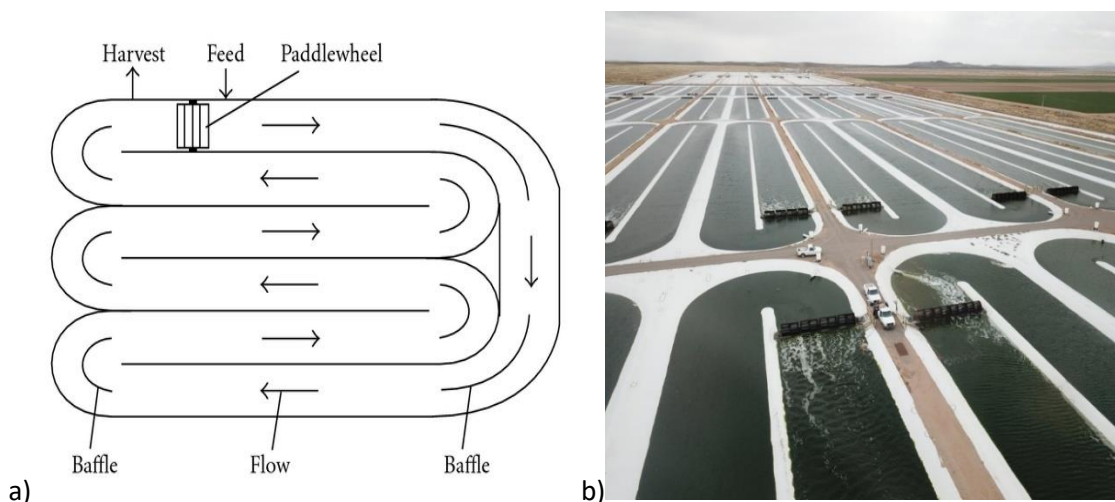
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926417300310>)

S druge strane, otvoreni sustavi (Slika 2.2.1.3.) su financijski povoljniji, ali je manja mogućnost kontroliranja uzgojnih uvjeta od zatvorenih sustava. Objekti otvorenih sustava se razlikuju po veličini, dizajnu i obliku. U komercijalnom uzgoju algi korišteni su kružni i kanalski bazeni. Najčešće korišteni oblici su „*open ponds*“ i „*raceways*“ (Slika 2.2.1.4.), odnosno jezera, lagune, prirodni vodotoci, umjetno iskopani bazeni i kanali. Spomenuti tankovi (*open ponds*, *raceways*) općenito su plitki, izrađeni od betona, stakloplastike ili polikarbonata, sa slojem zemlje na dnu ili obloženi plastičnim materijalom, gdje se kulture održavaju u stalnoj cirkulaciji pomoću turbine ili miješalice. Drugi dobro poznati otvoreni sustav uzgoja je kaskadni model. Ovdje je kultura u tankom sloju od otprilike 1 cm izložena sunčevoj svjetlosti koja omogućuje staničnu gustoću do 10 g/L. Volumen od oko 20.000 t mikroalgi godišnje se smatra početnim prinosom u proizvodnji biogoriva (Cruz i sur., 2018.). Godine 2018. je 95 % ukupne proizvodnje mikroalgi bilo u otvorenim sustavima. Jedna od glavnih značajki otvorenih sustava je njihova sposobnost iskorištenja atmosferskog CO₂. Položaj otvorenog sustava je vrlo važan kriterij jer utječe na dostupnost sunčeve svjetlosti, temperaturu, isparavanje i kontaminaciju koji su veliki ograničavajući čimbenici prilikom uzgoja na otvorenome (Saad i sur., 2019.).



Slika 2.2.1.3. Otvoreni sustav uzgoja – Kaskadni model tankog sloja

Izvor : Cruz i sur., 2018.



Slika 2.2.1.4. a), b) Otvoreni sustav uzgoja „demo raceways“

Izvor: a) Hosikian i sur., 2010. (https://www.researchgate.net/figure/Raceway-pond-for-open-air-microalgae-cultivation-extracted-from-3_fig4_44850233); b) <https://www.energy.gov/eere/bioenergy/algal-production>

Uzgoj mikroalgi moguće je koristiti i za smanjenje emisije plinova i prečišćavanje otpadnih voda. Alge mogu učinkovito ukloniti dušik, fosfor i teške metale kao što su As, Cd i Cr iz vodenih otopina. Budući da su kontrola emisija plinova i prečišćavanje otpadnih voda skupi i tehnički zahtjevni problemi u današnjem svijetu, korištenje otpadnih voda kao izvor hranjivih tvari za proizvodnju algi, zajedno s pročišćavanjem otpadnih voda, dodane su ekološke i ekonomske koristi (Patil i sur., 2008.). Teški metali kao što su krom (Cr), kadmij (Cd), arsen (As), olovo (Pb), živa (Hg) itd. su kancerogeni i toksični za ljude čak i u tragovima. Nadalje, oko 17-20 % onečišćenja vode pripisuje se bojama tekstilne industrije, a neke od boja su vrlo otrovne,

mutagene i kancerogene. Stoga istraživači istražuju mikroalge kako bi prevladale onečišćenje otpadnih voda i stvaranje biogoriva na bazi algi (Kumar, 2021.).

Uzgoj *Nanocloropsis* sp. u otpadnoj vodi radi eliminacije dušika uz nje uz uklanjanje CO₂ iz dima također su istraživan u nekoliko studija. Ove ekološki korisne primjene mogu se povezati s proizvodnjom lipida, što predstavlja mogući smjer prema isplativoj proizvodnji lipida pomoću mikroalge *Nanocloropsis* sp. (Ma i sur., 2016.). Sličan su primjer opisali i za uzgoj *Isochrysis galbana* u otpadnoj vodi od uzgoja ribe (Đođo i sur. 2022).

Uzgojem mikroalgi u otpadnim vodama može se spriječiti eutrofikacija, čime se poboljšava kvaliteta efluenta odnosno otpadne vode. Naime, kombiniranjem pročišćavanja otpadnih voda s proizvodnjom biogoriva, trošak biogoriva, kao i opasnosti za okoliš, mogu se svesti na minimum. Integriranjem korištenja otpadne vode u uzgoju mikroalgi dolazi do opskrbe besplatnim i već dostupnim hranjivim tvarima i vodom (Jayaseelan i sur., 2021.).

Uz očitu korist od kombiniranja biomase mikroalgi, a time i biogoriva, proizvodnje i pročišćavanja otpadnih voda, uspješna provedba ove strategije omogućila bi minimiziranje korištenja slatke vode, još jednog dragocjenog resursa posebno za suhe ili naseljene zemlje, za proizvodnju biogoriva. Glavni problem povezan s korištenjem otpadnih voda za uzgoj mikroalgi je kontaminacija. Time se može upravljati korištenjem odgovarajućih tehnologija predobrade za uklanjanje sedimenta i steriliziranje otpadne vode (Li i sur., 2008.).

2.2.2. Odabir vrste mikroalgi za proizvodnju biogoriva

Odabir vrsti mikroalgi za biogorivo temelji se na prilagodljivosti algi na okolnu klimu, kao i na produktivnosti biomase algi (Venteris i sur. 2014.; Peter i sur., 2021.). Mikroalge mogu rasti u otpadnoj vodi koja osigurava hranjive tvari kao što su dušik i fosfor, uz visoku proizvodnju biomase (Vargas-Estrada i sur., 2021.). Mata i sur. (2010.) identificirali su preko 40 vrsta mikroalgi sposobnih akumulirati sadržaj lipida u rasponu od 2 do 75 % mase (Wiley i sur., 2011.). Mikroalge se mogu klasificirati na temelju njihove osnovne stanične strukture, životnog ciklusa i pigmentacije. Međutim, prema taksonomskoj klasifikaciji najčešće upotrebljavane su (Hassain i sur., 2020.):

- zelene mikroalge (Chlorophyceae),
- dijatomeje (Bacillariophyceae), i
- zlatne mikroalge (Chrysophyceae).

2.2.2.1. *Nannochloropsis* sp.

Chlamydomonas reinhardtii je najviše proučavana mikroalga u posljednjih nekoliko desetljeća. Iako *Chlamydomonas* trenutno predstavlja najbolji model za istraživanje lipida mikroalgi, nije vjerojatno da će postati kandidat za proizvodnju biogoriva zbog svog prirodno nižeg potencijala nakupljanja lipida. Stoga su nedavno drugi rodovi mikroalgi, poput *Nannochloropsis* sp. s većim potencijalom za proizvodnju lipida, bili premet istraživanja. (Liu i sur., 2017.).

