

# Mogućnosti uzgoja mikroalge *Isochrysis galbana* u otpadnoj vodi iz akvakulturnih uzgojnih sustava

---

Đođo, Željana; Radić, Tajana; Barić, Oliver; Jug-Dujaković, Jurica; Gavrilović, Ana

Source / Izvornik: **Zbornik radova 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, 2022, 326 - 330**

Conference paper / Rad u zborniku

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:175979>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-07**



Repository / Repozitorij:

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



## Mogućnosti uzgoja mikroalge *Isochrysis galbana* u otpadnoj vodi iz akvakulturnih uzgojnih sustava

Željana Đođo<sup>1</sup>, Tajana Radić<sup>2</sup>, Oliver Barić<sup>3</sup>, Jurica Jug-Dujaković<sup>4</sup>, Ana Gavrilović<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, Ulica grada Vukovara 269d, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Hrvatska Poljoprivredna komora, Ulica grada Vukovara 78, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup>Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, Zagreb, Hrvatska (agavrilovic@ag.hr)

<sup>4</sup>Sustainable Aquaculture Systems Inc., 715 Pittstown Road, Frenchtown, NJ 08825, USA

### Sažetak

Sve veća pažnja posvećuje se mogućnosti iskorištavanja otpadnih voda iz akvakulturnih uzgojnih sustava. Atraktivnu opciju predstavlja uzgoj mikroalgi, koje pored dosadašnje tradicionalne primjene u mrijestilištima, postaju sve traženija sirovina u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i industriji biogoriva. U ovom je radu istražena podobnost otpadne vode saliniteta 25 psu iz recirkulacijskog akvakulturnog proizvodnog sustava za uzgoj mikroalge *Isochrysis galbana*. Podaci su uspoređeni s rastom uzgojnih populacija ove vrste u steriliziranoj moskoj vodi s dodatkom komercijalnog uzgojnog medija F/2 na dva različita saliniteta (25 psu i 33 psu). Rezultati pokazuju da su sastav i količina nutrijenata u otpadnoj vodi dostatni za uspješan uzgoj mikroalge *I. galbana* te da sniženi salinitet povoljno utječe na rast ove mikroalge u otpadnoj vodi i u komercijalnom uzgojnom mediju.

**Ključne riječi:** akvakulturne otpadne vode, salinitet, biogoriva, fitoplankton

### Uvod

Tijekom posljednjih 50 godina uloženi su značajni naponi da se iz otpadnih voda akvakulturnih proizvodnih sustava uklone hranjive soli kako bi se izbjegla eutrofikacija vodnih recipijenata (Crab i sur., 2007.). Istraživane su brojne biološke i kemijske metode koje bi bile prikladne za ovaj proces, kao što su: (1) biološki procesi za uklanjanje dušika, nitrifikacija i denitrifikacija te (2) kemijski procesi koji uključuju kemijsku precipitaciju fosfora (Ebeling i sur. 2003.). Jedna od novijih alternativa je biološki tretman pomoću kopnenih ili vodenih biljaka, uključujući kulture mikroalgi. Zbog brze stope rasta, značajnog prinosa biljne biomase i doprinosa očuvanju okoliša, njihovo se korištenje danas smatra jednom od najefikasnijih metoda za biološko pročišćavanje otpadnih voda (Lananan i sur., 2014.). Dobivena algalna biomasa može se koristiti kao sirovina za proizvodnju široke palete proizvoda različitih industrija (Gong i Bassi, 2016.; Sathasivam i sur., 2019.).

