Biotehnološki potencijal mikroalgi izoliranih iz rijeke Gacke i Jadranskoga mora- karakterizacija i optimizacija uzgojnih uvjeta

Grubišić, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:627687

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno- biotehnološki fakultet

MARINA GRUBIŠIĆ

Biotehnološki potencijal mikroalgi izoliranih iz rijeke Gacke i Jadranskoga mora- karakterizacija i optimizacija uzgojnih uvjeta

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr.sc. Mirela Ivančić Šantek

Zagreb, 2022

Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food technology and Biotechnology

MARINA GRUBIŠIĆ

Biotechnological potential of microalgae isolated from river Gacka and Adriatic Sea- characterization and optimization of growth conditions

DOCTORAL THESIS

Supervisor: PhD Mirela Ivančić Šantek, Full Professor

Zagreb, 2022

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zgrebu, kojeg je pročelnik prof. dr.sc. Božidar Šantek, a pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek, u okviru znanstveno istraživačkog projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ financiranog od strane Strukturnih i investicijskih fondova EU u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (Poziv: Vrhunska istraživanje Znanstvenih centara izvrsnosti KK.01.1.1.01).

Mentor: Dr. sc. Mirela Ivančić Šantek

Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek, znanstvena savjetnica, rođena je 21. lipnja 1971. godine u Splitu. Diplomirala je 1996. godine i magistrirala 2000. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu (PBF-u), a doktorirala 2005. godine na Tehničkom sveučilištu u Grazu (Technische Universität Graz, Austrija). Od 1997. godine zaposlena je na PBF-u Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, prvo kao mlađi istraživač i asistent. Habilitirala je 2006. godine na predmetu Kinetika biotehnoloških procesa na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2007. godine radi u znanstveno-nastavnom zvanju docenta, od 2012. godine u zvanju izvanrednog profesora, a od 2018. godine u zvanju redovitog profesora. Aktivno je bila uključena u realizaciju šest nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata, jednog tehnologijskog razvojno-istraživačkog projekta, te tri međunarodna projekta. Aktivno sudjeluje u radu Znanstvenog centara izvrsnosti za bioprospecting mora BioProCro. Voditeljica je znanstveno-tehnološkog bilateralnog projekta. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek se znanstveno usavršavala u Laboratoriju za molekularnu biotehnologiju prof. dr. sc. Helmutha Schwaba na Tehničkom sveučilištu u Grazu (Austrija, 2001-2004.), te u Centru izvrsnosti u Grazu (Austrija, 2006.). Sudjelovala je 1995. godine na „Yeast Molecular Genetics Course“ u International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, te „Bioprocess Engineering Course“ u organizaciji Europske federacije za biotehnologiju (Supetar, Brač, 2001.). Područje znanstveno-istraživačke djelatnosti prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek vezano je uz bioprocesno inženjerstvo, matematičko modeliranje bioprocesa, molekularnu biologiju i proteinsko inženjerstvo. Objavila je ukupno trideset i pet znanstvenih radova od kojih su dvadeset i četiri znanstvena rada klasificirana u a1 skupini, šest radova u a2 skupini, te pet radova s kongresa i skupova u kategoriji a3 rada (327 puta citirana, h-indeks 9 prema ISI Web of Science). Također je objavila poglavlje u znanstvenoj knjizi s međunarodnom recenzijom te jedan međunarodni patent koji se primjenjuje u komercijalnoj proizvodnji lijekova. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek bila je pozvani predavač na pet međunarodnih znanstvenih skupova. Sudjelovala je na dvadeset tri međunarodna i pet nacionalnih znanstvenih skupova s trideset i tri priopćenja. Također je bila predsjedavajući član na jednom međunarodnom znanstvenom skupu, te članica znanstvenog odbora dva međunarodna znanstvena skupa.Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek koordinatorica je dva modula i suradnica na pet modula na diplomskom studiju Bioprocesnog inženjerstva, te koordinatorica jednog modula na poslijediplomskom studiju Biotehnologije i bioprocesnog inženjerstva, prehrambene tehnologije i nutricionizam na PBF-a Sveučilišta u Zagrebu.Sudjelovala je u radu znanstveno-stručnog časopisa Kemija u industriji 2014-2022. kao član Uređivačkog odbora, te je bila gostujući urednik časopisa Energies MDPI. Dobitnik je više domaćih i međunarodnih nagrada: Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studentski rad (1995.), potpore Biotehničke zaklade PBF-a (1997.), godišnje nagrade Biotehničke zaklade PBF-a (2000.), DSM Innovation Award (DSM, Nizozemska, 2007) te nagrade Dr. Wolfgan Houska Preis (B&C Privatstiftung, Austrija, 2008.). Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek za pomoć u svim fazama istraživanja. Hvala joj za sad trud, strpljivost prema meni, nesebičnoj pomoći i svom znanju koje je prenijela na mene tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem dragim kolegama Antoniji Trontel, Mariu Novak, Mladenu Pavlečiću, Nenadu Marđetku i Blanki Ljubas, na potpori kada je bilo teško, na puno smijeha i svoj pomoći koju su mi iskazali. Hvala što ste bili tu i hvala što ste me naučili raditi i pokazali što znači imati dobre kolege!

Hvala mojoj obitelji što me poticala i podupirala sve ove godine. Hvala na podršci, strpljenju, slušanju teškoća i bezuvjetnoj ljubavi koju mi pružate.

I za kraj, hvala svim mojim prijateljima koji su mi kroz ove godine bili tu kao oni koji bi odnosili ono teško i donosili radost i odmor.

I na kraju, hvala Onomu koji mi je sve ovo darovao!

AMDG!

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno biotehnološkog fakulteta za akad. godinu 2020./2021. održanoj dana 27. siječnja 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 18. svibnja 2021. godine.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij: Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo
UDK: 582.263.1:628.335(262.3)(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL MIKROALGI IZOLIRANIH IZ RIJEKE GACKE I JADRANSKOG MORA: KARAKTERIZACIJA I OPTIMIZACIJA UZGOJNIH UVJETA

Marina Grubišić, mag.ing. bioproc.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilište u Zagrebu
Mentor: prof. dr. sc. *Mirela Ivančić Šantek*

Kratki sažetak disertacije

U ovom radu je izolirano i identificirano pet mikroalgi (*Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselsmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3) i jedna cijanobakterija (*Euhalothece* sp. C1) iz Jadranskog mora, te tri mikroalge iz rijeke Gacke (*Chlorella vulgaris* S2, *Clorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3). Provedena je karakterizacija izoliranih vrsta s obzirom na kinetiku rasta, makromolekulski sastav, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje. Mikroalga *Picochlorum* sp. D3 istaknula se najvećom brzinom rasta, dok je najveći prirast biomase zabilježen kod mikroalge *Tetraselmis* sp. Z3 (0.48± 0.11 g L^{-1}) i *Tetraselmis* sp. C6 (0.45 ± 0.04 g L^{-1}). Proteini su bili najzastupljenija makromolekula u svim mikroalgama (32.83–57.94%, g g^{-1}). Lipidi morskih mikroalgi bili su bogati na višestruko nezasićenim masnim kiselinama (eikosapentaenoična, dokosaheksaenoična, alfa- linolenska), dok su karotenoidi bili najzastupljeniji pigmenti. Metanolni ekstrakti svih istraženih mikroalgi pokazali su dobru antioksidativnu aktivnost, te su snažno inhibirali rast bakterija *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* i *Staphylococcus aureus*. Provedena je optimizacija sastava hranjive podloge i uvjeta uzgoja odabranih mikroalgi. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata *Nitzschia* sp. S5 u hranjivoj podlozi optimiranog sastava [Si]: [N-NO_3]:[PO_4^{3-}] =6.67:23.33:1 [mM:mM:mM] postignuta je šest puta veća koncentracija biomase u odnosu na šaržni uzgoj u izvornoj f/2 podlozi. Šaržnim uzgojem s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni postignuta je najveća koncentracija biomase *Picochlorum* sp. D3 od 1.68 g L^{-1}. Prihranom kulture natrijevim bikarbonatom potaknuto je nakupljanje lipida u biomasi čiji je udjel udvostručen. Učinkovita samoflokulacija *Picochlorum* sp. D3 (>98 %) postignuta je pri pH>11, te flokulacija (>97%) primjenom 1100 mg L^{-1} željezovog klorida pri pH=9 i 25 mg L^{-1} hitozana pri pH=8. Uspješno je provedena i bioflokulacija s plijesni *Mortierella isabelina* pri optimalnim uvjetima (mikroalga: plijesan=1:50 g g^{-1}, pH=2 i T=30°C) s učinkovitošću od 88.47%. Najveća učinkovitost adsorpcije stanica mikroalge *C. vulgaris* S2 na hife plijesni postignuta je s *Aspergillus niger*. Pogodan izvor ugljika za uzgoj slatkovodnih mikroalgi u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima bila je glukoza, galaktoza, melasa i octena kiselina. Uzgoj mikroalge *C. vulgaris* S2 uz veće molarne omjere izvora ugljika i dušika (C:N=10, 30, 50, 75 mol mol^{-1}) potaknuli su nakupljanje lipida tijekom šaržnog uzgoja i uzgoja s pritokom supstrata. Heterotrofni uvjeti uzgoja pokazali su se pogodnijim za rast biomase slatkovodnih mikroalgi u odnosu na miksotrofne uvjete. Dvostupanjskim šaržnim uzgojem *C. vulgaris* S2 postignuta je visoka koncentracija biomase od 19.31 g L^{-1} i produktivnost procesa od 0.075 g L^{-1}.

Broj stranica: 303
Broj slika: 83
Broj tablica: 70
Broj literaturnih navoda: 350
Broj priloga: 86
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: mikroalge, morske mikroalge, Jadransko more, biotehnološki potencijal, fotobioreaktor, optimizacija uzgoja, barbotirajuća kolona, dijatomeje, flokulacija, bioflokulacija
Datum obrane: 23. rujna 2022.
Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. dr. sc. Marin Roje, viši znanstveni suradnik

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb i na Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14, Zagreb.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph.D. thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in: Biotechnology and Bioprocess engineering
UDK: 582.263.1:628.335(262.3)(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Biotechnology

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROALGAE ISOLATED FROM RIVER GACKA AND ADRIATIC SEA: CHARACTERISATION AND OPTIMIZATION OF GROWTH CONDITIONS

Marina Grubišić, mag. ing. bioproc.

Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb
Supervisor: prof. dr. sc. *Mirela Ivančić Šantek*

Short abstract:

Five microalgae (*Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselsmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3) and one cyanobacterium (*Euhalothece* sp. C1) from the Adriatic Sea as well as three microalgae from the Gacka River (*Chlorella vulgaris* S2, *Clorococcum* sp. S1 and *Tetradesmus obliquus* S3) were isolated and identified. Microalgae were characterized regarding growth kinetics, macromolecular composition, and antimicrobial and antioxidant activity. Microalga *Picochlorum* sp. D3 showed the highest growth rate, while the highest biomass concentrations were achieved with microalgae *Tetraselmis* sp. Z3 (0.48± 0.11 g L^{-1}) and *Tetraselmis* sp. C6 (0.45± 0.04 g L^{-1}). Proteins were the most abundant macromolecule in all characterized microalgae (32.83–57.94%, g g^{-1}). Marine microalgae lipids were rich in polyunsaturated fatty acids (eicosapentaenoic, docosahexaenoic, alpha-linolenic), while carotenoids were the most abundant pigments. Methanolic extracts of all investigated microalgae showed good antioxidant activity and strongly inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. The nutrient concentration in the growth medium and the growth conditions were optimized for selected microalgae. In fed-batch cultivation of *Nitzschia* sp. S5 in the optimized growth medium with a nutrient molar ratio of [Si]: [N-NO_3]:[PO_4^{3-}] of 6.67:23.33:1 [mM:mM:mM] biomass concentration was six times higher compared to batch cultivation using an original f/2 medium. The highest biomass concentration of *Picochlorum* sp D3 was achieved in fed-batch cultivation in a bubble column (1.68 g L^{-1}). Supplementing the culture with sodium bicarbonate stimulated lipid accumulation resulting in doubled lipid content. Effective self-flocculation (>98 %) of *Picochlorum* sp. D3 was achieved at pH>11, and flocculation (>97%) using 1100 mg L^{-1} ferric chloride at pH=9 and 25 mg L^{-1} chitosan at pH=8. Bioflocculation with the fungi *Mortierella isabelina* was successfully performed under optimized conditions (microalgae: fungus=1:50 g g^{-1}, pH=2 and T=30°C) with an efficiency of 88.47%. The highest adsorption efficiency of microalgae *C. vulgaris* S2 cells was achieved with *Aspergillus niger*. Suitable carbon sources for cultivating freshwater microalgae under mixotrophic and heterotrophic conditions weres glucose, galactose, molasses, and acetic acid. Cultivation of the microalgae *C. vulgaris* S2 with higher molar ratios of carbon and nitrogen (C:N=10, 30, 50, 75 mol mol^{-1}) promoted the lipid accumulation during batch and fed-batch cultivation. Heterotrophic cultivation conditions were more suitable for the biomass growth of freshwater microalgae than mixotrophic conditions. The two-stage batch cultivation of *C. vulgaris* S2 resulted in a high biomass concentration of 19.31 g L^{-1} and productivity of 0.075 g L^{-1}.

Number of pages: 303
Number of figures:117
Number of tables: 83
Number of references: 350
Original in: Croatian
Key words: microalgae, marine microalgae, Adriatic Sea, biotechnological potential, photobioreactor, cultivation optimization, bubble column, diatoms, flocculation, biofloculation
Date of the thesis defense: 23.09.2022**.**
Reviewers:

1. Blaženka Kos, PhD, Full Professor
2. Ivana Radojčić Redovniković, PhD, Full Professor
3. Marin Roje, PhD, Senior scientific associate

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14, agreb).

SAŽETAK

Mikroalge su jednostanični mikroorganizmi koji za rast i razmnožavanje koriste Sunčevu energiju u procesu fotosinteze. Procjenjuje se da postoji od 70 000 do milijun vrsta mikroalgi, od koji je 44 000 do sada detaljno istraženo i opisano. Prisutne su u gotovo svim ekosustavima na Zemlji uključujući slatkovodna i morska staništa, te staništa u kojima su izrazito nepovoljni uvjeti rasta (Falaise i sur., 2016; Mata i sur., 2010). Široka lepeza različitih i nedovoljno istraženih proizvoda metabolizma mikroalgi rezultat je prilagodbe stanica na različite, i u nekim slučajevima, ekstremne okolišne uvjete, te natjecanja mikroalgi za hranu i prostor u staništima u kojima su okružene bakterijama, virusima i plijesnima te drugim višim organizmima (M. A. Borowitzka, 2013; Falaise i sur., 2016). Proizvodi primarnog i sekundarnog metabolizma mikroalgi kao što su tvari male molekulske mase, pigmenti, vitamini, lipidi, proteini i polisaharidi našli su primjenu u proizvodnji finih kemikalija, farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, akvakulturi, u prehrani stoke, te proizvodnji bioenergije i biogoriva (de Jesus Raposo i sur., 2013; Koller i sur., 2014). S obzirom na izniman potencijal primjene mikroalgi u biotehnološkoj proizvodnji, posljednjih desetak godina intenzivno se radi na izolaciji i karakterizaciji novih vrsta (Neofotis i sur., 2016). Izolacija, pročišćavanje i identifikacija mikroalgi izoliranih iz rijeke Gacke i Jadranskog mora prvi je od tri cilja ove doktorske disertacije. Jadransko more jedno je od najbolje očuvanih, ali nedovoljno istraženih područja Mediterana s potencijalno biotehnološki interesantnim mikroorganizmima uključujući i mikroalge (Cerano i sur., 2015). Uspješno je izolirano i do razine kseničnosti pročišćeno jedanaest morskih mikroalgi, a analizom molekularnih biljega (analiza 18S rRNA, ITS, LSU regije te 28S ili plastidne 16S regije) do razine roda identificirano pet mikroalgi (*Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3) i jedna cijanobakterija (*Euhalothece* sp. C1). Identifikacija preostalih izoliranih mikroalgi potvrdila je njihovu pripadnost razredu Bacillariophyceae i redu Naviculales, te da je za tri izolata riječ o istoj vrsti, različitoj od preostala dva izolata. Od slatkovodnih mikroalgi uspješno su izolirane i do razine kseničnosti pročišćene tri mikroalgalne kulture: *Chlorococcum* sp., *Chlorella vulgaris* i *Tetradesmus obliquus*. Drugi cilj ove doktorske disertacije bio je karakterizirati odabrane izolirane mikroalge s obzirom na primjenu u biotehnološkoj proizvodnji. Izolirane mikroalge međusobno su uspoređene s obzirom na brzinu rasta, prinos biomase i proizvoda, te produktivnost procesa. Također provedena je i analiza makromolekulskog sastava biomase mikroalgi tj. udio ugljikohidrata, lipida, proteina i pigmenata te njihov sastav. Najvećom

brzinom rasta istaknule su se mikroalge *Picochlorum* sp. D3 i *Nitzschia* sp. S5 (0.01 i 0.0092 h^{-1}), dok je najveća koncentracija biomase zabilježena kod *Tetraselmis* sp. C6 i *Tetraselmis* sp. Z3 (0.45 i 0.48 g L^{-1}). *Nanofrustulum shiloi* D1 imao je visoki udio lipida u biomasi od 33.65 % što ga čini prikladnim za proizvodnju biodizela. Mikroalga *Tetraselmis* sp Z3 imala je visok udio nezasićenih masnih kiselina, eikosapentaenoične (EPA), dokosaheksaenoične (DHA) i alfa-linolenske (ALA), što ju čini zamjenom za riblja ulja. Sve okarakterizirane mikroalge sadržavale su visok udjel proteina i pigmenata od kojih su prevladavali karotenoidi. Najveći udio karotenoida utvrđen je u zelenim mikroalgama iz odjeljka Chlorophyta. Također, istražen je i antioksidativni potencijal mikroalgalnih ekstrakata te njihovo potencijalno antimikrobno djelovanje. Metanolni ekstrakti svih okarakteriziranih mikroalgi poakzali su snažno inhibitorno djelovanje na Gram negative bakterije *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* i Gram pozitivnu *Staphylococcus aureus.* Kako bi se povećala ekonomska isplativost procesa proizvodnje biomase mikroalgi i njihovih metabolita potrebno je provesti optimizaciju uvjeta uzgoja što najčešće uključuje optimizaciju sastava hranjive podloge, intenzitet svjetla, temperaturu, način vođenja uzgoja i vrstu bioreaktora (Koller i sur., 2012). Pa je stoga treći cilj ove doktorske disertacije bio optimizacija uvjeta uzgoja za odabrane izolirane mikroalgalne vrste. Prvo je istražen utjecaj koncentracije makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5, a zatim je provedena optimizacija omjera koncentracija tih istih nutrijenata. Potom je na hranjivoj f/2 podlozi optimiranog sastava proveden šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 kojim je postignuta 2.23 puta veća koncentracija biomase u odnosu na šaržni uzgoj te 5.82 puta veća od uzgoja u ne-optimiranom mediju. Kao predstavnik zelenih mikroalgi (Chlorophyta) odabran je *Picochlorum* sp. koji se ističe velikom brzinom rasta, velikim udjelom lipida, te tolerancijom na velike koncentracije NaCl i visoke temperature (35 do 40°C). Proveden je uzgoj u dva otvorena sustava, barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu. Kultura je prihranjivana s natrijevim bikarbonatom kao dodatnim izvorom ugljika s nakupljanja ugljikohidrata ili lipida odnosno rezervnih tvari. Ovom uzgoju u 30 litarskoj barbotirajućoj koloni prethodio je uzgoj pri nekoliko C:N omjera, te uzgoj u uvjetima limitacije izvorom dušika s ciljem poboljšanja nakupljanja rezervnih tvari bogatih energijom. Uzgoj u barbotirajućoj koloni vođen je šaržno uz pritok supstrata. Tijekom uzgoja volumen podloge se sukcesivno povećavao kako bi se izbjegla dugotrajna faza prilagodbe kulture na nove uvjete rasta, te time izbjegla duga lag faza rasta. Osim uzgoja, proces izdvajanja biomase nakon kultivacije predstavlja važan korak u cjelokupnom procesu proizvodnje na koji otpada i do 30% ukupnih troškova proizvodnje. Iz tog razloga, kao zadnji korak u optimizaciji procesa

istražena je flokulacija kao alternativa izdvajanju biomase energetski zahtjevnim centrifugiranjem koje je posebice nepraktično za industrijske procese. Ispitana je mogućnost flokulacije promjenom pH vrijednosti kulture, te primjenom željezovog klorida i hitozana. Pri tome je napravljena optimizacija koncentracije flokulanta te pH vrijednosti za učinkovitu flokulaciju. Najveća učinkovitost flokulacije postignuta je pri pH vrijednosti 11 i 12. Flokulacijom biomase s željezovim kloridom koncentracije 1100 mg L^{-1} pri pH 8.77 istaloženo je 91.54% biomase čime se izbjegao dodatni utrošak kiseline i lužine za korekciju pH vrijednosti. S učinkovitošću flokulacije od 97.53%, koncentracija hitozana od 25 mg L^{-1} i pH vrijednost 8 pokazali su se kao optimalni uvjeti za flokulaciju *Picochlorum* sp. D3 hitozanom. Osim toga, ispitana je i mogućnost bioflokulacije pomoću plijesni *Mortierella isabellina* s ciljem snižavanja troškova izdvajanja, ali i potencijalnog obogaćivanja lipidima konačnog proizvoda budući da plijesan *M. isabellina* također ima tendenciju nakupljanja lipida u visokom udjelu. Kod bioflokulacije optimiran je odnos masa plijeni i mikroalge, pH vrijednost i temperatura za uspješnu provedbu bioflokulacije. Optimalni uvjeti za proces bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* bili su pH vrijednost 2, temperatura 30 °C i omjer masa biomase mikroalge i plijesni od 1:50 [g g^{-1}]. Istražena je i mogućnost bioflokulacije slatkovodne mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 s plijesni. Pri tome su uz plijesan *Mortierella isabellina* istražene i plijesni *Aspergillus niger* i *Aspergillus fumigatus*. Bioflokulacija mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 bila je najučinkovitija primjenom plijesni *Aspergillus niger*.

SUMMARY

SUMMARY

In general, microalgae can be defined as unicellular microorganisms able to conduct photosynthesis and ensure the energy needed for their growth and reproduction. It is estimated that there are around 70 000 up to million microalgae species, but only around 44 000 are identified and characterized. Microalgae are present in almost every ecosystem on Earth, including marine and freshwater habitats, and especially habitats with unfavorable and harsh growth conditions (Falaise i sur., 2016; Mata i sur., 2010). Microalgae diversity and huge potential for production of various bioactive molecules is a result of adaptation to these harsh environmental conditions and competition for food resources with other organisms habituating in their environments, such as bacteria, viruses, fungus, and other algae (Borowitzka, 2013; Falaise et al., 2016). Pigments, vitamins, lipids, proteins, polysaccharides, and other products of primary or secondary metabolism are often used in the production of high-value chemicals, pharmaceutic industry, food industry, aquaculture, and feed purposes and production of biofuels (de Jesus Raposo et al., 2013; Koller et al., 2014). Due to the vast biotechnological potential of microalgae in the last decade, a lot of research has been directed to the isolation and characterization of new microalgae species (Neofotis et al., 2016).

Therefore, three main goals were set for this doctoral thesis:

1. Isolation, purification, and identification of marine and freshwater microalgae from the Adriatic Sea and river Gacka
2. Characterization of selected microalgae regarding growth rate, productivity, biomass composition (pigments, lipids, proteins, and carbohydrates) and antioxidative and antimicrobial activities of microalgal extracts.
3. Optimization of cultivation conditions of chosen marine and freshwater microalgae, including optimization of growth media composition, cultivation mode, bioreactor type and biomass harvesting.

Methodology:

Water samples were collected at several sites on the Adriatic coast (Šibenik, Split, Island Šolta) and different locations along the course of the river Gacka (surroundings of town Otočac). Samples were kept in a dark and cold place (+4 °C) until transported into the laboratory. The first step was culture enrichment using the following methods: 1) growing a sample aliquot in growth media and 2) separating the cells by filtration through a 0.45-µm-

pore-size membrane and inoculating in growth medium (f/2 for marine and BBM for freshwater microalgae). The samples were cultivated at room temperature and in daylight for two weeks. The second step was the isolation of pure cultures by combining serial dilution and the streak plate method. Firstly, serial dilution of cultures was prepared in 96 and 24-well microplates. After 7 to 10 days of cultivation at a temperature of 20-25 °C under warm light, the culture aliquot was spread on agar plates by streaking. The well-isolated colonies grown on agar plates were assumed to arise from a single microalgal cell and represent a pure culture. The grown colonies were re-grown in liquid media and afterwards streaked on agar plates. The procedure was repeated several times to obtain monoalgal culture. The purity of the culture was also examined using a microscope. Isolated xenic cultures were maintained in liquid growth media (f/2 or BBM media) at 23 °C under warm light (3000 lux) and 12:12=light:dark [h h^{-1}] cycles. The monoalgal xenic cultures were identified by DNA sequencing of 18S rRNA, ITS, LSU and 16S rRNA region. Sequence alignment of obtained DNA sequences and similar sequences identified through BLAST search provided identification of the microalgal strains.

The cultures were cultivated in standard growth media and conditions (23 °C, 180 rpm, 3000 lux at 12:12 h light:dark cycle) to compare their growth kinetics by measuring optical density and cell concentration by counting cells in the Thoma chamber. At the end of cultivation, the biomass concentration was determined gravimetrically and the process parameters, including specific growth rate, biomass, and product productivity, were calculated.

The biomass composition was also analyzed. Lipid content was determined as total fatty acids by in situ transesterification, using the procedure developed by Nacional Laboratory for Renewable Energy (NREL; (van Wychen et al., 2013). The fatty acid profile of microalgae lipids was determined by gas chromatography. Thin layer chromatography- flame ionisation detection analysis (TLC-FID analysis) was applied to quantify lipid classes. High-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-Vis photodiode-array (PDA) detector was used to analyze pigments in microalgal extracts. Carbohydrate composition was determined by a method developed by NREL (Wychen & Laurens, 2013). Monosaccharides released by two-step acid hydrolysis of carbohydrates in cell biomass were analyzed by an Ultra Pressure liquid chromatography (UPLC) using a refractive index detector (RID). The proteins were determined spectrophotometrically by the Lowry method. Antioxidative and antimicrobial activity of microalgae extracts were also determined. The antioxidative activity and potential were determined using two assays: ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay (Guedes et al., 2013) and DPPH (2,2-diphenyl-1-

picryl-hydrazyl-hydrate) assay (Müller et al., 2011). The disk diffusion method was applied to detect the antimicrobial activity of microalgal extracts. The panel of seven microorganisms used in this analysis included Gram-positive and negative bacteria *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, yeast *Candida utilis* and the fungus *Aspergillus niger*. Based on the obtained results, several microalgae were selected for further growth conditions optimization. First, optimization of growth medium (macronutrient concentrations and their molar ratio) was conducted, followed by the cultivation of microalgae under different cultivation modes (batch, fed-batch, two-phased batch cultivation) and cultivations in different bioreactor types (stirred tank, bubble column, open pond). During cultivation, growth kinetic was monitored, and process parameters were determined. The analysis of biomass composition was also determined to investigate the effect of cultivation conditions on the accumulation of macromolecules in microalgae biomass. Finally, microalgae biomass was harvested by flocculation. Flocculation was achieved by a change in the pH of the culture (self-flocculation) and by the addition of chemical flocculant ferric chloride and chitosan at certain pH. The concentration of ferric chloride and chitosan as well as the pH of the culture broth, was optimized for effective flocculation.

Results and discussion

Isolation, purification, and identification of microalgae from samples from the Adriatic Sea and river Gacka was the first goal of this research. The Adriatic Sea is one of the best-preserved biological reserves in the Mediterranean, whose microbial diversity is still largely unexplored (Cerano et al., 2015). Five out of eleven isolated marine species were identified by DNA sequencing: *Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3. In addition, one cyanobacterium *Euhalothece* sp. C1 was identified. Three freshwater microalgae were isolated and identified: *Chlorococcum* sp., *Chlorella vulgaris* and *Tetradesmus obliquus*. Further, isolated microalgae were characterized regarding growth kinetics and biomass composition as described for marine microalgae. The strain *Picochlorum* sp. D3, showing the highest specific growth rate (0.009 h^{-1}), had biomass productivity of 33.98 ± 0.02 mg L^{-1} $day^{-1,}$ and proteins were the most abundant macromolecule in the biomass (32.83–57.94%, g g^{-1}). *Nanofrustulum shiloi* D1 contained significant amounts of neutral lipids (68.36%), while the biomass of *Picochlorum* sp. D3, *Tetraselmis* sp. Z3, *Tetraselmis* sp. C6 and *Euhalothece* sp. C1 was rich in glycolipids and phospholipids (>75%). The lipids of all studied microalgae contained predominantly

unsaturated fatty acids. Carotenoids were the most abundant pigments with the highest content of lutein and neoxanthin in representatives of Chlorophyta and fucoxanthin in strains belonging to the Bacillariophyta. All microalgal extracts showed antioxidant and antimicrobial activity against Gram-negative *E. coli* and *S. typhimurium* and Gram-positive *S. aureus*. Based on these results, microalgae *Nitzschia* sp. S5 and *Picochlroum* sp. D3 were chosen for further investigation and optimization. One of the most commonly used growth media for marine microalgae, especially diatoms, is the f/2 Guillard medium. However, this medium is optimized for the maintenance of marine microalgae, and the nutrient concentrations are unsuitable for the production of microalgae biomass at high densities. Therefore, the effect of three macronutrient concentrations on growth and biomass composition of diatom *Nitzschia* sp. S5 was first studied. In general, nitrogen, phosphorus and silicon are the main macronutrients confining the growth of diatoms in the f/2 medium. During the growth of *Nitzschia* sp. S5 cell biomass concentration and nutrient concentration followed Shelford´s law of tolerance, where the nutrients within a certain concentration range promote microalgae growth while concentration above a specific value inhibits it. The maximal macronutrient concentrations were: 2 and 3.5 mM for nitrogen, 0.5 and 1 mM for silicon and 0.036 mM for phosphorus, while silicon showed the most substantial effect on biomass productivity. A maximum biomass concentration of 0.49 g L^{-1} was obtained at 1 mM silicon. The second goal of this research was to optimize the nitrogen, silicate, and phosphate molar ratio to maximize biomass productivity of *Nitzschia* sp. S5. The highest biomass concentration (0.73 g L^{-1}) and productivity (52.04 mg L^{-1} day^{-1}) were obtained at Si: N-NO_3: PO_4^3 ratio of 6.67:23.33:1 mmol:mmol:mmol. Fed-batch cultivation using an optimized growth medium resulted in a 2.23-fold increase in biomass concentration compared to batch cultivation and a 5.82-fold increase compared to batch cultivation using the original f/2 growth medium. The *Picochlorum* genus has recently received much attention due to its high growth rate (El-Kassas, 2013; Weissman et al., 2018). In this research cultivation of *Picochlorum* sp. D3 strain was conducted in two open systems, a bubble column, and an open pond system, while the f/2 medium was modified by the addition of sodium bicarbonate to promote the accumulation of energy molecules, lipids and/or carbohydrates. Additionally, the two-phase cultivation was investigated. The first phase was designed to promote biomass production, and in the second phase, nitrogen limitation was applied along with supplementation with sodium bicarbonate to promote lipid or carbohydrate accumulation. The highest lipid content of 10.22% in cell biomass was obtained under nitrogen limitation and feeding the culture with 2 g L^{-1} of sodium bicarbonate. Fed-batch cultivation of *Picochlorum*

sp. D3 in a bubble column with a gradual increase of culture volume resulted in biomass concentration and productivity of 1.68 g L^{-1} and 0.064 g L^{-1} day^{-1}, respectively. In the second phase, under the nitrogen and phosphorus limitation, biomass accumulated 14.18% of lipids and 37.69% of carbohydrates. However, proteins were the major macromolecule in cell biomass (53.53%).

Flocculation of *Picochlorum* sp. D3 biomass was also investigated. Firstly, the impact of pH on self-flocculation of *Picochlorum* sp. D3 cells was investigated, and results confirmed that an alkaline pH value above 10 promotes cell flocculation. At pH 11, the flocculation efficiency was 97.81% and at pH 12 it was 98.25%. With the further decrease of pH value, the efficiency significantly dropped and at pH 9, an efficiency of 17.83% was determined. The surface of microalgal cells is negatively charged and at alkaline pH neutralizes the negative charge of microalgal cells resulting in cell flocculation. Moreover, the salts present in the growth medium precipitated at high pH values, enhancing flocculation efficiency by interacting with the surface of the microalgal cells (L. Zhu i sur., 2018). Two flocculants were also used for flocculation, ferric chloride, and chitosan. The maximum flocculation efficiency of 96.65 % was obtained at 1100 mg L^{-1} of ferric chloride and pH 9. A slightly lower flocculation efficiency of 91.54% was obtained from culture broth without previous pH correction (pH 8.77) using the same quantity of ferric chloride. When applying biopolymer chitosan, the highest flocculation efficiency of 97.53% was achieved at 25 mg L^{-1} chitosan and pH 8. The main advantage of using chitosan as a flocculant is its biodegradable and non-toxic nature which makes it safe for human consumption (L. Zhu i sur., 2018). Finally, the biomass of *Picochlorum* sp. D3 was flocculated using the fungus *Mortierella isabellina*. Maximum efficiency of 88.47% was achieved at pH 2, temperature 39 °C and microalgae to fungus biomass dry weight ratio of 1:50 [g g^{-1}].

Mixotrophic and heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 and *Tetradesmus obliquus* S3 using twelve different carbon sources (glucose, fructose, sucrose, molasses, glycerol, xylose, maltose, arabinose, galactose, lactose, cellobiose and acetic acid) were investigated. Glucose, galactose, and acetic acid were suitable for the cultivation of all freshwater microalgae. The second goal was to optimize sugar concentration in the growth medium. The glucose concentration was in the range of 10-70 g L^{-1}. *Chlorella vulgaris* S2 grew well on glucose at concentrations from 10 to 50 g L^{-1}, while concentrations above 50 g L^{-1} inhibited growth. All investigated microalgae grew well on acetic acid at a concentration of 10 g L^{-1}. Furthermore, optimization of the carbon to nitrogen molar ratio in

the growth medium of *Chlorella vulgaris* S2 was also conducted. Higher biomass concentration was achieved under heterotrophic cultivation conditions compared to mixotrophic. The highest biomass concentration of 20.14 g L^{-1} was achieved at a molar carbon to nitrogen ratio of 50 [mol mol^{-1}]. A higher carbon and nitrogen molar ratio supported lipid accumulation in biomass of *Chlorella vulgaris* S2. Fed-batch cultivation using a growth medium with 20 g L^{-1} of glucose at carbon to nitrogen molar ratio of 30 mol mol^{-1} resulted in 19.32 g L^{-1} of biomass and productivity of 0.0747 g L^{-1} h^{-1}, which is several times higher than reported in the literature (Stephenson et al., 2010). Furthermore, the bioflocculation of *Chlorella vulgaris* S2 with three fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Mortierella isabellina*) was investigated. Fungus *Aspergillus niger* was the most efficient for adsorption of *Chlorella vulgaris* S2. However, further optimization of adsorption conditions for efficient biofloculation is needed.

Conclusions

1. Eleven marine species were isolated from the Adriatic Sea and three freshwater microalgae from river Gacka. Five marine microalgae (*Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3), one cyanobacteria (*Euhalothece* sp. C1) and three freshwater microalgae (*Chlorococcum* sp. S1, *Chlorella vulgaris* S2, *Tetradesmus obliquus* S3) were identified by DNA sequencing.
2. The highest specific growth rate (0.009 h^{-1}), and biomass productivity of 33.98 ± 0.02 mg L^{-1} day^{-1} had strain *Picochlorum* sp. D3. Proteins were the most abundant macromolecule in the cell biomass (32.83–57.94%, g g^{-1}) in characterized microalgae. The highest lipid content of 33.65% was determined in *Nanofrustulum shiloi* D1. The most dominant fatty acids in microalgal lipids were palmitic (C16:0), myristic (C14:0) and palmitoleic acid (C16:1).
3. Carotenoids were the most abundant pigments with the highest content of lutein and neoxanthin in representatives of Chlorophyta and fucoxanthin in strains belonging to the Bacillariophyta.
4. All microalgal extracts showed antioxidant activity and antimicrobial activity against Gram-negative *E. coli* and *S. typhimurium* and Gram-positive *S. aureus*.
5. The highest biomass concentration (0.73 g L^{-1}) and productivity (52.04 mg L^{-1} day^{-1}) of diatom *Nitzschia* sp. S5 was obtained at Si: $N\text{-}NO_3$: PO_4^3 ratio of 6.67:23.33:1 mmol:mmol:mmol. In fed-batch cultivation using optimized growth media, biomass

concentration increased 2.23 times compared to batch cultivation and 5.82-fold compared to batch cultivation using the original f/2 growth medium.

6. Fed-batch cultivation of *Picochlorum* sp. D3 in the bubble column with successive volume increase resulted in biomass concentration of 1.68 g L^{-1} with the productivity of 0.064 g L^{-1} day^{-1}.
7. High efficiency of self-flocculation (>98%) was achieved at pH>11 after one hour. Similar efficiency of flocculation was obtained with 1100 mg L^{-1} ferric chloride at pH 9 and 25 mg L^{-1} chitosan at pH 8. Bioflocculation is an innovative harvesting method for microalgae separation from the culture broth. The flocculation efficiency depended on pH, temperature, and the weight ratio of fungus to microalgae biomass. The flocculation efficiency of 88.47% was achieved using fungus *Mortierella isabellina* at pH= 2, temperature 39 °C and microalgae to fungus biomass dry weight ratio of 1:50 [g g^{-1}].
8. Freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* S2, *Chloroccocum* sp. S1 and *Tetradesmus obliquus* S3 grew well using a growth medium with glucose, galactose, and acetic acid as carbon sources. Sugars xylose, maltose, arabinose, lactose, cellobiose, fructose and sucrose were unsuitable for the cultivation of investigated microalgae.

   A higher molar ratio of carbon and nitrogen increased the accumulation of lipids in *Chlorella vulgaris* S2 biomass. Higher biomass concentration was achieved in heterotrophic cultivation conditions compared to mixotrophic ones. Two-phase batch cultivation of *Chlorella vulgaris* S2 under nitrogen limitation conditions resulted in biomass concentration of 19.31 g L^{-1} and productivity of 0.075 g L^{-1} h^{-1}. Fungus *Aspergillus niger* was suitable for bioflocculataion of *Chlorella vulgaris* S2, while *Aspergillus fumigatus* and *Mortierella isabellina* were less effective.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 4
2.1. Mikroalge 4
2.2. Klasifikcija algi 5
2.3. Dijatomeje 7
2.3.1. Građa dijatomeja 8
2.3.2. Kretanje dijatomeja 10
2.3.3. Životni ciklus 11
2.3.4. Fotosinteza 13
2.3.5. Transport i metabolizam silicija 15
2.4. Taksonomija i morfologija mikroalgi iz odjeljka Chlorophta 16
2.4.1. Građa stanica i razmnožavanje 17
2.5. Najvažniji metabolički procesi u stanicama mikroalgi 19
2.5.1. Načini ishrane i pridobivanja energije 19
2.5.2. Fotosinteza 20
2.5.3. Biosinteza lipida 21
2.5.3.1. Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida 25
2.6. Uzgoj mikroalgi 26
2.6.1. Sustavi za uzgoj 28
2.6.2. Ostali faktori koji utječu na uzgoj mikroalgi 31
2.6.2.1. Svjetlo 31
2.6.2.2. Temperatura 32
2.6.2.3. Miješanje 33
2.6.2.4. Nutrijenti, pH i CO_2 34
2.6.3. Izdvajanje biomase mikroalgi 35
2.6.3.1. Bioflokulacija 38
2.7. Biotehnološka primjena mikroalgi 40
2.7.1. Mikroalge u ljudskoj i životinjskoj prehrani 41
2.7.2. Mikroalgalni pigmenti 43
2.7.3. Višestruko nezasićene masne kiseline 45
2.7.4. Mikroalge kao sirovina za proizvodnju biogoriva 46
3. EKSPERIMENTALNI DIO 50

3.1. Materijali 50
3.1.1. Radni mikroorganizmi 50
3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga 50
3.1.3. Ostale kemikalije 52
3.2. Hranjive podloge 53
3.2.1. Hranjive podloge za održavanje kultura morskih mikroalgi i njihovu karakterizaciju 53
3.2.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj – f/2 podloga različitih koncentracija 55
3.2.3. Hranjiva podloga za prihranu tijekom uzgoja *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru 55
3.2.4. Hranjiva podloga za istraživanje utjecaja koncentracije dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 56
3.2.5. Hranjiva podloga za istraživanje učinka omjera koncentracija dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 57
3.2.6. Hranjiva podloga za šaržni fototrofni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 58
3.2.7. Hranjiva podloga za istraživanje utjecaja različitih omjera ugljika i dušika na rast mikroalge *Picochlorum* sp. D3 58
3.2.8. Hranjive podloge za uzgoj slatkovodnih mikroalgi 59
3.2.9. Hranjiva podloga za istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima ugljika 60
3.2.10. Hranjiva podloga za istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima dušika 60
3.2.11. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj *Chlorella vulgaris* S2 s pritokom supstrata u biorekatoru 60
3.2.12. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma plijesni 61
3.2.13. Hranjiva podloga za uzgoj kulture plijesni *Mortierella isabellina* 61
3.2.14. Hranjiva podloga za uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni 61
3.2.15. LB hranjiva podloga 62
3.3. Oprema i aparatura 62
3.3.1. Laboratorijsku bioreaktor s mješalom 62
3.3.2. Babrotirajuća kolona 62
3.3.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti 63
3.3.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) 63
3.3.5. Uređaj za plinsku kromatografiju 63
3.3.6. Ostali uređaji 63

3.4. Metode ... 65
3.4.1. Izolacija morskih i slatkovodnih mikroalgi ... 65
3.4.1.1. Uzorkovanje ... 65
3.4.1.2. Izolacija čiste kulture mikroalgi ... 65
3.4.1.3. Metoda obogaćivanja uzoraka ... 66
3.4.1.4. Metoda razrjeđivanja ... 66
3.4.1.5. Metoda iscrpljivanja ... 66
3.4.1.6. DNA sekvencioniranje ... 67
3.4.2. Uzgoj morske mikroalge *Nitzschia* sp. S5 ... 68
3.4.2.1. Uzgoj inokuluma dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 ... 68
3.4.2.2. Uzgoj inokuluma za uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru ... 68
3.4.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije f/2 podloge na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 68
3.4.2.4. Polukontinuirani uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru ... 69
3.4.2.5. Optimizacija koncentracije makronutrijenata u f/2 podlozi za fototrofni uzgoj dijtomeje *Nitzschia* sp. S5 ... 70
3.4.2.6. Optimizacija omjera koncentracija makronutrijenata u f/2 podlozi za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 ... 71
3.4.2.7. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 s optimiranim sastavom makronutrijenata u f/2 podlozi ... 71
3.4.3. Uzgoj morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3 ... 72
3.4.3.1. Uzgoj inokuluma mikroalge *Picochlorum* sp. D3 ... 72
3.4.3.2. Uzgoj inoukuluma za fototrofni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu ... 72
3.4.3.3. Fototrofni nesterilni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu ... 73
3.4.3.3.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata *Picochlorum* sp. D3 u otvorenom bazenu ... 73
3.4.3.3.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni 74
3.4.3.4. Optimiranje rasta *Picochlorum* sp. D3 pri različitim omjerima koncentracija izvora dušika i izvora ugljika ... 75
3.4.3.5. Istraživanje utjecaja limitacije dušikom na rast i sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 ... 75
3.4.3.6. Šaržni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. uz sukcesivno povećanje volumena u barbotirajućoj koloni ... 76
3.4.4. Autoflokulacija promjenom pH ... 77
3.4.5. Flokulacija željezovim kloridom ... 77

3.4.6. Flokulacija hitozanom 78
3.4.7. Flokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* 78
3.4.7.1. Uzgoj inokuluma plijesni *M. isabellina* 78
3.4.7.2. Submerzni uzgoj plijesni *M. isabellina* 79
3.4.7.3. Izdvajanje peleta plijesni 79
3.4.7.4. Bioflokulacija 79
1.1.1. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi 81
1.1.1.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi 81
1.1.1.2. Istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima ugljika 81
1.1.1.3. Istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima dušika 82
1.1.1.4. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u biorekatoru 82
1.1.1.5. Uzgoj mješovite kulture plijesni i mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 83
1.2. Analitičke metode 84
1.2.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici 84
1.2.2. Brojanje stanica pomoću brojača stanica 85
1.2.3. Mjerenje optičke gustoće 85
1.2.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari 85
1.2.5. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi 86
1.2.6. Određivanje koncentracije fosfata u podlozi 87
1.2.7. Određivanje koncentracije silicija 87
1.2.8. Određivanje udjela proteina u biomasi 88
1.2.9. Određivanje udjela ugljikohidrata u biomasi mikroalgi 90
1.2.10. Određivanje sastava masnih kiselina i totalnih lipida u biomasi mikroalgi 90
1.2.11. Analiza lipidnih klasa 91
1.2.12. Određivanje ukupnih lipida u biomasi mikroalgi (Bligh i Dyer metoda) 92
1.2.13. Analiza sastava pigmenata 93
1.2.14. Spektrofotometrijska analiza sastava pigmenata 94
1.2.15. Priprema ekstrakta mikroalgi za ispitivanje antioksidativnog potencijala 95
1.2.16. Određivanje ukupnih flavonoida 95
1.2.17. Određivanje ukupnih fenola 96
1.2.18. Određivanje antioksidacijskog potencijala ABTS metodom 96
1.2.19. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom 96
1.2.20. Priprema ekstrakata mikroalgi za ispitivanje antimikrobnog djelovanja 97

1.2.21. Ispitivanje antimikrobnog potencijala metodom disk difuzije 98
1.2.22. Određivanje sadržaja pepela u biomasi mikroalgi 98
1.3. Izračun pokazatelja uspješnosti procesa 99
3. REZULTATI 101
4.1. Izolacija, identifikacija i karakterizacija izoliranih morskih mikroalgi 101
4.2. Karakterizacija izoliranih mikroalgi 103
4.3. Optimizacija uzgoja odabranih sojeva morskih mikroalgi 110
4.3.1. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 110
4.3.2. Uzgoj morske mikroalge *Picochlorum* sp. 128
4.4 Optimizacija flokulacije 140
4.4.1 Flokulacija promjenom pH vrijednosti 140
4.4.2 Flokulacija hitozanom 141
4.4.3 Flokulacija željezovim kloridom 143
4.4.4 Bioflokulacija pomoću plijesni *Mortierella isabellina* 145
4.5 Karakterizacija slatkovodnih mikroalgi 149
4.5.1 Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima i koncentracijama ugljika ... 149
4.5.2. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim koncentracijama izvora dušika 152
4.5.3. Šaržni heterotrofni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u fotobioreaktoru 158
4.5.4. Uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni 161
4. RASPRAVA 164
5.1. Izolacija, identifikacija i karakterizacija izoliranih morskih mikroalgi 164
5.1.1. Izoalcija i identifikacija morskih mikroalgi 164
5.1.2. Identifikacija slatkovodnih mikroalgi 170
5.1.3. Karakterizacija izoliranih mikroalgi 172
5.1.3.1. Kinetika rasta izoliranih mikroalgi 172
5.1.3.2. Sastav biomase izoliranih mikroalgi 175
5.1.3.3. Monosaharidni sastav ukupnih ugljikohidrata izoliranih morskih mikroalgi 177
5.1.3.4. Sastav masnih kiselina 178
5.1.3.5. Sastav lipida po lipidnim klasama izoliranih morskih mikroalgi 182
5.1.3.6. Sastav pigmenata izoliranih morskih mikroalgi 184
5.1.3.7. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te antioksidativno djelovanje ekstrakata izoliranih morskih mikroalgi 186
5.1.3.8. Antimikrobno djelovanje ekstrakata izoliranih morskih mikroalgi 189

5.2. Optimizacija uzgoja odabranih sojeva morskih mikroalgi 191
5.2.1. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 191
5.2.1.1. Istraživanje utjecaja koncentracije f/2 podloge na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i sastav biomase 191
5.2.1.2. Utjecaj koncentracije dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i sastav biomase 195
5.2.1.3. Efekt koncentracije dušika, fofora i silicija na sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 199
5.2.1.4. Utjecaj omjera koncentracija dušik, fosfora i silicija na rast i biokemijski sastav dijateomeje *Nitzschia* sp. S5 204
5.2.1.5. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 206
5.3. Optimizacija uvjeta uzgoja zelene morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3 209
5.3.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu 209
5.3.2. Učinak omjera C:N [mol mol^{-1}] na rast i biokemijski sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 213
5.3.3. Šaržni uzgoj uz sukcesivno povećanje volumena mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dvije faze u barbotirajućoj koloni 216
5.3.4. Optimizacija flokulacije 219
5.3.5. Učinak pH na flokulaciju *Picochlorum* sp. D3 220
5.3.6. Optimizacija flokulacije *Picochlorum* sp. D3 pomoću hitozana 221
5.3.7. Optimizacija flokulacije *Picochlorum* sp. D3 pomoću željezovog klorida 223
5.1.1. Bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* 224
5.2. Karakterizacija i optimizacija uzgoja izoliranih slatkovodnih mikroalgi 227
5.2.1. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima i koncentracijama ugljika ... 228
5.2.2. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim koncentracijama izvora dušika 231
5.2.3. Šaržni heterotrofni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u fotobioreaktoru 234
5.2.4. Uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni 238
6. ZAKLJUČCI 241
7. LITERATURA 245
8. PRILOZI 269
8.1. Identifikacija izoliranih mikroalgi 269
8.1.1. Rezultati identifikacije izolata B1 269
8.1.2. Rezultati identifikacije izolata A12 271

8.1.3. Rezultati identifikacije izolata E7 274
8.1.4. Rezultati identifikacije izolata D1 277
8.1.5. Rezultati identifikacije izolata B2 279
8.1.6. Rezultati identifikacije izolata D5 282
8.1.7. Rezultati identifikacije izolata Z3 284
8.1.8. Rezultati identifikacije izolata D3 286
8.1.9. Rezultati identifikacije izolata C6 288
8.1.10. Rezultati identifikacije izolata S5 290
8.1.11. Rezultati identifikacije izolata C1 292
8.1.12. Rezultati identifikacije izolata S1 293
8.1.13. Rezultati identifikacije izolata S2 294
8.1.14. Rezultati identifikacije izolata S3 295
8.1.15. Rezultati identifikacije izolata S4 296
8.2. Baždarni dijagrami 297
5. ŽIVOTOPIS 304

1. UVOD

Mikroalge su jednostanični mikroorganizmi koji za rast i razmnožavanje koriste Sunčevu energiju u procesu fotosinteze. Prisutne su u gotovo svim ekosustavima na Zemlji uključujući slatkovodna i morska staništa, te u staništima u kojima su izrazito nepovoljni uvjeti rasta (Falaise i sur., 2016; Mata i sur., 2010). Procjenjuje se da postoji od 70 000 do milijun vrsta mikroalgi, od kojih je 44 000 do sada detaljno istraženo i opisano. Široka lepeza različitih i nedovoljno istraženih proizvoda metabolizma mikroalgi rezultat je prilagodbe stanica na različite, i u nekim slučajevima, ekstremne okolišne uvjete, te natjecanja mikroalgi za hranu i prostor u staništima u kojima su okružene bakterijama, virusima i plijesnima te drugim višim organizmima (M. A. Borowitzka, 2013; Falaise i sur., 2016). Proizvodi primarnog i sekundarnog metabolizma mikroalgi kao što su tvari male molekulske mase, pigmenti, vitamini, lipidi, proteini i polisaharidi našli su primjenu u proizvodnji finih kemikalija, farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, akvakulturi, u prehrani stoke, te proizvodnji bioenergije i biogoriva (de Jesus Raposo i sur., 2013; Koller i sur., 2014). Među proizvodima metabolizma s bioaktivnim djelovanjem posebno se ističu pigmenti koji se primjenjuju u prehrambenoj i kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, ali i u kliničkim i znanstvenim istraživanjima kao markeri za protutijela i receptore (Begum i sur., 2016). Primjerice, klorofil-a pokazuje protuupalno djelovanje i smanjuje rizik raka debelog crijeva, ß-karoten se u ljudskom organizmu prevodi u provitamin A koji ima povoljno djelovanje na imunosni sustav, zdravlje očiju i kože te antikancerogeno djelovanje, dok astaksantin ima snažno antioksidativno djelovanje i pozitivan učinak u liječenju Alzheimera i Parkinsonove bolesti (Balder i sur., 2006; Dufossé i sur., 2005; Ferruzzi i Blakeslee, 2007). Lipidi mikroalgi bogati su omega-3 i omega-6 masnim kiselinama i mogu se koristiti kao zamjena za riblje ulje (Handayani i sur., 2011; Milledge, 2011). U određenim uvjetima uzgoja neke vrste mikroalgi mogu nakupljati značajne količine višestruko nezasićenih masnih kiselina među kojima se ističu eikosapentaenoična (EPA) i dokosaheksaenoična (DHA), gama-linolenska (GLA) i arahidonska kiselina (ARA) (Borowitzka, 2013; Koller i sur., 2014). Istraživanja su pokazala kako EPA prevenira kardiovaskularne bolesti i utječe na sniženje krvnog kolesterola, dok DHA ima važnu ulogu u razvoju središnjeg živčanog sustava dojenčadi (Handayani i sur., 2011). Među mikroalgama posebno se ističu dijatomeje ili alge kremenjašice (razred Bacilariophyceae) koje mogu nakupiti od 15 do 30% EPA-e u ukupnim masnim kiselinama (G. Mishra, 2015). Biomasa mikroalgi može se koristiti i kao sirovina za proizvodnju obnovljivih biogoriva, metana, biodizela, biovodika i bioetanola (Chisti, 2007; Sharmin i sur.,

2016). Prednost primjene biomase mikroalgi kao sirovine za proizvodnju biodizela u odnosu na uljarice, koje se danas pretežito koriste u proizvodnji biodizela su: proizvodnja biogoriva ne konkurira prehrambenoj industriji za sirovinu, za uzgoj se ne koristi obradiva zemlja, značajno veći prinos biomase mikroalgi po jedinici površine zemlje u odnosu na uljarice (2-10 puta), manji utrošak vode u odnosu na uzgoj uljarica i mogućnost primjene nepitke, bočate, slane i otpadne vode (M. Borowitzka, 2005; Parmar i sur., 2011). S obzirom na izniman potencijal primjene mikroalgi u biotehnološkoj proizvodnji, posljednjih desetak godina intenzivno se radi na izolaciji i karakterizaciji novih vrsta (Neofotis i sur., 2016). Postupak izolacije mikroalgi provodi se u uvjetima koji pogoduju bržem rastu poželjnih vrsta što uključuje odgovarajući režim osvjetljenja sa svjetlošću određene valne duljine i odgovarajuću temperaturu, pH, salinitet i sastav nutrijenata u hranjivoj podlozi (Andersen i Kawachi, 2005). Neke od najčešće korištenih metoda izolacije čiste kulture mikroorganizama su metoda serijskog razrjeđivanja, izolacija stanica pomoću mikropipete ili mikromanipulatora, te metoda iscrpljivanja nacjepljivanjem na hranjivi agar (Andersen i Kawachi, 2005). Dodatne metode pročišćavanja kao što su filtracija, diferencijalno centrifugiranje, tretman ultrazvukom te tretman antibioticima i mikoticima omogućavaju izolaciju aksenične kulture, odnosno monoalgalne kulture koja isključuje prisustvo drugih eukariotskih, prokariotskih i virusnih kontaminanata (Guillard, 2005). Kako bi se povećala ekonomska isplativost procesa proizvodnje biomase mikroalgi i njihovih metabolita potrebno je provesti optimizaciju uvjeta uzgoja što uključuje sastav hranjive podloge, intenzitet svijetla, temperaturu, te način vođenja uzgoja i vrstu bioreaktorskog sustava (Koller i sur., 2012; Suparmaniam i sur., 2019). Četiri su načina vođenja procesa s obzirom na metabolizam mikroalge: fototrofni (asimilacija anorganskog izvora ugljika uz prisustvo svjetlosti), heterotrofni (asimilacija organskog izvor ugljika bez prisustva svjetlosti), miksotrofni (asimilacija anorganskog i organskog izvor ugljika uz prisustvo svjetlosti) i fotohetrotrofni (asimilacija organskog izvora ugljika uz prisustvo svjetlosti) (Mata i sur., 2010). Heterotrofni i miksotrofni način uzgoja omogućava veće brzine rasta mikroalgi, koncentraciju biomase i posljedično tome veću produktivnost procesa (Mata i sur.., 2010). U uzgoju mikroalgi koje isključivo rastu fototrofno, veće koncentracije biomase postižu se dodatkom anorganskog izvora ugljika tako da se hranjiva podloga propuhuje sa zrakom obogaćenim s CO_2 ili dodatkom bikarbonata u hranjivi medij (White i sur., 2013). U komercijalom uzgoju mikroalgi koriste se dvije vrste bioreaktorskih sustava, otvoreni sustavi u koje se ubrajaju različite izvedbe otvorenih bazena (eng. open

pond), te zatvoreni sustavi u koje se ubrajaju fotobioreaktori. Uzgoj u fotobioreaktorima ima brojne prednosti pred otvorenim sustavima: bolja kontrola procesa, smanjena mogućnosti kontaminacije, veće koncentracije biomase, manji troškovi izdvajanja, zanemariv gubitak vode isparavanjem, smanjen gubitak CO_2 , veća fotosintetska učinkovitost te mogućnost uzgoja različitih vrsta mikroalgi (Huang i sur., 2017; Pulz, 2001). Za laboratorijski uzgoj mikroalgi najčešće se primjenjuju panel fotobioreaktori (eng. flat panel) i cijevni bioreaktori, bioreaktor s miješalom i barbotirajuća kolona (Gupta i sur., 2015). Uzgoj mikroalgi najčešće se provodi šaržnim, šaržnim s pritokom i polukontinuirani načinom uzgoja (Tan i sur., 2018). Kod fototrofnog uzgoja, veće produktivnosti procesa postižu se šaržnim uzgojem uz pritok supstrata ili polukontinuiranim uzgojem uz prethodno utvrđen režim prihrane nutrijenatima da bi se izbjegao inhibicijski učinak nutrijenata na rast mikroorganizma i eventualno taloženje anorganskih soli, što je čest problem kod uzgoja morskih mikroalgi. Promjenom sastava hranjive podloge može se utjecati na sastav biomase ili usmjeriti metabolizam mikroalge u nakupljanje željenog proizvoda. Tako se limitacijom rasta izvorom duška i silicija (dijatomeje) pogoduje nakupljanju lipida u biomasi mikroalge (Jeffryes i sur., 2013).

U sklopu ovoga doktorskog rada postavljena su tri glavna cilja. Prvi je izolacija, pročišćavanje i identifikacija morskih i slatkovodnih mikroalgi. U potrebe ispunjavanja ovoga cilja mikroalge će biti izolirane iz uzoraka vode uzorkovanih na nekoliko mjesta u Jadranskom moru i rijeci Gackoj. Kulture će potom biti obogaćene, pročišćene i identificirane upotrebnom molekularnih biljega. Drugi cilj je napraviti karakterizaciju izoliranih mikroalgi s obzirom na brzinu rasta, način rasta i sastav biomase (makromolekule, pigmenti, masne kiseline, tvari s antimikrobnim djelovanjem). Ovaj cilj proizlazi iz hipoteze kako biomasa mikroalgi sadrži makromolekule i biološki aktivne tvari koje imaju primjenu u proizvodnji biogoriva, lijekova, kozmetike, nutraceutika i prehrambenih proizvoda. Potom slijedi optimizacija uzgoja odabranih sojeva mikroalgi s ciljem postizanja visoke produktivnosti i prinosa proizvoda (lipidi, proteini, ugljikohidrati, pigmenti) kao treći cilj ovoga istraživanja. Optimizacija uzgoja odabranih sojeva mikroalgi provesti će se s obzirom na sastav hranjive podloge (ugljik, dušik, fosfor, silicij), način rasta (fototrofni, heterotrofni, miksotrofni) i način vođenja procesa (šaržni, šaržni s pritokom).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Mikroalge

Alge su fotosintetski organizmi, a sve alge mikroskopske veličine nazivaju se mikroalgama . Smatraju se vrlo jednostavnim mikroorganizmima budući da u svojoj strukturi ne sadrže kompleksne stanične strukture i organe koji se mogu pronaći u viših biljaka . Mikroalge su najčešće jednostanične, ali mogu rasti u filamentoznom obliku, a veličine su od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara. Obuhvaćaju i eukariotske, ali i prokariotske fotosintetičke mikrorganizme, što znači da u njih spadaju i cijanobakterije koje se još često nazivaju i modrozelene alge. One su predstavnice prokariotskih organizama dok zelene miroalge (Chlorphyta) ili pak dijatomeje (Bacillariophyta) predstavljaju eukariotske mikroalge. Ovu šaroliku polifiletsku skupinu mikroorganizama povezuje njihova sposobnost fiksacije ugljikovog dioksida koji se potom koristi za sintezu različitih algalnih staničnih komponenata, energije i molekularnog kisika. Osim toga mogu rasti relativno brzo i preživljavati u poprilično nepovoljnom okolišu upravo zbog toga što su uglavnom jednostanični ili pak tvore vrlo jednostavne višestanične tvorbe. Mikroalge nastanju ne samo vodena staništa što uključuje i slatkovodne i morske vodene sustave, nego su prisutne i u kopnenim staništima i ekosustavima, čineći tako ogromnu skupinu mikroorganizama čija različitost i potencijal su i dalje nedovoljno i nepotpuno istraženi. Procijenjeno je kako skupinu mikroalgi sačinjava od 70 000 do milion vrsta od kojih je samo oko 44 000 tek opisano. Alge su tradicionalno klasificirane ovisno o njihovoj boji (cijanobakterije, rodofiti, klorofiti, kromofiti), a osim toga današnji klasifikacijski sustav bazira se i na tipu pigmenata koji je prisutan u biomasi mikroalge, kemijskoj strukturi rezervnog materijala unutar stanica i sastavu stanične stijenke. Osim toga u dodatne kriterije za klasifikaciju upadaju prisutnost flagela za pokretanje i struktura flagela, prisutnosti ovojnice endoplazmatskog reticuluma oko kloroplasta i način dijeljenja stanica, odnosno razmnožavanja. Velika raznolikost mikroalgi proizlazi iz njihove evolucije tijekom bezbrojnih prilagodbi na različite nepovoljne životne uvjete i u borbi s raznolikim predatorima i drugim organizmima prisutnim u njihovim staništima. Upravo zahvaljujući toj evolucijskoj i filogenetičkoj raznolikosti, kemijski sastav mikroalgi također značajno varira između različitih vrsta čineći ih tako vrlo interesantnim mikroorgnizmima za biorudarenje (eng. bioprospecting) i eksploataciju širokog raspona različitih bio-proizvoda i bio-aktivnim molekula. Predstavljaju vrlo obećavajući izvor novih

proizvoda i primjena, a čija potencijalna primjena se proteže kroz prehrambenu, kemijsku, farmaceutsku industriju te industriju biogoriva. Budući da su dobar izvor vitamina, proteina, pigmenata (npr. β-karoten, astaksantin), lipida, polisaharida i drugih biološki aktivnih molekula koriste se u prehrani ljudi, ali i kao dodatak stočnoj hrani i hrani za životinje. Osim toga zbog svoje sposobnosti vezanja atmosferskog CO_2, mikroalge su od velike važnosti za održivost cjelokupnog Zemljinog ekosustava. Smatra se kako su mikroalge globalno najveći proizvođači kisika na Zemlji. Globalno vezanje CO_2 putem mikroalgi jednako je po kvantiteti fotosintetskoj aktivnosti kopnenih zelenih biljaka. Osim što ublažavaju emisiju CO_2, mogu doprinijeti i smanjenju kontaminacije u različitim okolišima, pa se tako primjenjuju u bioremedijaciji i to najčešće kod tercijarne obrade otpadnih voda. Konačno, mikroalgalna biomase može se primijeniti i kao sirovina za proizvodnju bioplina ili koristiti kao biognojivo čime se unosi ravnoteža u materijalnu i energetsku bilancu cjelokupnog bioprocesa.

2.2. Klasifikcija algi

Razvoj snažnijih svjetlosnih mikroskopa i ideja evolucije (Darwin i Wallace) kao i opažanje kako neki oblici života ne spadaju niti u životinjsko niti u biljno carstvo dovela je taksonome do potrebe za osnivanjem trećega carstva, carstva Protozoa. Ono je u svom prvotnom obliku objedinjavalo amebe, bakterije (dok ih iz ovoga carstva nije izdvojio Copeland 1938.), miksomicete, euglenoide, dijatomeje i neke zelene mikroalge (npr. volvox), radiolarije, foraminifere, rizopode, spužve i neke dinoflagelate, dok su morske makroalge (crvene, smeđe i makroskopske zelene alge), filamentozne cijanobakterije, desimidi, plijesni, lišaji i karofiti bili svrstani u carstvo Biljaka (Plantae), a cilijate su pridružene carstvu životinja (Animalia). Kasnije je Copeland preimenovao carstvo Protista i Protocista kako bi u njega uvrstio i smeđe i crvene alge, pirofite (uključujući kriptomonade, dinoflagelate i euglenoide), plijesni, mikomicete, rizopode, cilijate itd., dok su zelene alge ostale pripojene carstvu Biljaka. Na taj način je carstvo Protista uključivalo sve one organizme koji međusobno nisu bili povezani, ali koji ujedno nisu pripadali niti u jednu drugu skupinu te se nisu mogli klasificirati (Maneveldt i Keats, 2003). Kasnije je ova klasifikacija u tri carstva proširena na njih osam: Carstvo Eubakterija (tu su pribrojene cijanobakterije), Arheja (prijašnje carstvo Monera), Životinjsko carstvo, Biljno carstvo, Carstvo plijesni, Arhezoa,

Protozoa i novo carstvo Kromista koje će kasnije sadržavati smeđe alge, dijatomeje, oomicete i silicoflagelate (Cavalier-Smith, 1993). Potom je uslijedila redukcija na 6 carstava: Carstvo Bakterija, Životinja, Biljaka, Kromista i Protozoa (Cavalier-Smith, 1998). A potom je s razvojem molekularnih analiza i s više genetičkih informacija iz različitih genetičkih stabala dovela do ponovne reklasifikacije carstva Kromista i Protozoa (Cavalier-Smith, 2010). Genetska analiza dodatno je zakomplicirala klasifikaciju algi, koja se temeljila na ultra-strukturalnoj karakterizaciji plastida, budući da su plastidi edosimbiotskog podrijetla. To znači da biljke i alge dijele jedan plastidni genom uz dodatak dva slična eukariotska (mitohondrijski, a mitohondriji su također proizašli iz endosimbioze aerobnih bakterija i nuklearnog genoma). To dodatno otežava otkrivanje podrijetla gena koji su dobiveni endosimbiotskim putem- vertikalno (u odnosu na lateralne i horizontalne prijenose gena). Komplicirana klasifikacija mikroalgi kao i samo otkrivanje njihovoga podrijetla dovela je do toga da je trenutno u primjeni nekoliko načina klasifikacije mikroalgi. Naime, brojni su znanstvenici i taksonomi pokušali napraviti reklasifikaciju algi i protista, ali niti jedan pokušaj do sada nije bio zadovoljavajući dovoljno da bi bilo uzet kao standard. Za klasifikaciju mikroalgi koristi se nekoliko glavnih obilježja: a) kemijski sastav i relativna količina pigmenata; b) kemijski sastav rezervnih tvari; c) kemijska i fizička svojstva stanične stijenke; d) broj, oblik i orijentacija bičeva kod vegetativnih stanica, zoospora i gameta; e) građa kromatofora i pirenoida; f) prisutnost i odsutnost očne pjege; g) oblik spora i niz drugih citoloških i fizioloških svojstava. Oblik stanica također je važno svojstvo za taksonomsku klasifikaciju, ali mnoge jednostanične alge s naizgled jednakim stanicama pripadaju različitim taksonima, jer se fiziološki razlikuju. Fitoplankton ima predstavnike u deset osnovnih viših taksonomskih odjela. Od prokariota u alge se uključuju cijanobakterije (modrozelene alge) i proklorofita, a eukarioti obuhvaćaju: glaukofite, euglenofite, dinofite, kriptofite, rafidofite, krizofite, klorofite i rodofite. U svjetskim morima poznato je do danas oko 500 rodova i oko 4000 vrsta fitoplanktona (Sournia i sur., 1991). Krupnija veličinska frakcija (mikrofitoplankton) sadrži najviše kremenjašica i dinoflagelata (svaka skupina s po 1600 vrsta), te kokolitoforida (oko 300 vrsta), a ostalo su nanoplanktonske vrste, koje nisu dovoljno istražene. Slatkovodni i morski taksoni s najpoznatijim rodovima nabrojani su u tablici 1 (Viličić, 2002).

Tablica 1. Taksonomska raspodjela fitoplanktona (Viličić, 2002)

Latinski naziv	Hrvatski naziv
Nadcarstvo *Procaryota*	
Carstvo *Monera* Odjeljak *Cyanobacteria* Odjeljak *Prochlorophyta*	Cijanobakterija (modrozelene alge) Prazelene alge
Nadcarstvo *Eucaryota*	
Carstvo *Protoctista* Odjeljak *Glaucophyta* Odjeljak *Euglenophyta* Odjeljak *Dinophyta* Odjeljak *Cryptophyta* Odjeljak *Raphidophyt*a Odjeljak *Chrysophyta* Odjeljak *Chlorophyta* Odjeljak *Rhodophyta*	Glaukofita Zeleni bičaši Svjetleći bičaši Kriptofita Rafidofita Zlatno-smeđe alge Zelene alge Crvene alge

2.3. Dijatomeje

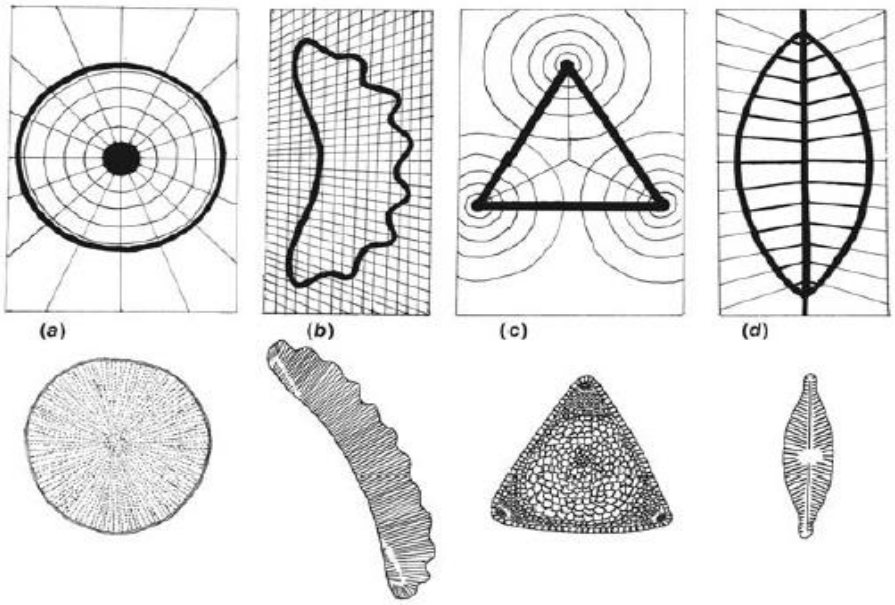
Bacillariophyceae, obično poznate kao dijatomeje, skupina je diploidnih, zlatno ili smeđe pigmentiranih algi. Uglavnom su slobodno plutajući mikroorganizmi morskog ili slatkovodnog okoliša. Neke vrste su nepokretne pa su to epifitske dijatomeje kojima različite vrste vodene vegetacije (alge ili više biljke, pričvršćene ili slobodno plutajuće) mogu osigurati stanište (Kumar i sur., 2016). Neke vrste žive kao endosimbionti s drugim protistima, a mali je broj dijatomeja izgubio sposobnost fotosinteze te su postali obligatni heterotrofi i sur., 2017a). Trenutno postoji preko 500 rodova dijatomeja (350 živih i 150 izumrlih) s oko 17000 vrsta (12000 živih i 5000 izumrlih). Nakon smrti stanica dijatomeja frustula se obično otapa nakon što bakterije razgrade organski omotač oko nje (Lee, 2008). Međutim, pod određenim okolnostima, frustule ostaju netaknute i akumuliraju se na dnu mora ili jezera. Nakupljanjem

kroz dugi period rasta nastaju nakupine biomase čineći dijatomejsku zemlju ili kieselguhr (Lee, 2008). *Bacillariophyceae* se može podijeliti u dvije veće skupine s obzirom na strukturu ljušturice (slika 1): *Biddulphiales* ili *Centrales* u koju se ubrajaju centrice i gonoidni oblici. Sadrže mnogo kloroplasta, nemaju rafe, ali imaju pokretljive spermatozoide (Lee, 2008). Imaju radijalnu strukturu u odnosu na centralnu točku i pretežno su planktonski oblici (Kumar i sur., 2016). Drugu, brojniju skupinu čine *Bacillariales* ili *Pennales* u koju ubrajamo penate ili trelisoidne oblike. Sadrže jedan ili dva kloroplasta, posjeduju rafe, nemaju spermatozoide s bičevima i spolno se razmnožavaju konjugacijom (Lee, 2008). *Pennales* su izdužene i prevladavaju u bentosu (Kumar i sur., 2016).

2.3.1. Građa dijatomeja

Većina vrsta dijatomeja (osim *Phadactylurm tricornutum* i endosimbiotskih vrsta) sadrži prepoznatljive silicijeve ljušturice koje okružuju protoplast. Glavna uloga ljušturice ili frustule je zaštita protoplasta, izmjena plinova, unos hranjivih tvari i izlučivanje staničnih produkata. Ljušturica je izgrađena od kvarcita (95 %) ili hidratiziranog amorfnog silicija (Kumar i sur., 2016). Dijatomeje nemaju staničnu stijenku već se nakon diobe ili spolnog razmnožavanja mlada stanica s vanjske strane obavija periplastom. Ispod plazmaleme periplasta nalaze se vezikule u kojima se sintetizira amorfni netopljivi silicijev oksid (SiO_2 x H_2O) iz topljivog silicija koji se u moru nalazi u obliku orto-silicijeve kiseline. Naslage kremena u vezikulama se povećavaju i izbijaju na vanjsku stranu stanice (Viličić, 2002). Nakon nestajanja plazmaleme i vanjske membrane, kremen obavija čitavu stanicu u obliku kremene kućice s dvije ljušturice (lat. *theaecae*). Gornja se ljušturica naziva epiteka (lat. *epithaeca*), dok se donja naziva hipoteka (lat. *hypothaeca*) (Lee, 2008). Svaka se polovica sastoji od niza obruča pričvršćenih za rub velikog završetka (valve). Hipoteka je općenito nešto manja od epiteke jer je formirana nakon posljednje mitoze (Mann i sur., 2017a). Hipoteka i epiteka su međusobno povezane pojasom, a pojas čine kopule (lat. *copulae*) i pleure (lat. *pleurae*) koje se tijekom rasta mogu umnožavati. Kopule prema unutrašnjosti stanice mogu pružati nastavke (lat. *septa*). Dodatne naslage silicija u unutrašnjosti ljušturice stvaraju zadebljanja koja se nazivaju rebra (lat. *costae*). Ona se mogu pružati radijalno od

kružne formacije (lat. *anulus*) ili od jednog središnjeg zadebljalog rebra (lat. *sternum*) koje prati apikalnu os (Viličić, 2002).



Slika 1. Osnovna podjela *Bacillariophyta* prema obliku i primjeri: (a) centrice (npr. *Coscinodiscus*), (b) trelisoid (npr. *Eunotia*), (c) gonoid (npr. *Triceratium*), (d) penate (npr. *Navicula*) (preuzeto od Lee, 2008)

Većina penata ima dva složena proreza duž ili blizu valve. Ti prorezi su poznati kao rafa prorezi, koji mogu biti dvostruki ili jednostruki. Unutar stijenke valve nalaze se izdužene komore alveole (lat. *alveolae*) koje su s gornje i donje strane perforirane. Te šupljine čine saćastu strukturu valve i nazivaju se areole (lat. *areolae*), a nizovi areola između rebara čine strije (lat. *striae*) (Viličić, 2002). Areole omogućuju izmjenu vode, hranjivih tvari, plinova i staničnih proizvoda između okoliša i stanice (Mann i sur., 2017a). Unutrašnja struktura dijatomeja vrlo je tipična. Protoplast u fotosintetskim dijatomejama sadrži jezgru, mitohondrije, endoplazmatski retikulum, Golgijevo tijelo i kloroplaste sa ili bez pirenoida. Često su prisutne jedna ili dvije velike središnje vakuole. Položaj jezgre varira u centralnim i penalnim dijatomejama. U nekim centralnim dijatomejama Golgijeva su tijela usko povezana s endoplazmatskim retikulumom i mitohondrijem te zajednički tvore Golgi-endoplazmatski retikulum-mitohondrij kompleks (Kumar i sur., 2016). Mitohondriji su raspoređeni u

protoplastu. Prisutni su žućkasti, zeleni ili smeđi plastidi. Mogu biti u obliku malog diska ili u obliku luka. Pigmenti karakteristični za dijatomeje su klorofili a, c_1 i c_2 te karotenoidi. Klorofil b se nikada ne nalazi u dijatomejama. Prisutni karotenoidi su fukoksantin (koji dijatomejama daje zlatno-smeđu boju), diadinoksantin, diatoksantin i β-karoten, dok se u manjim količinama javljaju violaksantin, anteraksantin i zeaksantin (javljaju se u nekim dijatomejama u uvjetima jakog svjetla) (Jeffrey i sur., 2012). Jedan ili više pirenoida su obično prisutni u svakom kloroplastu. Broj pirenoida po kloroplastu i njihova struktura i pozicija te morfologija i položaj vrlo su specifični za pojedine rodove, pa se također primjenjuje u identifikaciji ovih mikroorganizama. Neke dijatomeje koje nemaju pigmente (engl. *Apochlorotic diatoms*) žive od propadanja morske vegetacije i sluzi morskih algi. One nemaju vizualne plastide pa su oni fakultativni heterotrofi (Kumar i sur., 2016). Glavna je rezervna tvar u dijatomejama krizolaminarin (β-1,3 glukan) koji se nalazi u vezikulama. Dijatomeje također sadrže metil sterole, kao što je 4-desmetilsterol i kolesterol (Lee, 2008) te uljne vakuole i granule volutina (Mann i sur., 2017a).

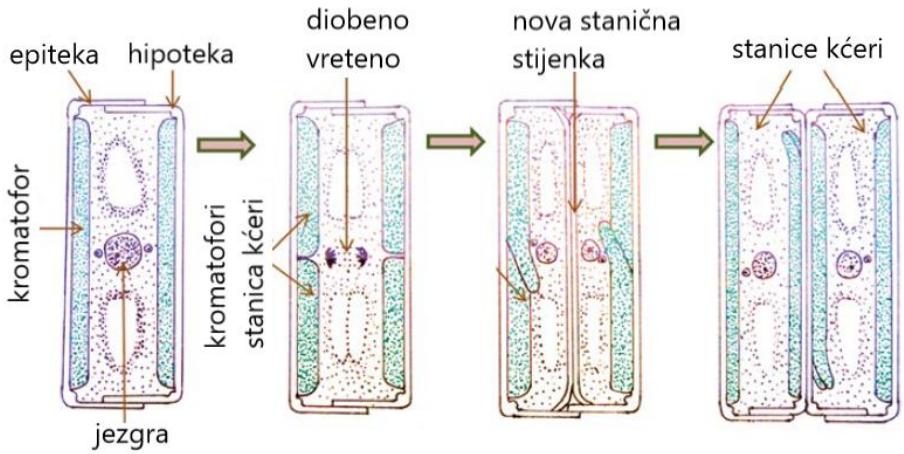
2.3.2. Kretanje dijatomeja

Rafe u dijatomejama određuju put klizanja koji može biti ravan (npr. *Navicula*), zakrivljen (npr. *Amfora*) ili zakrivljena s dvama različitim radijusima (npr. *Nitzschia*) (Kumar i sur., 2016). Postoji nekoliko predloženih mehanizama koji objašnjavaju pokretljivost dijatomeja. Glavni mehanizam koji su predložili Edgar i Pickett-Heaps (1983) analogan je vozilu koje se kreće po gusjenicama. Vezikule oslobađaju svoj fibrilarni sadržaj u invaginaciju plazmaleme uz rafe. Nakon otpuštanja fibrili su hidrirani i nabubre te se pojavljuje vanjska napuklina (Edgar i Pickett-Heaps, 1983). Sluz ostaje vezana za protoplast preko transmembranskih komponenti. Postoji pet ekstracelularnih agregata sluzi, a to su: cijevi, jastučići, stabljike, vlakna i prianjajuće folije. Ovi sluzavi sekreti pomažu u kretanju i vezivanju dijatomeja (Kumar i sur., 2016). Dijatomeje se mogu gibati klizanjem samo onda kada je rafa u dodiru s površinom. Ukoliko je prilikom klizanja stanica dijatomeje vezana za supstrat, dolazi do izlučivanja sluzi iz rafe. *Pennales* koje imaju sposobnost ovakvog načina kretanja sadrže snopove aktinskih mikrofilamenata koji su paralelni s rafom. Na odgovarajući podražaj sluz biva izbačena u rafu iz područja središnje pore. Sluzavi materijal putuje u rafi u

jednom smjeru dok ne naiđe na materijal na koji se veže. Ako je objekt na koji se veže stanica fiksiran, u stanici se događaju procesi koji ju potiskuju na gibanje u suprotnom smjeru (Lee, 2008). Tada se stanica pokreće pri brzinama do 20 μm ili više po sekundi (Mann i sur., 2017a).

2.3.3. Životni ciklus

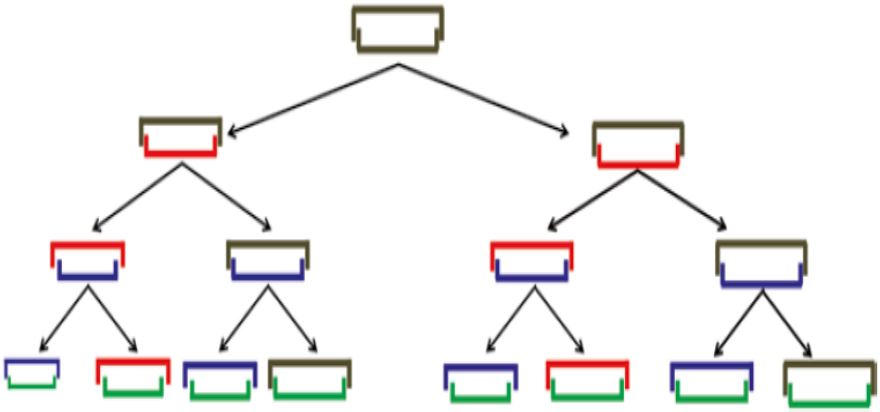
Dijatomeje imaju složen životni ciklus. Kao i druge jednostanične mikroalge, dijatomeje također imaju dva načina razmnožavanja: spolno i nespolno. Nespolno uključuje mitozu i povećanje broja stanica, dok spolni način podrazumijeva mejozu i genetsku rekombinaciju. Najčešće se nespolno (vegetativno) razmnožavanje, kada od jedne stanice nastaju dvije, zbiva noću (Kumar i sur., 2016). Svaka valva roditeljske stanice sebi izgradi novu hipoteku. Kada se stanica mora podijeliti, protoplast se širi i gube se veze između teka. Prije podjele dolazi do udvostručenja staničnih organela. Nakon podjele, svaka polovica sadrži hipoteku ili epiteku s "golim" suprotnim stranama. U svakoj se podijeljenoj polovici stanice formira nova hipoteka (slika 2) dok se u jednoj od polovica ona smanjuje (slika 3). Rezultat je ovakve diobe smanjenje veličine stanica nakon čega stanice, u pravilu, ugibaju. Ako ipak dođe do spolnog načina razmnožavanja, veličina stanica vraća se na prvobitnu te one preživljavaju (Mann i sur., 2017a).



Slika 2. Dioba stanica kod dijatomeja *Pennales* (preuzeto i prilagođeno od Kumar i sur., 2016)

Prema Edlundu i Stoermeru (1997) spolno se razmnožavanje ili formiranje auksospora javlja samo u dva slučaja: (1) ako se veličina stanice smanji na jednu trećinu najveće moguće veličine i (2) tijekom odgovarajućih uvjeta u okolišu kao što je npr. odgovarajuća temperatura, svjetlo, hranjive tvari, tragovi metala, organski faktori rasta i osmotski tlak (Lee, 2008). Za razliku od ostalih algi, dijatomeje se spolno razmnožavaju kako bi povećale veličinu stanice. U centričnim i gonoidnim dijatomejama samo muške gamete imaju flagelu, dok su ženske gamete (jajne stanice) nepokretne. S druge strane gamete penatnih i trelisoidnih dijatomeja nemaju flagele. Kod *Pennales* se auksospore formiraju spajanjem izo i anisogameta ili oogamijom, dok je proces autogamije ili partenogeneze rjeđi slučaj (Kumar i sur., 2016). Formiranje pojedinačnih spora fuzijom dviju stanica karakteristično je za *Surirella saxonica* i *Cocconeis* vrste. Nakon podjele, može doći do degradacije jedne jezgre (*Cocconeis pediculus*) ili tri haploidne jezgre. Zatim, haploidne gamete izlaze iz frustule, a oslobođene gamete su identične, i nazivaju se izogamete. Budući da su oslobođene gamete identične onim haploidnim gametama koje izlaze iz frustule, nazivaju se izogametama. Formiranje dviju auksospora fuzijom dviju stanica najčešća je metoda kod npr. *Cymbella lanceolata*. Diploidna se jezgra svake stanice dijeli mejozom i formira četiri haploidne jezgre, od kojih su dvije zakržljale (Kumar i sur., 2016). Oogamija se kod *Pennales* odvija uz pomoć rafa kako bi pronašli jedni druge i uparili se. Zatim se stanice često okružuju sa sluzavom kapsulom kako bi se omogućila gametogeneza i oplodnja (Kumar i sur., 2016).

Kod *Centrales*, auksospore nastaju oogamijom ili autogamijom. Kod oogamije, najprije dolazi do stvaranja spermija koji plivaju do jajne stanice, vjerojatno vođeni kemotaksijom. Nakon oplodnje, zigota se oslobađa iz roditeljske frustule i razvija se auksospora. Ona se povećava i diploidna jezgra se dijeli mitozom. Auksospora s preživjelom diploidnom jezgrom izlučuje frustulu unutar perizoniuma, a njezinim klijanjem nastaju diploidne stanice (Kumar i sur., 2016). Tijekom autogamije, protoplast diploidne stanice izlučuje sluz. Mejozom nastaju četiri haploidne jezgre. Od četiriju novih jezgara, samo dvije preživljavaju i međusobno se spajaju, što rezultira diploidnom jezgrom. Taj je proces nazvana autogamija. Nakon formiranja diploidne jezgre protoplast izlazi iz roditeljske frustule i razvija se u auksospore formirajući nove frustule u perizoniju (Kumar i sur., 2016).