Rod *Nannochloropsis* je široko rasprostranjen u oceanima i kopnenim vodama diljem svijeta. Ima značajnu ulogu u globalnim ciklusima ugljika i minerala. Ova mikroalga bogata je proteinima, pigmentima i višestruko nezasićenim masnim kiselinama, a obično se koristi u akvakulturi kao hrana za životinje (Hamidi i sur., 2014.). Rod mikroalgi *Nannochloropsis* potiče sve veći interes istraživača zbog svoje sposobnosti da sintetizira ne samo neutralne lipide za proizvodnju biogoriva, primjerice biodizela, već i korisne spojeve poput eikozapentaenske kiseline (EPA) za proizvodnju funkcionalne hrane.

Nannochloropsis sp. predstavljaju jednostanične mikroalge koje pripadaju razredu Eustigmatophyceae, redu Eustigmataceae i porodici Monodopsidaceae (Ma i sur., 2016.).

Rod *Nannochloropsis* sp. obuhvaćao je šest poznatih vrsta (Ma i sur., 2016.) od kojih su dvije u novije vrijeme taksonomski svrstane u rod *Microchloropsis* sp. (WoRMS, 2022.):

- *Microchloropsis gaditana*, - morske vode
- *Nannochloropsis granulata*, - morske vode
- *Nannochloropsis limnetica* – kopnene vode
- *Nannochloropsis oceanica* - morske vode
- *Nannochloropsis oculata* – eurihaline (kopnene, morske i brakične vode)
- *Microchloropsis salina* – morske vode.

Postoje prednosti i ograničenja upotrebe *N. oculata* kao sirovine za biogorivo. Uvjeti uzgoja (npr. nebiotički čimbenici i biotički čimbenici) ovog roda značajno utječu na akumulaciju biomase i profile masnih kiselina. Međutim, treba uzeti u obzir da su manipulacije uzgojnim uvjetima radi povećanja sadržaja lipida u praksi štetne za rast (kao što je gladovanje) i možda nisu poželjne. Mnoga pitanja vezana uz metabolizam lipida su još uvijek nejasna, a daljnja istraživanja su još uvijek potrebna za njegovu primjenu u industrijskim razmjerima (Liu i sur., 2017).

Rast vrsta rodova *Nannochloropsis* i *Microchloropsis* može se poboljšati duljim svjetlosnim razdobljem, kontrolom pH i dodatkom ureje kao dodatnog izvora dušika. Rod *Nannochloropsis* je dobro poznat kao izvor različitih vrijednih pigmenata, kao što su klorofil a, zeaksantin, kantaksantin i astaksantin, koji se proizvode u velikim količinama. *N. oculata* je također prepoznat i kao dobar potencijalni izvor EPA, važne višestruko nezasićene masne kiseline za prehranu ljudi za prevenciju nekoliko bolesti (Rocha i sur., 2003).

Mnogi atributi omogućuju *N. oculata* da bude snažna alternativna sirovina za biogorivo, bilo izravnim sagorijevanjem pri pravilnom rukovanju njegovih ostacima ili zajedničkim izgaranjem s drugim sirovinama biomase, koje imaju nizak sadržaj pepela, za smanjenje produkta pepela. (Hamidi i sur., 2014.).

2.2.2.2. *Isochrysis galbana*

Nekoliko je razloga zašto bi se mikroalge roda *I. galbana* mogle koristiti kao obećavajuća sirovina za proizvodnju biodizela. U prvom redu to što su morske alge te su prikladne za uzgoj u morskoj vodi, čime se izbjegava konkurencija za slatku vodu. Alge ovog roda također odlikuje brza stopa rasta te se u kratkom vremenu može proizvesti velika količina biomase. Prednost *I. galbana* predstavlja i odustvo debele stanične stijenke, tako da je ekstrakcija ulja mnogo lakša od drugih algi, što može znatno poboljšati ekonomičnost daljnje obrade za proizvodnju biodizela. Ističe se s time što ima visoke koncentracije dokozaheksaenske kiseline (DHA), vrijedne omega-3 polinezasićene masne kiseline sa značajnim nutritivnim i zdravstvenim prednostima. Stoga je vrlo moguće razviti integriranu proizvodnju biogoriva i proizvoda s dodanom vrijednošću iz mikroalgi ovog roda, a to je ključno za komercijalizaciju biodizela i bioplina baziranih na mikroalgama kao sirovini. Također sa stajališta biorafinerije, preostala biomasa dobivena nakon ekstrakcije ulja može se koristiti kao hrana za akvakulturu (Sun i sur., 2018.).

S gledišta kinetike rasta, s jednostavnim i jeftinim uzgojem hranjivih tvari, ova alga ima usporedivu stopu rasta s drugim vrstama algi. Posebnu pozornost treba posvetiti visokom udjelu Mg u ovoj biomasi jer bi mogao utjecati na neefikasnost prilikom izgaranja (Sukarni i sur., 2018.).

Alternativne primjene zaostale biomase mikroalgi, koje se pretvaraju u različite oblike goriva nakon ekstrakcije ulja, mogu pomoći u smanjenju ukupnih troškova proizvodnje.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Pokusi procjene energetskog potencijala čistih kultura mikroalgi *N. oculata* i *I. galbana* su provedeni u dvije faze. U prvoj fazi su u uzorcima (Slika 3.1.1.) koji su dopremljeni iz mrijestilišta Cromaris, tvrtke Cromaris d.d., 13. svibnja 2021., uz određivanje saliniteta medija i brojanje stanica u kulturi, određeni sadržaj vode i suhe tvari, količina pepela i sadržaj lipida. U drugoj fazi je, uz brojanje stanica, analiziran potencijal obje čiste kulture za proizvodnju bioplina na uzorcima (Slika 3.1.2.) dopremljenim iz tvrtke Aquarium Pula, 5. srpnja 2021.

Brojanje stanica u čistim kulturama mikroalgi provedeno je na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju, dok su ostale analize provedene u Laboratoriju za istraživanje biomase u poljoprivredi Zavoda za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport.



Slika 3.1.1. Uzorci čistih kultura *I. galbana* (lijevo) i *N. oculata* (desno) dopremljeni 13.05.2021.



Slika 3.1.2. Uzorci čistih kultura *N. oculata* (lijevo) i *I. galbana* (desno) dopremljeni 05.07.2021.

3.2. Metode

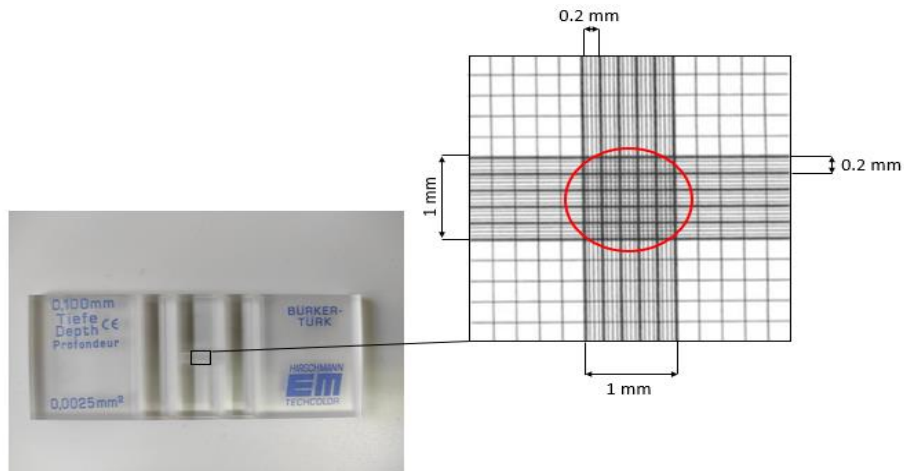
Istraživanje je provedeno u dva različita perioda, tijekom svibnja i srpnja 2021. godine. Sve su analize provedene u Laboratoriju za istraživanje biomase i energetske iskoristivosti u poljoprivredi. Mjerenje kemijske potrošnje kisika (KPK) je rađeno u vanjskom laboratoriju.

3.2.1. Mjerenje saliniteta medija s mikroalgama

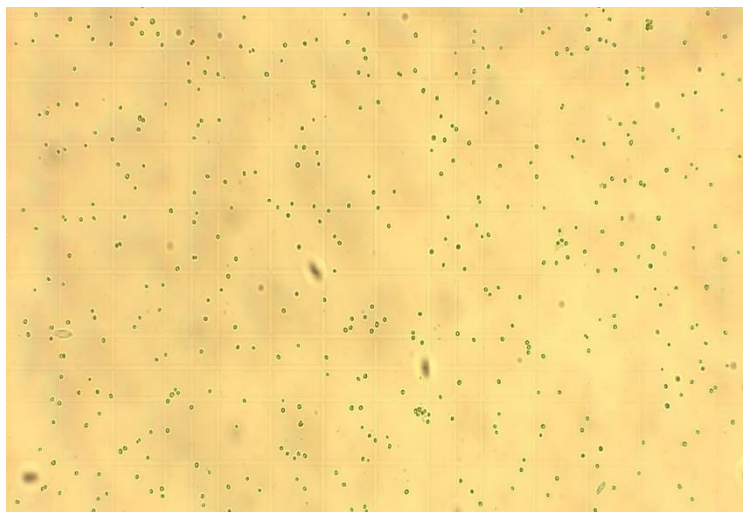
Salinitet medija s mikroalgama, odnosno prvotno električna provodljivost (mS/cm) mjerena je prema metodi ISO 7888:1985 pomoću ručnog konduktometra WTW Cond 720. Zatim se iz vodljivosti izražene u Ms/ cm preračunao salinitet u ppt (parts per thousand), $1 \text{ mS/ cm} = 0,493 \text{ ppt}$.