Mikroalge su jednostanični planktonski biljni organizmi koji slobodno plutaju u vodenoj sredini. Zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, posebno visokog udjela nezasićenih masnih kiselina (PUFA), osnovna su živa hrana u mrijestilištima morskih organizama te su u posljednjih nekoliko desetljeća provedeni pokusi pri kojima je testiran uzgoj više stotina vrsta kako bi se istražila njihova podobnost za korištenje u akvakulturi. Osnovni parametri koji određuju rast uzgojnih populacija mikroalgi su sastav nutrijenata i minerala te temperatura i salinitet uzgojne sredine. Salinitet uveliko utječe na rast algi djelujući izravno na osmoregulacijske mehanizme unutar stanica pa je od iznimne je važnosti pronaći optimalne vrijednosti za pojedine uzgajane vrste algi (Cañavate i sur., 2020.; Hotos i Avramidou, 1995.).

U posljednje vrijeme mikroalge pobuđuju sve veću pažnju i u drugim gospodarskim granama, posebno u farmaceutskoj, prehrambenoj industriji te proizvodnji biogoriva (Zuorro i sur., 2021.). Biogoriva su sve poželjniji izvor energije zbog smanjenog utjecaja na okoliš i sve izraženije energetske krize te se i tehnologija njihove proizvodnje ubrzano razvija. Dije se sukladno vrsti sirovine i stupnju razvitka tehnologije proizvodnje u četiri generacije (Chen i sur., 2015.; Moravvej i sur., 2019.). Biogoriva treće generacije zasnivaju se na proizvodnji od standardnih vrsta algi, dok se razvitak četvrte generacije zasniva na genetski modificiranim mikroalgama i još uvijek je u samim povojima (Moravvej i sur., 2019.). Najpoznatiji predstavnici koji se masovno uzgajaju i koriste u proizvodnji biogoriva su alge skupine Haptophyta. Alge roda *Isochrysis* karakteristične su po tome što nemaju staničnu stijenku pa je ekstrakcija lipida jednostavnija (Sun i sur., 2017.; Cohen, 1986.). Cilj ovog rada bio je istražiti efikasnost pročišćavanja otpadne vode iz zatvorenog recirkulacijskog sustava za proizvodnju morske ribe pri salinitetu od 25 psu, s obzirom na smanjenje koncentracije osnovnih hranjivih soli u odnosu na komercijalni medij, upotrebom mikroalge *Isochrysis galbana*. Time je ujedno istražena i podobnost otpadne vode kao medija za masovni uzgoj ove mikroalge.

### Materijal i metode

Laboratorijsko istraživanje podijeljeno je u dva pokusa. U prvom su pokusu alge uzgajane u 0.5 l morske vode na dva saliniteta (33 i 25 psu) kako bi se s obzirom na različite literaturne podatke istražila pogodnost uzgoja na salinitetu otpadne vode upotrebene u prvom pokusu. Pokus je proveden u duplikatu. Morska voda je razrijeđena destiliranom vodom do 33, odnosno 25 psu te sterilizirana natrijevim hipokloritom koji je potom neutraliziran natrijevim tiosulfatom (Gavrilović i sur., 2021.). U steriliziranu vodu dodan je komercijalni Guillard (F/2) medij prema uputama proizvođača te je nasadena mikroalga *I. galbana*. Nasadna gustoća bila je jednaka na oba saliniteta i iznosila je 200.000 stanica/ml, kao i u prvom pokusu.