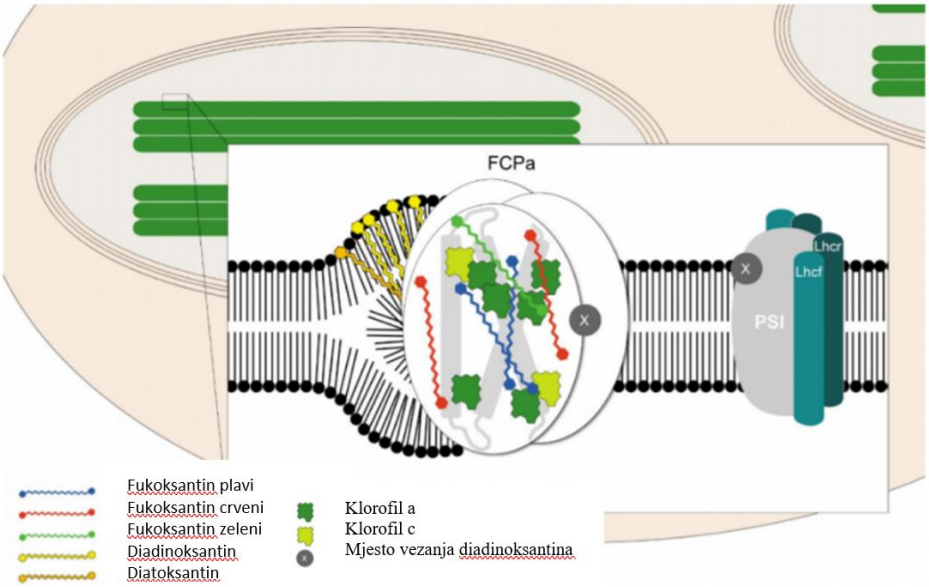
Slika 3. Proces podjele stanica kod dijatomeja i smanjenje veličine stanica (preuzeto od Kumar i sur., 2016)

2.3.4. Fotosinteza

Smatra se da su dijatomeje zaslužne za oko 25 % svjetske primarne proizvodnje kisika, fiksirajući ugljik i oslobađajući kisik, što je ekvivalentno proizvodnji dvaju najproduktivnijih kopnenih ekosustav, tropskih šuma i savana (Lavaud, 2007). Ekološki značaj dijatomeja, kao jedne od najvažnijih planktonskih mikroalgi, povezan je s prisutnim pigmentima. Dijatomejske su tilakoidne membrane raspoređene u tri skupine labavo složenih lamela koje se protežu cijelom duljinom kloroplasta i sadrže različite pigmente (slika 4). Ti pigmenti omogućuju dijatomejama učinkovitiju apsorpciju svjetlosti nego kod zelenih i crvenih algi (Kuczynska i sur., 2015).

U tilakoidama kloroplasta lokalizirani su fotosustavi, u kojima se nalaze molekule koje apsorbiraju svjetlosti (engl. *light harvesting complexes*, LHC) i reakcijski centri. Ti su fotosustavi međusobno povezani transportnim lancem elektrona. U dijatomejama LHC se nazivaju fukoksantin-klorofil-proteini (FCP) (Lavaud, 2007). Oni su vrlo slični centrima u zelenim algama, ali kao glavne pigmente sadrže fukoksantin i klorofil a i c. Svi pigmenti fotosustava mogu apsorbirati fotone svjetlosti, ali samo je klorofil a, koji se nalazi u reakcijskom centru, sposoban pretvarati svjetlosnu u kemijsku energiju. Ostale molekule pigmenata nazivaju se antenskim molekulama, a uloga im je primanje i prijenos energije do reakcijskog centra (Kuczynska i sur., 2015). Klorofil c učinkovito sudjeluje u fotosintezi kao

pomoćni pigment. Između različitih oblika klorofila c koji su prisutni u dijatomejama, najzastupljeniji su klorofil c_1 i c_2. Različita struktura klorofila c donosi promjene u apsorpcijskom spektru u usporedbi s drugim skupinama algi (Kuczynska i sur., 2015).



Slika 4. Pojednostavljeni model tilakoidne membrane dijatomeja pokazuje lokalizaciju fotosintetskih pigmenta unutar FCP, odnosno unutar fotosustava (preuzeto i prilagođeno od (Kuczynska i sur., 2015)

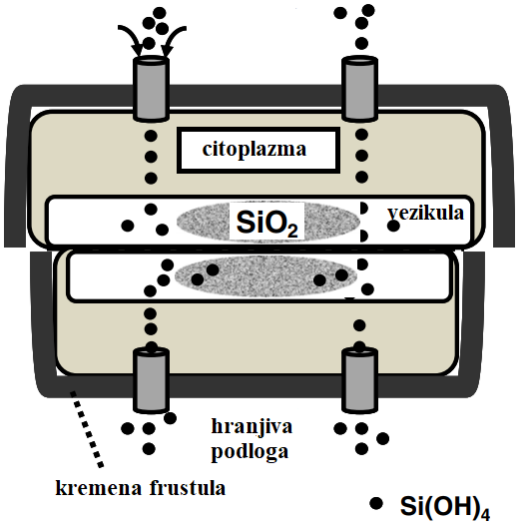
Ipak, u procesu apsorpcije svjetlosne energije glavnu ulogu imaju karotenoidi. Oni su podijeljeni u dvije glavne skupine: ksantofile i karotene. Oni ne mogu izravno prenijeti apsorbiranu energiju u transportni lanac elektrona, ali prenose energiju na klorofile, stoga ih se često naziva dodatnim pigmentima (engl. *accessory pigments*) (Kuczynska i sur., 2015). Glavni pigment za apsorpciju svjetla je fukoksantin. Ostali ksantofili koji su prisutni u značajnim količinama su diadinoksantin i diatoksantin. Oni su uglavnom uključeni u regulaciju apsorpcije svjetlosti, iako je diadinoksantin također sposoban apsorbirati i učinkovito prenositi energiju na klorofil (Lavaud, 2007). Pobuđeni elektroni zatim se prenose na reakcijski centar klorofila a. Elektroni se dalje prenose preko proteinskih kompleksa pri čemu nastaje NADPH. Suprotno tome, protoni se transportiraju suprotno koncentracijskom gradijentu pomoću ATP sintaze. Time je protonski gradijent smanjen uz istovremeno

nastajanje ATP (fotofosforilacija) (Kuczynska i sur., 2015). Koristeći energiju dobivenu reakcijama na svjetlu, ugljikov dioksid može biti fiksiran i reduciran za sintezu ugljikohidrata. Kao odgovor na prekomjerni intenzitet svjetlosti, višak energije oslobađa se kao toplina ili fluorescencija (non-photochemical quenching, NPQ) (Beckmann i sur., 2009). Tri karotenoida, β-karoten, diadinoksantin i diatoksantin, imaju važnu ulogu u fotozaštiti. Osim njih, smatra se da u ovaj proces mogu biti uključeni violaksantin, anteraksantin i zeaksantin. U prekomjernim uvjetima svjetla smanjuju se prinosi i brzina proizvodnje biomase. Pod visokim se intenzitetom svjetlosti aktivira ciklus ksantofila kako bi se zaštitile molekule pigmenta, pri čemu se sintetizira diatoksantin (Kuczynska i sur., 2015).

2.3.5. Transport i metabolizam silicija

Silicij je makroelement neophodan za formiranje stanične ljušturice, odnosno frustule (u obliku netopljivog SiO_2) u procesu diobe stanica (Jeffryes i sur., 2013). Dijatomeje su najveći svjetski doprinositelji biosilicifikaciji, procesu kojim se anorganski silicij ugrađuje u žive organizme u formi silicijevog dioksida (Martin-Jézéquel i sur., 2000). Biosilicifikacija podrazumijeva slijedeće korake: unos otopljenog silicija iz okoline u stanicu, taloženje istog u obliku amorfnog SiO_2 i konačno, formiranje frustule (Jeffryes i sur., 2013). Iako točan mehanizam nije razjašnjen, poznato je da su transport i metabolizam silicija usko povezani s staničnim ciklusom dijatomeja (Adams i Bugbee, 2014; Martin-Jézéquel i sur., 2000). Transport otopljenog silicija u formi ortosilicijeve kiseline, $Si(OH)_4$ iz okoline stanice u citoplazmu događa se u periodu između citokineze i odvajanja stanica kćeri (slika 5). Kada su stanice u fazi pripreme za diobu, $Si(OH)_4$ transportira se kroz staničnu stijenku u unutarstanični prostor. Pri vrlo visokim koncentracijama u okolini stanice, otopljeni silicij u stanicu se transportira difuzijom, a kod nižih koncentracija ($\leq$ 30 μM) pomoću transportnih proteina ovisnih o natriju (Adams i Bugbee, 2014). Zatim se $Si(OH)_4$ transportira u vezikulu gdje polimerizira u čvrsti amorfni silicijev dioksid koji izbija na površinu stanice tvoreći dvije nove teke stanica. Martin-Jezequel i sur. (2000) smatraju da je transport silicija uvjetovan kontroliranom ekspresijom i lokalizacijom transportnih proteina za silicij, kao i udjelom silicija inkorporiranog u frustulu (Martin-Jézéquel i sur., 2000). Neke studije pokazuju da na metabolizam silicija unutar stanice utječe salinitet, odnosno koncentracija otopljenog NaCl-a

u okolini stanice. U uvjetima niskog saliniteta, povećava se ukupna koncentracija silicija u dijatomejama, s većim udjelom otopljenog silicija u odnosu na mineralizirani. Drugim riječima, ispod kritične koncentracije NaCl-a u okolini stanice, inhibira se mineralizacija silicija, a posljedično i stvaranje frustule, odnosno dioba stanica. Premda točan mehanizam nije razjašnjen, Adams i Bugbee (2013) navode da salinitet hranjive podloge utječe ili na intracelularni transport silicija u vezikule ili na sam proces mineralizacije u vezikulama. S druge strane, niski salinitet pogoduje nakupljanju lipida u dijatomejama, npr. *Chaetoceros gracilus* (Adams i Bugbee, 2014).



Slika 5. Struktura frustule dijatomeja te unos i transport silicijeve kiseline (preuzeto i prilagođeno od Jeffryes i sur., 2013)

2.4. Taksonomija i morfologija mikroalgi iz odjeljka Chlorophta

Odjeljak Chlorophyta predstavlja jednu od najznačajnijih skupina eukariotskih mikroalgi s obzirom na brojnost vrsta, rasprostranjenost i morfološku raznolikost. Broji između 9000 i 12000 vrsta koje nastanjuju slatkovodna, morska i kopnena staništa, odnosno na gotovo svako mjesto na Zemlji do kojeg svijetlost i vlaga mogu doprijeti (Heimann i Huerlimann, 2015). Iako su rasprostranjene u moru, češće se pronalaze u slatkim vodama. Neke vrste dobro podnose onečišćenost pa su dobri indikatori stupnja boniteta vode. Svoje podrijetlo vuku od prabičaša. S taksonomskog gledišta, zelene alge parafiletska su skupina

budući da najvjerojatnije dijele zajedničkog pretka s biljkama na što ukazuju isti tip pigmenata koji sadrže te sinteza istih tipova ugljikohidrata u procesu fotosinteze kao i u viših biljaka (Naselli-Flores i Barone, n.d.). Za sistematiku je važna organizacija talusa, građa stanične stijenke ili periplasta, ultrastruktura stanice (građa kloroplasta i pirenoida), oblik bičeva- undulipodija, položaj stigme i biokemijske karakteristike (rezervna tvar, pigmenti). Planktonski predstavnici zelenih mikroalgi ubrajaju se u tri razreda: (1) Prasinophyceae, (2) Chlorophyceae i (3) Conjugatophyceae (Viličić, 2002). *Chlorella vulgaris, Dunaliella salina* i *Haematococcus pluvialis* su jednostanični predstavnici odjeljak Chlorophyta koji se danas primjenjuju u komercijalnoj proizvodnji, dok *Parietochloris incisa* i *Botryococcus braunii* pokazuju potencijal za primjenu u proizvodnji lipida i ugljikovodika. Pod svjetlosnim mikroskopom stanice *Chlorella vulgaris* su okrugle, nepokretne, veličine između 2 i 10 µm s jednim kloroplastom, granulama škroba (amiloza i amilopektin) i jednim pirenoidom koji sadrži visoke količine ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (RuBisCO) za fiksaciju CO_2. Razmnožava se vegetativno tako da se iz stanice majke oslobađaju četiri stanice kćeri i to uz puknuće staničnog zida. Razred Trebouxiophyceae sadrži najveći broj zelenih mikroalgi i najznačajnije biotehnološki primjenjive rodove, a jedan od njih je i *Picochlorum* sp. Rod *Picochlorum* sp. klasificiran je prvi puta 2004. godine te se od tada intenzivno istražuje zbog svojih karakteristika kao što je rast u širokom rasponu temperature (0 do 40 °C), brza prilagodba na promjene temperature, tolerancija na veliki salinitet i intenzitet svjetla i brži rast u odnosu na mikroalge koje se intenzivno koriste u biotehnologiji (*Dunaliella, Nannochloropsis*) (Dahlin i sur., 2019; Gonzalez-Esquer i sur., 2019). Mikroalge roda *Picochlorum* jednostanični su organizmi okruglog oblika stanica koji nastanjuju morska staništa, imaju visok sadržaj lipida (20-58 % suhe tvari biomase) i proteina i time su interesantni za primjenu u biotehnološke svrhe kao što je proizvodnja biogoriva (Gonzalez-Esquer i sur., 2019; Krasovec i sur., n.d.).

2.4.1. Građa stanica i razmnožavanje

Tipična stanica zelene mikroalge može biti pokretna ili nepokretna, sadržavati centralnu vakuolu i plastide različitih oblika u kojima su pigmenti. Stanica obavijena dvostrukom ovojnicom stanične stijenke građene od celuloze i pektina. Variraju u veličini i

obliku, pa tako mogu biti jednostanične (*Chlamydomonas*), kolonijalne (*Volvox, Hydrodictyon*), filamentozne (*Spirogyra, Cladophora*), te tubularne (*Actebularia, Caulerpa*). Sadrže talus s različitim stupnjem organizacije, a u planktonskih vrsta mogu se razlikovati: (a) pojedinačne pokretne stanice; (b) kolonijalni flagelati; (c) pojedinačne stanice povezane sluzavim omotačem (palmeloidni ili tetrasporalni talus); te (d) nepokretne, pojedinačne, okrugle ili ovalne stanice (kokoidni talus). Pokretne stanice uvijek nose po dva, četiri ili osam bičeva koji se nazivaju undulipodijima te su prekriveni ljuskama. Stanična stijenka stanica izgrađena je od celuloze, a vrste koje nemaju celulozne stijenke na površini imaju periplast koji stvara galertu, organske ljuske ili uklopine od kalcijevog karbonata ($CaCO_3$) (Viličić, 2002). Kloroplasti su većinom zelene boje koja proizlazi iz pigmenata klorofila a i klorofila b. Kloroplasti mogu biti pojedinačni ili mnogobrojni i različitih oblika: pharasti, pločasti, mrežasti, okrugli, kolutasti. Kloroplasti sadrže od 2 do 6 pa i više tilakoida koje u nakupinama tvore lamele. Nakupine tilakoida mogu mjestimično stvarati višestruke nakupine u kojima se tilakoidi međusobno povezuju kao u biljaka , što se naziva grana. U kloroplastima se nalaze i nukleotidi koji sadrže kloroplastnu DNK. Osim klorofila a i b, u kloroplastima su prisutni i karotenoidi (uključujući β-karoten) i različiti ksantofili kao što su astaksantin, lutein, kantaksantin, zeaksantin itd. (Barkia i sur., 2019; Heimann i Huerlimann, 2015). Neke vrste imaju i crveni hematokrom. Globula koja sadrži karotenoide čini stigmu koja se nalazi uz površinu kloroplasta. Unutar lamela kloroplasta nalaze se pirenoidi u kojima se nakuplja rezervni materijal. Rezervna tvar zelenih mikroalgi je škrob koji stvara pločaste naslage oko proteinske jezgre pirenoida, a katkad se nakuplja i u zrncima u stromi kloroplasta. Vakulole su jednostavne, kontraktilne. Stanice mogu biti s jednom jezgrom (monoenergidne) ili s više jezgara (polienergidne). Razmnožavanje može biti spolno i nespolno. Nespolno razmnožavanje može biti pomoću pokretnih zoospora ili putem nepokretnih akineta, aplanospora ili autospora. Spolno se razmnožavaju izogamijom odnosno spoja dviju pokretnih spolnih stanica koje su morfološki identične, a fiziološki različite ili anizogamijom odnosno spojem morfološki različitih muških i ženskih spolnih stanica. U vegetativnom stadiju većinom su haplonti, jer je u njihovom razvojnom ciklusu samo zigota diploidna, a reprodukcijska dioba događa se pri klijanju zigote. Izmjenjivanje generacija, između gametofita i sporofita česta je u višestaničnim zelenim mikroalgama, a vegetativno razmnožavanje putem fragmentacije talusa česta je za filamentozne oblike (Viličić, 2002).

2.5. Najvažniji metabolički procesi u stanicama mikroalgi

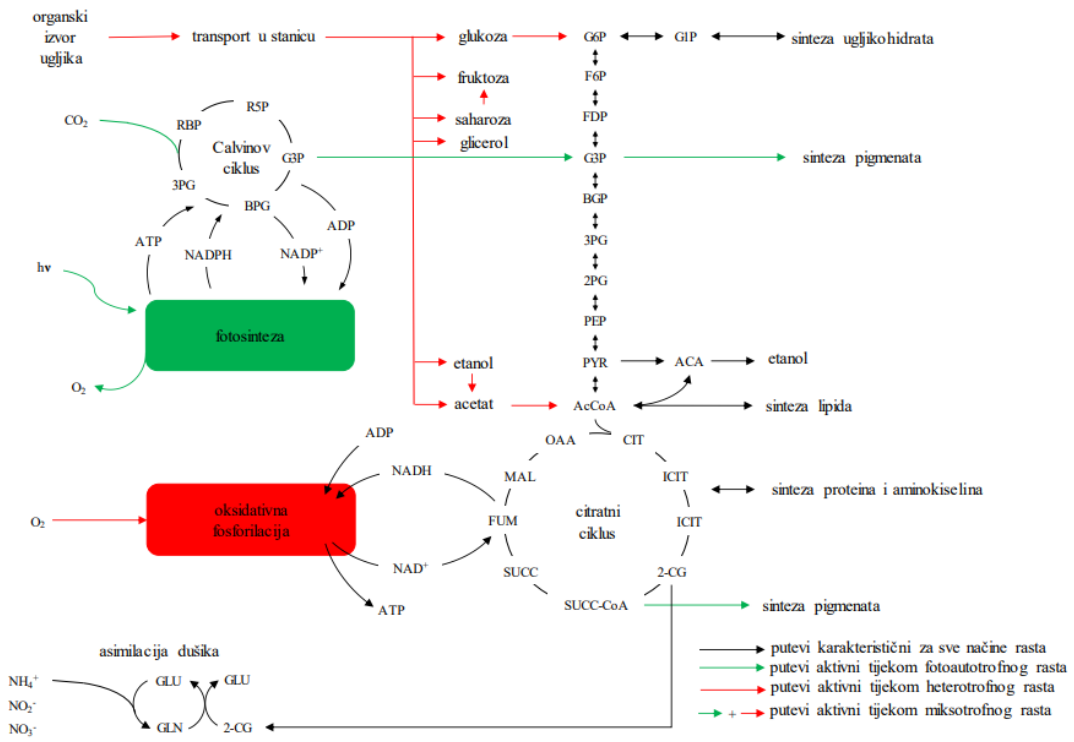
2.5.1. Načini ishrane i pridobivanja energije

Četiri glavna načina na koji mikroalge mogu pribavljati energiju potrebnu za rast i sintezu staničnih dijelova: (a) fotoautotrofno; (b) heterotrofno; (c) miksotrofno; i (4) fotoheterotrofno. Mikroalge su prvenstveno fotosintetski organizmi koji energiju potrebnu za rast i održavanje pribavljaju putem fotosinteze koja im omogućava da uz prisustvo svjetlosne energije koriste ugljikov dioksid kao izvor ugljika za sintezu organskih molekula. Ovaj tip metabolizma naziva se fotoautotrofnim. No, pojedine vrste izolirane na područjima limitiranog solarnog zračenja sposobne su iskorištavati široki spektar organskih izvora ugljika, koji stanicama služi i kao izvor energije (Morales-Sánchez i sur., 2015). Tu razlikujemo heterotrofni metabolizam i miksotrofni metabolizam. Kao i u mnogih drugih mikroorganizama, glukoza je preferirani izvor ugljika za rast miksotrofnih i heterotrofnih vrsta mikroalgi, a ostali izvori ugljika koje mikroalge mogu metabolizirati uključuju acetat, fruktozu, saharozu, laktozu, galaktozu, manozu i glicerol. Stanice rastu heterotrofno kada metaboliziraju organski izvor ugljika bez prisustva svjetlosti. Miksotrofni rast nastupa kada mikroalga i dalje pridobiva energiju fotosintezom za fiksaciju anorganskog ugljika uz istovremenu asimilaciju organskog ugljika iz okoline. Jedan od podtipova miksotrofnog rasta je amfitrofija gdje se metabolizam mikroorganizma mijenja iz autotrofnog u heterotrofni ovisno o koncentraciji organskog izvora ugljika i intenziteta svjetlosti (Wijffels, 2008). Miksotrofne organizme karakterizira sposobnost asimilacije organskih izvora ugljika dok koriste anorganske tvari kao elektron donore (Haoujar i sur., 2020). Za fotoheterotrofni rast mikroalgi je neophodan izvor svijetlosti da bi mogla koristiti organski izvor ugljika, odnosno neki šećer. Ovaj tip metabolizma također se naziva i fotometabolizam. Vrste *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira platensis* primjeri su mikroalgi koje mogu rasti fotoautotrofno, heterotrofno i miksotrofno, dok su *Selenastrum capricornutum* i *Scenedesmus acutus* primjeri sojeva koji preferiraju fotoautotrofni, heterotrofni ili fotoheterotrofni način rasta (Haoujar i sur., 2020). Od nekoliko poznatih biokemijskih puteva razgradnje glukoze, za mikroalge su karakteristična samo dva: Embden-Meyerhof-Parnasov i pentoza-fosfatni put (Perez-Garcia i sur., 2015). Prvi je dominantan kod miksotrofnog rasta u prisustvu svjetlosti, dok se u tami glukoza metabolizira uglavnom pentoza-fosfatnim putem.

Većina enzima pentoza-fosfatnog puta aktivna je i u Calvin-ovom ciklusu, što upućuje na potencijalnu zajedničku regulaciju metabolizma izvora ugljika i fotosintetske fiksacije CO_2 (Morales-Sánchez i sur., 2015). Mnoge vrste mikroalgi sposobne su metabolizirati acetat putem glioksilatnog ciklusa u glioksisomima (Combres i sur., 1994). Međutim, visoke koncentracije octene kiseline inhibiraju rast. Glicerol je još jedan od značajnijih supstrata koji podržavaju rast mikroalgi u heterotrofnim uvjetima. U stanicu se transportira jednostavnom difuzijom, gdje se fosforilira i oksidira do gliceraldehid-3-fosfata koji je jedan od intermedijera Embden-Meyerhof-Parnasovog puta (Chen i Jiang, 2017).

2.5.2. Fotosinteza

Fotosinteza je jedan od temeljnih biokemijskih puteva u kojem se odvija pretvorba energije svjetlosti u biokemijsku energiju potrebnu za rast i funkcioniranje stanice. Ovaj proces tradicionalno podrazumijeva tzv. reakcije na svjetlu i reakcije u tami. U eukariotskih mikroalgi i viših biljaka reakcije na svjetlu odvijaju se u tilakoidnim membranama kloroplasta, dok se kod prokariotskih cijanobakterija taj sustav nalazi na membrani same stanice (Golbeck, 1994). Kompleks koji omogućuje transport elektrona i fotofosforilaciju sastoji se od fotosustava II, fotosustava I, citokroma b6/f i ATP sintaze (Masojídek i sur., 2013). Fotosintetski ciklus započinje apsorpcijom fotona u molekulama pigmenata fotosustava II, što rezultira ekscitacijom elektrona i njihovim sekvencionalnim prijenosom do fotosustava I. Posrednik u prijenosu elektrona je proteinski kompleks citokroma b6/f zajedno s mobilnim akceptorima plastokinonom i plastocijaninom. Prilikom oksidacije fotosustava II, ekscitirani se elektroni nadomještaju fotolizom vode, čija je posljedica oslobađanje elementarnog kisika. Pri prijenosu elektrona kroz fotosustav II dolazi do formiranja transmembranskog gradijenta protona koji predstavlja pokretačku silu za sintezu ATP-a. Apsorpcija fotona u fotosustavu I inducira prijenos elektrona preko feredoksina do krajnjeg akceptora elektrona, $NADP^+$ (Bishop, 1971). Osnovna svrha reakcija na svjetlu je opskrba stanice energijom i biokemijskim reducensima nužnim za odvijanje reakcija u tami (Calvinov ciklus) koje omogućuju asimilaciju ugljikovog dioksida (slika 5)



Slika 5. Usporedba metaboličkih puteva asimilacije izvora ugljika karakterističnih za pojedini način rasta: 2-OG α-ketoglutarat, 2PG 2- fosfoglicerat, 3PG 3-fosfoglicerat, ACA acetaldehid, R5P ribuloza-5-fosfat, AcCoA acetil koenzim A, BPG 1,3-bisfosfoglicerat, G1P glukoza-1-fosfat, CIT citrat, F6P fruktoza-6- fosfat, FDP fruktoza-1,6-bisfosfat, FUM fumarat, G3P gliceraldehid-3-fosfat, G6P glukoza-6-fosfat, GLN glutamin, GLU glutamat, ICIT izocitrat, MAL malat, OAA oksaloacetat, OXA oksalosukcinat, PEP fosfoenolpiruvat, PYR piruvat, RBP ribuloza-1,5- bisfosfat, SUCC sukcinat, SUCCCoA sukcinil koenzim A (preuzeto i prilagođeno od (Perez-Garcia i sur., 2015).

2.5.3. Biosinteza lipida

Lipide mikroalgi dijelimo u dvije skupine: polarne i neutralne. Polarni lipidi uključuju fosfolipide i glikolipide, dok u neutralne lipide spadaju acilgliceridi (tri-, di- i monogliceridi) i masne kiseline. Neutralni lipidi pretežno služe kao izvori energije, dok polarni lipidi izgrađuju staničnu membranu. Masne kiseline su karboksilne kiseline s lancima duljine 4 - 36 atoma ugljika. Među njima razlikujemo zasićene masne kiseline (engl. Saturated Fatty Acid, SFA), masne kiseline s jednom nezasićenom dvostrukom vezom u lancu (engl. Monounsaturated

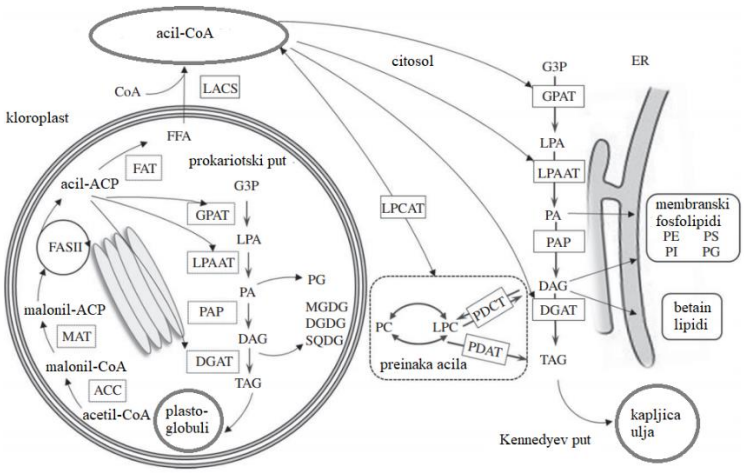
Fatty Acid, MUFA), masne kiseline s dvije nezasićene dvostruke veze u lancu (engl. Di-unsaturated Fatty Acid, DUFA), masne kiseline s tri nezasićene dvostruke veze u lancu (engl. Tri-unsaturated Fatty Acid, TUFA) i masne kiseline s više od tri nezasićene dvostruke veze u lancu (engl. Polyunsaturated Fatty Acid, PUFA). Prosječna duljina lanca u mikroalgama je od C14:0 do C22:6 pri čemu prevladavaju zasićene i jednostruko nezasićene masne kiseline (najčešće su C16:0, C18:0, C16:1, C18:1, C16:2, C18:2 i C18:3). Vrlo rijetko su prisutne masne kiseline s više od šest nezasićenih veza u lancu (D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016). Oleaginozne mikroalge tijekom uzgoja u povoljnim uvjetima sintetiziraju manje količine neutralnih lipida, pretežito u formi triglicerida. Zapravo mikroalge pohranjuju acilgliceride tijekom dana u procesu fotosinteze, a troše ih noću respiracijom za potrebe održavanja stanica i njihovu diobu. Međutim, akumulaciju lipida u stanicama mikroalgi može inducirati nekoliko faktora uglavnom onih koji predstavljaju mikroalgama stresne uvjete kao što su različite koncentracije nutrijenata (dušik, fosfor, željezo), visok salinitet, visoka temperatura, intenzitet svjetlosti i alternativni izvori ugljika. Važno je naglasiti da, iako stres pozitivno utječe na nakupljanje lipida u mikroalgama, on negativno utječe na rast stanica što u konačnosti može smanjiti produktivnost lipida. Pojačana akumulacija lipida u stanicama mikroalgi najčešće je promatrana u uvjetima limitacije izvorom dušika te se smatra da je prekomjerno nakupljanje triglicerida predstavlja efikasan način zaštite stanice od fotooksidativnog oštećenja uzrokovanog štetnim nakupljanjem fotoasimilata (Khozin-Goldberg, 2016). Naime, u nepovoljnim uvjetima prijeti opasnost od porasta razine reaktivnih kisikovih vrsta (eng. reactive oxygen species, ROS) uslijed nakupljanja elektrona u fotosintetskom elektron transportnom lancu, koje značajno inhibiraju fotosintezu i uzrokuju oštećenja strukture stanice. Rasterećenje prekomjerno reduciranog lanca elektrona omogućeno je preusmjeravanjem toka elektrona prema nastajanju NADPH koji predstavlja reduktivnu snagu u biosintezi masnih kiselina. Osim toga, istražena je stimulacija ovog fenomena iscrpljivanjem drugih nutrijenata, primjerice silicija kod dijatomeje *Cyclotella cryptica*, sumpora kod zelenih mikroalgi *Chlorella ellipsoidea* i *Chlamydomonas reinhardtii*, fosfora kod morske dijatomeje *Phaeodactylum tricornutum* i slatkovodne mikroalge *Monodus subterraneus* te cinka i željeza kod *Chlamydomonas reinhardtii* (Zienkiewicz i sur., 2016).

Akumulacija energijom bogatih spojeva preduvjet je za biosintezu lipida u stanicama mikroalgi. Ti spojevi pribavljaju se najčešće sintezom što ovisi o načinu ishrane. Sinteza lipida u stanici odvija se u nekoliko odjeljaka u stanici: u kloroplastima sinteza masnih kiselina, dok se sinteza triacilglicerida (TAG) odvija u endoplazmatskom retikulumu i tilakoidima (slika 6). U *de novo* sintezi, prva reakcija sinteze masnih kiselina je konverzija acetil-CoA u malonil-CoA u ATP-zavisnoj reakciji koji katalizira enzim acetil-CoA karboksilaze (engl. acetyl-CoA carboxylase, ACC). Reakcija se odvija u dva koraka: biotin karboksilaza (podjedinica CoA karboksilaze) katalizira parcijalnu reakciju karboksilacije biotinskog kofaktora pomoću bikarbonata. Podjedinica karboksiltransferaza katalizira prijenos karboksilne grupe na acetil-CoA pri čemu nastaje malonil-CoA. Drugi korak je konverzija malonil-CoA u malonil-ACP pomoću malonil-transferaze (engl. malonyltransferase, MAT) čime počinje ciklus masnih kiselina na multienzimskom kompleksu sintazi masnih kiselina (engl. fatty acid synthase, FAS). Sinteza masnih kiselina započinje prijenosom malonilne jedinice na proteinski nosač acila (engl. acyl carrier protein) koji čini nekatalitičku komponentu navedenog multienzimskog kompleksa. Elongacija acilnog lanca obuhvaća ponavljajući ciklus od četiri reakcije u nizu: kondenzacija, redukcija, dehidratacija i redukcija pri čemu se rastući acilni lanac produljuje za 2 C-atoma u svakom ciklusu(Sayanova i sur., 2017). Najčešće se odvija sedam ciklusa elongacije te nastaje primarni produkt palmitinska kiselina (16:0) koja je prekursor za biosintezu ostalih dugolančanih masnih kiselina (Mohan i sur., 2014). Mehanizam elongacije odvija se identično sintezi palmitata; postojeći lanac se produljuje za 2 C-atoma i nastaje stearinska kiselina (18:0) koja predstavlja svojevrsno raskrižje u sintezi masnih kiselina. Daljnja elongacija stearata rezultira formiranjem duljih zasićenih masnih kiselina, dok se desaturacijom dobiva oleinska kiselina (18:1, ω-9). Višestruka desaturacija oleinske kiseline dovodi do formiranja α- (18:3, ω-3) i γ-linolenske kiseline (18:3, ω-6). Konverzijom α-linoleata nastaju ostale višestruko nezasićene masne kiseline, dok elongacija i desaturacija γ-linoleata rezultira formiranjem arahidonske kiseline (20:4, ω-6).

Masne kiseline nakon sinteze (koja najčešće završava s C16:0-ACP ili C18:0-ACP) imaju dvije sudbine: (1) ostaju u kloroplastu gdje se pomoću aciltransferaza prevode u TAG i galaktolipide (tzv. prokariotski biosintetski put) ili (2) trasportiraju se u citosol gdje sudjeluju u sintezi fosfolipida i TAG (eukariotski Kennedyev put).

U kloroplastu u prokariotskom putu nastaju: fosfatidna kiselina (engl. phosphatic acid, PA), diacilglicerol (engl. diacylglycerol, DAG), monogalaktozil diacilglicerol (engl. monogalactosyldiacyilglycerol, MGDG), digalaktozil diacilglicerol (engl. digalactosyldiacylglycerol, DGDG), sulfokinovozil diacilglicerol (engl. sulfoquinovosyldiacylglycerol, SQDG) i fosfatidilglicerol (engl. phosphatidylglycerol, PG). Karakterizira ih C16 acilna skupina na sn-2 poziciji glicerolne okosnice (Sayanova i sur., 2017). U membranama tilakoida dijatomeja, osim spomenutih lipida nastaju i značajnije koncentracije fosfatidilkolina (engl. phosphatidylcholine, PC), u odnosu na druge vrste. Za razliku od zelenih algi i viših biljaka u kojima dominiraju MGDG i DGDG, kod dijatomeja su zastupljeniji anionski lipidi (SQDG i PG) koji čine 40 – 50 % ukupnih membranskih lipida. Prije ulaska u eukariotski put sinteze TAG, acil-ACP se u kloroplastu oslobađaju proteina nosača acila (engl. acyl carrier protein, ACP) pomoću acil-ACP tioesteraze (engl. fatty acyl-ACP thioesterase, FAT) pa difundiraju u citosol u formi slobodnih masnih kiselina (engl. free fatty acid, FFA). U citosolu se esterificiraju u acil-CoA pomoću acil-CoA sintaze (engl. long-chain acyl-CoA synthase, LACS) lokalizirane na vanjskoj strani membrane kloroplasta. Acil-CoA su prekursori sinteze TAG Kennedyevim putem na endoplazmatskom retikulumu. Osim toga, mogu ući u acil-modificirajući ciklus, vežući se umjesto masne kiseline na sn-2 poziciji fosfatidilkolina (PC) pomoću lizofosfatidilkolin aciltransferaze (engl. lysophosphatidylcholine acyltransferase, LPCAT). Modifikacijama na PC nastaju nezasićene masne kiseline, osobito PUFA, koje se dalje ugrađuju u stanične lipide (Sayanova i sur., 2017). U eukariotima se TAG sintetiziraju Kennedyevim putem postepenom esterifikacijom glicerol-3-fosfata (G3P), najvjerojatnije na endoplazmatskom retikulumu. Transfer masne kiseline s acil-CoA na sn-1 poziciju G3P je prvi korak ovog puta kataliziran glicerol-3-fosfat aciltransferazom (engl. glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT) koji rezultira stvaranjem lizofosfatidne kiseline (engl. lysophosphatic acid, LPA). Aciltransferaza lizofosfatidne kiseline (eng. lysophosphatic acid acyltransferase, LPAAT) katalizira esterifikaciju LPA na sn-2 poziciji glicerolne okosnice, pri čemu nastaje fosfatidna kiselina (eng. phosphatic acid, PA). Defosforilaciju na sn-3 poziciji PA provodi fosfataza fosfatidne kiseline (eng. phosphatic acid phosphatase, PAP) pri čemu nastaje DAG. PA i DAG su prekursori za sintezu TAG i membranskih fosfolipida (Sayanova i sur., 2017). Dijatomeje proizvode i ne fosforne glicerolipide, betain lipide (BL), koji nisu pronađeni kod viših biljaka. Betain lipidi imaju

polarnu amino-acil grupu vezanu eterskom vezom na sn-3 poziciju glicerolne okosnice (D'Alessandro & Antoniosi Filho, 2016; Sayanova i sur., 2017).



Slika 6. Shematski prikaz biosinteze lipida u mikroalgama. ACC: acetil-CoA karboksilaza; DAG: diacilglicerol; DGAT: diacilglicerol aciltransferaza; DGDG: digalaktozil diacilglicerol; ER: endoplazmatski retikulum; FAT: acil-ACP tioesteraza; FAS: sintaza masnih kiselina; FFA: slobodna masna kiselina; G3P: glicerol-3-fosfat; GPAT: glicerol-3-fosfat aciltransferaza; LACS: acil-CoA sintaza; LPAAT: aciltransferaza lizofosfatidne kiseline; LPA: lizofosfatidna kiselina; LPCAT: lizofosfatidilkolin aciltransferaza; MAT: malonil transferaza; MGDG: monogalaktozil diacilglicerol; PA: fosfatidna kiselina; PAP: fosfataza fosfatidne kiseline; PC: fosfatidilkolin; PDAT: fosfolipid diacilglicerol aciltransferaza; PDCT: fosfokolin transferaza; PE: fosfatidiletanolamin; PG: fosfatidilglicerol; PI: fosfatidilinozitol; PS: fosfatidilserin; SQDG: sulfokinovozil diacilglicerol; TAG: triacilglicerol (preuzeto i prilagođeno od Sayanova i sur., 2017)

2.5.3.1. <u>Utjecaj makronutrijenata silicija, dušika i fosfora na biosintezu lipida</u>

Metabolizam silicija utječe na diobu stanica i formiranje frustule, ali i na neke druge metaboličke puteve u dijatomeja. Posebno je zanimljiv utjecaj na metabolizam triacilglicerida (TAG), koji mogu poslužiti kao alternativna sirovina za proizvodnju biodizela treće generacije. Sinteza TAG stimulirana je kada silicij limitira rast stanica (Adams i Bugbee, 2014). Konkretno, male koncentracije silicija u stanici aktiviraju transkripciju gena koji

kodiraju acetil-CoA karboksilazu. Navedeni enzim katalizira reakciju sinteze malonil-CoA iz acetil-CoA, odnosno prvi korak u sintezi masnih kiselina. Osim toga, isti enzim katalizira sintezu triacilglicerida (TAG) u glicerol-3-fosfatnom putu (Jeffryes i sur., 2013). Limitacija rasta nekim drugim makronutrijentima, kao što su dušik i fosfor također dovodi do akumulacije lipida u dijatomejama, ali nakupljanje je znatno sporije i rezultira manjim udjelom lipida u biomasi u usporedbi s limitacijom silicijem (Adams i Bugbee, 2014). Dijatomeje brže reagiraju na nedostatak silicija nego nekog drugog makronutrijenta, jer se bez njega ne mogu dijeliti (Taguchi i su., 1987). Dušik je važan nutrijent koji sudjeluje u sintezi proteina, nukleinskih kiselina i klorofila u stanici. U uvjetima limitacije dušikom, metabolizam ugljika preusmjerava se sa sinteze krizolaminarina na sintezu lipida, osobito triacilglicerida (TAG). Istovremeno se de novo sinteza masnih kiselina neometano odvija pri čemu nastaju potencijalni prekursori sinteze TAG. Osim navedenog, limitacija rezultira aktiviranjem fosfolipaza i galaktolipaza, enzima koji degradiraju fosfolipide i galaktolipide u masne kiseline iz kojih se sintetizitaju TAG (Zulu i sur., 2018). Fosfor se u stanicama nalazi u formi fosfolipida i nukleinskih kiselina. U uvjetima limitacije fosforom eksprimiraju se geni koji kodiraju za acetil-CoA karboksilazu, ključni enzim u sintezi masnih kiselina, što za posljedicu ima akumulaciju TAG u stanici (Zulu i sur., 2018).

2.6. Uzgoj mikroalgi

Odabir načina kultivacije mikroalgi od presudnog je značaja za povećanje produktivnosti, prinosa biomase odgovarajućeg biokemijskog sastava i sinteze željenog proizvoda te postizanje isplativog procesa proizvodnje. Važniji čimbenici koje treba uzeti u obzir tijekom planiranja i provedbe uzgoja mikroalgi obuhvaćaju fiziološke karakteristike mikroalge, cijenu zemljišta, potrebnu energija, hranjive tvari, vodu, klimatske uvjeti (ako je otvoreni sustav) i vrstu konačnog proizvoda. Osim toga, odabir načina uzgoja kulture ovisit će i o učinkovitosti iskorištavanja svjetla, kvaliteti i kvantiteti nutrijenata, učinkovitosti kontrole temperature, osjetljivosti stanica mikroalgi na hidrodinamički stres, mogućnostima održavanja aksenične kulture i mogućnosti povećanja mjerila (Lebeau i Robert, 2003). S obzirom na četiri glavna načina pribavljanja energije za rast, odnosno s obzirom na izvor ugljika, razlikujemo i četiri glavna načina kultivacije: fotoautotrofni, heterotrofni, fotoheterotrofni i miksotrofni (Perez-Garcia i sur., 2015). Najčešće se provodi fotoautrotrofna kultivacija koja

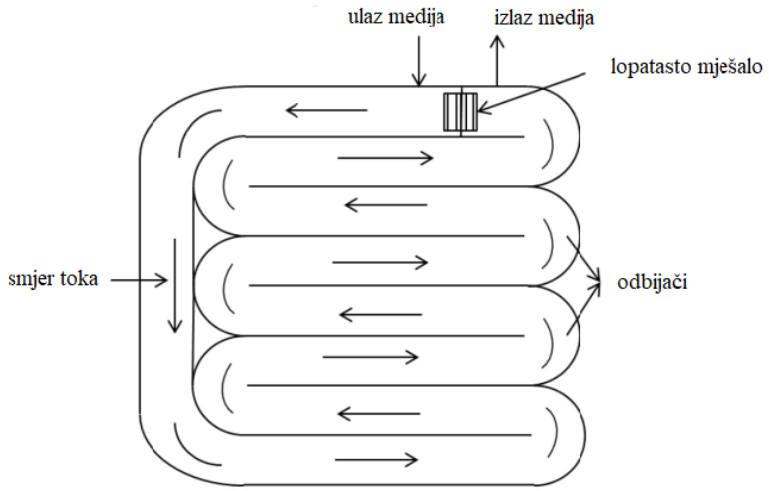
podrazumijeva korištenje anorganskog izvora ugljika (CO_2) i svjetlosti kao izvora energije. Mikroalge za koje je utvrđeno da mogu rasti miksotrofno i heterotrofno uključuju *Haematococcus pluvialis*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlamydomonas globosa*, *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus bijuja*, *Selenastrum capricornutum*, *Ankistrodesmus* sp. te mnoge vrste iz roda *Chlorella* (Ogbonna & Moheimani, 2015). Budući da je izvor energije za fotoautotrofni rast isključivo svjetlost, ovaj način kultivacije rijetko se koristi za proizvodnju biomase mikroalgi u svrhu dobivanja vrijednih proizvoda (Wang i sur., 2014). U usporedbi s fotoautotrofnim rastom, heterotrofnom i miksotrofnom kultivacijom postižu se znatno veći prinosi biomase i vrijednih proizvoda mikroalgi. Eksponencijalno smanjenje prodiranja svjetlosti s porastom turbiditeta uslijed fotoautotrofne kultivacije uzrok je poteškoća u postizanju visoke koncentracije biomase, kao i produktivnosti samog procesa (Wang i sur., 2014). U tablici 2. sumirane su tehnološke značajke različitih načina kultivacije mikroalgi. Dva osnovna kultivacijska sustava za uzgoj mikroalgi su otvoreni i zatvoreni sustavi, te će oni u nastavku biti detaljnije opisani.

Tablica 2. Usporedba različitih načina uzgoja mikroalgi

Način kultivacije	Izvor energije	Izvor ugljika	Potreba za svjetlom	Varijabilnost metabolizma	Bioreaktorski sustav	Troškovi	Nedostatci
Fotoautotrofno	svjetlost	annorganski	nužna	nema promjene između izvora C	otvoreni bazeni i/ili fotobioreaktori	niski	niska gustoća stanica; visoki troškovi izdvajanja; otežano povećanje mjerila
Heterotrofno	organski izvor C	organski	nije potrebna	promjena između izvora C	biorekator s miješalom	srednji	rizik od kontaminacije; cijena supstrata
Fotoheterotrofno	svjetlost	organski	nužna	promjena između izvora C	zatvoreni fotobioreaktor	visoki	rizik od kontaminacije; visoki kapitalni troškovi, cijena supstrata
Miksotrofno	svijetlost i organski izvor C	anorganski i organski	nije nužna	simultana primjena oba izvora C	zatvoreni fotobioreaktor	visoki	rizik od kontam.; visoki kapitalni troškovi, cijena supstrata

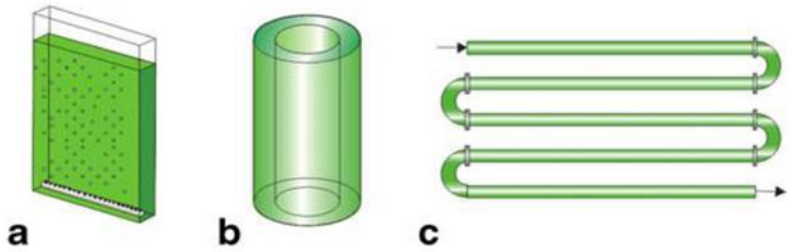
2.6.1. Sustavi za uzgoj

Dva su osnovna kultivacijska sustava koji se primjenjuju u uzgoju mikroalgi, otvoreni i zatvoreni sustavi. Otvoreni sustavi za fotoautotrofnu kultivaciju mikroalgi najčešće podrazumijevaju bazene i kanale. Za kultivaciju velikih razmjera obično se upotrebljavaju bazeni s recirkulacijom podloge (engl. raceway pond). U ovakvim se sustavima podloga pokreće pomoću lopatastog miješala s ciljem sprječavanja sedimentacije biomase mikroalgi. CO_2 se u podlogu uvodi raspršivanjem pomoću sustava mlaznica instaliranog na dnu bazena. Za uspješnu opskrbu stanica svjetlošću nužno je da visina podloge u bazenu ne prelazi 0,3 m (Veillette i sur., 2018). Bazen s recirkulacijom podloge jednostavne izvedbe prikazan je na slici 7. Sustav se može dodatno opremiti pregradama koje služe za usmjeravanje toka podloge i olakšavanje miješanja (Chisti, 2007). Otvoreni sustavi pogodni su i za miksotrofnu kultivaciju mikroalgi u slučaju njihove primjene za obradu otpadne vode (Craggs i sur., 2013). Relativno niski operativni troškovi primarni su razlog kultivacije u otvorenim sustavima (Moheimani i sur., 2015). Međutim, u ovakvim sustavima rizik od kontaminacije drugim mikroorganizmima ili stranim vrstama mikroalgi iznimno je visok. Direktna izloženost ultraljubičastom zračenju, nejednolika raspodjela solarne energije, slabo miješanje i ovisnost intenziteta svjetlosti o meteorološkim prilikama neki su od najznačajnijih faktora koji utječu na stabilnost bioprocesa (Yen i sur., 2013). Smatra se da je teoretska produktivnost otvorenih sustava 60 g m^{-2} dan^{-1} , međutim u praksi je vrlo teško postići čak i vrijednosti od 10 - 20 g m^{-2} dan^{-1} (Christenson i Sims, 2011).



Slika 7. Shema sustava otvorenog bazena za uzgoj mikroalgi (preuzeto i prilagođeno od Chisti, 2007))

Iz toga razloga razvijeni su zatvoreni sustavi u kojima je olakšana kontrola procesa što je posebice važno za heterotrofni i miksotrofni uzgoj mikroalgi zbog redukcije rizika od kontaminacije. Razvijeno je nekoliko različitih tipova fotobioreaktora uključujući vertikalne kolone, pločaste fotobioreaktore i cijevne fotobioreaktore (slika 8). Vertikalne kolone izrađuju se od transparentnog materijala (staklo ili akril) koji olakšava dopremu svjetlosti u kulturu mikroalgi.



Slika 8. Vrste zatvorenih fotobioreaktora: a) s ravnim pločama, b) kolonski bioreaktor i c) cijevni (preuzeto i prilagođeno od Posten, 2009))

Raspršivanjem zraka na dnu kolone ostvaruje se miješanje podloge uz efikasan prijenos mase CO_2 (Mohan i sur., 2014). Poželjno je postići turbulentno strujanje podloge u svrhu izbjegavanja inhibicije proizvedenim kisikom. Međutim, ovisno o kultiviranom soju, potrebno je uzeti u obzir mogućnost oštećenja stanica uslijed hidrodinamičkog stresa (J. A. V.

Costa i de Morais, 2013). Izvor svjetlosti obično je smješten izvan kolone, no razvijaju se i modeli s unutarnjim osvjetljenjem zahvaljujući većoj efikasnosti prodiranja svjetlosti i njenoj jednoličnijoj raspodjeli. Ovisno o načinu strujanja tekućine unutar kolone, dijele se na barbotirajuće kolone i air-lift fotobioreaktore (Yen i sur., 2013). Izvedba pločastih fotobioreaktora vrlo je jednostavna. Sastoje se od vertikalnih panela osvijetljenih s obje strane, u kojima se miješanje podloge ostvaruje aeracijom. Upotreba ove vrste bioreaktora potaknula je značajan interes zahvaljujući postizanju visoke koncentracije biomase (> 80 g L^{-1}) tijekom fotoautotrofne kultivacije (Brennan i Owende, 2010). No, budući da s porastom volumena raste hidrostatski tlak povećanje mjerila je otežano (Yen i sur., 2013). Cijevni fotobioreaktori u širokoj su upotrebi za komercijalnu proizvodnju. Obično su izrađeni od transparentnih polipropilen-akrilnih ili polivinil-kloridnih cijevi promjera do 0,1 m postavljenih horizontalno, vertikalno ili ukošeno. Recirkulacija podloge obavlja se pomoću pumpe ili air-lift sustava. Potonji se sastoji od uzlazne i silazne sekcije koje se nalaze u dijelu sustava za prihranu. Uzlazna sekcija se aerira i pritom omogućuje oslobađanje proizvedenog kisika koji se izvodi pri vrhu sustava, a podloga se kroz silaznu sekciju vraća u fotobioreaktor uz obogaćivanje ugljikovim dioksidom. Dvostupanjskom kultivacijom mikroalgi primjenom kombinacije otvorenog i zatvorenog sustava moguće je povećati prinos specifičnog metabolita (J. A. V. Costa i de Morais, 2013). Hibridni sustav razvijen je s ciljem iskorištavanja prednosti svojstvenih svakom od navedenih tipova bioreaktora. Prvi stupanj provodi se u fotobioreaktoru, pri čemu kontrolirani uvjeti kultivacije smanjuju rizik od kontaminacije i omogućuju neometanu diobu stanica mikroalgi. Prirasla biomasa prebacuje se u otvoreni bazen gdje se stanice izlažu nutritivnom stresu, čime se potiče nakupljanje željenog metabolita (Brennan i Owende, 2010). Glavni cilj konstrukcije fotobioreaktora je redukcija troškova proizvodnje biomase kroz bolju kontrolu procesa i smanjujući rizik od kontaminacije. No, unatoč tome poneki nedostatci njihovu primjenu čine ekonomski neprihvatljivim za proizvodnju proizvoda niske tržišne cijene (tablica 3). Cijena proizvodnje mikroalgalne biomase raste uslijed visokih kapitalnih troškova, operativnih troškova i troškova održavanja fotobioreaktora. Nadalje, prodor svjetlosti limitiran je kod volumena većih od 100 L, a nastajanje mikroalgalnog biofilma na površinama stijenki bioreaktora dodatno smanjuju prodiranje svijetlosti što rezultira smanjenjem rasta mikroalgi. Kod konstrukcije fotobioreaktora potrebno je voditi računa o kapitalnim i operativnim troškovima, potrošnji energije, osvjetljenju površine, prijenosu mase, silama smicanja koje mogu oštetiti

stanice te o brzini rasta što doprinosi produktivnosti i isplativosti uzgoja, te bi trebao biti pogodan za uzgoj različitih mikroalgalnih vrsta.

Tablica 3. Prednosti i nedostaci otvorenih i zatvorenih sustava za uzgoj mikroalgi (preuzeto i prilagođeno od Carvalho i sur., 2014; Lebeau i Robert, 2003)

Parametar	Otvoreni sustavi	Zatvoreni sustavi (PBR)
mogućnost kontaminacije	velika	mala
potrebna površina	velika	mala
gubici vode	velika	neznatni
gubici CO_2	velika	neznatni
kontrola procesa	nije moguća	zadovoljavajuća
ponovljivost uzgoja	nije moguća	moguća
ovisnost o ekološkim čimbenicima	apsolutna, uzgoj onemogućen za vrijeme padalina	neznatan; zatvoreni sustavi omogućuju kontrolirani uzgoj neovisno o vremenskim uvjetima
troškovi	mali	veliki
učinkovitost	mali	velika

2.6.2. Ostali faktori koji utječu na uzgoj mikroalgi

2.6.2.1. Svjetlo

Izvor svjetlosti ključan je u dizajnu fotobioreaktora te je jedan od glavnih ograničavajućih čimbenika u uzgoju dijatomeja budući da su dostupnost i intenzitet svjetlosti glavni faktori koji utječu na produktivnost fotosinteze. Svjetlo je potrebno za sintezu ATP i NADPH, molekula koje se koriste kao izvor energije za sintezu organskih spojeva. Glavni princip je maksimizirati omjer površine i volumena i redukcija puta svjetlosti kako bi se povećala količina svjetlosti koja dopire do svake pojedinačne stanice. Intenzitet svjetlosti je ključan, a sama optimizacija rasvjete u fotobioreaktoru nije jednostavna. Homogeni intenzitet svjetlosti vrlo je važan kako bi sve stanice u populaciji bile jednako izložene svjetlu te da bi se mogla ostvariti maksimalna proizvodnja željenog metabolita potrebne kvalitete. Ukoliko je intenzitet svjetlosti prejak rast će biti inhibiran uslijed foto-inhibicije, a sama svjetlost biti će potraćena kao fluorescencija i toplina. Treba imati na umu i efekt foto-limitacije i osigurati

dovoljnu dobavu svjetlosti kako bi se izbjeglo odumiranje kulture. Osim toga, svjetlost koja prolazi kroz stjenke i površine fotobioreaktora nije uvijek efikasno utrošena. Spektar svjetlosti također je važan faktor, budući da jedino svjetlost između 400 i 700 nm predstavlja fotosintetski aktivnu radijaciju (Sahin i sur., 2019). Iz toga razloga više od 50% sunčeve svjetlosti koja je prirodno prisutna ne može biti iskorištena za fotosintezu. Materijali koji se koriste za izradu fotobioreaktora moraju zadovoljavati ove potrebe pa se stoga izrađuju od prozirnih materijala kao što su staklo, pleksiglas, poli(vinil) klorid, polietilen i akrilni-PVC. Materijal bi također trebao biti otporan na nastajanje biofilma s budući da on drastično smanjuje prodiranje svjetlosti kroz materijal. Osim toga, visoka gustoća stanica također može uslijed međusobnog zasjenjivanja stanica smanjiti dobavu svjetla unutar bioreaktora stoga je potrebno odrediti i kritičnu gustoću kulture (koncentraciju stanica). Također je potrebno odrediti trajanje perioda svjetla i tame budući da izmjena svjetla i tame utječe na sinkronizirano dijeljenja stanica. Isto se postiže držanjem kulture u tami tijekom dugog razdoblja, te potom izlaganje svjetlu. Ako se kultura uzgaja 8 sati na svjetlu i 8 sati u tami, dobivene se stanice sinkronizirano dijele (Lee, 2008). Ako se primjenjuje ciklus od 6 sati svjetla i 6 sati tame, tada se stanična dioba pojavljuje svaki drugi period tame zbog nedovoljno vremena da se stanica pripremi za sljedeću diobu. Većina studija pokazala je da je vrijeme od 16 sati svjetla i 8 sati tame najprikladnije za rast većine algi (Lee, 2008). Optimalna razina intenziteta svjetlosti za većinu vrsta mikroalgi su oko 200–400 μM fotona m^{-2} s^{-1} (Khan i sur., 2018).

2.6.2.2. Temperatura

Otvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi prostiru se na velikim površinama kako bi se osigurala što učinkovitija osvijetljenost kulture, potreban prijenos CO_2 i O_2, te zadovoljavajuća količina biomase mikroalgi. Time su ovakvi sustavi izloženi velikim oscilacijama u temperaturama tijekom dana i tijekom godine zbog izmjene godišnjih doba. Iako većina mikroalgi ima sposobnost rasta u širokom rasponu temperatura, za optimalan rast i postizanje visoke produktivnosti potrebna je optimalna temperatura. Povećanje temperature na optimalan raspon eksponencijalno povećava rast mikroalgi, ali povećanje ili smanjenje na temperaturu iznad optimalne točke usporava ili čak zaustavlja njihov rast i aktivnost (Béchet i

sur., 2017). Optimalna temperatura za rast kod većine mikroalgalnih vrsta varira između 20°C i 24 °C, iako neke vrste mogu tolerirati i temperature u rasponu od 16°C do 35°C (ref 53 moj rad). Temperature niže od 16 °C usporavaju rast, dok su one više od 35 °C smrtonosne za brojne vrste (Lebeau i Robert, 2003). Snižavanje temperature postiže se uranjanjem cijelog sustava u vodene bazene, špricanjem osvjetljene površine vodom, zasjenjivanjem ili pak ugradnjom izmjenjivača topline unutar fotobioreaktora (Wang i sur., 2012; Watanabe i sur., 1994). Zbog visokih troškova hlađenja, procese bi trebalo voditi pri maksimalnim temperaturama koje kultura može podnijeti, a da to ne izaziva nepovoljan stres za samu mikroalgu (ref 52, moj rad)

2.6.2.3. Miješanje

Neprestano miješavanje mikroalgalne kulture nužno je kako bi se spriječilo taloženje algalnih stanica, osigurala jednolika izloženost stanica svjetlosti, postiglo dobro otapanje plinova i hranjivih tvari u hranjivoj podlozi te osigurala izmjena topline (Khan i sur., 2018). Iz tih razloga miješanje značajno doprinosi zadovoljavajućem rastu mikroalgalne kulture i povećava produktivnost. Dobro miješanje kulture ključno je u sprječavanju nastajanja mrtvih kuteva u kojima dolazi do odumiranja stanica uslijed nedostatka svjetlosti i nutrijenata što narušava kvalitetu konačnog proizvoda (Suh i Lee, 2003). Miješanje se uglavnom ostvaruje propuhivanjem kulture sa zrakom uz CO_2, uporabom tresilica, različitih mehaničkih miješala, mlaznih ili zračnih pumpi (Wang i sur., 2012). No, treba imati na umu kako mehaničko miješanje i pucanje mjehurića plina u hranjivoj podlozi dovodi do hidrodinamičkog stresa na stanice uslijed jakih sila smicanja što može oštetiti stanice i dovesti do smanjenih prinosa i nepoželjnih metaboličkih reakcija (ref 52). Zelene alge su najosjetljivije, zatim slijede plavo-zelene alge i dijatomeje, dok su dinoflagelati najmanje osjetljivi (Singh i sur., 2015). Dodatkom karboksimetil celuloze (CMC) u hranjivu podlogu u koncentraciji od barem 0,2 % (tež.) povećava se otpornost stanica na hidrodinamički stres (Lebeau i Robert, 2003).

2.6.2.4. Nutrijenti, pH i CO_2

Za rast mikroalgi najvažniji makronutrijenati su dušik, fosfor i kod dijatomeja silicij. Osim toga važni su i mikronutrijenti koji se sastoje od raznih metala u tragovima (posebno otopljeno željezo), vitamina tiamina (B1), cijanokobalamina, (B12), a ponekad i biotina (Lebeau i Robert, 2003). Koncentracija mikronutrijenata u hranjivoj podlozi, kao što su željezo i mangan, iznosi od 30 µg do 2,5 ppm, dok je koncentracija elemenata u tragovima (obalt, cink, bor, bakar i molibden) od 4,5 - 2,5 ppm (Juneja i sur., 2013). Silicij koji je nužan za rast dijatomeja apsorbira se u koncentraciji manjoj od 1 µM te se aktivno transportira kroz membranu (Mishra i sur., 2017). Dušik je nužan za rast, a u uvjetima limitacije rasta dušikom dolazi do nakupljanja lipida u stanicama dijetomeja (Lebeau i Robert, 2003). Za fototrofan rast mikroalgi također je nužan CO_2 kao anorganski izvor ugljika. Otapanje CO_2 u hranjivoj podlozi značajno utječe na pH same kulture te time i na rast mikroalgi. Optimalan pH za većinu mikroalgalnih kultura kreće se između 8.2 i 8.7, ali uzgoj može biti vođen u širem rasponu pH od 7 do 9 (Huang i sur., 2017; Wang i sur., 2012). Osim toga, pH utječe i na naboj disociranih skupina komponenata hranjivog medija kao što su anorganske tvari, organske kiseline, CO_2, a time i na njihovu dostupnost mikroalgama. Vrijednost pH također je od iznimne važnosti za transport kroz staničnu membranu, električni naboj površine stanica i membranskog potencijala, pa je stoga održavanje pH vrijednosti u prihvatljivom rasponu nužno za postizanje visokog prinosa biomase. Pri velikim koncentracijama stanica kultura se propuhuje s zrakom obogaćenim s CO_2 što dovodi do porasta pH vrijednosti kulture. Održavanje optimalnog pH osim dodatkom lužine može se postići i dodatkom natrijevog bikarbonata koji snižava pH vrijednost, a ujedno je i izvor ugljika. U stanicama mikroalgi mogu se odvijati tri procesa ovisno o uvjetima uzgoja, a to su fotosinteza, fotorespiracija i respiracija u tami. Tijekom fotosinteze, mikroalge koristeći sunčevu energiju vežu ugljikov dioksid (CO_2) i kao produkt metabolizma otpuštaju molekulu kisika O_2. Budući da mikroalge mogu koristiti samo otopljeni CO_2 u hranjivom mediju, odnosno u obliku bikarbonata, od ključne je važnosti održavati koncentraciju otopljenog ugljikovog dioksida unutar prihvatljivih granica. Previsoke koncentracije inhibiraju rast, a s druge strane koncentracija izvora ugljika ne smije pasti ispod minimalne vrijednosti budući da će rast tada prestaje (Mata i sur., 2010; Wang i sur., 2008). Jednostavna adsorpcija CO_2 iz zraka koji sadrži svega 0.3% istog je nedovoljna za rast mikroalgama i kultura je tada limitirana s CO_2. Upravo zato je

potrebno u fotobioreaktorima osigurati kontinuiranu dobavu topivog anorganskog ugljika kako bi se postigao zadovoljavajući rast kulture. To se uglavnom postiže propuhujući kulturu s CO_2 čiji se udio u industrijskom mjerilu uglavnom kreće od 1 do 5%, a u laboratorijskom mjerilu od 5 do 15%. U nekim uvjetima primjenjuje se čak i čisti CO_2 ovisno o mikroalgi koja se uzgaja. Kisik kao jedan od produkata fotosinteze ima izrazito negativne posljedice na kulturu mikroalgi. Visoke koncentracije otopljenog kisika toksične su za stanice mikrolgi što u kombinaciji s osvjetljenjem visokog intenziteta može dovesti do oštećenja citoplazmatske membrane i drugih staničnih komponenata i time dovesti do smrti stanice. Dva su načina kako se uklanja višak otopljenog kisika: (1) povećanje turbulencije intenzivnim miješanjem čime se poboljšava prijenos mase između tekuće i plinske faze; te (2) istiskivanje O_2 zrakom (Suh i Lee, 2003).

2.6.3. Izdvajanje biomase mikroalgi

Mikroalge rastu u tekućim hranjivim podlogama te ih je za njihovu upotrebu potrebno izdvojiti iz hranjive podloge. Zbog relativno male veličine i koncentracije stanica mikroalgi u proizvodnji biodizela, izdvajanje mikroalgi čini čak 20-30 % ukupnih troškova proizvodnje. Standardne metode izdvajanja biomase su: flitriranje, ultrafiltracija, centrifugiranje, flokulacija (kemijska ili elektro) i taloženje. Metoda koja će se upotrebljavati ovisi o samoj kvaliteti i cijeni konačnog proizvoda, a trebalo bi uzeti u obzir slijedeće kriterije: (1) karakteristike mikoralgalne vrste i tip željenog proizvoda (ekstracelularni ili intracelularni); (2) nedostatke pojedinačnih tehnika prevladati kombiniranjem različitih tehnologija i time poboljšati izdvajanje; (3) osigurati potpuno izdvajanje stanica iz razrijeđene suspenzije i efikasnu reciklaciju iskorištene hranjive podloge i nutrijenata kako bi se smanjili troškovi cijelog procesa; (4) smanjiti utjecaj na proces koji slijedi nakon izdvajanja (npr. utjecaj na ekstrakciju lipida i njihovu konverziju u biodizel); (5) primijeniti napredne tehnike za izdvajanje biomase morskih mikroalgi. Tako se za proizvode male vrijednosti (engl. bulk chemicals) upotrebljavaju jeftinije metode kao što su gravitacijsko taloženje i flokulacija, a za proizvode visoke vrijednosti (engl. fine chemicals) kontinuirano centrifugiranje. Metoda izdvajanja također se odabire i prema tome koliko vlage smije sadržavati biomasa mikroalgi budući da je sušenje skuplje nego mehaničko odvodnjavanje (Rizwan i sur., 2018). Ključni

čimbenik koji koči proizvodnju visokovrijednih proizvoda iz biomase mikroalge upravo je izdvajanje biomase. Za sada je proizvodnja biomase mikroalgi u velikom mjerilu ekonomski isplativa samo u proizvodnji visoko vrijednih proizvoda za farmaceutske potrebe. Tradicionalne metode izdvajanja imaju mnogo nedostataka tako da se razvijaju alternativne metode izdvajanja biomase kao što je bioflokulacija. Među najbržim i najučinkovitijim metodama izdvajanja je centrifugiranje. Centrifugiranje se temelji na različitoj gustoći između stanica algi i hranjive podloge uz upotrebu centrifugalne sile. Prednosti ovog načina izdvajanja je nekorištenje dodatnih kemikalija, brzina postupka kao i učinkovitost izdvajanja od preko 95 % stanica mikroalge (Alam i sur., 2020; Zhou i sur., 2013). Nedostaci ove metode su što zahtijeva visoki utrošak energije pa nije moguća njegova primjena za proizvode male tržišne vrijednosti, visoki kapitalni troškovi i smične sile koje mogu oštetiti staničnu strukturu (Surendhiran i Vijay, 2014). Filtracija je metoda izdvajanja stanica uz upotrebu polupropusnih membrana različitih veličina pora. Membrane s porama manjih veličina daje veću efikasnost izdvajanja stanica (do 100 %), ali zbog brzog nakupljanja biomase dolazi do smanjenja brzine filtracije zbog čega je potrebno često čišćenje membrane što produljuje vrijeme potrebno za izdvajanje biomase kao i povećanje troškova održavanja (Liber i sur., 2020). Kao metoda izdvajanja biomase, primjenjuje se i flokulacija. Među mnogim metodama, flokulacija se smatra najučinkovitijom i kao prikladan postupak za obradu velikih količina kultura mikroalgi. Najčešće se koristi zajedno s drugim metodama kao što su filtracija, flotacija ili gravitacijsko taloženje kako bi se poboljšala učinkovitost. Kao flokulanti koriste se razne anorganske ili organske tvari koje sadrže polivalentne metalne ione (željezov sulfat, željezov klorid, aluminijev sulfat i aluminijev klorid) (Luo i sur., 2019a). Flokulanti moraju biti jeftini, netoksični i učinkoviti pri niskim koncentracijama. Tijekom flokulacije, raspršene stanice mikroalge tvore flokule s flokulantom te se zatim uslijed gravitacije talože. Upotrebom kemijskih sredstava dolazi do onečišćenja biomase ionima metala pa su tako uvedene nove metode: flokulacija s biorazgradivim flokulantima kao što je hitozan ili bioflokulacija pomoću drugih mikroorganizama. Biorazgradivi flokulanti su skuplji u usporedbi sa anorganskim flokulantima koji su nerazgradivi i štetni za ekosustav (Luo i sur., 2019a). Bioflokulacijska sredstva imaju prednost nad kemijskim flokulantima zbog svoje biorazgradive prirode, visoke učinkovitosti, ne toksičnosti, ekološke prihvatljivosti, širokog raspona primjene i nižih doza potrebnih za flokulaciju. Bioflokulanti su sastavljeni od polisaharida koje izlučuju mikroorganizmi kao bakterije, kvasci i gljive (Surendhiran i Vijay,

2014) . Prednosti i nedostatci različitih metoda izdvajanja biomase mikroalgi dani su u tablici 4.

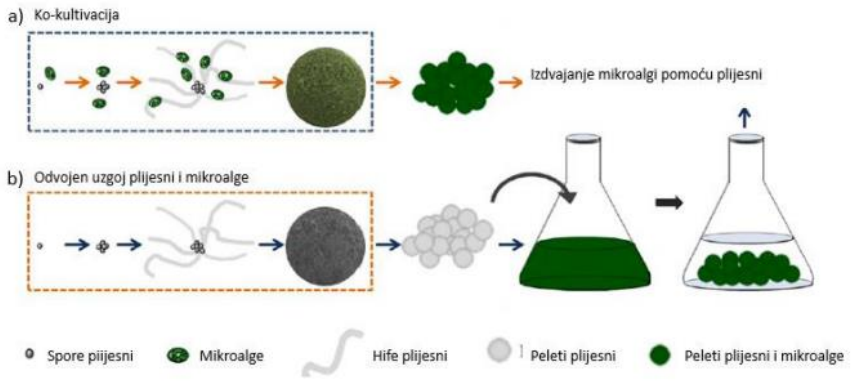
Tablica 4. Usporedba različitih procesa za izdvajanje biomase mikroalgi (preuzeto od Milledge i Heaven, 2013))

Proces	**Prednosti**	**Nedostaci**	**suha tvar (%)**
Centrifugiranje	pogodno za sve mikroalgalne vrste, brzo i efikasno izdvajanje biomase	visoki kapitalni i operativni troškovi	10-22
Filtracija	dostupnost široke palete različitih filtracijskih sredstava i membrana	visoka ovisnost o mikroalgalnoj vrsti, najpogodnija za velike stanice, problem začepljenja i nastajanja kolača na površini	2-27
Ultrafiltracija	pogodna za osjetljive stanice	visoki kapitalni i operativni troškovi	1.5-4
Sedimentacija	niski troškovi, mogućnost korištenja kao prvog koraka izdvajanja radi smanjenja utroška energije i troškova naknadnih koraka izdvajanja	ovisi o vrsti mikroalge, najpogodnija za velike i nepokretne stanice, spora separacija, mali udio suhe tvari u izdvojenoj biomasi	0.5-3
Kemijska flokulacija	široka paleta dostupnih flokulanata, raznolikost cijena	uklanjanje flokulanata, onečišćenje biomase sredstvom za flokulaciju	3-8
Flotacija	u nekim slučajevima brža od sedimentacije, moguća kombinacija s prijenosom plinova	specifična za mikroalgalnu vrstu, visoki kapitalni i operativni troškovi	7

2.6.3.1. Bioflokulacija

Bioflokulacija je inovativna i ekonomična metoda izdvajanja mikroalgi. Usporedbom s uobičajenim metodama izdvajanja biomase mikroalgi, bioflokulacija je ekološki prihvatljiva, jeftina te održiva metoda izdvajanja biomase. Postoje tri vrste bioflokulacije, a to su autoflokulacija, flokulacija s bioflokulantima te mikrobna bioflokulacija (Alam i sur., 2020). Autoflokulacija je proces međusobne adhezije i agregacije stanica mikroalgi u tekućoj podlozi uslijed promjene svojstava stanične površine izazvane promjenom uvjeta, npr. pH vrijednost, koncentracija nutrijenata, koncentracija otopljenog kisika, koncentracija kalcija i magnezija ili starenja kulture (Liber i sur., 2020). Međutim, sponatan autoflokulacija bez dodatka flokulacijskog sredstva javlja se kod malog broja algi. Neke od mikroalgi koje imaju sposobnost autoflokulacije su: *Ankistrodesmus falcatus, Tetraselmis suecica, Scenedesmus obliquus, Ettlia texensis, Skeletonema marinoi, Chlorella vulgaris i Chlorococcum* sp.. Nažalost, ti sojevi imaju manju brzinu rasta i akumuliraju manju količinu lipida pa nisu adekvatni za proizvodnju biodizela (Malik i sur., 2020). U alkalnim uvjetima iznad pH 9, promjene površinskog naboja stanica algi uglavnom se pripisuju značajnom lučenju izvanstaničnih polimera, a u kiselim uvjetima dolazi do fluktuirajuće disocijacije karboksilnih i amino skupina u staničnoj stijenci algi koje uzrokuju promjene površinskog naboja. Starenjem kulture algi izlučuju se izvanstanične organske tvari koje imaju ulogu u promjeni površinskog naboja stanica i njegovoj neutralizaciji što dovodi do autoflokulacije (Matter i sur., 2019). Ovakva metoda ne zahtijeva dodatna ulaganja u flokulante stoga je održiva i jeftina alternativna metoda izdvajanja stanica. No, ova metoda primjenjiva je samo kod određenih sojeva te pri određenim uvjetima. Mikrobna bioflokulacija uključuje korištenje mikroroganizama kao što su bakterije ili plijesni za flokuliranje biomase mikroalgi. Bioflokulacija se može provesti kao kokultivacija, odnosno zajednički uzgoj plijesni i mikroalge ili upotrebom prethodno uzgojenih peleta plijesni (slika 9 i slika 10). U procesu kokultivacije iskorištava se svojstvo filamentoznih plijesni da stvaraju hife koje povezuju mikroalge i tvore veće nakupine. Kod ovakvog postupka problem predstavlja različito trajanje uzgoja plijesni i mikroalgi te potreba za različitim hranjivim podlogama. Sposobnost filamentoznih plijesni za povezivanje stanica mikroalge ovisi o njihovoj morfologiji koja se

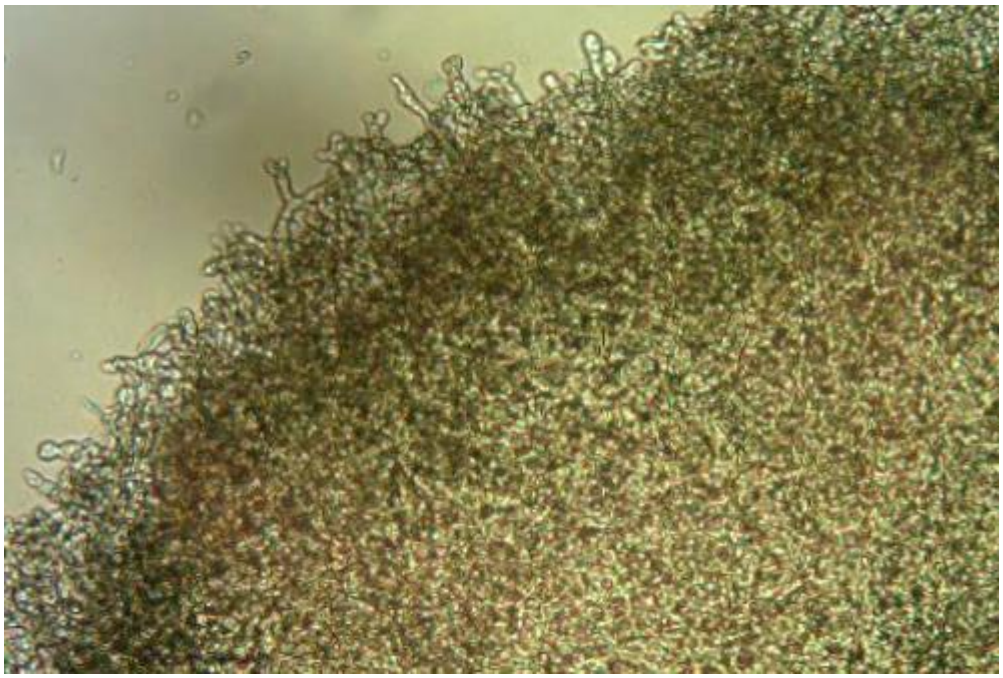
razlikuje ovisno o soju, reologiji hranjive podloge, pH vrijednosti pa i brzini smicanja medija (Luo i sur., 2019b).



Slika 9. Primjeri bioflokulacije s plijesnima: a) kokultivacija; b) odvojen uzgoj plijesni i mikroalge (preuzeto i prilagođeno od Pei i sur., 2021)

Sam mehanizam bioflokulacije nije još do kraja proučen te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se optimirao proces bioflokulacija i ostvarilo što bolje povezivanje bioflokulanta sa stanicama mikroalge. Jedan od predloženih mehanizama je neutralizacija naboja. Negativni naboj na površini algi posljedica je prisutnosti aminskih ($–NH_4$), karboksilnih (–COOH) i fosfatnih skupina ($–PO_4$), a pozitivni naboj na površini plijesni zbog prisutnosti alifatskih amina i drugih aromatskih aminskih skupina (Lal i sur., 2021). Rezultati elektronske mikroskopije sugeriraju kako su intaktne hife potrebne za povezivanje stanica mikroalge na pelete plijesni (Liber i sur., 2020). Van der Waalsove sile i elektrostatska odbijanja imaju važnu ulogu u povezivanju stanica. Zeta potencijal mjera je električnog potencijala u posmičnoj ravnini električnog dvostrukog sloja, koji daje mjeru prividnog površinskog naboja. Smanjenje zeta potencijala rezultira smanjenjem odbojnih elektrostatičkih sila. Kod kritičnog zeta potencijala, Van der Waalsove sile su jače nego elektrostatičke što dovodi do povezivanja stanica (Nazari i sur., 2020). Kako bi pobliže istražili funkcionalne skupine na hifama plijesni, u radu Pei i suradnika (2021), analiziran je sepktar fluorescencije uzorka izvanstanične polimerne tvari (Pei i sur., 2021). Dobiveni pikovi na različitim valnim duljinama ukazuju na prisustvo tirozina i triptofana čije su izoeletrične točke pri pH 5.66 odnosno 5.89. Upravo tirozin i triptofan u izvanstaničnom polimeru

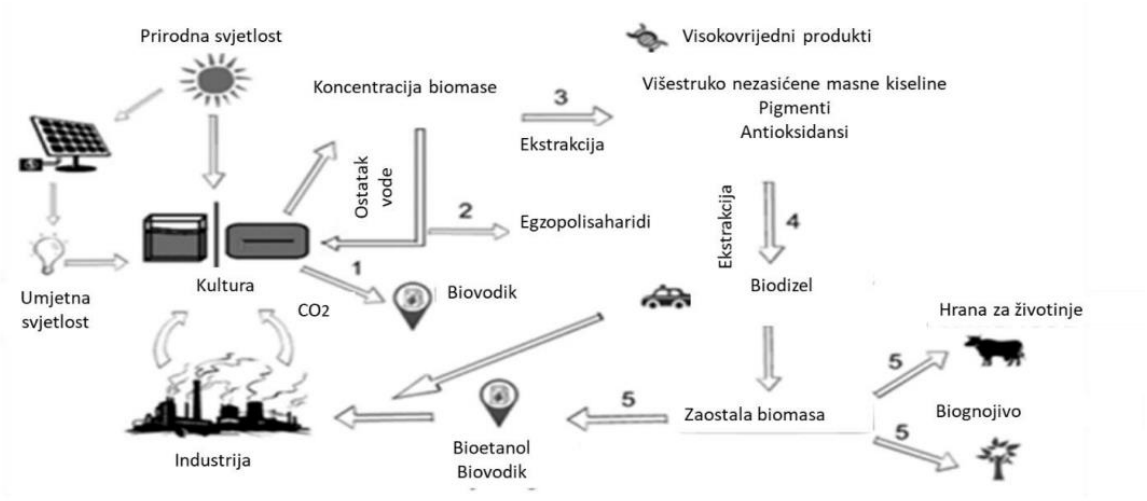
potencijalni su glavni čimbenici koji utječu na povezivanje hifa plijesni sa stanicama mikroalge (Pei i sur., 2021).



Slika 10. Peleti plijesni nakon provedene bioflokulacije (vlastita fotografija)

2.7. Biotehnološka primjena mikroalgi

Upotreba mikroalgi seže u daleku prošlost kada su se ljudi u prehrani koristili mikroalgom *Nostoc*, a komercijalna primjena mikroalgi započela je 1970-tih godina proizvodnjom β-karotena pomoću mikroalge *Dunaliela salina* (Spolaore i sur., 2006). Zbog velikog udjela proteina i minerala koriste se u ljudskoj prehrani te proizvodnji krmiva. Proteini mikroalgi sadrže esencijalne amino kiseline, ali mikroalge su i izvor vitamina, minerala, pigmenta, nukleinskih kiselina, ugljikohidrata i lipida (slika 11). Iz tog razloga potencijalna primjena mikroalgi proteže se od kozmetičke i farmaceutske industrije, prehrambene industrije, do primjene u terapeutske svrhe i proizvodnje zelenih izvora energije odnosno bioplina, biodizela, biovodika i bioetanola.



Slika 11. Biorafinerijski koncept uzgoja mikroalge (preuzeto i prilagođeno od: Giraldo-Calderón i sur., 2018)

2.7.1. Mikroalge u ljudskoj i životinjskoj prehrani

Proteini imaju važnu ulogu u strukturi kao sastavni dio membrane i sustava za apsorpciju svjetlosti te u metabolizmu stanica mikroalgi kao enzimi u metaboličkim putevima uključujući i fotosintezu (Barkia i sur., 2019). Sadržaj i kvaliteta proteina u mikroalgama slična je onima u većini prehrambenih proizvoda kao što su povrće, mlijeko ili soja. Meso govedine sadrži oko 17 % proteina, soja oko 36 % proteina u suhoj tvari biomase, a mikroalge, posebice *Chlorella* sp. i *Spirulina* sp. koje se najčešće koriste u prehrambene svrhe, sadrže i do 70 % proteina u suhoj tvari biomase. Prednost dobivanja proteina iz mikroalgi je što uzgoj zahtjeva malu površinu, u usporedbi s površinom potrebnom za uzgoj životinja te obradivim tlom potrebnim za uzgoj biljaka. Za uzgoj mikroalgi mogu se koristiti neobradive površine nepogodne za uzgoj poljoprivrednih kultura uz manji utrošak vode. Mikroalge imaju sposobnost sinteze svih aminokiselina pa time predstavljaju izvor esencijalnih aminokiselina potrebnih u prehrani ljudi i životinja. No, iako sadrže sve esencijalne aminokiseline te visok udio proteina u biomasi, biorazgradivost ovakvih proteina niža je od onih iz hrane. Celuloza, koja se nalazi u staničnoj stijenki određenih mikroalgi, za ljude je neprobavljiva, a kako bi se poboljšala bioraspoloživost proteina unutar biomase potrebno je razbiti staničnu stijenku mljevenjem, drobljenjem ili zagrijavanjem biomase.

Mikroalga *Spirulina* ne posjeduje celulozu u staničnoj stijenki tako da ima dobru probavljivost (Alam i sur., 2020). Do sada najveću komercijalnu primjenu ima proizvodnja lipida iz biomase mikroalgi. Prosječni udio lipida u biomasi varira između 1 i 70%, ali može dosegnuti i do 90% suhe tvari biomase prilikom uzgoja u specifičnim uvjetima. Osim što se mogu koristiti za potencijalnu proizvodnju biodizela, mikroalge su i dobar izvor višestruko nezasićenih masnih kiselina tj. omega masnih kiselina koje ljudski organizam ne može sintetizirati nego ih je potrebno unijeti prehranom, pa stoga imaju veću komercijalnu vrijednost. Višestruko nezasićene masne kiseline od ključne su važnosti za očuvanje zdravlja ljudi poput prevencije srčanih bolesti, razvoja mozga i usporavanje starenja. Omega-3 masne kiseline sastoje se od α-linolenske kiseline (18:3, n-3), eikosapentaenoične kiseline (20:5, n-3) i dokozaheksanske kiselina (22:6, n-3), a omega-6 masne kiseline uključuju linolnu kiselinu (18:2, n-6), ɣ-linolensku (18:3, n-6) i arahidonsku kiselinu (20:4 n-6) (Alam i sur., 2020). U stanicama mikroalgi, nezasićene masne kiseline grade membrane, a zasićene masne kiseline služe kao rezerva energije (Alam i sur., 2020; Barkia i sur., 2019). Najčešće prisutne masne kiseline u lipidima mikroalgi su C16 i C18 zasićene i nezasićene masne kiseline. Mikroalge također predstavljaju i izvor brojnih vitamina i minerala od kojih su najznačajniji vitamini A, C, B1, B2, B6, niacin, jod, željezo, kalij, magnezij i kalcij (Priyadarshani i Rath, 2012). Zelene mikroalge *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina* i *Spirulina maxima* neke su od biotehnološki najinteresantnijih mikroalgi. *Chlorella* predstavlja izvor β-1,3-glukana, koji djeluje kao imunostimulator, hvata slobodne radikale i reducira lipide u krvi. Neke mikroalge kao primjerice *Picochlorum* sp. mogu nakupiti i do 59 % lipida u suhoj tvari biomase u stresnim uvjetima (Dahmen i sur., 2014; Zhu i Dunford, 2013). Osim toga predstavljaju i izvor pigmenata kao što su: klorofil a, klorofil b, lutein, astaksantin, β-karoten, kantaksantin, violaksantin, neoksantin, zeaksantin i anteraksantin (Cano i sur., 2021). Biomasa mikroalgi koristi se kao dodatak prehrani u obliku tableta, kapsula, tekućina te se koristi kao dodatak tjesteninama, grickalicama i pićima za poboljšanje nutritivnog sastavaa hrane ili kao prirodna boja (Priyadarshani i Rath, 2012). Osim u ljudskoj prehrani, mikroalge se mogu koristiti kao hrana za životinje kao što su ribe, kućni ljubimci i stočne životinje. Trenutno je 30% svjetske proizvodnje mikroalgi namijenjeno upravo za proizvodnju stočne hrane i hrane za životinje. Intenzivno se primjenjuju u akvakulturi kao hrana za larve, rakove i ribe, a najčešće su u te svrhe koriste *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* i *Thalassiosira*.