3.2.2. Određivanje broja stanica mikroalgi

Brojanje je provedeno mikroskopski pomoću hemocitometra (Slika 3.2.2.1; Slika 3.2.2.2.). Prije svakog brojanja mikroalge su fiksirane 4 %-tnim formaldehidom. Neposredno prije brojanja na hemocitometar je položeno pokrovno stakalce te je u žljeb hemocitometra pomoću Pasterove sterilne pipete dodana kap kulture. Stanice su brojane u osam rubnih i dva nasumična polja. Ovaj je postupak radi veće preciznosti ponavljan za svaku kulturu tri puta te je izračunat prosjek. Koncentracija algi u uzgojnom volumenu izračunata je prema formuli: $n/10 \times 250000 = \text{br. stanica/mL kulture}$ (Gavrilović i sur., 2021).



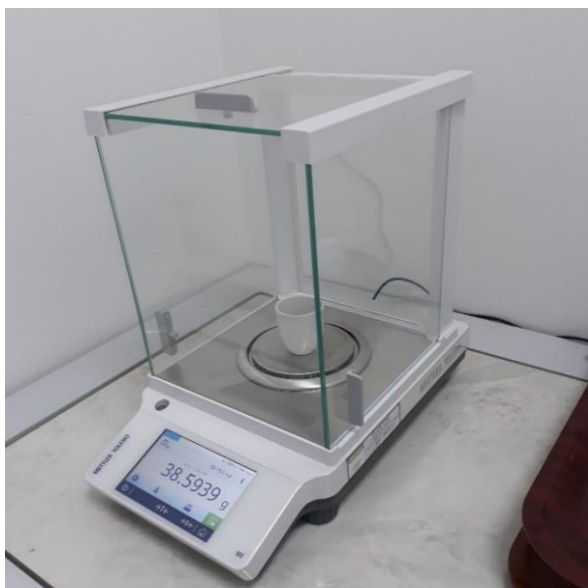
Slika 3.2.2.1. Hemocitometar s prikazom i dimenzijama komorice za brojanje (alge su brojane u središnjem zaokruženom dijelu mreže)



Slika 3.2.2.2. Brojanje mikroalgi na hemocitometru pod mikroskopom

3.2.3. Sadržaj vode i suhe tvari

Prilikom određivanja sadržaja vode sukladno HRN EN 18134-2:2015 metodi, prvo su vagani (Slika 3.2.3.1.) čisti prazni porculanski lončići. Prije prenošenja u lončice, uzorci su bili homogenizirani (promiješani) kako bi se dobili što reprezentativniji uzorci. Zatim je po 5 mL uzoraka medija s *N. oculata* i *I. galbana* prenijeto u lončice te su oni ponovo odvagani (Slika 3.2.3.2.). Analiza je provedena u tri ponavljanja, a sušenje (Slika 3.2.3.3.) je provedeno na temperaturi od 105 °C u atmosferskom zraku do postizanja konstantne mase.



Slika 3.2.3.1. Analitička vaga s četiri decimalna mjesta (Mettler Toledo, SAD)



Slika 3.2.3.2. Izvagani triplikati uzorka *N. oculata* u lončićima prije sušenja



Slika 3.2.3.3. Laboratorijska sušnica (Mettmert, Njemačka)

Nakon sušenja porculanski lončići su bili stavljeni u eksikator kako bi se ohladili na sobnu temperaturu. Kada su se ohladili ponovno je obavljeno vaganje. Sadržaj vode je izračunat na osnovu gubitka mase pomoću sljedeće formule:

$$\% \text{H}_2\text{O} = \frac{a-b}{m} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

a – masa porculanskog lončića s uzorkom prije sušenja (g)

b – masa porculanskog lončića s uzorkom nakon sušenja (g)

m – masa uzorka (g)

Budući da su mikroalge u uzorcima bile suspendirane u hranjivom mediju te se sadržaj vode u uzorku ne može pripisati samo sadržaju vode u mikroalgama, odredili smo masu suhe tvari koja se nalazila u pojedinačnom uzorku i odgovara suhoj masi algi:

$$M_{s.t.} \text{ u uzorku (g / mL) } = b - a$$

b - masa porculanskog lončića s uzorkom nakon sušenja (g)

a – masa praznog lončića (g)

3.2.4. Sadržaj pepela

Prilikom određivanja sadržaja pepela sukladno standardnoj metodi HRN EN ISO 18122:2015 korišteni su uzorci koji su nakon vaganja stavljeni u hladnu mufolnu peć (Slika 3.2.4.1.) gdje su spaljivani/žareni 4 – 5 sati. Nakon žarenja, lončići (Slika 3.2.4.2.) su nakon hlađenja odvagani.



Slika 3.2.4.1. Mufolna pećnica (Naberterm, Njemačka)



Slika 3.2.4.2. Uzorci *N. oculata* i *I. galbana* nakon žarenja

Sadržaj pepela je određen iz mase ostatka nakon spaljivanja uzorka do postizanja konstantne mase pomoću sljedeće formule:

$$\% \text{ pepeo}_{s.tv.} = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \times \frac{100}{100 - Mad} \dots\dots\dots(2)$$

m_1 – masa praznog lončića (g)

m_2 – masa lončića s uzorkom prije spaljivanja (g)

m_3 – masa lončića s uzorkom nakon spaljivanja (g)

M_{ad} – % H₂O u uzorku prije žarenja

3.2.5. Priprema i određivanje sadržaja masti

Uzorci *N. oculata* (120 mL) i *I. galbana* (120 mL) bili su povrgnuti centrifugiranju (Slika 3.2.5.1) u kivetama koje su centrifugirane 15 minuta na brzini od 6 000 rpm. Prilikom centrifugiranja došlo je do razaranja staničnih stjenki mikroalgi (Slika 3.2.5.2.) te su oslobođeni lipidi. Voda, talog mikroalgi i lipidne komponente su se odvojile tako da se ulje nalazilo na površini vode, dok se talog nalazio na dnu kivete.

Nakon pripreme, zajedno sa otapalom (reciklirani petrolej), uzorci su stavljeni u sustav za zatvorenu digestiju, ekstrator Soxhlet R304, po metodi HRN ISO 6492:2001 (Slika 3.2.5.3.). Tijekom digestije nastala je mješavina petroleja i ulja unutar tikvica. Tikvice sa mješavinom su potom stavljene u laboratorijsku sušnicu, kako bi ishlapio petrolej i ostalo samo ulje te vagane.



Slika 3.2.5.1. Centrifuga 3500 rpm (Tehtnica)



Slika 3.2.5.2. Dobiveni uzorci nakon centrifugiranja



Slika 3.2.5.3. Sustav za zatvorenu digestiju (Ethos D, Milestone)

3.2.6. Utvrđivanje bioplinskog potencijala

Utvrđivanje potencijala istraživanih mikroalgi za proizvodnju bioplina provedeno je na dva načina: (1) procesom anaerobne digestije uzoraka u laboratorijskom bioreaktoru i (2) teorijski, određivanjem kemijske potrošnje kisika (KPK).

3.2.6.1. Anaerobna digestija

Uzorci *N. oculata* (720 mL) i *I. galbana* (720 mL) bili su podvrgnuti centrifugiranju, nakon čega je dodan petrolej kako bi se ekstrahiralo ulje iz kiveta tako da ostane samo talog i malo vode. Ovom pripremom uzorka simulirano je dobivanje ostataka taloga mikroalgi nakon digestije i ekstrakcije ulja. Dobiveni uzorci su, zajedno s inokulumom ubačeni u laboratorijski bioreaktor (CROTEH, Hrvatska; Slika 3.2.6.1.1.).