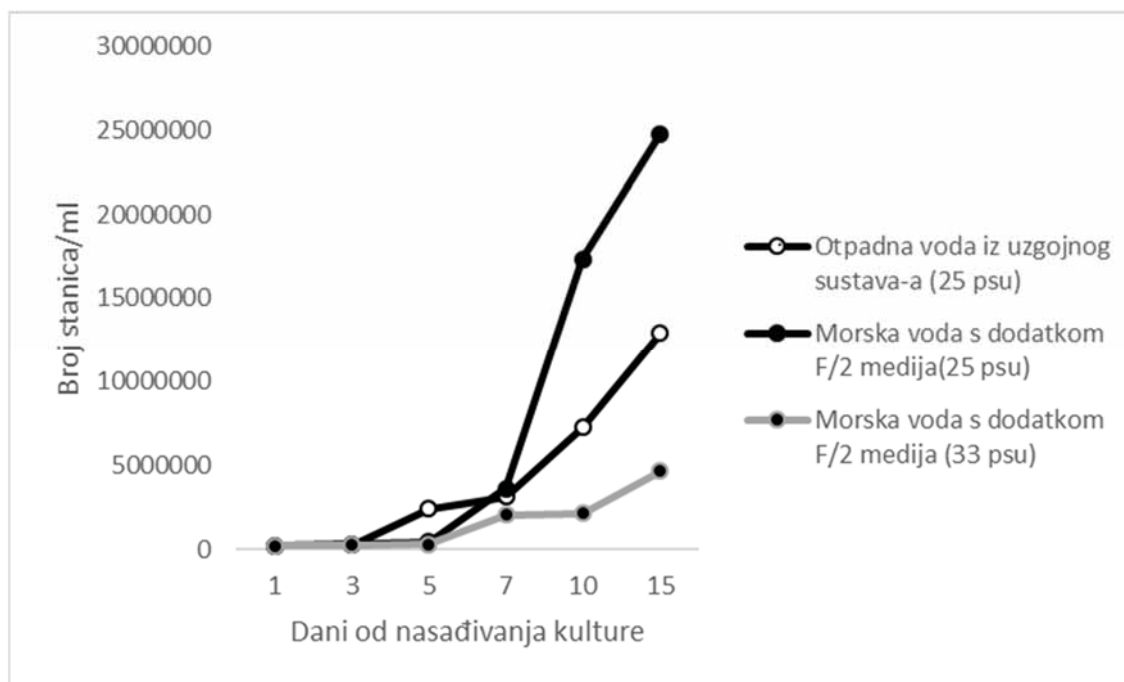
U drugom pokusu je kao medij za uzgoj mikroalge *I. galbana* korištena otpadna voda saliniteta 25 psu iz recirkulacijskog uzgojnog sustava za proizvodnju ribe, koja je najprije profiltrirana kroz mehanički zrnati filter, a zatim sterilizirana. Također su fotometrom YSI 9300 izmjerene koncentracije nutrijeneta, dušikovih i fosfornih spojeva, kako bi se usporedile s vrijednostima na kraju uzgojnog ciklusa algi. U po 0,5 l otpadne vode, u dvije tikvice, nasadeno je 200.000 stanica/ml.

Kako bi se izbjegao utjecaj drugih čimbenika osim saliniteta na rast populacije algi, tikvice su držane u jednakim uvjetima, pod umjetnim svjetlom jačine 2000 luxa na temperaturi od 22°C (Gavrilović i sur., 2021.) te spojene na isti aerator. Rast uzgojne populacije algi u oba pokusa praćen je brojanjem stanica 3., 5., 7., 10. i 15. dana od početka inkubacije. Brojanje je obavljano mikroskopski pomoću hemocitometra, pri čemu su prije svakog brojanja alge imobilizirane 4%-tnim formaldehidom. Neposredno prije brojanja na hemocitometar je položeno pokrovno stakalce te je u žljeb hemocitometra pomoću Pasretove 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.).

### Rezultati i rasprava

Uzgojna populacija *I. galbana* rasla je u Guillard-ovom (F/2) mediju, na dva različita saliniteta (25 psu i 33 psu) s najvećom postignutom gustoćom stanica u manjem salinitetu (25 psu) (slika 1). Brown i sur. (1993.) i Renaud i sur. (1994.) utvrdili su također najbrži rast ove vrste mikroalge na 25 psu, dok su Alkhamis i Qin (2013.) utvrdili da *I. galbana* raste na

širokom rasponu saliniteta od 10 do 65 psu, ali je optimalni bio 35 psu. Odgovarajuća kontrola saliniteta u masovnoj proizvodnji algi ključ je u pronalasku rješenja koja se odnose na optimizaciju rasta algi u procese kvalitetne ekstrakcije lipida (Fong Sing i sur., 2016.). Rast uzgojne populacije *I. galbana* u otpadnoj vodi RAS-a pokazuje sličan trend kao i rast u komercijalnom mediju koji se koristi u uzgoju mikroalgi u akvakulturi (slika 1). Stopa rasta *I. galbana* u otpadnoj vodi je manja od rasta u komercijalnom mediju na 25 psu, i veća od onog na 33 psu. Ti podaci govore o optimalnoj razini relevantnih čimbenika rasta u otpadnoj vodi iz RAS-a i njenoj podobnosti za proizvodnju mikroalgi.