2.7.2. Mikroalgalni pigmenti

Sintetičke boje korištene u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji i industriji nutraceutika, često su okarakterizirane kao štetnima za ljudsko zdravlje što povećava interes za pronalaskom zamjenskih prirodnih boja. Prirodne boje mogu se dobiti iz biljaka, voća i povrća. No, budući da su mikroalge bogate pigmentima kao što je klorofil, lutein, astaksantin i β-karoten kao alternativna opcija sintetičkim prehrambenim bojama nametnula se i eksploatacija mikroalgalnih pigmenata (Spolaore i sur., 2006). Glavna uloga pigmenata u mikroalgama je apsorpcija svjetla koja je nužna za fotosintezu. Klorofil koji je jedan od vrijednih bioaktivnih pigmenata koji se može ekstrahirati iz biomase mikroalgi, može se primijeniti kao aditiv u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima. Postoje dva glavna klorofila: klorofil a i klorofil b, a do sada su istraženi i klorofil c, d i f (da Silva Ferreira i Sant'Anna, 2017). Klorofil a zeleni je pigment koji je najzastupljeniji u pigmentima biljkama i mikroalgi te je odgovoran za apsorpciju energije svjetlosti i njezino pretvaranje u kemijsku energiju fotosintezom. Klorofil b drugi je klorofil po zastupljenosti. Klorofil c nalazi se u dinoflagelatima, haptofitima, heterokontima i kriptofitima, dok se klorofil d može se naći u crvenim algama, a klorofil f u nekim cijanobakterijama (Alam i sur., 2020). Molekula klorofila građena je od četiri prstena pirola, a u središtu molekule nalazi se atom magnezija. Svaki pirolni prsten sadrži četiri atoma ugljika i jedan atom dušika. Razlika u strukturi klorofila a i b je u zamjeni metilne skupine klorofila a s formilnom skupinom kod klorofila b (Halim i sur., 2010). Kako bi se povećao udjel klorofila u biomasi mikroalge utječe se na dostupnost hranjivih tvari, temperaturu, miješanje kulture i intenzitet svijetlosti. Mikroalga *Picochlorum celeri* sadrži oko 13 % pigmenata u suhoj tvari biomase, a od toga 85 % čine klorofili. Također sadrži veći udio luteina nego β-karotena, tako da lutein predstavlja oko 55 % svih karotenoida (Cano i sur., 2021). Klorofil a intenzivno se istraživao za primjenu kao bojilo zbog njegove visoke stabilnosti. Osim toga derivati klorofila mogu imati brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što su protuupalno i antikancerogeno djelovanje, te pozitivno djeluju na zacjeljivanje rana zbog čega se primjenjuju u medicinske svrhe. Klorofil se često koristi i u proizvodima za osobnu higijenu kao što su dezodoransi, pastile i sredstva protiv lošeg zadaha.

Od 400 poznatih karotenoida, samo nekoliko ih se nekoliko komercijalno i proizvodi. Od njih se ističu astaksantin i β-karoten, a uz njih manje su zastupljeni i lutein, zeaksantin, likopen i biksin (Chini Zittelli i sur., 2006). *Haematococcus pluvialis* i *Dunaliella salina* su za sada primarni izvor pigmenata astaksantina i β-karotena na tržištu (Giraldo-Calderón i su., 2018). Karotenoidi se primjenjuju kao bojila za hranu (bademi, piletina, jaja, žutanjci, maslac), ali i kao suplementi u hrani za životinje i ljude. Prirodni β-karoten sadrži oba izomera u njihovom prirodnom omjeru dok sintetički, iako je jeftiniji sadrži samo trans izomer. β-karoten se u ljudskom organizmu prevodi u vitamin A koji ima blagotvorno djelovanje na ljudski imunitet, pomaže u borbi protiv bolesti oka, kožnih bolesti, znakova starenja te čak i raka. Drugi komercijalizirani karotenoid iz mikroalgi je astaksantin koji sintetizira malen broj mikroalgalnih vrsta, te se trenutno proizvodi pomoću mikroalge *Haematococcus pluvialis* koja može nakupiti i do 3% astaksantina u suhoj tvari biomase. Osim u akvakulturi gdje djeluje blagotvorno na imunitet riba i kozica te potpomaže njihov rast, astaksantin se koristi i kao nutraceutik i antioksidans. Zbog svog snažnog antioksidativnog djelovanja koristi se kod tretiranja degeneracije mišića, Alzheimer-ove i Parkinson-ove bolesti (Dufossé i sur., 2005). U akvakulturi koristi se u proizvodnji lososa budući da doprinosi njegovoj lijepo ružičastoj boji čineći losos primamljiviji korisnicima. Od ostalih karotenoida, lutein, zeaksanttin i kantaksantin koriste se kod proizvodnje piletine za obojenje kože te u farmaceutske svrhe. Budući da imaju ulogu u zaštiti zdravlja oka, lutein i zeaksantin su bitni kao nutraceutici. Od mikroalgalnih pigmenata još se primjenjuju i fikobiliproteini, vodo-topljivi pigmenti koji se primjenjuju kao bojila u hrani i kozmetici gdje osim boje pružaju i antioksidativno djelovanje. Primjenjuju se i u foto-dinamičkoj terapiji raka, kao funkcionalna hrana te kao fluorescentna boja u imunologiji i protočnoj citometriji. Fikocijanin ne može biti proizveden sintetskim putem, a proizvoditi ga može jedino mikroalga *Spirulina platensis* koja sadrži čak više od 15% fikocijanina u suhoj tvari biomase. Fikocijanin kao pigment također pokazuje antioksidativno i protu-upalno djelovanje te ima neuroprotektivna i hepatoprotektivna svojstva zbog čega se koristi i u farmakologiji. *Porphyridium* vrste koriste se kao izvor fluorescentne ružičaste boje i kao izvor glavnih fikobiliproteina- B-fikoeritrina i R-fikoeritrina. Fikoeritrini se koriste kao bojila u proizvodnji slatkiša, želiranih deserata, fermentiranih mliječnih proizvoda, sladoleda, fermentiranih mliječnih proizvoda, dekoracija za kolače i kozmetike. Primjenjuju se i u kliničkoj i istraživačkoj imunologiji (Milledge, 2011b).

2.7.3. Višestruko nezasićene masne kiseline

Životinjskom i ljudskom metabolizmu nedostaju enzimi potrebni za sintezu nezasićenih masnih kiselina koje sadrže više od 18 ugljikovih atoma. Iz tog razloga te masne kiseline potrebno je unijeti putem hrane. Iz tog razloga one se nazivaju esencijalnim masnim kiselinama. Na tržištu su poznate kao omega-3 i omega-6 masne kiseline, a među najznačajnijim ističu se eikosapentaenoična, dokosaheksaenoična, gama-linoleinska i arahidonska kiselina (Koller i sur., 2014; Neofotis i sur., 2016). Glavni i trenutno najjeftiniji izvor ovih masnih kiselina je riba, kao i riblja ulja koja se često povezuju s neugodnim okusom, ribljim mirisom, nedovoljnom oksidativnom stabilnošću i potencijalnom prisutnošću toksina i žive. Alfa-linolna kiselina (ALA) je omega-3 višestruko nezasićena masna kiselina koja se može pronaći i u ulju biljnoga podrijetla kao što je primjerice laneno i repičino, a koja se u organizmu može konvertirati u eikosapentenoičnu i dokosaheksaenoičnu kiselinu. No, ta konverzija je nedovoljna kako bi se zadovoljile potrebe organizma i održalo dobro neuralno i kardiovaskularno zdravlje. Eikosapentaenoična kiselina prevenira razvoj koronarnih i srčanih bolesti i snižava kolesterol u krvi, dok dokosaheksaenoična kiselina ima važnu ulogu u razvoju centralnog živčanog sustava dojenčadi. Stoga je implementacija ovih masnih kiselina u hranu za dohranu dojenčadi i djece još 1994. godine preporučena od strane Svjetske zdravstvene organizacije. Neke od mikroalgi koje se ističu svojom proizvodnjom eikosapentanoične kiseline su *Nannochloropsis* sp. i *Paheodactylum tricornutum* i sur., 2014). Dijatomeje mogu nakupiti i od 15 do 30% eikosapentaenoične kiseline u ukupnim masnim kiselinama, a ističu se slatkovodna *Navicula pelliculosa* te morski sojevi *Nitzschia frustulum, Navicula incerta* i *Biddulphia sinensis*. Dokosapentaenoična kiselina jedina je komercijalizirana višestruko nezasićena masna kiselina koja se komercijalno proizvodi pomoću mikroalgi (*Crypthecodinium cohnii, Pavlova lutheri* i *Schizochytriums limacinum)* i dinoflagelata (*Cryptohecodinium cohni, Amphidinium carteri, Gymnodinium simplex* i *Gyrodinium cohnii*). Od nezasićenih masnih kiselina od velike važnosti su i arahidonska i gama-linolenska kiselina. Arahidonska kiselina ima protuupalno djelovanje i blagotvorno djelovanje na krvni sustav stoga se koristi kao dodatak prehrani, a gama-linolenska kiselina u ljudskom organizmu služi kao prekursor sinteze prostaglandina, a može se primjenjivati i u terapeutske svrhe uslijed njenog protuupalnog djelovanja i pozitivnog efekta na imunitet.

Jedan od potencijalnih izvora arahidnoske kiseline su mikroalge iz roda *Porphyridium*, dok se gama-linolenska kiselina uglavnom dobiva iz cijanobakterije *Arthrospira*.

2.7.4. Mikroalge kao sirovina za proizvodnju biogoriva

Nekoliko je tipova biogoriva koja se mogu proizvesti primjenjujući mikroalge. Metan se dobiva anaerobnom razgradnjom algalne biomase, biodizel se proizvodi iz mikroalgalnih lipida, biovodik se proizvodi fotobiološki, a mikroalgalna biomasa može se koristiti i kao obnovljiva sirovina za proizvodnju bioetanola (Bušić i sur., 2018; Chisti, 2007; Sharmin i sur., 2016). Direktnim spaljivanjem algalne biomase može se također proizvoditi para i/ ili električna energija. Raznolike su prednosti primjene mikroalgi u proizvodnji biogoriva. U usporedbi s drugim sirovinama, mikroalgalna proizvodnja ne zahtjeva veliku površinu, obradivu zemlju te ne predstavlja konkurenciju proizvodnji hrane. Procijenjeno je kako mikroalge imaju potencijal proizvodnje od dva do deset puta veće količine biomase po jedinici površine od kopnenih biljaka veće fotosintetske učinkovitosti. Nadalje, za uzgoj algi potrebna je manja količina vode, te se za uzgoj mikroalgi može primjenjivati nepitka voda kao što je slana, bočata ili pak otpadna voda. Mikroalge podnose visoke koncentracije CO_2 tako da mogu koristiti ugljikov dioksid iz elektrana koje rade na fosilna goriva. Korištenjem ugljikovog dioksida iz otpadnih plinova smanjuje se emisija stakleničkih plinova iz elektrana. Dodatna prednost je što mikroalge uz proizvodnju netoksičnih i biorazgradivih goriva ujedno proizvode i dodatne visoko vrijedne proizvode kao što su višestruko nezasićene masne kiseline, pigmenti i antioksidansi što sve povećava isplativost takve proizvodnje.

Bioetanol se iz mikroalgalne biomase može proizvesti na nekoliko načina, a za te potrebe posebno su zanimljive vrste koje imaju visoki udio ugljikohidrata u stanicama. Mikroalge nakupljaju ugljikohidrate prvenstveno u formi škroba i celuloze koji moraju biti hidrolizirani u fermentabilne šećere kroz kemijsku (kiselinama ili lužinama) ili enzimatsku hidrolizu i tada mogu biti konvertirani u etanol primjenom odgovarajućeg mikroorganizma što poskupljuje cijeli proces proizvodnje. Primjenom genetičkog inženjerstva, mikroalge bi se mogle modificirati na način da sve potrebne enzime proizvode sami što bi smanjilo cjelokupne troškove. Nakon fermentacije, etanol se pročišćava destilacijom čime se uklanja voda i ostale nečistoće, a dobiveni tekući etanol se potom može miješati sa ostalim tekućim

gorivima (Demirbas, 2009; John i sur., 2011). Prednost kod primjene mikroalgi je u tome što ne sadrže biopolimere kao što su hemiceluloza i lignin kao primjerice više biljke, što pojednostavljuje cijeli proces eliminirajući potrebu za kemijsku i enzimsku predobradu. Mikroalge se mogu uzgajati kroz cijelu godinu, a ne jednom ili dva puta godišnje kao većina poljoprivrednih kultura (Giraldo-Calderón i sur., 2018). Dobri kandidati za proizvodnju bioetanola su mikroalge koje mogu nakupiti čak više od 50% ugljikohidrata u formi glikogena i škroba u suhoj tvari biomase kao što su: *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmum* i *Spirulina* (Ho i sur., 2013; John i sur., 2011). Neke mikroalge imaju sposobnost takozvane fermentacije u tami gdje se u anaerobnim uvjetima bez prisustva svjetlosti polisaharide u stanici razgrađuju do etanola. U tu skupinu pripadaju mikroalge iz razreda Chlorophyceae (*Chlamydomonas*, *Chlorella*), Prasinophyceae, Cryptophyceae i Cyanophyceae (*Spirulina*, *Oscillatoria*, *Microcystis*).

Budući da mikroalge mogu nakupiti značajne količine lipida u svojoj biomasi, proizvodnja biogoriva iz mikroalgi često je usmjerena u proizvodnju biodizela. Primjerice, mikroalga *Botryococcis braunii* može nakupiti i do 80% lipida u biomasi, te budući da lipidi iz ove mikroalge nisu u formi triacilglicerida, nego dizel nalik ugljikovodika, izrazito su interesantni za proizvodnju biodizela. Takvi lipidi ne moraju biti transesterificirani, nego mogu biti direktno implementirani nakon procesa hidrokrakiranja (engl. hydrocracking) (Hillen i sur., 1982). Iako se mikroalge mogu koristiti za proizvodnju biodizela, on se i dalje najčešće proizvodi iz biljnih i životinjskih ulja budući da je takva proizvodnja i dalje jeftinija. No, površina potrebna za uzgoj dostatne količine žitarica za proizvodnju biodizela koja bi zadovoljila današnje potrebe je neodrživa. Neka istraživanja pokazuju kako bi proizvodnja biodizela iz mikroalgi mogla biti od 10 do 20 puta veća u odnosu na proizvodnju uz žitarica i biljnih ulja. Nadalje, konverzija ulja iz mikroalgi u biodizel je mnogo manje energetski zahtjevan proces od procesa proizvodnje drugih goriva pa je time kod ovoga procesa postignuta najbolja bilanca energije. Učinkovitost procesa uvelike ovisi o odabiru vrste mikroalge, te o uvjetima kultivacije budući da se različitim okolišnim uvjetima može utjecati na metabolizam mikroalgi i usmjeriti ga u nakupljanje lipida. Jedna od najčešće korištenih metoda u te svrhe je limitacija rasta izvorom dušika (N), kada stanice nakupljaju rezervne zalihe energije u formi lipida i/ ili ugljikohidrata. Najskuplji korak u procesu proizvodnje biodizela je izdvajanje mikroalgalne biomase koji može činiti i od 20 do 30% ukupnih

troškova. Troškovi proizvodnje biodizela iz mikroalgi morali bi biti drastično smanjeni da bi mogli konkurirati proizvodnji iz uobičajenih sirovina (Chisti, 2007). Ovakvi bioprocesi najisplativiji su kada se iskombiniraju sa sekvestracijom CO_2 emitiranog iz fosilnih goriva, procesima obrade otpadnih voda, te ekstrakcijom ko-produkata visoke tržišne vrijednosti kao što su pigmenti, nezasićene masne kiseline i glicerol koji se može transformirati u različite proizvode visoke vrijednosti za farmaceutsku, kozmetičku industriju i industriju sapuna (Veillette i sur., 2012).

Anaerobnom razgradnjom organskog materijala kao što je algalna biomasa dobiva se bioplin. Jedan od načina povećanja profitabilnosti proizvodnje biodizela iz mikroalgi može biti integracijom tog procesa s postojećim postrojenjima za proizvodnju bioplina. Otpadni CO_2 i ostatak potom mogu biti ponovno upotrijebljeni kao nutrijenti za algalnu kultivaciju, a dobivena biomasa može biti prevedena u bioplin anaerobnom razgradnjom kroz već postojeće postrojenje. Proces anaerobne digestije sastoji se od biokemijske degradacije kompleksnog organskog materijala prisutnog u mikroalgalnoj biomasi što rezultira nastajanjem bioplina koji se uglavnom sastoji od metana, ugljikovog dioksida, vodika, dušika i hidrogen sulfata (Bušić i sur., 2018). Prednosti primjene mikroalgi u ovakvom procesu je u tome što nije potrebno sušenje biomase, nego ona može biti direktno podvrgnuta anaerobnoj razgradnji u bioplinskom postrojenju, a preostali materijal nakon proizvodnje bioplina bogat je kalijem, fosfatima i drugim manje zastupljenim mineralnim komponentama koje su sve potrebne za rast mikroalgi. Time se otvara mogućnost njegove primjene u idućem uzgoju ili pak kao gnojivo u poljoprivredi. Osim navedenih biogoriva, uz pomoć mikroalgi moguće je proizvesti i vodik. Važnost vodika kao bez-ugljičnog i CO_2 neutralnog goriva raste svakim danom. Uz pomoć različitih fotosintetičkih mikroorganizama kao što su zelene mikroalge i cijanobakterije, solarna energija može se pretvoriti u kemijsku energiju u formi vodika. Ta manja skupina jednostaničnih mikroalgi i cijanobakterija razvila je sposobnost da apsorbiranu svjetlosnu energiju koriste za cijepanje molekule vode na molekularni kisik i H^+ te e^- koji potom djelovanjem enzima hidrogenaza ili nitrogenaza daju molekulu vodika. Ovaj proces može biti direktan ili indirektan. U indirektnom procesu, solarna energija najprije se konvertira u kemijsku energiju u formi ugljikohidrata koji potom predstavljaju supstrat za proizvodnju H_2. Ovo se odvija i u cijanobakterijama i u mikroalgama, gdje cijanobakterije posjeduju i nitrogenaze i hidrogenaze, a mikroalge samo hidrogenaze. Zbog visoke

osjetljivosti ovih enzima na O_2, fotosintetska proizvodnja H_2 i O_2 moraju biti razdvojeni. U dvofaznom indirektnom bioprocesu, proizvodnja H_2 i O_2 uspješno je razdvojena kroz potrošnju i dodatak sumpora. Voda je oksidirana na O_2 kroz fotosustav II te su H^+ i elektroni su pohranjeni u formi škroba tijekom fotosinteze. Uslijed uvjeta limitacije sumporom, H^+ i e^- su ekstrahirani iz škroba i usmjereni u plastokinone gdje se djelovanjem hidrogenaza u fotosustavu I proizvodi H_2. Prednosti ovakvog načina proizvodnje vodika su u tome što nema emisije stakleničkih plinova nego štoviše dolazi do potrošnje CO_2, a i proces je manje energetski zahtjevan od procesa elektrolize vode. No, tehnološko unaprjeđenje ovoga procesa kao i genetičko unaprjeđenje proizvodnih sojeva je nužno kako bi se povećala ekonomska isplativost proizvodnje vodika pomoću mikroalgi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U izradi ovoga radu korištene su morske i slatkovodne mikroalge iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. U istraživanju su korištene morske mikroalge: *Nitzschia* sp. S5, *Nanofrustulum shiloi* D1, *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3, te cijanobakterija *Euhalothece* sp. C1. A istražene su i slatkovodne mikroalge: *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum* sp. i *Tetradesmus obliquus*.

U istraživanju bioflokulacije korištene su plijesni: *Mortierella isabellina* iz zbrike mikroorganizama i staničnih kultura Deutche Sammlung von Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Njemačka); *Aspergillus niger* i *Aspergillus fumigatus* iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Za pripremu hranjivih podloga za uzgoj mikroorganizama istraženih u ovome doktorskom radu korištene su kemikalije navedene u tablici 5.

Tablica 5. Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Borna kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Bakrov (II) sulfat pentahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Biotin (vitamin B6)	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Njemačka
Cinkov sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Cijanokobalamin (vitamn B12)	≥ 98%	Sigma-Aldrich, Njemačka
Glukoza	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcijev klorid dihidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Kalijev klorid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Dikalijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Monokalijev fosfat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev hidroksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kobaltov (II) klorid heksahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kvaščev ekstrakt	za mikrobiologiju	Liofilchem, Italija
EDTA dinatrijev dihidrat	p.a.	Carlo Erba, Italija
Natrijev nitrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev metasilikat nanohidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev klorid	techn.	Solana, Nin, Hrvatska
Natrijev molibdat dihidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidrogenkarbonat	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Magnezij klorid heksahidrat	p.a.	Merck, Njemačka
Magnezij sulfat heptahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Manganov (II) klorid tetrahidrat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Molibden trioksid	p.a.	Kemika, Hrvatska
Tiamin hidroklorid	≥ 99%	Sigma-Aldrich, Njemačka
Željezov (III) klorid heksahidrat	p.a.	Sigma-Aldrich, Njemačka
DPPH		Sigma-Aldrich, Njemačka
ABTS		Sigma-Aldrich, Njemačka
agar	za mikrobiologiju	Biolife, Italija
fruktoza	p.a	Kemika, Hrvatska
laktoza	p.a	Kemika, Hrvatska
galaktoza	p.a	Difco, SAD
glicerol	p.a	Sigma-Aldrich, Njemačka
octena kiselina	p.a	Alkaloid, Makedonija
ksiloza	p.a	Kemika, Hrvatska
arabinoza	p.a	Kemika, Hrvatska
celobioza	p.a	Sigma- Aldrich, Njemačka
melasa	50% saharoze, teh.	Sladorana, Hrvatska
cijanokobalamin	≥ 98 %	Sigma- Aldrich, Njemačka
biotin	≥ 98 %	Sigma- Aldrich, Njemačka
tiamin hidroklorid	≥ 98 %	Sigma- Aldrich, Njemačka

3.1.3. Ostale kemikalije

U istraživanju korištene su i kemikalije navedene u tablici 6.

Tablica 6. Kemikalije koje su korištene tijekom provedbe istraživanja

Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
Aceton	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	p.a., apsolutni	Gram-Mol, Hrvatska
Folin-Ciocalteau reagrens	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Fosforna kiselina	≥ 85%	Sigma-Aldrich, Švicarska
Heksan	p.a.	Carlo Erba, Italija
Kalcijev karobnat	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kloroform	p.a.	Merck, Njemačka
Klorovodična kiselina	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalij-natrij tartarat	p.a.	Fisher Scientific, UK
Metanol	HPLC	J. T. Baker, SAD
Metil tridekanoat	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Natrijev bikarbonat	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	p.a.	Merck, Njemačka
PDA agar		Difco, USA
Pentadekan	standard	Sigma-Aldrich, Švicarska
Sumporna kiselina	p.a.	Carlo Erba, Italija
Tween 80	p.a.	Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije fosfata		Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije nitrata		Merck, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije silikata		Merck, Njemačka
Ampicillin	p.a.	Carl Roth, Austrija
Trikloroctena kiselina	p.a.	Merck, Njemačka
F.A.M.E. (C4-C24)	Standard	Sigma- Aldrich, Njemačka
Albumin goveđeg seruma	≥ 98%	Santa Cruz Biotech., SAD
Sredstvo protiv pjenjenja	-	Carl Roth, Austrija
pH puferi za kalibraciju	pH 4.01; 7; 9.21	Hamilton, Švicarska

3.2. Hranjive podloge

3.2.1. Hranjive podloge za održavanje kultura morskih mikroalgi i njihovu karakterizaciju

Za održavanje kultura i uzgoj inokuluma korištena je Gillardova obogaćena podloga, tkz. f/2 podloga pogodna za uzgoj morskih mikroorganizama (Robert R, L, 1975). Guillardova podloga pripremljena je u umjetnoj morskoj vodi sastava navedenog u tablici 7. Kao izvor natrijevog klorida korištena je prirodna, ručno brana, ne jodirana ninska sol (ninski cvijet). Umjetna morska voda kao i komponente f/2 podloge navedeni u tablici 7 i 8. (osim otopine vitamina) sterilizirani su autoklaviranjem na 120 °C kroz 20 minuta. Otopina vitamina sterilizirana je filtriranjem kroz sterilne celuloza acetatne (CA) filtere veličine pora 0.2 µm. Podloga je pripremljena dodatkom komponenata f/2 podloge kako je navedeno u tablici 8 u umjetnu morsku vodu. Osim za održavanje kulture ova podloga korištena je i kao kontrolna podloga u svim eksperimentima te kao podloga za uzgoj kod karakterizacije izoliranih morskih mikroalgi.

Tablica 7. Sastav umjetne morske vode (Keller i sur., 1987)

sastojak	koncentracija (g L^{-1})
natrijev klorid	24.55
kalcijev klorid	0.75
magnezijev diklorid heksahidrat	4.07
kalcijev klorid dihidrat	1.47
magnezijev sulfat heptahidrat	6.04
natrijev hydrogen karbonat	0.21

Tablica 8. Guillard-ova f/2 podloga:

(a) Sastav podloge (Robert, 1975)

sastojak	**konc. osnovne otopine [g L^{-1}]**	**volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu [mL L^{-1}]**	**molarna koncentracija u f/2 podlozi [M]**
natrijev nitrat	75	1	8.82×10^{-4}
natrijev dihidrogen fosfat monohidrat	5	1	3.62×10^{-5}
natrijev metasilikat nonhidrat	30	1	1.06×10^{-4}
otopina metala u tragovima	tablica 8 (b)	1	-
otopina vitamina	tablica 8 (c)	0.5	-

(b) Sastav otopine metala u tragovima

sastojak	**konc. osnovne otopine [g L^{-1}]**	**volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu [mL L^{-1}]**	**molarna koncentracija u f/2 podlozi [M]**
željezo III klorid heksahidrat	-	3.15 g	1.17×10^{-5}
dinatrijev EDTA dihidrat	-	4.36 g	1.17×10^{-5}
bakrov sulfat pentahidrat	9.8	1 mL	3.93×10^{-8}
natrijev molbidat dihidrat	6.3	1 mL	2.60×10^{-8}
cinkov sulfat heptahidrat	22.0	1 mL	7.65×10^{-8}
kobalt klorid heksahidrat	10.0	1 mL	4.20×10^{-8}
manganov II klorid tetrahidrat	180.00	1 mL	9.10×10^{-7}

(c) Sastav otopine vitamina

sastojak	**konc. osnovne otopine [g L^{-1}]**	**volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu [mL L^{-1}]**	**molarna koncentracija u f/2 podlozi [M]**
tiamin HCl; (vit. B_1)	-	200 mg	2.96×10^{-7}
biotin; (vit. H)	0.1	10 mL	2.05×10^{-9}
cijanokobalamin; (vit. B_{12})	1.0	1 mL	$\times 10^{-10}$

3.2.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj – f/2 podloga različitih koncentracija

Uz izvornu f/2 podlogu za uzgoj morskih algi, u prvom dijelu istraživanja s ciljem povećanja rasta dijatomeje, korištena je i modificirana f/2 podloga s dvostruko, četverostruko i desetorostruko većom koncentracijom minerala i vitamina (tablica 9).

Tablica 9. Sastav izvorne i modificiranih f/2 podloga za uzgoj dijatomeje soj 5.4.

sastojak	izvorna f/2 (M)	2 x f/2 (M)	4 x f/2 (M)	10 x f/2 (M)
natrijev nitrat	$8{,}82\cdot10^{-4}$	$1{,}76\cdot10^{-3}$	$3{,}53\cdot10^{-3}$	$8{,}82\cdot10^{-3}$
natrijev dihidrogen fosfat monohidrat	$3{,}62\cdot10^{-5}$	$7{,}24\cdot10^{-5}$	$1{,}45\cdot10^{-4}$	$3{,}62\cdot10^{-4}$
natrijev metasilikat nonhidrat	$1{,}06\cdot10^{-4}$	$2{,}12\cdot10^{-4}$	$4{,}24\cdot10^{-4}$	$1{,}06\cdot10^{-3}$
željezo III klorid heksahidrat	$1{,}17\cdot10^{-5}$	$2{,}34\cdot10^{-5}$	$5{,}47\cdot10^{-5}$	$1{,}17\cdot10^{-4}$
dinatrijev EDTA dihidrat	$1{,}17\cdot10^{-5}$	$2{,}34\cdot10^{-5}$	$5{,}47\cdot10^{-5}$	$1{,}17\cdot10^{-4}$
bakrov sulfat pentahidrat	$3{,}93\cdot10^{-8}$	$7{,}86\cdot10^{-8}$	$1{,}57\cdot10^{-7}$	$3{,}93\cdot10^{-7}$
natrijev molbidat dihidrat	$2{,}60\cdot10^{-8}$	$5{,}2\cdot10^{-8}$	$1{,}04\cdot10^{-7}$	$2{,}60\cdot10^{-7}$
cinkov sulfat heptahidrat	$7{,}65\cdot10^{-8}$	$1{,}53\cdot10^{-7}$	$3{,}06\cdot10^{-7}$	$7{,}65\cdot10^{-7}$
kobalt klorid heksahidrat	$4{,}20\cdot10^{-8}$	$8{,}40\cdot10^{-8}$	$1{,}68\cdot10^{-7}$	$4{,}20\cdot10^{-7}$
manganov II klorid tetrahidrat	$9{,}10\cdot10^{-7}$	$1{,}82\cdot10^{-6}$	$3{,}64\cdot10^{-6}$	$9{,}10\cdot10^{-6}$
cijanokobalamin B_{12}	$3{,}69\cdot10^{-10}$	$7{,}37\cdot10^{-10}$	$1{,}47\cdot10^{-8}$	$7{,}37\cdot10^{-9}$
biotin	$2{,}05\cdot10^{-9}$	$6{,}19\cdot10^{-9}$	$1{,}238\cdot10^{-8}$	$6{,}19\cdot10^{-8}$
tiamin HCl	$2{,}96\cdot10^{-7}$	$3{,}01\cdot10^{-7}$	$6{,}02\cdot10^{-7}$	$3{,}01\cdot10^{-6}$

3.2.3. Hranjiva podloga za prihranu tijekom uzgoja *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru

Kao hranjiva podloga za uzgoj i prihranu korištena je f/2 podloga s četverostruko većom koncentracijom anorganskih soli i vitamina. Prije dodatka prihrane određena je koncentracija izvora dušika te je za njezinu vrijednost umanjena koncentracija dušika u pripremljenoj 4x f/2 podlozi za prihranu. Navedene soli u tablici 10 otopljene su u 200 mL deionizirane vode i potom dodane kulturi uzgajanoj u fotobioreaktoru.

Tablica 10. Sastav hranjivih podloga za prihranu tijekom uzgoja u bioreaktoru

f/2 podloga za prihranu	7. dan uzgoja	11. dan uzgoja
sastojak	**koncentracija (M)**	
natrijev nitrat	$8{,}82 \cdot 10^{-4}$	$3{,}53 \cdot 10^{-3}$
natrijev dihidrogen fosfat monohidrat	$1{,}45 \cdot 10^{-4}$	$1{,}45 \cdot 10^{-4}$
natrijev metasilikat nonhidrat	$4{,}24 \cdot 10^{-4}$	$4{,}24 \cdot 10^{-4}$
željezo III klorid heksahidrat	$5{,}47 \cdot 10^{-5}$	$5{,}47 \cdot 10^{-5}$
dinatrijev EDTA dihidrat	$5{,}47 \cdot 10^{-5}$	$5{,}47 \cdot 10^{-5}$
bakrov sulfat pentahidrat	$1{,}57 \cdot 10^{-7}$	$1{,}57 \cdot 10^{-7}$
natrijev molbidat dihidrat	$1{,}04 \cdot 10^{-7}$	$1{,}04 \cdot 10^{-7}$
cinkov sulfat heptahidrat	$3{,}06 \cdot 10^{-7}$	$3{,}06 \cdot 10^{-7}$
kobalt klorid heksahidrat	$1{,}68 \cdot 10^{-7}$	$1{,}68 \cdot 10^{-7}$
manganov II klorid tetrahidrat	$3{,}64 \cdot 10^{-6}$	$3{,}64 \cdot 10^{-6}$
cijanokobalamin B_{12}	$1{,}47 \cdot 10^{-8}$	$1{,}47 \cdot 10^{-8}$
biotin	$1{,}238 \cdot 10^{-8}$	$1{,}238 \cdot 10^{-8}$
tiamin HCl	$6{,}02 \cdot 10^{-7}$	$6{,}02 \cdot 10^{-7}$

3.2.4. Hranjiva podloga za istraživanje utjecaja koncentracije dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Za ispitivanje utjecaja izvora dušika, fosfora i silicija na rast i biokemijski sastav biomase dijjatomeje *Nitzschia* sp. S5 korištena je f/2 podloga s modificiranom koncentracijom ispitivanog nutrijenta. U podlozi je mijenjana koncentracija jednog nutrijenta, dok su koncentracije preostala dva nutrijenta odgovarale koncentraciji u izvornoj f/2 podlozi. Ispitane koncentracije nutrijenata prikazane su u tablici 11. Izvorna f/2 podloga korištena je kao kontrolna podloga.

Istražene su slijedeće koncentracije $NaNO_3$: 0 mM (negativna kontrola), 0.88 mM (kontrolna podloga), 2 mM, 3.5 mM, 6 mM i 8 mM.

Istražene koncentracije $Na_2SiO_3 \times 9\ H_2O$ bile su: 0 mM (negativna kontrola), 0.1 mM (kontrolna podloga), 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM i 2 mM. Za koncentraciju od 0 mM uz staklene Erlenmeyer tikvice korištene su i plastične kako bi se isključio utjecaj otpuštanja silicija koji se otapa iz borosilikatnog stakla.

A istražene su i slijedeće koncentracije $NaH_2PO_4 \times H_2O$: 0 mM (negativna kontrola), 0.036 mM (kontrolna podloga), 0.15 mM i 0.36 mM.

Tablica 11. Sastav f/2 podloge za ispitivanje utjecaja koncentracije makronutrijenata na rast i biokemijski sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

eksperiment	**koncentracija $NaNO_3$ [mM]**	**koncentracija $Na_2SiO_3 \times 9\ H_2O$ [mM]**	**koncentracija $NaH_2PO_4 \times H_2O$ [mM]**
Istraživanje učinka koncentracije izvora dušika	0 0.88 2 3.5 6 8	0.1	0.036
Istraživanje učinka koncentracije izvora silicija	0.88	0 0.1 0.5 1 1.5 2	0.036
Istraživanje učinka koncentracije izvora fosfora	0.88	0.1	0 0.036 0.15 0.36

3.2.5. <u>Hranjiva podloga za istraživanje učinka omjera koncentracija dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5</u>

Za ispitivanje utjecaja različitih omjera koncentracija makronutrijenata f/2 podloga modificirana je na način opisan u tablici 12.

Tablica 12. Sastav f/2 podloge prilikom istraživanja učinka omjera koncentracije dušika, fosfora i silicija

	[mg L^{-1}]/ [mM]							
omjer	**Si**		**N-NO_3**		**PO_4^{3-}**		**Si:N-NO_3:PO_4^{3-}**	
1	11.23	0.5	28.01	2	3.42	0.036	3.28:8.19:1	13.89:55.56:1
2	11.23	0.5	28.01	2	13.68	0.15	1:2.49:1.22	3.33:13.33:1
3	28.09	1	49.02	3.5	13.68	0.15	2.05:3.58:1	6.67:23.33:1
4	28.09	1	84.04	6	13.68	0.15	2.05:6.14:1	6.67:40:1
5	28.09	1	49.02	3.5	20.51	0.22	1.37:2.39:1	4.5:15.91:1
6	28.09	1	49.02	3.5	27.35	0.29	1.03:1.79:1	3.45:12.07:1
izvorna f/2 podloga	2.81	0.1	12.33	0.88	3.42	0.036	1:4.39:1.22	2.78:24.44:1

3.2.6. Hranjiva podloga za šaržni fototrofni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Za šaržni uzgoj s pritokom dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 korištena je f/2 podloga slijedećeg sastava: 1 mM $Na_2SiO_3 \times 9\ H_2O$, 3.5 mM $NaNO_3$ i 0.15 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$, odnosno omjer koncentracija makronutrijenata odgovarao je omjeru 3: Si:N-NO_3:PO_4^{3-} =6.67:40:1 [mM:mM:mM]. Prihrana je sadržavala koncentriranu otopinu makronutrijenata $Na_2SiO_3 \times 9H_2O$, (30 g L^{-1}), NaNO3 (75 g L^{-1}) and $NaH_2PO_4 \times H_20$ (5 g L^{-1}). U podlogu je dodano 4 mL otopine natrijevog metasilikata nonhidrata (30 g L^{-1}), 1.3 mL otopine natrijevog nitrata (75 g L^{-1}) i 1.5 mL otopine natrijev dihidrogen fosfat monohidrat (5 g L^{-1}) kako bi se i u prihrani održavao omjer 3.

3.2.7. Hranjiva podloga za istraživanje utjecaja različitih omjera ugljika i dušika na rast mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Za ispitivanje utjecaja različitih omjera koncentracija izvora dušika i ugljika na rast mikroalge *Picochlorum* sp. D3 f/2 podloga (poglavlje 3.2.1.) obogaćena je dodatkom natrijevog bikarbonata. Dodatkom različitih koncentracija natrijevog bikarbonata postignuti su različiti omjeri ugljika i dušika koji su navedeni u tablici 13.

Tablica 13. Sastav podloge za ispitivanje različitih omjera izvora dušika i ugljika na rast *Picochlorum* sp. D3

podloga	$NaHCO_3$	$NaNO_3$
izvorna f/2 podloga	0 g L^{-1}	0.88 mM
C:N= 13.52 [mol mol^{-1}]	1 g L^{-1}= 11.9 mM	
C:N= 27.05 [mol mol^{-1}]	2 g L^{-1}= 23.8 mM	
C:N= 67.64 [mol mol^{-1}]	5 g L^{-1}= 59.52 mM	

3.2.8. Hranjive podloge za uzgoj slatkovodnih mikroalgi

Za pripremu inokuluma i uzgoj kulture mikroalgi korištena je tekuća BBM podloga (eng. Bold's Basal Medium) pogodna za kultivaciju slatkovodnih mikroalgi čiji je sastav prikazan u tablici 14. Kulture su održavane na krutim podlogama istog sastava uz dodatak 1,5 % (w/v) agara.

Tablica 14. Sastav BBM podloge

sastojak	koncentracija [mol L^{-1}]
natrijev nitrat	$2,94 \times 10^{-3}$
magnezijev sulfat heptahidrat	$3,04 \times 10^{-4}$
natrijev klorid	$4,28 \times 10^{-4}$
dikalijev fosfat	$4,31 \times 10^{-4}$
kalijev dihidrogen fosfat	$1,29 \times 10^{-3}$
kalcijev klorid dihidrat	$1,70 \times 10^{-4}$
cinkov sulfat heptahidrat	$3,07 \times 10^{-5}$
mangan II klorid tetrahidrat	$7,28 \times 10^{-6}$
molbiden trioksid	$4,93 \times 10^{-6}$
bakrov II sulfat pentahidrat	$6,29 \times 10^{-6}$
kobalt II nitrat heksahidrat	$1,68 \times 10^{-6}$
borna kiselina	$1,85 \times 10^{-4}$
EDTA	$1,71 \times 10^{-4}$
kalijev hidroksid	$5,53 \times 10^{-4}$
željezov sulfat heptahidrat	$1,79 \times 10^{-5}$
sumporna kiselina	1×10^{-5}

3.2.9. Hranjiva podloga za istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima ugljika

U svrhu ispitivanja rasta različitih sojeva mikroalgi pripremljena je BBM podloga u kojoj su otopljeni pojedinačni izvori ugljika. Rast je ispitan na 12 različitih izvora ugljika: glukozi, fruktozi, galaktozi, manozi, saharozi, maltozi, laktozi, ksilozi, arabinozi, glicerolu, melasi i octenoj kiselini. Koncentracija pojedinog izvora ugljika u podlozi iznosila je 5 g L^{-1}. Podloga je obogaćena dodatkom 0,5 mL L^{-1} f/2 otopine vitamina (poglavlje 3.2.1.; tablica 8 (c)). Kao kontrola korištena je BBM podloga, bez dodanog izvora ugljika. Za optimiranje rasta mikroalgi pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika korištena je prethodno opisana podloga u kojoj je koncentracija izvora ugljika iznosila 10, 35, 50 odnosno 75 g L^{-1}.

3.2.10. Hranjiva podloga za istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima dušika

Istražen je i rasta mikroalge *Chlorella vulgaris* pri različitim početnim molarnim omjerima C:N u BBM podlozi. Kao izvor ugljika odabrana je glukoza, a zadani omjeri C:N podešeni su dodatkom određene količine natrijevog nitrata. BBM hranjiva podloga je osim glukoze i natrijevog nitrata sadržavala 2 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta. Pri izračunu potrebne količine natrijevog nitrata uzet je u obzir sadržaj dušika u kvaščevom ekstraktu (7 % w/w). Za heterotrofni način uzgoja istražen je rast pri omjerima C:N 10 i 30 mol mol^{-1} uz početnu koncentraciju glukoze 20 g L^{-1}. U miksotrofnim uvjetima omjeri C:N iznosili su 10, 30, 50 i 75 mol mol^{-1} uz početnu koncentraciju glukoze 20 g L^{-1} , odnosno 30 i 50 mol mol^{-1} pri 50 g L^{-1} glukoze. Za miksotrofni uzgoj korištena je BBM hranjiva podloga s dvostruko većom koncentracijom anorganskih soli.

3.2.11. Hranjiva podloga za šaržni uzgoj *Chlorella vulgaris* S2 s pritokom supstrata u biorekatoru

U svrhu heterotrofnog uzgoja mikroalge *Chlorella vulgaris* u bioreaktoru korištena je BBM hranjiva podloga dvostruko veće koncentracije anorganskih soli. Pripremljena podloga sadržavala je 30 g L^{-1} glukoze i 4 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta. Početni omjer C:N podešen je na

10 mol mol^{-1} dodatkom izračunate mase natrijevog nitrata, pri čemu je u obzir uzet sadržaj dušika u kvaščevom ekstraktu. Prije inokulacije dodan je antibiotik ampicilin te je njegova koncentracija u podlozi iznosila 100 μg mL^{-1}. Za prihranu su pripremljene koncentrirane otopine glukoze (700 g L^{-1}), natrijevog nitrata (340 g L^{-1}), kvaščevog ekstrakta (130 g L^{-1}) i pojedinačnih anorganskih soli.

3.2.12. Hranjiva podloga za uzgoj inokuluma plijesni

Čista kultura plijesni *Mortierella isabellina, Aspergillus niger i Aspergillus fumigatus* čuvana je i održavana na kosom agaru. Za pripremu spora plijesni korištena je kosa PDA podloga pripremljena otapanjem 20 g L^{-1} glukoze i 20 g L^{-1} agara u krumpirovom bujonu. Krumpirov bujon dobiva se kuhanjem 150 g sitno narezanog krumpira u 500 mL vode. Nakon što se krumpir raskuhao, bujon je profiltriran kroz gazu, a filtrat korišten za pripremu hranjivih podloga.

3.2.13. Hranjiva podloga za uzgoj kulture plijesni *Mortierella isabellina*

Uzgoj kulture plijesni *Mortierella isabellina* provodi se u f/2 hranjivoj podlozi. Priprema i koncentracije soli u f/2 podlozi navedeni su poglavlju 3.2.1. Pripremljene su koncentrirane otopine kvašćevog ekstrakta koncentracije 250 g L^{-1} i otopina glukoze koncentracije 500 g L^{-1}. Sterilizacija je provedena pri 121°C kroz 20 minuta u autoklavu. Podloga za uzgoj kulture plijesni pripremljena je dodatkom određenog volumena prethodno sterilizirane i ohlađene otopine kvaščevog kako bi se u podlozi postigle koncentracije od 5 g L^{-1} glukoze i 1 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta u prethodno pripremljenu f/2 podlogu.

3.2.14. Hranjiva podloga za uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni

U svrhu uzgoja mješovite kulture mikroalge *Chlorella vulgaris* i plijesni *Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina* pripremljene su BBM podloge omjera C:N 30 mol mol^{-1} s dvostruko većom koncentracijom anorganskih soli. Početna koncentracija glukoze u podlozi iznosila je 20 g L^{-1}, a kvaščevog ekstrakta 2 g L^{-1}. Pri izračunu potrebne

količine natrijevog nitrata uzet je u obzir sadržaj dušika u kvaščevom ekstraktu. Na jednak način pripremljene su kontrolne podloge za uzgoj pojedinačnih čistih kultura mikroalge i plijesni.

3.2.15. LB hranjiva podloga

Za uzgoj testnih patogenih mikroorganizama u svrhu utvrđivanja antimikrobnog djelovanja mikroalgalnih ekstrakata korištena je čvrsta LB podloga sastava: 10 g L^{-1} triptona, 5 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta, 5 g L^{-1} natrijevog klorida i 20 g L^{-1} agara. Prekonoćne kulture uzgojene su u podlozi istog sastava, ali bez dodatka agara.

3.3. Oprema i aparatura

3.3.1. Laboratorijsku bioreaktor s mješalom

U svrhu uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. D3 i slatkovodne mikroalge *Chlorella vulgaris* korišten je stakleni bioreaktor s dvostrukim plaštom (M2, B. Braun, Njemačka) ukupnog volumena 2 L sa sustavima za kontrolu i regulaciju procesnih parametara (MD, B. Braun, Njemačka). Bioreaktor je opremljen s dvije Rushtonove turbine, pH elektrodom i sondom za mjerenje temperature (Pt-100). Na poklopcu bioreaktora nalazi se sustav za uzorkovanje te priključci za punjenje, inokulaciju i korekciju pH-vrijednosti podloge. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod i odvod zraka na koje su spojeni filteri za sterilizaciju zraka. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra. Broj okretaja miješala podešen je upotrebom analognog regulatora (Marus-Atm, Hrvatska).

3.3.2. Babrotirajuća kolona

Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. u velikom mjerilu proveden je u barbotirajućoj koloni izrađenoj od akrilnog stakla, ukupnog volumena 34 L. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod zraka spojenih na raspršivače zraka (A974 i A972; Hagen, Kanada) smještenih na dnu barbotirajuće kolone. Protok zraka reguliran je pomoću rotametra.

3.3.3. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

U izradi ovoga rada korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke učinkovitosti proizvođača Shimadzu CLASS-VP LC- 0A (Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od crpke (LC-10 ADVP), otplinjača (DGU-14A), injektora (SIL-10ADVP), uređaja za grijanje kolone (CTO-10AVP), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Supelcogel H Guard Column, Sigma), detektora indeksa loma (RID-10A), modula za kontrolu sustava (SCL-10AVP) i računalnog programa za kromatografiju (CLASS-VP v6.10).

3.3.4. Uređaj za tekućinsku kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

Osim HPLC-a u istraživanju korišten je i uređaj za tekućinsko kromatografiju ultravisoke djelotvornosti (UPLC) 1290 Infinity II, (Agilent Technologies, SAD). Uređaj se sastoji od pumpe (G7104A), automatskog injektora (G7167B), termostata (G7116B), analitičke kolone (ionsko-izmjenjivačka kolona Rezex ROA-Organic Acid H+; Phenomenex, SAD) s pretkolonom, detektora indeksa loma (G7162A 1260 RID), modula za kontrolu sustava i računalnog programa za obradu podataka (OpenLAB CDS).

3.3.5. Uređaj za plinsku kromatografiju

Sadržaj pojedinih masnih kiselina u lipidima mikroalgi određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju GC 2010 Plus AF (Shimadzu, Japan). Sustav se sastoji od automatskog uzorkivača (AOC-20s), injektora (AOC-20i), termostatirane kapilarne kolone (Zebron ZBFAME Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (FID-2010 Plus) i računalnog programa za obradu podataka (GC Solutions v2.32).

3.3.6. Ostali uređaji

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal, u izradi ovoga rada korištena je i oprema navedena u tablici 15.

Tablica 15. Uređaji korišteni u istraživanju

oprema	proizvođač
centrifuga	ThermoScientific, SL 8R, SAD
laboratorijska tresilica	RM 71 B. Braun Biotech. International, Sartorius group, Njemačka
tresilica za mikrotitarske pločice	Compact Digital MicroPlate Shaker, ThermoScientific, SAD
čitač mikrotitarskih pločica	Tecan Infinite 200 PRO, Tecan Group, Švicarska
vrtložna miješalica	Technica ET-1111, Slovenija
sušionik	Instrumentaria ST-50, Hrvatska
tehnička vaga	Technica ET-1111, Slovenija
analitička vaga	Sartorius, Njemačka
UV/Vis spektrofotometar	Cary 100 UV-Vis Agilent,
kvarcne kivete promjera 10 mm	Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka
mikroskop	Olympus CH20, Tokyo, Japan
boce plina s dušikom	Messer Croatia Plin, Zaprešić, Hrvatska
autoklav	Sutjeska, Beograd, Jugoslavija
hladnjak i zamrzivač	Bosch, Njemačka
bioreaktor	Chemap (Glasfermenter GF 0007, Švicarska)
LED lampice	Tween light LED Fiexband (1200 L m^{-1}, toplo bijela svjetlost (3000 K), duljina 10 m)
mufolna peć	Iskraterm, Tip: IP-08, 3500 W, 220 V Max. temp: 1200 ºC
vodena kupelj	VK3EN, InkoLab, Hrvatska
termostatirana tresilica (TermoShaker)	TS-100; Biosan, SAD
ortex mikser	LLG-uni*TEXER* 1; LLG-Labwware, Njemačka
pH metar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD
brojač stanica	CellDrop, DeNovix, SAD
pumpa	MCP V5.17; Ismatec, Švicarska
ledomat	AF-10; Scotsman, Italija
TLC_FID	Iattroscan MK-Vi, Iatron, Japan
pH metar	HI 9125; Hanna Instruments, SAD

3.4. Metode

3.4.1. Izolacija morskih i slatkovodnih mikroalgi

3.4.1.1. Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno ručno, direktnim uzimanjem vode u sterilne posudice na nekoliko lokacija na obali Jadranskog mora te na nekoliko lokacija na vodotoku rijeke Gacke. Točne lokacije uzorkovanja navedene su u tablici 16. (koordinate su očitane po WGS84 sustavu preko GEO portala).

Tablica 16. Geografske koordinate lokacija na kojima je provedeno uzorkovanje

naziv mjesta	geografska dužina	geografska širina
Jadrija	16.300	43.533
Šibenik	15.890	43.735
Šolta	16.2875	43.387
Švičko jezero	15.1105	44.5214
Zapornica-Šumećica	15.1251	44.5142
Stari most-SŠC	15.1401	44.5216
Šatrić	15.1520	44.5023
Kostelka	15.1839	44.4852

3.4.1.2. Izolacija čiste kulture mikroalgi

Korištene su dvije metode izolacije čiste kulture, metoda razrjeđivanja i metoda iscrpljivanja. Zbog vrlo niske koncentracije stanica mikroalgi u uzorcima vode i njihovog sporog rasta proveden je postupak obogaćivanja uzoraka vode. Slatkovodne mikroalge uzgajane su u BBM hranjivoj podlozi (poglavlje 3.2.8.), a morske mikroalge uzgajane su u f/2 hranjivoj podlozi (poglavlje 3.2.1.) Budući da obje korištene podloge ne sadrže organski izvor ugljika rast mikroalgi bio je ovisan isključivo o izvoru svijetlosti i CO_2 odnosno podržavale su fototrofni rast mikroalgi.

3.4.1.3. Metoda obogaćivanja uzoraka

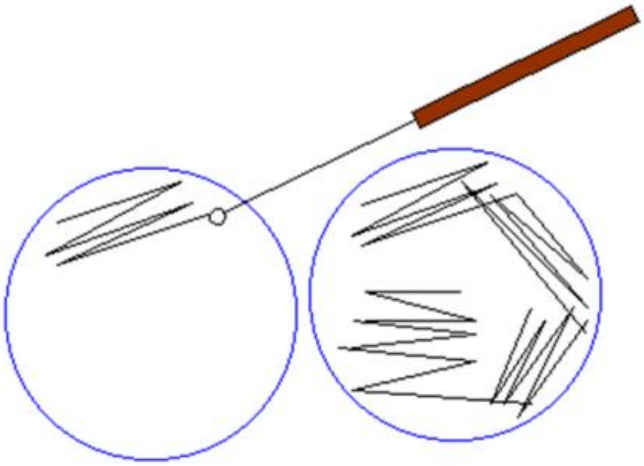
Prije izolacije čistih kultura, provedeno je obogaćivanje kulture u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL u koje je dodano 100 mL sterilne BBM/ f/2 hranjive podloge i 30 mL uzorkovane vode. Fototrofni uzgoj vodio se na sobnoj temperaturi kroz 15 dana, a tikvice su držane uz prozor na sjevernoj strani zgrade kako bi se osigurala potrebna dnevna svjetlost za rast fototrofnih mikroorganizama.

3.4.1.4. Metoda razrjeđivanja

Jedna od metoda primijenjenih za izolaciju čiste kulture mikroorganizama koja prevladava u mješovitoj kulturi je metoda razrjeđivanja. Pripremljen je niz razrjeđenja mješovite kulture u sterilnoj vodi, a zatim je odgovarajući alikvot razrjeđenja nacijepljen na čvrstu podlogu tako da očekivani broj stanica tj. broj naraslih kolonija nakon uzgoja bude između 30 i 300. Nakon brojanja stanica u Thoma-ovoj komorici, napravljeno je prvo i drugo decimalno razrjeđenje, nakon čega su iz drugog decimalnog razrjeđenja nacijepljeni odgovarajući alikvoti na BBM ili f/2 agar u Petrijevim zdjelicama. Za svako razrjeđenje nacijepljene su četiri paralele. Kultura je uzgajana na sobnoj temperaturi uz dnevno svjetlo. Nakon desetak dana uzgoja, izrasle kolonije precijepljene su u tekuću BBM odnosno f/2 hranjivu podlogu (uz dodatak otopine vitamina i ampicilina) u mikrotitarskim pločama s 96 jažica.

3.4.1.5. Metoda iscrpljivanja

Izolacija i pročišćavanje kultura provedena je na krutoj BBM, odnosno f/2 hranjivoj podlozi metodom iscrpljivanja čiji se princip temelji na smanjenju broja mikroorganizama svakim novim potezom mikrobiološke ušice, sa ciljem izolacije pojedinačnih stanica mikroorganizma iz koje će izrasti kolonija. U sterilnim uvjetima narasla kolonija na čvrstoj podlozi, mikrobiološkom ušicom je prenesena na odgovarajuću čistu krutu podlogu te je nacjepljivanje provedeno prema shemi na slici 12. Višekratnim precjepljivanjem kulture, dobivena je monoalgalna kultura.



Slika 12. Shema precjepljivanja na Petrijeve zdjelice

3.4.1.6. DNA sekvencioniranje

Identifikcija izoliranih mikroalgi napravljena je genetičkim barkodiranjem odnosno sekvencioniranjem DNA. Ekstrakcija DNA iz uzoraka napravljena je pomoću NucleoSpin Tissue Kit-a (Macherey Nalgel; Hoerdt, Cedex, France). Gen 18S rRNA, ITS regija (Internal Transcribed Spacer) i gen 28S rRNA umnoženi su pomoću PCR reakcije iz genomske DNK uzoraka. PCR program sastojao se od početne denaturacije (5 min na 95 °C), nakon čega je uslijedilo 35 ciklusa od 30 sek na 94 °C, 30 sek na 56 °C, te konačna elongacija kroz 1 min na 72 °C i hlađenje na 4 °C. Za pročišćavanje korišten je Exo SAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific; Walthman, MA SAD). Za umnažanje 18s rRNA korišteni su primeri: SA (50 -AACCTGGTT-GATCCTGCCAGT-3´), SB (5´-TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-30´), 63F (5´-ATG-CTT-GTC-TCA-AAGATTA-3´) 1818R (5´-ACGGAAACCTTGTTACGA-3´), S69 (5´-ACCAGACTGCCCTCC-3´) i S30 (5´-CGCGGTAATTGGAGCTCCA-3´). Za umnažanje ITS regije korišteni su primeri: 329F (5´-GTGAACCTG-CRG-AAG-GAT-CA-3´), D1R-R (5´- TATGCTTAAATTCAGCGGGT-3´) i ITS2F (5´-GGAGGCGCAGTAGCCAGCTGCCGT-3´). A gen 28S r RNA umnožen je pomoću primera D1R (5´-ACCCGCTGAATTTAAGCATA-3´) i D3Ca (5´-ACGAACGATTTGCACGTCAG-3´). Za identifikaciju cijanobakterije umnažana je regija 16S rRNA i to pomoću primera: CYA106Fc (5´- CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3´),

CYA359Fc (5´-GGGGAATYT TCCGCAATGGG-3´), CYA781R (5´-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3´), i CYA781R (5´-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3´). Umnoženi fragmenti DNK su sekvencionirani i pomoću dobivene sekvence napravljena je identifikacija koristeći NCBI BLAST alat.

3.4.2. Uzgoj morske mikroalge *Nitzschia* sp. S5

3.4.2.1. Uzgoj inokuluma dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Inokulum dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 uzgajana je u f/2 podlozi, čiji je sastav opisan u poglavlju 3.2.1. Uzgoj je započeo aspetičnom inokulacijom 50 mL sterilne hranjive podloge s 5 mL kulture uzgojene u tekućoj hranjivoj podlozi istoga sastava. Uzgoj se provodio kroz 7 dana na tresilici pri 200 o min^{-1} na temperaturi od 25 ºC. Za osvjetljenje je korištena toplo-bijela svjetlost (2000 K) prema režimu 12 sati svjetlo-12 sati tama. Potom je 20 mL tako uzgojene kulture inokulirano u aseptičnim uvjetima u 180 mL sterilne podloge jednakog sastava te je inokulum uzgajan kroz 7 dana u prethodno opisanim uvjetima.

3.4.2.2. Uzgoj inokuluma za uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru

Za potrebe eksperimenta uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru, uzgojeno je 2 L inokuluma na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.4.2.1. Prorasla biomasa potom vcentrifugiranjem u sterilnim plastičnim kivetama pri 500 rpm kroz 15 minuta. Supernatant je odbačen, a biomasa je resuspendirana u 200 mL sterilne umjetne morske vode. Tako pripremljena ugušćena kultura koristila se kao inokulum za uzgoj u fotobioreaaktoru.

3.4.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije f/2 podloge na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Sastav ispitivanih podloga za optimizaciju fototrofnog uzgoja dijatomeje naveden je u poglavlju 3.2.2. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL s odbijačima

vrtloga i ukupnim volumenom od 300 mL. U 270 mL prethodno sterilizirane hranjive podloge dodano je 30 mL prethodno uzgojenog inokuluma (poglavlje 3.4.2.1.). Uzgoj se provodio na rotacionoj tresilici uz 200 okretaja po minuti na 25 °C te uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlosti jakosti 2000 K uz režim 12 sati svjetlo, 12 sati tama. Uzgoj je praćen izuzimanjem uzoraka kojima je određivana optička gustoća podloge i broj stanica po mililitru suspenzije brojanjem stanica u Thoma-ovoj komorici (poglavlje 3.5.1.). Uzgoj je trajao do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. U izvornoj i dvostruko koncentriranoj f/2 podlozi uzgoj je trajao 13 dana, dok je u četverostruko i deseterostruko koncentriranoj podlozi uzgoj trajao 15 dana. Na kraju uzgoja gravimetrijski je određena koncentracija biomase u svakoj ispitivanoj podlozi (poglavlje 3.5.4.), a biomasa izdvojena centrifugiranjem i filtracijom. U filtratu, odnosno podlozi izdvojenoj nakon uzgoja, određena je koncentracija dušika, fosfatnih iona i silikata (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.).

3.4.2.4. Polukontinuirani uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru

Za uzgoj dijatomeje 5.4. korišten je stakleni bioreaktor s miješalom (slika 13) ukupnog volumena 2 L. Bioreaktor je najprije steriliziran u autoklavu, a potom je u njega dodana sterilna f/2 hranjiva podloga. Prema rezultatima prethodnog eksperimenta, za uzgoj je korištena četverostruko koncentrirana f/2 hranjiva podloga (poglavlje 3.2.2.). Početni volumen podloge iznosio je 1,6 L. Podloga je nacijepljena s 200 mL inokuluma pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.4.2.2. i time je ukupan volumen u bioreaktoru iznosio 1,8 L. Uzgoj se provodio pri 22 °C, pH oko 7,4 te na 200 rpm (dva mješala) uz umjetni izvor toplo-bijele svjetlosti (LED lampice) uz režim 12 sati tame i 12 sati svjetla. Uzorci su izuzimani svakodnevno te je rast praćen određivanjem optičke gustoće kulture i gravimetrijskim određivanjem koncentracije stanica (poglavlja 3.5.3. i 3.5.4.). Također je praćena potrošnja dušika, fosfata i silikata u podlozi (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.). Prvi dio uzgoja u fotobioreaktoru vođen je šaržno, a potom polukontinuiranim načinom uzgoja. Po ulasku kulture u stacionarnu fazu, na što je upućivalo smanjenje porasta optičke gustoće kulture i koncentracije stanica, završen je šaržni dio uzgoja. Polukontinuirani uzgoj započet je izuzimanjem 200 mL kulture iz fotobioreaktora i nadomještanjem tog volumena svježom, prethodno steriliziranom četverostruko koncentriranom f/2 podlogom. Izmjena volumena se u

ovom eksperimentu provela dva puta, sedmog i jedanaestog dan uzgoja. Određena je koncentracija neutrošenog izvora dušika u podlozi prije prihrane te je u četverostruko koncentriranoj f/2 hranjivoj podlozi za prihranu umanjena koncentracija izvora dušika za vrijednost preostalog izvora dušika. Sastav za podlogu za prihranu naveden je u poglavlju 3.2.3. (tablica 10).

Slika 13. Fotobioreaaktor za uzgoj mikroalgi (vlastita fotografija)

3.4.2.5. Optimizacija koncentracije makronutrijenata u f/2 podlozi za fototrofni uzgoj dijtomeje *Nitzschia* sp. S5

Za ispitivanje utjecaja koncentracije makronutrijenata f/2 podloge, odnosno izvora dušika, fosfora i silicija hranjiva podloga je pripremljena na način opisan u poglavlju 3.2.4. (tablica 11). Koncentracija svakog makronutrijenta varirana je zasebno. Za uzgoj su korištene Erlenmeyer tikvice ukupnog volumena 200 mL U 180 mL svježe pripremljene i sterilizirane podloge dodano je 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma. Inokulum je pripremljen na način opisan u poglavlju 3.4.2.1. Uzgoj se provodio na rotacionoj tresilici uz 200 okretaja po minuti na 25 °C te uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlost jakosti 2000 K i režim 12 sati svjetlo, 12 sati tama. Uzgoj je vođen do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Biomasa je izdvojena

centrifugiranjem i napravljena je analiza njenoga sastava, a supernatantu je određena koncentracija preostalih nutrijenata (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.).

3.4.2.6. Optimizacija omjera koncentracija makronutrijenata u f/2 podlozi za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Kako bi se ispitao utjecaj različitih omjera koncentracija makronutrijenata f/2 podloge, hranjiva podloga je pripremljena na način opisan u poglavlju 3.2.5. (tablica 12). Uzgoj je vođen u Erlenmeyerovim tikvicama sa 180 mL svježe pripremljene podloge i 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma (poglavlje 3.4.2.1.) na rotacionoj tresilici uz 200 okretaja po minuti na 25 °C uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlosti jakosti 2000 K i režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Rast je praćen primjenom metoda opisanih u poglavljima 3.5.1. i 3.5.3. i vođen je do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Biomasi izdvojenoj centrifugiranjem određen je udio proteina (poglavlje 3.5.8.), udio ugljikohidrata (poglavlje 3.5.9.), udio lipida (3.5.10.), a supernatantu je određena koncentracija nutrijenta (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.).

3.4.2.7. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 s optimiranim sastavom makronutrijenata u f/2 podlozi

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 proveden je u Erlenmeyer tikvicama s ukupnim volumenom od 200 mL (180 mL podloge odgovarajućeg sastava i 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma). Inokulum je uzgojen na način opisan u poglavlju 3.4.2.1., a sastav podloge dan je u poglavlju 3.2.6. i na taj način je pripremljeno 15 tikvica. Uzgoj je vođen na rotacionoj tresilici uz 200 okretaja po minuti na 25 °C uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlosti jakosti 2000 K i režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. S padom porasta optičke gustoće i broja stanica po mililitru, započet je uzgoj s pritokom supstrata. Tri tikvice su izdvojene iz uzgoja kako bi se odredili parametri procesa i analizirao sastav biomase na kraju šaržnog uzgoja. Preostale tikvice prihranjene su koncentriranom otopinom nutrijenata koja je predstavljala prihranu (poglavlje 3.2.6.). Kada je ponovno primijećeno smanjenje brzine rasta kulture, izdvojene su iduće tri tikvice kako bi se napravile potrebne analize, a u preostale je dodana nova prihrana istoga sastava. Kultura je prihranjena četiri puta a nakon svake prihrane izuzet je uzorak te je biomasa izdvojena centrifugiranjem

kako bi se mogla provesti analiza njenog sastava (poglavlja 3.5.7., 3.5.8., 3.5.9.), a u supernatantu kulture odredila koncentracija preostalih nutrijenata (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.).

3.4.3. Uzgoj morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3

3.4.3.1. Uzgoj inokuluma mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Uzgoj inokulum za eksperimente optimizacije uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. D3 proveden je sukcesivnim povećanjem volumena kulture. Kultura je uzgajana u Erlenmeyr tikvicama od 500 mL s 180 mL sterilizirane f/2 hranjive podloge (bez dodatka izvora silicija) koja je inokulirana s 20 mL originalne kulture. Uzgoj inokuluma trajao je 7 dana na tresilici pri 200 rpm i temperaturi od 25 °C, uz osvjetljenje umjetnim izvorom svjetlosti toplo–bijele boje prema režimu 12 sati svjetlo, 12 sati tama. Tako pripremljeni inokulum ili je korišten za pripravu većeg volumena inokuluma ili za daljnje eksperimente u tikvicama.

3.4.3.2. Uzgoj inoukuluma za fototrofni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu

Početni volumen inokuluma od 200 mL je pripremljen na način opisan u poglavlju 3.4.3.1. Potom je ta kultura korištena kao inokulum za nacjepljivanje 800 mL svježe hranjive podloge u Erlenmeyer tikvici od 2 L. Uzgoj je također vođen na rotacionoj tresilici pri 200 rpm i temperaturi od 25 °C, uz osvjetljenje umjetnim izvorom svjetlosti toplo – bijele boje prema režimu 12 sati svjetlo, 12 sati tama. Uzgoj je trajao od 10 do 14 dana, odnosno dok se nije postigla kultura željene gustoće. Na takav način pripremljen je volumen kulture koji je činio 10% ukupnog volumena podloge za uzgoj u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu.

3.4.3.3. Fototrofni nesterilni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu

U ovome istraživanju ispitana je mogućnost uzgoja mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dva otvorena sustava, barbotirajuća kolona i otvoreni bazen. Oba sustava su prije punjenja hranjivom podlogom očišćena uz dodatak lužine i prebrisana korištenjem dezinfekcijskog sredstava (Bacillol plus; Hartmann, Njemačka). Kultura je uzgajana u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi bez dodatka silicija (poglavlje 3.2.1.). Pripremljena hranjiva podloga kao i otopina $NaNO_3$ i otopina NaH_2PO_4, koje su korištene za prihranu supstrata, sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta. Nakon što je podloga prebačena u bioreaktorske sustave, uključena je aeracija u svrhu bržeg hlađenja podloge. Inokulacija je provedena 24 sata nakon prebacivanja hranjive podloge u sustave. Bioreaktori su bili osvijetljeni LED svjetlima (Model: 001412; Ferotehna, Hrvatska) uz režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Uzorci su izuzimani svakodnevno s ciljem praćenja rasta kulture mjerenjem optičke gustoće i brojanjem stanica u Thomaovoj komorici (poglavlje 3.5.1.). Tijekom uzgoja praćena je potrošnja dušika i fosfora u podlozi (poglavlja 3.5.5. i 3.5.6.).

3.4.3.3.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata *Picochlorum* sp. D3 u otvorenom bazenu

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u fototrofnim uvjetima rasta. U otvorenom bazenu ukupnog volumena 16 L, dodano je 14 L f/2 hranjive podloge. Podloga je inokulirana s 1 L fototrofno uzgojenog inokuluma (poglavlje 3.4.3.2.). Uzgoj je vođen šaržno do kraja eksponencijalne faze rasta, odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu. Iz otvorenog bazena svakodnevno je izuziman uzorak(20 mL) u svrhu praćenja rasta kulture i analize sastava biomase mikroalgi. Uzorku je mjerena optička gustoća kulture i određivan broj stanica (poglavlja 3.5.1. i 3.5.3.), pH vrijednosti i temperatura. Temperatura je varirala između 22 i 24,8 °C dok je pH vrijednost podloge bila u intervalu od 8,09 do 8,78. U prosjeku, svaki treći dan izuziman je veći volumen podloge od 300 mL. Tijekom cijelog uzgoja veći volumen podloge izuzet je ukupno 7 puta. Iz tih uzoraka, osim mjerenja optičke gustoće kulture i broja stanica, pripremljeni su uzorci za određivanje koncentracija lipida, proteina, pigmenata, ugljikohidrata, kao i uzorci za analizu sastava masnih kiselina i

gravimetrijsko određivanje suhe tvari (poglavlja 3.5.10. i 3.5.4.). Uzorci supernatanta, koji su iz kulture izdvojeni centrifugiranjem, korišteni su za određivanje koncentracije nutrijenata. Prvi dan uzgoja u otvoreni bazen dodano je 500 mL otopine $NaHCO_3$ (50 g L^{-1}). Druga prihrana provedena je 14. dan uzgoja tako što je u podlogu dodano: 19.3 mL otopine $NaNO_3$ (75 g L^{-1}), 14.1 mL otopine NaH_2PO_4 (5 g L^{-1}), 14.1 mL otopine elemenata u tragovima i 7 mL otopine vitamina (poglavlje 3.2.1.; tablica 8 (b) i 8 (c)). Treća prihrana volumena 250 mL dodana je 19. dan uzgoja te je sadržavala isključivo otopinu $NaHCO_3$. Četvrta, ujedno i posljednja prihrana od 250 mL otopine $NaHCO_3$ (50 g L^{-1}) provedena je 22. dan uzgoja. Pred kraj uzgoja, 26.-tog dana iz otvorenog bazena izuzeto je 1000 mL uzorka koji je korišten kao inokulum za uzgoj u barbotirajućoj kolonu. Uzgoj je ukupno trajao 28 dana.

3.4.3.3.2. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni

Šaržni uzgoj s pritokom supstrata proveden je u barbotirajućoj koloni ukupnog volumena 34 L u ukupno 20 L sterilne hranjive podloge. Volumen inokuluma je iznosio 5 % volumena podloge, odnosno 1000 mL. Inokulum za ovaj kultivacijski sustav je izuzet iz otvorenog bazena 26.-tog dana uzgoja kada je koncentracija stanica iznosila 6.88×10^7 stanica po mililitru kulture. Tijekom uzgoja praćena je promjena temperature koja je bila u intervalu između 21.4 i 24.5 °C, dok je pH-vrijednost bila oko 8 uz manja odstupanja (7.74 – 8.16). Iz sustava svakodnevno je izuziman manji volumen podloge (40 mL) iz kojeg je mjerena optička gustoća kulture i određivan broj stanica. U razmaku od tri do četiri dana izuziman je veći volumen podloge od 500 mL iz kojeg su pripremljeni uzorci za provođenje ostalih analiza. Uzgoj je vođen šaržnim načinom s pritokom supstrata tako što je nakon izuzimanja većeg uzorka, volumen u reaktoru nadomješten dodatkom sterilne demineralizirane vode do početnog volumena od 21 L. Izmjena volumena je tijekom uzgoja provedena ukupno šest puta: trećeg, šestog, devetog, trinaestog, šesnaestog i dvadesetog dana. Osim toga, trinaestog dana uzgoja provedena je i prihrana dodatkom 20 mL otopine $NaNO_3$ (75 g L^{-1}) i 20 mL otopine NaH_2PO_4 (5 g L^{-1}). Uzgoj je trajao 23 dana odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta.

3.4.3.4. Optimiranje rasta *Picochlorum* sp. D3 pri različitim omjerima koncentracija izvora dušika i izvora ugljika

Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija izvora dušika i ugljika, odnosno njihovog omjera na rast mikroalge *Picochlorum* sp., provedeno je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Kao izvor dušika korišten je natrijev nitrat ($NaNO_3$), a kao anorganski izvor ugljika natrijev bikarbonat (NaH_2PO_4). Pripremljena je otopina natrijevog bikarbonata koncentracije 100 g L^{-1} koja je zatim sterilizirana filtracijom kroz sterilni filter veličine pora 0,2 µm. Sterilizacija je provedena uz plamenike koristeći prethodno steriliziranu tikvicu od 500 mL. Kombiniranjem različitih koncentracija $NaNO_3$ i $NaHCO_3$, ispitani su različiti omjeri ugljika i dušika (poglavlje 3.2.7.; tablica 13). Erlenmeyerove tikvice su sadržavale 180 mL umjetne morske vode (poglavlje 3.2.1; tablica 7), a zatim je u aseptičnim uvjetima dodan određeni volumen $NaNO_3$, $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, otopine metala u tragovima, vitamina soli i $NaHCO_3$. Potom je podloga inokulirana sa 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma (poglavlje 3.4.3.1.) Izuzetak je bila kontrolna podloga u koju nije dodan natrijev bikarbonat. Uzgoj je trajao ukupno 13 dana uz praćenje broj stanica i optičke gustoća kulture (poglavlje 3.5.1. i 3.5.3.). Vrijednost pH hranjive podloge održavana je u području 6-8 pomoću 1 M NaOH. Nakon završetka uzgoja, izdvojenoj biomasi određen je sastav (poglavlja 3.5.7., 3.5.8., 3.5.9.), a u supernatantu koncentracija nutrijenata (poglavlja 3.5.5., 3.5.6 i 3.5.7.).

3.4.3.5. Istraživanje utjecaja limitacije dušikom na rast i sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Kako bi se ispitao utjecaj limitacije izvorom dušika na rast i sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 napravljen je uzgoj u dvije faze. Prva faza bila je šaržni uzgoj u f/2 podlozi originalnog sastava (poglavlje 3.2.1.) kao kontrolnom uzgoju i uzgoj na f/2 podlozi uz dodatak 0.5 g L^{-1} natrijevog bikarbonata odnosno uz C:N omjer od 13.52 mol mol^{-1}. Ova faza uzgoja trajala je 7 dana, odnosno do ulaska kulture u kasnu eksponencijalnu fazu. Rast je praćen metodama opisanim u poglavlju (poglavlja 3.5.1. i 3.5.3.). Potom je uzgojena biomasa izdvojena centrifugiranjem i prebačena u f/2 podlogu u koju nije dodan izvor dušika. Podloga za drugu fazu uzgoja sadržavala je natrijev bikarbonat koji je dodan u koncentracijama od 1 i 2 g L^{-1}. Svi eksperimenti provedeni su u tri paralele. Uzgoj je vođen do ulaska kulture u

stacionarnu fazu nakon čega je biomasa izdvojena centrifugiranjem u svrhu utvrđivanje njenog sastava (poglavlja 3.5.7., 3.5.8., 3.5.9.).

3.4.3.6. Šaržni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. uz sukcesivno povećanje volumena u barbotirajućoj koloni

Uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni proveden je kao šaržni uzgoj uz sukcesivno dodavanje svježe hranjive podloge. Uzgoj je započet s 8 L svježe hranjive podloge nacijepljene s ukupno 2 L prethodno uzgojenog inokuluma mikroalge (poglavlje 3.4.3.1.). Proveden je fototrofni uzgoj uz korištenje tople bijele svjetlosti te stalnu aeraciju zrakom. Prva faza uzgoja provedena je s ciljem proizvodnje biomase. Svježa f/2 hranjiva podloga dodana je u obrocima po 2,5 L. Prva faza uzgoja trajala je 15 dana, odnosno do ulaska kulture mikroalge u stacionarnu fazu. U drugoj fazi uzgoja mikroalge, 16. i 21. dana uzgoja dodana je otopina natrijevog bikarbonata koncentracije 1 g L^{-1}, dok je 23. dana uzgoja dodana otopina natrijevog bikarbonata koncentracije 0.5 g L^{-1}. Natrijev bikarbonat korišten je kako bi se potaklo nakupljanje lipida u stanicama mikroalge. Uzgoj mikroalge u barbotirajućoj koloni proveden je tijekom ukupno 26 dana. Svakodnevno je određivana koncentracija nutrijenata, odnosno dušika i fosfora (poglavlja 3.5.7., 3.5.8., 3.5.9.), te se prema dobivenim rezultatima izračunala potrebna koncentracija nutrijenata u prihrani. Otopine $NaNO_3$ (75 g L^{-1}) i $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ (5 g L^{-1}), korištene za prihranu, sterilizirane su u autoklavu pri 121 °C kroz 20 minuta. Kako bi se pratio rast kulture, optička gustoća, veličina stanica, pH vrijednost, temperatura i koncentracije nutrijenata, svaki dan je izuzeto oko 50 mL podloge. Tijekom uzgoja također su uzeti i veći volumeni podloge od 1000 mL kako bi se uz prethodno navedena mjerenja odredila i koncentracija lipida, proteina, pigmenata, ugljikohidrata, gravimetrijsko određivanje suhe tvari i analiza sastava masnih kiselina. Korekcija volumena provodila se dodatkom svježe demineralizirane vode prije izuzimanja uzoraka.

3.4.4. Autoflokulacija promjenom pH

Autoflokulacija stanica mikroalge *Picochlorum* sp. D3 izazvana je promjenom pH kulture. Ispitano je pH područje od 2 do 12 (2, 4, 6, 8, 10, 11, 12), a pH vrijednosti je podešena s 1 M otopinom NaOH ili 1 mM otopinom HCl-a. Kultura je pri dodatku kiseline ili lužine bila miješana na magnetskom mješaču, a potom ostavljena u mirovanju kroz 7.5 h. Tijekom tog vremena izuzimani su uzorci kulture iznad istaložene biomase (supernatant) kojima je određena optička gustoća na 540 nm. Početnu vrijednost predstavljala je optička gustoća kulture prije dodatka kiseline ili lužine. Efikasnost flokulacije izračunata je prema jednadžbi 1:

$$EF = \left(1 - \frac{OD_t}{OD_{t0}}\right) \times 100(\%) \ [1]$$

gdje je:

OD_t- optička gustoća supernatanta iznad taloga u vremenu t

OD_{t0}- optička gustoća kulture prije autoflokulacije

EF- učinkovitost flokulacije

3.4.5. Flokulacija željezovim kloridom

Željezov klorid korišten je kao flokulacijsko sredstvo za taloženje biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Pripremljena je osnovna otopina koncentracije 100 g L^{-1} željezovog klorida. Izračunati volumen osnovne otopine dodan je u 100 mL kulture mikroalge (pH=8) uz miješanje kako bi se postigle koncentracije željezovog klorida od 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 i 1200 mg L^{-1}. Potom je izabrano područje koncentracije od 1100 do 1500 mg L^{-1} željezovog klorida koje su istražene pri tri različite pH vrijednosti: 5, 7, 8 i 9. pH vrijednost kulture podešena je dodatkom 1 M NaOH ili 1 mM HCl-a. Kultura po dodatku željezovog klorida miješana na magnetskom mješaču, a potom je ostavljena u mirovanju kroz 30 minuta kako bi se istaložile nastale flokule. Nakon isteka vremena taloženjna izuzet je uzorak supernatanta kojem je određena optička gustoća, te je izračunata učinkovitost flokulacije prema jednadžbi 1.

3.4.6. Flokulacija hitozanom

Biopolimer hitozan korišten je kao flokulacijsko sredstvo za taloženje biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Pripremljena je otopina hitozana u 1% octenoj kiselini koncentracije 5 g L^{-1}. Kulturi je prije dodatka hitozana podešena pH vrijednost na 8 i potom je dodan odgovarajući volumen otopine hitozana kako bi se istražile koncentracije od 5, 10, 25, 50 i 80 mg L^{-1}. Nakon dodatka hitozana kultura je miješana pomoću magnetskog mješača na 450 rpm-a kroz 10 minuta, a potom je ponovno podešena pH vrijednost na 8 dodatkom 1 mM NaOH. Kultura je ponovno miješana kroz još 10 minuta na 250 rpm-a. a potom je ostavljena u mirovanju kroz 30 minuta. Po isteku vremena taloženja nastalih flokula, uzet je uzorak supernatanta te je izmjerena optička gustoća. Prema jednadžbi 1 izračunata je učinkovitost flokulacije. Potom je istražen utjecaj pH vrijednosti na učinkovitost flokulacije. Početni pH kulture podešen je na 8, a potom je dodana otopina hitozana kako bi se postigla koncentracija od 25 mg L-1. Nakon 10 minuta miješanja na 450 rpm-a pomoću magnetske miješalice, kulturi je podešen pH na slijedeće vrijednosti: 7.5, 8.2, 8.5, 8.8, i 9. Nakon podešavanja pH vrijednosti dodatkom 1 mM otopine NaOH kultura je miješana kroz 10 minuta na 250 rpm-a i potom ostavljena u mirovanju kroz 30 minuta. Po isteku vremena ponovno je uzet uzorak supernatanta kojem je određena optička gustoća, te je učinkovitost flokulacije

3.4.7. Flokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina*

3.4.7.1. Uzgoj inokuluma plijesni *M. isabellina*

Plijesan *Mortierella isabellina* kultivirana je na kosom PDA agaru, opisanom u poglavlju 3.2.12., kroz sedam dana pri temperaturi 28 ˚C. U aseptičnim uvjetima, kultivirane spore plijesni sastrugane su i resuspendirane u otopini Tween 80, koncentracije 1 g L^{-1}. Potom je dobivena otopina spora filtrirana kroz sterilnu gazu u sterilnu kivetu te čuvana u hladnjaku pri -20˚C. Broj spora određen je brojanjem pomoću brojača stanica CellDrop.

3.4.7.2. Submerzni uzgoj plijesni *M. isabellina*

Kako bi proveli optimizaciju dobivanja peleta odgovarajućih karakteristika, provedena je kultivacija plijesni uz različitu početnu koncentraciju spora u inokulumu. Koncentracije inokuluma iznosile su: 10^4 spora/100 mL, 10^5 spora/100 mL, 10^6 spora/100 mL i 10^7 spora/100 mL. Izračunati volumen prethodno pripremljenog inokuluma dodan je u Erlenmayer-ovu tikvicu volumena 500 mL koja je sadržavala steriliziranu i ohlađenu podlogu za uzgoj plijesni (poglavlje 3.2.13.). Volumen hranjive podloge iznosio je 200 mL te je uzgoj proveden za svaku koncentraciju inokuluma u dvije paralele. Kultivacija je provedena kroz 72 sata na tresilici uz 180 rpm pri 20 ˚C. Dobiveni peleti su izdvojeni iz hranjive podloge pomoću cjedila, izvagani pomoću analitičke vage, mikroskopirani, uslikani pomoću mikroskopske kamere, izmjeren im je promjer, a zatim napravljeno gravimetrijsko određivanje mase.

3.4.7.3. Izdvajanje peleta plijesni

Plijesan je uzgajana u Erlenmayer tikvicama volumena 500 mL u podlozi sastava opisanog u poglavlju 3.2.10. Dobiveni peleti plijesni izdvojeni su iz hranjive podloge filtracijom pomoću cjedila u nesterilnim uvjetima, a zatim su korišteni u procesu bioflokulacije.

3.4.7.4. Bioflokulacija

Uzgojenoj kulturi mikroalge dodani su prethodno izdvojeni peleti plijesni. Bioflokulacija je provedena pri različitim uvjetima: (a) omjer suhe tvari plijesni i mikroalge; (b) temperature; (c) pH.

a) omjer suhe tvari plijesni i mikroalage

Bioflokulacija je provedena koristeći pelete plijesni uzgojene u 300 mL hranjive podloge, uz koncentraciju inokuluma 10^7 spora/100 mL pri uvjetima od 180 rpm kroz 48 sati na 20 °C. Volumen kulture mikroalge iznosio je 100 mL u svakoj tikvici, a masa peleta

plijesni izračunata je pomoću jednadžbe 2 tako da u konačnici iznosi 1 g, 1.5 g ili 2 g suhe tvari plijesni. Dobiveni omjeri masa mikroalge: plijesan iznosili su 1:404, 1:592 i 1:814 (g g^{-1}). Ovim eksperimentom se ispitala mogućnost bioflokulacije između mikroalge *Picochlorum* sp. te plijesni *Mortierella isabellina* stoga je plijesan dodana u suvišku, a u eksperimentu opisanim pod c) optimiran je omjer masa. Tijekom bioflokulacije praćena je optička gustoća uz pH vrijednost 4 kroz 2.5 sata te je, potom, bioflokulacija sljedećih 1.5 sat provedena pri pH vrijednosti 2.

$$\text{masa peleta (g)} = \frac{\text{x}}{\text{suha tvar (\%)}} \quad [2]$$

pri čemu je:

x- željena masa suhe plijesni (1 g, 1.5 g, 2 g)

b) pH vrijednost

Za optimizaciju pH vrijednosti, bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2, 2.5; 3 i 4. Vrijednost pH mjerena je pomoću pH metra uz dodatak fosforne kiseline ili natrijeve lužine za postizanje željene pH vrijednosti kulture mikroalge. Korišteni su peleti plijesni uzgojeni u 300 mL hranjive podloge, uz koncentraciju inokuluma 10^7 spora/100 mL pri uvjetima na tresilici od 180 rpm kroz 48 sati pri 20 °C. Volumen kulture mikroalge iznosio je 100 mL u svakoj tikvici, a masa peleta plijesni izračunata je tako da u konačnici iznosi 1.5 g. Bioflokulacija je provedena kroz 3.5 h, na tresilici pri 20 °C i 180 rpm. Mjerena je optička gustoća uz pripremu odgovarajućih razrjeđenja kako bi izmjerena vrijednosti na spektrofotometru bila manja od 1.

c) optimizacija omjera masa plijesni i mikroalge

Provedena je bioflokulacija s uzgojenim peletima plijesni početne koncentracije inokuluma 10^7 spora/100 mL uzgojenih u 300 mL hranjive podloge pri 180 rpm kroz 48 sati i 20 °C. Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2, 2.5 i 3 s različitim omjerima masa plijesan:alga (5:1, 15:1, 25:1, 35:1, 50:1 (g g^{-1})) pri 20 °C i 180 rpm. Za provedbu eksperimenta korišteno je 100 mL kulture mikroalge u dvije paralele za svaki omjer. Promjena optičke gustoće tijekom bioflokulacije praćena je spektrofotometrijski kroz 4 sata bioflokulacije.

d) temperatura

Za provedbu optimizacije temperature bioflokulacije korišteni su peleti plijesni uzgojeni u 300 mL hranjive podloge pri 180 rpm kroz 48-60 sati na 20 °C. Bioflokulacija je provedena pri pH vrijednosti 2 i 3, pri različitim temperaturama (20, 25, 30 °C) sa 100 mL kulture mikroalge u tri paralele uzimajući u obzir omjer mase mikroalga:plijesan 1:50 (g g^{-1}). Tijek procesa bioflokulacije praćen je mjerenjem promjene optičke gustoće kroz 3.5 sata.

1.1.1. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi

1.1.1.1. Uzgoj inokuluma mikroalgi

Inokulum mikroalgi pripremljen je postupnim povećanjem volumena kulture. Uzgoj je započet precjepljivanjem kulture s krute BBM podloge u tekuću (poglavlje 3.2.8.). U aseptičnim uvjetima stanice mikroalgi sastrugane su s površine kosog agara pomoću eze i prenijete u 50 mL prethodno sterilizirane BBM podloge koja je po potrebi sadržavala 20 g L^{-1} glukoze i 2 g L^{-1} kvaščevog ekstrakta (poglavlje 3.2.8.). Inokulum je uzgajan 5-7 dana na tresilici pri 200 rpm i temperaturi od 25-28 °C. Ovisno o namjeni inokuluma, uzgoj je proveden uz upotrebu umjetnog izvora svjetlosti tople bijele boje (2700K) prema režimu 12 sati svjetlo, 12 sati tama, odnosno bez prisustva svjetlosti. Veći volumen kulture potom je uzgojen u 180 mL sterilne hranjive podloge u Erlenmeyer tikvici od 500 mL koja je inokulirana sa 20 mL prethodno uzgojene kulture u istim uvjetima.