Slika 3.2.6.1.1. Laboratorijski reaktor za fermentaciju (CROTEH)

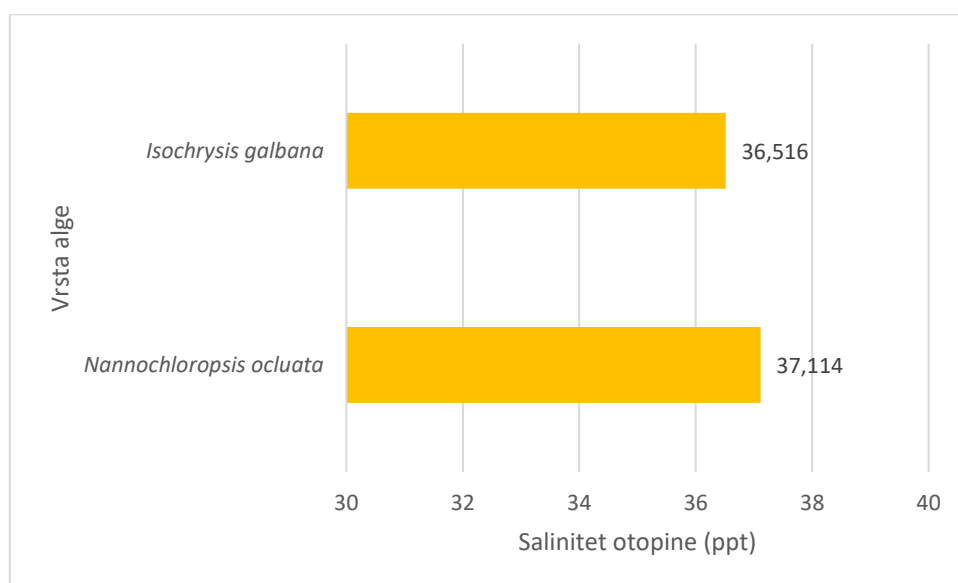
3.2.6.2. Teorijsko određivanje bioplinskog potencijala

Bioplinski potencijal je utvrđen prema standardnoj metodi ISO 6060:1989. Uzorci su pripremljeni istovjetno kao i za potrebe anaerobne digestije.

4. Rezultati

4.1. Salinitet medija s kulturom mikroalgi

Vrijednosti saliniteta hranjivog medija s kulturom *N. oculata* i *I. galbana* u uzorcima iz svibnja prikazane su na Grafikonu 4.1.1..



Grafikon 4.1.1. Usporedba saliniteta (ppt) hranjivog medija s kulturom mikroalgi rodova *N. oculata* i *I. galbana*

4.2. Broj stanica mikroalgi

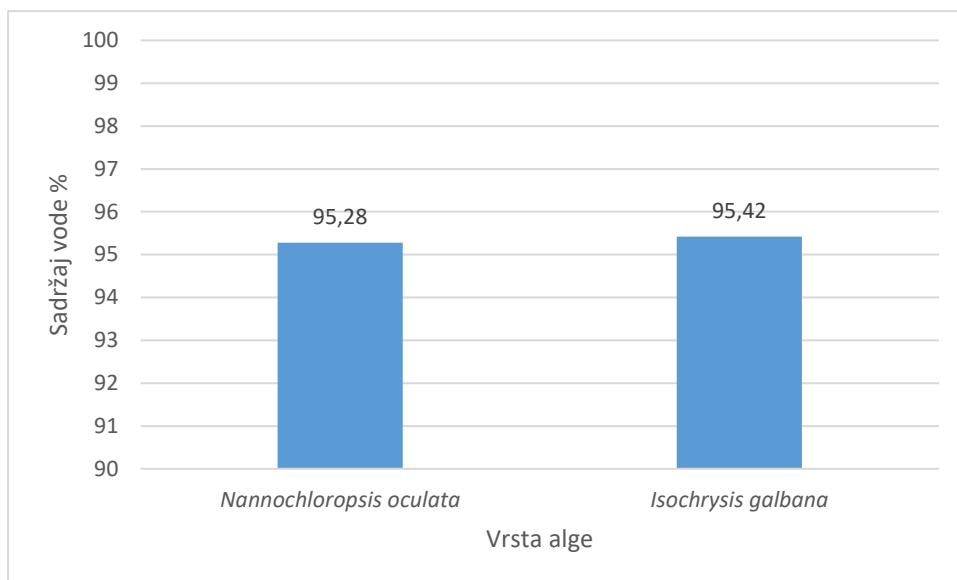
U tablici 4.2.1. je prikazan broj stanica u mL. U obje faze uzorkovanja dostavljene mikroalge bile su u eksponencijalnoj fazi rasta. Iako su bile u istoj fazi, iz podataka je vidljivo da je kultura druge skupine uzoraka bila starija te imala veću biomasu u mL.

Tablica 4.2.1. Broj stanica *N. oculata* i *I. galbana*

Datum dopremanja u laboratorij	<i>Nannochloropsis oculata</i> (broj stanica/mL)	<i>Isochrysis galbana</i> (broj stanica/mL)
13.5.2021.	2 015 000	1 128 000
5.7.2021.	4 918 000	6 350 000

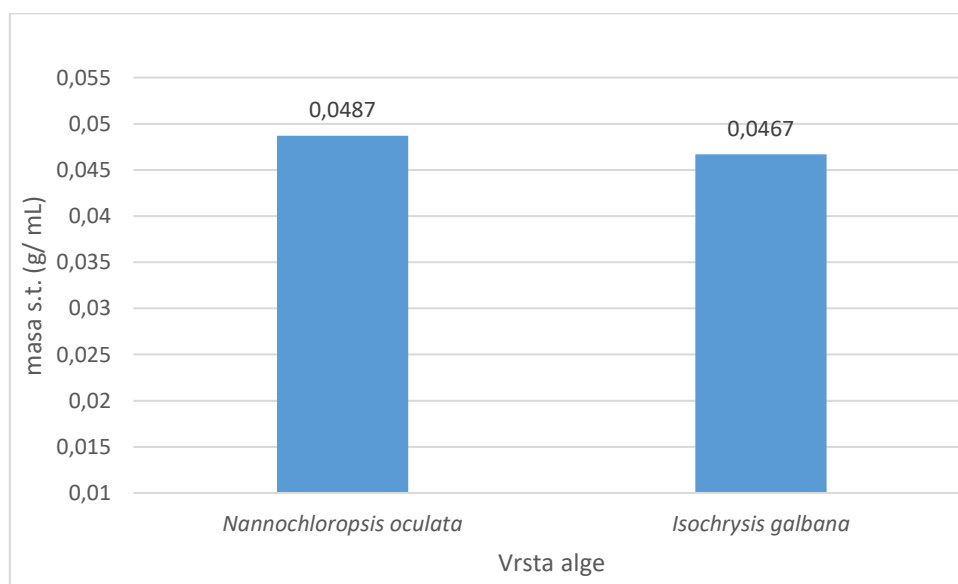
4.3. Sadržaj vode i suhe tvari

Na Grafikonu 4.3.1. prikazana je srednja vrijednosti sadržaja vode u uzorcima. Srednja vrijednost sadržaja vode analiziranih uzoraka (medija sa suspendiranim mikroalgama) iznosila je 95,28 % za uzorke mikroalge *N. oculata*, dok je za *I. galbana* iznosila 95,42 %.



Grafikon 4.3.1. Srednja vrijednosti sadržaja vode u uzorcima

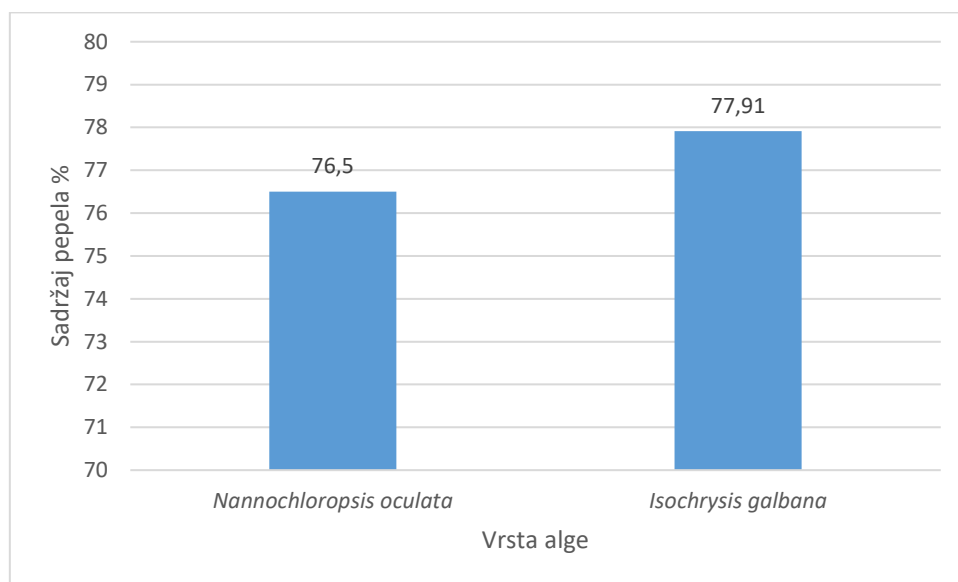
Srednja vrijednost mase suhe tvari ($m_{s.t.}$) u uzorku od 5 mL iznosila je 0,0487 g/mL za *N. oculata*, dok je za *I. galbana* iznosila 0,0467 g/ mL uzorka. Na Grafikonu 4.3.2. prikazana je usporedba mikroalgi.