Slika 1. Rast populacije *I. galbana* u različitim uzgojnim uvjetima

U tablici 1. prikazane su koncentracije relevantnih nutijenata prije i nakon završenog pokusa. Koncentracije sva četiri ispitivana nutrijenta smanjene su za više od 50%: N-NO<sub>3</sub> za 62 %, N-NO<sub>2</sub> za 56 %, N-NH<sub>4</sub> za 67 % i P-PO<sub>4</sub> za 57 %.

Tablica 1. Koncentracije nutrijenata u otpadnoj vodi RAS-a prije i nakon pokusa

Nutrijenti	Koncentracija na početku pokusa, mg l <sup>-1</sup>	Koncentracija na kraju pokusa, mg l <sup>-1</sup>
N – NO <sub>3</sub>	185	70,8
N – NO <sub>2</sub>	1,05	0,46
N – NH <sub>4</sub>	2,84	0,94
P – PO <sub>4</sub>	8,63	3,72

Do sličnog zaključka dolaze i Hawrot-Paw i sur. (2020.) koristeći otpadne vode iz ribogojilišta za proizvodnju mikroalgi. U njihovom pokusu sadržaj ukupnog dušika i ukupnog fosfora u otpadnim vodama otvorenog uzgojnog sustava smanjen je za 88%, odnosno preko 99%. Uz to, sadržaj N-NO<sub>3</sub> smanjen je za 88,6%, N-NO<sub>2</sub> za 74,3%, a otopljenih ortofosfata za 99%. Manje postotke dobivene u ovom pokusu moguće je objasniti većom koncentracijom hranjivih soli u otpadnoj vodi RAS-a u isporudbi s onom u otvorenim sustavima.

## Zaključak

Salinitet uzgojnog medija od 25 psu pokazao se pogodnijim za uzgoj mikroalge *I. galbana* od saliniteta 33 psu. Populacija *I. galbana* može uspješno rasti na otpadnoj vodi iz recirkulacijskog akvakulturnog sustava saliniteta 25 psu, proizvodeći dovoljno biomase za eventualnu komercijalizaciju, što ujedno potvrđuje njenu podobnost za biloško pročišćavanje otpadne vode.