1.1.1.2. Istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima ugljika

U ovom eksperimentu istražen je rast mikroalgi *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3. na različitim izvorima ugljika u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima. Uzgoj je proveden u mikrotitarskim pločama s 96 jažica. Svaka jažica sadržavala je 180 µL sterilne BBM hranjive podloge s odgovarajućim izvorom

ugljika (poglavlje 3.2.9.). Pripremljene su po dvije paralele za svaki ispitivani izvor ugljika. Jažice su inokulirane s 20 µL prethodno uzgojenog inokuluma prema shemi prikazanoj na slici 5. Odabran je identičan raspored testiranih sojeva i izvora ugljika za obje vrste uzgoja. Uzgoj je proveden na tresilici pri temperaturi od 25 °C i 250 rpm tijekom 72 h. U slučaju miksotrofnog rasta, tijekom uzgoja korištena je topla bijela svjetlost uz režim 12 h svjetlo, 12 h tama. Prirast biomase mikroalgi određen je iz razlike optičke gustoće kulture pri 540 nm na početku i kraju uzgoja.

1.1.1.3. Istraživanje rasta slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima dušika

Heterotrofni uzgoj mikroalge *Chlorella vulgaris* pri različitim omjerima C:N proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL, korisnog volumena 200 mL. Sastav podloga opisan je u poglavlju 3.2.10. Korekcija pH-vrijednosti podloge provedena je dodatkom 1 M NaOH pri čemu je početni pH iznosio 6.6. Tikvice s podlogama sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 min. Ohlađene podloge inokulirane su s 20 mL prethodno uzgojenog inokuluma. Uzgoj je vođen šaržno na tresilici pri temperaturi od 25 °C i brzini rotacije od 200 rpm. Tijekom uzgoja iz tikvica je izuzimano po 2 mL uzorka svakih 24 h u svrhu praćenja optičke gustoće kulture i koncentracije glukoze u podlozi. Po završetku uzgoja kultura je centrifugirana 20 min pri 4000 rpm. Vlažna biomasa podvrgnuta je sušenju pri 50 °C, a supernatant je pohranjen na -20 °C do analize. Miksotrofni uzgoj proveden je uz umjetni izvor toplo bijele svjetlosti (2700 K) pri istim uvjetima uz iznimku temperature, koja je iznosila 28 - 32 °C.

1.1.1.4. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u biorekatoru

Heterotrofni uzgoj mikroalge *Chlorella vulgaris* vođen je u laboratorijskom bioreaktoru. Osim hranjive podloge (poglavlje 3.2.11.), pripremljene su otopine za korekciju pH-vrijednosti (1 M H_2SO_4 i 1 M NaOH) i otopina sredstva protiv pjenjenja koncentracije 50 g L^{-1}. Za kalibraciju pH elektrode korišteni su puferi pH-vrijednosti 4.01; 7 i 9.21. Sterilizacija bioreaktora, zajedno sa svim potrebnim priključcima, vršila se u

autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta. Pripremljene otopine, uključujući hranjivu podlogu, sterilizirane su zasebno u autoklavu pri istim uvjetima. Temperatura sadržaja bioreaktora podešena je na 28 °C cirkulacijom rashladne vode kroz dvostruki plašt. Početni volumen podloge u bioreaktoru iznosio je 1.5 L. Podloga je inokulirana s 200 mL miksotrofno uzgojenog inokuluma koji je sadržavao 2.7×10^8 stanica po mililitru kulture.

Proces je vođen šaržno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Iz bioreaktora je svakodnevno izuzimano po 100 mL uzorka u aseptičnim uvjetima u svrhu analize sastava biomase. Rast biomase praćen je gravimetrijskim određivanjem koncentracije suhe tvari, mjerenjem optičke gustoće kulture i određivanjem broja stanica u podlozi. Također, tijekom uzgoja praćena je potrošnja glukoze. Nakon 170 h uzgoja u bioreaktor je dodano 180 mL prihrane u obliku pojedinačnih koncentriranih otopina glukoze, kvaščevog ekstrakta, natrijevog nitrata i ostalih anorganskih soli BBM hranjive podloge. Prihranjivanjem je u podlozi uspostavljen početni omjer C:N (10 mol mol^{-1}). Druga prihrana volumena 100 mL u bioreaktor je dodana nakon 210 h uzgoja te je sadržavala isključivo vodenu otopinu glukoze. Broj okretaja miješala tijekom uzgoja podešen je na 150 rpm. Zadana pH-vrijednost podloge iznosila je 6.6 te je održavana automatskom regulacijom pritoka kiseline i lužine. S obzirom na porast koncentracije stanica u bioreaktoru, protok zraka nakon druge prihrane povećan je s 2 na 3 L min^{-1}. Sredstvo protiv pjenjenja dodavano je po potrebi. Proces je vođen ukupno 236 h te je po završetku uzgoja biomasa mikroalgi izdvojena iz podloge centrifugiranjem 20 min pri 4000 rpm. Talog je sušen u sušioniku pri 50 °C, dok je supernatant pohranjen na -20 °C do analize.

1.1.1.5. Uzgoj mješovite kulture plijesni i mikroalge *Chlorella vulgaris* S2

Šaržni uzgoj mješovite kulture mikroalge *Chlorella vulgaris* i plijesni *A. niger*, *A.fumigatus* te *M. isabellina* proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL. Sastav podloga naveden je u poglavlju 3.2.12. Za svaku mješovitu kulturu pripremljena je kontrolna podloga za uzgoj monokulture mikroalge, odnosno plijesni. Korekcija pH-vrijednosti podloge provedena je dodatkom 1 M NaOH pri čemu je početni pH podloge iznosio 6.6. Tikvice s podlogama sterilizirane su u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 min.

Eksperiment je započet nacjepljivanjem 180 mL podloge s 20 mL miksotrofno uzgojenog inokuluma mikroalgi. Čiste kulture su uzgajane 96 h na tresilici pri 150 rpm i temperaturi od 27 °C te su potom inokulirane suspenzijom spora plijesni. Početni omjer spora plijesni i stanica mikroalgi u podlozi iznosio je 1:60000. Istovremeno su inokulirane kontrolne podloge s 2×10^6 spora plijesni. Uzgoj je nastavljen na tresilici pri gore navedenim uvjetima. Tijekom uzgoja korišten je umjetni izvor toplo-bijele svjetlosti (2700 K) uz režim 12 h svjetlo, 12 h tama. Iz tikvica je povremeno izuzimano po 2 mL uzorka za kontrolu koncentracije glukoze i mikroskopski pregled kulture. Po završetku uzgoja prirasla biomasa u mješovitoj kulturi razdvojena je na dvije frakcije filtracijom kroz gazu. Filtrat koji je sadržavao isključivo stanice mikroalgi naknadno je centrifugiran 20 min pri 4000 rpm. Vlažna biomasa podvrgnuta je sušenju pri 50 °C, a supernatant je pohranjen na -20 °C do analize.

1.2. Analitičke metode

1.2.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Prije nanošenja uzorka, Thoma-ova komorica isprana je destiliranom vodom i etanolom te dobro osušena. Zatim je kap suspenzije kulture (mikroalgi ili plijesni) prenesena na površinu mrežice i prekrivena pokrovnicom. Pokrovnica je fiksirana povlačeći naprijed-nazad sve dok se na oba susjedna polja nisu pojavili Newtonovi kolobari (pokrovnica je čvrsto priljubljena i više se ne može pomicati). Pripravak je promatran pod objektivom povećanja 40 puta. Izbrojane su stanice dijatomeja u četiri velika kvadrata. Izračunata je srednja vrijednost broja stanica te izražena kao ukupan broj stanica po mililitru suspenzije [3]:

$$N = \frac{m \times n \times 400 \times 10000}{Q} \quad [3]$$

Gdje je:

N- ukupan broj stanica po mililitru suspenzije;

m - ukupan broj izbrojanih stanica u kvadratima;

n - razrjeđenje suspenzije;

Q - broj malih kvadrata u kojima su izbrojane stanice;

m/Q - prosječan broj stanica po malom kvadratu;

1.2.2. Brojanje stanica pomoću brojača stanica

Koncentracija stanica po mililitru određena je pomoću brojača stanica CellDrop (DeNovix, SAD). Za određivanje broja stanica korišten je program Brightfield. Kada je uređaj bio spreman za korištenje, mjerenje je započeto pipetiranjem 10 µL uzorka poznatog razrjeđenja. U programu je podešeno razrjeđenje i sliku je fokusirana kako bi uređaj prepoznao stanice. Pomoću brojača stanica CellDrop dobivena je vrijednost koncentracije stanica po mililitru i prosječni promjer stanica.

1.2.3. Mjerenje optičke gustoće

Rast mikroalgi tijekom uzgoja praćen je izuzimanjem uzorka podloge kojem je određena optička gustoća UV/VIS spektrofotometrom pri 540 i 720 nm uz korištenje semi-mikro plastičnih kiveta (Kartell, SAD) volumena 1.5 i 2 mL. Kako bi izmjerena optička gustoća bila u intervalu između 0 i 1, odnosno u području linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji stanica, po potrebi napravljena su odgovarajuća razrjeđenja uzoraka korištenjem destilirane vode.

1.2.4. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari

U uzorcima plijesni određena je suha tvar biomase tako da je na masnom papiru izvagan uzorak plijesni, a zatim je staklena posudica sa uzorkom osušena u sušioniku do konstantne mase pri 100 °C. Nakon hlađenja u eksikatoru, masni papir s osušenom biomasom plijesni je izvagan. Suha tvar biomase izračunata je prema jednadžbi 4. Za uzorke kulture mikroalge, u prethodno osušenu i izvaganu plastičnu kivetu dodan je definirani volumen podloge. Kivete s uzorcima centrifugirane su pri 8000 rpm tijekom 10 minuta. Supernatant je dekantiran, a zaostali talog biomase resuspendiran u destiliranoj vodi kako bi se uklonili ostaci podloge i soli. Nakon ponovnog centrifugiranja, supernatant se također dekantira, a preostali talog

biomase suši se u sušioniku pri 100°C do konstantne mase. Poslije hlađenja u eksikatoru, kiveta s osušenim talogom je izvagana. Koncentracija suhe tvari biomase mikroalge određena je prema jednadžbi 5.

$$X = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \ [4]$$

pri čemu je:

X- suha tvar biomase (%);

m_1- masa vlažne biomase plijesni (g);

m_2- masa osušene biomase plijesni (g).

$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \ [5]$$

pri čemu je:

X- koncentracija suhe tvari biomase (g L^{-1});

m_1- masa prazne osušene kivete (g);

m_2- masa sa osušenom biomasom (g);

V_p- volumen podloge uzet za analizu (L).

1.2.5. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi

Koncentracija nitrita u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji sadrži reagense NO_3-1 i NO_3-2. Tijekom ove metode dolazi do reakcije nitritnih iona u otopini sumporne i fosforne kiseline s 2,6-dimetilfenolom (DMP) pri čemu nastaje 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se detektira spektrofotometrijski. Nitriti se određuju u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzorka kulture mikroalge. U suhu kivetu volumena 15 mL otpipetirano je 2 mL reagensa NO_3-1, 250 µL uzorka (5 - 25 °C) i 250 µL reagensa NO_3-2. Sadržaj je vorteksiran 30 sekundi. Miješanjem dolazi do kemijske reakcije što se primjećuje po promjeni boje i oslobađanju topline. Nakon 10 minuta izmjeri se apsorbancija pri valnoj

duljini 25 od 357 nm pomoću kvarcne kivete (Agilent Technologies, SAD). Za slijepu probu dodana je demineralizirana voda umjesto uzorka. Kako bi se odredila koncentracija nitrita, izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrjeđivanjem otopine natrijevog nitrita koncentracije 1 g L^{-1} s demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija nitrita između 0 i 25 mg L^{-1}. Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Baždarni dijagram je prikazan u prilogu 76.

1.2.6. Određivanje koncentracije fosfata u podlozi

Koncentracija fosfata u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji sadrži reagense PO_4-1 i PO_4-2. Tijekom ove metode dolazi do reakcije ortofosfatnih iona u otopini sumporne kiseline s molibdenovim ionima pri čemu nastaje fosfomolibdenska kiselina. Askorbinska kiselina reducira nastali produkt u fosfomolibden plavo (PMB) koji daje plavo obojenje. Fosfati su određeni u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzorka kulture mikroalge. U suhu kivetu volumena 15 mL otpipetira se 5 mL uzorka (15 – 35 °C), doda 5 kapi reagensa PO_4-1 i jedna mikrožličica reagensa PO_4-2. Sadržaj se zatim vorteksira. Nakon 5 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm pomoću kvarcne kivete (Agilent Technologies, SAD). U slijepoj probi koristi se demineralizirana voda umjesto uzorka. Kako bi se mogla odrediti koncentracija fosfata, izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrijeđivanjem otopine natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata koncentracije 1 g L^{-1} s demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija fosfata između 0.05 i 3.5 mg L^{-1}. Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Baždarni dijagram je prikazan u prilogu 77.

1.2.7. Određivanje koncentracije silicija

Koncentracija silikata u uzorcima je određivana pomoću kita (Merck KGaA, Njemačka). U sumpornoj otopini silikatni ioni reagiraju s molibdenovim ionima dajući pri tome žuto obojenje. Redukcijom nastaje silikomolibden plavi koji se određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 810 nm. U 5 mL uzorka (20- 40°C) dodane su 3 kapi reagensa Si-1. Smjesa je dobro izmiješana te je provjerena pH vrijednost uzorka koja mora

biti od 1.2 do 1.6. Reakcijska smjesa ostavljena je na sobnoj temperaturi 3 minute. Nakon toga dodane su 3 kapi reagensa Si-2 te je smjesa ponovno izmiješana. Zatim je uzorku dodano 0.5 mL regensa Si-3 te je smjesa ponovno izmiješana. Nakon 10 minuta uzorku je određena apsorbancija pri zadanoj valnoj duljini. Slijepa proba sadržavala je demineraliziranu vodu umjesto uzorka. Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem otopine natrijevog metasilikata nanohidrata koncentracije 1 g L^{-1} u demineraliziranoj vodi kako bi se dobile koncentracije silicija u rasponu od 0,1 do 1.5 mg L^{-1}. Izmjerena je apsorbancija otopina poznatih koncentracija i izrađen je baždarni pravac prikazan u prilogu 78.

1.2.8. Određivanje udjela proteina u biomasi

Udio proteina u biomasi mikroalge određen je metodom po Lowry-ju. Tijekom Biuret reakcije dolazi do reagiranja Cu^{2+} iona i peptidne veze u lužnatom mediju pri čemu se razvija tamnoplavo obojenje zbog redukcije Cu^{2+} iona do Cu^{+} iona. U nastalu otopinu se zatim dodaje Folin-Ciocalteu reagens (otopina fosfovolframat-fosfomolibdata) pri čemu smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancem tirozina i triptofana što rezultira plavim obojenjem. U plastičnu epruvetu s 0.5 mL destilirane vode dodaje se volumen podloge koji sadrži 100 µg suhe tvari biomase mikroalgi. Zatim se u resuspendirane stanice dodaje 0.5 mL otopine 1M NaOH. Epruveta je začepljena te stavljena u vodenu kupelj pri 85 °C kroz 5 minuta. Poslije hlađenja sadržaja u epruveti na sobnu temperaturu, sadržaju se dodaje 2.5 mL otopine C (tablica 17). Nakon 10 minuta se naglo doda 0.5 mL otopine D (tablica 17) uz vorteksiranje. Slijepa proba sadržava destliranu vodu umjesto uzorka. Sadržaj epruveta ostavljen je u tami kroz 40 minuta, na sobnoj temperaturi, a potom se uzorku izmjeri apsorbancija pri valnoj duljini 550 nm. Pomoću baždarnog dijagrama izračunata je koncentracija proteina u uzorku (prilog79). Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrijeđivanjem 1 g L^{-1} otopine albumina goveđeg seruma s destiliranom vodom kako bi koncentracije iznosile od 0 do 100 mg L^{-1}. Masa proteina je izračunata pomoću jednadžbe 6, udio proteina u biomasi izračunat je pomoću jednadžbe 7.

$$m_p = \gamma_p \times V_k \text{ [6]}$$

$$w_p = \frac{m_p}{m_x} \times 100\% \text{ [7]}$$

pri čemu je:

m_p – masa proteina (mg);

γ_p – koncentracija proteina (mg L^{-1});

V_k – volumen reakcijske smjese (mL);

w_p – udio proteina u biomasi (%);

m_x – masa biomase dodana u reakcijsku smjesu (mg).

Tablica 17. Sastav otopina za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u

Otopina	Sastav otopine
Reagens A	5 % Na_2CO_3
Reagens B	0.5% $CuSO_4$ u 1% K, Na-tartaratu
Reagens C	Pomiješaju se reagensi A i B u omjeru 50:1
Reagens D	Razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens s destiliranom vodom u omjeru 1:1

1.2.9. Određivanje udjela ugljikohidrata u biomasi mikroalgi

Određivanje ugljikohidrata provedeno je pomoću metode razvijene u National Renewable Energy Laboratory, USA (NREL) laboratoriju. U staklene vijalice odvaže se 10-25 mg osušene i usitnjene biomase mikroalgi te doda 250 µL 72 % sumporne kiseline. Sadržaj u vijalici lagano se promiješa kako bi se osigurao kontakt biomase i kiseline. Vijalice su zatim inkubirane sat vremena pri 30 °C uz povremeno miješanje. Nakon inkubacije se doda 7 mL destilirane vode u vijalice zatvorene gumenim čepom koji je dodatno učvršćen aluminijskim poklopcem te se sadržaj autoklavira 1 sat pri 121 °C. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, izuzet je alikvot od 3 mL kojemu je podešena pH vrijednost na 5 dodatkom kalcijevog klorida. Uzorci se zatim profiltriraju kroz filter pora velične 0,22 µm u vijalicu za UPLC/HPLC analizu. Koncentracija ugljikohidrata određena je UPLC/HPLC analizom uz pomoć jednadžbi pravaca baždarnih dijagrama prikazanih u prilogu 80, a udio monosaharida se izračuna prema jednadžbi 8:

$$w_{UH} = \frac{m_{UH}}{m_x} \times 100\% \quad [8]$$

pri čemu je:

m_{UH} – masa ugljikohidrata (mg);

m_x – masa biomase (mg);

w_{UH} – udio ugljikohidrata u biomasi (%).

1.2.10. Određivanje sastava masnih kiselina i totalnih lipida u biomasi mikroalgi

Tranesterifikacija masnih kiselina provedena je prema metodi razvijenoj u NREL laboratoriju (National Renewable Energy Laboratory, USA) za određivanje ukupnih lipida. Za provođenje prema navedenom protokolu potrebno je pripremiti otopine standarda. Standard metil tridekanoata (C13:0ME), koncentracije 10 mg mL^{-1}, pripremljen je otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard priređen je vaganjem 10 mg pentadekana koji je otopljen u 1 mL heksana. Dobiveni standard potom je razrijeđen s heksanom u omjeru 1:10 (100 µL pripremljenog standarda i 900 µL heksana). Otopine standarda čuvane su u

zamrzivaču pri -20 °C u staklenim vijalama volumena 1,5 mL. U staklene vijale se izvagano je 5-10 mg osušene i usitnjene biomase mikroalge. Biomasi je dodano 20 µL standarda metil tridekanoata, 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,6 M otopine HCl u metanolu. Staklene vijale su začepljene, promiješane na vibromikseru, a zatim inkubirane u vodenoj kupelji kroz sat vremena pri 85 °C. Ohlađenim uzorcima dodano je 1 mL heksana, uzorak je vorteksiran te ostavljen na sobnoj temperaturi kroz sat vremena kako bi se faze razdijelile. Gornja, heksanska faza, sadržavala je estere masnih kiselina te se koristila za daljnju analizu. U vijalicu je izdvojeno 400 µL gornje faze i 10 µL standarda pentadekana. Uzorci su analizirani plinskim kromatografom opremljenim masenim detektorom (GC-FID). Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera smjese standarda za 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Dobivene koncentracije metilnih estera masnih kiselina normalizirane su prema količini standarda C13:0 ME i izražene masenim udjelom u suhoj tvari biomase (jednadžba 9):

$$m_{\mathrm{FAME\ 13\ norm.}} = \frac{\gamma_{\mathrm{Ci}}}{\gamma_{\mathrm{C13}}} \times m_{\mathrm{C13}} \quad [9]$$

pri čemu je:

$m_{FAMEC13\ norm}$ – masa standarda C13:0ME (mg);

γ_{ci} – koncentracija metilnog estera masne kiseline (mg L^{-1});

γ_{C13} – koncentracija standarda metil tridekanoata (C13) (mg L^{-1});

m_{C13} – masa dodanog standarda metil tridekanoata (C13) (mg);

$w_{ci/s.tv.}$ – maseni udio metilnih estera masnih kiselina u suhoj tvari biomase (%);

$m_{s.\ tv.}$ – masa suhe tvari biomase (g)

1.2.11. Analiza lipidnih klasa

Analiza lipidnih klasa napravljena je prema proceduri opisanoj u Gašparović i suradnici (Gašparović i sur., 2017). Ekstrakcija lipida za analizu napravljena je iz 5 mg liofilizirane biomase i modificirane smjese otapala diklormetan-metanol-voda (Bligh i Dyer, 1959). Dodano je 10 mL jednofazne smjese otapala diklormetan-metanol- deionizirana voda (1:2:0.8;

v:v:v) i 15 µg internog standarda te je smjesa tretirana ultrazvukom oko 3 min. Uzorci su čuvani preko noći u frižideru, a sutradan su filtrirani pomoću sinter lijevaka. Talog je dodatno ispran s još 10 mL jednofazne smjese otapa i potom s još 10 mL dvofazne smjese otapala 0.73 % diklormetana i otopine NaCl-a (1:1; v:v) i konačno s 10 mL diklormetana. Prikupljeni ekstrakti lipida su upareni pod inertnim plinom dušikom i čuvani na -20 °C do analize. Prije same analize, uzorci su otopljeni u 44-54 µL diklormetana. Lipidne klase određene su putem tankoslojne klormatografije s FID detektorom (TLC_FID, Iattroscan MK-Vi, Iatron, Japan) uz protok vodika od 160 mL min^{-1} i zraka od 2000 mL min^{-1}. Razdvajanje lipidnih klasa provedeno je pomoću kvarcnih TLC ćelija prevučenih silicijem (Chromarods SIII) (SES-Analysesysteme, Bechenheim, Germany) i kvantificirani pomoću baždarnih pravaca dobivenih analizom mješavine standarda. Za razdvajanje lipidnih klasa korištene su različite smjese otapala, nakon čega je slijedilo parcijalno izgaranje na Chromarods ćelijama. Tijekom 28 minuta korištena je smjesa heksan-dietil eter- mravlja kiselina (97:3:0.2, v:v:v) kako bi se razdvojili ugljikovodici, sterilni esteri i metil esteri. Za razdvajanje triglicerida i slobodnih masnih kiselina korištena je smjesa heksan-dietil eter- mravlja kiselina (80:20:0.2; v:v:v) kroz 30 minuta, a potom kroz dodatnih 20 minuta kako bi se razdvojili slobodni alkoholi, 1,3-digliceridi, steroli i 1,2-digliceridi. Kroz iduće 32 minute korištena je smjesa kloroform-aceton-mravlja kiselina (95:5:0.6; v:v:v) kako bi se razdvojili pigmenti i monogliceridi. Za razdvajanje monogalatosildiacilglicerola i digalactosildiacilglicerola korišten je aceton (100%) za 30 minuta. Sulfokvinovosildiacilglicerol i fosfatidilglicerol razdvojeni su nakon 37 minuta u smjesi aceton-kloroform-metanol-amonijev hidroksid (33:33:33:0.6; v:v:v:v). Smjesa kloroform-metanol-amonijev hidroksid (50:50:5; v.v:v) korištena je kao posljednja smjesa otapala kroz 35 minuta kako bi se razdvojili fosfatidiletanolamini i fosfatidilkolin.

1.2.12. Određivanje ukupnih lipida u biomasi mikroalgi (Bligh i Dyer metoda)

Lipidi iz biomase mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 ekstrahirani su sa smjesom otapala metanol i kloroform prema promijenjenom propisu Bligh i Dyer (Bligh i Dyer, 1959). Biomasa mikroalgi prethodno je osušena na 50 °C i usitnjena u tarioniku. U staklene viale odvagano je po 100 mg biomase. Uzorcima je dodano 4 mL metanola, 2 mL kloroforma i 0,4 mL vode. Sadržaj viala vorteksiran je 60 sekundi te je potom dodano još 2 mL kloroforma i 2

mL vode u svrhu razdvajanja faza. Ponovljeno je vorteksiranje kroz 60 sekundi. Suspendirana biomasa mikroalgi uklonjena je filtriracijom kroz sinter lijevak. Filtrat je izdvojen u čistu staklenu vialu, a talog biomase je ponovno podvrgnut ekstrakciji sa smjesom metanola i kloroforma u omjeru 1:1 (v/v). Nakon filtracije dobiveni filtrat pridodan je prethodnom. Nakon razdvajanja faza, donja kloroformska faza prenesena je pomoću injekcijske igle u prethodno izvaganu staklenu epruvetu. Kloroform je iz uzoraka uklonjen propuhivanjem s plinovitim dušikom. Ekstrahirani lipidi dodatno su osušeni u sušioniku pri 100°C kroz 60 minuta u svrhu uklanjanja eventualnih tragova vode zaostale u kloroformskoj fazi. Epruvete su nakon sušenja ohlađene u eksikatoru i izvagane na analitičkoj vagi. Udio lipida u biomasi mikroalgi izračunat je prema sljedećem izrazu:

$$w_L = \frac{m_2 - m_1}{m_x \times (1 - w_{\frac{H2O}{x}})} \times 100\ (\%)\ [10]$$

gdje je:

m_1 - masa prazne epruvete (g)

m_2 - masa epruvete s lipidima nakon sušenja (g)

m_x - masa biomase uzeta u analizu (g)

$w_{H2\,O/x}$ - udio vlage u biomasi.

1.2.13. Analiza sastava pigmenata

Ekstrakcija pigmenata provedena je u Dionex ASE 350 ekstraktoru (Dionex™ASE™350 Accelerated Solvent Extractor; Thermo Fisher Scientific Inc., Sunnyvale, CA, USA) koristeći 96% etanol kao otapalo. Ekstrakcija je provedena pri 80 °C kroz 5 minuta u četiri ciklusa, 10.34 MPA uz 30 sek propuhivanja dušikom i 50% ispiranja. Svi dobiveni ekstrakti su prije analize filtrirani kroz membranske filtere veličine pora 0.45 µm (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany). Identifikacija i kvantifikacija karotenoida i klorofila provedena je analizom na uređaju za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju Agilent Infinity 1260 opremljenog s Agilent 1260 fotodiodnim detektorom (PDA; photodiode array detector; Agilent, Santa Clara, CA, SAD) i automatskim injektorom. Rezultati su obrađeni pomoću Chemstation programa (Chemstation software; ver. C.01.03). Razdvajanje i

analiza karotenoida i klorofila provedena je na Develosil RP-Aqueus C 30 koloni (250×4.6 mM i.d. 3 µm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD). Mobilna faza je bila mješavina otopina MeOH:MTBE:voda (90:7:3, v/v/v) (otapalo A) i MeOH:MTBE (10:90,v/v) (otapalo B). Na kolonu je injektirano 10 µL, a protok mobilne faze je bio 0.8 mL min^{-1}. Kromatogrami su dobiveni skeniranjem područja od 240 do 770 nm, a signali detektirani na 450 i 660 nm su korišteni za kvantifikaciju karotenoida i klorofila. Identifikacija je provedena usporedbom retencijskog vremena i spektra sa standardima (α- i β-karoten, klorofil a i b) ili spektrima objavljenima u literaturi, te je kvantifikacija napravljena pomoću baždarnih pravaca.

1.2.14. Spektrofotometrijska analiza sastava pigmenata

Kako bi se odredili pigmenti u biomasi, najprije je napravljena ekstrakcija iz vlažne biomase s 90 % otopinom acetona. Kivete u kojima se provodi analiza potrebno je zaštititi aluminijskom folijom radi sprječavanja raspada fotosenzitivnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Volumen od 14 mL kulture mikroalge centrifugiran je pri 8000 rpm tijekom 10 minuta. Supernatant je dekantiran, a talog resuspendiran u destiliranoj vodi te ponovno centrifugiran kako bi se uklonili ostaci podloge i soli. Dobivenom čistom talogu biomase dodano je 2 grama staklenih kuglica (B. Braun Biotech International GmbH, Njemačka) i 2 mL 90 % (v v^{-1}) acetona. Kivetu je potrebno vorteksirati nekoliko puta po 30 sekundi s hlađenjem na ledu između svakog vorteksiranja. Zatim je provedeno centrifugiranje kroz 10 minuta pri 5000 rpm. Supernatant je izdvojen u čistu kivetu obloženu alumnijskom folijom, a preostali talog biomase ponovno je podvrgnut ekstrakciji do potpunog obezbojenja biomase. Nakon svakog postupka ekstrakcije supernatant je izdvojen u kivetu koja sadrži supernatant iz prethodnog koraka ekstrakcije. Dobivenom supernatantu spektrofotometrijski se određuje koncentracija klorofila a, b i c pri valnim duljinama 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm. Koncentracija klorofila a, b i c izračunata je prema izrazima 11, 12, 13:

$$\text{Klorofil a} = \frac{\left(11.85 \times (OD_{664} - OD_{750}) - 1.54 \times (OD_{647} - OD_{750}) - 0.08 \times (OD_{630} - OD_{750})\right) \times Ve}{L \times V_f} \quad [11]$$

$$\text{Klorofil b} = \frac{(-5.43 \times (OD_{664} - OD_{750}) + 21.03 \times (OD_{647} - OD_{750}) - 2.66 \times (OD_{630} - OD_{750})) \times Ve}{L \times V_f} \quad [12]$$

$$\text{Klorofil c} = \frac{(-1.67 \times (OD_{664} - OD_{750}) + 7.6 \times (OD_{647} - OD_{750}) + 24.52 \times (OD_{630} - OD_{750})) \times Ve}{L \times V_f} \quad [13]$$

pri čemu je:

L – duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm);

V_e – ukupan volumen ekstrakta (mL);

V_f – volumen stanične kulture koji je centrifugiran (L).

1.2.15. Priprema ekstrakta mikroalgi za ispitivanje antioksidativnog potencijala

Za pripremu mikroalgalnih ekstrakta u svrhu ispitivanja njihovog antioksidacijskog potencijala, 60 mg liofilizirane biomase resuspendirano je u 600 µL 100 % metanola. Ekstrakcija je provedena kroz sat vremena na 50 °C u ultrazvučnoj kupelji, nakon čega je supernatant odvojen, a biomasa ponovno podvrgnuta esktrakciji. Drugi korak esktrakcije također se sastojao od dodatka 600 µL 100% metanola i ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji kroz sat vremena. Dobiveni ekstrakt pridružen je onome iz prvog koraka. Ekstrakti su do analiza spremljeni na -20 °C. Kako bi se odredila koncentracija suhe tvari ekstrakta, alikvot ekstrakta uparen je i izvagan, a koncentracija potom izražena u mg mL^{-1}.

1.2.16. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su prema metodi opisanoj u radu Bhattacharjya i suradnika (Bhattacharjya i sur., 2020). Mikrolgalni ekstrakt je pripremljen prema metodi opisanoj u poglavlju 3.5.14. U reakcijsku smjesu dodano je 0.2 mL ekstrakta, 0.2 mL 10% aluminijevog klorida, 0.2 mL 1 M kalijevog acetata i 1.4 mL destilirane vode. Reakcijskoj smjesi potom je izmjerena apsorbancija na 415 nm koristeći kvercentin kao standard. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih fenola prikazan je u prilogu 81.

1.2.17. Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenoli u ekstraktu biomase mikroalgi pripremljenom kako je opisano u poglavlju 3.5.14. određeni su prema metodi opisanoj u radu Safafar i suradnika iz 2015. godine (Safafar i sur., 2015). Reakcijska smjesa sastojala se od 100 µL mikrolgalnog ekstrakta, 600 µL demineralizirane vode, 500 µL Folin-Ciocalteu reagensa i 1500 µL 20% (m v^{-1}) otopine natrijevog karbonata. Smjesa je pripremljena u odmjernoj tikvici od 10 mL koja je dopunjena do volumena od 10 mL demineraliziranom vodom. Nakon inkubacije u mraku kroz 60 minuta na sobnoj temperaturi, izmjerena je apsorbancija na 750 nM. Kao standard korištena je galna kiselina, a rezultati koncentracije fenola su prikazani kao ekvivalenti galne kiseline po gr suhe tvari esktrakta. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu 82.

1.2.18. Određivanje antioksidacijskog potencijala ABTS metodom

Antioksidativni potencijal mikroalgalnih ekstrakata (poglavlje 3.5.14.) određen je ABTS metodom, a postupak je preuzet od Li i suradnika (Li i sur., 2007). Osnovna otopina ABTS-a pripremljena je miješanje 88 µL 140mM kalijevog persulfata i 50 mL 7mM otopine ABTS-a. Sve otopine pripremljene su u 100% metanolu. Reakcijska smjesa ostavljena je u tami kroz 24 sata nakon čega je tako pripremljeni ABTS reagens bio spreman za korištenje. Prije analize, otopina ABTS-a razrijeđena je pomoću metanola kako bi apsorbancija otopine na 734 nm iznosila 0.7±0.05. Uzorcima je antioksidacijski potencijal određen dodatkom 50 µL ekstrakta u 1.9 mL ABTS otopine. Nakon šest minutne reakcije u mraku, uzorku je izmjerena apsorbancija na 734 nm, a ukupna antioksidativna aktivnost je izražena kao ekvivalent troloxa po gramu suhe tvari ekstrakta. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu 84.

1.2.19. Određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom

DPPH test napravljen je kako je opisano u radu Assunção i suradnika (Assunção i sur., 2017). DPPH reagens pripremljen je otapanjem 4.8 mg DPPH (Sigma, St. Louis, Mo, USA) u 200 mL 100% metanola do konačne koncentracije od 0.06 mM. Razrjeđivanjem pomoću 100 %-tnog metanola mikroalgallni ekstrakti razrijeđeni su 2, 4, 8 i 20 puta. Reakcija je započeta

dodatkom 200 µL pripremljenog razrjeđenja u 1.8 mL DPPH reagensa te je nakon 15-minutne reakcije u tami izmjerena apsorbancija na 515 nm. Antioksidacijski potencijal ekstrakata određen je izračunom postotka inhibicije (PI) (jednadžba 14) i koncentracije ekstrakta potrebne za 50%-tnu inhibiciju:

$$\mathrm{PI} = \frac{\mathrm{Abs_{DPPH}} - \mathrm{Abs_{uzorak}}}{\mathrm{Abs_{DPPH}}} \times 100\ \%\ [14]$$

gdje je:

PI- postotak inhibicije (%);

Abs_{DPPH}- apsorbancija reagensa;

Abs_{uzorak}- apsorbancija uzorka.

Za izračun IC_{50} vrijednosti, u korelaciju je stavljena koncentracija mikroalgalnog ekstrakta u mg mL^{-1} i odgovarajuća PI vrijednost, te je dobivena jednadžba pravca (R2≥0.98) na temelju koje je IC_{50} vrijednosti izračunata prema jednadžbi 15:

$$\mathrm{IC_{50}} = \frac{50 - \mathrm{b}}{\mathrm{m}}\ (\mathrm{mg\ mL^{-1}})\ [15]$$

gdje je:

b odsječak na Y osi;

a m -nagib pravca.

Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijskog potencijala ABTS metodom prikazan je u prilogu 83.

1.2.20. Priprema ekstrakata mikroalgi za ispitivanje antimikrobnog djelovanja

Za pripremu ekstrakta pomiješano je 15 mg liofilizirane mikroalgalne biomase u 150 µL 100% metanola. Ekstrakcija je napravljena pri 15 °C u ultrazvučnoj kupelji kroz 1 sat. Supernatant je potom odvojen od biomase u čistu staklenu vialicu zatvorenu teflonskim čepom. Biomasa je podvrgnuta još jednom koraku ekstrakcije dodatkom 150 µL metanol kroz sat vremena u ultrazvučnoj kupelji. Ekstrakt nakon drugog koraka ekstrakcije pridodan je

ekstraktu iz prvog koraka i kao takav korišten je za ispitivanje antimikrobnog potencijala. Kako bi se odredila koncentracija suhe tvari ekstrakta, ekstrakt je uparen u struji dušika i izvagan te je koncentracija izražena u mg mL^{-1}.

1.2.21. Ispitivanje antimikrobnog potencijala metodom disk difuzije

Za ispitivanje antimikrobnog potencijala mikroalgalnih ekstrakata kao test organizmi korištene su patogene bakterije *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, plijesan *Aspergillus niger* i kvasac *Candida utilis*. Test mikroorganizmi uzgojeni su u LB hranjivom mediju za rast (poglavlje 3.2.15.), te je 100 µL prekonoćne kulture nacijepljeno na čvrste LB podloge u Petrijevim zdjelicama. Na sterilne diskove dodano je 50 µL mikroalgalnog ekstrakta te su oni položeni na površinu čvrste podloge inokuliran test mikroorganizmom. Antibiotik neomicin i nistatin u koncentraciji od 50 mg mL^{-1} korišteni su kao pozitivna kontrola, a 100% metanol kao negativna. Nacijepljene ploče s diskovima inkubirane su kroz 24-28 h na 30 °C, nakon čega su pomoću ravnala izmjereni promjeri inhibicijskih zona. Svi eksperimenti provedeni su u dvije paralele.

1.2.22. Određivanje sadržaja pepela u biomasi mikroalgi

Udio pepela u biomasi mikroalgi određen je gravimetrijski. U čiste, prethodno žarene i izvagane porculanske lončiće odvagano je 500 mg biomase osušene pri 50 ºC. Uzorak je sušen pri temperaturi od 105 ºC u sušioniku do konstantne mase te je početna masa korigirana za sadržaj vlage. Prije žarenja u mufolnoj peći lončići s biomasom zagrijavani su na Bunsenovom plameniku do potpune karbonizacije. Lončići s biomasom prenijeti su u mufolnu peć prethodno zagrijanu na 550 ºC i žareni do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru do sobne temperature lončići su izvagani s točnošću ± 0,001 g. Udio pepela u biomasi izračunat je prema izrazu:

$$w_p = \frac{m_p}{m_u \times (1 - w_{H2O})} \times 100\ (\%)\ [16]$$

gdje je:

m_p- masa pepela (mg)

m_u- masa uzorka (mg)

w_{H2O}- udio vode u uzorku.

1.3. Izračun pokazatelja uspješnosti procesa

Paramteri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednadžbama [17]-[21]:

Prinos biomase:

$$Y_x = X - X_0 \text{ [17]}$$

gdje je:

Y_x- prinos biomase (g L^{-1})

X-koncentracija biomase na kraju uzgoja (g L^{-1})

X_0- početna koncentracija biomase (g L^{-1}).

Specifična brzina rasta:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0} \text{ [18]}$$

gdje je:

μ- specifična brzina rasta (h^{-1});

X- koncentracija biomase u vremenu t_n (g L^{-1});

X_0- početna koncentracija biomase (g L^{-1});

Δt- interval vremena (t_n-t_o).

Produktivnost sinteze biomase:

$$Pr_x = \frac{x}{t_u} \text{ [19]}$$

gdje je:

Pr_x- produktivnost sinteze biomase (g L^{-1} dan^{-1})

x- koncentracija biomase u vremenu t_n (g L^{-1})

t_u- trajanje uzgoja [dan].

Produktivnost sinteze lipida:

$$Pr_L = \frac{x \times w_L}{t_u} \quad [20]$$

gdje je:

Pr_x- produktivnost sinteze lipida (g L^{-1} dan^{-1})

x- koncentracija biomase u vremenu t_n (g L^{-1})

w_L- udio lipida u biomasi u vremenu t_u (%)

t_u- trajanje uzgoja [dan].

Koeficijent konverzije supstrata u biomasu:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad [21]$$

gdje je:

$Y_{X/S}$ - koeficijent konverzije supstrata u biomasu (g g^{-1})

X_0 - početna koncentracija biomase (g L^{-1})

X - koncentracija biomase na kraju uzgoja (g L^{-1})

S_0 - početna koncentracija supstrata (g L^{-1})

S - koncentracija supstrata na kraju uzgoja (g L^{-1}).

3. REZULTATI

Rezultati istraživanja u sklopu izrade ove doktorske disertacije podijeljeni su u četiri skupine s obzirom na ciljeve istraživanja. Prvi dio obuhvaća rezultate izolacije i identifikacije izoliranih morskih i slatkovodnih mikroalgi. Potom su u drugom dijelu prikazani rezultati njihove karakterizacije s obzirom na produktivnost, brzinu rasta, sastav biomase, te antimikrobno i antioksidativno djelovanje ekstrakata biomase mikroalgi. Treći dio obuhvaća rezultate optimizacije uzgoja odabranih vrsta izoliranih mikroalgi s obzirom na sastav podloge za uzgoj, koncentraciju nutrijenata, fotobioreaktorskog sustava i načina vođenja procesa te izdvajanja biomase na kraju uzgoja. Četvrti dio obuhvaća rezultate karakterizacije i optimizacije uzgoja slatkovodnih mikroalgi izoliranih iz rijeke Gacke.

4.1. Izolacija, identifikacija i karakterizacija izoliranih morskih mikroalgi

Iz uzoraka morske vode uzorkovanih na nekoliko lokacija na obali Jadranskog mora izolirano je nekoliko mikroalgalnih vrsta. Isto tako, iz uzoraka vode izuzete na vodotoku rijeke Gacke izolirano je nekoliko vrsta slatkovodnih mikroalgi. Nakon pročišćavanja kulture do kseničnosti, provedena je njihova identifikacija analizom molekularnih biljega. Identifikacija je provedena sekvencioniranjem 18S rRNA gena, te u potrebi preciznije identifikacije sekvencioniranjem ITS i LSU gena. Cijanobakterije su identificirane sekvencioniranjem 16S rRNA gena. Dobivene sekvence DNA potom su analizirane pomoću BLAST alata kako bi se utvrdio identitet analizirane mikroalge. Kao pomoć pri identifikaciji određene su i morfološke karakteristike izoliranih mikroalgi pomoću svjetlosnog mikroskopa. Mikroskopske slike izolata kao i sekvence dobivene sekvencioniranjem 18S rRNA, 16S rRNA, ITS i LSU gena svakog izolata prikazane su Prilogu 8.1. Identifikacija izoliranih mikroalgi. Osim toga prikazani su i rezultati usporedbe dobivenih sekvenci s NCBI bazom pomoću BLAST alata. Klasifikacija izoliranih morskih mikroalgi temeljem rezultata analize navedenih molekularnih biljega, odnosno sekvencioniranja prikazana je u Tablici 16. Klasifikacija izoliranih slatkovodnih mikroalgi prikazana je u Tablici 17.

Tablica 18. Identificirani sojevi morskih mikroalgi

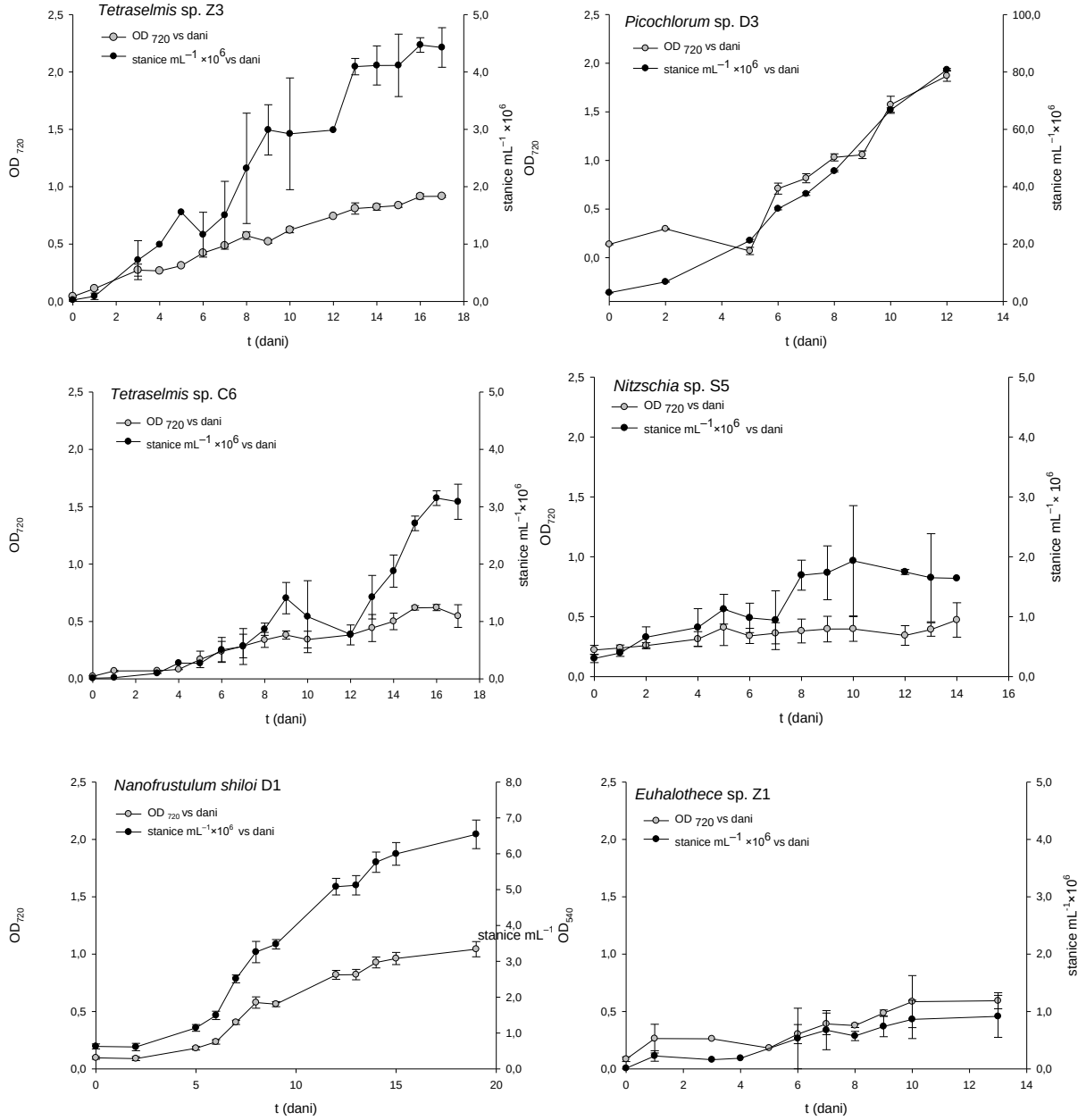
Soj	Domena	Odjeljak	Razred	Red	Porodica	Rod	Vrsta	Sličnost
Soj B1	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculineae	-	-	
Soj A12	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculineae	-	-	
Soj E7	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculineae	-	-	
Soj B2	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculineae	-	-	
Soj D5	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Naviculales	Naviculineae	-	-	
Soj D1	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Fragilariales	Staurosiraceae	*Nanofrustulum*	*shiloi*	99.27 %
Soj S5	Eukaryota	Bacillariophyta	Bacillariophyceae	Bacillariales	Bacillariaceae	*Nitzschia* ili *Psammodictyon*	-	97.90 %
Soj Z3	Eukaryota	Chlorophyta	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	*Tetraselmis*	*rubens* ili *marina*	100 % i 100%
Soj C6	Eukaryota	Chlorophyta	Chlorodendrophyceae	Chlorodendrales	Chlorodendraceae	*Tetraselmis*	*rubens* ili *suecica*	96.46 % i 96.46%
Soj D3	Eukaryota	Chlorophyta	Trebouxiophxceae	Chlorellales	Chlorellaceae	*Picochlorum*	-	99.87%
Soj C1	Prokaryota	Cyanobacteria	Oscillatoriophyceae	Chroococales	Aphanothecaceae	*Euhalothece* ili *Halothece* sp	-	97.94% i 97.06%

Tablica 19. Identificirani sojevi slatkovodnih mikroalgi

Soj	Domena	Odjeljak	Razred	Red	Porodica	Rod	Vrsta	Sličnost
Soj S1	Eukaryota	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlorococcaceae	*Chlorococcum*	-	99.93%
Soj S2	Eukaryota	Chlorophyta	Trebouxiophxceae	Chlorellales	Chlorellaceae	*Chlorella*	*vulgaris*	100%
Soj S3	Eukaryota	Chlorophyta	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae	*Tetradesmus*	*obliquus*	100%
Soj S4	Eukaryota	Chlorophyta	Chlorophyceae	Sphaeropleales	Scenedesmaceae	*Tetradesmus*	*obliquus*	100%

4.2. Karakterizacija izoliranih mikroalgi

U ovom poglavlju prikazani su rezultati uzgoja izoliranih mikroalgi u izvornoj f/2 podlozi u svrhu njihove karakterizacije. Krivulje rasta, odnosno promjena optičke gustoće i koncentracije stanica tijekom uzgoja u f/2 podlozi izoliranih morskih mikroalgi prikazana je na slici 14.



Slika 14. Krivulje ovisnosti optičke gustoće (OD_{720}) i broja stanica $mL^{-1} \times 10^6$ u vremenu (dani)

Gravimetrijskom metodom određena je koncentracija suhe tvari biomase na temelju koje je izračunata i produktivnost sinteze biomase za svaki istraženi soj mikroalge. Osim toga, iz krivulja rasta izračunate su i specifične brzine rasta te su rezultati prikazani u tablici 20.

Tablica 20. Koncentracija biomase, produktivnost sinteze biomase i specifična brzina rasta izolata morskih mikroalgi

Soj	X (g L^{-1})	Pr_x (mg L^{-1} dan^{-1})	μ (dan^{-1})
Tetraselmis sp. Z3	0.48±0.11	28.00±0.11	0.064±0.022
Picochlorum sp. D3	0.41±0.01	33.98±0.02	0.217±0.089
Tetraselmis sp. C6	0.45±0.04	26.29±2.14	0.076±0.027
Nitzschia sp. S5	0.28±0.14	19.74±3.25	0.15±0.003
Nanofrustulum shiloi D1	0.10±0.01	12.8±3.78	0.099±0.006
Euhalothece sp. C1	0.28±0.08	24.42±1.64	0.095±0.002

Potom je napravljena analiza makromolekulskog sastava suhe biomase mikroalgi te su rezultati prikazani u tablici 21. Napravljena je kiselinska hidroliza biomase, te je analizom hidrolizata tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti određen sastav ugljikohidrata prisutnih u biomasi. Monosaharidi prisutni u hidrolizatu i pripadajući udjeli u ukupnim ugljikohidratima prikazani su u tablici 22. Udio ukupnih ugljikohidrata (tablica 21) izražen je kao zbroj monosaharida u kiselinskom hidrolizatu biomase mikroalgi (poglavlje 3.5.9.).

Tablica 21. Makromolekulski sastav izoliranih morskih mikroalgi

Soj	Lipidi (%)	Proteini (%)	Ugljikohidrati (%)
Tetraselmis sp. Z3	4.87±0.03	36.32±1.66	11.18±0.76
Picochlorum sp. D3	7.98±1.21	54.38±35.48	8.84±0.11
Tetraselmis sp. C6	4.77±0.38	57.94±5.45	17.42±0.83
Nitzschia sp. S5	7.76±0.32	52.72±3.64	9.13±1.26
Nanofrustulum shiloi D1	33.65±4.51	56.22±1.54	16.58±0.80
Euhalothece sp. C1	2.98±0.07	32.83±10.85	15.58±0.80

Tablica 22. Sastav ugljikohidrata u izoliranim morskim mikroalgama

Soj	glukuronska kiselina (%)	glukoza (%)	galaktoza (%)	ksiloza (%)	ramnoza (%)	arabinoza (%)	fukoza (%)
Tetraselmis sp. Z3	38.85±2.18	40.37±3.17		17.82±1.78	2.63		3.32±0.49
Picochlorum sp. D3	11.26±1.01	46.51±2.22		10.93±0.69	8.21±0.18		23.09±0.25
Tetraselmis sp. C6	46.53±5.58	41.19±0.77	8.78±2.69			10.49±0.01	
Nitzschia sp. S5	6.87±1.45	37.45±4.07		4.54±1.98			31.56±3.54
Nanofrustulum shiloi D1	6.08±0.63	73.49±2.62		14.44±0.60			4.75±0.23
Euhalothece sp. C1	9.51±2.61	59.50±0.85	6.19±2.39		5.14±0.73	17.09±0.79	6.29±1.00

*fruktoza-nije detektirana u niti jednom soju

In-situ ekstrakcijom i transesterifikacijom masnih kiselina i analizom dobivenih ekstrakata plinskom kromatografijom određen je profil masnih kiselina u lipidima istraživanih mikroalgi (tablica 23). Na temelju dobivenih rezultata izračunat je i udio ukupnih lipida izražen kao ukupni metilni esteri masnih kiselina (tablica 21).

Tablica 23. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranih morskih mikroalgi

soj masna kiselina	Z3	D3	C6	S5	D1	C1
C11:0						1,45±0,15
C14:0		0.38±0.08		10.59±0.32	0.66±0.34	
C14:1 cis9					0.07±0.01	
C15:0					0.19±0.14	
C15:1 cis 10					2.45±2.98	
C16:0	31.63±1.1	28.14±2.61	33.25±1.35	23.19±0.26	30.76±0.27	28.40±0.45
C16:1 cis 9	3.54±0.12	1.36±0.03	2.24±0.09	56.12±0.14	41.57±2.18	14.07±0.03
C17:0	1.02±0.23	22.23±2.47	2.62±0.03	1.06±0.002	0.57±0.14	48.79±0.42
C17:1 cis 10	0.77±0.31		2.90±0.18	4.75±0.15	1.88±0.73	
C18:1 cis 9	16.56±0.63	2.92±0.65	9.55±0.37		0.67±0.17	0.84±0.26
C18:2 trans 9, 12						2.54±0.31
C18:2 cis 9, 12	8.5±0.13	33.33±1.76	12.69±0.39		1.88±0.55	3.99±0.7
C18:3 cis 6,9,12						
C18:3 cis 9, 12, 15	22.50±0.47	11.59±0.91	21.75±0.82		0.72±0.34	
C20:1 cis 11	3.81±0.45				0.14±0.03	
C20:3 cis 8, 11, 14					2.41±3.73	
C20:4 cis 5, 8, 11, 14			1.32±0.03		9.29±3.3	0.18±0.04
C20:5 cis 5, 8, 11, 14, 17	8.58±1.05		7.01±3.17	3.48±0.19	6.79±1.84	
C24:1 cis 15					0.19±0.05	
C22:6 cis 4, 7, 10, 13, 16, 19	1.97±0.78				0.47±0.37	
SFA	33.81±1.68	52.98±2.33	36.88±1.38	34.84±0.06	32.35±0.85	78.65±0.93
MUFA	24.66±0.58	7.74±3.35	18.19±0.61	64.68±0.13	46.08±5.40	14.70±0.61
PUFA	41.53±1.11	39.28±3.95	44.93±1.99	3.48±0.19	21.57±6.09	6.65±0.84

Ekstrakcija lipida provedena je i u svrhu analize lipidnih klasa. Razdvajanje i kvantifikacija lipidnih klasa provedeno je pomoću kvarcnih TLC (tankoslojna tekućinska kromatografija) ćelija opremljenih FID detektorom (poglavlje 3.5.11.). Udjeli pojedinih lipidnih klasa u ukupnim lipidima prikazani su u tablici 24.

Tablica 24. Sastav lipida izoliranih morskih mikrolagi

	Soj					
Lipidna klasa (%, g g^{-1})	*Tetraselmis* sp. Z3	*Picochlorum* sp. D3	*Tetraselmis* sp. C6	*Nitzschia* sp. S5	*Nanofrustulum shiloi* D1	*Euhalothece* sp. C1
Neutralni lipidi	17.07	17.93	15.22	46.60	68.36	18.58
Monogliceridi	0.00	2.95	1.45	6.24	1.12	0.00
1,2 digliceridi	0.31	0.24	0.59	0.00	0.45	0.15
1,3-digliceridi	0.00	0.96	0.31	0.00	0.00	0.00
Trigliceridi	0.59	5.12	0.58	0.00	0.71	0.90
Slobodne masne kiseline	10.25	5.80	6.86	37.35	58.34	15.23
Steroli	2.21	2.53	2.77	1.30	2.03	0.61
Sterolni esteri	3.71	0.34	2.66	1.71	5.71	1.69
Polarni lipidi	77.25	78.33	76.29	49.33	29.03	74.59
Glikolipidi	21.77	33.97	26.31	19.08	13.30	17.02
Monogalaktozildiacilglicerol	7.19	22.48	9.29	8.46	8.71	4.66
Digalaktozildiacilglicerol	1.35	1.69	2.14	1.67	0.58	0.59
Sulfokvinovozildiacilglicerol	13.23	9.80	14.89	8.95	4.02	11.78
Fosfolipidi	55.47	44.36	49.98	30.25	15.74	57.56
Fosfatidilglicerol	36.32	21.93	36.08	21.74	10.00	36.83
Fosfatidiletanolamini	18.67	14.35	13.26	8.24	5.25	19.88
Fosfatidilkolin	0.49	8.08	0.63	0.27	0.50	0.85
Ugljikovodici	2.10	2.77	3.41	1.94	1.53	3.77
Pigmenti	3.58	0.96	5.09	2.13	1.06	3.07

Kako bi se utvrdio potencijal izoliranih mikroalgi kao potencijalnih izvora pigmenata, provedena je i ekstrakcija pigmenata iz biomase (poglavlje 3.5.13). Analiza najzastupljenijih pigmenata te njihova kvantifikacija određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (poglavlje 3.5.13.). Profil pigmenata u biomasi izoliranih morskih mikroalgi prikazan je u tablici 25.

Tablica 25. Sastav pigmenata izoliranih morskih mikroalgi

	mg/ 100 g suhe tvari biomase					
Pigment	*Tetraselmis* sp. Z3	*Picochlorum* sp. D3	*Tetraselmsis* sp. C6	*Nitzschia* sp. S5	*Nanofrustulum shiloi* D1	*Euhalothece* sp. C1
Fukoksantin	4.91	2.93	7.59	40.11	39.54	n.d.
Neoksantin	11.62	14.92	79.44	5.53	n.d.	2.19
Zeaksantin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lutein	37.12	233.39	164.84	55.56	n.d.	22.45
Ksantaksantin	n.d.	47.54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α-karoten	n.d.	n.d.	1.6	n.d.	n.d.	n.d.
β-karoten	0.19	0.11	1.01	n.d.	0.36	0.13
Klorofil b	19.85	n.d.	97.91	n.d.	n.d.	n.d.
Klorofil a	31.5	116.18	156.12	36.38	131.07	12.52
Ukupni pigmenti	105.19	415.07	508.51	137.58	170.97	37.29

Ekstrakcija antimikrobnih i antioksidativnih spojeva iz mikroalgalne biomase provedena je pomoću metanola na način opisan u poglavlju 3.5.15. U metanolnim ekstraktima spektrofotometrijskim metodama određen je sadržaj ukupnih flavonoida i fenola (poglavlje 3.5.16. i 3.5.16.), te ukupni antioksidacijski potencijal ekstrakata primjenom ABTS i DPPH testa (poglavlje 3.5.18. i 3.5.19.). Rezultati su prikazani u tablici 26.

Tablica 26. Ukupni fenoli, flavonoidi i antioksidativni potencijal (ABTS i DPPH test) odabranih morskih mikroalgi

	Nitzschia sp. S5	*Nanofrustulum shiloi* D1	*Picochlorum* sp. D3	*Tetraselmis* sp. Z3	*Tetraselmis* sp. C6	*Euhalothece* sp. C1
flavonoidi (mg kvercentina g^{-1} suhe tv.)	0.67±0.10	0.38±0.01	0.37±0.02	0.21±0.05	0.44±0.02	0.14±0.02
fenoli (mg galne kis. g^{-1} suhe tv.)	22.64±1.86	11.67±0.27	16.53±2.87	6.51±0.28	22.33±0.24	5.99±0.17
Ukupni karotenoidi (mg/100 g suhe tv.)	101.2	39.9	298.89	53.84	254.48	24.77
ABTS (µmol trolox ekvivalenata g^{-1})	75.82±7.88	12.75±4.65	54.42±0.04	51.36±5.11	170.96±5.26	73.83±1.40
DPPH (µmol trolox ekvivalenata g^{-1})	86.93±3.27	36.53±0.59	19.51±1.36	80.27±1.86	199.97±5.51	90.69±7.43
IC_{50} (mg mL^{-1})	1.82±0.08	4.05±0.19	1.90±0.12	2.05±0.26	0.87±0.23	1.80±0.16

*koncentracije ekstrakata (mg mL^{-1}): *Nitzschia* sp. S5 (5.20 ± 0.03); *Nanofrustulum shiloi* D1 (10.76 ± 0.08); *Picochlorum* sp. D3 (10.49 ± 0.05); *Tetraselmis* sp. Z3 (4.79 ± 0.57); *Tetraselmis* sp. C6 (2.92 ± 0.38); *Euhalothece* sp. C1 (5.91 ± 0.04)

Osim toga istraženo je i antimikrobno djelovanje ekstrakta odabranih mikroalgi na nekoliko patogenih bakterijskih vrsta, kvasac i plijesan primjenom metode disk difuzije (poglavlje 3.5.21.). Izmjerene zone inhibicije nakon 24-satnog uzgoja prikazane su u tablici 27.

Tablica 27. Antimikrobno djelovanje metanolnog ekstrakta odabranih sojeva morskih mikroalgi

	Zona inhibicije (mm±s.d.)						K^+	K^-
	Nitzschia sp. S5	*Nanofrustulum shiloi* D1	*Picochlorum* sp. D3	*Tetraselmis* sp. Z3	*Tetraselmis* sp. C6	*Euhalothece* sp. C1	(neomicin/ nistatin**)	(metanol)
E. coli	11.00±0.01	12.00±0.01	13.00±0.01	-	26.05±0.07	13.10±0.14	-	-
S. typhimurium	10.50±0.71	9.05±0.07	9.00±0.09	-	20.00±4.24	17.50±4.95	27±2.12	-
P. aeruginosa	9.50±3.54	9.50±2.12	9.00±0.07	16.70±0.42	17.00±0.09	12.00±1.41	41±3.0	15±1.41
B. subtilis	15.00±1.41	20.00±0.01	8.50±0.71	-	10.00±0.07	-	21±2.0	9±0.71
S. aureus	9.05±0.07	10.00±0.01	14.50±2.12	14.50±0.71	22.00±0.1	26.00±1.26	21±1.5	-
E. faecalis	-	-	nema rasta	18.00±4.24	-	9.00±0.19	19±2.0	11±0.58
C. utilis	11.00±4.24.	9.00±0.07	9.00±0.14	7.05±0.07	12.00±4.24	5.5.±2.12	21±1.7**	13±2.12
A. niger	-	-	-	-	-	-	30±1.45**	-

*koncentracije ekstrakata (mg mL^{-1}): *Nitzschia* sp. S5 (10.63 ± 0.34); *Nanofrustulum shiloi* D1 (22.10 ± 0.52); *Picochlorum* sp. D3 (21.76 ± 0.52); *Tetraselmis* sp. Z3 (10.72 ± 0.15); *Tetraselmis* sp. C6 (6.39 ± 0.01); *Euhalothece* sp. C1 (12.18 ± 0.39)

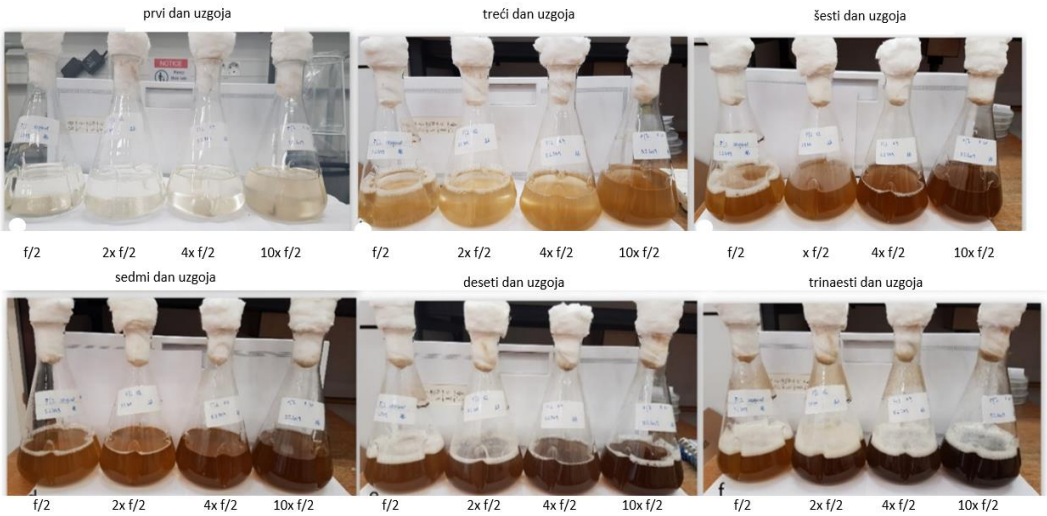
**antibiotik neomicin se koristio kao pozitivna kontrola za bakterijske culture, a nistatin za kvasac *C. utilis* i plijesan *A. niger*

4.3. Optimizacija uzgoja odabranih sojeva morskih mikroalgi

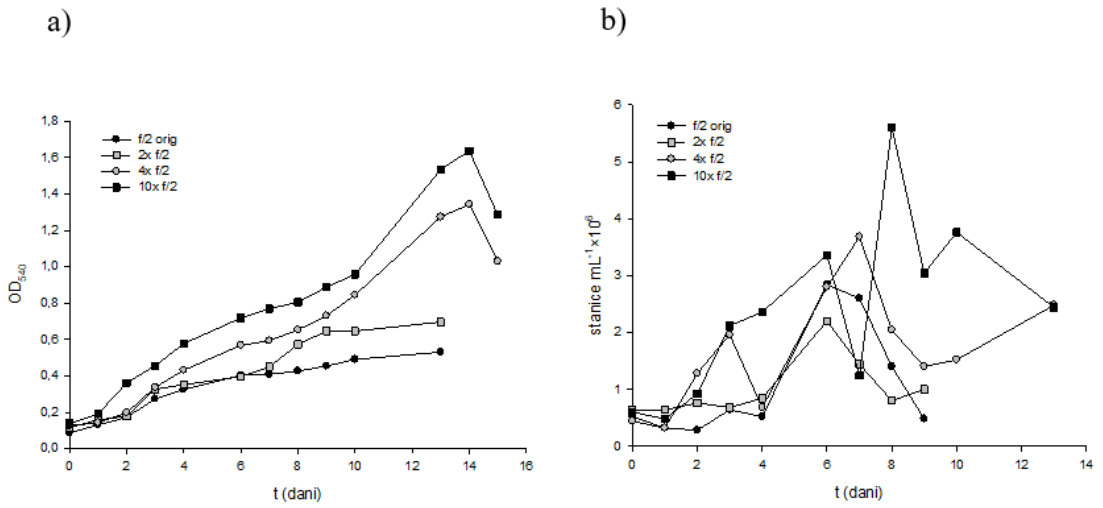
U trećem dijelu ovog doktorskog rada prikazani su rezultati optimizacije uvjeta uzgoja za odabrane sojeve mikroalgi. Istražen je utjecaj koncentracije makronutrijenata u hranjivom mediju, način vođenja procesa (šaržni, šaržni s pritokom supstrata) i vrsta bioreaktorskog sustava (bioreaktor s miješalom, barbotirajuća kolona, otvoreni bazen). Naposlijetku je istraženo nekoliko načina izdvajanja biomase nakon uzgoja (flokulacija potaknuta promjenom pH, željezovim kloridom i hitozanom i bioflokulacija pomoću plijesni).

4.3.1. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Jedna od mikroalgi odabranih za nastavak istraživanja je dijatomeja *Nitzschia* sp. S5 koja se istaknula značajno većom koncentracijom biomase na kraju uzgoja u izvornoj f/2 podlozi u odnosu na drugog predstavnika iz razred Bacillariophyceae, *Nannofrustulum shiloi* D1. Kao prvi korak u optimizaciji hranjive podloge za uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 korištena je f/2 hranjiva podloga različitih koncentracija nutrijenata. Anorganske soli (makronutrijenti dušik, fosfor i silicij i elementi u tragovima) i vitamini dodani su u dva, četiri i deset puta većoj količini u odnosu na izvorni sastav f/2 podloge. Na slici 15 prikazan je izgled kultura prilikom uzgoja na modificiranim f/2 podlogama različitih koncentracija. Rast dijatomeje praćen je mjerenjem optičke gustoće kulture uzoraka izuzimanih svakih 24 h tijekom uzgoja te određivanjem broja stanica po mL brojanjem u Thoma-ovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Krivulje rasta prikazane su na slici 15.



Slika 15. Uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u tikvicama na f/2 i modificiranim f/2 podlogama (vlastita fotografija)



Slika 16. Uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 na f/2 podlogama različitih koncentracija: (a) promjena optičke gustoće (OD_{540}) i (b) promjena koncentracije stanica (stanice mL^{-1} $\times 10^6$)

Istražene podloge međusobno su uspoređene na osnovi koncentracije suhe tvari biomase u kulturi na kraju uzgoja te specifične brzine rasta dijatomeje u podlogama različite koncentracije (tablica 28). Prilikom odabira najoptimalnije od istraženih podloga uzeto je u obzir i postizanje maksimalnog utroška svih triju nutrijenata. Koncentracija nutrijenata preostalih u hranjivoj podlozi na kraju uzgoja određena je spektrofotometrijskim metodama, a rezultati su prikazan u tablici 29.

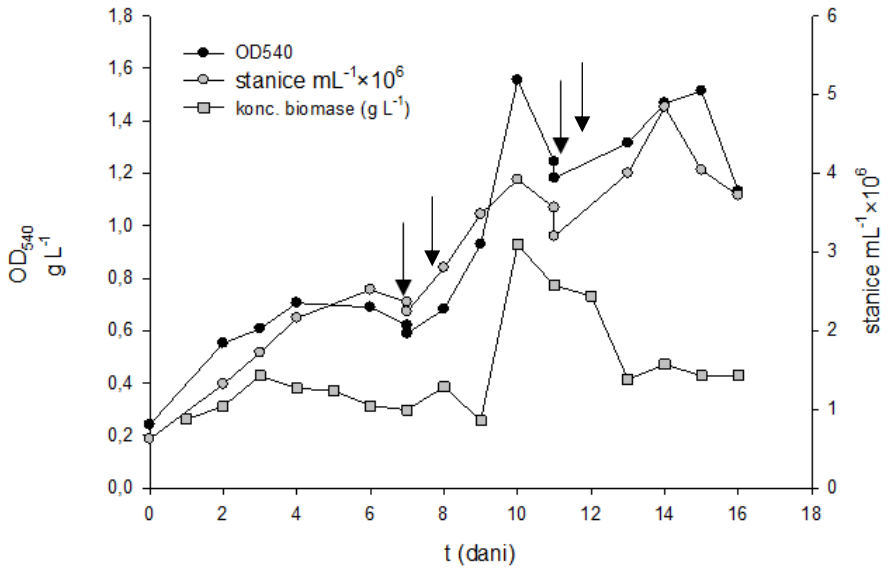
Tablica 28. Koncentracija biomase i specifična brzina rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 na f/2 podlogama različitih koncentracija nutrijenata

podloga	X (g L^{-1})	μ (dan^{-1})
izvorna f/2	0,19	0,337
f/2 2x	0,24	0,3207
f/2 4x	0,27	0,3333
f/2 10x	0,47	0,3709

Tablica 29. Koncentracija glavnih nutrijenata dušika, fosfora i silicija na početku (γ_0) i kraju (γ_k) uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 na f/2 podlogama različitih koncentracija

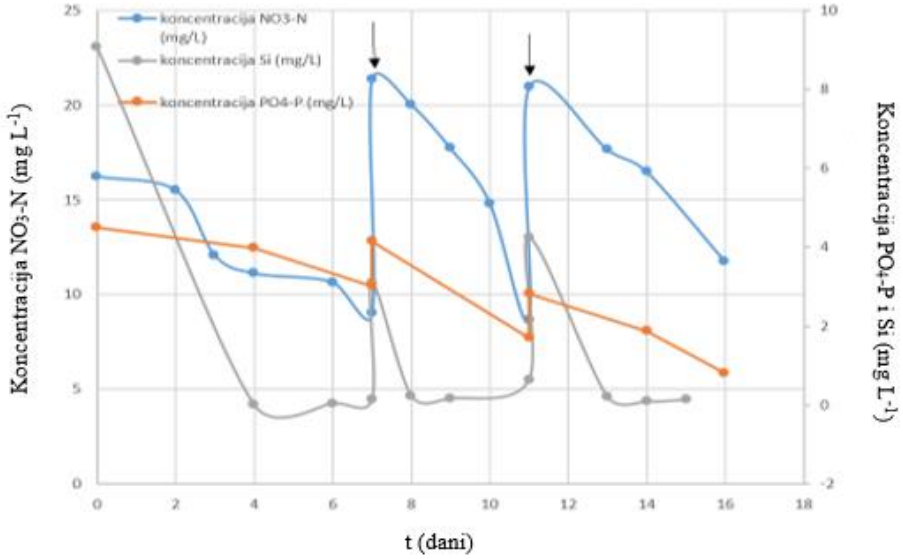
podloga	mg L^{-1}					
	Si		NO_3-N		PO_4^{3-}-P	
	γ_0	γ_k	γ_0	γ_k	γ_0	γ_k
Izvorna f/2	3,24	0,04	12,37	2,39	3,45	/
2x f/2	6,49	0,027	24,75	2,51	6,89	0,65
4x f/2	12,98	0,59	49,48	3,42	13,79	0,41
10x f/2	32,44	3,50	123,7	10,19	34,47	/

Na temelju prethodno dobivenih rezultata za nastavak istraživanja odabrana je modificirana f/2 podloga s četverostruko većom koncentracijom nutrijenata i vitamina. S obzirom na postignutu koncentraciju biomase i učinkovitost potrošnje nutrijenata, ta podloga odabrana je za istraživanje načina uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5. S ciljem veće proizvodnje biomase istražen je polukontinuirani uzgoj koji je proveden u fotobioreaktoru laboratorijskog mjerila (poglavlje 3.4.2.4.). Na slici 17 prikazane su krivulje rasta dobivene praćenjem promjene optičke gustoće, broja stanica po mL i koncentracije suhe tvari biomase tijekom uzgoja.



Slika 17. Promjena optičke gustoće, koncentracije suhe tvari biomase i koncentracije stanica u vremenu tijekom polukontinuiranog fototrofnog uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru (strelice označavaju trenutak izmjene podloge)

S obzirom kako je riječ o polukontinuiranom uzgoju koji podrazumijeva izuzimanje određenog volumena kulture iz fotobioreaktora i nadomještanja tog volumena svježom podlogom s nutrijentima, tijekom uzgoja praćena je promjena i njihove koncentracije (slika 18).



Slika 18. Promjena koncentracije dušika, fosfora i silicija u vremenu tijekom polukontinuiranog fototrofnog uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru (strelice označavaju trenutak izmjene podloge)

Kako bi se istražio utjecaj načina uzgoja te izmjena hranjive podloge na makromolekulski sastav biomase, određenih dana uzgoja u biomasi je određen udio proteina, ugljikohidrata i lipida (tablica 30). Spektrofotometrijskom metodom (poglavlje 3.5.13.) određen je i udio klorofila u biomasi, a sadržaj pepela u biomasi određen je na kraju uzgoja (poglavlje 3.5.22.).

Tablica 30. Sastav biomase na kraju uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u fotobioreaktoru

t (dan)	%				
	proteini	ugljikohidrati	lipidi	klorofil	pepeo
4	29,20		3,44	2,31	
7	22,54		18,40	4,33	
11	7,96	5,53	24,70	1,47	
14	22,75		13,27	2,11	
16	29,08	4,88	22,73	2,32	44,1

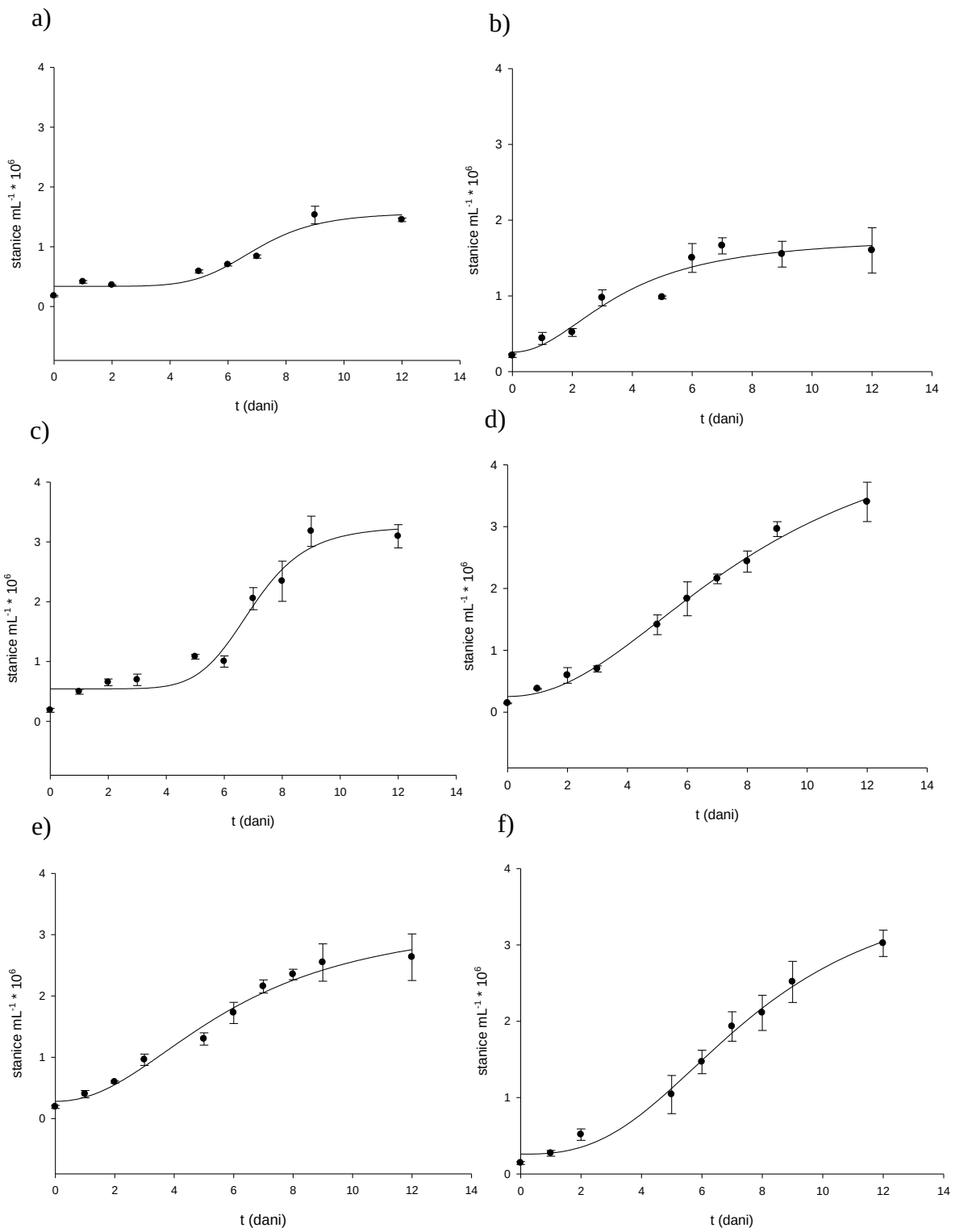
Napravljena je i detaljnija analiza lipida, pa je tako određen i sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima u određenim danima uzgoja. Sastav je prikazan u tablici 31.

Tablica 31. Profil masnih kiselina dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom u fotobioreaktoru

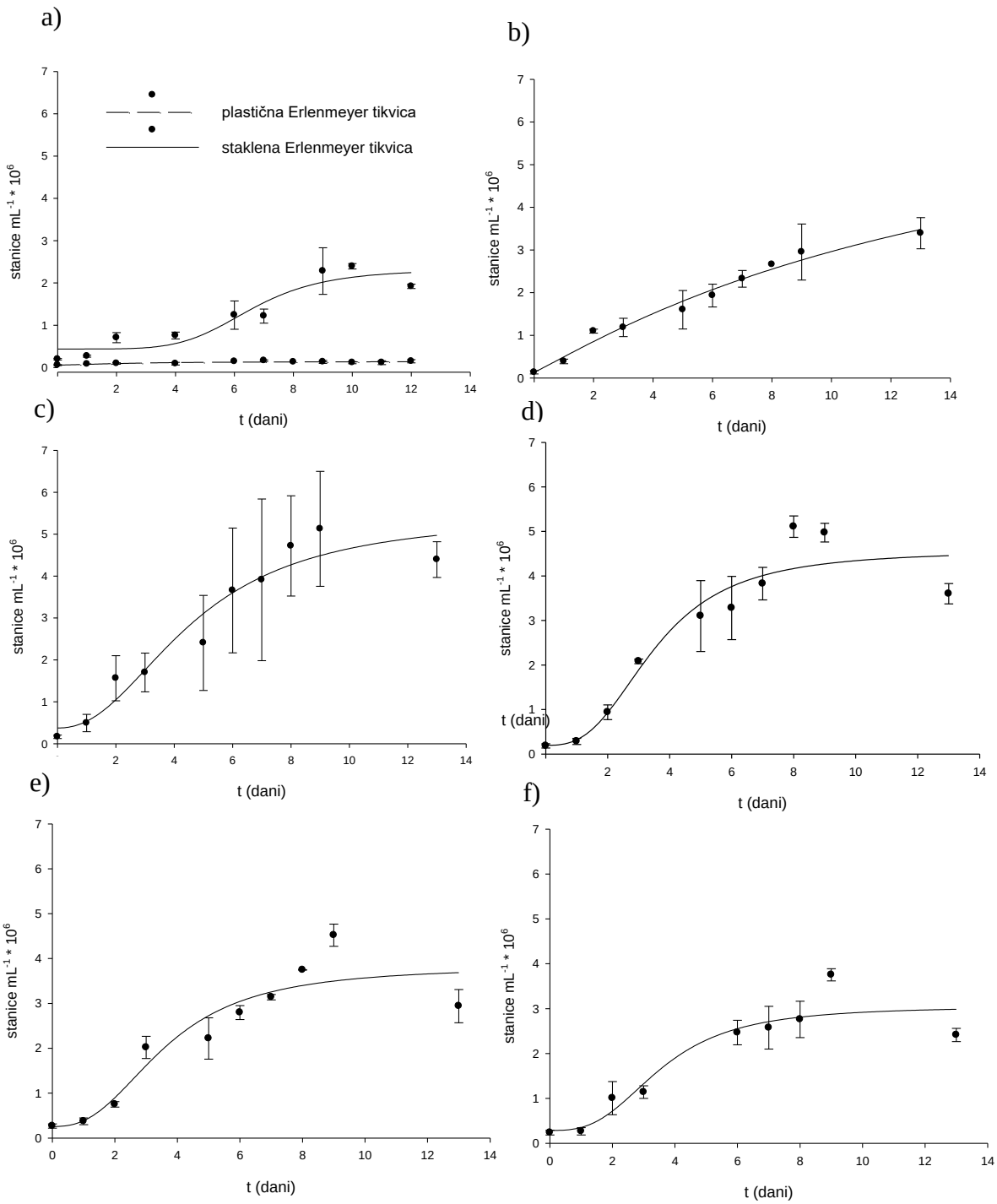
Metil ester masne kiseline	dan uzgoja				
	4	7	11	14	16
	udio % (g g^{-1})				
C11:0		0.37	0.34	*	*
C12:0	1.17	*	0,28	*	*
C14:0		8.75	8.92	6.49	10.69
C14:1 cis 9		1.16	0.35	1.9	0.07
C15:0	0.82	2.50	2.53	3.42	1.05
C15:1 cis 10		0.91	1.54	1.31	1.05
C16:0	42.53	14.97	15.68	7.90	19.00
C16:1 cis 9	18.92	41.75	38.99	26.88	47.71
C17:0	1.18	5.16	0.56	7.01	2.32
C17:1 cis 10	10.78	1.48	3.48	1.56	4.34
C18:0		1.93	1.06	0.98	*
C18:1 trans 9		2.53	0.54	4.10	0.65
C18:2 cis 9,12	1.88	2.39	0.32	14.86	0.34
C18:3 cis 6,9,12		1.93	2.16	2.31	0.53
C20:0,		*	0.11	*	*
C20:2 cis 11,14		*	0.64	*	0.07
C20:3 cis 8,11,14 n6		2.95	4.01	4.3	0.63
C20:4 cis 5,8,11,14 n6		2.12	3.15	3.43	1.07
C22:0		*	0.33	5.28	0.9
C20:5 cis 5,8,11,14,17 n3,	22.73	6.39	7.62	6.14	7.98
C24:0		1.78	3.69	1.47	0.74
C24:1 cis 15		0.94	0.61	*	0.32
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19;(n3)		*	3.09	0.81	0.55
SFA	45.70	35.46	33.50	32.55	34.71
MUFA	29.69	48.77	45.51	35.75	54.13
PUFA	24.61	15.77	20.99	31.85	11.17

*metilesteri masnih kiselina detektirana u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije, SFA- (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline, MUFA (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline, PUFA (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline.