Grafikon 4.3.2. Masa suhe tvari (g/ mL) uzorka za *N. oculata* i *I. galbana*

4.4. Sadržaj pepela

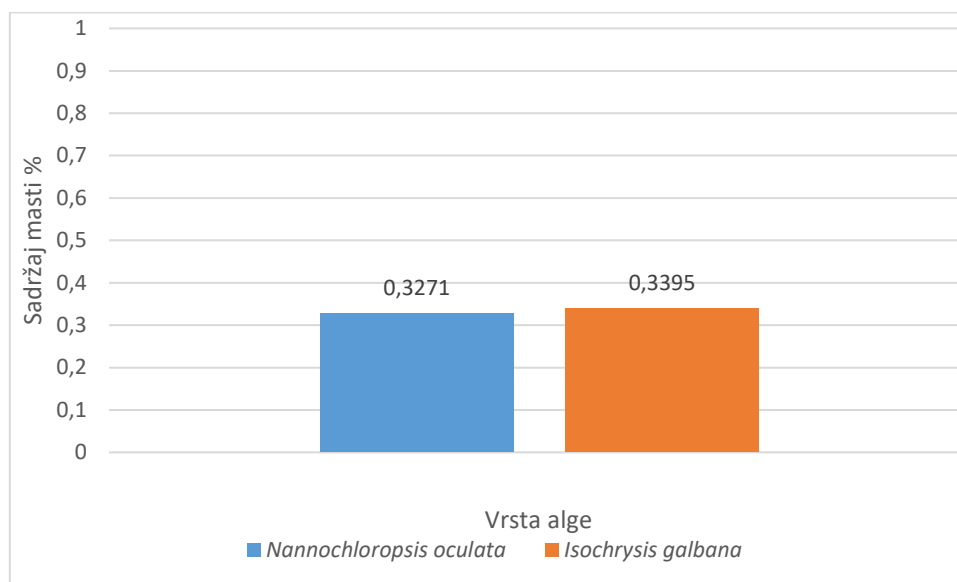
Srednja vrijednost postotka sadržaja pepela u suhoj tvari mikroalgalne biomase rodova mikroalgi *N. oculata* i *I. galbana* prikazana je na Grafikonu 4.4.1.



Grafikon 4.4.1. Srednje vrijednosti sadržaja pepela u suhoj tvari mikroalgi rodova *N. oculata* i *I. galbana*

4.5. Sadržaj masti

Utvrđen je sadržaj masti za mikroalgu *N. oculata* 0,3271 %/ 100 mL te 0,3395 %/ 100 mL za mikroalgu *I. galbana* (Grafikon 4.5.1.).

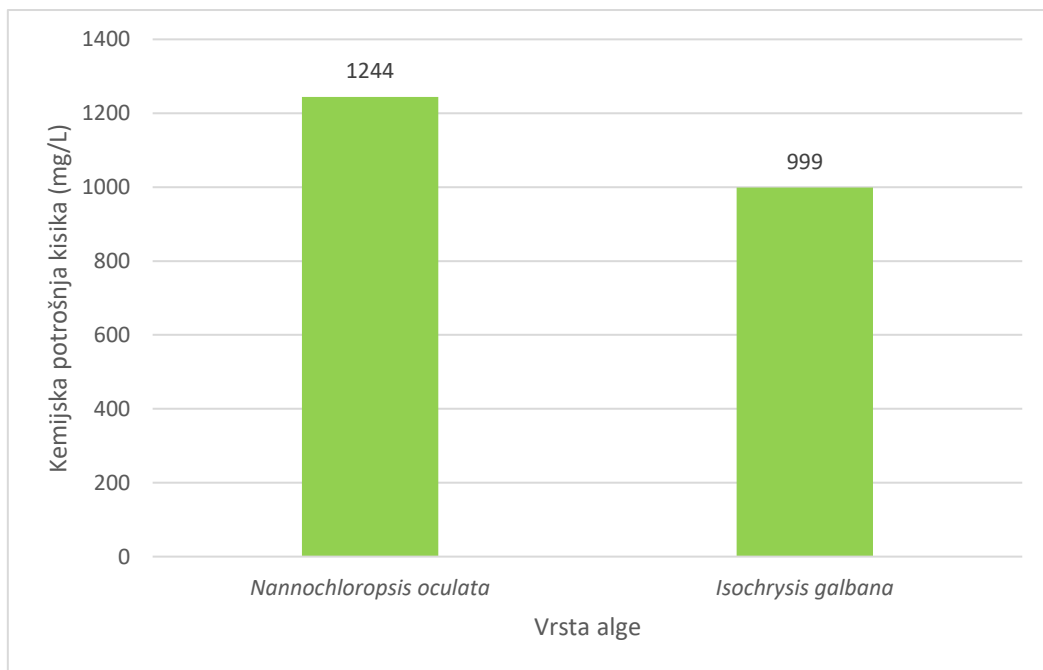


Grafikon 4.5.1. Srednje vrijednosti sadržaja masti u uzorcima istraživanih mikroalgi

4.6. Utvrđivanje potencijala za bioplin

Nakon 14 dana anaerobne digestije primijećeno je da u bioreaktor nema mikrobiološke aktivnosti, odnosno da količina pripremljenih uzoraka dviju mikroalgi nije bila dostatna za anaerobnu digestiju i proizvodnju bioplina.

Analiza KPK, koja se koristi kao standardna analiza za utvrđivanje potencijala određene biomase za proizvodnju bioplina pokazala je vrijednosti KPK za mikroalgu *N. oculata* od 1.244 mg/L, dok je za *I. galbana* bila nešto manja i iznosila 999 mg/L. Na Grafikonu 4.6.1. su prikazane dobivene vrijednosti.



Grafikon 4.6.1. Kemijska potrošnja kisika istraživanih uzoraka mikroalgi *N. oculata* i *I. galbana*

5. Rasprava

Bagnato i suradnici (2019.) su utvrdili oko 80 % sadržaja vode u uzorcima *N. oculata* i *I. galbana*. U ovom istraživanju ustanovljena je viša količina vode, za oba roda mikroalgi oko 95 %, međutim to ne iznenađuje jer su istraživane kulture bile u početnom dijelu faze eksponencijalnog rasta te je broj stanica bio nizak u usporedbi s brojem stanica u stacionarnoj fazi (Đođo i sur., 2022.), a analiza sadržaja vode je obavljena zajedno s vodenim medijem. Iz tog razloga je i utvrđena suha masa kulture (g / mL) koja je u skladu s literaturnim podacima o suhoj masi stanica mikroalgi (Pérez-Morales i sur., 2015.; Madani i sur., 2021.; Zhu i Lee, 1997.). Biomasa mikroalgi ima relativno visok sadržaj vode (80-90 %) i to je osnovni problem u proizvodnji energije. Kao i kod većine drugih izvornih biomasa, visok sadržaj vode i niži sadržaj ogrjevne vrijednosti čini biomasu mikroalgi teškom za korištenje za proizvodnju topline i električne energije. Iz tog razloga je potreban predtretman za smanjenje sadržaja vode i povećanje gustoće. Kao posljedica toga, troškovi proizvodnje energije se povećavaju i čine ovu alternativu manje ekonomski isplativom (Patil i sur., 2008.).

Za proizvodnju energije iz mikroalgi potrebna je ekstrakcija lipida. Tradicionalni lipidni ekstraktanti su hidrofobna organska otapala, na primjer, heksan. Prisutnost molekula vode mogla bi dramatično spriječiti kontakt između otapala i lipida, te stoga rezultirati niskim prinosom ekstrakcije lipida. Nadalje, koncentriranje biomase mikroalgi je osmišljeno tako da ukloni vodu kako bi se poboljšala učinkovitost kontakta. Razvijene su različite tehnike koncentriranja, no neke od njih mogu ugroziti kvalitetu finalnih proizvoda i/ili biti energetske intenzivne. Dokazano je da je centrifugiranje najpouzdanija tehnika, ali prije njene upotrebe treba optimizirati sustav te smanjiti unos energije (Li i sur., 2015.).

Jazzar i sur. (2015.) su utvrdili kako visoki sadržaj vode nema značajni utjecaj na proizvodnju biogoriva. Najveći prinosi biodizela dobiveni iz osušenih mikroalgi bili su samo između 2 % i 9 % veći od onih postignutih iz vlažnih mikroalgi, što ukazuje da visok sadržaj vode u biomasu algi nije značajno utjecao na proces proizvodnje biodizela. U navedenom radu, mokre (80 % vlage) i suhe morske mikroalge *N. gaditana* (*M. gaditana* prema WoRMS, 2022.) izravno su korištene za sintezu biodizela u jednostupanjskom procesu izravnom transesterifikacijom bez dodanih katalizatora uz korištenje superkritičnog metanola (Jazzar i sur., 2015.). Iz ovoga proizlazi da će se najveća koncentracija biomase dobiti iz kulture koja je na početku stacionarne faze rasta i ujedno ima najpovoljniji kemijski sastav (Gavrilović i sur., 2021.)