## Literatura

- Alkhamis Y, and Qin J.G. (2013). Cultivation of *Isochrysis galbana* in Phototrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions. *BioMed Research International*. 2013: 983465.
- Brown M.R., Garland C.D., Jeffrey S.W., Jameson I.D., Leroi M. (1993). The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis* sp. (clone T. ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*. 15: 285–296.
- Cañavate J.P., Hachero-Cruzado I., Pérez-Gavilán C., Fernández-Díaz C. (2020). Lipid dynamics and nutritional value of the eustarine strain *Isochrysis galbana* VLP from hypo to hyper salinity. *Journal of Applied Phycology*. 32: 3749-3766.
- Chen J., Bai J., Li H, Chang C., Fang S. (2015). Prospects for Bioethanol Production from Macroalgae. *Trends Renewable Energy*. 1: 2376-2144.
- Cohen Z. (1986). Products from microalgae. *In: Handbook of microalgal mass cultures* (Richmond, A., ed), p.421-454. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt T., Bossier P., Verstraete W. (2007). Nitrogen Removal Techniques in Aquaculture for a Sustainable 342 Production. *Aquaculture*. 270 (1–4): 1–14.
- Ebeling J.M., Sibrell P.L., Ogden, S.R., Summerfelt S.T. (2003). Evaluation of Chemical Coagulation–Flocculation Aids for the Removal of Suspended Solids and Phosphorus from Intensive Recirculating Aquaculture Effluent Discharge. *Aquaculture Engineering*. 29(1-2): 23–42.
- Fon-Sing S., Borowitzka M.A. (2016). Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology*. 28: 1–14.
- Gavrilović A., Jug-Dujaković J., Ljubičić A., Iveša N. (2021). Dizajn i menadžment mrijestilišta školjkaša. Pula, Hrvatska: Sveučilište Jurja Dibrile u Puli.
- Gong M., Bassi A. (2016). Carotenoids from microalgae: a review of recent development. *Biotechnol. Adv.* 34: 1396–1412.
- Hawrot-Paw M., Koniuszy A., Gałczyńska M., Zajac G., Szyszlak-Bargłowicz J. (2020) Production of Microalgal Biomass Using Aquaculture Wastewater as Growth Medium. *Water*. 12 (1):106.
- Hotos G., and Avramidou D. (1995). Growth study of the one-celled halophilous alga *Asteromonas gracilis* (Chlorophyta) in mass culture condition using different salinities, photoperiod and without addition of vitamins (in Greek with English summary). *Geotechnical Scientific Issues of the Geotechnic Chamber of Greece*. 6(2): 37-45.
- Lananan F., Abdul Hamid S.H., Din W.N.S., Ali N., Khatoon H., Jusoh A., Endut A. (2014). Symbiotic Bioremediation of Aquaculture Wastewater in Reducing Ammonia and Phosphorus Utilizing Effective Microorganism (EM-1) and Microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 95: 127–134.



- Moravvej Z., Makarem M.A., Rahimpour M.R. (2019). The fourth generation of biofuel. *In: Second and Third Generation of Feedstocks*, Basile, A., and Dalena F. (eds), 557-597. Elsevier Inc.
- Renaud S.M., Parry D.L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture. II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 6: 347–356.
- Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd\_Allah E.F. (2019). Microalgae metabolites: a rich source for food and medicine. *Saudi Journal Biology of Science*. 26: 709–722.
- Sun Z., Chen Y., Mao X., Liu J. (2017). Physiological and biochemical changes reveal differential patterns of docosahexaenoic acid partitioning in two marine algal strains of *Isochrysis*. *Marine Drugs*. 15(11): 357.
- Sun Z., Wei H., Zhou Z.G., Ashokkumar M., Liu J. (2018). Screening of *Isochrysis* strains and utilization of a two stage outdoor cultivation strategy for algal biomass and lipid production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 185(4): 1100-1117.
- Zuorro A. (2015). Optimization of Polyphenol Recovery from Espresso Coffee Residues Using Factorial Design and Response Surface Methodology. *Separation and Purification Technology*. 152: 64-69.

### **Possibilities of cultivation of microalga *I. galbana* in wastewater from aquaculture cultivation systems**

#### **Abstract**

More and more attention is being paid to the possibility of using wastewater from aquaculture farming systems. An attractive option is the cultivation of microalgae, which, with traditional use in hatcheries, are becoming increasingly popular raw materials in the pharmaceutical, cosmetic, food and biofuel industries. In this paper, the suitability of 25 psu salinity wastewater from the aquaculture production system for the cultivation of the microalga *I. galbana* was investigated. The data were then compared with the growth of breeding populations of this species in sterilized seawater with the addition of commercial breeding medium F / 2 at two different salinities (25psu and 33psu). The results show that the composition and amount of nutrients in wastewater are sufficient for successful cultivation of the microalga *I. galbana*. and that reduced salinity has a beneficial effect on the growth of its population in wastewater and commercial culture medium.

**Key words:** aquaculture waste water, salinity, biofuel, phytoplankton