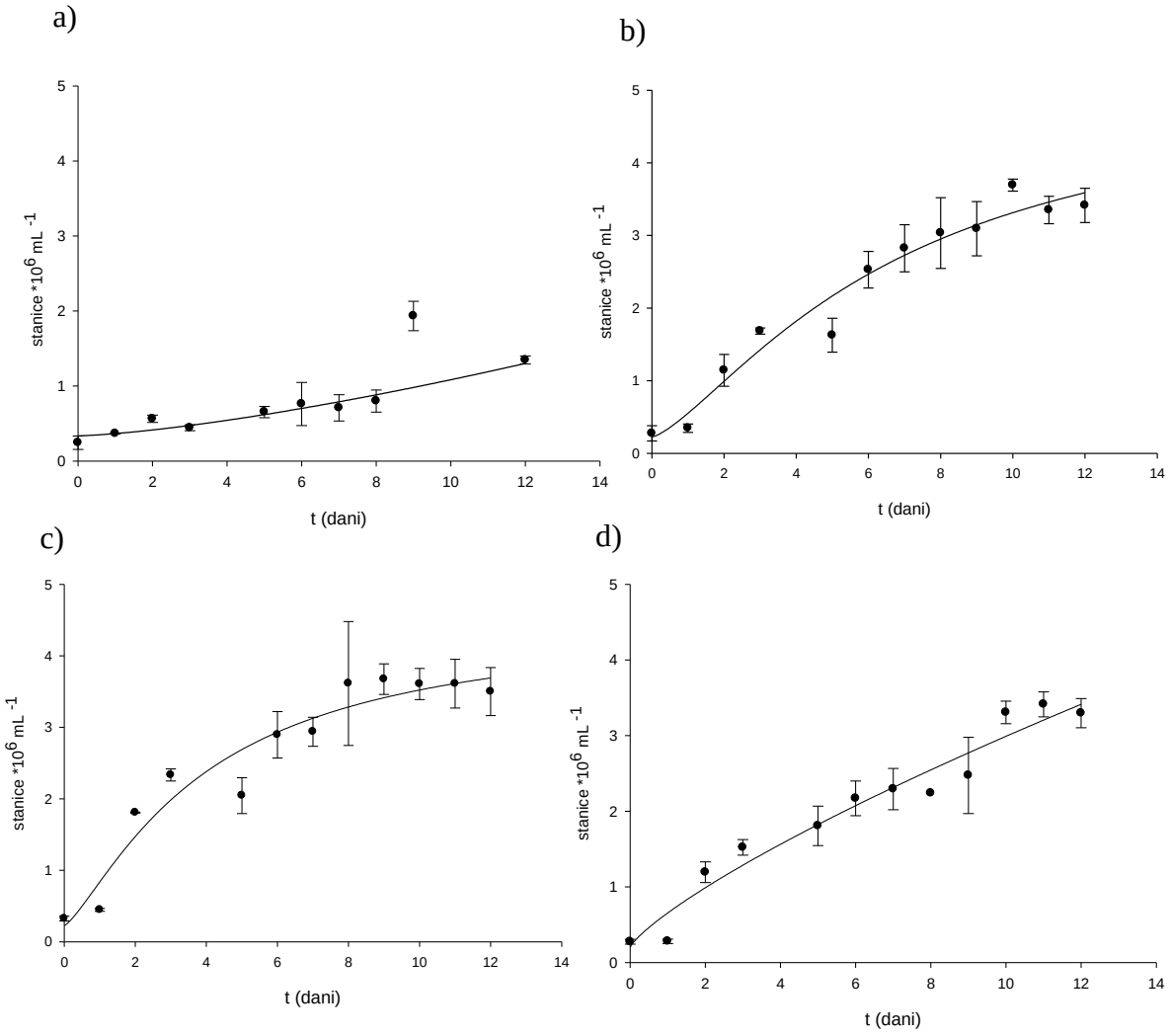
U idućem koraku optimizirana je koncentracija silicija, dušika i fosfora na način da je koncentracija jednog makronutrijenta mijenjana dok je koncentracija preostalih makro i mikronutrijenata bila nepromijenjena (jednako izvornoj f/2 podlozi). Krivulje rasta prilikom uzgoja na podlogama s različitim koncentracijama pojedinih nutrijenata prikazane su na Slikama 19., 20. i 21.



Slika 19. Krivulje rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 pri različitim koncentracijama dušika (NO_3-N) u f/2 podlozi: (a) 0 mM; (b) 0.88 mM; (c) 2 mM; (d) 3.5 mM; (e) 6 mM; (f) 8 mM



Slika 20. Krivulje rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 pri različitim koncentracijama silicija u f/2 podlozi: (a) 0 mM i 0 mM u plastičnim tikvicama; (b) 0.1 mM; (c) 0.5 mM; (d) 1 mM; (e) 1.5 mM; (f) 2 mM



Slika 21. Krivulje rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 pri različitim koncentracijama fosfora u f/2 podlozi: (a) 0 mM; (b) 0.036 mM; (c) 0.15 mM; (d) 0.36 mM

U tablici 32. prikazane su vrijednosti koncentracije biomase i broj stanica po mL, specifične brzine rasta, te produktivnosti sinteze biomase i lipida tijekom uzgoja na različitim koncentracijama svakog pojedinog makronutrijenta. Na osnovu dobivenih vrijednosti odabrane su odgovarajuće koncentracije makronutrijenata za nastavak istraživanja.

Tablica 32. Koncentracija suhe tvari (g L^{-1}), koncentracija stanica (st mL^{-1} $\times 10^6$), specifična brzina rasta (dan^{-1}), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg $L^{-1}dan^{-1}$) prilikom uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u f/2 podlozi s različitim koncentracijama dušika, fosfora i silicija u f/2 podlozi

	c_o (mM)	X (g L^{-1})	stanice $\times 10^6$ mL^{-1}	μ (dan^{-1})	Pr_x (mg $L^{-1}dan^{-1}$)	Pr_L (mg $L^{-1}dan^{-1}$)
N-NO_3	0	0.10±0.01	1.61±0.19	0.22±0.01	8.53±0.99	1.26±0.14
	0.88	0.20±0.04	2.04±0.47	0.24±0.03	16.87±2.98	2.18±0.39
	2	0.24±0.01	3.09±0.19	0.26±0.02	20.02±0.78	2.14±0.08
	3.5	0.23±0.04	3.40±0.32	0.32±0.04	19.31±3.26	1.86±0.31
	6	0.23±0.03	2.63±0.38	0.29±0.01	19.05±0.22	1.51±0.02
	8	0.13±0.06	3.02±0.17	0.21±0.002	19.79±4.84	2.36±0.58
Si	0 pl	0.05±0.07	0.16±0.04	0.04±0.02	3.85±0.77	/*
	0	0.09±0.05	1.92±0.05	0.26±0.009	7.97±0.73	0.69±0.06
	0.1	0.31±0.04	3.39±0.36	0.25±0.011	23.34±1.06	2.13±0.09
	0.5	0.38±0.08	4.39±0.43	0.22±0.02	29.51±2.08	4.12±0.29
	1	0.49±0.09	3.60±0.23	0.35±0.02	37.61±2.92	2.13±0.17
	1.5	0.26±0.08	2.94±0.37	0.26±0.01	20.11±1.62	0.46±0.04
	2	0.27±0.02	2.41±0.15	0.19±0.04	20.8±0.58	0.29±0.01
PO_4^{3-}	0	0.101±.04	1.35±0.05	0.24±0.03	8.43±0.69	1.56±0.27
	0.036	0.34±0.06	3.41±0.24	0.25±0.06	28.50±1.56	4.01±0.38
	0.15	0.27±0.09	3.50±0.34	0.10±0.02	22.7±2.00	2.08±0.03
	0.36	0.25±0.02	3.29±0.19	0.12±0.01	20.85±0.43	2.59±0.18

*tijekom uzgoja u plastičnim Erlenmeyer tikvicama primijenjenom metodom analize nije bilo moguće kvantificirati prisutnost silicija u hranjivoj podlozi

Kako bi se istražio učinak koncentracije svakog pojedinog makronutrijenata na sastav biomase, na kraju uzgoja u biomasi je određen udio ugljikohidrata, lipida, proteina i ukupnog klorofila. Rezultati su prikazani u tablici 33.

Tablica 33. Makromolekulski sastav biomase (udio proteina, ugljikohidrata, lipida, ukupnog klorofila) *Nitzschia* sp. S5 uzgojene u f/2 podlozi s različitim koncentracijama dušika, silicija i fosfora

	c_o (mM)	ugljikohidrati (%)	proteini (%)	lipidi %)	ukupni klorofil (%)
$N\text{-}NO_3$	0	18.69	26.60±8.04	14.82±1.84	0.86±
	0.88	10.58	46.74±1.51	12.95±0.79	0.99±0.36
	2	9.37	45.59±1.91	10.71±0.46	1.35±0.08
	3.5	8.66	49.93±6.13	9.62±0.46	1.31±0.06
	6	7.95	49.70±1.83	7.92±0.49	0.89±0.14
	8	7.42	50.41±0.18	11.97±0.91	1.43±0.37
Si	0 pl	/*	/*	/*	
	0	16.81	43.19±1.99	8.77±1.41	
	0.1	8.28	44.05±1.02	9.13±0.43	0.19±0.07
	0.5	9.07	40.15±1.37	13.95±1.53	0.41±0.28
	1	7.24	38.75±3.18	5.67±0.51	0.10±0.05
	1.5	6.77	52.84±1.31	2.27±0.09	0.22±0.14
	2	9.77	50.95±2.59	1.41±0.15	0.22±0.12
PO_4^{3-}	0	12.64	54.72	18.83±4.69	2.31±0.48
	0.036	8.55	63.46±4.10	14.16±1.68	2.80±0.13
	0.15	22.12	58.03±3.61	9.3±0.84	3.59±0.23
	0.36	13.43	64.10±1.08	12.4±0.74	3.61±0.62

*tijekom uzgoja u plastičnim Erlenmeyer tikvicama nije proizvedeno dovoljno biomase kako bi se mogle provesti analize potrebne za određivanje makromolekulskog sastava biomase

Istražen je učinak svakog pojedinog makronutrijenta i njegove koncentracije na sastav lipida mikroalge *Nitzschia* sp. S5 analizom metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom. Promjena sastava masnih kiselina u lipidima dijatomeje za svaki pojedini makronutrijent prikazana je u tablicama 34, 35 i 36.

Tablica 34. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 prilikom uzgoja u f/2 podlozi s različitim koncentracijama izvora dušika

%	$NaNO_3$ (mM)					
masna kiselina	0	0.88	2	3.5	6	8
C14:0	10.76±0.49	11.91±0.22	12.41±0.47	10.29±0.21	9.40±0.21	9.22±0.15
C16:0	28.75±0.55	27.03±0.75	28.00±0.03	33.25±0.58	36.58±0.52	32.22±0.98
C16:1 cis 9	57.22±0.95	56.09±0.46	56.88±1.34	53.16±0.49	52.33±0.23	53.06±0.14
C17:1 cis 10	0.96±0.45	1.05±0.29	1.02±0.37	1.45±0.34	0.42±0.05	1.21±0.37
C20:5 cis 5,8,11,14,17	2.39±1.08	2.92±0.81	2.72±1.62	2.28±0.74	3.19±0.66	3.51±0.44
C24:0		0.53±0.13			1.59±0.18	
C24:1 cis 15		0.28±0.07		1.68±0.28		
Σ SFA	39.76±0.58	39.79±1.11	40.63±0.59	43.80±0.81	46.21±0.65	42.21±0.67
Σ MUFA	57.86±0.50	57.21±0.58	57.55±1.02	53.93±0.46	52.37±0.21	54.27±0.23
Σ PUFA	2.39±1.08	2.99±0.77	1.81±1.62	2.28±0.74	1.42±0.66	3.51±0.44

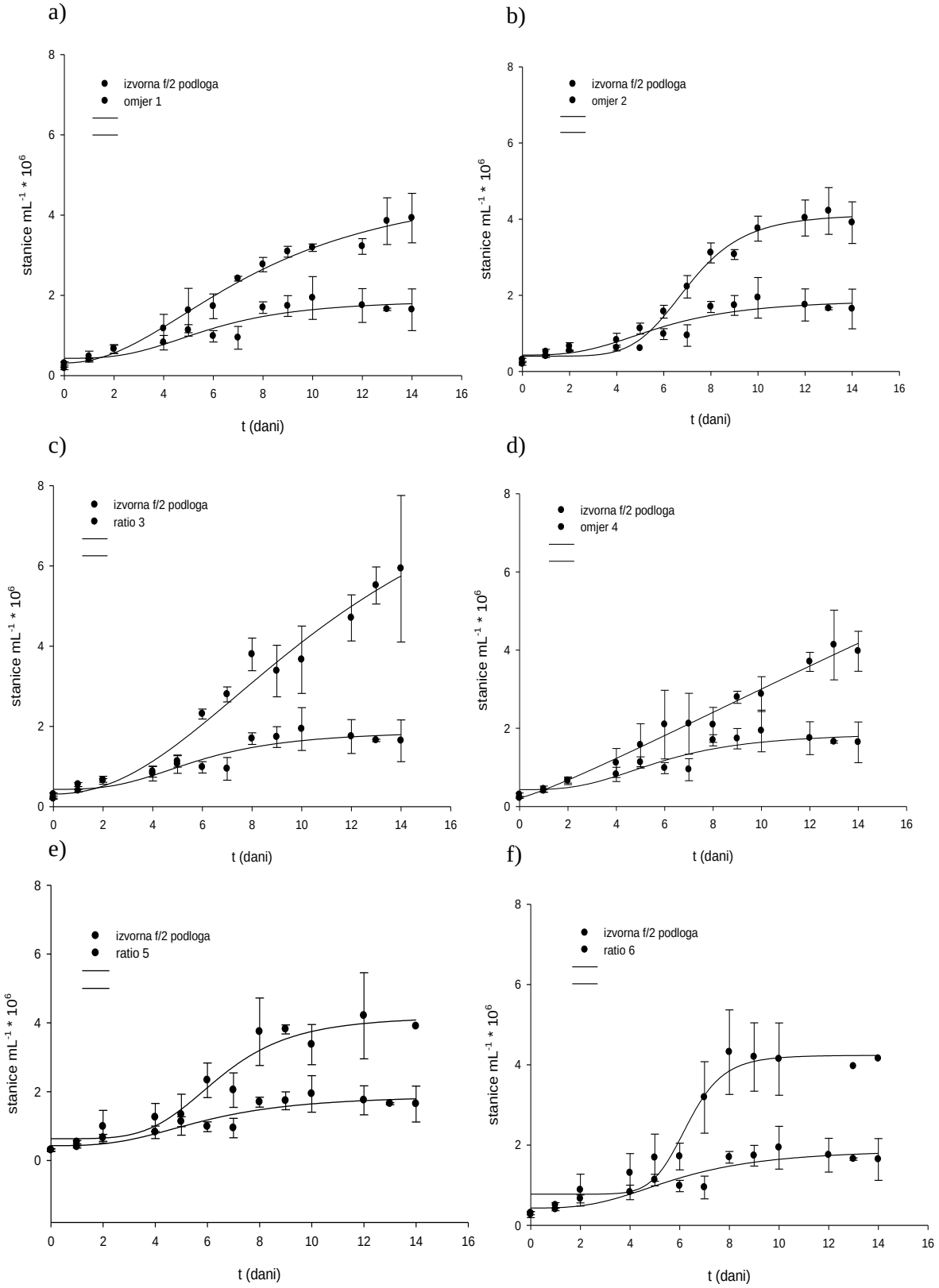
Tablica 35. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 prilikom uzgoja u f/2 podlozi s različitim koncentracijama izvora silicija

%	Si (mM)					
masna kiselina	0	0.1	0.5	1	1.5	2
C14:0	12.46±1.18	12.88±0.99	9.92±0.60	10.35±0.28	12.79±0.25	12.50±0.93
C16:0	26.73±2.43	25.45±1.11	30.94±2.89	24.50±1.03	16.10±0.23	8.94±2.75
C16:1 cis 9	53.49±3.22	57.11±0.66	54.96±1.42	60.35±1.02	65.20±0.43	66.75±4.78
C17:0	1.03±0.65	0.69±0.27	0.04±0.04	2.91±0.42	4.18±0.43	6.24±4.26
C17:1 cis 10	0.29±0.19	1.67±0.85	0.98±0.50	0.05±0.05		
C18:0	0.46±0.26		1.10±1.10	0.28±0.27		
C18:2 cis 9,12	1.26±0.77	0.48±0.24	0.55±0.30	0.10±0.06		0.34±0.33
C20:5 cis 5,8,11,14,17	1.45±0.90	0.82±0.42	0.74±0.37			0.37±0.37
C24:0		0.15±0.09	0.05±0.03	0.74±0.69	0.36±0.31	2.74±2.33
Σ SFA	41.21±2.19	39.45±1.63	42.64±2.60	39.09±0.93	34.33±0.44	30.41±3.58
Σ MUFA	55.99±3.15	59.24±1.10	56.07±1.99	60.81±0.95	65.32±0.45	68.42±4.09
Σ PUFA	2.79±1.69	1.30±0.66	1.29±0.65	0.09±0.06	0.36±0.35	1.17±0.89

Tablica 36. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 prilikom uzgoja u f/2 podlozi s različitim koncentracijama izvora fosfora

%	PO_4^{3-} (mM)			
masna kiselina	0	0.036	0.15	0.36
C14:0	9.10±1.34	10.41±0.85	11.81±0.08	11.44±1.01
C16:0	32.02±4.13	24.57±1.32	21.07±0.69	22.98±0.43
C16:1 cis 9	53.27±5.28	61.09±1.95	63.15±2.79	61.65±1.05
C17:1 cis 10	1.24±0.36	1.41±0.51	2.31±1.32	2.68±0.49
C18:1 cis 9		1.95±1.95		
C20:5 cis 5,8,11,14,17	3.72±0.43	1.26±0.16	1.25±0.71	1.71±0.42
Σ SFA	41.64±5.94	35.82±1.48	33.69±1.32	35.08±0.91
Σ MUFA	54.64±5.51	65.08±0.49	66.26±1.15	65.09±1.07
Σ PUFA	3.72±0.43	1.26±0.16	1.25±0.71	1.71±0.42

Nakon istraživanja učinka koncentracije pojedinačnih makronutrijenata istražen je i učinak šest različitih masenih omjera dušika, fosfora i silicija na rast i sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5. Krivulje rasta na izvornoj (kontrola) i modificiranim f/2 podlogama dobivene određivanjem promjene broja stanica po mL u vremenu prikazane su na slici 22.



Slika 22. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 na f/2 podlozi sa različitim omjerom Si: N-NO_3: PO_4^{3-}, promjena optičke gustoće i koncentracije stanica pri: (a) omjer 1; (b) omjer 2; (c) omjer 3; (d) omjer 4; (e) omjer 5 i (f) omjer 6

Kao i u prethodnim eksperimentima, koncentracija biomase određena je gravimetrijskom metodom, te je potom izračunata i produktivnost sinteze biomase. Osim toga praćena je i razlika u specifičnim brzinama rasta između pojedinih istraženih omjera koje su prikazane u tablici 37. Sastav biomase određen je s obzirom na udio ugljikohidrata, proteina i lipida (tablica 37), dok je za lipide određen i sastav masnih kiselina prikazan u tablici 38.

Tablica 37. Koncentracija biomase (g L^{-1}), specifična brzina rasta (dan^{-1}), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg L^{-1} dan^{-1}) i udio ugljikohidrata, proteina i ukupnih lipida u biomasi pri uzgoju na različitim omjerima dušika, silicija i fosfora

omjer	X (g L^{-1} s.tv.)	μ (dan^{-1})	Prx (mg L^{-1} day^{-1})	PrL (mg L^{-1} day^{-1})	ugljikohidrati (%)	proteini (%)	ukupni lipidi (%)
kontrola	0.28±0.14	0.15±0.03	19.74±3.25	1.02±0.92	19.73	15.34±1.5	7.76±0.32
omjer 1	0.51±0.06	0.18±0.02	36.34±5.31	2.02±0.51	11.53	19.14±0.77	5.57±0.57
omjer 2	0.56±0.12	0.13±0.001	39.86±3.84	2.07±0.35	7.08	21.48±1.10	5.20±0.40
omjer 3	0.73±0.07	0.14±0.01	52.04±2.52	1.29±0.11	8.04	21.00±2.87	2.48±0.19
omjer 4	0.66±0.02	0.18±0.02	45.15±2.18	1.03±0.09	9.58	14.13±1.00	2.27±0.18
omjer 5	0.53±0.10	0.18±0.04	35.01±3.55	0.76±0.13	3.11	18.25±3.91	2.16±0.24
omjer 6	0.51±0.11	0.29±0.07	38.67±3.05	0.77±0.11	4.19	13.67±2.57	1.99±0.10

Tablica 38. Profil masnih kiselina nakon uzgoja pri različitim omjerima dušika, silicija i fosfora

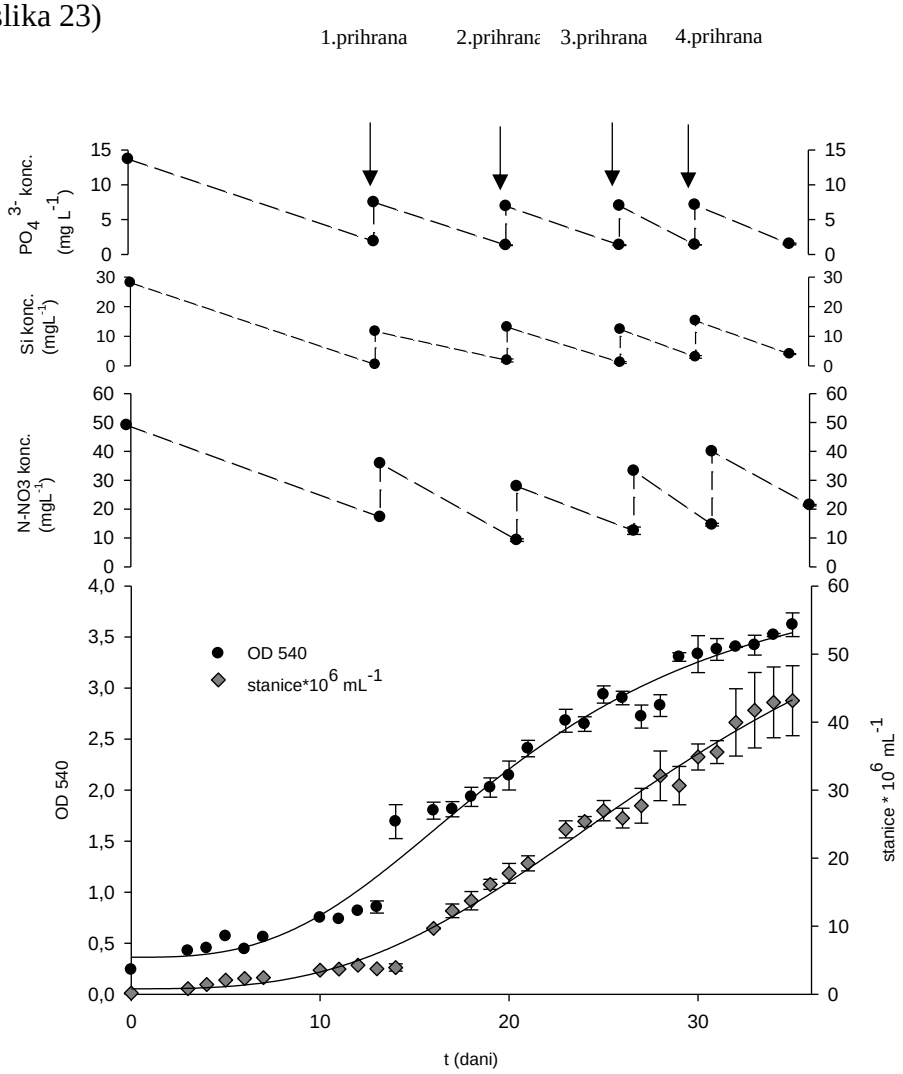
% masna kiselina	kontrola	omjer 1	omjer 2	omjer 3	omjer 4	omjer 5	omjer 6
C14:0	10.60±0.32	10.76±0.42	14.40±0.05	14.55±0.79	14.97±0.74	15.90±0.35	16.04±0.84
C14:1 cis 9	0.66±0.02	0.89±0.12	1.21±0.02	1.65±0.12	1.20±0.19	0.88±0.15	0.58±0.17
C16:0	23.19±0.26	17.84±0.93	22.64±0.19	15.98±0.88	12.58±1.99	10.75±1.16	11.39±3.58
C16:1 cis 9	56.12±0.14	53.67±1.45	53.81±0.59	47.74±0.61	54.41±3.47	52.51±3.73	49.14±3.16
C17:0	1.06±0.003	2.66±0.423	2.93±0.09	8.81±1.17	8.30±0.45	4.97±1.08	3.45±1.12
C17:1 cis 10	4.75±0.15	7.76±0.39		3.02±1.03	1.15±0.58	5.68±2.66	7.85±2.31
C18:0							1.54±1.54
C18:1 trans 9							
C18:1 cis 9				0.61±0.38			1.84±1.84
C20:5 cis 5.8.11.14.17	3.48±0.19	5.76±1.07	3.97±0.38	6.35±0.79	5.20±0.60	9.31±2.88	9.42±0.93
C24:0				1.04±0.80	1.92±1.92		0.26±0.26
ΣSFA	34.84±0.06	31.26±0.59	40.16±0.27	40.38±0.61	37.77±2.43	31.61±2.46	32.68±4.66
ΣMUFA	61.68±0.13	62.98±1.07	55.87±0.44	53.28±1.04	57.03±2.85	59.08±1.70	57.90±3.82
ΣPUFA	3.48±0.19	5.76±1.07	3.97±0.38	6.35±0.79	5.19±0.60	9.31±2.88	9.42±0.93

Tijekom optimizacije koncentracije nutrijenata, kao i njihovog masenog omjera, na kraju svakog uzgoja određena je koncentracija nutrijenata preostala u podlozi. Rezultati su prikazani u tablici 39.

Tablica 39. Koncentracija nutrijenata dušika, fosfora i silicija na početku i kraju uzgoja

		N-NO_3- (mg L^{-1})		Si (mg L^{-1})		PO_4^{3-} (mg L^{-1})	
	c_0. (mM)	c_0	$C_{konačna}$	c_0	$c_{konačna}$	c_0	$c_{konačna}$
N-NO_3- konc.	0	0	0	2.81	0.07±0.03	3.42	0*
	0,88	12.32	6.08±0.19		0.19±0.05		
	2	28.01	6.09±0.23		0.01±0.004		
	3,5	49.02	6.30±0.36		0.30±0.23		
	6	84.04	8.98±1.81		0.99±0.42		
	8	112.05	6.71±0.19		0.97±0.11		
Si konc.	0 (pl.)	54.56	29.39±2.28	0	0.05±0.03	3.42	0*
	0		1.76±0.20	0	0.04±0.03		
	0,1		1.99±0.38	2.81	0.17±0.07		
	0,5		0.91±0.43	14.04	0.37±0.52		
	1		0.67±0.03	28.09	1.56±0.28		
	1,5		1.04±0.17	42.13	1.32±0.10		
	2		1.69±0.25	56.17	1.22±0.07		
PO_4^{3-} konc.	0	54.56	8.39±0.17	2.81	0	0	0
	0,036		2.25±0.32		0	3.42	0
	0,15		2.99±0.94		0	14.25	0
	0,36		2.99±1.04		0.04±0.02	34.19	3.79±0.76
omjer 1		28.01	2.67±0.70	11.23	0.20±0.06	3.42	0.04±0.01
omjer 2		28.01	3.48±0.85	11.23	0.07±0.02	13.68	0.70±0.29
omjer 3		49.02	3.95±0.92	28.09	0.20±0.13	13.68	/
omjer 4		84.04	3.48±2.84	28.09	0.20±0.09	13.68	0.07±0.06
omjer 5		49.02	11.99±1.13	28.09	2.08±1.42	20.51	1.41±0.69
omjer 6		49.02	8.07±0.56	28.09	2.11±0.47	27.35	1.91±0.15
kontrola		12.33	8.72±0.42	2.81	0.10±0.08	3.42	0.24±0.12

Podloga optimiranog sastava (omjer Si:N:P= 6.67:23.33:1 [mM:mM:mM]) potom je primijenjena za šaržni uzgoj dijatomje *Nitzschia* sp. S5 s pritokom supstrata. Promjena koncentracije stanica i optičke gustoće, te koncentracije tri glavna makronutrijenta prikazana je na slici 23. Uzgoj je vođen šaržno do 13. dana kada je dodana prva prihrana. Ukupno je napravljeno četiri prihrane, te je koncentracija nutrijenata određena prije dodatka prihrane te nakon nje (slika 23)



Slika 23. Krivulja rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom; promjena optičke gustoće (OD_{540}), koncentracije stanica (stanice×10^6 mL^{-1}) i koncentracije nutrijenata (mg L^{-1}) (strelice označavaju dodatak prihrane)

Na kraju šaržnog uzgoja i prije dodatka nove prihrane određena je koncentracija biomase gravimetrijskom metodom. Osim toga, praćena je i promjena u specifičnoj brzini rasta dijatomeje između pojedinih prihrana (tablica 40). Određivanjem udjela lipida, ugljikohidrata i proteina u biomasi na kraju svake faze uzgoja istražen je i utjecaj šaržnog uzgoja s prihranom na sintezu glavnih makromolekula u biomasi (tablica 40).

Tablica 40. Koncentracija biomase (g L^{-1}), specifična brzina rasta (dan^{-1}), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg L^{-1} dan^{-1}) i udio ugljikohidrata, proteina i ukupnih lipida u biomasi *Nitzschia* sp. S5 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom

		X (g L^{-1})	μ (dan^{-1})	Pr_x (mg L^{-1} dan^{-1})	Pr_L (mg L^{-1} dan^{-1})	lipidi (%)	proteini (%)	ugljikohidrati (%)
Šaržni uzgoj		0.73±0.04	0.12	60.71	1.28	2.10	11.41	8.04
Šaržni uzgoj s pritokom	I prihrana	1.03±0.07	0.13±0.01	49.14±3.20	0.96±0.06	1.94±0.05	25.69±1.85	14.50±3.19
	II prihrana.	1.23±0.04	0.10±0.01	45.41±1.46	1.05±0.03	2.31±0.17	28.64±0.16	9.51±0.79
	III prihrana	1.46±0.04	0.09±0.03	48.57±1.37	1.18±0.03	2.42±0.12	29.06±0.15	12.92±1.10
	IV prihrana	1.63±0.05	0.08±0.05	46.69±0.57	1.06±0.01	2.28±0.11	28.05±1.57	12.92±1.07

S ciljem praćenja promjene sastava masnih kiselina tijekom šaržnog uzgoja s pritokom, posebice udjela visokovrijednih masnih kiselina, određen je profil masnih kiselina lipida dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 (tablica 41).

Tablica 41. Profil masnih kiselina ukupnih lipida dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata

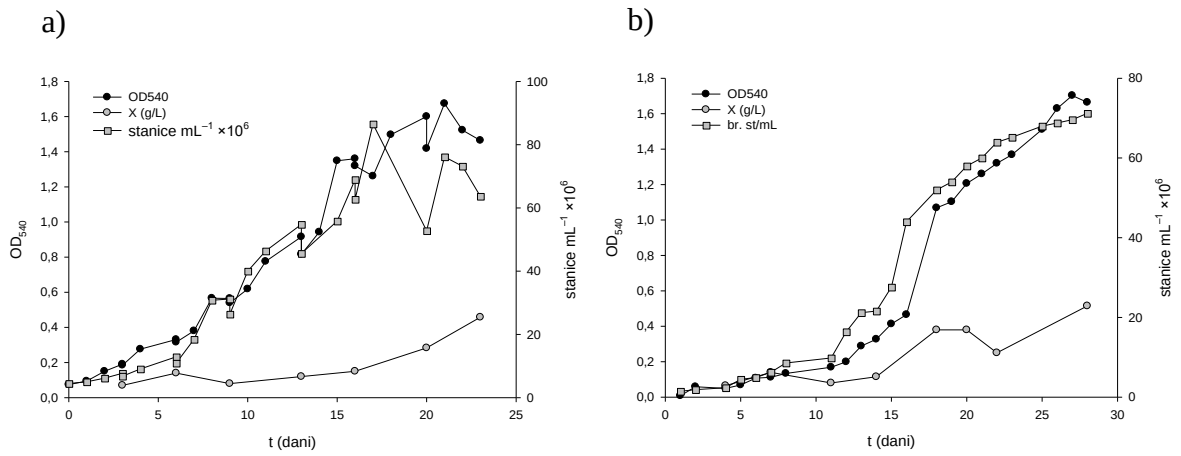
% masna kiselina	šaržni uzgoj	I prihrana nutrijentima	II prihrana nutrijentima	III prihrana nutrijentima	IV prihrana nutrijentima
C14:0	19.50	10.16±3.22	11.48±2.86	9.84±3.09	2.91±2.62
C14:1 cis 9	0.85	1.39±0.17	1.38±0.15	1.53±0.16	1.64±0.6
C16:0	11.46	8,55±1.67	8.21±1.99	9.00±1.49	11.38±1.65
C16:1 cis 9	52.61	54.84±0.92	55.36±1.50	56.82±1.43	56.80±1.84
C17:0		9.86±0.61	5.77±1.39	9.72±1.03	11.48±1.02
C17:1 cis 10		9.90±2.12	7.82±3.35		
C18:2 cis 9,12			0.05±0.05	0.47±0.29	1.49±0.52
C20:4 cis 5,8,11,14		0.10±0.10	0.65±0.45	1.65±0.55	2.91±0.72
C20:5 cis 5,8,11,14,17	15.59	5.15±1.22	9.13±1.50	10.72±2.18	10.50±2.77
ΣSFA	30.95	28.57±1.58	25.52±1.57	28.67±1.67	26.31±1.81
ΣMUFA	53.46	66.18±2.40	64.65±3.07	58.49±1.36	58.79±1.95
ΣPUFA	15.59	5.25±1.26	9.84±1.95	12.84±2.21	14.91±2.86

4.3.2. Uzgoj morske mikroalge *Picochlorum* sp.

Provedena je optimizacija uvjeta uzgoja zelene morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Prvo je istražen učinak dva kultivacijska sustava na produktivnost sinteze biomase. Pa je uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 proveden u dva otvorena sustava, barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu (slika 24). Oba uzgoja vođena su šaržno uz prihranu nutrijentima tijekom uzgoja.

Slika 24. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dva različita kultivacijska sustava: (a) barbotirajuća kolona; (b) otvoreni bazen

Trend rasta praćen promjenom koncentracije biomase, stanica po mL i optičke gustoće tijekom vremena u oba reaktorska sustava prikazan je na slici 25.

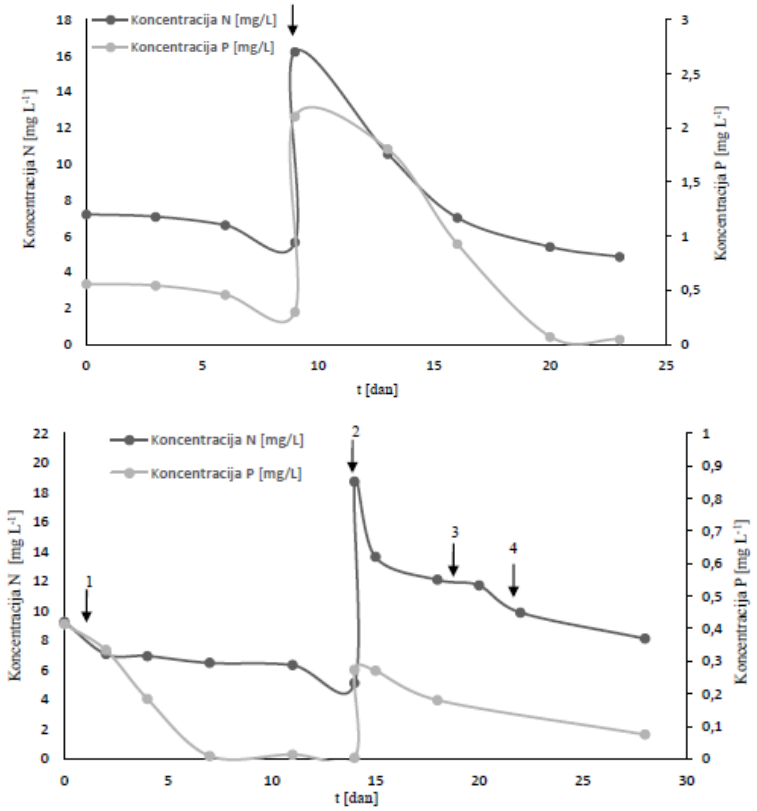


Slika 25. Uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. S5 u (a) barbotirajućoj koloni; (b) otvorenom bazenu

Tijekom uzgoja u barbotirajućoj koloni napravljena je samo jedna prihrana izvorima dušika i fosfora. Kao što je prikazano na slici 26 a) trinaestog dana uzgoja dodano je 20 mL otopine $NaNO_3$ koncentracije 75 g L^{-1} (ukupno 1.5 g) te 20 mL otopine NaH_2PO_4 koncentracije 5 g L^{-1} (ukupno 0.1 g). Kod uzgoja u otvorenom bazenu napravljene su četiri prihrane koje su strelicama označene na slici 26 b). Prva prihrana sadržavala je 500 mL otopine $NaHCO_3$ koncentracije 0,5 g L^{-1} (0.25 g). Druga prihrana sadržavala je otopinu izvora dušika (19.3 mL otopine $NaNO_3$ koncentracije 75 g L^{-1}; ukupno 1.45 g) i otopinu izvora fosfora (14.1 mL otopine NaH_2PO_4 koncentracije 5 g L^{-1}; ukupno 0.07 g). Treća i četvrta prihrana bile su dodatak 250 mL otopine $NaHCO_3$ koncentracije 0,5 g L^{-1} (0.125 g). Promjene koncentracije nutrijenata u hranjivoj podlozi (dušika i fosfora) tijekom uzgoja *Picochlorum* sp. u oba reaktorska sustava prikazana je na slici 26.

a)

b)



Slika 26. Promjena koncentracije dušika i fosfora tijekom fototrofnog šaržnog uzgoja u (a) barbotirajućoj koloni-strelicom je prikazana prihrana (b) otvorenom bazenu- strelicama i brojevima su prikazane prihrane

Sastav biomase odnosno udio proteina, ugljikohidrata i lipida u karakterističnim fazama rasta prikazan je u tablici 42. Napravljena je i usporedba pokazatelja uspješnosti uzgoja u dva različita otvorena sustava, a koja je prikazana u tablici 43.

Tablica 42. Makromolekulski sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 uzgojene u (a) barbotirajućoj koloni; (b) otvorenom bazenu

a)

t (dani)	proteini (%)	ugljikohidrati* (%)	lipidi (%)
3	20.326	-	6.227
6	20.764	-	7.416
9	17.950	-	4.493
13	22.616	-	8.043
17	11.059	-	9.022
20	-	-	8.339
23	8.813	7.703	7.312

b)

t (dani)	proteini (%)	ugljikohidrati* (%)	lipidi (%)
4	4.701	-	2.583
7	7.597	-	6.001
11	13.991	-	8.037
14	11.551	-	7.238
18	9.831	-	8.368
20	10.795	-	9.478
22	17.761	5.344	9.341
28	12.859	6.603	13.187

*ugljikohidrati su određeni samo za zadnji uzorak (i predzadnji u slučaju otvorenog bazena), budući da je tijekom uzgoja izuzeta premala količina biomase za analizu ugljikohidrata

Tablica 43. Produktivnosti sinteze biomase i lipida uzgojem mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dva sustava: otvoreni bazen i barbotirajuća kolona

barbotirajuća kolona			otvoreni bazen		
t (dani)	Pr_x	Pr_L	t (dani)	Pr_x	Pr_L
3	1.0278	0.0640	4	0.6771	0.0175
9	0.5000	0.0225	11	0.3030	0.0244
13	0.3077	0.0247	14	0.3423	0.0248
16	0.4557	0.0410	18	0.8796	0.0736
23	0.8297	0.0607	20	0.7917	0.0750
			28	0.7664	0.1011

Tablica 44. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *Picochlorum* sp. D3 uzgojenoj u: (a) barbotirajućoj koloni;

% masna kiselina	dan uzgoja						
	3	6	9	13	17	20	23
C6:0	0.480	0.360	-	-	-	-	-
C11:0	0.225	0.196	-	-	-	-	-
C12:0	0.157	0.104	-	-	-	-	-
C14:0	0.830	0.164	0.672	0.640	0.634	0.664	1.510
C14:1 cis 9	0.946	1.036	1.762	1.431	1.374	1.380	1.609
C15:0	0.251	-	0.162	*	*	0.154	0.104
C15:1 cis 10	0.251	0.316	0.720	0.593	0.713	0.684	1.492
C16:0	16.146	15.598	33.453	19.866	19.867	19.116	23.428
C16:1 cis 9	4.200	4.332	7.714	4.473	3.994	4.025	4.776
C17:0	7.713	10.605	19.874	16.097	16.151	17.500	20.110
C17:1 cis 10	*	*	*	0.033	0.153	0.128	0.276
C18:0	15.044	15.189	*	*	*	*	17.389
C18:1 trans 9	-	-	6.144	1.113	2.281	1.579	1.425
C18:1 cis 9	*	*	*	*	*	-	*
C18:2 trans 9,12	-	-	-	*	-	-	-
C18:2 cis 9,12	18.594	19.583	29.499	25.460	25.885	25.530	27.880
C18:3 cis 9,12,15	34.842	31.856	*	30.294	29.101	29.240	*
C20:2 cis 11,14	-	-	-	-	*	-	-
C24:0	-	0.650	*	*	*	*	*
C24:1 cis 15	-	0.011	-	-	-	*	-
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	*	*	*	*	*	*	*
ΣSFA	40.845	42.866	51.161	36.602	36.652	37.434	62.542
ΣMUFA	5.721	5.696	16.341	7.643	8.362	7.796	9.579
ΣPUFA	55.436	51.438	29.499	55.754	54.986	54.770	27.880

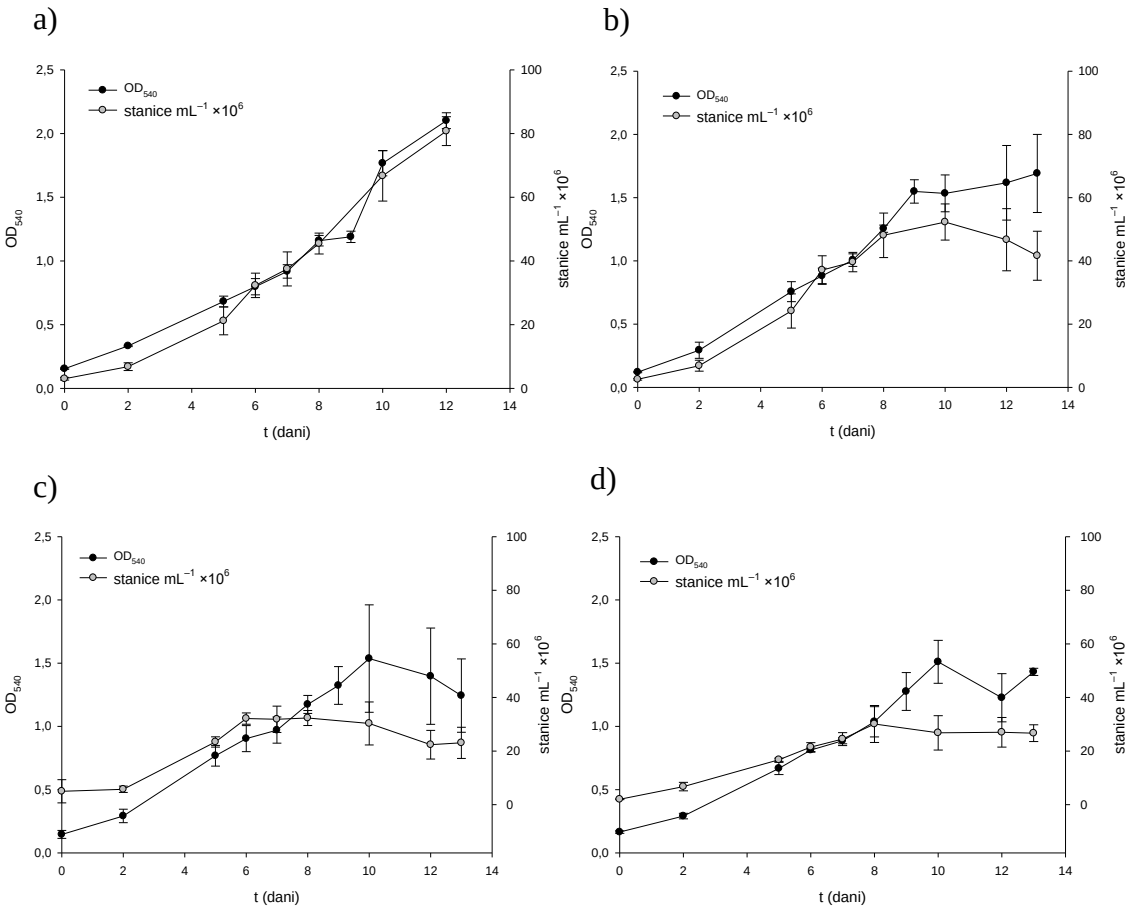
*metilesteri masnih kiselina detektirana u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije

(b) u otvorenom bazenu

% masna kiselina	dan uzgoja							
	4	7	11	14	18	20	22	28
C6:0	2.636	1.564	1.151	-	-	-	-	-
C8:0	-	0.958	-	-	-	-	-	-
C11:0	-	0.276	-	-	-	-	-	-
C14:0	0.202	1.172	0.525	0.154	0.457	0.388	0.395	1.102
C14:1 cis 9	1.104	0.177	1.063	0.868	1.131	1.002	0.976	0.981
C15:0	0.167	0.190	0.122	*	*	*	-	*
C15:1 cis 10	0.625	1.050	1.096	0.610	0.748	0.527	0.544	0.629
C16:0	23.528	22.200	20.973	17.767	21.337	17.900	17.755	16.997
C16:1 cis 9	5.506	6.703	5.124	3.279	4.219	3.596	3.604	3.040
C17:0	12.641	12.008	14.423	13.675	16.546	15.295	14.547	14.051
C17:1 cis 10	*	-	0.089	*	*	*	*	*
C18:0	*	*	*	12.628	*	12.883	12.351	11.350
C18:1 cis 9	*	*	*	*	*	*	*	*
C18:2 cis 9,12	23.808	22.307	23.689	22.567	24.618	22.317	22.928	24.157
C18:3 cis 9,12,15	29.783	31.027	31.746	28.453	30.943	26.092	26.901	27.694
C24:0	-	0.369	-	-	*	*	-	*
C24:1 cis 15	-	-	-	*	-	-	-	-
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19	*	*	*	*	*	*	*	*
ΣSFA	39.173	38.737	37.193	44.222	38.340	37.434	62.542	43.500
ΣMUFA	7.235	7.930	7.372	4.757	6.098	7.796	9.579	4.649
ΣPUFA	53.591	53.333	55.435	51.021	55.562	54.770	27.880	51.851

*metilesteri masnih kiselina detektirana u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije

U nastavku ovoga rada istražen je rast mikroalge *Picochlorum* sp. D3 uz dodatak anorganskog izvora ugljika, natrijevog bikarbonata koji je dodan u hranjivu podlogu na početku uzgoja. Proveden je šaržni uzgoj kod tri koncentracije natrijevog bikarbonata (1, 2 i 5 g L^{-1}) tj. molarnih omjera izvora ugljika i dušika C:N=13.52; 27.05 i 67.64 [mol mol^{-1}]. Rast mikroalge prikazan je na slici 27. Pokazatelji uspješnosti procesa i sastav biomase na kraju uzgoja prikazani su u tablici 45, dok je utjecaj dodatka anorganskog izvora dušika na sastav lipida prikazan u tablici 46.



Slika 27. Krivulje rasta mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u f/2 podlozi uz različite molarne omjere izvora ugljika i dušika: (a) izvorna f/2, (b) omjer C:N =13,52 [mol mol $^{-1}$], (c) omjer C:N =27,05 [mol mol $^{-1}$], (d) omjer C:N =67,64 [mol mol $^{-1}$]

Tablica 45. Koncentracija biomase (g L^{-1}), specifična brzina rasta (dan^{-1}), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg L^{-1} dan^{-1}) i udio ugljikohidrata, proteina i ukupnih lipida u biomasi tijekom šaržnog uzgoja s pritokom

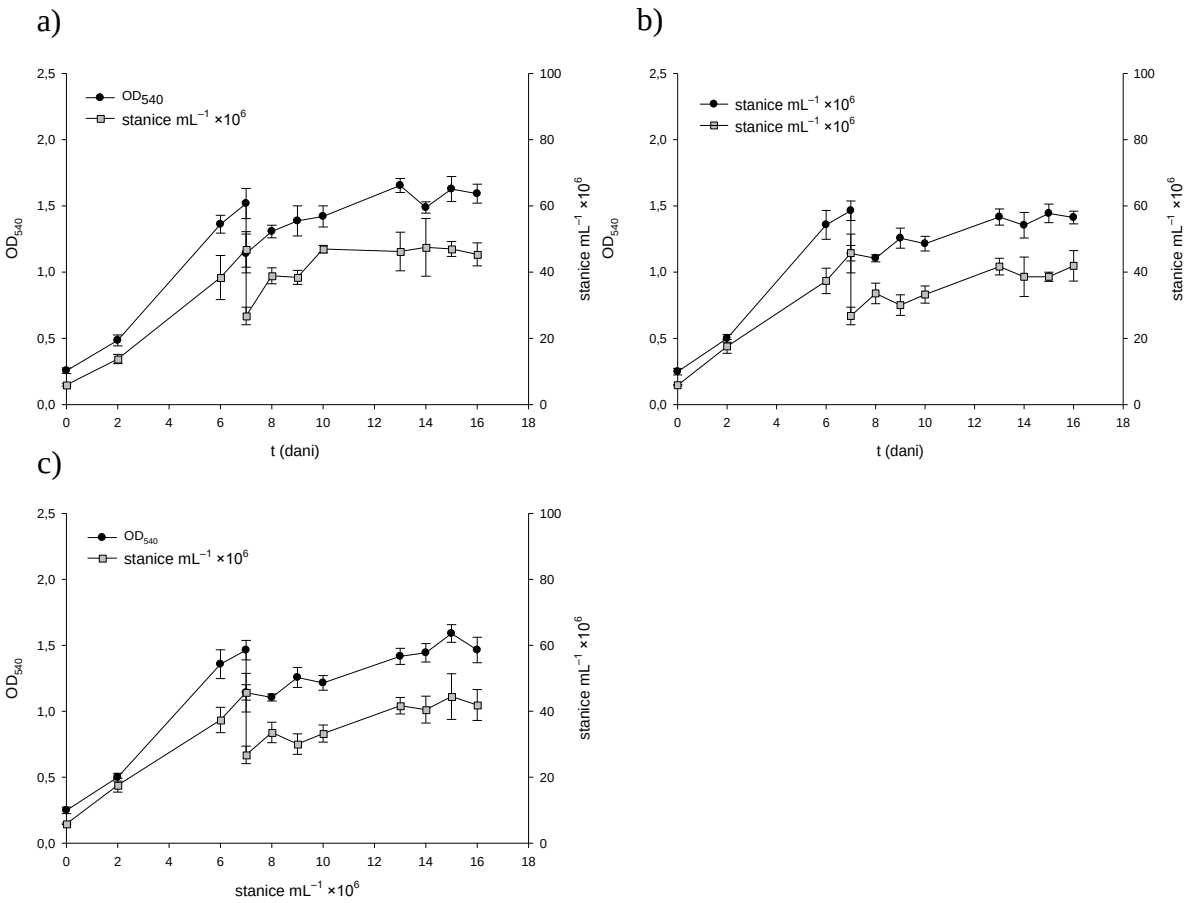
omjer C:N [mol mol $^{-1}$]	X (g L^{-1})	μ (dan^{-1})	Pr_x (g L^{-1}dan^{-1})	Pr_L (mg L^{-1}dan^{-1})	proteini (%)	lipidi (%)	ugljikohidrati (%)
izvorna f/2	0.56±0.18	0.18±0.04	0.043±0.01	2.36±	47.41±8.20	5.48±1.31	8.75±0.27
13,52	0.66±0,04	0.35±0.06	0.05±0.004	2.51±0.20	49,46±7.12	4.96±0.64	7.22±0.62
27,05	0.76±0.13	0.44±0.05	0.06±0.01	2.30±0.34	42,12±8.72	3.07±0.64	5.72±0.78
67,64	0.28±0.03	0.30±0.09	0.02±0.003	1.15±0.08	75,26±4.12	9.27±0.74	15.08±1.00

Tablica 46. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *Picochlorum* sp. D3 uzgojena na različitim omjerima koncentracije dušik i ugljika

% masna kiselina	izvorna f/2	omjer C:N [mol mol $^{-1}$]		
		13.52	27.05	67.64
C11:0	0.275	-		
C14:0	0.490	0.19±0.07	*	0.19±0.06
C14:1 cis 9	0.719	0.56±0.08	0.45±0.12	0.38±0.01
C15:0	1.773	0.85±0.27	0.23±0.001	0.66±0.16
C15:1 cis 10	0.318	0.52±0.63	0.27±0.11	0.22±0.04
C16:0	31.155	27.82±0.84	32.06±2.98	30.53±1.06
C16:1 cis 9	1.045	0.49±0.14	0.07±0.001	0.22±0.08
C17:0	18.600	23.02±1.76	24.86±4.72	17.21±0.52
C18:0	0.685	-	-	-
C18:1 cis 9	5.658	4.87±1.56	6.27±0.96	12.25±0.56
C18:2 cis 9,12	36.057	35.05±1.30	41.94±5.09	36.00±0.97
C18:3 cis 9,12,15	3.224	6.99±0.81	3.56±1.26	3.23±0.18
ΣSFA	52.98	38.737	37.193	44.222
ΣMUFA	7.74	7.930	7.372	4.757
ΣPUFA	39.28	53.333	55.435	51.021

*metilesteri masnih kiselina detektirana u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije

Potom je istražen uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dvije faze: prva u uvjetima optimalnim za sintezu biomase, a druga u uvjetima limitacije dušikom uz dodatak natrijevog bikarbonata kao anorganskog izvora ugljika. Pri tome je ispitan dodatak natrijevog bikarbonata u dvije koncentracije, 1 i 2 g L^{-1}. Dodatak natrijevog bikarbonata uslijedio je nakon sedam dana uzgoja u izvornoj f/2 podlozi, odnosno u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta kulture. Krivulje promjene optičke gustoće i broja stanica po mL prikazane na slici 28, prikazuju rast kulture *Picochlorum* sp. D3 nakon dodatka natrijevog bikarbonata.



Slika 28. Krivulja rasta mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u drugoj fazi uzgoja uz limitaciju dušika i dodatak različitih koncentracija natrijevog bikarbonata: a) izvorna f/2 (bez dušika); b) 1 g L^{-1} NaH_2CO_3; c) 2 g L^{-1} NaH_2CO_3

Koncentracija biomase dobivena na kraju druge faze uzgoja koja je trajala 16 dana, prikazana je u tablici 45. Učinak dodatka natrijevog bikarbonata na specifičnu brzinu rasta također je prikazan u tablici 47, zajedno sa makromolekulskim sastavom biomase (udjeli proteina i lipida) te produktivnosti sinteze biomase i lipida.

Tablica 47. Koncentracija biomase (g L^{-1}), produktivnost sinteze biomase i lipida (mg L^{-1} dan^{-1}) i udio proteina i ukupnih lipida u biomasi tijekom uzgoja uz limitaciju izvorom dušika i dodatak natrijevog bikarbonata

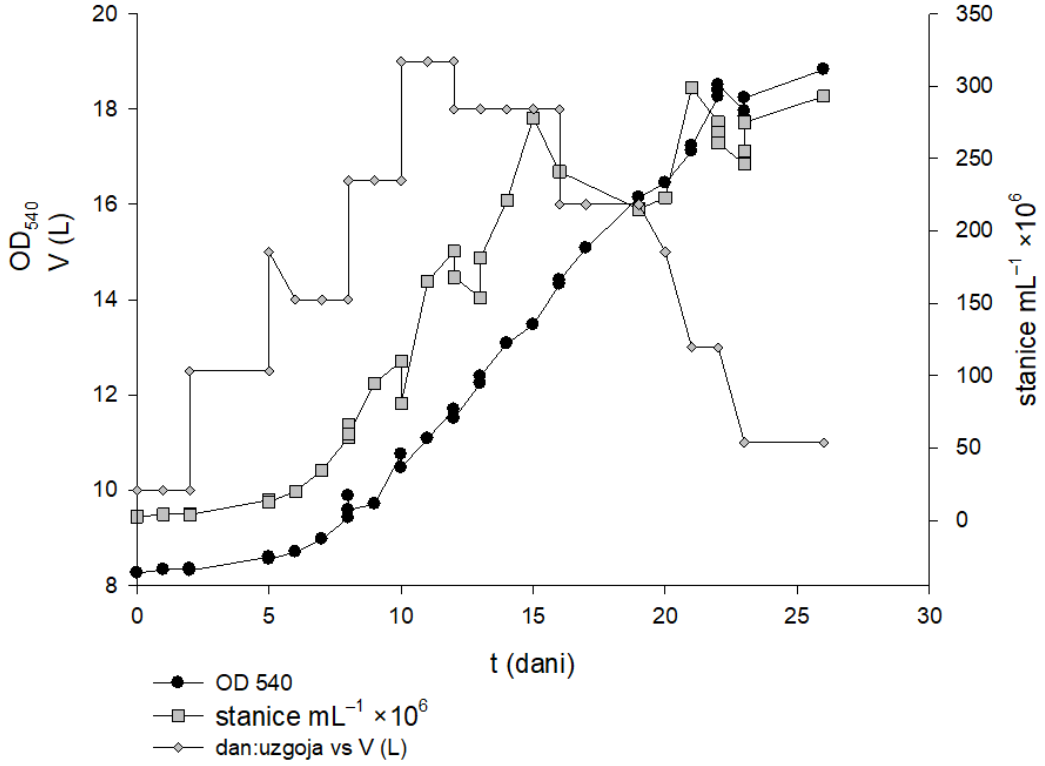
podloga	X (g L^{-1})	Pr_X (g L^{-1} dan^{-1})	Pr_L (mg L^{-1} dan^{-1})	proteini (%)	lipidi (%)
izvorna f/2 (bez dušika)	0.39±0.01	0.043±0.01	2.36±0.1	53.53±2.73	8.31±2.54
1 gL^{-1} $NaHCO_3$	0.16±0,02	0.01±0.004	2.51±0.20	46.74±2.68	8.98±2.21
2 gL^{-1} $NaHCO_3$	0.15±0.02	0.009±0.01	2.30±0.34	31.26±2.83	10.22±3.16

Učinak natrijevog bikarbonata na sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *Picochlorum* sp. D3 prikazan je u tablici 48.

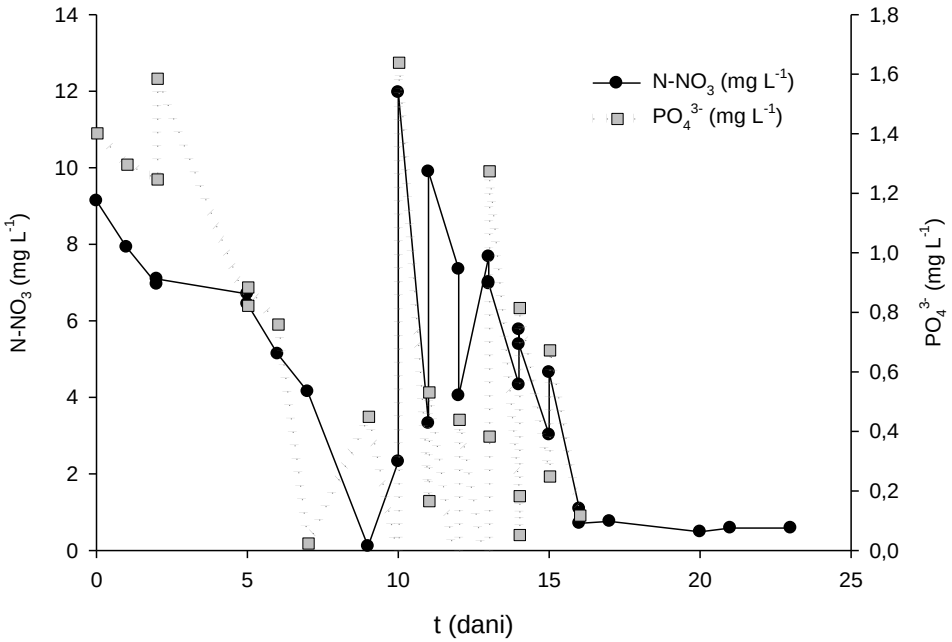
Tablica 48. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima *Picochlorum* sp. D3 nakon uzgoja u uvjetima limitacije dušikom i dodatak anorganskog izvora ugljika

% masna kiselina	izvorna f/2	1 g L^{-1} NaH_2CO_3	2 g L^{-1} NaH_2CO_3
C11:0	0.146	-	
C12:0	0.173		
C14:0	0.473	0.19±0.07	*
C14:1 cis 9	0.281	0.56±0.08	0.45±0.12
C15:0	1.773	0.85±0.27	0.23±0.001
C15:1 cis 10	0.318	0.52±0.63	0.27±0.11
C16:0	31.155	27.82±0.84	32.06±2.98
C16:1 cis 9	1.045	0.49±0.14	0.07±0.001
C17:0	18.600	23.02±1.76	24.86±4.72
C18:0	0.685	-	-
C18:1 cis 9	5.658	4.87±1.56	6.27±0.96
C18:2 cis 9,12	36.057	35.05±1.30	41.94±5.09
C18:3 cis 6,9,12	3.224	6.99±0.81	3.56±1.26
C18:3 cis 9,12,15			
ΣSFA	52.98	38.737	37.193
ΣMUFA	7.74	7.930	7.372
ΣPUFA	39.28	53.333	55.435

Naposlijetku je istražen i šaržni uzgoj mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dvije faze u barbotirajućoj koloni. Prva faza uzgoja usmjerena je proizvodnji biomase te je vođena šaržno, ali uz sukcesivno povećanje volumena u bioreaktoru. Početni volumen bio je 10 L (8L svježe hranjive podloge i 2L inokuluma), te je svježa hranjiva podloga dodavana u obrocima od 2.5 L (10., 12., 13. i 16. dan uzgoja). Promjena optičke gustoće i broja stanica po mL prikazana je na slici 29, a promjena koncentracije nutrijenata tijekom uzgoja prikazana na slici 30. Pokazatelji uspješnosti procesa prikazani su u tablici 49. dok je profil masnih kiselina u ukupnim lipidima prikazan u tablici 50.



Slika 29. Promjena optičke gustoće (OD_{540}), broja stanica po mL (stanice $mL^{-1}\times10^{6}$) i volumena u barbotirajućoj koloni (L) tijekom šaržnog uzgoja uz sukcesivno povećanje volumena mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni



Slika 30. Promjena koncentracije nutrijenata dušika i fosfora tijekom šaržnog uzgoja uz sukcesivno povećanje volumena mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni

Tablica 49. Koncentracija biomase, produktivnost sinteze biomase i lipida i sastav biomase tijekom šaržnog uzgoja uz skucesivno povećanje volumena mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni

t (dan)	X ($g\ L^{-1}$)	Pr_X ($g\ L^{-1}\ dan^{-1}$)	Pr_L ($mg\ L^{-1}\ dan^{-1}$)	proteini (%)	lipidi (%)	UH (%)
9	0.13	0.015		63.9		13.97
12	0.30	0.025	3.04	38.85	12.16	13.71
16	0.52	0.033	2.05	61.20	6.20	24.41
19	0.67	0.035	3.30	52.55	9.43	11.81
21	0.76	0.036	71.75	44,00	9.44	34.23
23	0.85	0.037		44,80		
26	0.90	0.035	85.5	42,35	9.50	37.69

Tablica 50. Profil masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *Picochlorum* sp. D3 tijekom šaržnog uzgoja uz skucesivno povećanje volumena mikroalge u barbotirajućoj koloni

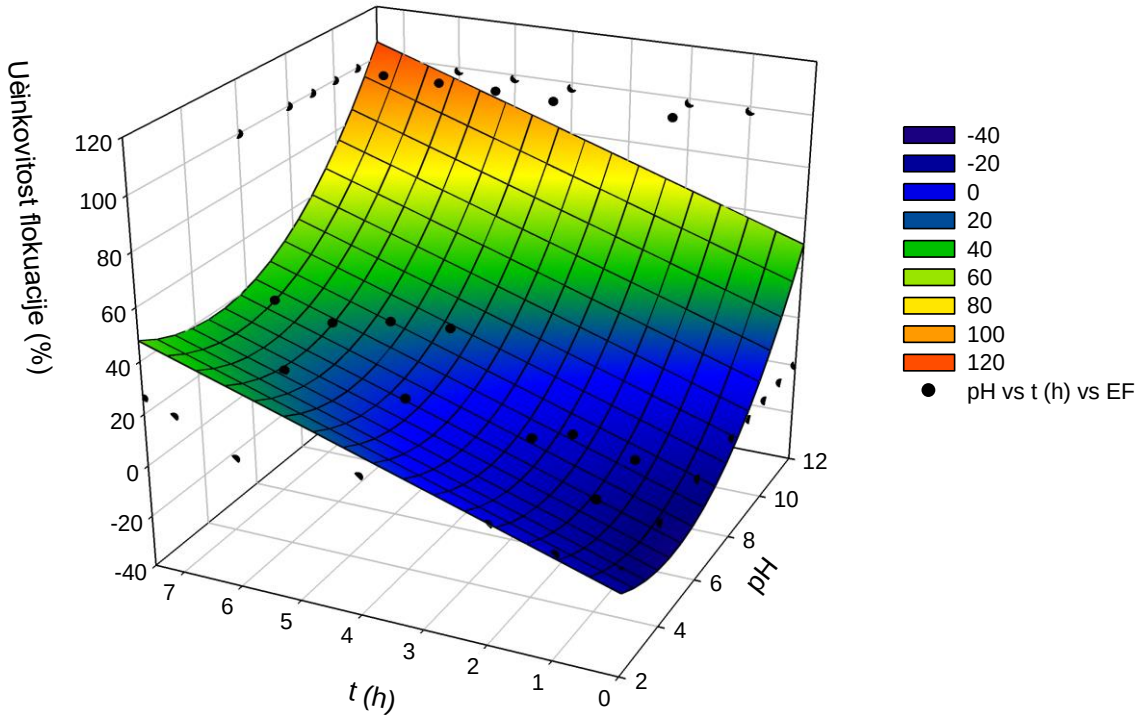
% masna kiselina	% 12	16	19	21	26
C11:0	0.16	0.39	0.23	0.15	0.43
C14:1 cis 9	0.68	0.58	0.07	0.01	
C15:1 cis 10	0.09				
C16:0	29.21	27.47	22.97	26.27	36.59
C16:1 cis 9	5.88	3.98	1.66	1.27	0.51
C17:0	20.47	28.31	16.79	15.29	16.36
C18:1 cis 9	3.85	0.14	2.81	4.37	999
C18:2 cis 9,12	39.17	39.14	28.63	27.42	36,11
C18:3 cis 9,12,15			26.84	25.23	
C24:0	0.49				
ΣSFA	50.33	56.17	56.78	41.71	53.41
ΣMUFA	10.5	4.7	4.54	5.65	10.5
ΣPUFA	39.17	39.14	55.47	52.65	36.11

4.4 Optimizacija flokulacije

Uobičajene metode izdvajanja mikroalgalne biomase najčešće uključuju centrifugiranje i filtraciju koje su cjenovno zahtjevne metode. U ovome radu istražena je mogućnost izdvajanja biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 flokulacijom kao alternativnom metodom izdvajanja. Ispitana su četiri načina flokulacije: 1.) promjenom pH vrijednosti; 2) željezovim kloridom; 3) hitozanom i 4) bioflokulacija primjenom plijesni *Mortierella isabellina*.

4.4.1 Flokulacija promjenom pH vrijednosti

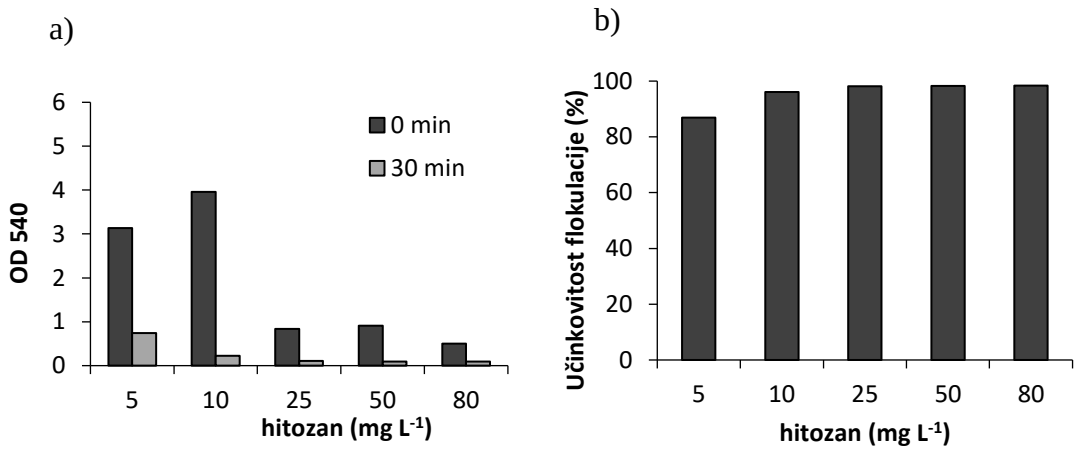
Istražena je mogućnost samoflokulacije stanica mikroalge *Picochlorum* sp. D3 promjenom pH kulture u rasponu od pH 2 do pH 14. Nakon podešavanja pH kulture na željenu vrijednost, kultura je ostavljena u mirovanju kako bi se sedimentacijom istaložile nastale flokule. Tijekom 8 h izuzimani su uzorci kojima je određena optička gustoća pomoću koje je izračunata učinkovitost. Učinkovitost flokulacije u ovisnosti o pH vrijednosti kulture i vremenu prikazana je na slici 31.



Slika 31. Ovisnost učinkovitosti flokulacije o pH vrijednosti kulture i vremenu

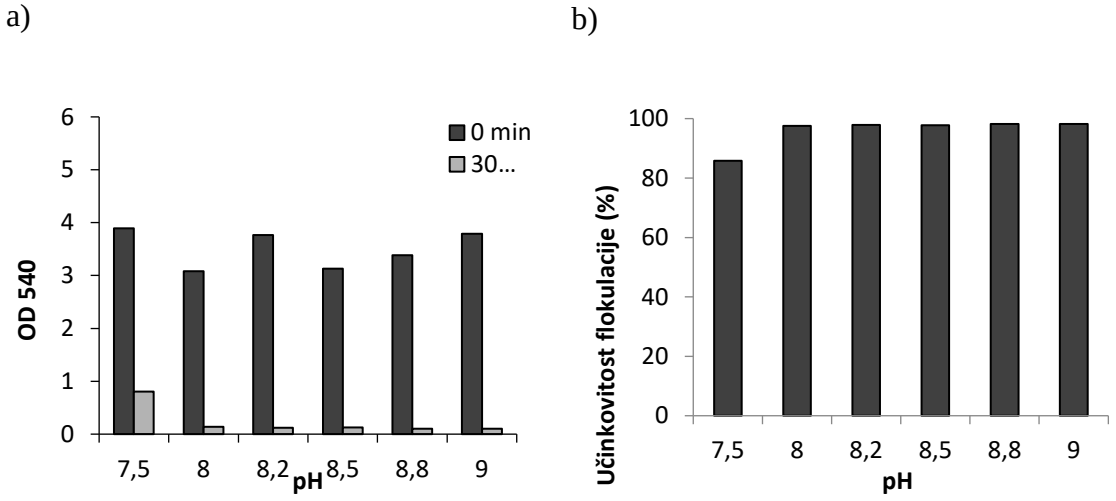
4.4.2 <u>Flokulacija hitozanom</u>

Istražena je bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću biopolimera hitozana. Najprije je istražen utjecaj širokog područja koncentracije hitozana na učinkovitost flokulacije koja je prikazana. Na slici 32 (a) prikazana je promjena u optičkoj gustoći kulture nakon 30 minuta od trenutka dodatka hitozana, a pripadajuća učinkovitost flokulacije prikazana je na slici 32 (b).



Slika 32. Utjecaj koncentracije hitozana na flokulaciju: (a) razlika u odnosu na trenutak dodavanja i nakon 30 min; (b) učinkovitost flokulacije

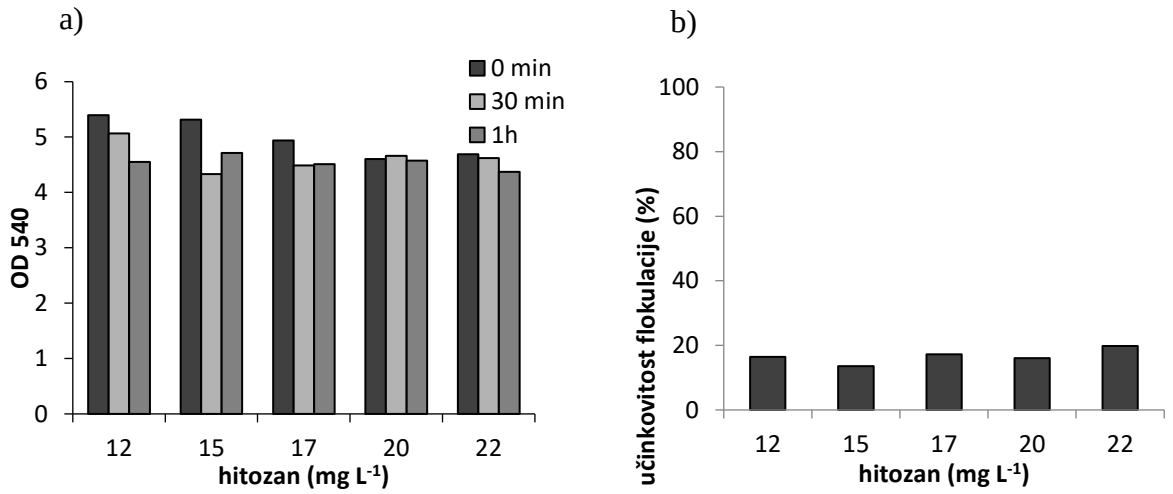
Potom je za nastavak istraživanja odabrana ona koncentracija hitozana nakon koje s daljnjim povećanjem nije došlo do značajnog povećanja učinkovitosti flokulacije. Koncentracija hitozana primijenjena je za istraživanje utjecaja pH vrijednosti kulture na proces flokulacije. Istraženo je pH područje od 7.5 do 9, te su rezultati prikazani na slici 33.



Slika 33. Učinkovitost flokulacije u ovisnosti o pH vrijednosti uz konstantnu koncentraciju hitozana od 25 mg L^{-1}: (a) razlika u odnosu na trenutak dodavanja i nakon 30 min; (b) učinkovitost flokulacije (%)

Nakon što je odabrana odgovarajuća pH vrijednost pri kojoj je postignuta visoka učinkovitost flokulacije, ponovljena je optimizacija koncentracije hitozana. U ovom koraku istražen je uži raspon koncentracija u rasponu od 12 do 25 mg L^{-1} te su dobiveni rezultati prikazani na slici 34. Na slici 34 (a) prikazana je promjena u optičkoj gustoći kulture nakon

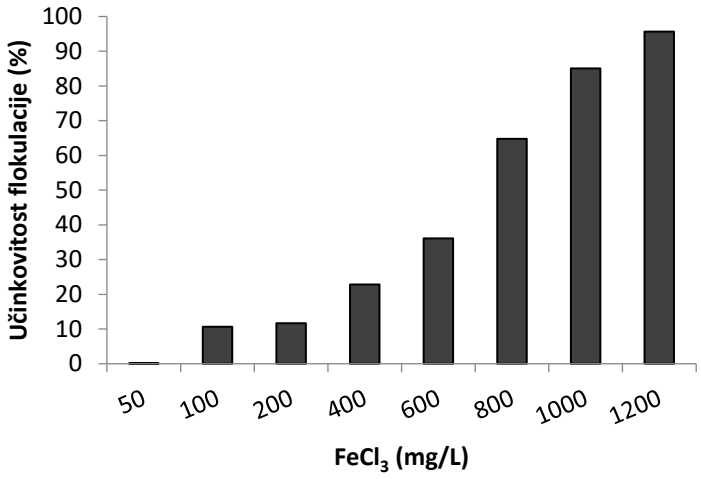
pola sata i sat vremena nakon dodatka odgovarajuće koncentracije hitozana. Učinkovitost flokulacije za svaku istraženu koncentraciju hitozana prikazana je na slici 34 (b).



Slika 34. Ovisnost učinkovitosti flokulacije o koncentraciji hitozana pri konstantnoj pH vrijednosti od 8: (a) razlika u odnosu na trenutak dodavanja i nakon 30 i 60 min; (b) učinkovitost flokulacije (%)

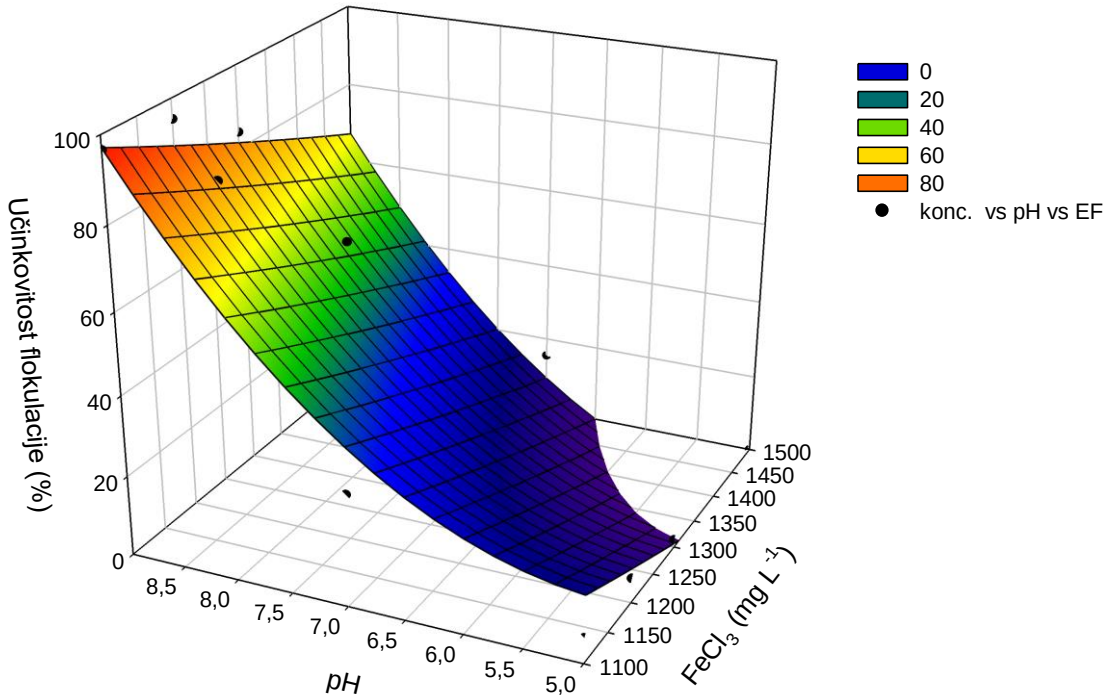
4.4.3 Flokulacija željezovim kloridom

Osim hitozana, ispitan je i željezov klorid kao flokulant za flokulaciju biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Prvi korak u istraživanju bio je odabrati odgovarajuću koncentraciju željezovog klorida za učinkovitu flokulaciju. Istražen je najprije široki raspon koncentracija od 50 do 1200 mg L^{-1} željezovog klorida, a učinkovitost flokulacije prikazana je na slici 35.



Slika 35. Ovisnost učinkovitosti flokulacije o koncentraciji željezovog klorida.

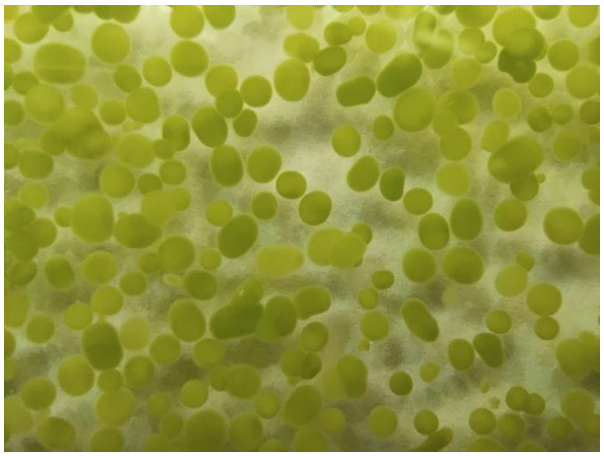
Nastavak istraživanja uključivao je istraživanje užeg područja koncentracije željezovog klorida (1100-1500 mg L^{-1}) zajedno sa istraživanjem odgovarajuće pH vrijednosti za učinkovit proces flokulacije. Međusobna ovisnost ova tri parametra prikazana je na slici 36.



Slika 36. Ovisnost učinkovitosti folukacije o koncentraciji $FeCl_3$ i pH vrijednosti

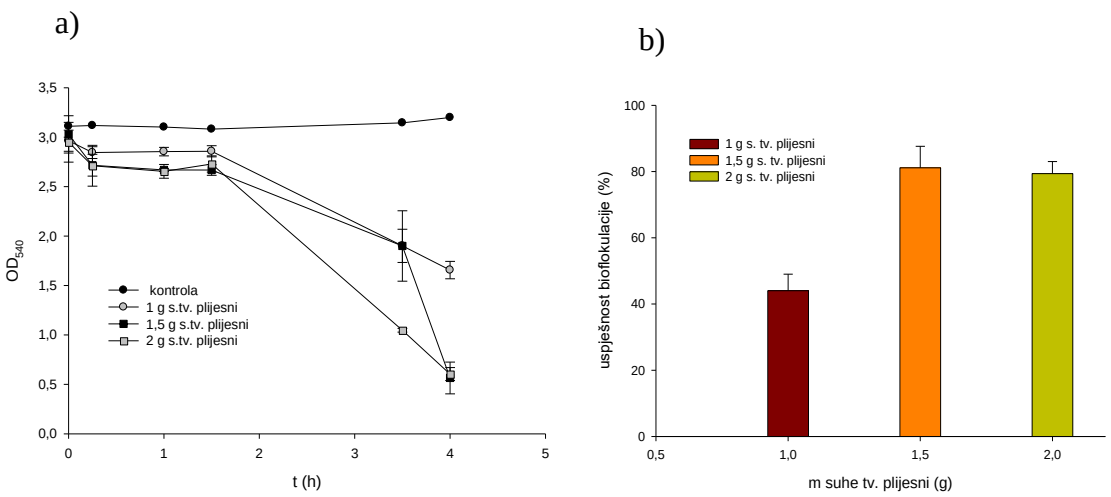
4.4.4 Bioflokulacija pomoću plijesni *Mortierella isabellina*

Kao zadnja alternativna metoda izdvajanja biomase je istražena je mogućnost bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoć peleta plijesni *Mortierella isabellina* (slika 37).



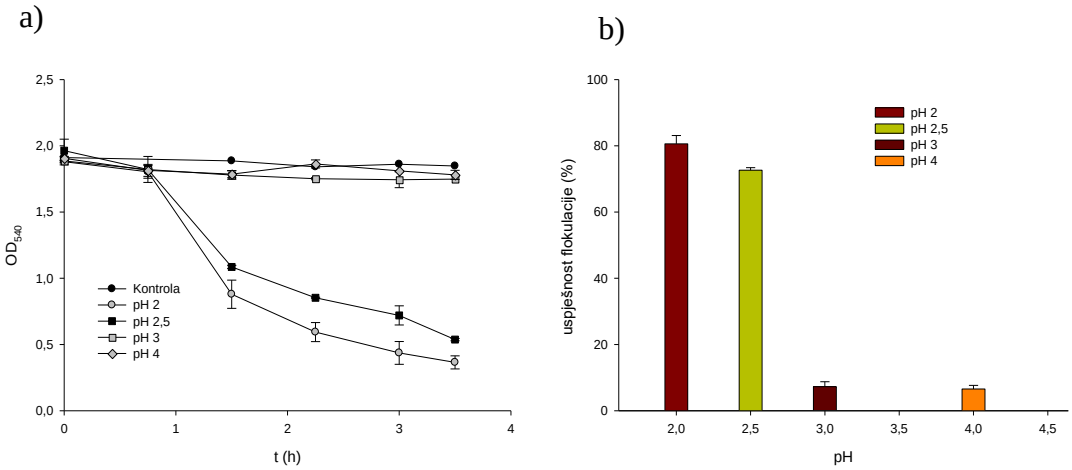
Slika 37. Peleti plijesni s biomasom mikroalge nakon provedene bioflokulacije (vlastita fotografija).

Prvi korak u istraživanju obuhvaćao je istraživanje učinak mase suhe tvari plijesni na učinkovitost bioflokulacije. Tijek adsorpcije mikroalgalnih stanica na hife plijesni praćen je mjerenjem optičke gustoće kulture tijekom vremena (8 h), a na temelju toga izračunata je i učinkovitost bioflokulacije. Dobivena krivulja tijeka bioflokulacije prikazana je na slici 38 a), a ovisnost učinkovitosti o masi suhe tvari plijesni na slici 38 b).



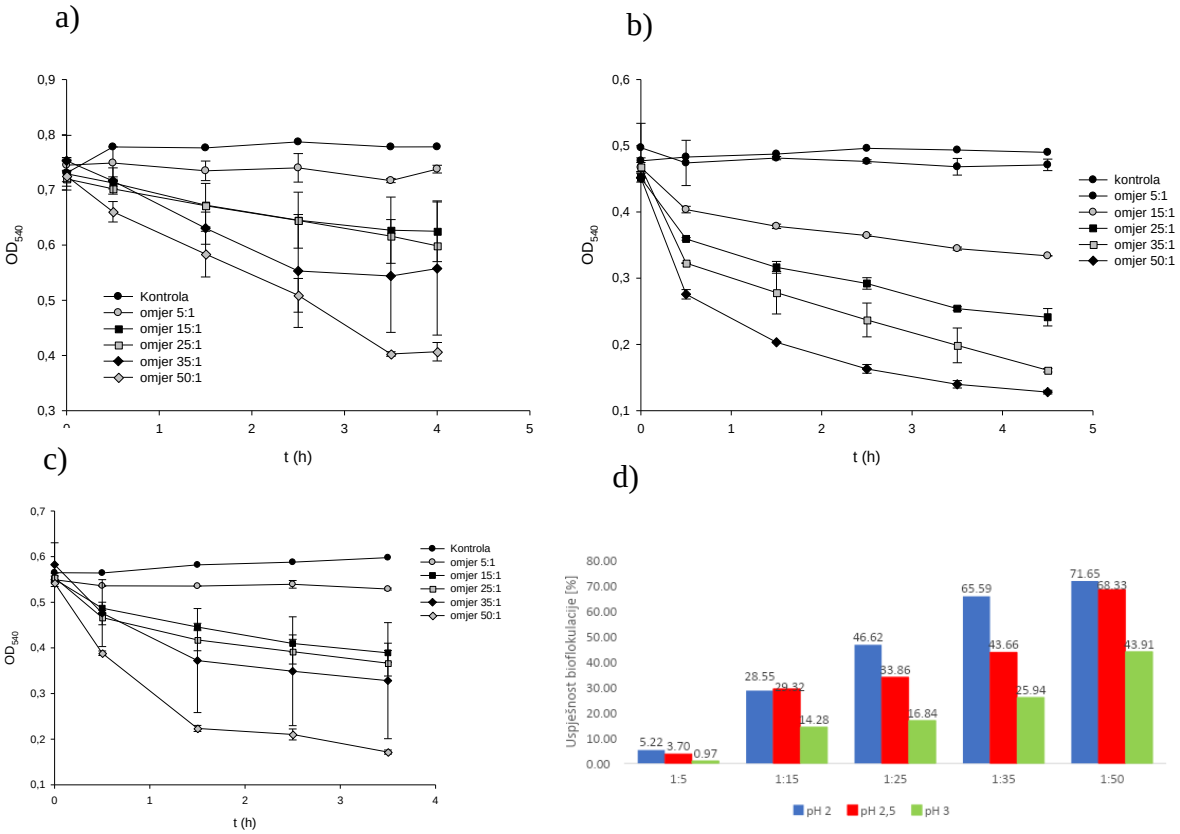
Slika 38. Bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću dodatka različitih masa suhe tvari plijesni *Mortierella isabellina:* (a) promjena optičke gustoće kulture u vremenu tijekom bioflokulacije; (b) učinkovitost bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Odabrana masa suhe tvari plijesni potom je primijenjena u istraživanju učinka pH vrijednosti na učinkovitost bioflokulacije koja je prikazana na slici 39 (b). Tijek bioflokulacije pri različitim pH vrijednostima također je praćen mjerenjem optičke gustoće kulture tijekom vremena te su dobivene krivulje prikazane na slici 39 (a).