Određivanje sadržaja pepela je ključno za procjenu pretvorbe anorganskih spojeva u organske spojeve. Ono eliminira varijabilnost koja može proizaći iz uzoraka s različitim sadržajem pepela. Liu i suradnici (2015.) su koristili različite temperature žarenja za mikroalge kako bi utvrdili njihov utjecaj na sadržaj pepela. Utvrđeno je da su niže temperature dovele do nepotpunog izgaranja, što je rezultiralo većim sadržajem pepela. Dok su više temperature dovele do isparavanja nekih minerala, poput kalija. Iz navedenog razloga je potrebno optimizirati temperaturu žarenja.

Tijekom ovog istraživanja, dobiveni su rezultati od 76,5 % pepela za *N. oculata* i 77,91 % za *I. galbana*, koji ukazuju na mogućnost nepotpunog izgaranja.

Bi i He (2013.) tvrde da zelene mikroalge imaju više hlapljivih tvari od smeđih mikroalgi, dok smeđe mikroalge sadrže puno veći udio pepela (čak 43,4 % mokrih uzoraka). Najmanji udio pepela utvrdili su u uzorcima zelenih mikroalgi te je iznosio 14,3 %. Dobiveni rezultati potvrđuju ovu tvrdnju, iako dolazi do malih razlika u brojkama, za samo 1,41 %.

Prirodne mikroalge s niskim sadržajem lipida imaju visok sadržaj pepela, što može imati značajan utjecaj na prinos i svojstva masti odnosno ulja. Visok sadržaj pepela u mikroalgama ima negativan učinak na prinos ulja zbog manjka organskih tvari i ograničenja interakcije između biomase i reakcijskog medija. Međutim visoki sadržaj pepela nema nužno negativan utjecaj i može pridonijeti anaerobnoj digestiji. Također, pepeo ima složen sastav s velikim količinama minerala i metalnih soli koji mogu djelovati kao katalizator tijekom hidrotermalne likvifikacije odnosno HTL procesa (Liu i sur., 2020).

Učinak saliniteta na nakupljanje lipida u *N. oculata* je proučavan i rezultati sugeriraju da niska slanost uzgojnog medija odnosno vode potiče proizvodnju lipida prilikom uzgoja (Ma sur., 2016.). I *N. oculata* i *I. galbana* pokazali su relativno dobru sposobnost podnošenja ekstremnih uvjeta visokog saliniteta i kontaminanata prisutnih u medijima otpadnih voda (Ammar i sur., 2018). Salinitet kultura istraživanih u ovom radu bio je 36 i 37 ppt te bi sukladno prethodnim navodima i optimalnim uvjetima za dvije istraživane alge (Hoff i Snell, 1993.) bilo uputno radi povećanja koncentracije lipida u stanici mikroalge uzgajati na nešto nižem salinitetu. Dođo i sur. (2022.) uspoređujući rast *I. galbana* u otpadnoj vodi iz akvakulture na različitim salinitetima (33 i 25 ppt) dobili najveću količinu biomase pri 25 ppt.

Prva ključna točka koju treba razjasniti je maksimalni prinos ulja koji se može postići s kulturama mikroalgi. To strogo ovisi o odabranom mikroorganizmu, zemljopisnom položaju proizvodnog pogona ukoliko se radi o otvorenom uzgoju i uvjetima kulture. Potencijalni prinos ulja kultura mikroalgi je od 5 do 20 puta veći od uljane palme, općenito priznate kao najproduktivnija kultura u industrijskim razmjerima (Bondioli i sur., 2012.).

Ukupni sadržaj lipida u mikroalgama uobičajeno može varirati od oko 1 % do 85 % suhe težine biomase, više vrijednosti od 40 % obično se postižu pod povoljnim ograničenjem hranjivih tvari (Anadarajah i sur. 2012.).

Poznato je da rod *Nannocloropsis*, kao i druge uljane alge koje se uzgajaju u uvjetima s dovoljno hranjivih tvari, uglavnom proizvode polarne lipide koji se ne mogu preraditi u postojećim industrijskim postrojenjima za biodizel. Za proizvodnju biodizela potrebno je neutralno ulje, koje se uglavnom sastoji od triacilglicerola i slobodnih masnih kiselina koji se mogu lako pretvoriti u odgovarajuće spojeve pomoću reakcije s metanolom katalizirane lužinama. Slobodne masne kiseline također se mogu koristiti kao sirovina za proizvodnju

biodizela, ali u ovom slučaju potreban je kiseli katalitički sustav ili korak preesterifikacije (Bondioli i sur., 2012.).

Dobivanje niske koncentracije masti od 0,3271 % za rod *Nanocloropsis* može se objasniti visokom koncentracijom polarnih lipida uz premalu količinu analiziranog materijala s obzirom da su, kako je već rečeno kulture bile rijetke te se uzorak (120 mL) sastajao od velikog dijela vode koje potiče od medija. Uz to su opne stanica razarane centrifugiranjem (bez prešanja) te postoji mogućnost da određeni dio lipida nije niti oslobođen iz stanica.

Nadalje, nakon prikupljanja biomase mikroalgi primjerice centrifugiranjem, biomasa ima vlagu od 70 % ili više i, u najboljem slučaju, sadržaj ulja od 50 % (na osnovi suhe tvari.). Stoga je sadržaj ulja u biomasi vlažne alge usporediv s onim u sjemenkama uljarica koje sadrže približno 15 % ulja, kao što je plod masline. Kada bi se alge mogle prerađivati, kao što se masline i ekstrahirano ulje prerađuju mokrom tehnologijom, moglo bi se uštedjeti na visokim troškovima sušenja. Međutim u tom slučaju bilo bi potrebno, nakon ekstrakcije masti, drastično smanjiti sadržaj vode u rezidualnoj biomasi kako bi se izbjegla mikrobiološka degradacija (Bondioli i sur., 2012.).

Centrifugiranje je metoda prikupljanja biomase mikroalgi koja uključuje centripetalno ubrzanje kako bi se kultura algi odvojila na područja veće i manje gustoće, nakon čega se alge i voda odvajaju ekstrakcijom viška medija. Centrifugiranje također može biti praćeno sedimentacijom za odvajanje supernatanta. Ova metoda pokazala je 90 %-tnu učinkovitost koncentriranja mikroalgi iz medija 90 %, ali treba naglasiti da efikasnost ovisi o samom postupku. Ekstrakcija lipida se vrši fizikalnim (poput prešanja i jakog centrifugiranja) i kemijskim metodama s otapalom ili kombinacijom obje metode. Metoda koja se koristi za ekstrakciju treba biti brza i učinkovita i ne bi trebala oštetiti ekstrahirane lipide. Nije svaka lipidna frakcija prikladna za proizvodnju biodizela i štoviše, ponekad se i nelipidni sadržaj ekstrahira zajedno s lipidnim sadržajem. Zato odabrani postupak ekstrakcije ne samo da bi trebao biti specifičan za lipide, već bi trebao biti i selektivan prema poželjnim lipidnim frakcijama. (Pragya i sur., 2013).

Koncentraciju dobivenih rezultata masti/ulja u ovom istraživanju je teško usporediti s drugim istraživanjima radi korištenja uzoraka koji su suspendirani u mediju, odnosno nije se radilo sa suhim uzorcima biomase mikroalge ili sedimentiranim kao u većini drugih istraživanja (Bondioli i sur., 2012; Li i sur., 2015.). Budući da je došlo do razaranja stanica mikroalgi centrifugiranjem, te se ulje odvojilo i nalazilo na površini vode, bilo je potrebno prilikom pipetiranja vode ostaviti određenu količinu vode u uzorku kako se ne bi zahvatilo ulje. Za detaljnu procjenu bilo bi uputno i koncentrirati alge te koristiti kulturu s većim brojem stanica, odnosno na početku stacionarne faze.

Uzgojem mikroalgi za iskorištavanje CO₂ i proizvodnju biodizela stvara se rezidualna biomasa algi kojom se mora upravljati kako bi se spriječilo njezino nepropisno odlaganje u okoliš, zagađenje tla i površinskih voda. U tom kontekstu, anaerobna digestija se prepoznaje kao perspektivna tehnologija za gospodarenje ovim otpadom, tražeći odgovarajuću obradu i

konačno zbrinjavanje te istovremeno dobivanje energije u obliku metana, što može pridonijeti održivosti proizvodnje biodizela iz mikroalgi. Anaerobna digestija mikroalgi može eliminirati korake prikupljanja i sušenja biomase, smanjujući troškove (Santos i sur., 2014.).

Općenito, previsoka ulazna koncentracija KPK (više od 2.000 mg/L) rezultira nezadovoljavajućom brzinom rasta mikroalgi i niskom učinkovitošću uklanjanja hranjivih tvari u otpadnoj vodi. Zaključno, tehnologija kokultivacije i koncentracija KPK mogli bi utjecati na rast mikroalgi. U istraživanju Gao i sur. (2018.), postignuta je maksimalna učinkovitost uklanjanja CO₂ kada je početna koncentracija KPK bila 1.200 mg/L, što sugerira da je koncentracija KPK od 1.200 mg/L bila najučinkovitija utjecajna koncentracija za uklanjanje CO₂ tijekom tretiranja otpadnih voda. Uklanjanje CO₂ u proizvodnji bioplina uglavnom se koristi za rast mikroalgi putem fotosinteze. Sadržaj metana ovisi o učinkovitosti uklanjanja CO₂. Visoka učinkovitost uklanjanja CO₂ rezultirat će povećanjem sadržaja metana u bioplinu, što povećava kvalitetu bioplina. Različite koncentracije KPK mogle bi utjecati na put akumulacije ugljika u biomasi mikroalgi (Gao i sur., 2018.).

Iako su Gao i sur. (2018.) u navedenom istraživanju koristili mikroalgu *Chlorella vulgaris*, ono potvrđuje činjenicu da je koncentracija KPK od 1.200 mg/L optimalna za proizvodnju bioplina.

Istraživanja koja su se bavila konačnom koncentracijom topljivog KPK mogu ukazati na količine hidroliziranog supstrata, ali i na otpornost na daljnju mineralizaciju u hlapive masne kiseline, a zatim u metan i CO₂. Koncentracija KPK općenito je bila niska za slatkovodne vrste (oko 800 mg/L), ali prilično visoka za morske vrste (oko 2.000 mg/L) što može biti pokazatelj da salinitet ima utjecaj na koncentraciju KPK. Može se pretpostaviti da je visoka koncentracija KPK kod morskih vrsta predstavljala otporan ili nerazgradiv biološki materijal (Frigon i sur., 2013.).

6. Zaključak

Mikroalge *N. oculata* i *I. galbana* pogodne su sirovine za proizvodnju biogoriva, specifično biodizela i bioplina koji možemo dobiti od otpada iz proizvodnje biodizela. Međutim, rezultati ovog rada pokazuju kako je taj postupak potrebno optimirati. Prilikom uzgoja je potrebno osigurati uvjete u kojima će kultura rasti najbrže (svjetlost, temperatura, pH, koncentracija hranjivih tvari, salinitet i dr.) i uz to imati maksimalni sadržaj lipida. Pored toga, važno je i vrijeme prikupljanja mikroalgalne biomase. Naime, uzgoj je potrebno provoditi do trenutka postizanja najvećeg broja stanica po jedinici hranjivog medija, odnosno do početka stacionarne faze. Nakon ove faze, kultura stagnira, kemijski sastav joj se mijenja te se potom mikroalge počinju razgrađivati i postaju neadekvatna sirovina za ekonomski isplativu proizvodnju biodizela od mikroalgi.

Pored optimizacije samog procesa uzgoja mikroalgi za proizvodnju biogoriva, potrebno je optimirati i tehnologiju proizvodnje biogoriva, počevši od samog izdvajanja mikroalgi kao sirovine iz vodenog medija do ekstrakcije lipida za proizvodnju biodizela. Pri ekstrakciji je potrebno voditi računa o staničnoj stjenci mikroalgi, koju je najprikladnijom metodom potrebno razoriti radi oslobađanja lipida.

Ukoliko se otpad od proizvodnje biodizela koristi za proizvodnju bioplina, potrebno je koristiti veću količinu uzorka od one korištene u ovom istraživanju. Nadalje, za ekonomski profitabilniju proizvodnju bioplina bilo bi moguće koristiti mješavinu ostatka mikroalgi od proizvodnje biodizela i neku drugu vrstu otpada.

Korištenjem otpadnih voda prilikom uzgoja mikroalgi, prvenstveno za proizvodnju biodizela te sekundarno za proizvodnju bioplina od ostataka taloga nakon proizvodnje biodizela, moguća je uspostava kružne proizvodnje, odnosno održivog gospodarenja korištenjem mikroalgi. Na ovaj bi se način kogeneracijom osigurala i energija za proizvodnju biodizela. Uz navedeno, digestat se nakon anaerobne digestije također može koristiti kao gnojivo. Integriranje ovakve proizvodnje predstavlja optimalnu proizvodnju, međutim prvo je potrebno smanjiti troškove i prilagoditi tehnologiju za uzgoj mikroalgi i proizvodnju biogoriva iz njih.

7. Literatura

1. Ammar S. H., Khadim H.J., Mohamed A.I. (2018). Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & Innovation*, 10: 132-142.
2. Anandarajah K., Mahendrapurumal G., Sommerfeld M., Hu Q. (2012). Characterization of microalga *Nannochloropsis sp.* mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy*, 96: 371-377.
3. Aratboni H. A., Rafiei N., Garcia-Granados R., Alemzadeh A., Morones-Ramírez J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 18(1): 1-17.
4. Bagnato G., Boulet F., Sanna A. (2019). Effect of Li-LSX zeolite, NiCe/Al₂O₃ and NiCe/ZrO₂ on the production of drop-in bio-fuels by pyrolysis and hydrotreating of *Nannochloropsis* and *Isochrysis* microalgae. *Energy*, 179: 199-213.
5. Bi Z., He B.B. (2013). Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Transactions of the ASABE*, 56(4): 1529-1539.
6. Bondioli P., Della Bella L., Rivolta G., Zittelli G.C., Bassi N., Rodolfi L., Casini D., Prussi M., Chiaramonti D., Tredici, M.R. (2012). Oil production by the marine microalgae *Nannochloropsis sp.* F&M-M24 and *Tetraselmis suecica* F&M-M33. *Bioresource technology*, 114: 567-572.
7. Brennan L., Owende P. (2010). Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(2): 557-577.
8. Cruz Y.R., Aranda D.A., Seidl P.R., Diaz G.C., Carliz R.G., Fortes M.M., da Ponte D.A.M.P., de Paula R.C. (2018). Cultivation systems of microalgae for the production of biofuels. *Biofuels-State of Development*, 199-218.
9. Đodo Ž., Radić T., Barić O., Jug-Dujaković J., Gavrilović A. (2022). Mogućnost uzgoja mikroalge *Isochrysis galbana* u otpadnoj vodi iz akvakulturnih uzgojnih sustava. 57. hrvatski i 17. međunarodni simpozij agronoma, Vodice <https://sa.agr.hr/publication/23/57.+hrvatski+i+17.+me%C4%91unardni+simpozij+agronoma+eZbornik+radova.Full+text> (Pristupljeno rujan 2022.)
10. Enamala M. K., Enamala S., Chavali M., Donepudi J., Yadavalli R., Kolapalli B., Tirumala V.A., Jeevitha V., Kuppam C. (2018). Production of biofuels from microalgae-A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94: 49-68.
11. European Commission (2007). Communication from the commission to the European council and the European parliament: an energy policy for Europe. In: EC COM(2007) 1 Final, 27.

12. Frigon J.C., Matteau-Lebrun F., Abdou R.H., McGinn P.J., O'Leary S.J., Guiot S.R. (2013). Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied energy*, 108: 100-107.
13. Gao S., Hu C., Sun S., Xu J., Zhao Y., Zhang H. (2018). Performance of piggery wastewater treatment and biogas upgrading by three microalgal cultivation technologies under different initial COD concentration. *Energy*, 165: 360-369.
14. Gavrilović A., Jug-Dujaković J., Ljubičić A., Iveša N. (2021). Dizajn i menadžment mrijestilišta školjkaša. *Fakultet prirodnih znanosti Sveučilišta Jurja Dobrile, Pula*, 45-66.
15. Ghadiryanfar M., Rosentrater K. A., Keyhani A., Omid M. (2016). A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54: 473-481.
16. González-González L. M., Correa D. F., Ryan S., Jensen P. D., Pratt S., Schenk P. M. (2018). Integrated biodiesel and biogas production from microalgae: towards a sustainable closed loop through nutrient recycling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82: 1137-1148.
17. Gordon M. E. (2016). Challenge and Potential of Biofuels from Algae. *Science Insights*, 14: 1-6.
18. Gouveia L. (2011). Microalgae as a Feedstock for Biofuels. In *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-69.
19. Hamidi N., Yanuhar U., Wardana I. N. G. (2014). Potential and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5(4): 279-290.
20. Harun R., Singh M., Forde G.M., Danquah M.K. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew Sustain Energy Rev*, 14: 1037-47.
21. Hoff F.H., Snell T.W. (1993). *Plankton Culture Manual Florida*, Dade City: Aqua Farms.
22. Hossain N., Hasan M. H., Mahlia T. M. I., Shamsuddin A. H., Silitonga A. S. (2020). Feasibility of microalgae as feedstock for alternative fuel in Malaysia: A review. *Energy Strategy Reviews*, 32, 100-536.
23. Huang G.-H., Chen F., Wei D., Zhang X.-W., Chen G. (2010). Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Appl. Energy*, 87, 38-46.
24. Janssen M., Tramper J., Mur L.R., Wijfels R.H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol Bioeng*, 81(2):193-210.
25. Jayaseelan M., Usman M., Somanathan A., Palani S., Muniappan G., Jeyakumar R.B. (2021). Microalgal Production of Biofuels Integrated with Wastewater Treatment. *Sustainability*, 13(16): 87-97.
26. Jazzar S., Olivares-Carrillo P., de los Ríos A.P., Marzouki M.N., Acien-Fernández F.G., Fernández-Sevilla J.M., Molina-Grima E., Smaali I., Quesada-Medina J. (2015). Direct supercritical methanolysis of wet and dry unwashed marine microalgae (*Nannochloropsis gaditana*) to biodiesel. *Applied Energy*, 148: 210-219.