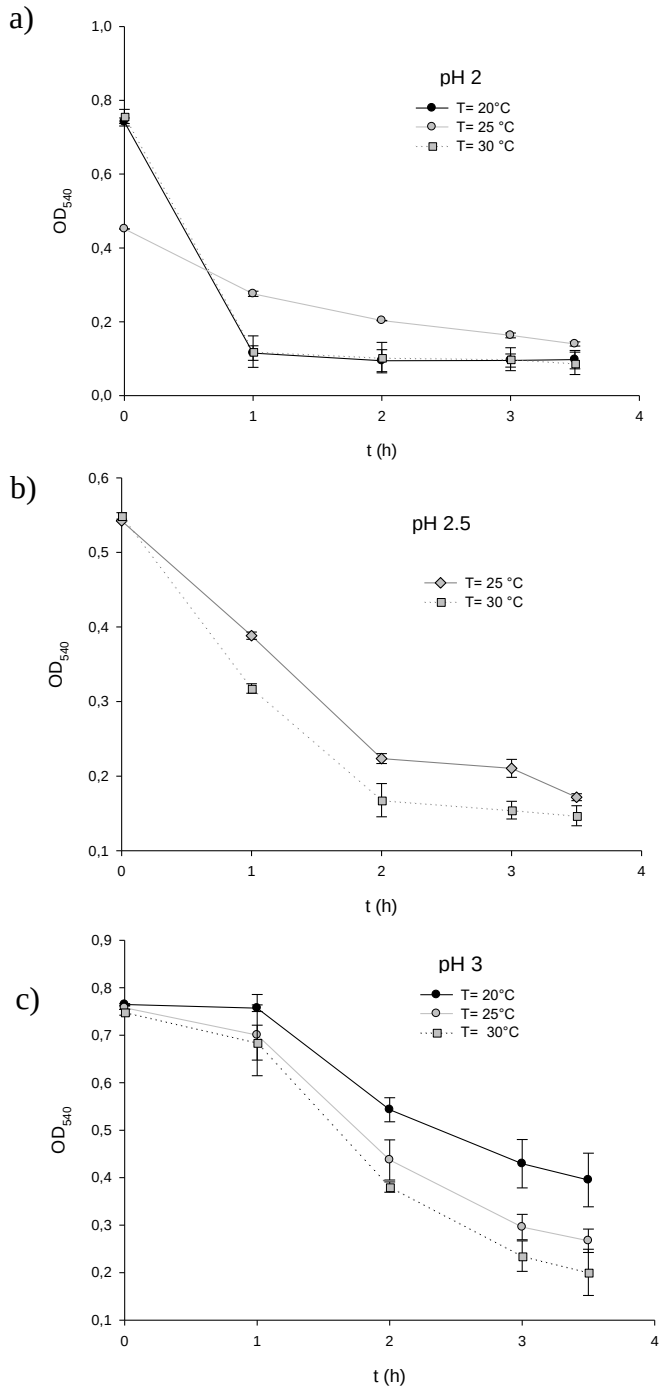
Slika 39. Bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* pri različitim pH vrijednostima*:* (a) promjena optičke gustoće kulture u vremenu tijekom bioflokulacije; (b) učinkovitost bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Učinkovitost bioflokulacije istovremeno značajno ovisi i o pH vrijednosti kulture i o omjeru masa suhe tvari plijesni i mikroalge. Pa je tako slijedeći korak u istraživanju bio paralelno ispitati učinak oba parametra na učinkovitost bioflokulacije. Pet različitih masenih omjera plijesni i mikroalge (5:1, 15:1, 25:1, 35:1 i 50:1) primijenjeno je u bioflokulaciji pri tri različite pH vrijednosti (2, 2.5 i 3). Tijek bioflokulacije praćen promjenom optičke gustoće kulture prikazan je na slici 40 (a, b i c), kao i učinkovitost bioflokulacije za svaki istraženi uvjet (d).

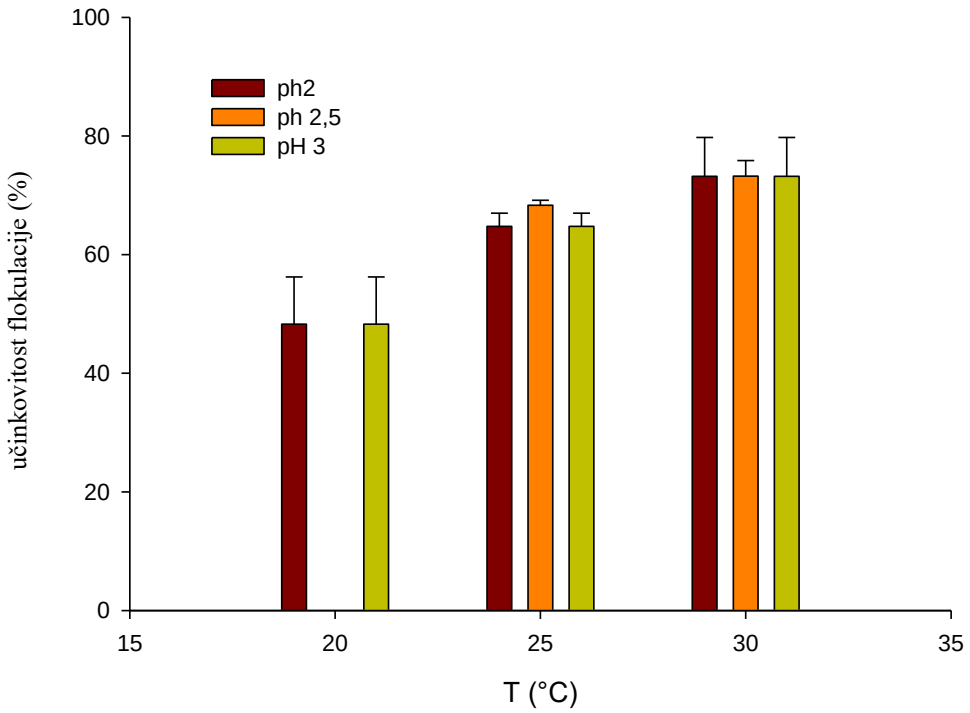


Slika 40. Bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* pri različitim masenim omjerima plijesni i mikroalge i konstantnim pH*:* (a) tijek bioflokulacije pri pH 3; (b) tijek bioflokulacije pri pH 2.5; (c) tijek bioflokulacije pri pH 2; (d) učinkovitost bioflokulacije pri različitim omjerima masa plijesni i mikroalge te različitim pH vrijednostima

Kada je odabran odgovarajući maseni omjer plijeni i mikroalge, eksperiment je ponovljen za sve tri istražene pH vrijednosti, ali pri različitim temperaturama kako bi se istražio i njen utjecaj. Krivulje promjene optičke gustoće kulture u vremenu tijekom bioflokulacije prikazane su na slici 41. Za svaki istraženi uvjet ponovno je izračunata učinkovitost bioflokulacije koja je prikazana na slici 42.



Slika 41. Tijek bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *M. isabellina* pri različitim pH vrijednostima i temperaturama: (a) pH 2; (b) pH 2.5; (c) pH 3

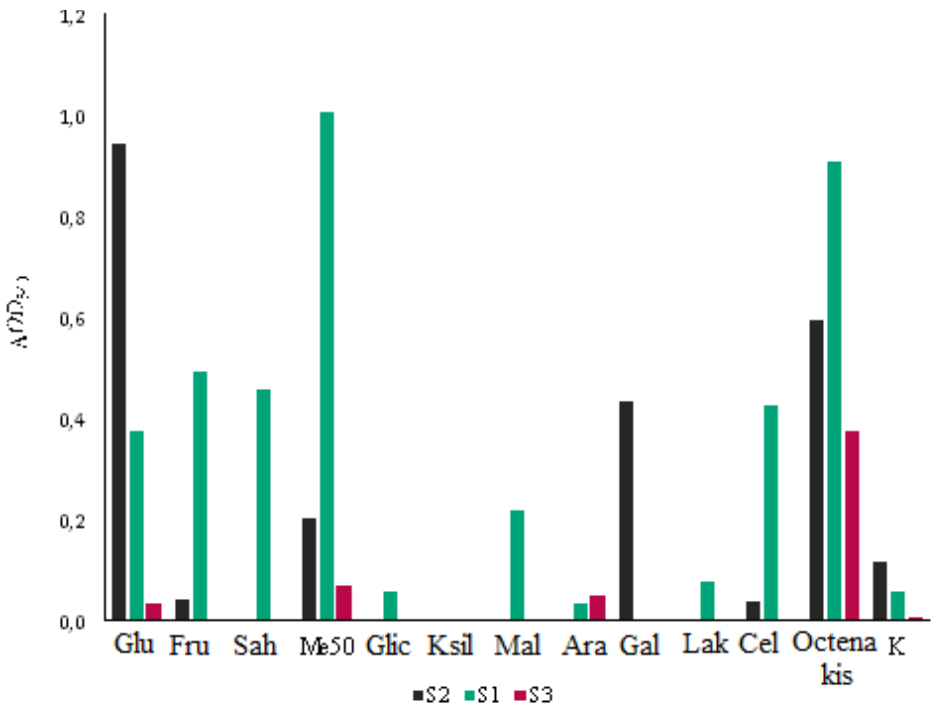


Slika 42. Učinkovitost bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *M. isabellina* pri različitim pH vrijednostima i temperaturama: (a) pH 2; (b) pH 2.5; (c) pH 3

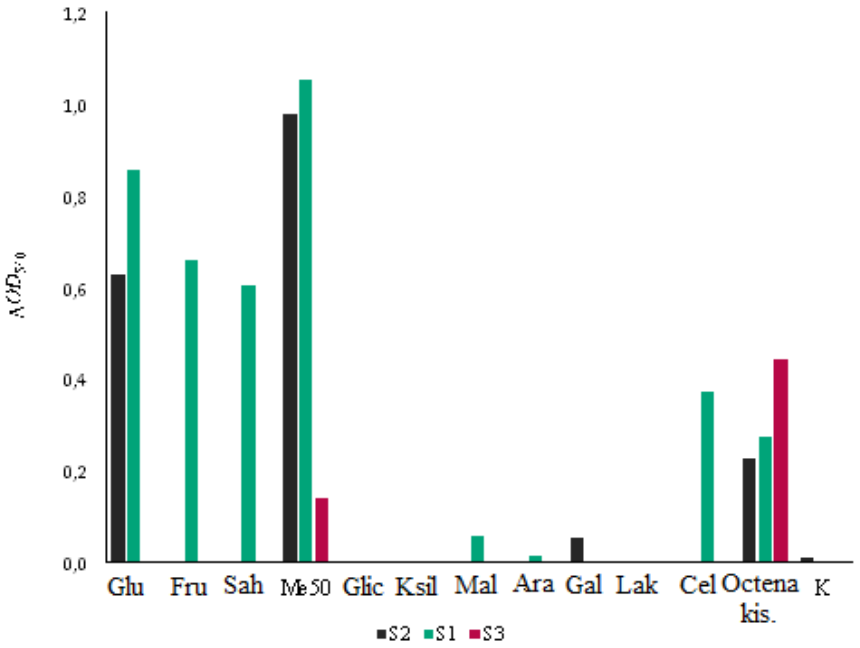
4.5 Karakterizacija slatkovodnih mikroalgi

4.5.1 Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima i koncentracijama ugljika

Tri slatkovodne mikroalge istražene su u ovome doktorskome radu: *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3. Najprije je istražena mogućnost rasta navedenih mikroalgi na različitim organskim izvorima ugljika (glukoza, fruktoza, saharoza, melasa, glicerol, ksiloza, maltoza, arabinoza, galaktoza, laktoza, celobioza i octena kiselina). Pri tome je uzgoj vođen na dva načina. Prvi je uz prisustvo izvora svjetlosti kako bi se istražila mogućnost miksotrofnog rasta (slika 43), a drugi istraženi način uzgoja je heterotrofni odnosno u tami. Rezultati rasta u heterotrofnim uvjetima prikazani su na slici 44.

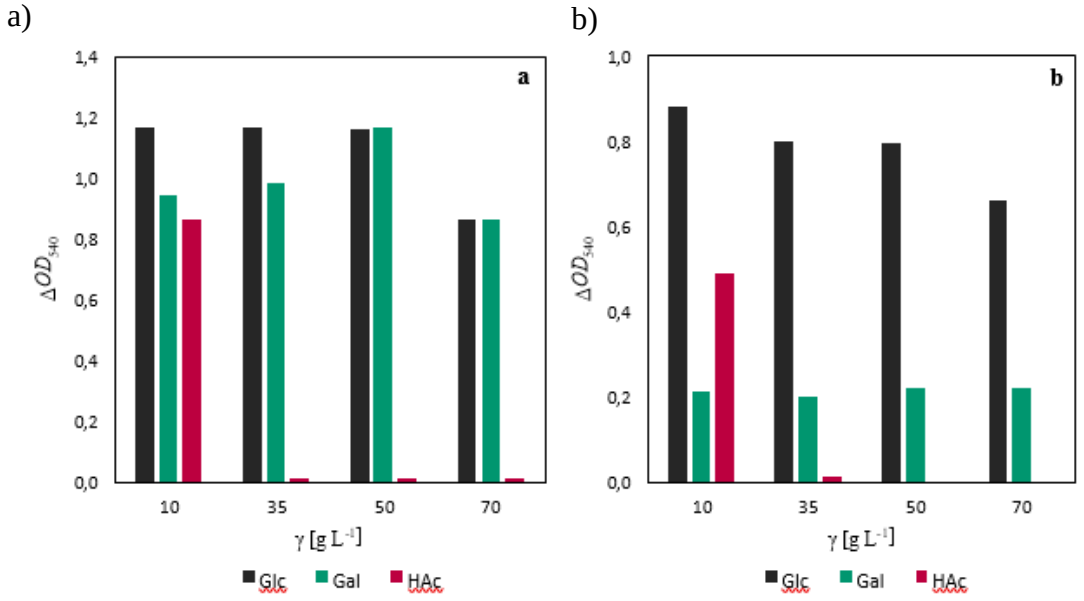


Slika 43. Rast sojeva *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3 na različitim izvorima ugljika u miksotrofnim uvjetima

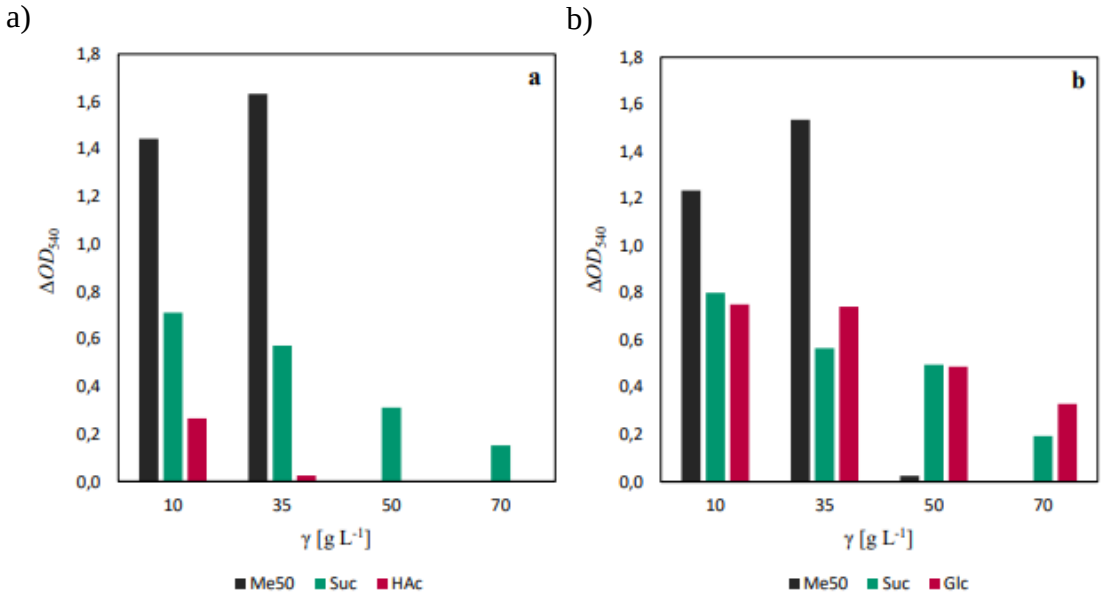


Slika 44. Rasta sojeva *Chlorella vulgaris S2*, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3 na različitim izvorima ugljika u heterotrofnim uvjetima

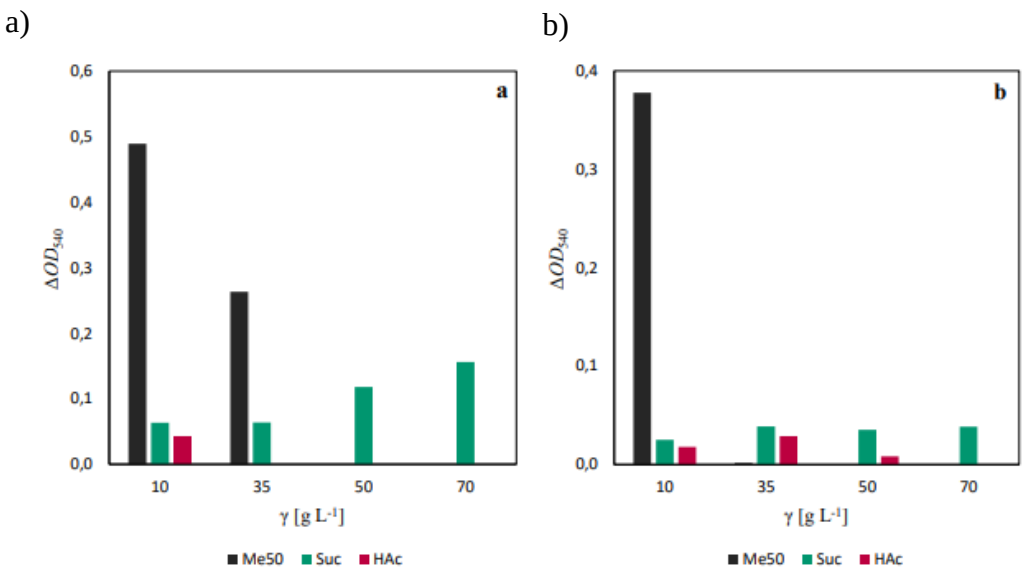
S obzirom na dobivene rezultate, za svaki soj odabrano je tri izvora ugljika za nastavak istraživanja u kojem je istražen utjecaj njihove koncentracije na rast. Ponovno je istražen rast i u miksotrofnim i u heterotrofnim uvjetima. Rast mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 prikazan je na slici 45, mikroalge *Chlorococcum* sp. S1 na slici 46 te mikroalge *Tetradesmus obliquus* S3 na slici 47.



Slika 45. Miksotrofni (a) i heterotrofni (b) rasta soja *Chlorella vulgaris* S2 pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika



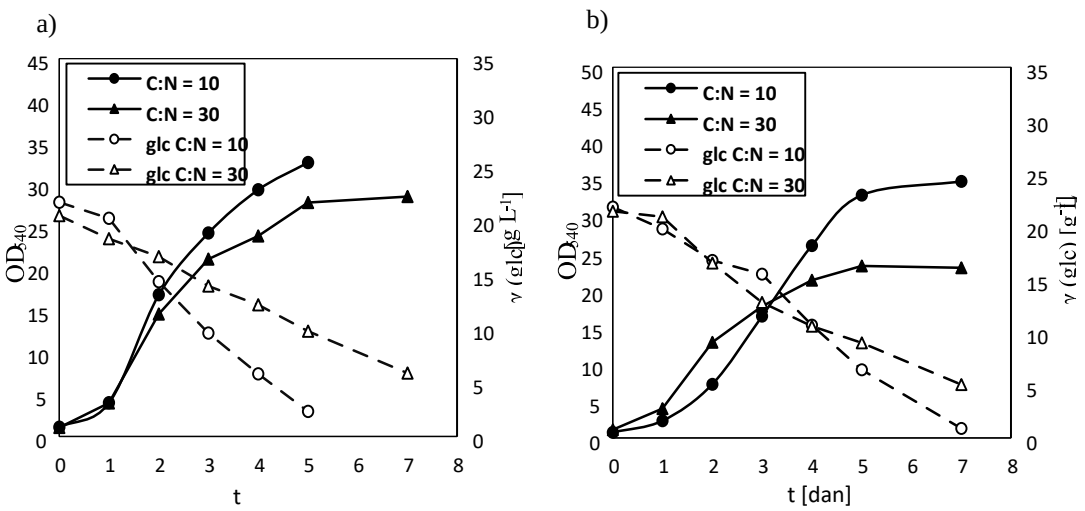
Slika 46. Miksotrofni (a) i heterotrofni (b) rasta soja *Chlorococcum* sp. S1 pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika



Slika 47. Miksotrofni (a) i heterotrofni (b) rasta soja *Tetradesmus obliquus* S3 sp. pri različitim koncentracijama odabranih izvora ugljika

4.5.2. <u>Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim koncentracijama izvora dušika</u>

Prethodni eksperimenti služili su kao temelj za odabir soja mikroalge i najpogodnijeg izvora ugljika za daljnje istraživanje. Budući da je *Chlorella vulgaris* pokazala stabilan miksotrofni i heterotrofni rast na glukozi u rasponu od 10 - 50 g L^{-1}, ova mikroalga odabrana je za nastavak istraživanje. Osim izvora ugljika, vrlo je važna opskrba izvorima dušika, fosfora i sumpora koji omogućuju normalan rast i funkcioniranje stanica. Na rast i proizvodnju specifičnih proizvoda metabolizma posebice ima molarni omjer ugljika i dušika. Stoga je kao slijedeći korak u istraživanju provedeno ispitivanje rasta na različitim koncentracijama dušika, odnosno različitim molarnim omjerima ugljika i dušika. Najprije su ispitana dva omjera C:N [mol mol^{-1}] od 10 i 30, a potom i širi raspon ispitujući i omjere 50 i 75. Tijekom uzgoja praćena je promjena optičke gustoće kulture kao i potrošnja supstrata, odnosno izvora ugljika te su dobivene krivulje rasta prikazane na slici 48.



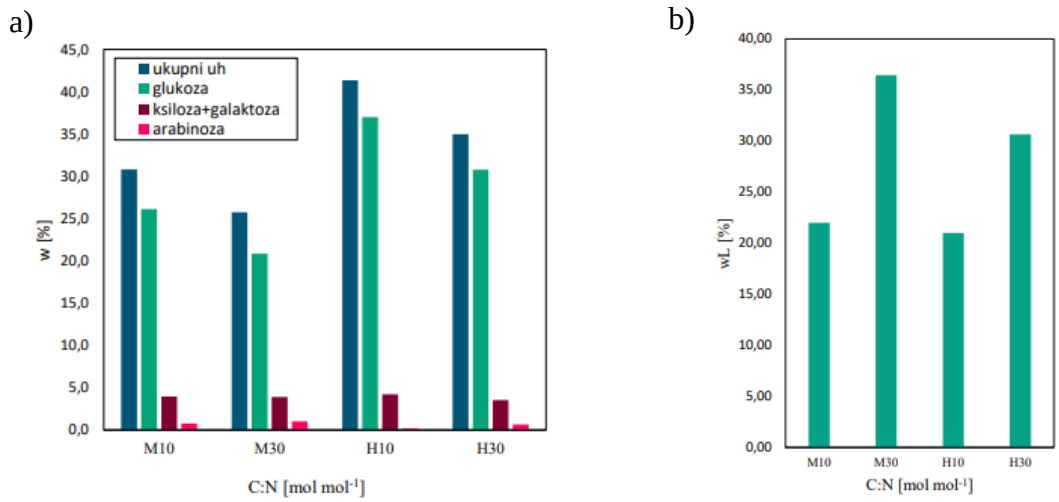
Slika 48. Krivulje rasta soja *Chlorella vulgaris* S2 pri različitim molarnim omjerima C:N u miksotrofnim (a) i heterotrofnim uvjetima (b)

Koncentracija suhe tvari biomase određena je gravimetrijskom metodom, te je izračunat koeficijent konverzije supstrata u biomasu. Rezultati su prikazani u tablici 51 zajedno sa izračunatom produktivnošću sinteze biomase.

Tablica 51. Koncentracija suhe tvari (g L^{-1}), koeficijent konverzije supstrata u biomasu (g g^{-1}) i produktivnost sinteze biomase (g L^{-1} dan^{-1}) mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 tijekom uzgoja u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima

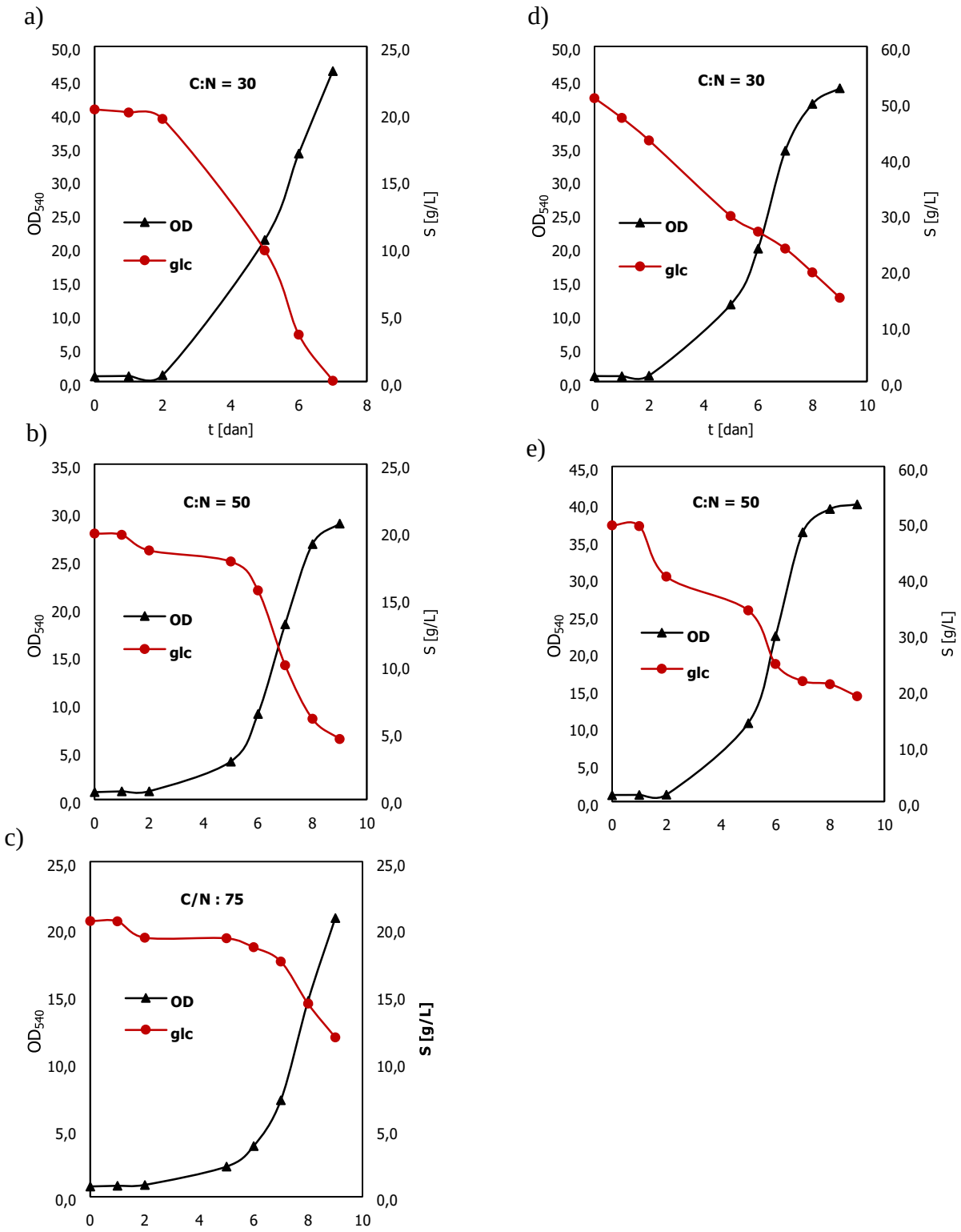
način uzgoja	C:N [mol mol^{-1}]	X [g L^{-1}]	YX/S [g g-1]	Pr_x [g $L^{-1}dan^{-1}$]
miksotrofno	10	8,5800	0,4429	1,7160
miksotrofno	30	7,4800	0,5125	1,0686
heterotrofno	10	10,2550	0,4907	1,4650
heterotrofno	30	6,9150	0,4229	0,9879

Na kraju uzgoja određen je udio ugljikohidrata i udio lipida u biomasi mikroalge. Osim toga, određen je i sastav monosaharida u ugljikohidratima te je on zajedno s udjelima prikazan na slici 49.



Slika 49. Promjena udjela (a) ugljikohidrata i (b) lipida (w_L) pri različitim molarnim omjerima C:N u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima soja *Chlorella vulgaris* S2

Tri omjera C:N [mol mol^{-1}] od 30, 50 i 75 istražena su za koncentraciju glukoze od 20 g L^{-1}. Promjena koncentracije supstrata odnosno glukoze tijekom rasta mikroalge praćena je svakodnevnim izuzimanjem uzoraka i određivanjem koncentracije glukoze pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (poglavlje 3.3.4.). Krivulja rasta pri navedeni uvjetima, te potrošnje supstrata, prikazana je na slici 50 (a), (b) i (c). Osim toga omjeri C:N [mol mol^{-1}] 30 i 50 istraženi su za koncentraciju glukoze od 50 g L^{-1} za koju se prethodnim eksperimentima potvrdilo da nema inhibirajući učinak na rast mikroalge. Krivulja rasta mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 za navedene uvjete, kao i krivulja promjene koncentracije glukoze tijekom uzgoja prikazana je na slici 50 (d) i (e).

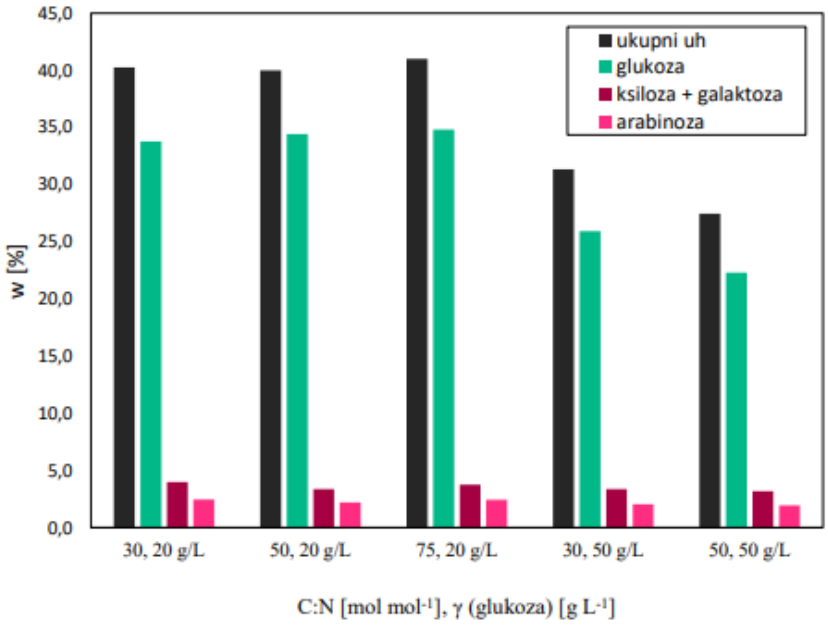


Slika 50. Krivulje rasta i utroška supstrata prilikom uzgoja *Chlorella vulgaris* S2 na: (a) 20 g L^{-1} glukoze i C:N=30 [mol mol^{-1}]; (b) 20 g L^{-1} glukoze i C:N=50 [mol mol^{-1}]; (c) 20 g L^{-1} glukoze i C:N=75 [mol mol^{-1}]; (d) 50 g L^{-1} glukoze i C:N=30 [mol mol^{-1}]; (e) 50 g L^{-1} glukoze i C:N=50 [mol mol^{-1}]

Tablica 52. Koncentracija suhe tvari (g L^{-1}), koeficijent konverzije supstrata u biomasu (g g^{-1}) i produktivnost sinteze biomase (g L^{-1} dan^{-1}) mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog mikrsotrofnog uzgoja u tikvicama

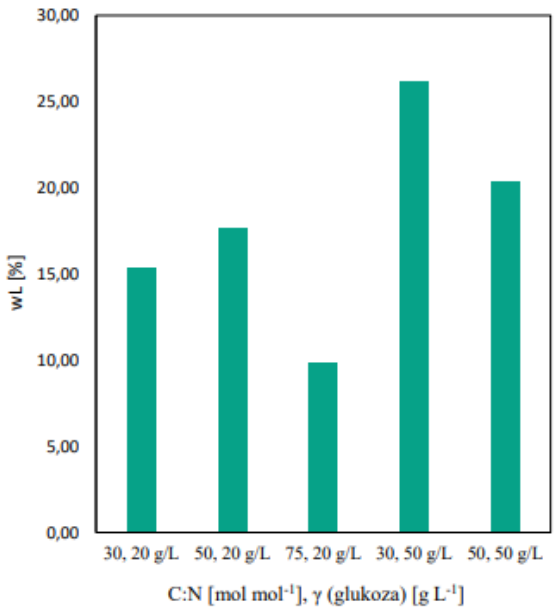
C:N [mol mol^{-1}]	X [g L^{-1}]	$Y_{X/S}$ [g g-1]	Pr_x [g $L^{-1}dan^{-1}$]
glukoza (g L^{-1})		20	
30	10,1	0,499	1,4429
50	12,515	0,8175	1,3906
75	6,84	0,7886	0,76
glukoza (g L^{-1})		50	
30	14,49	0,4057	1,61
50	20,14	0,6582	2,2378

Kiselinskom hidrolizom biomase i analizom hidrolizata tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti utvrđen je sadržaj ugljikohidrata u biomasi *Chlorella vulgaris* S2. Kao što je vidljivo na slici 51, u hidrolizatu je uglavnom bila prisutna glukoza, ksiloza, galaktoza i arabinoza.

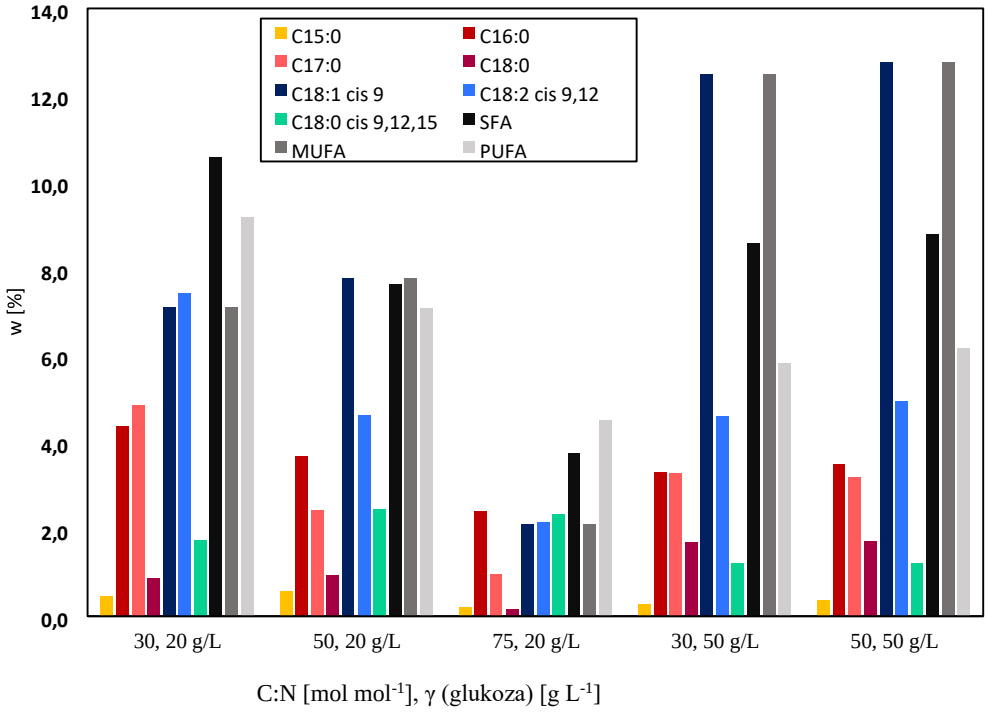


Slika 51. Udio ugljikohidrata u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom miksotrofne kultivacije pri različitim C:N omjerima [mol mol^{-1}]

Osim udjela ugljikohidrata, u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 određen je i udio lipida kao (slika 52) i sastav masnih kiselina (slika 53).



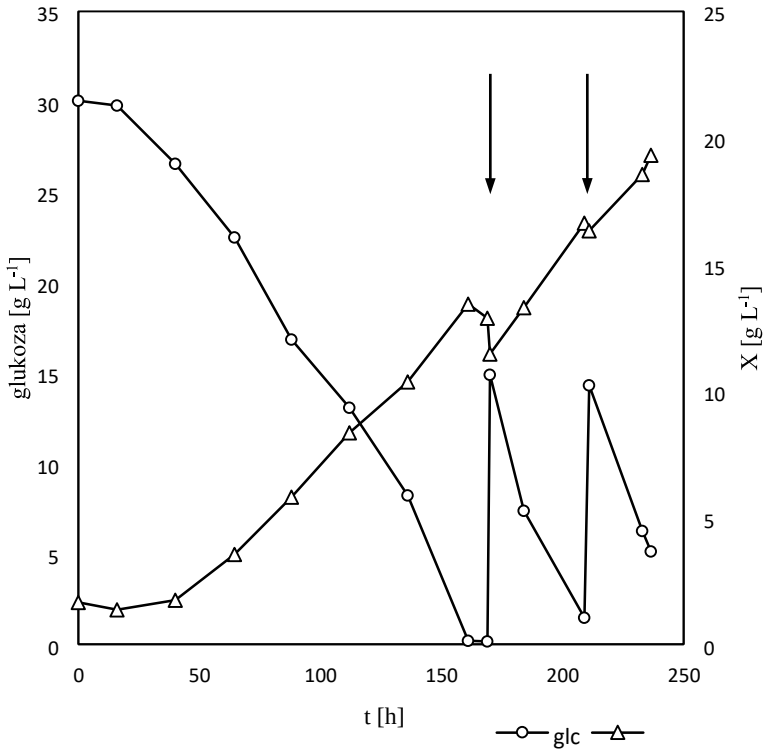
Slika 52. Udio lipida u biomasi *Chlorelle vulgaris* S2 tijekom miksotrofnog uzgoja pri različitim C:N omjerima.



Slika 53. Profil masnih kiselina tijekom miksotrofnog uzgoja *Chlorella vulgaris* S2 pri različitim C:N omjerima.

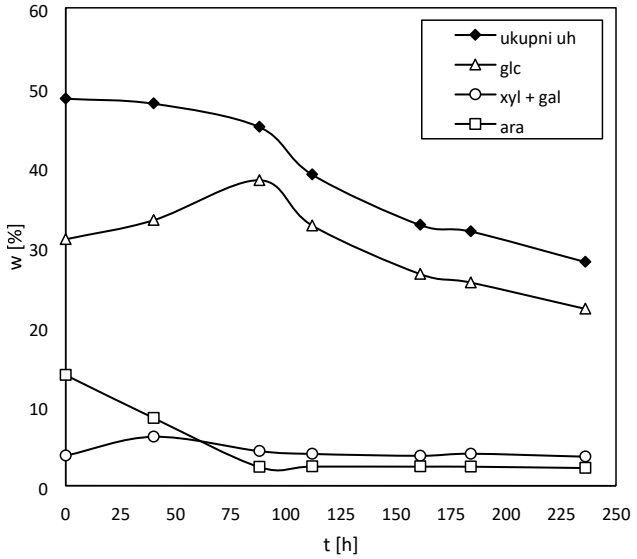
4.5.3. Šaržni heterotrofni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u fotobioreaktoru

U slijedećem koraku istraživanja proveden je uzgoj mikroalge *Chlorella vulgaris* u većem mjerilu, odnosno u laboratorijskom bioreaktoru volumena 2 L. Uzgoj je vođen šaržno sa pritokom supstrata u heterotrofnim uvjetima. Rast mikroalge praćen je svakodnevnim izuzimanjem uzoraka kojima je određena optička gustoća, broj stanica po mL i koncentracija suhe tvari biomase. Osim toga određena je i koncentracija supstrata odnosno koncentracija glukoze UPLC analizom. Krivulja promjene koncentracije suhe tvari biomase i krivulja potrošnje glukoze tijekom vremena prikazana je na slici 54.

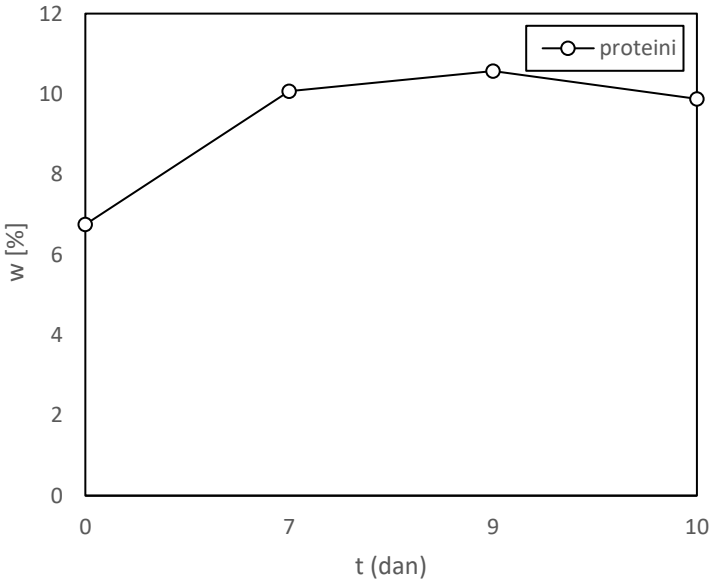


Slika 54. Promjena koncentracije biomase i glukoze tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2

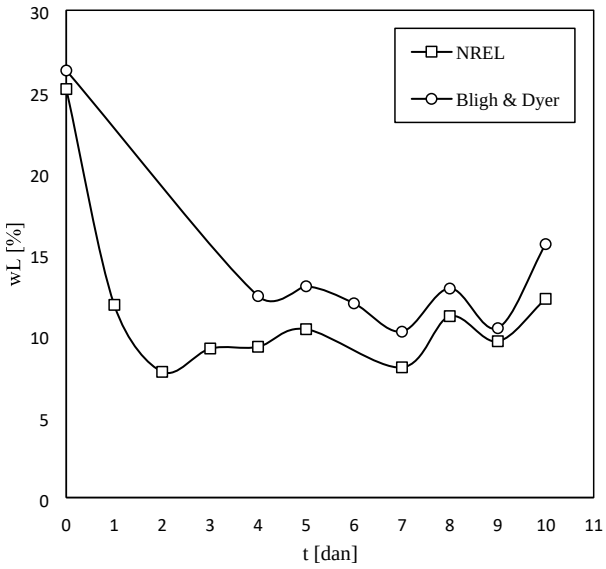
U biomasi *Chlorella vulgaris* S2 je tijekom uzgoja određen udio ugljikohidrata i njihov sastava (slika 55) kao i udio proteina (slika 56). Udio lipida određen je in situ transesterifikacijom masnih kiselina kao što je opisano u poglavlju 3.5.10., ali i metodom po Blingh & Dyer-u (poglavlje 3.5.12.). Rezultati obje metode prikazani su na slici 57. Sastav masnih kiselina te kako se on mijenjao tijekom uzgoja *Chlorella vulgaris* S2 u bioreaktoru prikazan je na slici 58.



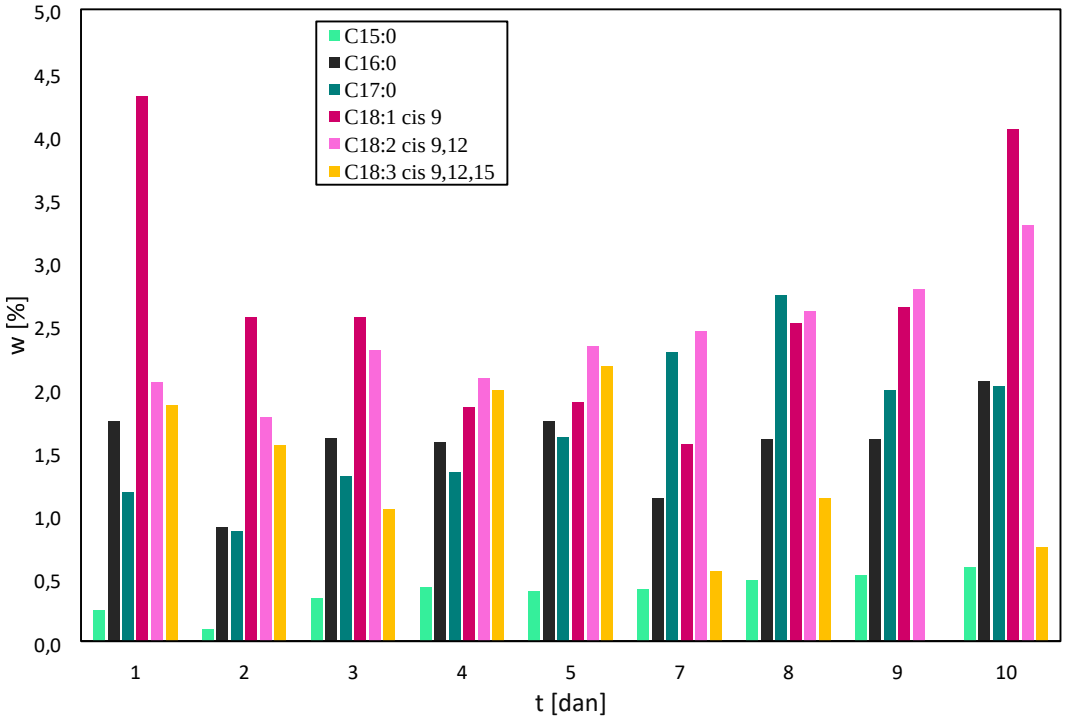
Slika 55. Promjena udjela ugljikohidrata u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u bioreaktoru



Slika 56. Promjena udjela proteina u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u biorekatoru

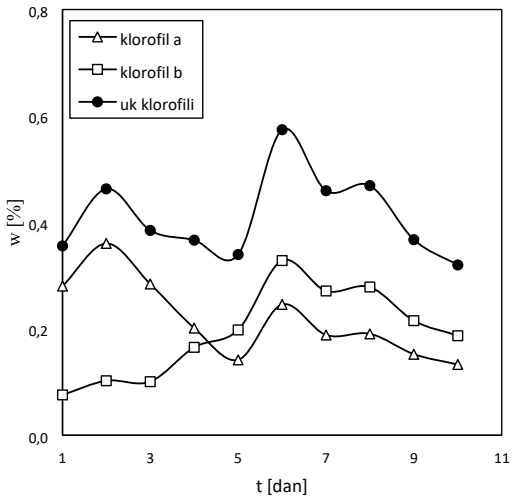


Slika 57. Promjena udjela lipida u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata



Slika 58. Udjeli masnih kiselina u biomasi mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u bioreaktoru

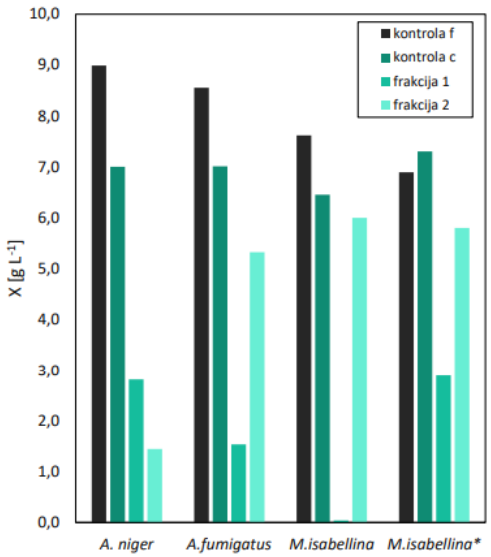
Spektrofotometrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.5.14. određen je i sadržaj klorofila a i b, kao i ukupnog klorofila u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom uzgoja u bioreaktoru. Rezultati su prikazani na slici 59.



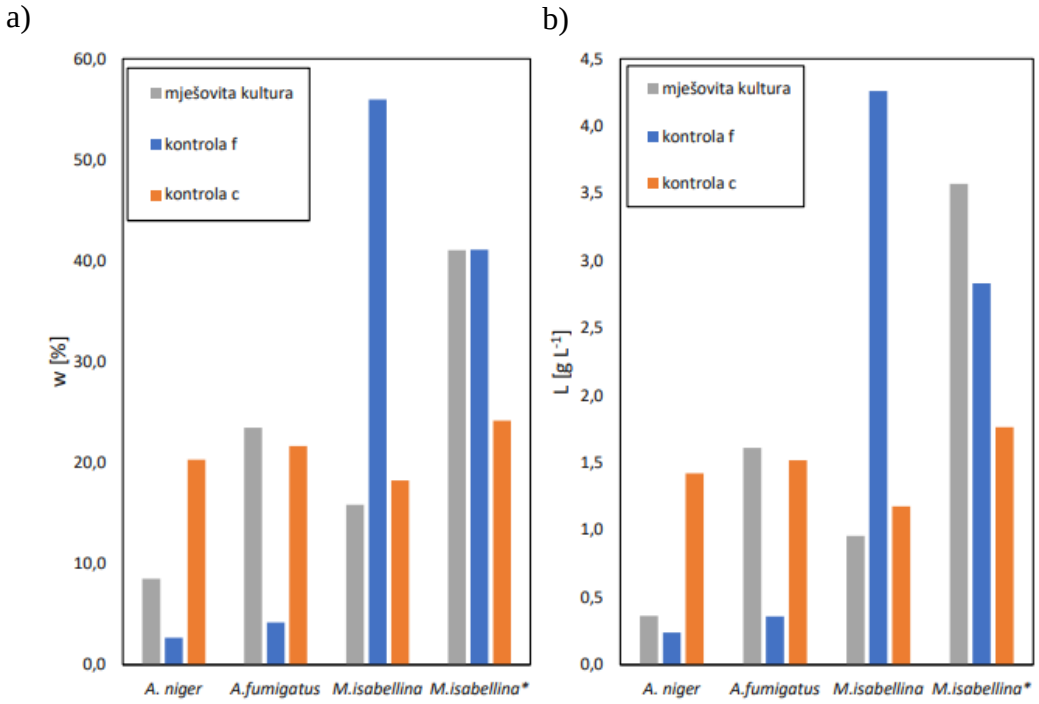
Slika 59. Promjena udjela klorofila a i b u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata u bioreaktoru

4.5.4. Uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni

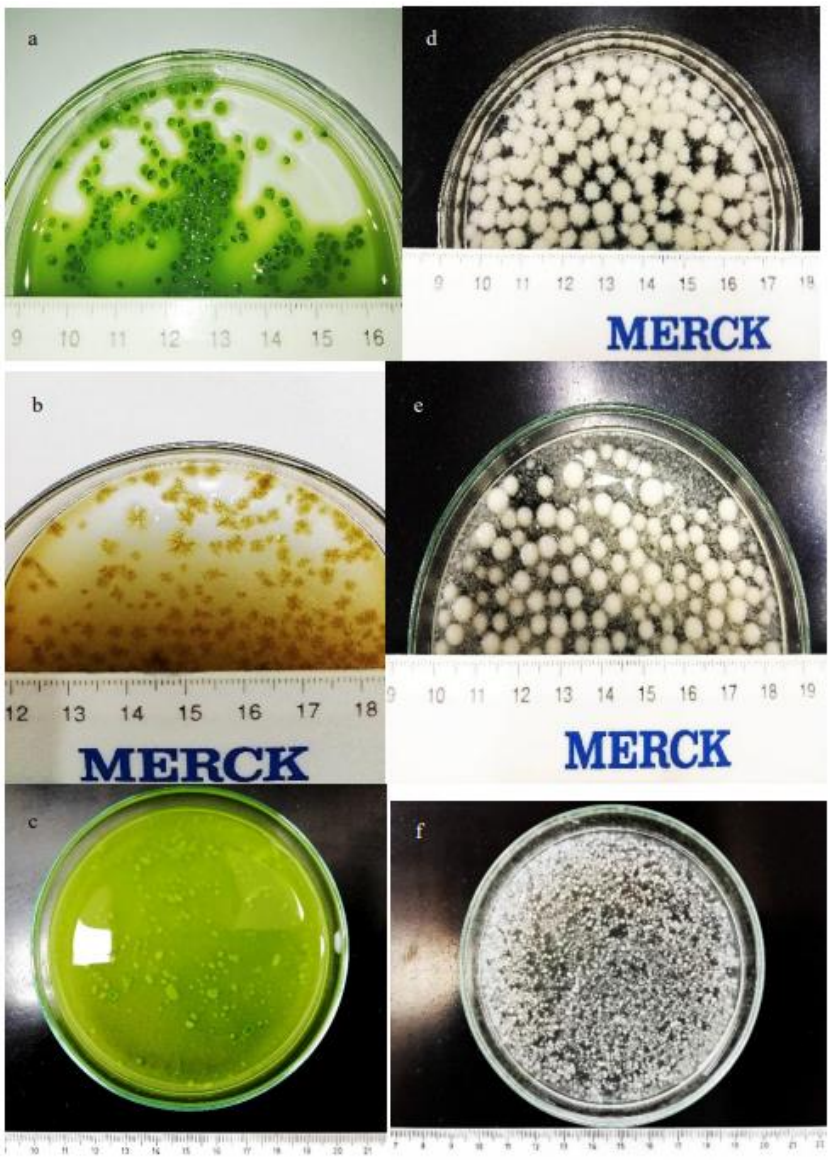
Kako bi se istražila mogućnost izdvajanja biomase *Chlorelle vulgaris* S2 pomoću bioflokulacije, napravljen je miksotrofni uzgoj mješovite kulture s tri vrste plijesni: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina*. Na kraju uzgoja mješovite kulture gravimetrijskom metodom određena je koncentracija biomase. Isto je napravljeno i za kontrolne kulture, odnosno čistu kulturu mikroalge i čistu kulturu plijesni. Rezultati su prikazani na slici 60, a izgled peleta plijesni s adsorbiranim stanicama mikroalgi na slici 62. Po završetku uzgoja mješovite kulture, filtracijom su izdvojene dvije frakcije. Prva je sadržavala pelete plijesni s adsorbiranim stanicama mikroalgi koji su zaostali na filteru (frakcija 1), dok su neadsorbirane stanice mikroalgi iz filtrata činile drugu frakciju (frakcija 2). Koncentracije biomase pojedine frakcije također su prikazane na slici 60. Biomasi dobivenoj na kraju uzgoja mješovite odnosno kontrolne kulture određen je udio lipida prikazan na slici 61.



Slika 60. Koncentracija biomase na kraju uzgoja: kontrola f (čista kultura plijesni), kontrola c (čista kultura mikroalge *Chlorella vulgaris* S2), frakcija 1 (biomasa peleta u mješovitoj kulturi), frakcija 2 (biomasa mikroalge u filtratu)



Slika 61. Udio (a) i koncentracija (b) ukupnih masnih kiselina u kontrolnom uzgoju mikroalge, kontrolnom uzgoju plijesni i mješovitoj kulturi



Slika 62. Izgled kulture po završetku uzgoja (a) *A. fumigatus*, (b) *A. niger*, (c) *M. isabellina*, (d) A. *fumigatus* kontrola, (e) *A. niger* kontrola, (f) *M. isabellina* kontrola

4. RASPRAVA

5.1. Izolacija, identifikacija i karakterizacija izoliranih morskih mikroalgi

5.1.1. Izoalcija i identifikacija morskih mikroalgi

Za potrebe izrade ove doktorske disertacije iz Jadranskog mora izuzeto je nekoliko uzoraka morske vode kroz proljeće 2019. godine (od ožujka do lipnja) u svrhu izolacije morskih mikroalgi. Izolacija je provedena primjenom tradicionalnih metoda izolacije razvijenih tijekom kasnih 1800-tih i ranih 1900-tih godina. Tradicionalne metode izolacije dobro su razvijene, opisane i utemeljene radom znanstvenika Beijernick (1890) i Miquel (1890-1893), a intenzivno se primjenjuju i u današnjim istraživanjima (Andersen, 2005). Nakon izuzimanja i dopreme uzoraka u laboratorij postupak izolacije započet je preliminarnim korakom obogaćivanja kulture. Svrha obogaćivanje kulture je osigurati uvjete pogodne za rast mikroalgi u izuzetom uzorku, a postiže se dodatkom nutrijenata, hranjive podloge, različitih ekstrakata kao npr. vodenog ekstrakta zemlje (Andersen, 2005). U ovome radu za obogaćivanje uzoraka korištena je Guillard-ova f/2 podloga, jedna od najčešće upotrjebljavanih podloga za uzgoj morskog fitoplanktona koja u svom sastavu sadrži sve potrebne makro i mikronutrijente za rast mikroalgi (Andersen, 2005). S ciljem izolacije dijatomeja koje u svojoj građi sadrže silicijevu ljušturicu, podloga je još dodatno obogaćena izvorom silicija. Osim toga, obogaćivanje kultura uz istovremeno pročišćavanje provedeno je i filtracijom okolišnog uzorka nakon čega je sadržaj na filteru prebačen u svježu hranjivu podlogu. Iz obogaćenih kultura započet je postupak izolacije pojedinačnih mikroalgalnih vrsta. Kulture su izolirane kombinacijom metode razrjeđivanja i metode iscrpljivanja te nekoliko metoda pročišćavanja kulture. Iz obogaćene kulture pripravljena su serijska razrjeđenja iz kojih su se metodom iscrpljivanja nacjepljivanjem na čvrstoj hranjivoj podlozi izdvajale kolonije nastale iz jedne stanice. S čvrste hranjive podloge, kolonije su ponovno precijepljene u tekuću podlogu kako bi se provelo dodatno pročišćavanje i provjera čistoće odnosno da je kultura monoalgalna. Razdvajanje pojedinačnih mikroalgalnih vrsta otežano je tendencijom nastajanja mikroalgalnih agregata, posebice u slučaju bentonskih mikroalgi. Naime, mikroalge imaju sposobnost proizvodnje i lučenja takozvanog ekstracelularnog polisaharidnog matriksa (EPM) koji se pretežno sastoji od polisaharida i proteina, te manjih količina drugih molekula kao što su masne kiseline, nukleinske kiseline, humične kiseline i aminokiseline (Babiak i

Krzemińska, 2021). Tvorba EPM-a ovisi o nizu abiotičkih i biotičkih faktora, a najčešće nastaje kao odgovor na nepovoljne okolišne uvjete i ima zaštitnu ulogu (Babiak i Krzemińska, 2021). EPM potiče mikrobnu adheziju stanica i time potiče nastajanje mikroalgalnih agregata i biofilma, ali i podupire simbiozu s drugim mikroalgama i bakterijama (Roux i sur., 2021; Xiao i Zheng, 2016). Naime, EPM sadrži uglavnom šećere kao što su arabinoza, gruktoza, manoza, ksiloza, galaktoza i služi heterotrofnim mikroorganizmima odnosno bakterijama kao izvor ugljika, dok dijatomeje od bakterija dobivaju dušik nastao biološkom fiksacijom (Bruckner i s., 2008). Proizvodnja ekstracelularnog polisaharidnog matriksa posebno je dobro istražena kod dijatomeja gdje i u slučaju planktonskih, ali i bentonskih vrsta dolazi do njegovog lučenja uslijed vezanja, kolonizacije i rasta populacije kako bi se formirao biofilm i mukozni sloj na površinama i sedimentu (Xiao i Zheng, 2016). Stoga su tijekom izolacije mikroalgalnih vrsta primijenjene i metode pročišćavanja pomoću ultrazvuka uz primjenu različitih antibiotika (neomicin, ampicilin, carbendazim, nistatin). Nakupine nastale rastom u obogaćenoj kulturi sastojale su se od različitih mikroalgalnih vrsta te drugih organizama, u prvom redu bakterija, koje su razbijene djelovanjem ultrazvučnih valova, a potom su primjenom metode serijskog razrjeđivanja i metode iscrpljivanja dobivene pojedinačne kolonije. U svrhu eliminacije kontaminanata (bakterija, kvasaca i plijesni) korišteni su i antibiotici i antimikotici kako bi se spriječio rast mikroorganizama oslobođenih iz EPM-a tijekom djelovanja ultrazvuka. S obzirom na prisutnost drugih mikroorganizama, najčešće bakterija, razlikuju se dva stupnja čistoće mikroalgalnih kultura. Aksenična kultura sadrži samo jednu vrstu mikroorganizma odnosno mikoalge (Andersen, 2005), dok su ksenična kulture sadrži jednu vrstu mikroalge te druge vrste prokariotiskih i/ ili eukariotskih mikroorganizama kao što su bakterije, virusi i protozoe (Andersen, 2005). U ovome istraživanju, korištenim metodama pročišćavanja uspješno je izolirano 11 kseničnih mikroalgalnih vrsta. Zatim je provedena identifikacija kseničnih kultura na temelju morfoloških karakteristika pomoću svjetlosnog mikroskopa, a analizom molekularnih markera određena je njihova taksonomska pripadnost kako je opisano u poglavlju 3.4.1.6. Sekvencioniranje genskih biljega postalo je najvažniji alat u taksonomskim istraživanjima, a posebno se pokazalo kao jedan od najvažnijih alata za identifikaciju velikog broja još neidentificiranih mikroalgalnih vrsta. Morfološka identifikacija vremenski je zahtjevna, često nedovoljna za egzaktno određivanje mikroalgalnih vrsta na temelju morfoloških razlika (Santhosh Kumar i sur., 2015). Sekvencioniranje genskih biljega nametnulo se razvojem automatskog sekvencioniranja kao najvažniji alat koji daje brzu, preciznu i točnu

identifikaciju. Identifikacija izoliranih vrsta provedena je sekvencioniranjem genskih biljega regije 18S rRNA, osnovnog strukturnog dijela male podjedinice ribosoma eukariotske stanice i jednog od najčešće korištenih markera u filogenetičkim istraživanjima (Fu i s., 2021). U većine eukariotskih vrsta, velika podjedinica RNA gena (LSU rRNA) i ITS- regija (engl. Internal Transcribe Spacer) varijabilnije su od 18S rRNA te je njihovo sekvencioniranje provedeno u svrhu detaljnije taksonomske identifikacije izoliranih sojeva mikroalgi.

Izolati B1, A12, E7, B2 i D5 identificirani su samo do razine reda. Svih pet navedenih izolata pripada razredu Bacillariophyceae. Ove mikroalge još se nazivaju dijatomeje ili alge kremenjašice budući da sadrže silikatnu ljušturicu. Mikroskopska analiza (prilog 1, prilog 8, prilog 15, prilog 29, prilog 36) svih navedenih izolata potvrdila je prisutnost jedne mikroalgalne vrste, ali uz prisutstvo bakterija, čime je potvrđena kseničnost kultura. Stanice svih pet izolata rasle su uglavnom pojedinačno, no primijećena je i pojava nakupina stanica najvjerojatnije upravo zbog bakterijske kontaminacije koja potiče na lučenje EPM-a i povezivanje stanica. Stanice su ovalne i izdužene, veličine između 15 i 30 µm, sa dva plastida smještena jedan nasuprot drugoga sa svake strane čahurice. Kod soja A12 mikroskopskom analizom primijećeno je lučenje lipidnih mješinica izvan stanica (slika 67). Na temelju analize 18S rRNA gena, izolati su identificirani do razine reda Naviculales, te najvjerojatnije pripadaju ogranku simetrično bilateralnih dijatomeja. Sekvenca dobivena amplifikacijom gena 18S rRNA soja B1 prikazana je u prilogu 2, izolata A12 u tablici 56, izolata E7 u tablici 59, izolata B2 u tablici 65, a izolata D5 u tablici 68 (prilozi 8.1.). Sekvence su potom uspoređene s bazom podataka NCBI pomoću BLAST alata, a rezultati analize s postotkom podudarnosti sekvence sojeva sa sekvencama poznatih mikroorganizma prikazane su za sojeve B1, A12, E7, B2 i D5 na prilog 3, 68, 72, 80 i 84. Analiza 28S gena (ITS i LSU regije) dodatno je potvrdila rezultate dobivene 18S analizom, uz podudarnost od 95% koja nije dovoljna da bi se odredio rod izoliranih mikroalgi (prilog 5 i 7 za izolat B1; prilog 12 i 14 za izolat A12; prilog 19 i 21 za izolat E7; prilog 33 i 35 za izolat B2; prilog 40 i 42 za izolat D5). Dobivene 18S rRNA sekvence pet mikroalgi uspoređene su i time je utvrđeno kako je riječ o mikroalgama iz iste porodice. Međutim, analiza ITS i LSU gena i njihovo podudaranje, omogućila je razlikovanje koje su mikroalge identične na razini soja, iako soj nije mogao biti određen. S obzirom na ITS analizu zaključeno je kako su sojevi B1, A12, B2 i D5 slični i vjerojatno pripadaju istom rodu (prilog 4, prilog 11, prilog 32, prilog 39), dok je E7

različit (prilog 18). Analiza LSU genskog biljega omogućuje bolje razlikovanje između dijatomeja te je time potvrđeno da su izolati B1, A12 i B2 (prilog 6, prilog 13, prilog 34) u potpunosti identične mikroalge dok je izolat D5 (prilog 41) različit od njih i od izolata E7 (prilog 20). Izolati D1 i S5 također pripadaju dijatomejama odnosno razredu Bacillariophyceae. Mikroskopska analiza izolata D1 (prilog 22) potvrdila je kseničnost kulture. Ovu mikroalgu karakteriziraju pravokutne ljušturice, te formacija kolonija u obliku lanca. Stanice su okruglog i ovalnog oblika, a najčešće se može primijetiti jedan, a ponekad i dva kloroplasta koja su smještena uz naličje valve ljušturice. Najprije je provedena analiza 18S rRNA gena, a dobivena sekvenca prikazana je u prilog 23. BLAST analiza pokazala je podudarnost sa *Nanofrustulum shiloi* od 99,8% (prilog 24). Podudarnost je potvrđena i mikroskopskom analizom budući da se na osnovu morfologije mogu eliminirati sojevi Serratifera, Opephoroid i Gedaniella. Identifikacija ovoga soja na osnovu same mikroskopske analize pomoću svjetlosnog mikroskopa veoma je zahtjevna budući da su valve ove mikroalge veoma sitne što otežava razlikovanje između sličnih sojeva. Uz pomoć skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM-a), koji omogućava pregled areola na naličju valve može se razlikovati *Nanofrustulum shiloi* i *Nanofrustulum wachnickianum* budući da se kod *N. shiloi* pronalaze dvije areole, a kod *N. wachnickianum* tri. Molekularna analiza ITS regije potvrdila je kako je riječ o *Nanofrustulum shiloi* (prilog 25 i 26) i LSU analiza potvrdila je rezultate 18S analize s podudarnošću od 99,3% (prilog 27 i 28).

Soj S5 pripada rodu *Nitzschia* ili *Psammodictyon* sp. (tablica 18). Mikroskopska analiza pokazuje kako je riječ o većinom pojedinačnim stanicama ovalnog ili ravnog oblika veličine između 7 i 15 µm, te se može primijetiti i prisutnost bakterija (prilog 58). Mikroskopska slika potvrđuje kako je riječ o kseničnoj kulturi. Stanice sadrže po dva plastida smještena jedan nasuprot drugoga, svaki na jednom polu stanice. Provedena je analiza 18S rRNA (prilog 59), i usporedbom sekvenci u NCBI bazi podataka utvrđeno je da se radi o *Nitzschia* ili *Psammodictyon* sp. (prilog 60). Napravljena je i analiza komplementarnih gena (gena 28S i ITS rRNA), međutim amplifikacijom gena nije dobiven PCR produkt. U rod *Nitzschia*, ubraja se relativno veliki broj različitih vrsta mikroalgi koje pronalazimo i u slatkovodnim i u morskim staništima. Vrste ovog roda često su komplicirane za identifikaciju i međusobno razlikovanje. Iako mogu biti i planktonske, većina *Nitzschia* vrsta raste na površini drugih živih organizama ili pak na neživim površinama. Tako mogu biti epipelne ako rastu na finom sedimentu kao što je mulj, ali i

epilitske koje rastu na tvrdom i relativno inertnom materijalu kao što su kamenje i stijene. Ukoliko rastu na površini viših biljaka i makroalgi riječ je o epifitnim vrstama. Općenito, alge kremenjašice, odnosno dijatomeje dominantna su fitoplanktonska vrsta koja broji oko 200 000 vrsta međusobno značajno različitih i oblika i dimenzija (Mann i Vanormelingen, 2013; Sharma i sur., 2021). Osim što imaju važnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu uključujući i ciklus kruženja ugljika i silicija, imaju i sposobnost fiksacije dušika što otvara mogućnost njihove primjene u obradi otpadnih tvari i voda, te u industriji biogoriva. Osim toga, ove mikroalge imaju sposobnost sinteze brojnih bioaktivnih tvari s potencijalnom primjenom u nutraceutici kao što su proteini, nezasićene omega masne kiseline i druge esencijalne masne kiseline, te pigmente.

Uz dijatomeje uspješno su izolirane i tri mikroalge pripadnice odjeljka Chlorophyta (tablica 18). Sojevi Z3 i C6 pripadaju razredu Chlorodendrophyceae, dok izolat D3 pripada razredu Trebouxiophyceae. Mikroskopska slika soja Z3 prikazana je u prilogu 43. Morfološkom analizom svjetlosnim mikroskopom potvrđuje se monoalgalna kultura. Stanice su različite morfologije (sa flagelama ili nepokretne) ovisno o fazi rasta. Stanice rastu pojedinačno, a mogu biti blago zakrivljenog, eliptičnog i sferičnog oblika, kao i oblika srca. Na prednjem kraju stanice može se primijetiti invaginacija, a stanice najvjerojatnije imaju 4 flagele te su okružene dobro prianjajućim periplastom. Unutar stanice primijećeno je prisustvo jednog kloroplasta i centralnog pirenoida. Na izravnatom dijelu stanice može se primijetiti i jedna očna pjega. Nepokretne stanice dijele se aseksualnom reprodukcijom. U toj fazi, nastaje novi stanični zid dok se onaj stari skuplja u obliku koncentričnih prstenova oko stanice ili se pak polarizira na jednoj strani tvoreći tvorbu nalik stabljici. Filogenetskom analizom gena 18S rRNA (prilog 44) soj Z3 je pripada rodu *Tetraselmis*, što potvrđuje i morfologija stanica. Analiza je pokazala da ovaj soj pripada vrsti *T. rubens* ili *T. marina* (prilog 45). Analiza komplementarnih gena (*rbcL* i ITS) također nije dala bolje rezultate. Molekularna analiza izolata C6 također je pokazala kako pripada rodu *Tetraselmis* (prilog 55). No, usporedbom sekvenci dobivenih analizom gena 18S rRNA oba soja pokazalo se da je riječ o različitim vrstama (prilozi 44 i 54). Dodatna analiza LSU regije izolata C6 također nije omogućila utvrđivanje pripadnosti *T. marina* ili *T. rubens* vrsti (prilog 56 i 57). Mikroskopska analiza pokazala je kako su stanice oba izolata morfološki veoma slične. Kultura izolata C6 također je karakterizirana jednostaničnim stanicama ovalnog, eliptičnog i oblika srca različite morfologije ovisno o reproduktivnoj fazi: sa flagelama ili nepokretne (prilog 53). Pod svjetlosnim mikroskopom

mogu se uočiti po jedan kloroplast i središnji pirenoid, te jedna očna pjega smještena na izravnatom dijelu stanice. *Tetraselmis* vrste imaju jednostavne zahtjeve za nutrijentima, ne zahtijevaju dodatak vitamina u podlogu za kultivaciju te mogu asimilirati različite izvore dušika što ih čini pogodnim mikroalgama za kultivaciju u velikom mjerilu (Borowitzka, 2018; Fon-Sing i Borowitzka, 2016). Nekoliko *Tetraselmis* vrsta uključujući *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica* i *Tetraselmis tetrahele* već je u širokoj primjeni u akvakulturi kao izvor hrane za zooplanton, školjkaše i larve rakova (Ferreira i sur., 2009). Uz brzi rast i veliki udjel lipida u biomasi, povoljna karakteristika *Tetraselmis* vrsta je što mogu rasti u širokom rasponu saliniteta zbog čega se smatraju dobrim kandidatima za uzgoj u otvorenim bazenima s morskom vodom i potencijalnim, održivim izvorom lipida za proizvodnju biogoriva (Borowitzka, 2018; Fon-Sing i Borowitzka, 2016).

Treći predstavnik koljena Chlorophyta je soj D3. Mikroskopskom analizom potvrđena prisutnost jedne mikroalgalne vrste u kulturi. Soj D3 odlikuju jednostanične zelene stanice, sferičnog i pomalo ovalnog oblika veličine svega 2 µm (prilog 46). Analizom gena 18S rRNA (prilog 47) nije dobivena dovoljno duga sekvenca najvjerojatnije zbog prisustva kontaminanata budući da je riječ o kseničnoj kulturi (1200 pb). Usporedbom s NCBI bazom podataka, analiza ove sekvence pokazala je poklapanje s tri roda mikroalgi: *Nannochloris, Picochlorum i Nannochloropsis* (prilog 48). Na temelju literaturnih podataka, vrste iz roda *Nannochloris* podrijetlom iz morskih staništa pripojene su rodu *Picochlorum*. Osim toga analiza je pokazala i poklapanje s mikroalgom *Nannochloropsis oculata* što je sinonim za *Nannochloris oculata* i *Picochlorum oculata*. Ova vrsta poznata je po nakupljanju značajnih količina lipida. Budući da je mikroalga izolirana iz Jadranskog mora u daljnjoj analizi potvrđeno je kako se radi o mikroalgi roda *Picochlorum* sp. Iz tog razloga je provedena analiza LSU gena (prilog 51), ali i 16S (gena za eukariotski plastid) (prilog 49). Rezultati analize LSU djelomično su potvrdili da ovaj izolat pripada redu Chloralles (prilog 52). Analizom sekvence gena 16S rRNA potvrđeno je da se radi o mikroalgi roda *Picochlorum* sp. (prilog 50). *Picochlorum* vrste također se koriste kao hrana u akvakulturi za uzgoj zooplantonskih vrsta i koralja. Osim toga pokazuju i dobar potencijal za primjenu u proizvodnji biogoriva zbog relativno visoke brzine rasta, značajnog sadržaja lipida u biomasi, adaptacije na stresne okolišne uvjete (širok raspon temperature i saliniteta) što ih čini pogodnim za uzgoj u otvorenim sustavima u kojima vladaju promjenjivi vremenski uvjeti (Dogaris i sur., 2016). Stanice soja C1 prikazane su u prilogu 61. Mikroskopska analiza potvrdila je da se radi o monoalgalnoj

kulturi. Stanice rastu pojedinačno, ali je vidljiva tendencija tvorbe nepravilnih nakupina koji su obavijeni mukoznom ovojnicom. Stanice su zelene boje, ovalnog ili elipsoidnog do cilindričnog oblika sa široko zaobljenim krajevima. Na mikroskopskoj slici vidljiva je i prisutnost longitudinalnih tilakoida. Budući da soj C1 pripada koljenu cijanobakterija provedena je analiza gena 16S rRNA, markera karakterističnog za prokariotske vrste (prilog 62). Analiza dobivene sekvence upućuje na pripadnost porodici Aphanothecaceae. Kombinirajući morfološku analizu pod svjetlosnim mikroskopom kao i molekularnu analizu 16S rRNA gena nije bilo moguće utvrditi radi li se *Euhalothece* ili *Halothece* sp. (prilog 63). *Euhalothece* sp. halofilna je cijanobakterija koja može rasti u vodi širokog raspona saliniteta, od slatkovodnih uvjeta pa sve do 70 g L^{-1} NaCl-a (Pagels i sur., 2021). Osim što se ističe visokim udjelom karotenoida, neki radovi pokazuju kako ovu mikroalgu karakterizira i proizvodnja važnih sekundarnih metabolita s velikim potencijalom za primjenu u farmaceutskoj industriji i medicini (Mogany i sur., 2018). Jedan takav primjer je i criptoficin koji ima citotoksično djelovanje te se koristi kao prirodni antikancerogeni lijek (Costa i sur., 2012). Osim toga, neki radovi potvrđuju kako ova jednostanična cijanobakterija posjeduje i visoku koncentraciju aminokiselina nalik mikosporinima koji imaju važnu ulogu u zaštiti od oštećenja uzrokovanih UV zračenjem koji imaju veliki potencijal i važnost u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Volkmann i sur., 2006).

5.1.2. Identifikacija slatkovodnih mikroalgi

Osim morskih mikroalgi u izradi ovog doktorskog rada provedena je i izolacija slatkovodnih mikroalgi iz slatkovodnih uzoraka izuzetih na nekoliko lokacija na vodotoku rijeke Gacke (Otočac, Ličko-senjska županije). Uzorci su izuzeti s nekoliko lokacija Švičko jezero, Zapornica-Šumećica, Stari most, Šatrić i Kostelka. Uzorkovanje je provedeno u ožujku 2018. godine, nakon otapanja veće količine snijega uslijed čega su uzorci bili veoma razrijeđeni. Iz tog razloga je i u ovom slučaju provedeno obogaćivanje uzoraka, a izolacija je provedena pomoću prethodno opisanih metoda (poglavlje 3.4.1.2.-3.4.1.5.) kao i pri izolaciji morskih mikroalgi. Izolirano je nekoliko vrsta mikroalgi, a za njih četiri provedena je i identifikacija. Klasifikacija izoliranih mikroalgi na temelju sekvencioniranja prikazana je u poglavlju 4.1. Rezultati u tablici 18. Izolat S1 identificiran je kao *Chlorococcum* sp. Na mikroskopskoj slici zamijećeno je kako su stanice pojedinačne ili samo privremeno unutar grupica u nedefiniranoj formi, te da nisu okružene

nikakvih gelatinoznim omotačem koji bi ih držao na okupu (prilog 64). Elipsoidnog su do sfernog oblika te variraju u veličini, a stanična stjenka je glatka. Parijentalni kloroplast unutar stanice može biti sa ili bez perifernog otvora, te sadržavati jedan ili više pirenoida. Pokretne stanice su također elipsoidne te posjeduju dvije flagele. Mikroskopska morfološka analiza podupire rezultate molekularne analize 18S rRNA kojom je soj S1 identificiran kao *Chlorococcum* sp (prilog 65). Ova vrsta veoma je široko rasprostranjena pa se tako može pronaći i na neobičnim staništima kao što su vrući izvor u Centralnoj Aziji, tlu uzorkovanu na Antartici, te ju je moguće izolirati iz slatke vode, morske vode i zraka. Reprodukcija je putem spora, a vegetativne stanice variraju u veličini. Za kompletnu identifikaciju do razine vrste trebalo bi napraviti analizu ITS gena. Izolat S2 identificiran je kao *Chlorella vulgaris.* Mikroskopska analiza pokazala je stanice sferičnog ili elipsoidnog oblika sa jednostrukim kloroplastom i odsutnim mukoznim omotačem (prilog 67). Takva morfologija u skladu je sa rezultatima sekvencioniranja (prilog 68). *Chlorella* je jednostanična mikroalga koja je karakteristična po koncentraciji klorofila i sposobnosti da tvori unutarstaničnu simbiozu sa vodenim beskralježnjacima i protozoama. U takvim simbiozama, *Chlorella vulgaris* nalazi se unutar vakuola domaćina gdje sintetizira i otpušta maltozu izvan stanice. Također pokazuje sposobnost miksotrofnog rasta na različitim izvorima ugljika i dušika. Od posebne je biotehnološke važnosti zbog širokog spektra bioaktivnih spojeva koje ima sposobnost sintetizirati, a koji su vrijedni u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutičkoj industriji. Zadnja dva izolata S3 i S4 su na temelju molekularne analize identificirani kao *Tetradesmus obliquus*. Aanaliza 18S rRNA gena također je pokazala kako su ova dva izolata vrlo vjerojatno slična odnosno identična (tablica 81 i tablica 82). Mikroskopska analiza pokazala je pojedinačne stanice, ali i mjestimično stanice u kolonijama po dvije stanice koje nisu povezane mukozim omotačem (prilog 71 i 73). Stanice su sferičnog oblika, izdužene okomito na cenobijalnu površinu sa stanicama paralelnim i pričvršćenim duž bočnih stijenki na druge dvije stanice. Kada se promatraju s bočne strane, stanice su lunasto ili cilindrično savijene sa šiljastim ili tupim krajevima. Stanice su jednojezgrene sa pojedinačnim odnosno parijentalnim kloroplastom i jednim pirenoidom. Budući da morfologija *Tetradesmus* vrste uvelike ovisi o uvjetima rasta, mogu se primijetiti različiti tipovi kralježnice te povezivanje stanica u kolonije. Rezultati BLAST analize pokazuju pripadnost ovih izolata različitim taksonomskim nazivima: *Tatreadesmus obliquus*, *Acutodesmus obliquus* i *Scenedesmus obliquus*. Pregledom literature može se zaključiti kako je riječ o istoj vrsti i njenim različitim nazivima (Wynne i Hallan, 2016). Ova vrsta posebno je interesantna u istraživanjima

proizvodnje obnovljivih izvora energije odnosno biogoriva. Sve izolirane slatkovodne mikroalge također su ksenične kulture, što je potvrđeno i mikroskopskim pregledom.

5.1.3. Karakterizacija izoliranih mikroalgi

5.1.3.1. Kinetika rasta izoliranih mikroalgi

Kao slijedeći korak u izradi ove doktorske dizertacije, provedena je karakterizacija izoliranih i identificiranih mikroalgi. Okarakterizirane su mikroalge koje su bile identificirane najmanje do razine roda (sojevi D1, Z3, D3, C6, S5 i C1). Time su okarakterizirana dva predstavnika iz skupine Bacillariophyceae odnosno dijatomeja (*Nitzschia* sp. i *Nanofrustulum shiloi*), tri predstavnika Chlorophyta (*Tetraselmis* sp. Z3 i *Tetraselmis* sp. C6 i *Picochlorum* sp. D3) te jedna cijanobakterija (*Euhalothece* sp. C1). U svrhu karakterizacije praćena je dinamika rasta mikroalgi, određena specifična brzina rasta, te produktivnost sinteze biomase. Pri tome je za sve sojeve korištena f/2 hranjiva podloga i primijenjeni identični uvjeti uzgoja (poglavlje 3.2.1.). Potom je dobivenoj biomasi određen sastav kako bi se utvrdio potencijal izolirane mikroalge. Određen je udio ugljikohidrata i njegov monosaharidni sastav, udio proteina te udio lipida. Ukupnim lipidima utvrđen je profil masnih kiselina, te je dodatno provedeno razdvajanje klasa lipida. Također je određen i sastav pigmenata.

Rast odabranih mikroalgalnih vrsta okarakteriziran je praćenjem promjene koncentracije stanica i optičke gustoće tijekom vremena. Iz krivulja rasta odabranih sojeva mikroalgi prikazanih na slici 14. vidljivo je kako su one oblika karakterističnog za rast jednostaničnih mikroorganizama. Naime šaržni uzgoj mikroalgi, kao i ostalih mikroorganizama uglavnom se sastoji od 6 različitih faza: lag, eksponencijalna, linearna, faza usporenog rasta, stacionarna faza i faza odumiranja. Uzgoj je vođen sve do smanjenja brzine rasta i opadanja broja stanica odnosno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Ovisno o mikroalgalnoj vrsti uzgoj je trajao između 12 i 19 dana. Eksponencijalna faza također je varirala u trajanju između mikroalgalnih vrsta. Kod *Nitzschia* sp. S5 eksponencijalna faza trajala je od 2. do 12. dana, kod *Nanofrustulum shiloi* D1 od 2. do 12. dana. *Tetraselmis* sp. Z3 rastao je eksponencijalno od 6. do 13. dana, a soj C6 od 6. do 14. dana. Najkraća eksponencijalna faza zabilježena je kod *Picochlorum* sp. D3 koja je trajala od 2. do 7. dana. Eksponencijalni rast cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1 opažen je od 2. do 10. dana uzgoja. Maksimalna koncentracija stanica od 8.07×10^{6} mL^{-1} postignuta je nakon 12. dana uzgoja *Picochlorum* sp. D3. Koncentracija

stanica na kraju uzgoja preostalih sojeva bila je značajno niža. To se može pripisati nižoj koncentraciji inokuluma budući da koncentracija stanica dobivena na kraju uzgoja ovisi ne samo o specifičnoj brzini rasta nego i o koncentraciji stanica na početku eksponencijalne faze. Početna koncentracija stanica kod *Picochlorum* sp. iznosila 3.03×10^6 stanica mL^{-1} dok je kod ostalih ispitivanih mikroalgi bila i nekoliko puta niža, između 1.0×10^4 i 6.27×10^5 stanica mL^{-1}. Brzina rasta ključan je parametar za karakterizaciju i odabir mikroalge pogodne za proizvodnju i uzgoj u industriji budući da veća specifična brzina rasta radnog mikroorganizma ujedno omogućuje i postizanje većih produktivnosti, reducira rizik od kontaminacije i skraćuje vrijeme kultivacije (Barten i s., 2020). Specifične brzine rasta izračunate su na osnovu nagiba pravca ovisnosti logaritma koncentracije stanica o vremenu (jednadžba 17; poglavlje 3.6.). Najveća vrijednost specifične brzine rasta od 0.217±0.089 dan^{-1} zabilježena je kod mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Osim specifične brzine rasta, potencijal ove mikroalge potvrđuju i već spominjana koncentracija stanica, ali i preostali pokazatelji uspješnosti procesa. Kod ove mikroalge zabilježena je ujedno i najviša vrijednost produktivnosti od 33.98±0.02 mg L^{-1} dan^{-1} , te jedna od većih koncentracija biomase u odnosu na ostale istraživane sojeve (0.41 ±0.01 g L^{-1}). Ova koncentracija biomase nešto je veća u odnosu na koncentraciju od 0.27 g L^{-1} zabilježenu za *Picochlorum atomus* uzgojen u sličnim uvjetima, ali pod fluorescentnim svijetlom (Ra i sur., 2016). Visokom koncentracijom biomase među istraživanim sojevima ističu se *Tetraselmis* vrste. Najveća vrijednost koncentracije biomase zabilježena je kod *Tetraselmis* sp. Z3 gdje je zabilježeno 0.48±0.11 g L^{-1} na kraju uzgoja, a kod *Tetraselmis* sp. C6 nešto niža koncentracija od 0.45±0.04 g L^{-1}. Slične vrijednosti koncentracije biomase od 0.36-0.46 g L^{-1} dobivene su i za *Tetraselmis tetrathele, Tetraselmis striata, Tetraselmis chuii* i *Tetraselmsi gracilli* uzgajanim u sličnim uvjetima (Boopathy i sur., 2020). Budući da je uzgoj ova dva *Tetraselmis* soja trajao 17 dana, što je duže od uzgoja *Picochlorum* sp. D3 koji je trajao 12 dana, specifične brzine rasta za *Tetraselmis* sp. sojeve značajno su niže. Kod izolata Z3 ona iznosi 0.064±0.022 dan^{-1}, a kod izolata C6 zabilježena je vrijednost od 0.076±0.027 dan^{-1}. Dobivene produktivnosti sinteze biomase za ova dva soja također su nešto niže od one zabilježene za *Picochlorum* sp. D3 (tablica 20). Iz skupine dijatomeja, odnosno razreda Bacillariophyceae, višim vrijednostima pokazatelja uspješnosti bioprocesa istaknula se *Nitzschia* sp. S5. Druga najviša vrijednost specifične brzine rasta zabilježena je kod ove dijatomeje i ona iznosi 0.15±0.003 dan^{-1}. No, u odnosu na tri predstavnika koljena Chlorophyta dobivena je nešto niža koncentracija biomase od 0.28±0.14 g L^{-1} i produktivnost sinteze biomase od 19.74±3.25 mg L^{-1} dan^{-1}. Koncentracija biomase na kraju uzgoja *Nitzschia* sp. S5 u ovome radu, usporediva je s 0.212±0.041 g L^{-1} iz rada Duygu,

te s 0.23±0.02 g L^{-1} postignutom u radu Demirel i suradnika (Demirel i sur., 2017; Yalcin Duygu, 2019). Za drugog predstavnika skupine dijatomeja, *Nanofrustulum shiloi* D1, zabilježene su najniže vrijednosti sva tri pokazatelja. Dobivene su najniža koncentracija biomase od 0.10±0.01 g L^{-1} i produktivnost sinteze biomase od 12.8±3.78 mg L^{-1} dan^{-1}. Specifična brzina rasta kod ove dijatomeje od 0.099±0.006 dan^{-1} vrlo je slična specifičnoj brzini rasta cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1 gdje je izračunata brzina iznosila 0.095±0.002 dan^{-1}. Cijanobakterija *Euhalothece* sp. C1 rasla je brže i od oba *Tetraselmis* soja, no konačna koncentracija biomase i produktivnost njene sinteze bila je niža. Koncentracija biomase cijanobakterije na kraju uzgoja iznosila je 0.28±0.08 g L^{-1} što je istovjetno koncentraciji dobivenoj za *Nitzschia* sp. S5, dok je produktivnost sinteze biomase čak i nešto viša uslijed jedan dan kraćeg uzgoja te iznosi 24.42±1.64 g $L^{-1}dan^{-1}$. Dobivena koncentracija biomase cijanobakterije značajno je niža od vrijednosti zabilježene u literaturi. Tako je u optimiranim uvjetima (120 g L^{-1} NaCl i temp. 35 °C) postignuta koncentracija od 2-4 g L^{-1} (Mogany i sur., 2018). Zabilježene specifične brzine rasta nekih okarakteriziranih mikroalgi niže su od onih navedenih u literaturi. Specifična brzina rasta *Nitzschia* sp. S5 iz ovog rada niža je od raspona vrijednosti zabilježenih za *Nitzschia inconspicua* u radu Chu i suradnika, a koja iznosi od 0.25 do 0.44 dan^{-1}, vrijednosti od 0.26 dan^{-1} zabilježene za *Nitzschia* sp. u radu Demirel i suradnika, te vrijednosti od 0.24 dan^{-1} zabilježene za *Nitzschia palea* iz rada iz rada Duygu (Chu i sur., 1996; Demirel i sur., 2017; Yalcin Duygu, 2019). U radu Renaud i Parry-a iz 1994 za *Nanofrustulum shiloi* zabilježena je specifična brzina rasta u rasponu od 0.75 do 0.80 dan^{-1}, što je veća vrijednost od one zabilježene za *N. shiloi* u ovome radu (Renaud i Parry, 1994). Isto se može primijetiti i kod usporedbe specifičnih brzina rasta zelenih mikroalgi iz ovoga rada s vrijednostima dobivenim za *Picochlorum* sp. i *Tetraselmis* sp. u radu Bartena i suradnika (Barten i sur., 2020). Yang i suradnici zabilježili su prilikom uzgoja cijanobakterije *Euhalothece* sp. Z-M001 specifičnu brzinu rasta koja je iznosila 0.1104 dan^{-1} (0.0046 h^{-1}) što je nešto viša od one zabilježene u ovome radu, a koja je postignuta u optimiranim uvjetima uzgoja kod 3% NaCl-a i temperature od 28 °C (Yang i ssur., 2020). I u drugim spomenutim radovima kulture su bile uzgajane u uvjetima (temperatura, pH, svjetlost) specifično optimiranim za pojedinu vrstu mikroalge, često koristeći i optimiran sastav hranjive podloge uz propuhivanje zrakom obogaćenim s CO_2, što doprinosi postizanju većih specifičnih brzina rasta te veće ukupne produktivnosti bioprocesa. Nasuprot tome, sve mikroalge okarakterizirane na gore opisani način uzgajane su u jednakim uvjetima te koristeći izvornu f/2 podlogu.