27. Kassim M.A., Meng T.K. (2017). Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. *Sci Total Environ*, 585: 1121–1129.
28. Konda N., Singh S., Simmons B., Klein-Marcuschamer D. (2015). An investigation on the economic feasibility of macroalgae as a potential feedstock for biorefineries, *BioEnergy Res.*, 8: 1046-1056.
29. Kumar, A. (2021). Current and Future Perspective of Microalgae for Simultaneous Wastewater Treatment and Feedstock for Biofuels Production. *Chemistry Africa*, 1-27.
30. Lavens P., Sorgeloos P. (1996). Manual on the production and use of live food for aquaculture (No. 361). Food and Agriculture Organization (FAO).
31. Lee E., Jalalizadeh M., Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: a review. *Algal research*, 12:497-512.
32. Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C.Q., Dubois-Calero N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*, 24(4): 815-820.
33. Li Z., Li Y., Zhang X., Tan T. (2015). Lipid extraction from non-broken and high water content microalgae *Chlorella spp.* by three-phase partitioning. *Algal research*, 10: 218-223.
34. Liu H., Chen Y., Yang H., Gentili F.G., Söderlind U., Wang X., Zhang W., Chen, H. (2020). Conversion of high-ash microalgae through hydrothermal liquefaction. *Sustainable Energy & Fuels*, 4(6): 2782-2791.
35. Liu J., Pan Y., Yao C., Wang H., Cao X., Xue S. (2015). Determination of ash content and concomitant acquisition of cell compositions in microalgae via thermogravimetric (TG) analysis. *Algal research*, 12: 149-155.
36. Liu J., Song Y., Qiu W. (2017). Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72: 154-162.
37. Ma X.N., Chen T.P., Yang B., Liu J., Chen F. (2016). Lipid production from *Nannochloropsis*. *Marine drugs*, 14(4): 61.
38. Madani N.S.H., Shamsaie Mehrgan M., Hosseini Shekarabi S.P., Pourang N. (2021). Regulatory effect of gibberellic acid (GA3) on the biomass productivity and some metabolites of a marine microalga, *Isochrysis galbana*. *Journal of Applied Phycology*, 33(1): 255-262.
39. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1): 217-232.
40. OECD/FAO (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/19428846-en>. (Pristupljeno rujan 2021).
41. Patil V. (2007). The Relevance of Biofuels. *Curr. Sci.*, 92: 707.
42. Patil V., Tran K.Q., Giselrød H.R. (2008). Towards sustainable production of biofuels from microalgae. *International journal of molecular sciences*, 9(7): 1188-1195.

43. Pérez-Morales A., Martínez-López A., Camalich-Carpizo J.M. (2015). Dry weight, carbon, c/n ratio, hydrogen, and chlorophyll variation during exponential growth of selected microalgae species used in aquaculture. *Cicimar Oceánides*, 30(1): 33-34.
44. Peter A.P., Khoo K.S., Chew K.W., Ling T.C., Ho S.H., Chang J.S., Show P.L. (2021). Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring. *Environmental Chemistry Letters*, 1-14.
45. Pragya N., Pandey K.K., Sahoo P.K. (2013). A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and sustainable energy reviews*, 24: 159-171.
46. Rocha J.M., Garcia J.E., Henriques M.H. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular engineering*, 20(4-6): 237-242.
47. Rogner H.H. (2000). Energy resources. In: Goldemberg J, editor. *World energy assessment: energy and the challenge of sustainability*. New York: UNDP/ UNDESA/WEC.
48. Saad M.G., Dosoky N.S., Zoromba M.S., Shafik H.M. (2019). Algal biofuels: current status and key challenges. *Energies*, 12(10): 1920.
49. Santos N.O., Oliveira S. M., Alves L.C., Cammarota M.C. (2014). Methane production from marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Bioresource technology*, 157: 60-67.
50. Sialve B., Bernet N., Bernard O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol Adv*, 27: 409–16.
51. Sukarni S., Sumarli S., Nauri I.M., Purnami P., al Mufid A., Yanuhar U. (2018). Exploring the prospect of marine microalgae *Isochrysis galbana* as sustainable solid biofuel feedstock. *Journal of applied research and technology*, 16(1): 53-66.
52. Suresh K.S. (2019). *Prospective ecofuel feedstocks for sustainable production*. Elsevier, Amsterdam.
53. Vargas-Estrada L., Longoria A., Arenas E., Moreira J., Okoye P.U., Bustos-Terrones Y., Sebastian P.J. (2021). A Review on Current Trends in Biogas Production from Microalgae Biomass and Microalgae Waste by Anaerobic Digestion and Co-digestion. *BioEnergy Research*, 1-16.
54. Venteris E.R., Wigmosta M.S., Coleman A.M., Skaggs, R.L. (2014). Strain selection, biomass to biofuel conversion, and resource colocation have strong impacts on the economic performance of algae cultivation sites. *Frontiers in Energy Research*, 2: 37.
55. Wiley P.E., Campbell J.E., McKuin B. (2011). Production of biodiesel and biogas from algae: a review of process train *options*. *Water Environment Research*, 83(4): 326-338.
56. WoRMS Editorial Board (2022). World Register of Marine Species. <https://www.marinespecies.org> at VLIZ. doi:10.14284/170 (Pristupljeno rujan 2022.)
57. Xu H., Miao X., Wu Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, 126(4): 499-507.

58. Yatish K. V., Lalithamba H. S., Suresh R., Hebbar H. H. (2018). Optimization of bauhinia variegata biodiesel production and its performance, combustion and emission study on diesel engine. *Renewable Energy*, 122: 561-575.
59. Yun J.H., Smith V.H., deNoyelles F.J., Roberts G.W., Stagg-Williams S.M. (2014). Freshwater macroalgae as a biofuels feedstock: mini-review and assessment of their bioenergy potential. *Industrial Biotechnology*, 10(3): 212-220.
60. Zabed H.M., Akter S., Yun J., Zhang G., Zhang Y., Qi X. (2020). Biogas from microalgae: Technologies, challenges and opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117: 109-503.
61. Zakon o energiji (NN 68/2001, 177/2004, 76/2007, 152/2008 i 127/2010), https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_11_141_2651.html (Pristupljeno rujan 2021)
62. Zhu C.J. i Lee Y.K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of applied phycology*, 9(2): 189-194.
63. Zhu L. (2015). Microalgal culture strategies for biofuel production: a review. *Biofuels Bioprod Biorefn.* 9(6): 801–14.
64. Zhu L., Huo S., Qin L.A. (2015). Microalgae-based biodiesel refinery: sustainability concerns and challenges. *Int J Green Energy.*, 12(6): 595–602.
65. Zhu L.D. (2016). Algal biorefinery for sustainable development and the challenges. *Proc Inst Civil Eng Energy.*, 169(4): 179–86.

Izvori slika:

Jerney J., Spilling K. (2018). Large scale cultivation of microalgae: open and closed systems. In *Biofuels from Algae*. Humana, New York, 1-8.

Martín-Girela I., Curt M.D., Fernández J. (2017). Flashing light effects on CO₂ absorption by microalgae grown on a biofilm photobioreactor. *Algal research*, 25: 421-430. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926417300310> (pristupljeno lipanj 2022.)

Price K., Farag I.H. (2013). Resources conservation in microalgae biodiesel production. *International Journal of Engineering and Technical Research*, 1(8): 49-56. - https://www.researchgate.net/publication/259868136_Resources_Conservation_in_Microalgae_Biodiesel_Production (pristupljeno lipanj 2022.)

https://www.researchgate.net/figure/Raceway-pond-for-open-air-microalgae-cultivation-extracted-from-3_fig4_44850233 (pristupljeno srpanj 2022.)

Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M.K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*, 2010. - https://www.researchgate.net/figure/Raceway-pond-for-open-air-microalgae-cultivation-extracted-from-3_fig4_44850233 (pristupljeno svibanj 2022.)

<https://www.energy.gov/eere/bioenergy/algal-production> (pristupljeno srpanj 2022.)