5.1.3.2. Sastav biomase izoliranih mikroalgi

Makromolekularni sastav biomase izoliranih morskih mikroalgi prikazan je u tablici 21. Proteini su bili najzastupljeniji u biomasi svih okarakteriziranih mikroalgi. Najveći udio od 57.94±5.45 % zabilježen je kod *Tetraselmis* sp. S5, a udio proteina veći od 50% zabilježen je i kod *Nanofrustulum shiloi* D1 (56.22±1.54%), *Picochlorum* sp. D3 (54.38±3.55%) i *Nitzschia* sp. S5 (52.72±3.64%). Vrijednost udjela proteina zabilježena za dijatomeju *Nitzschia* sp. S5 u ovome radu u skladu je s vrijednostima zabilježenim u literaturi za *Nitzschia palea* (41.21±0.11%) u radu Duygu iz 2019. godine i *Nitzschia* sp. iz rada Rodríguez-Núňez gdje je zabilježen udio od 43.16±0.13 % (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017; Yalcin Duygu, 2019). Udio proteina u mikroalgi *Picochlorum* sp. D3 sličan je udjelu (57.8 %) kojeg su Barten i suradnici odredili za mikroalgu istoga roda (Barten i sur., 2020). Niže vrijednosti udjela proteina od 36.32±1.66% 32.83±10.85% zabilježeni su kod *Tetraselmis* sp. Z3 i *Euhalothece* sp. C1. Za veliki broj cijanobakterija u literaturi su navedeni veći udjeli proteina koji premašuju čak 60% u suhoj tvari biomase (Grossmann i sur., 2019; López i sur., 2010; Niccolai i sur., 2019; Vargas i sur., 1998). Udio proteina u *Euhalothece* sp. C1 sličan je udjelu proteina u biomasi cijanobakterije *Synechocystis aquatilis* SAG 90.79 (30 % proteina) (López i ., 2010). Iako sojevi Z3 i C6 pripadaju istom rodu *Tetraselmis* sp., velika razlika u udjelu proteina i nije toliko neuobičajena. U većini radova navode se udjeli ispod 41% za ovu vrstu. No, zabilježene su i veće vrijednosti. Kassim i suradnici odredili su 63.04% proteina u biomasi *T. suecica* u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta (Kassim i sur., 2014). Druga makromolekula po zastupljenosti u biomasi izoliranih mikroalgi bili su ugljikohidrati, a u najmanjoj mjeri su bili zastupljeni lipidi. Ovakav sastav biomase nije iznenađujući uzimajući u obzir kako su mikroalge uzgajane do kasne eksponencijalne ili rane stacionarne faze. Naime, sinteza rezervnih tvari, najčešće ugljikohidrata i/ili lipida, najčešće započinje u stacionarnoj fazi rasta uslijed iscrpljivanja nutrijenata potrebnih za rast (stresni uvjeti). Tada dolazi do preusmjeravanja tokova ugljika u metabolizmu stanice u proizvodnju i nakupljanju energetski bogatih rezervnih tvari. Budući da u istraživanim uvjetima limitacija nutrijentima nije postignuta, tok ugljika i dalje je bio usmjeren u proizvodnju proteina i sintezu energije za nastajanje novih stanica (Picardo i sur., 2013). Biomasa *Tetraselmis* sp. C6 ističe se i s najvišim udjelom ugljikohidrata među ispitivanim sojevima od 17.42±0.83 %. Kao i u slučaju proteina, nešto niža vrijednost zabilježena je za *Tetraselmis* sp. Z3 i iznosila je 11.18±0.76%. Ove vrijednosti u skladu su sa rasponom navedenim u literaturi. U radu Pereira i suradnika navode sadržaj ugljikohidrata od 18.1g/100g za *Tetraselmis* sp. CTP4, a Schwenzfeier i

suradnici navode 24% ugljikohidrata u biomasi *Tetraselmis* sp (Pereira i sur., 2019; Schwenzfeier i sur., 2011). *Picochlorum* sp. D3 imao je najmanji sadržaj ugljikohidrata od 8.84±0.11 % . Sličan sadržaj naveden je u radu El-Kassas za isti soj mikroalge, te nešto niži od onog radu Barten i suradnika od 13.7% za *Picochlorum* sp. BPE23 (Barten i sur., 2020; El-Kassas, 2013). I ovdje je bitno naglasiti da zbog različitih uvjeta uzgoja mikroalgi, usporedba s literaturnim podatcima često je nemoguća. Odstupanja u sastavu biomase navedene u literaturi reflektira se i na otežanu usporedbu podataka dobivenih u ovome istraživanju, a rezultat su različitosti načina vođenja uzgoja, uvjeta uzgoja (T, pH, svjetlost, konc. CO_2, te sastava podloge). Svi navedeni uvjeti utječu na sastav biomase. Udio ugljikohidrata u biomasi *Nitzschia* sp. S5 (9.13±1.26%) bio je niži nego u mikroalgi istoga soja (18.88 i 13.80%) navedenih u radu Rodríguez-Núñez i Teoledo-Agüero i mikroalge *N. palea* (21.74%) naveden u radu Duygu (Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017; Yalcin Duygu, 2019). No, vrijednost dobivena u ovome radu usporediva je s udjelom ugljikohidrata u biomasi *Chaetoceros* sp. (10.78%) zabilježenoj tijekom logaritamske faze rasta. Ugljikohidrati imaju specifičnu fiziološku funkciju u mikroalgalnim stanicama. Ovisno o njihovoj ulozi dijele se u tri skupine: skladišni polisaharaidi koji služe kao zalihe energije, polisaharidi stanične stijenke i egzopolisaharidi (Bernaerts i sur., 2018; Pignolet i sur., 2013). Cijanobakterije nakupljaju glikogena kao unutarnja skladišta ugljikohidrata odnosno energije, dok eukariotske mikoralge uglavnom akumuliraju škrob ili β-glukan (Debnath i sur., 2021; Pignolet i sur., 2013). Tako primjerice, mikroalge iz odjeljka Chlorophyta, Cryptophyta i Dinophyta akumuliraju škrob, dok mikroalge iz odjeljka Rodophyta i Euglenophyta nakupljaju tkz. floridejski škrob i paramilon. Za oleaginozne mikroalge iz odjeljka Heterokontophyta i Bacillariophyceae poznato je poznato je da pohranjuju energiju u obliku lipida umjesto ugljikohidrata (Debnath i sur., 2021). Lipidi su bili zastupljeni u značajno nižem udjelu u odnosu na proteine i ugljikohidrate u svim karakteriziranim mikroalgama u ovome radu. Dijatomeja *Nannofrustulum shiloi* D1 sadrži velik udio lipida od 33.65±4.51 što je čini potencijalno interesantnim sojem za proizvodnju lipida. Kod drugog izolata iz skupine dijatomeja, *Nitzschia* sp. S5 zabilježen je značajno manji udio lipida od svega 7.76±0.32%. Sličan udio lipida imala su dva soja roda *Tetraselmis*. Za Z3 udio lipida iznosio je 4.87±0.03%, a za C6 4.77±0.38%. Najmanji udio lipida od 2.98±0.07% utvrđen je kod cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1.

5.1.3.3. Monosaharidni sastav ukupnih ugljikohidrata izoliranih morskih mikroalgi

Kao što je vidljivo iz tablice 22 sastav ugljikohidrata također varira između različitih vrsta morskih mikroalgi okarakteriziranih u ovome radu. Kemijski sastav ugljikohidrata u mikroaglama i cijanobaterijama također je ovisan o taksonomiji, uvjetima uzgoja kao što su temperatura, pH, intenzitet svijetlosti, koncentraciji nutrijenata te fazi rasta kulture. Ugljikohidrati morskih mikroalgi uglavnom se sastoje od neutralnih monosaharida (što podrazumijeva glukozu, galaktozu, ksilozu, manozu, ramnozu, arabinozu, fukozu i ribozu), amino šećera (glukozamin) i uronskih kiselina (galakturonska i glukuronska) (Bernaerts i sur., 2018; Pignolet i sur., 2013). U skladu s literaturnim podatcima, kod svih izoliranih sojeva glukoza je bila najzastupljeniji monosaharid osim u soju *Tetraselmis* sp. C6. Kod ove mikroalge najzastupljenija je bila glukouronska kiselina s 46.53% u ukupnim ugljikohidratima. Najveći udjel glukoze u ukupnim ugljikohidratima imala je dijatomeja *Nanofrustulum shiloi* D1 (73.49±2.62%). Sličan sadržaj (82.4%) utvrđen je kod dijatomeje *Thalassiosira pseudonana* (Brown, 1991). Za oba *Tetraselmis* soja, primijećena je neuobičajeno visoka količina glukuronske kiseline (46.53±5.58 za soj C6 i 38.85±2.18 za soj Z3) u odnosu na literaturne navode. Ugljikohidrati izolirani iz mikroalge *Tetraselmsi chuii* sadrže svega 1.2±0.2% glukuronske kiseline, dok je udio glukoze nešto niži od dobivenog u radu Berneartes i suradnika te iznosi 28.9±4.1% (Bernaerts i sur., 2018). Kao i sastav biomase, tako i sastav ugljikohidrata naveden u literaturi za mikroalge istih rodova značajno se razlikuje. Tako je u radu Brown-a iz 1991. naveden udio ugljikohidrata od 84.7% za *T. chui* i 74.8% za *T. suecica* (Brown, 1991). To potvrđuje veliku ovisnost makromolekulskog sastava biomase o uvjetima uzgoja, kao i o samoj mikroalgalnoj vrsti. Drugi najzastupljeniji monosaharid u ugljikohidratima biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i zelene mikroalge *Picochlorum* sp. D3 bila je fukoza s udjelima od 31.56±3.54% i 23.09±0.25%. Značajno niži udio fukoze zabilježen je kod drugog predstavnika dijatomeja, *Nanofrustulum shiloi* gdje je iznosio 4.75±0.23%. U manjoj količini (3.32±0.49% i 6.29±1.00%) fukoza je bila prisutna u ugljikohidratima *Tetraselmis* sp. Z3 i *Euhalothece* sp. C1, dok u mikroalgi *Tetraselmis* sp. C6 fukoza nije bila prisutna. Općenito gledano, udjeli fukoze dobiveni u ovome radu veći su od onih literaturnih. U radu Brown (1991) udjeli fukoze u ugljikohidratima varirali su između 2.8 i 14.3% kod 6 istraživanih dijatomeja (*Chaetoceros calcitrans, Chaetocheros gracilis, Nitzschia ciosterium, Phaeodactlyum tricornutum, Skeletonema costatum* i *Thalosiosira pseudonana*). Također, u istom radu, fukoza nije utvrđena u sojevima roda *Tetraslemis* kao ni

kod *Nannochloris* sp. koji je taksonomski blizak izolatu *Picochlorum* sp. D3 iz ovoga rada (Brown, 1991). Od ostalih monosaharida, ksiloza je bila zastupljena u dijatomejama u rasponu od 4.54±1.98% i 17.82±1.78% i zelenim mikroalgama uz izuzetak *Tetraselmis* sp. C6 te cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1. Cijanobakterija *Euhalothece* sp. ističe se među ostalim ispitivanim mikroalgama po prisustvu galaktoze (6.19±2.39%) i arabinoze (17.09±0.79%), čija je prisutnost u ukupnim ugljikohidratima zabilježena još jedino kod *Tetraselmis* sp. C6. Uz to, kod ova dva izolata, te *Tetraselmis* sp. Z3 primijećena je i ramnoza u sastavu (2.63%-8.21±0.18%). U literaturi se može pronaći sastav ugljikohidrata za samo 2 soja od 6 okarakteriziranih u ovome radu. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju kvantitativno su usporedivi s onima pronađenim u literaturi za vrste koje pripadaju istom razredu (Bernaerts ii sur., 2018; Brown, 1991). Potencijal ugljikohidrata izoliranih iz mikroalgi nije samo u njihovoj primjeni u prehrambenoj industriji, gdje je njihova upotreba donekle ograničena. Interes za mikroalgalnim ugljikohidratima stječe sve veću važnost u kozmetičkoj industriji kao higroskopni agent, a zbog svojih antioksidativnih svojstava ovi ugljikohidrati mogu se koristiti u proizvodima za površinsku primjenu kao što su losioni i kreme (de Jesus Raposo l., 2013). No još veća važnost mikroalgi kao izvora ugljikohidrata je njihova primjena u proizvodnji biogoriva. Interes industrije biogoriva uglavnom je usmjeren na iskorištavanje mikroalgi kao izvora lipida za proizvodnju biodizela. No, biomasa mikroalgi mogla bi se koristiti i na alternativni način, kao sirovina za proizvodnju biogoriva putem biotehnološke i termokemijske konverzije (Debnath i sur., 2021; Demirbas, 2009). Iako ugljikohidrati imaju manju energetsku vrijednost od lipida (15.7 kJ g^{-1} u odnosu na 37.6 kJ g^{-1}), preferirani su supstrat u proizvodnji nekoliko tipova biogoriva kao što su bioetanol, biobutanol i biovodik, putem procesa biotehnološke konverzije odnosno fermentacije.

5.1.3.4. Sastav masnih kiselina

Baš kao i u slučaju ugljikohidrata, niske vrijednosti udjela lipida u biomasi mikroalgi nisu neočekivane. Naime, mikroalge uz ugljikohidrate kao skladišne energetske molekule, mogu nakupljati i lipide. Mikroalgalni lipidi mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: polarni lipidi, kao što su glicerofosfolipidi koji imaju strukturnu ulogu u stanici, te nepolarni lipidi, npr. triacilgliceroli koji služe za pohranu energije. Različiti okolišni stresni uvjeti među koje ubrajamo i limitaciju nutrijenata mogu potaknuti njihovo nakupljanje (Gao i sur., 2019; Gao i sur., 2013; Jeffryes i sur., 2013). Budući da su kulture uzgajane do kasne eksponencijalne ili

rane stacionarne faze postignuti uvjeti nisu pogodovali nakupljanju lipida, pa je većina sintetiziranih lipida najvjerojatnije ugrađena u staničnu membranu. Profil masnih kiselina izoliranih mikroagli prikazan je u tablici 23. Najzastupljenija masna kiselina u ukupnim lipidima svih morskih mikroalgi bila je palmitinska kiselina (C16:0). Njen udio kretao se od 23.19±0.26% u lipidima *Nitzschia* sp. S5 soja do 31.63±1.1% zabilježenih u lipidima *Tetraselmis* sp. Z3. To je bila ujedno i najzastupljenija zasićena masna kiselina. Profil masnih kiselina značajno se razlikovao između karakteriziranih mikroalgalnih sojeva. Uz palmitinsku kiselinu, druga najzastupljenija je bila miristinska kiselina (C14:0) i palmitolenska masna kiselina (C16:1), a potom višestruko nezasićene masne kiseline dokosaheksaenoična kiselina (DHA; C22:6) i eikosapentaenoična masna kiselina (EPA; C20:5). U biomasi obje dijatomeje najzastupljenije su bile palmitoleinska (C16:1) i palmitinska (C16:0) koje zajedno čine više od 70% ukupnih masnih kiselina lipidnog ekstrakta. Karakterističan profil masnih kiselina dijatomeja uglavnom je sastavljen od masnih kiselina C14:0 i C22:6, a najzastupljenije su miristinska (14:0), pamitinska (C16:0), palmitolenska (C16:1n-7), dokozaheksaenoična (DHA) i eicosapentanoična (EPA) masna kiselina (Yi i sur., 2017). Profili masnih kiselina ovih dviju dijatomeja su u skladu s literaturnim navodima, a ujedno su i međusobno slični uz poneku iznimku. Udio miristinske kiseline u *Nitzschia* sp. S5 iznosi 10.59±0.32% što je značajnije više u odnosu na 0.66±0.34% zabilježenih kod *Nanofrustulum shiloi* D1. Mikroalge iz skupine dijatomeja karakteristične su po sadržaju značajnih količina omega-3 i omega-6 masnih kiselina među kojima se ističu alfa-linolenska kiselina (ALA C18:3), eikosapentaenoična kiselina (EPA, C20:5), dokozaheksaenoična kiselina (DHA, C22:6), arahidonska kiselina (ARA, C20:4) i linolenska (C18:2) kiselina (Jiang i sur., 2016; Yi i sur., 2017). *Nanofrustulum shiloi* D1 ističe se u odnosu na *Nitzschia* sp. S5 visokim udjelom arahidonske kiseline (ARA, C20:4) od 9.29±3.3%, eikosapentaenoične kiseline (EPA, C20:5) od 6.79±1.84% i linolenske kiseline (C18:2) od 1.88±0.55%. Arahidonska i linoleična kiselina nisu detektirane u lipidima *Nitzschia* sp. S5, a udio eikosapentanoične kiseline bio je nešto niži i iznosio je 3.48±0.19%. Profil masnih kiselina dobiven za *Nitzschia* sp. S5 bio je bogatiji na jednostruko nezasićenim masnim kiselinama (64.68±0.13%) uz udio višestruko nezasićenih masnih kiselina od svega 3.48±0.19%, dok je *Nanofrustulum shiloi* puno bogatiji na višestruko nezasićenim kiselinama s udjelom od 21.57±6.09%. Iako je profil masnih kiselina velikog broja poznatih i okarakteriziranih mikroalgi sličan, on je također i ovisan o vrsti dijatomeje i uvjetima kultivacije (Jiang i sur., 2016; Yi i sur., 2017). Miristinska i palmitolenska kiselina, najzastupljenije masne kiseline u dijatomejama, spadaju u skupinu tiracilglicerida koje svoju potencijalnu primjenu pronalaze u industriji biogoriva (Hildebrand i

sur., 2012). Upravo zbog tendencije nakupljanja velike količine tiracilglicerida, te povoljnog profila masnih kiselina, dijatomeje su primjenjive za proizvodnju biogoriva i to prvenstveno biodizela (Hildebrand i sur., 2012). EPA i DHA najvrijednije su masne kiseline koje su česte u mnogim vrstama dijatomejama i to u relativno velikim količinama (Yi i sur., 2017). Njihova zdravstvena dobrobit za ljude je višestruka, od toga da pokazuju antitumorsko, antiviralno i antimikrobno djelovanje pa do primjene kod ateroskleroze, hipertenzije i raznih upalnih procesa. Također imaju važnu ulogu u zaštiti kardiovaskularnog sustava (Sapieha i sur., 2011), zdravlja očiju (Hallahan i Garland, 2005) i u liječenju psihičkih poremećaja (Lafourcade i sur., 2011). Iako je ljudski organizam sposoban sintetizirati EPA i DHA iz linolenske kiseline, zbog malog prinosa potreban je njihov unos putem hrane. Među visokovrijedne masne kiseline dijatomeja uklapaju se i palmitolenska i stearinska kiselina koje pokazuju antibakterijsko i antimikrobno dijelovanje, glikolipidi koji posjeduju protuupalno, anti-tumorsko, antibakterijsko i antiviralno djelovanje, te fosfolipidi koji vrijednost pronalaze kao sastojci funkcionalne hrane, kozmetike i proizvoda farmaceutske industrije (Yi i sur., 2017). Među karakteriziranim mikroalgama, relativno visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina istaknule su se *Tetraselmis* sp. C6 (44.93±1.99) i *Tetraselmis* sp. Z3 (41.53±1.11). Alfa-linolenska masna kiselina bila je najzastupljenija nezasićena masna kiselina s 22.50±0.47% kod izolata Z3 i 21.75±0.82% kod izolata C6 što je skoro dvostruko više od 11.59±0.91 zabilježenih za trećeg predstavnika zelenih mikroalgi *Picochlorum* sp. D3. U usporedbi s dijatomejama oba *Tetraselmis* izolata s 8.58±1.05% (Z3) i 7.01±3.17% (C6) bogatija su visokovrijednom eikosapentanoičnom kiselinom. EPA nije detektirana u *Picochlorum* sp. D3, a udio linolenske kiseline od 33.33±1.76% bio je značajnije veći u odnosu na *Tetraselmis* sp. C6 i Z3. Udio arahidonske kiseline (C20:4) u *Tetraselmis* sp. C6 iznosio je samo 1.32±0.03%, dok je udio linolenske kiseline u *Tetraselmis* sp. Z3 iznosio 3.81±0.45%. Za razliku od dijatomeja palmitolenska kiselina je bila zastupljena u značajnije manjoj mjeri (1.36±0.03%-3.54±1.1%) dok je najzastupljenija bila palmitinska (C16:0) (28.14±2.61%-33.25±1.35%). Masne kiseline sa neparnim brojem ugljikovih atoma, margarinska (C17:0) i heptadekanska (C17:1) prisutne su u ukupnim lipidima svih karakteriziranih mikroalgi u nešto nižim udjelima. Ove masne kiseline često se koriste kao biomarkeri koji potvrđuju i ukazuju na bakterijsku kontaminaciju mikroalgalne kulture (Viso i Marty, 1993). Iako je riječ o kseničnim kulturama te prisutnost ovih masnih kiselina može biti bakterijskog podrijetla, one se mogu pronaći i u mikroalgalnoj biomasi s udjelima manjim od 5% (Maltsev i Maltseva, 2021). Neki autori navode kako u zelenim mikroalgama udio masnih kiselina s neparinim brojem ugljikovih atoma može biti i značajno veći, čak i do 52.2% u

ukupnim masnim kiselinama (Ghazala i Shameel, 2005). Ove masne kiseline pokazuju i brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što je smanjenje rizika od razvoja multiple skleroze (Holman i sur., 1989) i antitumorskog djelovanja (Holman i sur., 1989; Vlaeminck i sur., 2006). Cijanobakterija *Euhalothece* sp. C1 ističe se najvećim udjelom zasićenih masnih kiselina od 78.65±0.93%. Najzastupljenija masna kiselina u većini cijanobakterija je palmitinska (C16:0), potom palmitoleinska (C16:1) i starinska (C18:0) masna kiselina, dok su među nezasićenim masnim kiselinama najčešće C18 masne (Anahas i Muralitharan, 2018; Nalley i sur., 2018). Profil masnih kiselina cijanobakterije karakterizirane u ovome radu neobičan je zbog visokog udjela margarinske kiseline (C17:0) od čak 48.79%. Ova masna kiselina može se pronaći kod nekih cijanobakterija koje tvore heterociste, ali u znatno nižim udjelima od 1.57-5.84% (Anahas i Muralitharan, 2018). Udio palmitinske kiseline od 28.40% i palmitolenske kiseline od 1.36% usporediv je s profilom cijanobakterije *Nostoc punctiforme*, dok su zabilježene količine oleinske (C18:1) (0.84%) i linolenske (C18:2 trans 9, 12 2.54%; C18:2 cis 9, 12 3.99%) bile značajno niže kod *Euhalothece* sp. C1. No kao što je i prethodno spominjano, profil masnih kiselina uvelike ovisi o uvjetima uzgoja kao i o fazi rasta same mikroalge odnosno cijanobaterije. Značajna količina margarinske kiseline pronađena je i u lipidima *Picochlorum* sp. D3 s udjelom od 22.23±2.47% što nije u skladu s literaturnim navodima. Općenito gledano, profil masnih kiselina *Picochlorum* sp. D3 nije u skladu s profilom karakterističnim za druge vrste *Picochlorum* soja (Barten i sur., 2020; Pereira i sur., 2013). No, udio margarinske kiseline do 12% zabilježen je za neke vrste iz rodova *Nannochloropsis* i *Tetraselmis* (Barten i sur., 2020; Muhammad i sur., 2018). Upravo zahvaljujući neuobičajenom prisustvu margarinske masne kiseline čini ove dvije mikroalge izolirane iz Jadranskog mora potencijalnim proizvođačima masnih kiselina s neparnim brojem ugljikovih atoma. Pentadekanska (C15:0) i margarinska (C17:0) masna kiselina, detektirane u ova dva soja imaju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje budući da smanjuju rizik od multiple skleroze, srčanih bolesti i bolesti krvnih žila te dijabetesa tipa 2 (Calder, 2015; Forouhi i sur., 2014; Jenkins i sur., 2015; Khaw i sur., 2012). Osim toga, masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma i njihovi derivati često se primjenjuju kao prekursori u sintezi kemikalija, biocida i različitih okusa (Park i sur., 2018). Stoga ove, ali i ostale mikroalge okarakterizirane u ovome radu, svojim profilom masnih kiselina pokazuju potencijal za primjenu u proizvodnji hrane, biogoriva i nutraceutika. Četiri izolirane mikroalge, *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3, *Picochlorum* sp. D3 i *Nanofrustulum shiloi* sp. D1 imaju potencijal za primjenu kao dodatci prehrani budući da se ističu sadržajem višestruko nezasićenih masnih kiselina. *Tetraselmis* sp. Z3 s velikim udjelom višestruko

nezasićenih masnih kiselina koji uključuje ω-3 masne kiseline eikosapentaenoičnu (EPA), arahidonsku (ARA) i dokosapentaenoičnu (DHA) može biti pogodna za zamjenu ribljeg ulja. Masne kiseline dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i cijenoabkterije *Euhalothece* sp. C1 bogate su na C16-C18 masnim kiselinama, te niskog sadržaja višestruko nezasićenih masnih kiselina što ih čini idealnim kandidatima za proizvodnju biodizela.

5.1.3.5. Sastav lipida po lipidnim klasama izoliranih morskih mikroalgi

Mikroalge sintetiziraju različite tipove lipidnih molekula kao što su triacilgliceroli, steroli, glikolipidi, fosfolipidi, ugljikovodike i spojeve iz skupine voskova (Morales i sur., 2021). Kao što je vidljivo iz tablice 24. sva tri razreda mikroalgi razlikuju se po sastavu lipidnih klasa. Neutralni lipidi obuhvaćaju mono, di, i triacilglicerole, slobodne masne kiseline, sterole i sterilne estere. Fosfolipidi (fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamin i fosfatidilkolin) i glikolipidi (monogalaktozilgliceroli, digalaktosildiacilglicerols i sulfokvinovosildiacilglicerols) čine skupinu polarnih lipida. Izolirane zelene mikroalge i cijanobakterije imali su najmanji udio neutralnih lipida (15.22-18.58%) i najveći udio polarnih lipida (74.59-78.33%). Dijatomeje su pak imale veći udio neutralnih lipida (46.60-68.36%) i nešto manji udio polarnih (29.03-49.33%). Relativno mala količina triacilglicerola je prisutna u svim okarakteriziranim mikroalgama budući da su stanice izdvojene u kasnoj eksponencijalnoj ili ranoj stacionarnoj fazi rasta kada je njihova količina u stanicama uobičajeno niska (Gao i sur., 2019; Gao i sur., 2013; Jeffryes i sur., 2013). Slobodne masne kiseline bile su najdominantnije u neutralnim lipidima u sva tri mikroalgalna razreda. Zelena mikroalga, *Tetraselmis* sp. Z3 i *Tetraselmis* sp. C6 sadržavale su najmanju količinu masnih kiselina (5.80-10.25%), a potom je slijedila cijanobakterija *Euhalothece* sp. C1 sa 15.23%. Sadržaj slobodnih masnih kiselina u ovim sojevima bio je znatno manji od onih navedenih u literaturi za zelene mikroalge (Yao i sur., 2015) i cijanobakterije (Verma i sur., 2019). Točnost dobivenih rezultata može biti narušena neadekvatnim uvjetima skladištenja i neispravnim rukovanjem s uzorcima. Stoga, veće vrijednosti udjela masnih kiselina navedene u literaturi mogu biti rezultat degradacije lipida tijekom skladištenja ili čuvanja uzoraka (Parrish i sur., 1991; Yao i sur., 2015). Suprotno tome, udjel slobodnih masnih kiselina u dijatomejama okarakteriziranim u ovome radu bio je znatno veći od udjela navedenog u literaturi za većinu dijatomeja unatoč ispravnom načinu rukovanja uzorcima (Dunstan i sur., 1994; Parrish i sur., 1991; Schaub i sur., 2017; Volkman' i sur., 1989). Visok sadržaj

slobodnih masnih kiselina najvjerojatnije je posljedica hidrolize triacilglicerola djelovanjem endogenih lipaza koje sintetiziraju dijatomeje. Tijekom uvjeta bez prisustva svjetlosti hidrolizom triacilglicerola pohranjenih i sintetiziranih unutar stanice tijekom fotosintetski aktivne svjetlosne faze nastaju masne kiseline koje služe stanici kao izvor energije i ugljika (Barka i sur., 2016). Budući da je biomasa korištena u analizama u ovome radu izdvojena nakon faze rasta bez prisustva svijetla, za očekivati je da je aktivnost lipaza u ovoj fazi rasta velika, pogotovo na kraju stacionarne faze rasta kada je rast stanica limitiran i izvorom ugljika, a najčešće i dostupnom svjetlošću (Barka i sur., 2016). Mikroalge proizvode i sterole koji povećavaju fluidnost i propusnost staničnih membrana, te služe kao signalne molekule i modulatori tako da se vežu na proteine (Dufourc, 2008; Volkman, 2003). U većini mikroalgi, steroli su prisutni u slobodnoj formi, odnosno neesterificiranoom obliku, iako mogu biti i u konjugiranoj formi kao što su primjerice sterilni esteri, sterol glikozidi i acil sterol glikozidi (Jaramillo-Madrid i sur., 2019). Sterol esteri bili su dominantniji u odnosu na sterole u lipidima dijatomeja *Nanofrustulum shiloi* D1 i *Nitzschia* sp. S5 (5.71 i 1.71% u odnosu na 2.03 i 1.30%), a slično je zabilježeno i za cijanobakteriju *Euhalothece* sp. C1. Sinteza sterola tema je o kojoj se mnogo raspravlja unutar fikološkog kruga i većina provedenih istraživanja pokazuje kako cijanobakterije ne sintetiziraju sterole (Volkman, 2003). U ovom istraživanju, značajne varijacije su opažene između mikroalgalnih razreda, ali i između sojeva. Omjer neutralnih i polarnih lipida u dijatomejama značajno je varirao. Kod *Nanofrustulum shiloi* D1 iznosio je 2.35 %, a kod *Nitzschia* sp. S5 isti je iznosio 0.94 %, dok je u zelenim mikroalgama i cijanobakteriji taj omjer bio više-manje konstantan i kretao se između 0.20-0.25 %. Omjer polarnih i neutralnih lipida ovisan je o uvjetima kultivacije (intenzitet svjetlosti, ciklus tama svjetlo), fazi rasta i sastavu medija (Fidalgo i sur., 1998). U cijanobakteriji *Euhalothece* sp. i sve tri okarakterizirane zelene mikroalge, polarni lipidi sačinjavali su više od 75% u ukupnim lipidima i to sa sličnim količinama glikolipida i fosfolipida. Glikolipidi (monogalactozildiacilglicerol, digalactozildiacilglicerol i sulfokinovozildiacilglicerol) i fosfolipdi (fosfatidilglicerol, fosfatidilkolin, fosfatidildiacilglicerol) glavne su komponente mikroalgalnih kloroplasta (Yao i sur., 2015). Među polarnim lipidima u svim karakteriziranim mikroalgama najzastupljeniji su bili monogalaktozildiacilglicerol (4.66-22.48%), sulfokvinovosildiacilglicerol (4.02-14.89%), fosfatidilglicerol (10.00-36.83%) i fosfatidiletanolamin (5.25-19.88%). Lipidni ekstrakt *Picochlorum* sp. D3 ističe se od ostalih okarakteriziranih mikroalgi visokim sadržajem fosfatidilkolina (8.08%). *Tetraselmis* sp. C6, *Tetraselmis* sp. Z3 i *Euhalothece* sp. C1 imali su sličan sadržaj monogalaktozildiacilglicerola (4.66-9.29%), sulfokvinovosildiacilglicerol (11.78-14.89%), fosfatidilglicerol (36.08-36.83%)

i fosfatidiletanolamina (13.26-19.88%). *Picoclorum* sp. D3 sadrži značajno veću količinu monogalaktozildiacilglicerola (22.48%) i puno nižu razinu fosfatidilglicerola (21.93%). Opažena količina fosfolipida i glikolipida bila je značajnije veća od literaturnih podataka za zelenu mikroalgu *Nannochloropsis* sp., slatkovodne mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* i *Scenedesmus* sp., te za *Schizochytrium limacinum* (Yao i sur., 2015). Nadalje, karakterističan profil polarnih lipida u zelenim mikroalgama i cijanobakteriji uvelike odskače od onih dobivenih u ovome radu (Sakurai i sur., 2006a; Sohlenkamp i Geiger, 2015; van Eerden i sur., 2015; Yao i sur., 2015). No, literatura potvrđuje i kako profil lipida može varirati između vrsta istoga roda (Yang i sur., 2020). Budući da su ove mikroalge izolirane iz Jadranskog mora, odstupanja od literaturnih podataka nisu toliko iznenađujuća. U cijanobakteriji *Euhalothece* sp. C1, najdominantnije lipidne frakcije bile su monogalaktozildiacilglicerol (~40%) i digalaktozildiacilglicerol (~32%), a potom su uslijedili sulfokinovozildiacilglicerol (~15%) i fosfatidilglicerol (~13%) (Sakurai i sur., 2006b; Sohlenkamp Geiger, 2015; van Eerden i sur., 2015). Visoka razina fosfolipida uz prisutnost ω-3 i ω-6 masnih kiselina čini i dijatomeje i zelene mikroalge okarakterizirane u ovome radu potencijalnim dodatcima za hranu za životinje, ali i za ljudsku prehranu. Nekoliko studija je potvrdilo kako se ova kompleksna skupina estera masnih kiselina bolje apsorbira, distribuira i asimilira u tkivo od triacilglicerola. Nadalje, glikolipidi i fosfolipidi iz morskih mikroalgi imaju dodatnu biološku aktivnost (Ramírez i sur., 2001). Antimikrobno, antiviralno, protuupalno i imunostimulativno djelovanje ekstrakata morskih makrofita uglavnom se povezuje sa glikolipidima i fosfolipidima (Kellogg i sur., 2015; Sanina i sur., 2004; Wijesinghe i Jeon, 2012). Sve okarakterizirane mikroalge u ovom radu imale su nizak sadržaj ugljikovodika (1.53-3.77%) što je u skladu s literaturnim navodima (Anahas i Muralitharan, 2018; Nichols i sur., 1988; Yao i sur., 2015).

5.1.3.6. Sastav pigmenata izoliranih morskih mikroalgi

Pigmenti su visokovrijedni proizvodi s širokom mogućnošću primjene, koja obuhvaća prehrambenu, kozmetičku i farmaceutsku industriju. Osim toga, pigmenti su u velikoj mjeri zaslužni i za antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost mikroalgalne biomase. Sadržaj i sastav pigmenata u svrhu karakterizacije odabranih morskih mikroalgi praćena je pomoću HPLC-PDA analize. Detektirano je šest karotenoida i dva tipa klorofila, a to su neoksantin (i njegova četiri derivata), fukoksantin (uz jedan njegov derivat), ksantaksantin (uz dva derivata), lutein

(uz dva derivata), α-karoten, β-karoten, klorofil *a* i njegovih šest derivata, klorofil *b* i njegov jedan derivat. Pigmenti su analizirani i potom su izraženi kao ukupni karotenoidi, ukupni klorofil i ukupni pigmenti, a rezultati su prikazani u tablici 25. Najveći sadržaj pigmenata određen je u predstavnicima iz odjeljka Chlorophyta. Najveći sadržaj pigmenata od 508.51 mg/100 g suhe tv. biomase određen je kod *Tetraselmis* sp. C6, a slijedi ga *Picochlorum* sp. D3 s 415.07 mg/ 100 g suhe tv. biomase. Ove dvije mikroalge također su imale i najveći udio ukupnih klorofila (254.03 mg/ 100 g suhe tv) i sadržaj karotenoida (298.89 mg/ 100 g suhe tv.). Slično je prikazano i u radu Almendinger i suradnika, gdje je najveći udio pigmenata također bio zabilježen za mikroalge koje pripadaju razredu Chlorophyta, s najvećom zabilježenom vrijednosti od 60 mg/ g u *N. oleobundans* (Almendinger i sur., 2021). U svim karakteriziranim mikroalgama, najveći udio među karotenoidima zauzimali su ksantofili. *Picochlorum* sp. D3 imao je najveći sadržaj luteina među mikroalgama analiziranim u ovome radu i to 233.39 mg/ 100 g suhe tvari biomase. Iako s manjim sadržajem, lutein je bio najzastupljeniji karotenoid i u pigmentima ostalih predstavnika odjeljka Chlorophyta, a potom je slijedio neoksantin. Sličan profil pigmenata s luteinom kao najzastupljenijim, zabilježen je u *Picochlorum* sp. HM1 (3.5 mg/ g suhe tv.) (de la Vega i sur., 2011). Lutein je visokovrijedan pigment koji pokazuje imunostimulirajuće djelovanje i zaštitnu ulogu od nekih upalnih i kroničnih bolesti. Također, lutein je sastavni dio očne makule, te ima ulogu u zaštiti oka od oksidativnog stresa budući da posjeduje sposobnost vezanja slobodnih radikala (Chung i sur., 2017). Sličan profil utvrđen je i kod *Tetraselmis* sp. C6 gdje su ukupne karotenoide (254.48 mg/ 100 g suhe tv.) sačinjavali ksantofili lutein i neoksantin i to sa najvećim sadržajem među svim karakteriziranim mikroalgama od 79.44 mg/ 100 g suhe tv). Sadržaj luteina i neoksantina bio je sličan ili čak i veći u odnosu na podatke pronađene u literaturi za *Tetraselmis* sojeve (di Lena i sur., 2019; Peramuna i Summers, 2014; Pereira i sur., 2013; Schüler i sur., 2020). Schüller i suradnici proveli su kultivaciju *Tetraselmis* sp. CTP4 u uvjetima sličnim kao u ovome radu i dobiven je sličan profil pigmenata ali uz značajnije niži sadržaj neoksantina (0.5 mg po g suhe tvari) i luteina (1.64 mg po g suhe tvari) u odnosu na *Tetraselmis* sp. C6. Profil pigmenata *Tetraselmis* sp. Z3 bio je sličan profilu dobivenom za *Tetraselmis* sp. C6 kvalitativnim sastavom, ali znatno nižih vrijednosti za svaki pojedini pigment. Ova razlika može biti pripisana različitosti između sojeva istoga roda (Pagels i sur., 2021; Schüler i sur., 2020). Najniži sadržaj na pigmentima zabilježen je kod cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1 sa samo 37.29 mg po 100 g suhe tvari. Lutein je bio najzastupljeniji pigment s 22.45 mg po 100 g suhe tvari biomase cijanobaterije. U cijanobakterijama glavni pigmenti su fikobiliproteini, dok karotenoidi imaju zaštitnu ulogu kod velikog intenziteta

svjetlosti i odgovorni su za hvatanje slobodnih radikala (Pagels i sur., 2021). Fikocijanin je jedan od glavnih i najzastupljenijih pigmenata pronađen u biomasi *Euhalothece* sp. zajedno s klorofilom a i karotenoidima (Yang i sur., 2020). Mikroalge iz razreda Bacillariophyta imale su najveći sadržaj fukoksantina. Fukoksantin je ksantofil koji ima snažno antioksidativno djelovanje, a zastupljen je uglavnom u dijatotomejama, te smeđim i zlatnim algama (Fung i sur., 2013). Njegova primjena usmjerena je u medicinske i nutraceutičke svrhe budući da pokazuje antioksidativno, antikancerogeno, protuupalno, neuroprotektivno i antidijabetičko djelovanje (Peng i sur., 2011). Sadržaj fukosantina u oba predstavnika dijatomeja bio je sličan. U biomasi *Nitzschia* sp. S5 iznosio je 40.11 mg/100 g suhe tvari, a kod *Nanofrustulum shiloi* D1 39.54 mg/100 g suhe tvari. Sadržaj fukoksantina u ove dvije dijatomeje veći je od onog zabilježenog za *Thalassiosira pseudonana* (<0.2% suhe tvari), sličan onome u mikroalgi *Thalassiosira* sp. (0.44 mg/ g suhe tvari), te niži od zabilježenog za *Skeletonema* sp. (1.81 mg/ g suhe tv) i *Chaetoceros* sp. (1.49 mg/g suhe tvari) (Bhattacharjya i sur., 2020; Guo i sur., 2016). Karotenoidi su najzastupljenij pigmenati u biomasi *Nitzschia* sp. S5 i *Picochlorum* sp. D3 sa 73.56%, odnosno 72%. Ova dva soja imala su najveći udjel karotenoida među ostalim okarakteriziranim mikroalgama.

5.1.3.7. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida te antioksidativno djelovanje ekstrakata izoliranih morskih mikroalgi

Karotenoidi imaju važnu ulogu kao antioksidansi u stanicama mikroalgi zahvaljujući njihovoj sposobnosti vezanja slobodnih radikala koji nastaju tijekom fotosinteze. Mnoga istraživanja potvrdila su takvu ulogu karotenoida (Almendinger i sur., 2021; Assunção i sur., 2017; Goiris i sur., 2012; Haoujar i sur., 2019; Pereira i sur., 2015; Safafar i sur., 2015). Međutim, antioksidativni potencijal mikroalgi ne može se pripisati isključivo samo karotenoidima. Mikroalgalna biomasa sadrži različite antioksidanse uključujući aromatske spojeve kao što su fenoli i flavonoidi, pa čak i nezasićene masne kiseline i druge ne klasificirane molekule (Almendinger i sur., 2021; Remize i sur., 2021). U svrhu karakterizacije izoliranih mikroalgalnih sojeva, određen je i njihov antioksidacijski potencijal primjenom dva testa, ABTS i DPPH koristeći Trolox kao standard za usporedbu. Ukupni sadržaj na fenolima varirao je između 5.99±0.17 do 22.64±1.86 mg galne kiseline po g suhe tvari ekstrakta, a ukupni sadržaj flavonoida od 0.14±0.02 do 0.67±0.10 mg kvercentina po g suhe tvari ekstrakta (tablica 26). Najniži sadržaj fenola i flavonoida zabilježen je kod cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1. Najviše fenola utvrđeno je u ekstraktima mikroalge

Tetraselmis sp. C6 (22.33 mg galne kis. po g suhe tvari) i *Nitzschia* sp. S5 (22.64 mg galne kis po g suhe tvari) što je u skladu s literaturnim navodima (Anahas i Muralitharan, 2018; Bhattacharjya i sur., 2020; Haoujar i sur., 2019; Li i sur., 2007; Safafar i sur., 2015). Sadržaj fenola dobiven u ekstraktu *Tetraselmis* sp. C6 sličan je onome zabilježenom u radu Maadane i suradnika (25.5 mg galne kis. po g suhe tvari ekstrakta) te već od 3.8 mg galne kis po g suhe tvari iz rada Goiris i suradnika (Goiris i sur., 2012; Maadane i sur., 2017). Haoujar i suradnici također su objavili nešto veći sadržaj fenola kod *Tetraselmis suecica* od 28. 03 mg galne kiseline po g suhe tvari (Haoujar i sur., 2019). Sadržaj fenola u dijatomeji *Phaeodactylum tricornutum* bio je 39.34 mg galne kiseline po g suhe tvari što je više od vrijednosti dobivenih u ovome radu za dva predstavnika dijatomeja (Haoujar i sur., 2019). I ovdje treba napomenuti kako je usporedba s literaturom otežana uslijed taksonomske različitosti okarakteriziranih sojeva, ali i uvjeta uzgoja kao što su sastav nutrijenata, temperatura i stres, a koji svi značajno utječu na sastav i sadržaj antioksidansa. Osim toga, nekoliko istraživanja potvrđuje i značajan utjecaj primijenjene metodologije u analitici, a osobito odabir otapala za provođenje ekstrakcije (Ahmed i sur., 2014; Li i sur., 2007). Također je potvrđeno kako se sadržaj fenola u mikroalgama povećava uslijed izlaganja UV svijetlosti koji inducira antioksidativni odgovor stanice na ovaj tip stresa (Duval i sur., 2000; Ková i sur., 2010). Sadržaj flavonoida dijatomeje *Nanofrustulum shiloi* D1 je sličan onome kod *Picochlorum* sp. D3, no sadržaj fenola kod zelene mikroalge je značajnije veći. Kako bi se preciznije odredio antioksidativni potencijal ekstrakata mikroalgi, provedena su dva in vitro testa koja se temelje na dva različita mehanizma. ABTS test bazira se na peroksidaciji antioksidansa kao što su fenolni spojevi i karotenoidi djelovanjem vodotopljivog peroksid radikala. Vrijednosti dobivene ABTS testom za šest okarakteriziranih mikroalgi varirali su između 12.75 i 170.96 µmol TE/g (tablica 26). Svi mikroalgalni ekstrakti pokazali su visoku TEAC (>40 µmol trolox ekvialenta po g suhe tvari ekstrakta) aktivnost osim ekstrakta *Nanofrustulum shiloi* D1. Nekoliko autora potvrdilo je velike razlike u antioksidativnoj aktivnosti između različitih sojeva i vrsta unutar istog roda mikroalgi (Assunção i sur., 2017; Goiris i sur., 2012; Li i sur., 2007). Kao što je očekivano po samom sadržaju fenola, flavonoida i ukupnih karotenoida, najveći antioksidativni potencijal prema oba primijenjena testa pokazao je izolat *Tetraselmis* sp. C6. Unatoč sličnom sadržaju fenola i flavonoida, dijatomeja *Nitzschia* sp. S5 je pokazala značajnije niži antioksidativni potencijal u odnosu na *Tetraselmis* sp. C6. Moguće objašnjenje je razlika u sadržaju karotenoida budući da je kod *Nitzschia* sp. S5 on iznosio 101.2 mg po 100 g suhe tvari, a kod *Tetraselmis* sp. C6 254.48 mg po 100 g suhe tvari. No, dijatomeja *Nitzschia* sp. S5 pokazala je veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na druga dva izolata iz odjeljka Chlorophyte. U

usporedbi s *Tetraselmis* sp. Z3, ekstrakt dijatomeje pokazao se bogatiji na fenolima i flavonoidima baš kao i na karotenoidima. Iako je ukupni sadržaj pigmenata i karotenoida kod *Picochlorum* sp. D3 bio veći nego kod dijatomeje *Nitzschia* sp. S5, antioksidacijski potencijal je bio manji. Mogući razlog tomu je što je biomasa dijatomeje bogatija na pigmentu fukoksantinu koji ima snažno antioksidativno djelovanje, jače od ostalih karotenoida što potvrđuje literatura (Mikami i Hosokawa, 2013; Nomura i sur., 1997; Peng i sur., 2011; Sathasivam i Ki, 2018). Nomura i suradnici potvrdili su kako fukoksantin reagira ekvimolarno s DPPH reagensom kao oksidans u anoksičnim uvjetima, za razliku od β-karotena, zeaksantina, likopena, luteina i β-kriptoksantina koji vrlo slabo ili čak nikako ne reagiraju s DPPH (Nomura i sur., 1997). Fukoksantin efektivno djeluje u hvatanju radikala zahvaljujući strukturi koja uključuje alenske veze, 5, 6-monoepoksid, dvije hidroksilne grupe, karbonilnu grupu i acetilnu grupu u terminalnom prstenu, a po tome se fukoksantin razlikuje od ostalih karotenoida (Mikami & Hosokawa, 2013; Peng i sur., 2011; Sathasivam i Ki, 2018). Također se pretpostavlja kako je upravo alenska veza zaslužna za veću antioksidativnu aktivnost fukoksantina, koja ga uz 6 atoma kisika čini boljim antioksidansom, posebice u anoksičnim uvjetima (Peng i sur., 2011). Kada se usporede dvije dijatomeje okarakterizirane u ovome radu, *Nanofrustulum shiloi* D1 pokazuje veću antioksidativnu aktivnost određenu TEAC testom unatoč manjem sadržaju fukoksantina. Većem antioksidativnom potencijalu *Nanofrustulum shiloi* D1 doprinosi veći sadržaj fenola i flavonoida. Muller i suradnici, pokazali su kako antioksidativno djelovanje karotenoida određeno TEAC testom ovisi o broju konjugiranih dvostrukih veza i hidroksilnih grupa blizu konjugiranog sustava i o supstituciji β-ionskog prstena (Müller i sur., 2011). Osim toga, u istom radu dokazali su kako karotenoidi pokazuju veću aktivnost od ksantofila u TEAC testu u odnosu na FRAP test (Müller i sur., 2011). Antioksidativna aktivnost ekstrakta cijanobakterije *Euhalothece* sp. C1 bila je veoma slična ekstraktu mikroalge *Tetraselmis* sp. Z3 i *Niztschia* sp. S5 unatoč tome što je biomasa *Euhalothece* bila najsiromašnija fenolima, flavonoidima i pigmentima. Poznato je kako mikroalge sintetiziraju različite antioksidativne spojeve uz karotenoide i fenolne spojeve, uključujući polisaharide i dugo lančane nezasićene masne kiseline. Osim toga, antioksidativno djelovanje ovisi uvelike o korištenom otapalu za pripremu ekstrakta. Budući da tvari iz mikroalgalne biomase s antioksidativnim djelovanjem imaju različitu polarnost, sastav otapala uvelike utječe na sastav ekstrakta (Ahmed i sur., 2014; Li i sur., 2007; A. López i sur., 2011). IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju ekstrakta kod koje je 50% DPPH slobodnog radikala oksidirano. Vrijednost IC_{50} izračunata i prikazana u tablici 35. Metanolni ekstrakt biomase *Tetraselmis* sp. C6 imao je najmanju IC_{50} vrijednost od 0.87±0.23 mg mL^{-1}. Dobivena

vrijednost slična je vrijednosti određenoj za *Tetraselmis* sp. uzgajanoj pri niskom intenzitetu svijetla (753.99 µg mL^{-1}) (Coulombier i sur., 2020), ali veća od vrijednosti izmjerene za *T. suecica* (394.40 µg mL^{-1}) (Haoujar i sur., 2019). Za sve ostale okarakterizirane mikroalge, IC_{50} vrijednost bila je veća od 1 mg mL^{-1}, a maksimalna vrijednost od 4.05 mg mL^{-1} zabilježena je za ekstrakt mikroalge *Nanofrustulum shiloi* D1. U radu Coulombier i suradnika, vrijednosti IC_{50} za *Nitzschia* sp. i *Tetraselmis* sp. bile su iznad 1000 µg mL^{-1} (Coulombier i sur., 2020). Neka istraživanja potvrđuju kako je kapacitet karotenoida u hvatanju DPPH radikala slaba, čak i do 50 puta slabija u odnosu na troloks (Müller i sur., 2011). I to je moguće objašnjenje i u slaganju sa slabim potencijalom mikroalgalnih ekstrakata za hvatanje ABTS i DPPH radikala, koji pokazuju puno veći kapacitet u hvatanju peroksi radikala (Coulombier i sur., 2020). Kako bi se detaljnije utvrdio doprinos pojedinih fenolnih i flavonoidnih tvari antioksidativnom potencijalu ekstrakata mikroalgi potrebno je utvrditi njihov međusobni doprinos bilo da se radi o sinergističkom, aditivnom ili antagonističkom doprinosu.

5.1.3.8. Antimikrobno djelovanje ekstrakata izoliranih morskih mikroalgi

Osim antioksidativnog potencijala, ispitano je i antimikrobno djelovanje metanolnih ekstrakata na tri Gram-pozitivne bakterije (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*), tri Gram-negativne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*) te kvasac *Candida utilis* i plijesan *Aspergillus niger*. Rezultati su prikazani u tablici 27, a izraženi u mm promjera zone inhibicije. Niti jedan od ispitanih ekstrakata nije pokazao antimikrobno djelovanje prema *C. utilis* i *A. niger*. Čisti metanol korišten je kao negativna kontrola da bi se utvrdilo njegovo eventualno antimikrobno djelovanje na rast test mikroorganizme. Na taj način se moglo odrediti da li je inhibicijsko djelovanje rezultat samog otapala ili ekstrahiranih komponenata u ekstraktu. Kao pozitivna kontrola korišteni su antibiotici. Neomicin je korišten za bakterijske kulture, a nistatin za plijesan i kvasac. Antimikrobno djelovanje na rast kvasca *Candida utilis* može se pripisati inhibitornom djelovanju samog otapala unutar mikroalgalnih ekstrakata budući da je zona inhibicije ekstrakata za sve ispitivane mikroalge bila manja od one za čisto otapalo. No, metanolni ekstrakti pokazali su dobru antimikrobnu aktivnost protiv svih ispitivanih Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija. Prethodna istraživanja također su potvrdila kako su etanolni i metanolni ekstrakti mikroalgi visoko efektivni protiv različitih Gram pozitivnih i

Gram negativnih bakterija (Pina-Pérez i sur., 2017). Svi ispitani mikroalgalni ekstrakti osim ekstrakta *Tetraselmis* sp. Z3 inhibirali su rast *E. coli*. Najveću inhibicijsku zonu imao je ekstrakt *Tetraselmis* sp. C6 (26.05±0.07 mm). Osim toga, taj isti ekstrakt pokazao je izraženi inhibicijski učinak na rast *S. typhimurium, P. aeruginosa* i *S.aureus* između svih ispitivanih mikroalgalnih ekstrakata. Unatoč razlikama u djelovanju ekstakata *Tetraselmis* sp. izolata, oba su pokazala inhibitorno djelovanje na bakteriju *P. aeruginosa*. Uspoređujući ekstrakte ova dva *Tetraselmis* soja, ekstakt soja C6 pokazao je jače inhibitorno djelovanje na sve ispitivane patogene mikroorganizme što je moguće i posljedica niže koncentracije ekstrakta izolata Z3. Jedina iznimka je *E. faecalis* čiji rast nije bio inhibiran ekstraktom *Tetraselmis* sp. C6. Inhibicijske zone izmjerene za ekstrakte ostalih okarakteriziranih mikroalgi bile su manjeg promjera za čisti metanol. Time se inhibicijsko djelovanje ekstrakta može pripisati djelovanju metanola, a ne tvarima ekstrahiranim iz mikroalgalne biomase. Ekstakti dijatomeja snažno su inhibirali rast *B. subtilis*, s izmjerenih 20±0.01 mm za ekstrakt *Nitzschia* sp. S5 i 15±1.41 mm za ekstrakt *Nanofrustulum shiloi* D1. S obzirom na veću koncentraciju suhe tvari ekstrakta *N. shiloi* s 22.10±0.52 mg mL^{-1} u odnosu na koncentraciju ekstrakta *Nitzschia* sp. S5 od 10.63±0.34 mg mL^{-1}, može se zaključiti kako je veći inhibicijski učinak pokazao upravo ekstrakt *Nitzschia* sp. S5. Ovi dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim za ekstrakt dijatomeje *Thalossiosira* sp. na *B. subtilis* i *S. aureus* (Lauritano i sur., 2016). Prema navedenom istraživanju, antibakterijsko djelovanje različitih dijatomeja također ovisi o vrsti, uvjetima kultivacije te metodi korištenoj za ekstrakciju (Lauritano i sur., 2016). Ekstrakti svih mikroalgi inhibirali su rast *S. aureus*, a najveća inhibicijska zona zabilježena je za ekstrakt *Tetraselmis* sp. C6 budući da je taj ekstrakt imao i najnižu koncentraciju suhe tvari (6.39±0.01 mg mL^{-1}). Ranija istraživanja pokazala su kako metanolni ekstrakti *Nostoc* spp., *Microcystis* spp., *Scenedesmus* sp., *Oscillatoria geminata* i *Chlorella vulgaris* imaju snažno antimikrono djelovanje na rast *S. aureus* i *B. subtilis*, s izmjerenim inhibicijskim zonama od 16 i 18 mm (Salem i sur., 2014). Ekstrakt *Picochlorum* sp. istaknuo se potpunom inhibicijom rasta *E. faecalis*. Cijanobaterija *Euhalothece* sp. C1 imala je snažno inhibitorno djelovanje na rast *S. aureus* (26.00±1.26 mm) i *S. typhimurium* (17.50±4.95 mm). Uzimajući u obzir dobivene rezultate može se zaključiti kako metanolni ekstrakti karakteriziranih mikroalgi posjeduju antimikrobni potencijal na rast testiranih patogenih bakterija i to posebno Gram pozitivnih.

5.2. Optimizacija uzgoja odabranih sojeva morskih mikroalgi

5.2.1. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

5.2.1.1. Istraživanje utjecaja koncentracije f/2 podloge na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i sastav biomase

Sastav podloge i koncentracije hranjivih tvari od ključne su važnosti za uspješnost i postizanje visoke produktivnosti procesa uzgoja mikroalgi. Stoga je kao prvi korak u optimizaciji uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 istražen utjecaj povećanja koncentracije nutrijenata podloge na rast i produktivnost. Koncentracija svih nutrijenata osim vitamina (makronutrijenti dušik, fosfor, silicij i mikronutrijenti) dodana je u dva, četiri i deset puta većoj količini u odnosu na izvorni sastav f/2 podloge. Na slici 15. prikazana je kultura tijekom uzgoja na podlogama različitih koncentracija. Kontrolna podloga bila je izvorna f/2. Karakterizacija kinetike rasta napravljena je praćenjem promjene optičke gustoće kulture i promjenom broja stanica tijekom vremena, a dobivene krivulje prikazane su na slici 16. Iz krivulja se mogu razaznati pojedine faze rasta, te ovisnost prijelaza jedne faze u drugu. Lag faza prilagodbe kulture na nove uvjete najkraće je trajala kod uzgoja na deset puta koncentriranijoj podlozi, a kultura je ušla u eksponencijalnu fazu rasta već nakon 24 sata. To je za dan kraće u usporedbi s lag fazom prilikom uzgoja na preostalim ispitivanim podlogama gdje je ona trajala do 48 sati. Nakon eksponencijalne i linearne faze rasta, kultura je s iscrpljivanjem nutrijenata te limitacijom svjetlošću i dostupnim CO_2 ušla u stacionarnu fazu rasta ili fazu odumiranja (Lee i sur., 2015). Stacionarna faza može se uočiti na krivuljama rasta na izvornoj i dvostruko koncentriranoj podlozi, a trajala je od 9. do 13. dana uzgoja. Kod uzgoja na četverostruko i deseterostruko koncentriranoj f/2 podlozi, kultura je po izlasku iz eksponencijalne faze rasta naglo ušla u fazu odumiranja koja je rezultirala naglim padom broj stanica i optičke gustoće u svega 24 sata (od 14. do 15. dana). Krivulja promjene koncentracije stanica djelomično prati krivulju promjene optičke gustoće kulture. Naime, ova dijatomeja ima tendenciju rasta u nakupinama, što je otežalo određivanje broja stanica brojanjem u Thoma-ovoj komorici. Iz tog je razloga kultura prije određivanja broja stanica tretirana ultrazvukom kroz 20-ak sekundi kako bi se razbili aglomerati stanica nastali uslijed lučenja ekstracelularnog polisaharidnog matriksa. Najveća koncentracija biomase od 0.47 g L^{-1} postignuta je kod uzgoja na deseterostruko koncentriranoj f/2 podlozi čime je ostvarena i

veća produktivnost procesa (31.33 mg L^{-1} dan^{-1}). Dobivena količina biomase na kraju uzgoja bila je 2.47 puta veća u odnosu na biomasu dobivenu uzgojem na izvornoj f/2 podlozi (0.19 g L^{-1}), dok je ostvarena produktivnost veća za 2.14 puta. Specifična brzina rasta varirala je od 0.32 do 0.37 dan^{-1} s najvećom vrijednosti također zabilježenom kod deseterostruko koncentrirane f/2 podloge. Vrijednosti specifične brzine rasta dobivene za preostale tri istraživane podloge bile su veoma bliske po vrijednosti. Analiza koncentracije nutrijenata preostalih na kraju uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. pokazuje kako su silicij i fosfor najčešće bili limitirajući. Silicij je gotovo u potpunosti utrošen kod uzgoja na izvornoj i dvostruko koncentriranoj f/2 podlozi (98.66% izvorna f/2 podloga i 99.55% 2x f/2), dok ga je u četverostruko (utrošak 95.07%) i deseterostruko koncentriranoj podlozi (88.24% utrošak) preostalo veoma malo. Velik utrošak silicija nije bio neočekivan budući da je on neophodan za formiranje silicijske ljušturice karakteristične za dijatomeje, i time nužan za diobu i rast stanica (Martin-Jézéquel i sur., 2000). Nepotpuni utroška silicija, a i dušika u slučaju deseterostruko koncentrirane podloge može biti uzrokovan limitacijom fosforom koji je bio u potpunosti utrošen. Ono što se iz analize sastava podloge na kraju uzgoja može primijetiti je kako je s dvostruko većom koncentracijom fosfora i silicija u odnos na izvornu f/2 podlogu utrošena i dvostruko veća količina dušika što ukazuje na važnost dobre usklađenosti koncentracija svih triju nutrijenata kako bi se postigao maksimalni utrošak. Utrošak dušika je kod svih ispitivanih koncentracija bio sličan i iznosio je u prosjeku 20%. To upućuje na to da omjeri koncentracija nutrijenata nisu usklađeni sa realnim potrebama ove dijatomeje za rast, te da je potrebna detaljnija optimizacija koncentracije svakog pojedinog nutrijenta kako bi se osigurao maksimalan utrošak. Kod deseterostruko koncentrirane f/2 podloge osim što je preostala najveća količina neutrošenih nutrijenata, tijekom pripreme podloge došlo je do zamućenja uslijed taloženja soli zbog previsoke ukupne koncentracije. Zbog toga je četverostruko koncentrirana podloga odabrana za istraživanje polukontinuiranog načina uzgoja, unatoč nižoj postignutoj koncentraciji biomase i produktivnosti njene sinteze.

Ispitivanje načina vođenja procesa provedeno je uzgojem u staklenom bioreaktoru, opremljenom izvorom svjetlosti (Tween light LED Fiexband, 1200 L m^{-1}, topla bijela svijetlost 3000 K, duljina 10 m) kako bi bio pogodan za fototrofni uzgoj. Kinetika rasta tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata prikazana je na slici 17., a određena je praćenjem promjene koncentracije suhe tvari, te stanica po mL^{-1} i optičke gustoće tijekom vremena. Iz krivulje rasta može se primijetiti izostanak lag faze rasta, koja je izbjegnuta inokulacijom s većom koncentracijom stanica. Kultura korištena kao inokulum uzgojena je u 1 L f/2 podloge

i prije dodatka u bioreaktor biomasa je izdvojena i resuspendirana u 200 mL svježe četverostruko koncentrirane f/2 podloge. Tako pripremljena kultura potom je dodana u fotobioreaktor kao inokulum. Zbog veće početne koncentracije biomase kultura je brzo ušla u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala sve do četvrtog dana uzgoja, nakon čega je sa smanjenjem povećanja broja stanica i optičke gustoće primijećen ulazak u stacionarnu fazu rasta koja je trajala do šestog dana uzgoja. Potom je kultura prihranjena koncentriranom podlogom u kojoj je koncentracija dušika bila četverostruko veće koncentracije nego u izvornoj f/2 podlozi. Dodatkom prihrane započet je polukontinuirani način uzgoja. Koncentracija ostalih nutrijenata odgovarala je onoj u izvornoj f/2 podlozi. Dušik je dodan u suvišku kako bi produžili rast kulture i time postigli veću produktivnost procesa. Posljedično s promjenom koncentracije dušika, dolazi i do promjene u sastavu masnih kiselina. Naime, dok limitacija dušikom preusmjerava metabolizam na nakupljanje zasićenih masnih kiselina za čiju sintezu je potrebno i manje energije, udio visokovrijednih višestruko nezasićenih masnih kiselina u ukupnim masnim kiselinama se povećava s većim koncentracijama dušika. Dodatak dušika kao što je vidljivo iz prethodno provedenog eksperimenta predstavlja pogodne uvjete za rast dijatomeje, ali i potiče na sintezu višestruko nezasićenih masnih kiselina i pogoduje većim udjelima visokovrijednih masnih kiselina kao što su arahidonska i dokosaheksaenoična (ARA, DHA) u ukupnim masnim kiselinama. S dodatkom nutrijenata kultura je ponovno počela rasti, ali je nakon tri dana uzgoja ponovno primijećeno opadanje broja stanica i vrijednosti optičke gustoće. Iz slike 18. koja prikazuje promjenu koncentracije nutrijenata dušika, fosfora i silicija tijekom uzgoja, vidljivo je kako su silicij i fosfor bili u tim trenutcima u potpunosti utrošeni, te je količina dodanog dušika bila u značajnom suvišku. Kako bi se potaknuo daljnji rast kulture, ponovljen je dodatak nutrijenata istog sastava kao i kod prethodne prihrane. Rast kulture nastavio se kroz sljedeća tri dana (11. do 14. dan) nakon čega je kultura ponovno naglo ušla u fazu odumiranja i uzgoj je završen. Promjena koncentracije biomase slijedila je trend promjene koncentracije stanica i optičke gustoće te je bila u skladu s koncentracijom nutrijenata u podlozi. Tako je kroz prvu fazu uzgoja do petog dana, odnosno kraja prve eksponencijalne faze rasta koncentracija biomase porasla s početnih 0.26 g L^{-1} na 0.42 g L^{-1}. Uslijed ulaska u fazu odumiranja, koncentracija biomase se sedmoga dana također smanjila, no početkom polukontinuiranog načina uzgoja koncentracija biomase ponovno pokazuje rast. Desetog dana uzgoja koncentracija biomase bila je 0.93 g L^{-1}, nakon čega je kultura ponovno ušla u fazu odumiranja čime se koncentracija biomase smanjila na 0.77 g L^{-1}. Nakon druge prihrane koncentracija biomase i dalje je bila u opadanju te je konačna vrijednost iznosila 0.43 g L^{-1}. Ovaj negativan trend mogao bi se objasniti limitacijom izvorom

silicija i fosfora. Kako je već spomenuto, silicij je neophodan za diobu stanica, a prihranom nije bio dodan u dovoljnoj količini. Posebice je to vidljivo nakon druge prihrane gdje dodana koncentracija nije bila dovoljna da bi zadovoljila potrebe kulture kako bi se nastavio neometan rast. I silicij i fosfor vrlo su brzo u potpunosti utrošeni, pa ni dušik nije mogao biti utrošen. Unatoč tome što je koncentracija biomase opadala, koncentracija stanica je bila u poratu nakon druge prihrane kroz kraći vremenski period. U literaturi je potvrđeno kako u periodu intenzivne diobe stanica, dolazi do smanjenja njihove veličine čime je posljedično smanjena i njihova masa (Mann i sur., 2017b). Polukontinuirani način uzgoja rezultirao je 1.59 puta većom koncentracijom biomase na kraju procesa od postignute šaržnim uzgojem na četverostruko koncentriranoj f/2 podlozi u tikvicama (0.27 g L^{-1}), te 1.38 puta većom od one na kraju šaržnog uzgoj u fotobioreaktoru (0.31 g L^{-1}). Dobivena produktivnost procesa od 61 mg L^{-1} dan^{-1} je 3.39 puta veća od šaržnog uzgoja u tikvicama na podlozi istog sastava. Tijekom uzgoja također je praćena i promjena makromolekularnog sastava biomase koji je prikazan u tablici 30. Udio proteina nije se značajno mijenjao tijekom uzgoja i kretao se između 22.54 i 29.20%. Udio ugljikohidrata u biomasi bio je mali, te je na kraju uzgoja iznosio svega 4.88%. Udio lipida se tijekom uzgoja značajno promijenio. Budući da je kultura korištena kao inokulum u fazi intenzivnog rasta (sredina eksponencijalne faze), udio lipida na početku šaržnog uzgoja je nizak i iznosio je 3.44%. Udio lipida raste te je do kraja šaržnog uzgoja kada je iznosio 18.40%. Maksimalna vrijednost postignuta je 11. dan uzgoja i iznosila je 24.70%. Ovaj udio određen je prije druge prihrane, kada je rast bio limitiran silicijem i fosforom, te je i koncentracija dušika bila najniža (38.28 mg L^{-1}). Limitacija rasta silicijem utjecala je na smanjenje brzine rasta stanica što je ujedno potaklo i na nakupljanje lipida kao rezervnog materijala. Ono što se da zamijetiti je pad vrijednosti udjela lipida nakon druge prihrane (od 11. do 16. dana) s maksimalne vrijednosti na 13.27% što je posljedica dodatka nutrijenata i ponovnog ulaska stanica u fazu rasta. Kako su se nutrijenti do kraja uzgoja ponovno trošili, te su ponovno uspostavljeni uvjeti limitacije silicijem i fosforom, udio lipida ponovno je porastao do konačnih 22.73%. Sadržaj pepela u biomasi na kraju uzgoja iznosio je 44.1%. Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima prikazan je u tablici 31. Taj profil odgovara karakterističnom profilu masnih kiselina dijatomeja (Zulu i sur., 2018). Pa su tako najzastupljenije masne kiseline bile: palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1 cis 9), miristinska (C14:0) i eikosapentaenoična masna kiselina (EPA; C20:5 cis 5, 8, 11, 14, 17). Sastav masnih kiselina nije se značajno mijenjao tijekom uzgoja, ali se mijenjao udio pojedinih masnih kiselina te time i udjel zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Najzamjetniji je pad udjela zasićenih masnih kiselina sa 45.70% na 34.71% te značajan porast

udjela jednostruko nezasićenih masnih kiselina s početnih 29.69% na konačnih 54.13%. Literaturni podatci također potvrđuju kako dostatne količine hranjivih tvari u podlozi za rast pogoduju sintezi jednostruko nezasićenih masnih kiselina, dok je udio višestruko nezasićenih niži u takvim uvjetima (Klein Breteler i sur., 2005). Time je i trend promjene jednostrukih i višestruko nezasićenih masnih kiselina tijekom uzgoja u skladu s literaturom. Na kraju šaržnog dijela uzgoja uz limitaciju silicijem i fosforom, udio višestruko nezasićenih masnih kiselina opao je s početnih 24.61% na 15.77%, a početkom prihranjivanja i povećanjem koncentracije nutrijenata taj udio je ponovno porastao na 20.99%, a nakon druge prihrane taj udio je još više porastao na 31.85%. U posljednjim danima uzgoja nastupili su ponovno uvjeti limitacije silicijem i fosforom te se udio smanjio na konačnih 11.17%, dok je udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina porastao s 35.75% na konačnih 54.13%. Promjena udjela jednostruko nezasićenih masnih kiselina povezana je s promjenom najzastupljenije palmitoleinske masne kiseline čiji udio se s početnih 18.92% povećao na 47.71% na kraju uzgoja. Osim toga može se primijetiti da je udio visokovrijedne eikosapentaenoične masne kiseline imao tendenciju rasta u uvjetima limitacije te je na kraju uzgoja iznosio 7.98%.

5.2.1.2. Utjecaj koncentracije dušika, fosfora i silicija na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i sastav biomase

Kao što je bilo vidljivo iz rezultata dobivenih u prethodnom eksperimentu koncentracija glavnih makro nutrijenata f/2 podloge nisu međusobno usklađene. To je bilo vidljivo iz potpunog utroška jednog od nutrijenata, najčešće silicija ili fosfora, te količine neutrošenog dušika. Osim toga jedan od ciljeva je i definirati kako limitacija ili suvišak pojedinog nutrijenta utječe na sastav biomase s naglaskom na sastav lipida i njihov udio u biomasi. To bi ujedno omogućilo i bolju kontrolu samoga procesa i usmjeravanje ugljika u metabolizmu stanica ka nakupljanju željenog proizvoda. Iz tog razloga je kao sljedeći korak optimizacije napravljeno ispitivanje utjecaja koncentracije svakog pojedinog makro nutrijenta na rast i sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5.

Glavni makro nutrijenti nužni za rast dijatomeja su dušik, fosfor i silicij (Yang i sur., 2014). Koncentracija jednog od tri ispitivana nutrijenta je bila promijenjena, dok je koncentracija preostala dva nutrijenta bila konstantna i jednaka onoj u izvornoj f/2 podlozi. Rast dijatomeje opet je praćen promjenom optičke gustoće kulture i promjene broja stanica po mL (poglavlje 3.5.1. i 3.5.2.). Krivulje rasta pri različitim koncentracijama izvora dušika

prikazane su na slici 19, pri različitim koncentracijama silicija na slici 20 i pri različitim koncentracijama fosfora na slici 21. Sve krivulje rasta bile su u skladu sa karakterističnim oblikom krivulje rasta jednostaničnih mikroorganizama. Korelacija rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i koncentracije nutrijenta (dušik, fosfor ili silicij) slijedila je takozvani Shelford-ov zakon tolerancije (Yang i sur., 2014). Prema navedenom zakonu, svaki pojedini nutrijent unutar određenog koncentracijskog raspona ima pozitivan efekt na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5. Koncentracije niže od tog raspona ograničavaju rast, dok više koncentracije inhibiraju rast dijatomeje. Ono što se može primijetiti iz tablice 32 je postepeni rast i koncentracije suhe tvari i koncentracije stanica, do određene točke odnosno do određene koncentracije ispitivanog nutrijenta, te potom pad tih vrijednosti s daljnjim povećanjem koncentracije. Maksimalne vrijednosti koncentracije suhe tvari i stanica kod ispitivanja različitih koncentracija postignute su za koncentracije dušika 2 i 3.5 mM, za koncentracije silicija 0.5 i 1 mM, a za fosfora kod koncentracije od 0.036 mM. Pronađene optimalne koncentracije dušika bile su više nego je to zabilježeno u literaturi za sojeve mikroalgi *Navicula* i *Nitzschia* sp. (Yang i sur., 2014). Koncentracija stanica po mL varirala je između ispitivanih koncentracija dušika sa statistički značajnom razlikom, a kretala se između 1.61±0.19 do 3.40±0.32 $\times 10^6$ st mL^{-1} ($p<0.05$). Gledajući promjenu koncentracije suhe tvari s promjenom koncentracije dušika, nije bilo značajnih promjena te je maksimalna vrijednost od 0.24±0.01 g L^{-1} postignuta kod 2 mM svega nešto veća od one koncentracije dobivene uzgojem na f/2 podlozi izvornog sastava (0.88 mM). Kod najviše ispitane koncentracije dušika od 8 mM zabilježena je gotovo u pola manja koncentracija biomase, svega 0.13 g L^{-1}. Ovakvi rezultati u skladu su sa rezultatima objavljenima u sličnim radovima (Cointet i sur., 2021; El-Kassas, 2013; Moll i sur., 2014; Yodsuwan i sur., 2017; Zarrinmehr i sur., 2020). Tako je primjerice zabilježen pad koncentracije stanica mikroalge *Isochrysis galbana* sa porastom koncentracije dušika sa 144 mg L^{-1} na 288 mg L^{-1} (Zarrinmehr i sur., 2020). Slično su zabilježili Girija i suradnici za mikroalgu *Chaetoceros simplex* gdje je s porastom koncentracije dušika i fosfora rast opadao (Girija i sur., 2014). No, u nekim radovima zabilježeno je kako je pri višim koncentracijama dušika, prirast biomase *Tetraselmis suecica* bio veći kada se kultura propuhivala s CO_2 (Fabregas i sur., 1984). Upravo to upućuje kako je nepotpuni utrošak dušika rezultat limitacije drugim nutrijentima kao npr. ugljikom, fosforom, te silicijem u slučaju dijatomeja, ali i drugih faktora kao što je izvorom svijetlosti. Kao negativna kontrola korištena je podloga bez dodanog izvora dušika i tu je rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 bio jako usporen te su postignute najmanje vrijednosti svih pokazatelja uspješnosti bioprocesa. Slično je zabilježeno i za *Isochrysis galbana* i *Picochlorum* sp. pri 0 g L^{-1} natrijevog nitrata

(El-Kassas, 2013; Zarrinmehr i sur., 2020). Dušik dodan s otopinom vitamina, dušik prisutan u anorganskim solima korištenim za pripravu umjetne morske vode te dušik oslobođen razgradnjom dušikom bogatih molekula unutar mikroalgalne biomase (npr. klorofil) mogli su poduprijeti rast u uvjetima kada nije dodan izvor dušika (El-Kassas, 2013; Valenzuela i sur., 2012; Yodsuwan i sur., 2017). Najmanji rat zabilježen je na podlozi u koju nije dodan izvor silicija. Da bi se ispitali uvjeti limitacije silicijem na rast, uz staklene korištene su i plastične Erlenmeyer tikvice kako bi se isključio utjecaj silicija koji se otapa iz borosilikatnog stakla u podlogu za uzgoj. A taj jedva zamjetni rast zabilježen u ovim uvjetima može se pripisati siliciju koji je dodan s morskom vodom za pripremu podloge i/ ili intracelularnim zalihama silicija. Ostale istražene koncentracije silicija bile su u rasponu od 0 do maksimalno 2 mM, zbog niske topivosti monosilicijeve kiseline u morskoj vodi od 1.5 do 1.7 mM pri 25°C i pH 8.8. Za razliku od dušika, analiza varijance pokazala je da siliciji ima značajan utjecaj na koncentraciju i biomase i stanica, a ujedno je između tri nutrijenta utjecaj silicija bio najznačajniji. To potvrđuje i literatura u kojoj se navodi silicij kao glavni limitirajući čimbenik rasta dijatomeja (Baines i sur., 2011; Tantanasarit i sur., 2013). Slične rezultate zabilježili su također i Li i suradnici koji su utvrdili kako je koncentracija silicija imala najveći utjecaj na rast dijatomeja od četiri istraživana nutrijenta (dušik, fosfor, željezo i silicij). Najviša koncentracija stanica od $4.39\pm0.43\times10^{6}$ stanica mL^{-1} postignuta je kod koncentracije silicija od 0.5 mM, a kod koncentracije od 1 mM najveća koncentracija suhe tvari biomase od 0.49 ± 0.09 g L^{-1}. S time su i najveće vrijednosti produktivnosti sinteze biomase postignute upravo kod ove dvije koncentracije, a najviša je bila za 1 mM silicija i iznosila je 37.61 ± 2.92 mg L^{-1} dan^{-1}. Osim toga produktivnosti postignute kod ove dvije koncentracije silicija bile su ujedno i najviše vrijednosti zabilježene među svim istraživanim nutrijentima za čitavo područje koncentracija. Dobivene vrijednosti su u nekim slučajevima više ili niže od onih literaturnih. Tako je dobivena najveća koncentracija biomase veća od one zabilježene u radu Moll i suradnika za dijatomeju RGd-1 pri istoj koncentraciji silicija (0.32 g L^{-1} pri 1 mM Si). No, vrijednosti koje su dobili pri višim koncentracijama silicija od 2.0 i 2.5 mM u istome radu bile su veće nego one zabilježene za iste koncentracije u ovome radu gdje povećanjem koncentracije silicija iznad 1 mM je primijećen značajan pad koncentracije biomase. Tako je pri najvišoj ispitanoj koncentraciji silicija od 2 mM zabilježena koncentracija suhe tvari od 0.27 ± 0.02 g L^{-1} i stanica od $2.41\pm0.14\times10^{6}$ st mL^{-1}. Tijekom sterilizacije podloge u autoklavu silicij u podlozi formira polimernu strukturu te se smanjuje količina biološki dostupnog otopljenog silicija. Ukoliko je brzina potrošnje monomernih i dimernih oblika silicija veća od brzine kojom se oni oslobađaju iz nastalih polimera, brzina

rasta će posljedično biti niža te time i postignute koncentracije biomase i stanica (Moll i sur., 2014). To bi mogao biti i razlog nižih vrijednosti zabilježenih kod koncentracija silicija od 1.5 i 2 mM. Osim tog neki literaturni podatci navode kako visoke koncentracije silicija mogu imati i inhibicijski učinak na rast dijatomeja (Alverson, 2007).

Ispitane su i tri koncentracije fosfora od 0.036, 0.15 i 0.36 mM, uz negativnu kontrolu bez dodatka izvora fosfora. Koncentracija stanica nije značajno varirala između tri ispitane koncentracije, no ta razlika je značajna kada se usporedi s rezultatima dobivenim na podlozi s 0 mM fosfora. Najveća koncentracija stanica zabilježena je kod koncentracije od 0.15 mM i iznosila je $3.50 \pm 0.34 \times 10^6$ st mL^{-1}, dok je najviša koncentracija suhe tvari biomase postignuta na podlozi s koncentracijom fosfora od 0.036 mM što odgovara koncentraciji u f/2 mediju izvornog sastava (0.34 ± 0.06 g L^{-1}). Dobivene vrijednosti slične su onima zabilježenim za *C. mulleri* dobivenim pri koncentraciji fosfora od 0.144 mM, gdje je koncentracija stanica iznosila 3.42×10^6 st mL^{-1} , a koncentracija biomase 248.07 mg L^{-1} (Lovio-Fragoso i sur., 2019). Iako efekt suviška fosfora u mediju za rast nije toliko istražen kao utjecaj limitacije, dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podatcima iz sličnih istraživanja (Lopes i sur., 2019; Lovio-Fragoso i sur., 2019; Yongmanitchai i Ward, 1991). Tako u radu Yongmanitchai i suradnika nije zabilježena značajna promjena koncentracije biomase *P. tricornutum* s povećanjem koncentracije fosfora s 2.5 puta na 5 puta veću koncentraciju od izvorne Mann Myers podloge (Yongmanitchai i Ward, 1991). Slično su zabilježili i Lopes i suradnici također za *P. tricornutum* gdje povećanje koncentracije fosfora s 1.5 na 3 puta veću od koncentracije u f/2 podlozi nije došlo do značajnog porasta u koncentraciji biomase (Lopes i sur., 2019). Za razliku od koncentracije stanica, suha tvar biomase se s promjenom koncentracije fosfora statistički značajno mijenjala. Tako je s porastom koncentracije fosfora, koncentracija suhe tvari biomase opadala. Sličan trend zabilježen je i u radu Lovio-Fragoso i suradnika gdje su također dobili veću koncentraciju biomase u kontrolnoj podlozi u odnosu na onu s dvostruko većom koncentracijom fosfora i statistički značajnom razlikom u koncentraciji stanica između ispitivanih uvjeta (Lovio-Fragoso i sur., 2019). Roopnarain i suradnici su pak pokazali da povećanje koncentracije fosfora za 25% od one u f/2 podlozi ne rezultira većom brzinom eksponencijalnog rasta i ne pogoduje rastu dijatomeje *Isochrysis galbana* (Roopnarain i sur., 2014). Literatura navodi također kako je asimilacija fosfora značajno manja nego za dušik te da se fosfor čak može smatrati i manje zastupljenom komponentom stanica morskih fitoplanktona (Tantanasarit i sur., 2013). No ipak, fosfor je nužan za rast fitoplanktona budući da je sastavna komponenta nukleinskih kiselina, protein,

membranskih lipida i moelkula za transport energije (ATP) u procesu fotosinteze i respiracije. Iako potreban u manjoj količini u odnosu na druga dva ispitivana makronutrijenta, fosfor je nužan za rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 što je vidljivo kroz smanjen rast u podlozi koja nije sadržavala izvor fosfora. Koncentracija suhe tvari od 0.101 g L^{-1} slična je onoj zabilježenoj kod limitacije izvorom dušika i silicija, dok je koncentracija stanica bila nešto veća i iznosila 1.35×10^{6} stanica po mL. Rast u uvjetima limitacije izvorom dušika najvjerojatnije je bio moguć zbog intracelularnih zaliha fosfora kako se navodi u literaturi (Lopes i sur., 2019; Roopnarain i sur., 2014). Nakupljanje zaliha fosfora (eng. luxurios uptake) odgovor je mikroalgalnih stanica na promjenjive okolišne uvjete i omogućava im da nastave rast u uvjetima bez prisustva ovog elementa u njihovom okolišu. No ovaj uskladišteni fosfora ne rezultira i značajno većom količinom biomase. Specifična brzina rasta svih istraživanih nutrijenata i njihovih koncentracija bila je u rasponu od 0.10 do 0.35 dan^{-1} što je usporedivo s literaturnim navodima (Lopes i sur., 2019; Lovio-Fragoso i sur., 2019; Sahin i sur., 2019; F. Yang i sur., 2014; Zarrinmehr i sur., 2020). Najmanja i zanemariva brzina rasta od 0.04 dan^{-1} zabilježena je prilikom uzgoja na podlozi bez izvora silicija u plastičnim Erlenmeyer tikvicama. Taj slabi rast i biokemijski odgovor kulture u početnim danima uzgoja na podlogama uz limitaciju izvorom silicija i fosfora moguć je najvjerojatnije upravo zbog intracelularnih zaliha silicija i fosfora (Fred Millie, 1984; Tantanasarit i sur., 2013). Što se tiče produktivnosti sinteze biomase, najniže vrijednosti su također dobivene kod uzgoja uz limitaciju pojedinim nutrijentom, s najmanjom zabilježenom kod upotrebe plastičnih Erlenmeyer tikvica i podloge bez izvora silicija.

5.2.1.3. Efekt koncentracije dušika, fofora i silicija na sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Mijenjanjem okolišnih uvjeta u svrhu usmjeravanja izvora ugljika u staničnom metabolizmu radnog mikroorganizma za nakupljanje željenog proizvoda često je korištena strategija u biotehnologiji (Arora i sur., 2016; Botte i sur., 2018; Jeffryes i sur., 2013; Picardo i sur., 2013; Roessler, 1988; Yang i sur., 2014). Iz tog razlog, kako bi se utvrdilo kako svaki pojedini nutrijent utječe na metabolizam dijatoemje *Nitzschia* sp. S5 uz kinetiku rasta praćena je i promjena sastava biomase. Jedna od najčešće korištenih strategija uvođenje je limitacije jednim ili više nutrijenata kako bi se stanice mikroorganizma potaklo na nakupljanje rezervnog materijala što su najčešće ugljikohidrati i/ ili lipidi. U tablici 33 prikazan je sastav biomase za svaki ispitivani uvjet uzgoja. Pa se tako lako može primijetiti kako je sadržaj

ugljikohidrata i lipida bio najveći uz limitaciju nekim od istraživanih nutrijenata. Najveći utjecaj na sadržaj ugljikohidrata prema prikazanim rezultatima imala je limitacija dušikom pa je tako kod 0 mM N-NO_3 zabilježen udio ugljikohidrata od 18.69%. Dok se udio ugljikohidrata u biomasi uzgojenoj na f/2 podlozi izvornog sastava kretao između 8.28 i 10.58%. Limitacija izvorom silicija i fosfora također je dovela do nakupljanja ugljikohidrata pa su tako zabilježene vrijednosti od 16.81% (0 mM Si) i 12.64% (PO_4^{3-}). Vrijednosti koncentracija slične su vrijednostima navedenim u literaturi za dijatomeju *Navicula incerta* uzgojenoj na podlozi sa smanjenom koncentracijom dušika (šesnaestina koncentracije dušika u izvornoj f/2 podlozi; N/16) i silicija (osmina koncentracije silicija u izvornoj f/2 podlozi; Si/8). Udjel ugljikohidrata u navedenim uvjetima iznosio je 23.31% i 19.9% (Encinas-Arzate i sur., 2020). Slične vrijednosti zabilježene su u *Nitzschia inconspicua* gdje je udio ugljikohidrata varirao između 3 i 14% (Chu i sur., 1996). Postignuti su i veći udjeli ugljikohidrata uz limitaciju dušikom, ali u takvim uzgojima potrebno je osigurati veću koncentraciju ugljika i to kroz kontinuiranu aeraciju s zrakom obogaćenim s CO_2. Takav slučaj je zabilježen kod mikroalge *Isochrysis galbana* u radu Zarrinmehr i suradnika gdje je kombinacijom limitacije izvorom dušika i dodatkom CO_2 (0.04%) postignut udio ugljikohidrata od 47.0% (Zarrinmehr i sur., 2020). Chu i suradnici su također primijetili kako stanice koje su uzgajane uz dodatak ugljika i limitaciju dušikom sadrže dvostruko veću količinu ugljikohidrata u usporedbi s kontrolo. U istom je radu primijećeno kako se za razliku od ugljikohidrata čiji se udjel smanjivao s porastom koncentracije $NaNO_3$, udio lipida nije značajno mijenjao s promjenom koncentracije dušika (Chu i sur., 1996). Kod dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 iz ovoga rada, udio lipida se sa statistički značajnom razlikom mijenjao s promjenom koncentracije dušika. Limitacija izvorom dušika imala je pozitivan utjecaj na udio lipida, pa je tako maksimalna koncentracija zabilježena kod 0 mM N-NO_3 i iznosila je 14.82±1.84%. U mnogim radovima navodi se kako je upravo koncentracija dušika ključna za nakupljanja lipida u stanicama (Arora i sur., 2016; Fields i sur., 2014; Gao i sur., 2013; Sibi i sur., 2016; Singh i sur., 2015; Zhu i sur., 2015). No, kod dijatomeje istraživane u ovome radu, nešto veći udio lipida zabilježen je kod limitacije fosforom gdje je iznosio 18.83±4.69%, dok utjecaj limitacije silicijem nije pokazao pozitivan efekt na sam udio lipida. Suprotno je to rezultatima u nekim radovima gdje je upravo limitacija silicijem imala izraženiji utjecaj na sadržaj (Adams i Bugbee, 2014; Jeffryes i sur., 2013; Moll i sur., 2014). No, udio lipida se mijenjao ovisno o koncentraciji silicija sa statistički značajnom promjenom, pa je tako udio lipida varirao od 1.41±0.15% do 13.95±1.53%. Naime, povećanje koncentracije silicija pokazalo je snažan negativan utjecaj na sadržaj lipida u stanicama ove dijatomeje. Pa je tako

najniža vrijednost u svim ispitivanim koncentracijama svih nutrijenata zabilježena upravo kod najviše ispitivane koncentracije silicija od 2 mM i iznosila je 1.41±0.15%. Utjecaj viška silicija na proizvodnju lipida u dijatomejama nije toliko istražen kao utjecaj limitacije, ali je potvrđeno kako u uvjetima povoljnim za rast dijatomeje proizvode male količine neutralnih lipida i to uglavnom triacilglicerola (TAG) (Sabu i sur., 2017; Valenzuela i sur., 2012). No, literatura navodi i kako stanice dijatomeja izgladnjele silicijem s ponovnom dostupnošću silicija ga najčešće usmjeravaju u sintezu lipida, dok je sinteza ugljikohidrata manje zastupljena. Razlog niskog udjela lipida kod uzgoja uz limitaciju izvorom silicija, ali preostala dva nutrijenta može biti uslijed limitacije izvorom ugljika budući da su kulture bile propuhivane zrakom u kojem je udjel CO_2 vrlo nizak (0.03 %). Ono što se i iz literaturnih rezultata može zaključiti kako je utjecaj nutrijenata ovisan i o soju mikroalge budući da su za različite sojeve zabilježeni poprilično različiti, i u nekim slučajevima kontradiktorni rezultati. U radu Lin i suradnika kod dijatomeje *Thalassiosira weissflogii* najjači utjecaj na sadržaj lipida imala je upravo limitacija fosforom dok to nije bio slučaj za dijatomeju *Chaetocheros mulleri* gdje je limitacija dušikom imala pozitivan utjecaj na nakupljanje lipida. Također je za obje mikroalge zabilježeno kako je koncentracija silicija imala najmanji utjecaj na udio ukupnih lipida u biomasi (Lin i sur., 2018). Suprotno rezultatima ovoga rada, za mikroalge *Navicula* sp. i *Amphora* sp. porast udjela lipida bio je potaknut upravo limitacijom izvorom silicija (Thajuddin i sur., 2015).

Vrijednosti udjela ukupnih lipida u dijatomeji *Nitzschia* sp. S5 u skladu su sa vrijednostima zabilježenim u literaturi za isti soj, a i profil masnih kiselina bio je karakterističan za dijatomeje. Najzastupljenije masne kiseline bile su palmitinska (C16:0) i palmitoleinska (C16:1 cis 9) kao što je vidljivo iz tablica 34, 35 i 36. Najveći udio činila je pamitoleinska kiselina s najnižim udjelom od 52.33±0.23% zabilježenim kod koncentracije $N\text{-}NO_3$ od 6 mM i najvećih udjelom od 66.75±4.78% kod 2 mM Si. Upravo zbog tako velikog udjela palmitoleinske kiseline i udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina bio je iznad 50% u ukupnim lipidima kod svih ispitivanih uvjeta za sva tri nutrijenta. No, kada se gleda promjena jednostruko nezasićenih masnih kiselina u odnosu na promjenu koncentracije pojedinog nutrijenta, može se primijetiti da je njihov udio rastao s povećanjem koncentracije Si i PO_4^{3-}, dok je smanjenje udjela zabilježeno kod porasta koncentracije $N\text{-}NO_3$. Sličan trend zabilježen je u literaturi gdje je sa porastom koncentracije izvora dušika zabilježeno smanjenje udjela jednostruko nezasićenih i zasićenih masnih kiselina (Qiao i sur., 2016; Sahin i sur., 2019). Miristinska kiselina je uz palmitinsku bila najzastupljenija u skupini zasićenih

masnih kiselina, dok je najzastupljenija nezasićena masna kiselina bila eikosapentaenoična (EPA; C20:5 cis 5, 8, 11, 14, 17). Statistička analiza pokazala je kako sadržaj višestruko nezasićenih masnih kiselina nije značajno varirao u ovisnosti o nutrijentu i njegovoj koncentraciji. Blago povećanje udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina u ukupnim masnim kiselinama može se primijetiti kod limitacije fosforom i silicijem. U radu Lin i suradnika također je zabilježen negativni utjecaj limitacije dušikom na sadržaj višestruko nezasićenih masnih kiselina, a pozitivan efekt limitacije silicijem i fosforom (Lin i sur., 2018). Porast udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina zabilježen je i kod većih koncentracija dušika. Tako je i ovome radu najveći udio od 3.51±0.44 % zamijećen kod koncentracije dušika od 8 mM što je ujedno i najveći udio između svih ispitivanih uvjeta. Dijatomeje su također karakteristične po visokom sadržaju vrlo dugih višestruko nezasićenih masnih kiselina kao što su EPA i ARA (arahidonska kiselina; C20:4 n-6) (Chen i sur., 2007; Tachihana i sur., 2020; Zulu i sur., 2018). Veće koncentracije dušika pogodovale su sintezi eikosapentaenoične kiseline pa je tako najviša vrijednost od 3.19±0.66 i 3.51±0.44% postignuta kod 6 i 8 mM. Limitacija fosforom i silicijem imala je pozitivan učinak na sintezu EPA, pa je tako uzgoj na 0 mM rezultirao najvećim udjelom EPA i iznosio je 3.71±0.43%. Kod uzgoja uz različite koncentracije silicija dobiveni su značajno manji udjeli eikosapentaenoične kiseline s najmanjom vrijednosti od 0.37±0.37% kod 2 mM. Limitacija silicijem rezultirala je udjelom od 1.45±0.90%. Literatura potvrđuje kako limitacija nutrijentima može rezultirati višim udjelima EPA i DHA u ukupnim lipidima mikroalgi (Li i sur., 2007; Mortensen i Gislerød, 2016; Vitova i sur., 2014). Feng i suradnici, te Kaye i suradnici istraživali su utjecaj različitih koncentracija dušika na enzime uključene u biosintetski put dugolančanih višestruko nezasićenih masnih kiselina. Rezultati su pokazali kako udio nezasićenih masnih kiselina, posebice višestruko nezasićenih masnih kiselina raste s dodatkom nutrijenata te da je ekspresija enzima uključenih u biosintezu dugolančanih masnih kiselina regulirana potrošnjom dušika (Feng i sur., 2011; Kaye i sur., 2015).

Sadržaj proteina u biomasi dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 varirala je do 26.6% do 64.10% između ispitivanih uvjeta (tablica 33). Promjena sadržaja na proteinima u ovisnosti o promjeni koncentracije nutrijenata bila je u skladu s literaturnim navodima. Dušik je esencijalan za sintezu vitalnih makromolekula kao što su aminokiseline, nukleinske kiseline i klorofil te nezamjenjiv element u sintezi proteina (Millie, 1984). U nedostatku izvora dušika, u stanicama mikroalgi usporava se sinteza proteina, a metabolizam ugljika se potom usmjerava sa sinteze proteina prema sintezi ugljikohidrata i/ili lipida (Gao i sur., 2019). Pa su tako i

rezultati dobiveni u ovome radu u skladu s literaturnim navodima. Među svim istraživanim koncentracijama sva tri nutrijenta, najmanji udio proteina od 26.60±8.04% zabilježen je u uvjetima limitacije dušikom odnosno za koncentraciju N-NO_3 od 0 mM. Povećanje koncentracije dušika imalo je pozitivan efekt na sadržaj proteina koji je do 3.5 mM porastao na 49.93±6.13%, a s daljnjim povećanjem koncentracije dušika do 8 mM taj udio proteina nije se značajnije povećao te je iznosio 50.41±0.18%. Limitacija s dva druga nutrijenta nije pokazala značajan učinak na sintezu i sadržaj proteina. Promjenom koncentracije silicija udio proteina kretao od 40.15±1.37% i 50.95±2.59% uz iznimku kod 1 mM Si gdje je zabilježena nešto niža vrijednost od 38.75±3.18%. Uvjeti limitacije fosforom ne dovode do inhibicije sinteze proteina pogotovo ako je dušik dostupan, barem u prvoj, inicijalnoj fazi uzgoja (Fred Millie, 1984; Lopes i sur., 2019; Roopnarain i sur., 2014). Sinteza proteina dodatno je poduprta intracelularnim citoplazmatskim zalihama Si i P koji se u nedostatku ovih makronutrijenata u podlozi koriste za sintezu staničnih makromolekula (Fred Millie, 1984; Lopes i sur., 2019; Roopnarain i sur., 2014). Najveći udijeli proteina u biomasi mikroalge *Nitzschia* sp. S5 bili su kod većih koncentracija fosfora, a najveća vrijednost iznosila je 64.10±1.08 % (0.36 mM P-PO_4). Ukupni klorofil određen je spektrofotometrijskom metodom opisanom u poglavlju 3.5.14. Najveće vrijednosti udjela klorofila postignute su kod koncentracije fosfora iznad 0.15 mM dok silicij nije pokazao značajan utjecaj. Koncentracija dušika koji je strukturni element u molekuli klorofila ima značajan utjecaj na fotosintetski sustav. Tako uvjeti limitacije dušikom mogu dovesti do nedostatka klorofila što može dovesti do smanjene adsorpcije svjetlosti i učinkovitosti fotosustava II što rezultira nižom fotosintetskom aktivnosti mikroalgalnih stanica (Lovio-Fragoso i sur., 2021; Singh i sur., 2015; Zarrinmehr i sur., 2020). Kod limitacije fosforom i silicijem takav negativan učinak na sadržaj klorofila nije zamijećen. Blagi pad na sadržaju od 3.61 na 2.31% može se zamijetiti sa smanjenjem koncentracije fosfora s 0.36 na 0 mM. Ovaj pad može se pripisati nemogućnosti stanica da proizvodi ATP i NADPH u uvjetima bez dodatka izvora fosfora koji je važan za sintezu klorofila, ili da ga pak sintetiziraju u manjoj mjeri iz intracelularnih zaliha (Roopnarain i sur., 2014).

5.2.1.4. Utjecaj omjera koncentracija dušik, fosfora i silicija na rast i biokemijski sastav dijateomeje *Nitzschia* sp. S5

Prethodno dobiveni rezultati pokazali su kako je rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i njen biokemijski sastav uvelike ovisni o sva tri istraživana nutrijenta (dušika, fosfora i silicija) te o njihovim koncentracijama. Istraživanje utjecaja koncentrirane f/2 podloge pokazali su kako omjer nutrijenata u podlozi nije optimiran s obzirom na potrebe same mikroalge. Ispitivanje utjecaja svakog pojedinog nutrijenata zasebno, dao je vrijedne informacije o njegovom utjecaju na rast i sastav biomase, ali ovaj pristup nije uzeo u obzir međudjelovanje između samih nutrijenata kao i činjenicu da je iskorištenje jednog nutrijenta ovisno o prisutnosti drugih nutrijenata i njihovih koncentracija. Stoga je kao slijedeći korak optimizacije hranjive podloge kroz primjenu šest različitih omjera nutrijenata ispitan zajednički utjecaj dušika, silicija i fosfora na rast i biokemijski sastav biomase. Pri tome je f/2 podloga u izvornom sastavu korištena kao kontrolna podloga. Kinetika rasta praćena je kako je opisano u poglavlju 3.5.1 i 3.5.3. te su vrijednosti prikazane grafički na slici 22. Na grafu je prikazan rast na ispitivanom omjeru u odnosu na kontrolnu podlogu. Sve krivulje rasta imaju oblik karakterističan za rast jednostaničnih mikroorganizama započinjući lag fazom na koju se nastavlja eksponencijalna te potom linearna faza rasta koja je trajala od 8 do 14 dana ovisno o sastavu podloge. Kultivacija je trajala sve do opažanja pada broja stanica i optičke gustoće nakon čega je uzgoj zaustavljen. Sve istražene podloge rezultirale su višom koncentracijom stanica te koncentracijom suhe tvari biomase u odnosu na kontrolnu podlogu. Koncentracija suhe tvari biomase kretala se između 0.51±0.06 i 0.73±0.07 g L^{-1} te je razlika u koncentraciji kao i produktivnosti između istraživanih uvjeta bila statistički značajna. Kao i kod ispitivanja različitih koncentracija svakog pojedinog nutrijenta i kod ispitivanja utjecaja njihovih omjera rezultati su bili u skladu s Shelfordovim zakonom. Pa je tako s povećanjem koncentracija sva tri nutrijenta rasla i koncentracija biomase i produktivnost do maksimalnih vrijednosti postignutih kod omjera 3 nakon čega je uočen pad. Maksimalna koncentracija biomase od 0.73 g L^{-1} postignuta kod omjera 3 bila je 2.64 puta veća (62.07%) u odnosu na kontrolnu podlogu. Pri ovim uvjetima ostvarena je i najveća produktivnost sinteze biomase od 52.04±2.52 mg L^{-1} dan $^{-1}$. Specifična brzina rasta rasla je s porastom koncentracija odnosno njihovog omjera pa je tako kod omjera 6 ostvarena maksimalna od 0.29±0.07 dan^{-1}. No, budući da je eksponencijalni rast trajao 2 dana kod ovog omjera postignuta je niža koncentracija biomase od 0.51±0.11 g L^{-1} što je ista

vrijednost zabilježena kod omjera 1 gdje su bile potrebne značajno niže količine nutrijenata. U literaturi se može pronaći podataka kako dijatomeje zahtijevaju ekvimolarne količine silicija i dušika (Flynn i Martin-Jézéquel, 2000). Optimalan omjer dušika i fosfora za rast fitoplanktona često se procjenjuje prema Redfield-ovom pravilu (16 mola N: 1 mol P) (Leonardos i Geider, 2004). Podloga s omjerom tri sadržavala je nutrijente u molarnom odnosu od Si: $N\text{-}NO_3^{-:}$ PO_4^{3-} = 6.67: 23.33: 1 [mM:mM:mM] što nije u skladu sa navedenim omjerima u literaturi. No, podatci o optimalnim koncentracijama koji se mogu pronaći u literaturi također pokazuju kako je optimalna koncentracija drugačija za svaku pojedinu mikroalgalnu vrstu (Kumaran i sur., 2017; Yang i sur., 2014). To je potvrdio rad Yang i suradnika u kojem su ispitali pet različitih omjera koncentracije nutrijenata na različite vrste iz roda *Navicula* i *Nitzschia* pri čemu su dobivene različite vrijednosti za svaku ispitivanu vrstu unatoč pripadnosti istome rodu (Yang i sur., 2014). Upravo to ukazuje na potrebu da se za svaku mikroalgalnu vrstu posebno odredi koncentracija nutrijenata u podlozi. Potrošnja silicija i fosfata je kod svih ispitivanih omjera bila iznad 90%. Kod omjera 2, 3 i 4 utrošak silicija je bio gotovo potpun (99%) pri čemu je utrošeno 96% i 98% fosfata. Potrošnja dušika odnosno nitrata najviše je varirala između ispitanih omjera gdje je najmanji utrošak bio kod f/2 podloge izvornog sastava, a kod omjera 3 utrošeno je 90% dodanog $N\text{-}NO_3^-$. Veća količina fosfora kod omjera 5 i 6 nije rezultirala većim utroškom dušika ili silicija. No s povećanjem koncentracije silicija s 0.5 na 1 mM utrošak dušika bio je veći. Uspoređujući omjer 3 i 4, manji utrošak dušika kod omjera 4 najvjerojatnije je rezultat limitacije silicijem i fosforom. Najefikasniji utrošak sva tri nutrijenta ostvaren je kod omjera 3. Veća koncentracija nutrijenata imala je pozitivan utjecaj na sintezu biomase, ali je pri tome zamijećen i snažan negativan učinak na udio lipida i produktivnost sinteze lipida. Tako je od kontrolne podloge do podloge s omjerom 6 udio lipida opao sa 7.76±0.32% na svega 1.99±0.10%. Omjer 3 koji se pokazao optimalnim za sintezu biomase također je rezultirao 3.1 puta nižim udjelom lipida (2.48±0.19%) u usporedbi s kontrolom. Pri tome se profil masnih kiselina nije mijenjao po svom sastavu kod različitih omjera koncentracije nutrijenata te je bio u skladu s profilom karakterističnim za dijatomeje. I ovdje je primijećen porast koncentracije eikosapentaenoične kiseline u nutrijentima bogatijoj hranjivoj podlozi što potvrđuje kako takvi uvjeti za rast pogoduju sintezi dugolančanih nezasićenih masnih kiselina. Tako je u sastavu masnih kiselina iz biomase uzgojene na podlozi sastava omjera 6 udio eikosapentaenoične kiseline u ukupnim masnim kiselinama iznosio 9.42±0.93%. Smanjenje udjela lipida nije bilo neočekivano budući da su i

prethodno dobiveni rezultati ukazali kako je nakupljanje rezervnih energetskih bogatih molekula lipida i ugljikohidrata potaknuto u uvjetima limitacije nutrijentima. Pa je tako najveći udio ugljikohidrata bio upravo u kontrolnoj podlozi koja je sadržavala najmanju količinu nutrijenata. S tih maksimalnih 19.73% udio ugljikohidrata smanjio se na 3.11 i 4.19% kod omjera 5 i 6. Suprotan trend zamijećen je kod promjene udjela proteina koji je porastao sa 15.34±1.5% kod kontrolne podloge na maksimalnih 21.48±1.10% i 21.00±2.87% kod omjera 2 i 3. Sastav biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 u skladu je s literaturom (Botte i sur., 2018; Chu i sur., 1996; Fred Millie, 1984; Pimolrat i sur., 2010; Rodríguez-Núñez i Toledo-Agüero, 2017; Yalcin Duygu, 2019). Morris i suradnici navode kako u stanicama koje su uzgajane u prisutnosti svih potrebnih nutrijenata, udjel proteina gotovo uvijek premašuje sadržaj ugljikohidrata, a on pak gotovo uvijek nadmašuje udjel lipida (Morris i sur., 1981). Također kao što je spomenuto i kod karakterizacije sojeva, faza rasta ima značajan utjecaj na sastav biomase. Pa tako mnogi autori navode kako je udio lipida i ugljikohidrata u stanicama u stacionarnoj fazi rasta (kasna stacionarna faza) uglavnom niži dok udjel proteina ostaje više-manje isti i blago opada u kasnijoj fazi rasta (Conover, 1975; Handa, 1969). Literatura navodi kako se u stanicama u eksponencijalnoj fazi rasta udjel proteina se kreće od 17 do 35%, ugljikohidrata od 4 do 20%, te lipida od 2 do 7% (Fred Millie, 1984). Sastav biomase dijatomeje u ovom istraživanju u skladu je s udjelom navedenim u literaturi, posebno uzimajući u obzir kako je rast zaustavljen po samom izlasku iz eksponencijalne faze rasta. Na temelju rezultata daljnje optimizacije podloge za uzgoj, omjer 3 odabran je kao najpogodniji za rast biomase dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 i postizanje najveće produktivnosti.

5.2.1.5. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata dijatomeje *Nitzschia* sp. S5

Nakon optimizacije sastava hranjive podloge za rast započeto je istraživanje načina uzgoja na produktivnost procesa. Niska topljivost silicija jedan je od ključnih ograničavajućih faktora u postizanju visoke produktivnosti pri uzgoju dijatomeja. Stoga je kao idući korak optimizacije uzgoja bio istražiti učinak šaržnog uzgoja s pritokom supstrata na rast biomase. Ovaj način uzgoja često se primjenjuje u biotehnologiji kako bi se izbjegla inhibicija supstratom i/ili postigla veća koncentracija biomase. Krivulja rasta prikazana je na slici 23. Početni sastav podloge odgovarao je

sastavu podloge uz omjera 3 nutrijenata. Šaržni uzgoj trajao je 13 dana sve dok kultura nije ušla u kasnu eksponencijalnu fazu kada je primijećen i pad optičke gustoće i koncentracije stanica, te je silicij gotovo u potpunosti utrošen (koncentracija 0.42 mg L^{-1}). Potom je dodatkom koncentrirane otopine tri makronutrijenta u hranjivu podlogu započet šaržni uzgoj s pritokom supstrata. Dodana prihrana sadržavala je izračunatu količinu nutrijenata potrebnu za sintezu 0.3 g L^{-1} biomase dijatomeje i pri tome su koncentracije ključnih nutrijenata u prihrani bile jednake omjeru 3. Svaka iduća prihrana napravljena je kad je primijećeno smanjenje rasta odnosno kada je zamijećeno smanjenje porasta koncentracije stanica i optičke gustoće kulture. Ukupno su napravljene 4 prihrane i to 13., 20., 26. i 30. dana. S četvrtom prihranom kulturi je osigurano dodatnih 44.8 mg L^{-1} silicija, 74.38 mg L^{-1} dušika i 22.45 mg L^{-1} fosfata. Koncentracija biomase bila je 2.23 puta veća u odnosu na koncentraciju na kraju šaržnog uzgoja te 5.82 puta veća od uzgoja u kontrolnom mediju (tablica 40). Na kraju šaržnog uzgoja s prihranom nutrijentima postignuta je koncentracija od 1.63 g L^{-1} i koncentracija stanica od 43.15×10^6 po mL. Iako su dodani nutrijenti osigurali nastavak rasta biomase tijekom vremena, taj rast nije bio eksponencijalan. Specifična brzina rasta polako je opadala s 0.13±0.01 dan^{-1} svakom idućom prihranom do konačnih 0.08±0.05 dan^{-1}. Produktivnost sinteze biomase kretala se od 45.41±1.46 i 48.57±1.37 mg L^{-1} dan^{-1} bez statistički značajne promjene između prihrana. Nešto veća produktivnost postignuta je kod šaržnog uzgoja s 60.71 mg proizvedene biomase po litri i danu. Iako je usporedba s literaturnim podatcima otežana uslijed različitih načina i uvjeta uzgoja, te razlika između mikroalgalnih sojeva, upravo šaržni uzgoj s pritokom se najčešće navodi kao najučinkovitiji način za postizanje viših koncentracija stanica i ukupne produktivnosti sinteze biomase mikroalgi. Picardo i suradnici su šaržnim uzgojem s pritokom postigli koncentraciju biomase *Isochrysis galbana* od 1.88 g L^{-1}, dok je ista nakon šaržnog uzgoja iznosila 0.42 g L^{-1} (Picardo i sur., 2013). Ozkan i Rorrer su višekratnim dodatkom nutrijenata postigli deset puta veću koncentraciju stanica u odnosu na proces s dvokratnim dodatkom silicija (Ozkan i Rorrer, 2017). Analizom koncentracije nutrijenata tijekom uzgoja uočeno je da je silicij prvi nutrijent iscrpljen u hranjivoj podlozi što je prouzrokovalo smanjenje rasta dijatomeje. Dušik je bio prisutan u dovoljnim količinama tijekom čitavog vremena uzgoja, dok fosfor također nije limitirao rast. Nizak udio lipida od 1.94 do 2.42% nije bio neočekivan budući da je na temelju rezultata dobivenih iz prethodno provedenih eksperimenta potvrđeno kako veći utjecaj na akumulaciju rezervnih energetski bogatih

makromolekula u dijatomeji *Nitzschia* sp. S5 ima limitacija dušikom, a ne silicijem. Udio lipida i njihov profil masnih kiselina nije se značajno mijenjao tijekom šaržnog uzgoja s pritokom supstrata te se produktivnost sinteze kretala od 0.96±0.06 do 1.18±0.03 mg $L^{-1}dan^{-1}$. Udio proteina značajno se povećao početkom faze prihranjivanja s 11.41% na kraju šaržnog uzgoja na maksimalnih 29.06±0.15% nakon treće prihrane. Nizak udio lipida i visoki udio proteina daje indikaciju kako su se stanice aktivno dijelile i nisu ušle u stacionarnu fazu te da nije došlo do nakupljanja rezervnog materijala. S prihranama je došlo do blagog porasta udjela ugljikohidrata u biomasi pa je tako s 8.04% na kraju šaržnog uzgoja udio porastao na 14.50±3.19% nakon prve prihrane. Do kraja uzgoja udio je blago opao, ali je konačni udio od 12.92±1.07 % veći nego na kraju šaržnog uzgoja. Brojni autori navode kako je moguće regulacijom prihranjivanja nutrijentima postići povećanje produktivnosti sinteze lipida te da se to može postići primjenom upravo strategije šaržnog uzgoja s pritokom (Hsieh i Wu, 2009; Jeffryes i sur., 2013; Picardo i sur., 2013; Takagi i sur., 2000). S tim na umu, nastavak ovoga istraživanja trebao bi biti usmjeren ka postizanju veće produktivnosti sinteze lipida kroz daljnju optimizaciju, a time i povećanja isplativosti cjelokupnog procesa. Jedna od predloženih strategija je održavanje niske koncentracije silicija kroz duži vremenski period uzgoja u stacionarnoj fazi koji bi poticao na nakupljanje lipida, ali uz dovoljan dodatak silicija kako bi stanice i dalje mogle rasti. S takvim pristupom Jeffryes i suradnici postigli su veću lipidnu produktivnost kod uzgoja dijatomeje *Cyclotella* sp. u usporedbi sa jednokratnim dodatkom silicija. (Jeffryes i sur., 2013). Što se tiče profila masnih kiselina i ovdje su bile prisutne za dijatomeje karakteristične masne kiseline: palmitoleinska, miristinska i palmitinska. Slične rezultate dobili su i autori brojnih drugih radova (Cheng i sur., 2014; Jeffryes i sur., 2013; Yi i sur., 2017; Yodsuwan i sur., 2017). U usporedbi sa šaržnim uzgojem, tijekom faze prihranjivanja došlo je povećanja udjela nezasićenih masnih kiselina C17:1, C18:2 i C20:4 što je ujedno dovelo do većeg udjela ukupnih nezasićenih masnih kiselina u ukupnim lipidima. Određena je i prisutnost margarinske masne kiseline (C17:0). Margarinska i heptadekaenoična kiselina prisutne u ukupnim masnim kiselinama dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 su masne kiseline s neparnim brojem ugljikovih atoma, koji se često koriste kao biomarkeri za detekciju bakterijske kontaminacije (Viso i Marty, 1993). No, unatoč tome što ukazuju na prisutnost bakterija, te masne kiseline mogu se pronaći i u mikroalgama, ali njihov udio tada najčešće ne prelazi 5% (Maltsev i Maltseva, 2021). Vrijednosti dobivene u ovome

radu nešto su više, te je udio margarinske kiseline varirao između 0.04% (0.05 mM Si) i 11.48% (nakon 4. prihrane), a udio heptadekaenoične (C17:1) između 0.05% (1 mM Si) i 9.90% (nakon 1. prihrane). Tako su i u radu Ghazala i Shameele odredili vrlo visoki udio od 52.2% masnih kiselina s neparnim brojem ugljikovih atoma u mikroalgi *Cyclotella* sp. (Ghazala i Shameel, 2005). Od višestruko nezasićenih masnih kiselina najzastupljenije su eikosapentaenoična i arahidonska kiselina. Udio arahidonske kiseline povećao se tijekom uzgoja s 0.10% na 2.91% zabilježenih na kraju kultivacije. Arahidonska kiselina također je visokovrijedna masna kiselina koja je neophodni element staničnih membrana odgovoran za njenu fleksibilnost i fluidnost. Nalazi se u svim stanicama, a posebice stanicama živčanog i imunosnog sustava te skeletnih mišića (Tallima i el Ridi, 2018). Arahidonska kiselina detektirana je u biomasi samo tijekom i nakon šaržnog uzgoja s pritokom supstrata. Udio eikosapentaenoične kiseline (C20:5) na kraju uzgoja iznosio je 10.50±2.77% što je nešto manja vrijednost nego na kraju šaržnog uzgoja (15.59%), ali veća od one na kraju uzgoja na podlozi s makronutrijentima u omjeru 3 u prethodnom eksperimentu (6.35%) (tablica 41).

5.3. Optimizacija uvjeta uzgoja zelene morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3

5.3.1. Šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni i otvorenom bazenu

Mikroalge iz roda *Picochlorum* sp. ističu se brojnim pozitivnim karakteristikama među kojima su veće specifične brzine rasta od komercijalno korištenih mikroalgi kao što su *Dunaliella*, *Nannochloropsis* (de la Vega i sur., 2011; Weissman i sur., 2018), halotolerantost (Foflonker i sur., 2016; Wang i sur., 2014), rast u širokom rasponu temperatura od 0 do 40 °C (Dogaris i sur., 2016; Henley i sur., 2002) te nakupljanje lipida u biomasi do udjela od 58% u suhoj tvari biomase (Dahmen i sur., 2014; de la Vega i sur., 2011; Zhu i Dunford, 2013). Upravo zbog nakupljanja lipida smatraju se potencijalnim kandidatom za proizvodnju biogoriva u industrijskom mjerilu (El-Kassas, 2013). Zbog velikog potencijala u daljnjem istraživanju kao radni mikroorganizam korištena je zelena mikroalga *Picochlorum* sp. D3.

Prethodno istraživanje vezano uz optimizaciju uzgoja dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 pokazalo je kako je šaržni uzgoj s pritokom supstrata dobar pristup za povećanje prinosa i produktivnosti. Tako je za prvi korak optimizacije uzgoja zelene mikroalge *Picochlorum* sp. D3 proveden šaržni uzgoj s pritokom supstrata, korištenjem dva različita bioreaktorska sustava, barbotirajuću kolonu i otvoreni bazen (slika 24). Uzgoj je vođen kako je opisano u poglavlju 3.3.3.2.. Cilj ova dva uzgoja bilo je nakupljanje biomase u prvoj fazi uzgoja te potom uvodeći limitaciju fosforom u drugoj fazi uzgoja potaknuti na nakupljanje lipida u biomasi mikroalgae. Svakodnevno se pratio rast kulture izuzimanjem uzorka kulture te je određivana optička gustoća, koncentracija stanica i koncentracija biomase. Svaka tri do četiri dana analizirana je i koncentracija nutrijenata u podlozi. Uzgoji u dva bioreaktorska sustava razlikovali su se u načinu vođenja procesa. Tijekom uzgoja u otvorenom bazenu kultura je prihranjivana otopinom nutrijenata te otopinom natrijevog bikarbonata kao dodatnog izvora ugljika, a kultura u barbotirajućoj koloni prihranjivana je samo otopinom nutrijenata bez dodatka natrijevog bikarbonata. Tijekom uzgoja u barbotirajućoj koloni u određenim vremenskim razmacima izuziman je veći volumen kulture (500 mL) koji je nadoknađen dodatkom sterilne demineralizirane vode do početnog volumena. Takva izmjena je tijekom uzgoja provedena ukupno šest puta. Prihrana izvorima dušika i fosfora provedena je deveti dan uzgoja te kod prihrane nije dodavan natrijev bikarbonat. S grafa na slici 26 (a) vidljiv je porast koncentracije dušika s 5.65 na 16.21 mg L^{-1} i fosfora s 0.3 na 2.105 mg L^{-1}. Krivulja potrošnje nutrijenata u skladu je s krivuljom rasta prikazanom na slici 25 (a). Uzgoj je vođen sve do ulaska u stacionarnu fazu rasta, dok nije zamijećen pad koncentracije stanica i optičke gustoće kulture što je trajalo od 20 do 23. dana uzgoja. Biomasa je s početnih 0.036 g L^{-1} narasla na konačnih 0,458 g L^{-1}. Uzgoj u otvorenom bazenu trajao je 28 dana tijekom kojih je cilj bio nakupljanje biomase, ali i postizanje uvjeta limitacije izvorom fosfora kako bi se ispitao njegov utjecaj na nakupljanje lipida. Natrijev bikarbonat dodan je u tri obroka i to 1., 19. i 22. dan uzgoja i to dodatkom izračunate količine koncentrirane otopine natrijevog bikarbonata tako da je njegova koncentracija u kulturi iznosila 0.5 g L^{-1}. Osim dodatka natrijevog bikarbonata, kultura je prihranjivana i drugim nutrijentima. Kao što je vidljivo sa grafa na slici 26 (b) dodatkom prihrane 14. dana uzgoja koncentracija dušika porasla je s 5.1 mg L^{-1} na 18.7 mg L^{-1}, a fosfora s 0.002 mg L^{-1} na 0.272 mg L^{-1}. Pad koncentracije nutrijenata popraćen je i rastom kulture što je vidljivo iz promjene koncentracije stanica, optičke gustoće i koncentracije biomase (slika 25 (b)). Kultura je eksponencijalno rasla od 11. do 18. dana uzgoja te je ulaskom u stacionarnu fazu rasta nakon 10 dana uzgoj prekinut. Unatoč tome što je od 7. do 14. dana koncentracija fosfora bila veoma mala i limitirajuća za rast, kultura je i

dalje rasla eksponencijalno zahvaljujući intracelularnim zalihama fosfora. Koncentracija biomase povećala se s 0.065 g L^{-1} nakon inokulacije do konačnih 0.515 g L^{-1} na kraju uzgoja. Sastav biomase uzgojene u otvorenom bazenu i barbotirajućoj koloni bio je veoma sličan. Najveći udio suhe tvari biomase otpadao je na proteine s rasponom od 8.81% do 22.62% za biomasu uzgojenu u barbotirajućoj koloni i od 4.70% do 17.76% za biomasu uzgojenu u otvorenom bazenu (tablica 42). Kao i u slučaju dijatomeje *Nitzschia* sp.S5, literaturni podatci navode kako s uvjetima nižih koncentracija dušika dolazi do smanjenja fotosintetske aktivnosti i usmjeravanja ugljika u staničnom metabolizmu ka sintezi lipida i ugljikohidrata uz smanjenje sadržaja proteina (Camacho-Rodríguez i sur., 2013). Limitacija dušikom nije postignuta u ova dva uzgoja, a udio proteina nije se značajno razlikovao. Tako je biomasa uzgojena u otvorenom bazenu sadržavala 12.86% proteina, a biomasa uzgojena u barbotirajućoj koloni 8.81%. Udio ugljikohidrata također nije značajno varirao te se kretao između 5.344 i 6.6% u biomasi uzgojenoj u kod otvorenom bazenu, te je iznosio 7.7% u biomasi uzgojenoj u barbotirajućoj koloni. Najveće vrijednosti udjela lipida zabilježene su u biomasi uzgojenoj u barbotirajućoj koloni i to na početku uzgoja. Trinaestog dana uzgoja zabilježena je najviša vrijednosti od 22.62% nakon čega je zabilježeno opadanje udjela lipida do konačnih 8.81% 23. dana uzgoja. Najveća razlika u udjelu lipida u biomasi uzgojenoj u dva bioreaktorska sustava zabilježena na kraju uzgoja je u sadržaju na lipidima. Kod uzgoja u otvorenom bazenu udio lipida u biomasi bio je nešto veći (13.19%), dok je isti kod biomase uzgojene u barbotirajućoj koloni iznosio 7.31%. Porast udjela lipida u biomasi uzgojenoj u otvorenom bazenu zabilježen je nakon prihrane natrijevim bikarbonatom (tablica 42. (b)). Udio lipida je porastao s početnih 2.5% na 9.48% 20. dana uzgoja, a nakon druge prihrane 22. dana uzgoja taj udio je porastao na konačnih 13.19%. Naime, za sintezu skladišnih lipida potrebna je dostatna količina otopljenog anorganskog ugljika (CO_2). Anorganski oblik otopljenog ugljika u morskoj vodi je većinom (>90%) u formi bikarbonata (HCO_3^-), a brzina spontane konverzije HCO_3^- u CO_2 je niska. Mnoge mikroalge i cijanobakterije posjeduju sposobnost aktivnog unošenja HCO_3^- iz medija. Bikarbonat se transportira u citoplazmu stanice kroz plazma membranu gdje se djelovanjem enzima karbonil anhidraze provodi konverzija HCO_3^- u CO_2. Time se osigurava neprekinuti tok CO_2, supstrata za enzim ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza i nesmetano odvijanje fotosinteze. Druga mogućnost je da ekstracelularna karbonil anhidraza vrši konverziju HCO_3^- u CO_2, a oba mehanizma su zabilježena kod fitoplanktona (Bozzo1 i sur., 2000; Young i sur., 2001). U komercijalnim proizvodnim pogonima gdje CO_2 nije dostupan koriste se soli bikarbonata kao izvor ugljika za intenzivnu mikroalgalnu proizvodnju (Chi i sur., 2011; Ungsethaphand i sur., 2009). Brojni

radovi u kojima je istraživan utjecaj izvora ugljika na rast i biokemijski sastav različitih vrsta mikroalgi koristili su upravo natrijev bikarbonat i potvrdili da ima stimulirajući učinak na akumulaciju triacilglicerola u stanicama mikroalgi (Golob i sur., 2009; Guihéneuf i sur., 2008, 2009; Jayasankar i Valsala, 2008). Stoga više vrijednosti udjela lipida prilikom uzgoja u otvorenom bazenu mogu pripisati dodatku natrijevog bikarbonata. White i suradnici su također zabilježili veće udjele lipida kod mikroalgi *T. susecica* i *N.salina* uz dodatak 2 g L^{-1} bikarbonata u odnosu na 0 g L^{-1} i 1 g L^{-1} (White i sur., 2013). No, ako se usporede produktivnosti ova dva procesa, veća produktivnost sinteze biomase postignuta je pri uzgoju u barbotirajućoj koloni (82.97 mg L^{-1} dan^{-1}) u odnosu na otvoreni bazena (76.64 mg L^{-1} dan^{-1}). No, unatoč duljem trajanju samoga procesa, produktivnost sinteze lipida je već 18. dana uzgoja u otvorenom bazenu bila veća u odnosu na maksimalnu postignutu od 6.07 mg L^{-1} dan^{-1} u barbotirajućoj koloni te je na kraju procesa iznosila 10.11 mg L^{-1} dan^{-1}. Profil masnih kiselina nije se značajnije razlikovao između uzgoja u dva bioreaktorska sustava te su najzastupljenije masne kiseline bile linolna masna kiselina (C18:2 cis 9, 12), α-linoleinska kiselina (C18:3 cis 9,12,15), palmitinska (C16:0) i heptadekanska (C17:0) masna kiselina. Detektirane su i manje količine miristinske kiseline (C14:0), miristoleične kiseline (C14:1 cis 9) te C15:1 cis 10 (pentodekanoične kiseline). Profil masnih kiselina u mikroalgi *Picochlorum* sp. D3 istraživanoj u ovoj doktorskoj radnji nije u potpunosti u skladu s literaturnim podatcima za druge sojeve istog roda mikroalge. Kao najzastupljenije masne kiseline u ukupnim lipidima također se navode palmitinska i linolenska kiselina. Tako je udio palmitinske i linolenske masne kiseline u *Picochlorum* sp. HM1 iznosio 32.15% te 43.08%, dok je u mikroalgi *Picochlroum oklahomensis* bio 23.81% i 26.19% (de la Vega i sur., 2011; Zhu i sur., 2014). Udjeli određeni u ovome radu za te dvije masne kiseline su unutar navedenih raspona te time u skladu s literaturnim navodima. Nadalje sadržaj α-linolenske kiseline također je u skladu s vrijednostima navedenim za prethodno spomenute mikroalge. Najveće odstupanje od literaturnih podataka vidljivo je u udjelu heptadekanske kiseline čiji je udio u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. D3 bio neuobičajeno visok. Kod uzgoja u otvorenom bazenu zabilježeni su udjeli od 12.64% do 15.30%, te u barbotirajućoj koloni od 7.71% do konačnih 20.11%. U literaturi je ova masna kiselina utvrđena kod nekih sojeva iz roda *Picochlorum* sp., ali u značajno nižim udjelima. Tako je u radu Zhu i Dunford za mikroalgu *Picochlorum oklahomensis* određen značajno manji udio od svega 0.15%, a u radu de la Vega i suradnika za *Picochlorum* sp. HM1 nije utvrđena prisutnost ove masne kiseline (de la Vega i sur., 2011; Zhu i Dunford, 2013). Profil masnih kiselina za biomasu uzgojenu u barbotirajućoj koloni nije se značajno razlikovao od profila masnih kiselina biomase uzgojene

u otvorenom bazenu. U biomasi na kraju uzgoja u otvorenom bazenu udio višestruko nezasićenih masnih kiselina iznosio je 51.85%, a udio zasićenih masnih kiselina 43.5%. Tijekom uzgoja nije se značajnije mijenjao udjel zasićenih odnosno nezasićenih masnih kiselina. Nešto veći udio zasićenih masnih kiselina od 62.54% određen je u biomasi na kraju uzgoja u barbotirajućoj koloni, dok je udio višestruko nezasićenih masnih kiselina iznosio 27.88%. No, sastav lipida određen 20. dan uzgoja u barbotirajućoj koloni veoma je sličan profilu na kraju uzgoja u otvorenom bazenu. Zahvaljujući profilu masnih kiselina bogatog na višestruko nezasićenim masnim kiselina mikroalga *Picochlorum* sp. D3 posjeduje potencijal za primjenu kao dodatak prehrani obogaćen zdravim masnim kiselinama. Osim toga prisustvo C17:0 masne kiseline u visokom udjelu, također čini ovu mikroalgu zanimljivom kao platformom za proizvodnju masnih kiselina s neparnim brojem ugljikovih atoma koje pokazuju brojne benefite za ljudsko zdravlje.

5.3.2. Učinak omjera C:N [mol mol^{-1}] na rast i biokemijski sastav biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3

Prethodnim eksperimentom potvrđen je pozitivan učinak dodatka natrijevog bikarbonata na sadržaj lipida u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. D3 izolirane iz Jadranskog mora. Stoga je najprije istražen učinak nekoliko različitih omjera ugljika i dušika u podlozi. Omjer C:N [mol mol^{-1}] u podlozi podesio se dodatkom određene količine natrijevog bikarbonata koji je predstavljao dodatni izvor ugljika uz onaj koji se tijekom miješanja otapa iz zraka (poglavlje 3.4.3.4.). Krivulje rasta na različitim omjerima C:N [mol mol$^{-1]}$ prikazane su na slici 27. Utvrđen je karakterističan oblik krivulja rasta mikroalge s lag fazom na početku uzgoja, na koju se nastavlja eksponencijalna faza, stacionarna faza i naposlijetku faza odumiranja. Uzgoj je za sve uvjete trajao 13 dana. Trajanje eksponencijalne faze rasta značajno se razlikovalo u ispitivanim uvjetima. Tako je u kontrolnoj podlozi (f/2 izvorna podloga) ulazak u stacionarnu fazu rasta zamijećen tek od 10. do 13. dana smanjenjem brzine rasta stanica i optičke gustoće kulture. Kod omjera C:N=13.52 [mol mol^{-1}] do opadanja vrijednosti OD i koncentracije stanica došlo je već nakon 10 dana, nakon čega je uslijedio nagli pad broja stanica. Sličan trend zabilježen je i kod omjera C:N=27.05 [mol mol^{-1}], gdje je do opadanja vrijednosti optičke gustoće također došlo nakon 10. dana uzgoja. Međutim rast koncentracije stanica počeo je stagnirati već oko 7. dana uzgoja, a do pada je došlo od 10. do

13. dana uzgoja kada je uzgoj završen. Najslabiji rast stanica zabilježen je pri uzgoju u podlozi sa C:N omjerom 67.64 [mol mol-1] gdje je već od 8. dana uzgoja broja stanica počeo opadati uz blagi nastavak rasta optičke gustoće kulture. Najveća koncentracija stanica zabilježena je kod uzgoja na izvornoj f/2 podlozi gdje je zabilježeno 8.06×10^{7} st mL^{-1}, a najmanja je zabilježena u podlozi s omjerom C:N=27.05 i C:N=67.64 [mol mol^{-1}] s vrijednostima koncentracije stanica 2.31 $\times10^{7}$ stanica mL^{-1} i 2.67×10^{7} stanica mL^{-1}. Utjecaj dodatka natrijevog bikarbonata na rast mikroalge *Picochlroum* sp. D3 vidljiv je i iz koncentracije biomase postignute na kraju uzgoja (tablica 45). Najveća koncentracija biomase zabilježena je pri omjeru C:N=27.05 [mol mol^{-1}], kod kojeg je primijećeno taloženje natrijevog bikarbonata. Taloženje anorganskih tvari najvjerojatnije je prividno povećalo koncentraciju suhe tvari biomase pri omjerima C:N=27.05 [mol mol^{-1}] i C:N=67.64 [mol mol^{-1}]. To potvrđuje i neslaganje s koncentracije suhe tvari biomase s brojčanom koncentracijom stanica (stanice mL^{-1}) na kraju uzgoja. Specifična brzina rasta bila je najveća također pri C:N omjera od 27.05 [mol mol^{-1}] (0.44±0.05 dan^{-1}) gdje je i eksponencijalna faza trajala kraće nego u odnosu na omjer C:N=13.52 [mol mol^{-1}] gdje je specifična brzina rasta bila nešto niža i iznosila 0.35±0.06 dan^{-1}. Iz tablice sastava biomase (tablica 45) može se primijetiti kako se sastav biomase između ispitivanih uvjeta nije značajno mijenjao. Rast udjela lipida može se primijetiti pri dodatku natrijevog bikarbonata i to za omjer C:N=67.64 [mol mol^{-1}] gdje je zabilježeno 9.27±0.74% što je više nego kod kontrolne podloge gdje je zabilježeno 5.48±1.31%. Udio proteina nije se značajnije razlikovao kod kontrolne podloge i omjera C:N= 13.52 i C:N= 27.05 [mol mol^{-1}], dok je pri omjeru C:N=67.64 [mol mol^{-1}] neuobičajeno visok (75.26±4.12%). Nešto veći udjel ugljikohidrata također je zabilježen pri ovom omjeru (15.08±1.00%). Udio ugljikohidrata kod ostalih ispitivanih uvjeta kretao se između 5.72±0.78% i 8.75±0.27%. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako dodatak natrijevog bikarbonata na samom početku uzgoja ima negativan učinak na rast biomase. Osim toga za koncentracije natrijevog bikarbonata veće od 5 g L^{-1} primijećeno je značajno taloženje bikarbonata u podlozi. Taloženje anorganskih tvari utjecalo je na točnost rezultata dobivenih analitičkim metodama. Taloženje uzrokovano dodatkom bikarbonata smanjilo je koncentraciju drugih makro i mikronutrijenata u podlozi, a koji su potrebni mikroalgi za rast. Zbog smanjenja koncentracije nutrijenata smanjena je i koncentracija biomase i produktivnost sveukupnog procesa. Iz navedenih razloga u nastavku istraživanja primijenjen je šaržni uzgoj proveden u dvije faze (poglavlje 3.4.3.5.). U prvoj fazi provodio se uzgoj u f/2 izvornoj podlozi bez dodatka natrijevog bikarbonata kako bi se ostvarili uvjeti pogodni za sintezu biomase. U drugoj fazi cilj je bio potaknuti nakupljanje lipida u biomasu. Stoga je u drugoj

fazi ispitan utjecaj dodatka natrijevog bikarbonata, ali u uvjetima limitacije dušikom. Uzgoj u prvoj fazi trajao je sedam dana nakon čega je biomasa izdvojena iz podloge i prebačena u podlogu bez dodatnog izvora dušika. Kao kontrolna podloga korištena je f/2 podloga bez izvora dušika, odnosno $NaNO_3$. Ta podloga sadržavala je natrijev bikarbonat u koncentracijama od 1 i 2 g L^{-1}. Nakon što je biomasa prebačena u podlogu bez izvora dušika, uzgoj je trajao još 9 dana (slika 28). Koncentracija stanica dobivena na kraju uzgoja nije se značajnije razlikovala te se kretala od $4{,}19\times10^7$ do $4{,}54\times10^7$ stanica po mL. Najveća je vrijednost od $4{,}75\times10^7$ st mL^{-1} postignuta u f/2 podlozi bez dodatka natrijevog bikarbonata. Vrijednosti optičke gustoće također se nisu značajno razlikovale između tri ispitana uvjeta. Utjecaj dodatka natrijevog bikarbonata na biomasu ponovno je bio negativan pa je tako koncentracija biomase na kraju uzgoja bila najviša u kontrolnoj podlozi s 0.39±0.01 g L^{-1} (tablica 47). Prema brojnim literaturnim navodima uvjeti limitacije dušikom potiču nakupljanje lipida, pa tako neki autori navode i osam puta veći udio lipida u biomasi nakon uzgoja bez izvora dušika u odnosu na podlogu koja je sadržavala izvor dušika. Osim toga, Nunez i Quigg u svom radu navode kako su zabilježili deset puta veći udio lipida u podlozi uz dodatk 5 g L^{-1} natrijevog bikarbonata (Nunez i Quigg, 2016). U ovome radu za mikroalgu *Picochlorum* sp D3 nije zabilježen takav učinak dodatka natrijevog bikarbonata. Najveći udio lipida od 10.22±3.16% zabilježen je kod uvjeta limitacije dušikom uz dodatak 2 g L^{-1} natrijevog bikarbonata. No, to je tek neznatno viša vrijednost od one dobivene kod kontrolne podloge (8.31±2.54%). Promjena udjela lipida tijekom uzgoja praćena je spektrofotometrijskom metodom po vanilinu (rezultati nisu prikazani) gdje je porast udjela lipida povećavao sve do 14. i 15. dana uzgoja nakon čega je zabilježen drastičan pad. Stoga je moguće objašnjenje niskih vrijednosti lipida predugo održavanje stresnih uvjeta uslijed kojih je došlo do potrošnje rezervnog materijala u stanicama za održavanje životnih funkcija. Udio proteina bio je niži uz dodatak natrijevog bikarbonata. Biomasa uzgojena u kontrolnoj podlozi sadržavala je 53.53±2.73% proteina, a uz dodatak 2 g L^{-1} natrijevog bikarbonata udio proteina iznosio je 31.26±2.83%. Unatoč neočekivanom učinku dodatka natrijevog bikarbonata na rast i sastav biomase *Picochlorum* sp., uzgoj u dvije faze pokazao se dobrim pristupom za postizanje većih koncentracija biomase na kraju uzgoja pa je iz tog razloga ovaj pristup dodatno istražen u nastavku istraživanja.

5.3.3. Šaržni uzgoj uz sukcesivno povećanje volumena mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u dvije faze u barbotirajućoj koloni

Saznanja prethodnih eksperimenata iskorištena su za nastavak istraživanja uzgoja mikroalge *Picochlroum* sp. D3 u barbotirajućoj koloni. Barbotirajaća kolona i air lift bioreaktori često se koriste u procesima obrade otpadnih voda te za uzgoj mikroorganizama budući da ih karakterizira niska cijena izrade, niske sile smicanja, odsutnost rasta biomase po stijenkama, visoka učinkovitost prijenosa mase, smanjena mogućnost foto-inhibicije rasta i visoki omjer površine i volumena bioreaktor (Mubarak i sur., 2019; Zuccaro i sur., 2019). Zbog navedenih prednosti kao i zbog jednostavne izvedbe sustava za aeraciju i njegove učinkovitosti, za uzgoj mikroalge odabrana je barbotirajuća kolona. Prethodnim eksperimentima utvrđeno je da dodatak natrijevog bikarbonata ima pozitivan učinak na nakupljanje lipida u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Osim toga šaržni uzgoj u dvije faze pokazao se uspješnijim kod prihrane natrijevim bikarbonatom. S obzirom na navedeno u idućem koraku optimizacije uzgoja ispitan je šaržni uzgoj u dvije faze u barbotirajućoj koloni. Prva faza vodila se šaržno, ali uz sukcesivno povećanje volumena s ciljem povećanja prinosa biomase. Dok su u drugoj fazi uzgoja mikroalge u tri obroka prihranjene otopinom natrijevog bikarbonata s ciljem usmjeravanja metabolizma mikroalge ka nakupljanju lipida (poglavlje 3.4.3.6.). Uzgoj je trajao ukupno 26 dana, a rast je praćen kao i do sada mjerenjem optičke gustoće i određivanjem koncentracije stanica (stanice mL^{-1}). Temperatura podloge tijekom uzgoja nije bila regulirana i iznosila je između 19 i 25.4 °C, a pH vrijednost se kretala između 7.75 i 8.66. Krivulja rasta prikazana je na slici 29. Oblik krivulje rasta bio je karakterističnog oblika za uzgoj jednostaničnih mikroorganizam. Tijekom eksponencijalne faze rasta dodana je svježa hranjiva podloga (10., 12., 16., 20. i 22. dan). Uslijed dodatka svježe podloge došlo je pada broja stanica i optičke gustoće kulture. Strategija sukcesivnog povećanja volumena primijenjena je kako bi se izbjegla duga lag faza koja je karakteristična po niskoj početnoj koncentraciji stanica. Na ovaj način kultura je održavana u eksponencijalnoj fazi rasta kroz duži period budući da svježa podloga sadržava i sve nutrijente potrebne za rast. Time je osiguran veći prinos biomase. Postepenim dodatkom nutrijenata izbjegnuta je inhibicija rasta nutrijentima i taloženje anorganskih soli do kojeg bi došlo ako bi se ista količina nutrijenata dodala u podlogu na samom početku uzgoja. Uzgoj je vođen do kraja eksponencijalne faze rasta i ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Početna koncentracija stanica iznosila je 2.6×10^{6} st mL^{-1}, dok je konačna koncentracija iznosila 3.46×10^{8} st mL^{-1}. Koncentracija stanica na samom kraju uzgoja bila je viša nego u svim do sada provedenim istraživanjima

optimizacije uzgoja *Picochlorum* sp. D3. Koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila je 1.68 g L^{-1} što je 3.26 puta veća koncentracija biomase od one postignute šaržnim uzgojem s pritokom supstrata u barbotirajućoj koloni (0.515 g L^{-1}). Dobivena vrijednost nešto je niža od one u radu Zhu i Dunforda u kojem je maksimalna koncentracija biomase mikroalge *Picochlorum oklahomensis* iznosila 2.1 g L^{-1} (Zhu i Dunford, 2013). Literatura navodi čak kako se upotrebom zvuka različitih frekvencija može pozitivno utjecati na proizvodnju biomase mikroalgi. U radu Cai i suradnika dobivena je koncentracija od 1.6 g L^{-1} kod uzgoja *Picochlorum oklahomensis*, što je slično koncentraciji dobivenoj u ovome radu. No, primjenom zvuka frekvencije 2200 Hz postignuta je koncentracija od 2.2 g L^{-1} (Cai i sur., 2016). Na slici 30 prikazana je krivulja koncentracije nutrijenata tijekom uzgoja. Na krivulji se u prvoj fazi uzgoja se može primijetiti da dodatak nutrijenata ovisi o njihovoj potrošnji. Dodano je ukupno deset prihrana kroz dodatak koncentriranih otopina $NaNO_3$ i NaH_2PO_4 tako da su koncentracije ovih tvari u podlozi nakon dodatka bile jednake onoj u izvornoj f/2 podlozi. U literaturi se navodi kako rastu mikroalgi pogoduju koncentracije dušika iznad 10 mg L^{-1} i fosfora iznad 0.1 mg L^{-1}. Maksimalna koncentracija dušika u ovome radu je bila 11.96 mg L^{-1}, a fosfora 1.64 mg L^{-1}. U drugoj fazi uzgoja rast mikroalge bio je limitiran izvorom fosfora te je koncentracija dušika bila veoma niska (ispod 1 mg L^{-1}). U danim uvjetima napravljene su tri prihrane natrijevim bikarbonatom s ciljem osiguravanja dodatnog izvora ugljika za rast i sintezu staničnih elemenata. U prvoj i drugoj prihrani dodatkom koncentrirane otopine natrijevog bikarbonata u hranjivoj podlozi postignuta je koncentracija istog od 1 g L^{-1} 16. i 21. dana, te 0.5 g L^{-1} 23. dan uzgoja.

Tijekom uzgoja praćena je i promjena sastava biomase te je makromolekulski sastav biomase prikazan u tablici 49. Kao što je već navedeno, dušik je nužan element za sintezu proteina i nukleinskih kiselina. Najveći udio proteina u biomasi određen je na samom početku uzgoja s 63.9%. Do 12. dana uslijed limitacije izvorom dušika došlo je do smanjenja udjela proteina na 38.85%. Dodatkom prihrane koja je sadržavala izvor dušika ponovno dolazi do porasta sadržaja na proteinima te 16. dana uzgoja on iznosi 61.20%. Do kraja uzgoja udio proteina je blago opadao do konačnih 42.35% na kraju uzgoja. Kao što je već potvrđeno, limitacija nutrijentima dovodi do smanjenja udjela proteina. Pa je tako El-Kassas u svom radu pokazao da kod mikroalge *Picochlorum* sp., sa smanjenjem koncentracije dušika za 50% i 100%, dolazi i do smanjenja udjela proteina za 54% odnosno za 69.7%. U istome radu zabilježeno je smanjenje udjela proteina za 24.5% kod 50%-tnog smanjenja koncentracije fosfora, te za 37.3% kod potpunog izostanka izvora fosfora u hranjivom mediju (El-Kassas,

2013). Baš kao i kod dijatomeja, i kod zelenih mikroalgi dolazi do nakupljanja rezervnog staničnog materijala u obliku ugljikohidrata ili lipida kada se stanice nalaze u stresnim uvjetima uslijed nedostatka nutrijenata. Time dolazi i do smanjenja brzine rasta stanica, te nakupljanja rezervi energije koje bi osiguralo preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (Ikaran i sur., 2015). Provedeno istraživanje pokazalo je da mikroalga *Picochlorum* sp.D3 u ovim uvjetima uzgoja ne nakuplja lipida. Njihov udio je na kraju uzgoja unatoč dodatku natrijevog bikarbonata iznosio svega 9.50%. U ovim uvjetima došlo je do nakupljanja ugljikohidrata pa je tako njihov udio porastao s 13.97% određenih 9. dan uzgoja, na 11.81% određenih 19. dan uzgoja na konačnih 37.69% zadnjeg dana uzgoja. Ova dobivena vrijednost u skladu je s vrijednostima navedenim za druge *Picochlorum* sp. vrste. Tako se npr. u radu Seyed i suradnika navodi da je nakon 21. dana uzgoja udio ugljikohidrata iznosio 27%, dok je u radu Gonzalez-Esquer udio ugljikohidrata iznosio 38% 11. dana uzgoja (Gonzalez-Esquer i sur., 2019). Škrob i celuloza su najzastupljeniji ugljikohidrati u stanicama mikroalgi pa je biomasa time pogodna za proizvodnju bioetanola. U skladu s time, u kiselinskom hidrolizatu najzastupljeniji monosaharid bila je glukoza, a potom ksiloza i fukoza. Udio glukoze je nakon 9 dana uzgoja iznosio 32.93% te je zatim porastao na 54.67% 16. dana uzgoja. Nakon blagog pada 19. dana uzgoja ulaskom u stacionarnu fazu (31.94%), udio glukoze u ukupnim ugljikohidratima je ponovno porastao i to na 73.82% 26. dana uzgoja. Ksiloza je bila druga po zastupljenosti i njen udio je opadao s porastom udjela glukoze. Pa je tako najveći udio od 47.36% zabilježen 19. dana uzgoja kada je udio glukoze bila najmanja. Prema kraju uzgoja udio ksiloze je opadao te je posljednjeg dana uzgoja iznosio 19.33%. Fukoza je bila najmanje zastupljena. Do 19. dana uzgoja njen udio je varirao od 13.09% do 22.54%. Ulaskom u drugu fazu uzgoja, odnosno u stacionarnu fazu, udio fukoze je značajno smanjen i to od 19. do 26. dana kultivacije. Na kraju uzgoja udio fukoze je iznosio 6.85%. Ovi rezultati ukazuju na to da *Picochlorum* sp. u navedenim uvjetima uzgoja nakuplja ugljikohidrate kao rezervni izvor energije, a ne lipide. Mogući razlog niskog udjela lipida najvjerojatnije je posljedica nedovoljne količine ugljika osigurane kroz dodatak natrijevog bikarbonata, te bi se nakupljanje lipida moglo poboljšati propuhivanje kulture sa zrakom obogaćen s CO_2 kako bi osigurala kontinuirana dobava ugljika za sintezu rezervnih tvari. Profil lipida nije se značajno promijenio. Iz tablice 50 vidljivo je kako su najzastupljenije masne kiseline opet bile palmitinska (C16:0), heptadekanska (C17:0) te višestruko nezasićene masne kiseline linolna (C18:2 cis 9,12) i α-linolenska kiselina (C18:3 cis 9,12,15). Navedene masne kiseline čine preko 88% ukupnih masnih kiselina pri čemu α-linolenska kiselina zauzima između 36 i 55%. Slični udjeli dobiveni su i u radu Zhu i Dunford za *Picochlorum oklahomensis* (Zhu i

Dunford, 2013). Visoki udjeli heptadekanske kiseline bili su zabilježeni i u biomasi dobivenoj tijekom ovog uzgoja. Najviše vrijednosti zabilježene su 12. i 16. dan uzgoja i iznosile su 20.47%, odnosno 28.30%. Ulaskom kulture u stacionarnu fazu udio heptadekanske kiseline se smanjivao do konačnih 16.36%. Visoki udjeli palmitinske, linolne i oleinske kiseline (55-82%) čini ovu mikroalgu pogodnu za proizvodnju kvalitetnog biodizela pošto upravo one čine većinu masnih kiselina biodizela (Dahmen i sur., 2014). U drugoj fazi uzgoja došlo je do pada udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina od 55.47% (19.-ti dan) do 36.11% (26.-ti dan), i porasta jednostruko nezasićenih masnih kiselina sa 4.54% na 10.5%. Udio zasićenih masnih kiselina nije se značajno mijenjao tijekom vremena uzgoja i kretao se između 41.71% i 56.78%.

5.3.4. Optimizacija flokulacije

Završni korak svakoga bioprocesa je proces izdvajanja biomase i proizvoda. Najčešće korištene metode za izdvajanje biomase mikroalgi su centrifugiranje, filtracija i flokulacija (Chen i sur., 2011; Kawaroe i sur., 2016; Molina Grima i sur., 2002). Uzimajući u obzir visoke troškove povezane s izdvajanjem mikroalgalne biomase, posebice u industrijskom mjerilu, s ciljem pojeftinjenja cjelokupnog procesa kultivacije mikroalgi u ovome radu istraženo je izdvajanje biomase flokulacijom. Flokulacija je široko prihvaćena kao jedna od obećavajućih i jeftinijih metoda izdvajanja mikroalgalne biomase u velikom, odnosno industrijskom mjerilu (Lama i sur., 2016; Molina Grima i sur., 2002; Vandamme i sur., 2016). Flokulacija je metoda kojom se individualne mikroalgalne stanice povezuju u veće agregate odnosno flokule koje se potom mogu jednostavno izdvojiti samim djelovanjem gravitacijske sile (sedimentacija i dekantiranje ili flotacija ili centrifugiranje) ili pak filtracijom (npr. pomoću membranskih filtera). Mikroalgalne stanice su u pravilu negativno nabijene što sprječava njihovu agregaciju u hranjivom mediju. Neutralizacijom naboja na površini stanica dodatkom različitih flokulanata uključujući multivalentne katione (npr aluminijev sulfat, željezov klorid, kalcijev oksid, natrijev oksid) i kationske polimere (hitozan, poliakrilamid, poli-željezov sulfat) može se potaknuti flokulacija. U ovome radu ispitana je mogućnost flokulacije promjenom pH vrijednosti kulture, dodatkom željezovog klorida i hitozana, te je ispitana i mogućnost bioflokulacije pomoću peleta plijesni *Mortierella isabellina*. Budući da je flokulacija posebice osjetljiva na pH vrijednost i ionsku jakost medija za uzgoj te koncentraciji flokulanta, provedena je i optimizacija procesa flokulacije s obzirom na

navedene parametre. Za istraživanje flokulacije korištena je kultura mikroalge *Picochlorum* sp. D3, a flokulacija je provedena na način opisan u poglavlju 3.4.4.

5.3.5. Učinak pH na flokulaciju *Picochlorum* sp. D3

Flokulacija je uvelike uvjetovana pH vrijednosti algalne suspenzije, te prema literaturnim navodima alkalna sredina pogoduje brzom nastajanju mikroalgalnih flokula. Ovaj fenomen može se objasniti neutralizacijom negativno nabijenih mikroalgalnih stanica uslijed redukcije elektrostatičkog odbijanja (zeta potencijal) pri visokim pH vrijednostima što destabilizira stanice u suspenziji. Prednosti ove metode su i mogućnost ponovne upotrebe hranjivog medija za kultivaciju, neprisutnost drugih kemijskih tvari koje bi kontaminirale biomasu, niska cijena i mali utrošak energije za izdvajanje. Upravo iz tog razloga bioflokulacija se smatra dobrom alternativom za primjenu u industrijskom mjerilu u procesima izdvajanja mikroalgalne biomase. U ovome istraživanju istraženi su uvjeti flokulacije potpomognuti promjenom pH vrijednosti mikroalgalne suspenzije. Kao što je objašnjeno u poglavlju 3.4.4. istražena je flokulacija pri pH vrijednosti 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12. Vrijednost pH podešena je pomoću klorovodične kiseline i natrijevog hidroksida, a početna pH vrijednost kulture iznosila je 8.77. Rezultati su prikazani na slici 31. U skladu s literaturom najveća efikasnost flokulacije zabilježena je upravo na najvišim ispitanim pH vrijednostima 11 i 12. Nakon dva sata mirovanja došlo je do taloženja formiranih flokula, te je kod pH vrijednosti 11 istaloženo je 97.81% biomase, a kod pH vrijednosti 12 98.25%. Nakon 7 sati taloženja efikasnost taloženja kod obje pH vrijednosti bila je iznad 98%. Flokulacija se pokazala učinkovitom metodom izdvajanja unutar kratkom vremenskog perioda (2 h). Smanjenjem pH vrijednosti na 10 efikasnost taloženja bila je značajno niža te je nakon 7 sati uspješnost flokulacije bila svega 30.21%. Najniža vrijednost flokulacije postignuta je kod pH vrijednosti 9 koja je najbliža pH vrijednosti same kulture na kraju uzgoja (8.77) te je iznosila svega 17.83%. U kiselom području efikasnost flokulacije je bila nešto bolja nego u neutralnom, ali i daleko lošija u odnosu na lužnato područje. Tako je kod pH vrijednosti 6 ona iznosila 38.16%, daljnjim smanjenjem pH na 4 pala je na 32.36%, te je potom na pH vrijednosti 2 iznosila 25.78%. Slična opažanja zabilježili su i Perez i suradnici ispitujući pH potaknutu flokulaciju kulture *Skeletonema costatum* i *Chaetoceros gracillis*. Za obje kulture gotovo potpuna flokulacije postignuta je kod visokih pH vrijednosti 11, 11.5 i 12. U kiselom području (pH 2-6) maksimalna postignuta uspješnost izdvajanja biomase mikroalgi iznosila je 60% što je više

nego za mikroalgu ispitivanu u ovome radu kod istih pH vrijednosti (Pérez i sur., 2017). Flokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. nije detaljno istraživana u literaturi. No, rezultati dobiveni u ovome radu u skladu su sa pronađenim literaturnim navodima. Tako je u radu Zhu i suradnika istražena flokulacija *Picochlorum oklahomensis* te je također dobivena efikasnost flokulacije veća od 97% pri pH vrijednostima iznad 11 (Zhu i sur., 2014). Na samu flokulaciju značajno utječu veličina stanica, gustoća kulture, kompozicija stanične stijenke te naboji koji su na njoj prisutni (Lubian, 1989). Pri visokoj pH vrijednosti dolazi do neutralizacije negativnog naboja na površini stanica što omogućuje njihovo povezivanje. Soli koje su prisutne u hranjivoj podlozi također mogu imati tendenciju taloženja pri visokim pH vrijednostima. Tako istaložene čestice soli mogu na sebe vezati stanice i na taj način pospješiti njihovo taloženje (Zhu i sur., 2014).

5.3.6. Optimizacija flokulacije *Picochlorum* sp. D3 pomoću hitozana

Flokulacija se odvija na osnovu tri različita mehanizma: neutralizacijom negativnog naboja na površini stanica, povezivanjem individualnih stanica ili formacijom taloga koji veže stanice na sebe i tako ih istaloži. Kako bi se istražio mehanizam flokulacije stanica pomoću flokulanta, primijenjen je biopolimer hitozan. Hitozan je jedan od najčešće korištenih bioflokulanata koji se za komercijalne svrhe proizvodi od hitina koji je otpadni produkt iz industrije morskih plodova kao što su rakovi, škampi i lignje. Ovaj kationski polielektrolit nastaje iz hitina djelomičnom deacetilacijom acetoamino grupa na C2 jedinici glukoze čime u uvjetima niskog pH nastaju pozitivno nabijene amino grupe. Primjenjuje se najčešće u obradi otpadnih voda. Prednosti hitozana su netoksičnost, nekorozivnost, biološka razgradivost, neškodljivost po ljudsko zdravlje, a primjenjuje se čak i u različite medicinske svrhe i kao dodatak u prehrambenim proizvodima (Blockx i sur., 2018; L. Zhu i sur., 2018). U staničnoj stjenci mnogih mikroalgi prisutni su polisaharidi slični hitinu pa dodatak hitina ne narušava kvalitetu biomase i ne ograničava njenu primjenu. (Blockx i sur., 2018). Već je dokazano kako je hitin učinkovit flokulant za izdvajanje slatkovodnih mikroalgi i to u relativno niskim dozama oko 10-ak mg L^{-1}. No rezultati istraživanja flokulacije hitozanom u morskoj vodi daju različite rezultate i brojni autori navode slabiju učinkovitost flokulacije (Bilanovic i sur., 1988; ’t Lam i sur., 2016). Zbog brojnih pozitivnih karakteristika hitozana, u ovom istraživanju ipak je odabran hitozan za ispitivanje flokulacije morske mikroalge *Picochlorum* sp. D3. Flokulacija je provedena na način opisan u poglavlju 3.4.6. Kao i u slučaju

istraživanja flokulacije željezovim kloridom, najprije je istražen širi raspon koncentracija hitozana u rasponu od 5 do 80 mg L^{-1} kako bi se odabrala optimalna koncentracija. Kao što je vidljivo na grafu (slika 32) najmanja učinkovitost flokulacije postignuta je kod najniže koncentracije hitozana od 5 mg L^{-1}. Potom je s većim koncentracijama hitozana rasla i učinkovitost flokulacije te je kod 10 mg L^{-1} hitozana iznosila 96.04%, a kod koncentracije 25 mg L^{-1} hitozana 98.16%. Daljnjim povećanjem koncentracije hitozana iznad 25 mg L^{-1} nije došlo do značajnog porasta u efikasnosti flokulacije te se zadržala na 98%. Koncentracija od 25 mg L^{-1} bila je najniža koncentracija hitozana kod koje je flokulacija bila najuspješnija pa je upravo ona odabrana u daljnjem istraživanju. Kao i u slučaju željezovog klorida, pH vrijednost ima veliki utjecaj i na flokulaciju hitozanom. Stoga su ispitane pH vrijednosti u rasponu od 7.5 do 9 uz koncentraciju hitozana od 25 mg L^{-1}. Budući da je hitozan pripremljen u 1%-tnoj otopini octene kiseline, pH kulture je podešen nakon dodatka hitozana. Najniža vrijednost učinkovitosti flokulacije bila je pri pH vrijednosti od 7.5 (slika 33). Povećanjem pH vrijednosti na 8 učinkovitost flokulacije je bila iznad 95%. S porastom koncentracije hitozana iznad 25 mg L^{-1} učinkovitost flokulacije bila je veća za manje od 1%. Ovakvi rezultati u sladu su sa saznanjima kako je flokulacija morskih mikroalgi hitozanom učinkovitija u uvjetima pH većeg od 7. Naime, hitozan je veoma efektivan flokulant kod slatkovodnih mikroalgi gdje je potrebna niska pH vrijednost. Tada su amino skupine hitozana pozitivno nabijene i time mogu stupiti u interakciju s negativno nabijenim stanicama mikroalgi. Na taj način nastaje most između mikroalgalnih stanica i dolazi do flokulacije. Rezultati flokulacije morskih mikroalgi su raznoliki pa tako neki autori navode kako hitozan nije učinkovit za njihovu flokulaciju što se pripisuje činjenici da su pozitivni naboji hitozana zaklonjeni visokom ionskom jakosti morske vode. To pak rezultira nastajanjem polimera čime se onemogućava povezivanje stanica i flokulacija (Bilanovic i sur., 1988; ’t Lam i sur., 2016). No, neki autori navode kako su proveli uspješnu flokulaciju morskih mikroalgi, ali primjenom pH vrijednosti viših od 7 (Farid i sur., 2013; Garzon-Sanabria i sur., 2013). Rezultati dobiveni u ovome istraživanju u skladu sa literaturom. Vrijednost pH 8 pokazala se kao optimalna za flokulaciju morske mikoalge *Picochlorum* sp. D3 izolirane iz Jadranskog mora. Hitozanom. Kako bi se koncentracija od 25 mg L^{-1} potvrdila kao optimalnom za odabranu pH vrijednosti u slijedećem koraku napravljeno je ispitivanje koncentracija hitozana od 12 do 25 mg L^{-1}. Efikasnost flokulacije unutar navedenog raspona ispitanih koncentracija kretala se od 13.55% do 19.80% što je značajno manje u usporedbi sa 97.53% dobivenih za koncentraciju hitozana od 25 mg L^{-1} (slika 34). Time su potvrđeni optimalni uvjeti za flokulaciju mikroalge *Picochlorum* sp. D3 koji uključuju koncentraciju hitozana od 25 mg L^{-1} i pH vrijednost 8.

5.3.7. Optimizacija flokulacije *Picochlorum* sp. D3 pomoću željezovog klorida

Flokulacija mikroalgalnih stanica može se provesti i dodatkom anorganskih koagulanata, a najčešće se koriste aluminijeve i željezove soli kao što su aluminijev sulfat, željezov sulfat i željezov klorid (Molina Grima i sur., 2002). Kao što je već spomenuto, mikroalgalne stanice nose na površini negativan naboj koji se dodatkom multivalentnih kationa može neutralizirati što će dovesti do povezivanja stanica. Multivalentne metalne soli učinkoviti su flokulirajući i koagulirajući agensi kao i multivalentne soli poput aluminijevih i željezovih koje su u širokoj primjeni u procesima obrade otpadnih voda (Molina Grima i sur., 2002). U ovome radu istražena je mogućnost flokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću željezovog klorida, te je provedena optimizacija s obzirom na koncentraciju flokulanta, vrijeme flokulacije i pH vrijednost mikroalgalne kulture kao što je opisano u poglavlju 3.4.5. Najprije je istražen učinak širokog raspona koncentracija željezovog klorida od 50 do 1200 mg L^{-1} te je potom odabran uži raspon ovisno o uspješnosti flokulacije. Pri tome je zadržana pH vrijednost kulture nakon uzgoja od 8.77. Kao što je vidljivo iz grafa prikazanog na slici 35 učinkovitost flokulacije bila je ispod 50% pri koncentracijama manjim od 600 mg L^{-1} $FeCL_3$. Kod koncentracije od 800 mg L^{-1} učinkovitost je bila nešto veća (64.79%), a pri koncentracijama većim od 1000 mg L^{-1} učinkovitost je bila veća od 85%. Maksimalna vrijednost od 95.69% postignuta je pri koncentraciji od 1200 mg L^{-1}. To je značajno veća koncentracija $FeCL_3$ navedena vrijednost za flokulaciju *Chlorella* sp. od 143 mg L^{-1} pri pH 8.1 i vremenu taloženja od 40 min (Sanyano i sur., 2013). S obzirom na dobivene rezultate za daljnju optimizaciju procesa odabran je raspon koncentracija željezovog klorida od 1000 do 1500 mg L^{-1}. Sve odabrane koncentracije bile su istražene pri pH vrijednostima 5, 7, 8 i 9, a rezultati su prikazani na slici 36. Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako pH vrijednosti iznad 8 pogoduju flokulaciji *Picochlorum* sp. D3 i to kod nižih primijenjenih koncentracija samog flokulanta. Kod pH vrijednosti 9 zabilježene su maksimalne vrijednosti efikasnosti flokulacije za svaku istraženu koncentraciju željezovog klorida. Najveća učinkovitost od 96.66% zabilježena je za pH vrijednost 9 uz koncentraciju željezovog klorida od 1100 mg L^{-1}. S povećanjem koncentracije željezovog klorida efikasnost opada te je kod 1500 mg L^{-1} iznosila 52.98%. Najviša istražena koncentracija željezovog klorida (1500 mg L^{-1}) ujedno je bila najmanje efikasna kod svih istraženih pH vrijednosti, a najmanja je bila pri pH 5 kod koje nije došlo do flokulacije (0.06%). Vrijednost pH=5 pokazala se najmanje pogodnom za flokulaciju ove mikroalge te su postignute učinkovitosti bile u rasponu od svega 1.98% (1300 mg L^{-1}) do maksimalnih 6.37% (1100 mg L^{-1}). Porastom pH vrijednosti na 7 učinkovitost flokulacije

kretala se od 15.42% (1500 mg L^{-1}) do 27.77% (1100 mg L^{-1}) s istim trendom pada pri većim koncentracijama flokulanta. Veće koncentracije flokulanta usporavale su nastajanje flokula što je vjerojatno uzrokovano suviškom pozitivnog naboj oko stanica koji dovode do destabilizacije stanica u suspenziji (Saramma i Saseendran, 2018). Pri koncentraciji željezovog klorida od 1100 mg L^{-1} i pH vrijednosti 8 postignuta je gotovo 95% učinkovitost izdvajanja biomase mikroalge *Picochlorum* sp. D3 što je neznatno manje u odnosu na vrijednost dobivenu kod pH 9 za istu koncentraciju. Iz tog razloga istražena je i učinkovitost flokulacije kulture nakon uzgoja bez korekcije pH vrijednosti. Vrijednost pH bila je u rasponu od 8 do 9 nakon dodatka željezovog klorida u koncentraciji od 1100 mg L^{-1}. Pri tim uvjetima dobivena je učinkovitost flokulacije od 91.54% nakon 30 minuta taloženja. Prednost je u tome što nije bio potreban dodatan utrošak lužine ili kiseline za podešavanje pH vrijednosti, a učinkovitost flokulacije bila je iznad 90%. Nedostatak primjene željezovog klorida za flokulaciju je u tome što se željezo taloži zajedno sa biomasom i na taj način ju onečišćuje ograničavajući mogućnost njene daljnje upotrebe. Osim toga kod primjene željezovog klorida može se primijetiti promjena boje biomase što ukazuje na promjenu kvalitete biomase. Slična pojava primijećena je i kod flokulacije *Nannochloropsis salina* pomoću željezovog klorida (Saramma i Saseendran, 2018). Naime, ovakvi kemijski flokulanti mogu negativno reagirati s tvarima prisutnim u biomasi kao što su proteini, škrob i lipidi, ograničavajući time njihovu primjenu u prehrambene svrhe.

5.1.1. Bioflokulacija mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina*

Bioflokulacija primjenom živih mikroorganizama predstavlja alternativan način izdvajanja biomase mikroalgi. Prednosti ovog načina izdvajanja biomase je izostanak kemijskih tvari koji onečišćuju biomasu mikroalgi te su energentske potrebe procesa male. Najčešće se kao bioflokulanti primjenjuju različite bakterijske vrste i filamentozne plijesni upravo zbog njihovih adsorpcijskih karakteristika te male potrebe za energijom i visoke učinkovitosti adsorpcije. Bakterijski flokulanti nemaju negativan učinak na rast mikroalgalnih stanica i mogu se lako i jeftino izdvojiti te potom ponovno primjenjivati u procesu flokulacije. Filamentozne plijesni koje se koriste kao bioflokulanti (*Aspergillus fumigatus* i *Mucor circinelloides*) imaju često sposobnost nakupljanja lipida u udjelima od 10-15% u suhoj tvari biomase čime uz mikroalgalnu biomasu doprinose ukupnom prinosu lipida i povećavaju

isplativost procesa kod primjerice proizvodnje biodizela (Du i sur., 2018). U ovome radu istražena je mogućnost primjene bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 pomoću plijesni *Mortierella isabellina* (poglavlje 3.4.7.). Prvi korak bio je istražiti dolazi li do adsorpcije biomase mikroalgi na hife plijesni. U tu svrhu istražen je utjecaj dodatka tri različita omjera mase suhe tvari plijesni u mikroalgalnu kulturu: 1 g, 1.5 g i 2 g suhe tvari plijesni na 100 mL mikroalgalne kulture koncentracije 0.47 g L^{-1}. Tijek bioflokulacije u vremenu prikazan je na slici 38. Na temelju pretraživanja literature za bioflokulaciju je odabrana pH vrijednost 4 i ta vrijednost održavana je kroz prvih 2.5 h folokulacije. Budući da nije došlo do učinkovite adsorpcije mikroalgi na hife plijesni postupak je ponovljen kod niže pH vrijednosti. Kultura mikroalge je zakiseljena do pH 2 i ponovno je opažen pad vrijednosti optičke gustoće koji je ukazao na nastavak procesa bioflokulacije. Naime pH vrijednost utječe na zeta potencijal i plijesni i mikroalgalnih stanica odnosno na njihov površinski naboj. Za svaku kombinaciju mikroalge i plijesni potrebno je odrediti pH vrijednost pri kojoj su naboji površine stanica oba mikroorganizma suprotnog naboja tako da se međusobno privlače. Npr. kod pH vrijednost ispod 3.3 drastično poboljšava vezanje i bioflokulaciju mikroalge *Chlorelle* sp. s plijesni *Pleutotus ostreatus*, dok s pH vrijednostima iznad 6 površine oba mikroorganizma su negativne tako da se međusobno odbijaju (Luo i sur., 2019b). Iako u ovome radu nije određen zeta potencijali mikroalge *Picochlorum* sp. D3 i plijesni *Mortierella isabellina* dobiveni rezultati ukazuju kako niske vrijednosti pH također pospješuju bioflokulaciju i pogoduju vezanju stanica mikroalge na hife plijesni. Učinkovitost procesa bioflokulacije prikazan je na slici 38 iz koje je vidljivo kako je najveća učinkovitost bioflokulacije od 81.34 % postignuta dodatkom 1.5 g suhe tvari plijesni. Daljnjim povećanjem količine dodane biomase plijesni smanjila se učinkovitost bioflokulacije te je dodatkom 2 g suhe tvari plijesni ona iznosila 70.53%. Najmanje učinkovita bioflokulacija bila je uz dodatak 1 g L^{-1} suhe tvari plijesni pri čemu je izdvojeno samo 44.11% biomase mikroalge. S obzirom na dobivene rezultate za daljnji postupak uzeto je 1.5 g L^{-1} suhe tvari plijesni. U slijedećem koraku istražen je utjecaj pH vrijednosti na proces bioflokulacije.

Proveden je eksperiment pri pH vrijednostima 2, 2.5, 3 i 4 u kiselom području i pH vrijednostima 8, 9 i 10 u lužnatome području. Za svaki eksperiment dodano je 1.5 g L^{-1} suhe tvari plijesni na 100 mL kulture mikroalge koncentracije 0.47 g L^{-1} (poglavlje 3.4.4.). Rezultati prikazani na slici 39 pokazuju kako je tijek bioflokulacije u vremenu od 3.5 sati pri čemu se jasno vidi kako je najuspješnija flokulacija bila pri pH vrijednostima od 2.5 i 2. Vrijednost pH=2 ponovno se pokazala kao najpogodnija za proces bioflokulacije s

učinkovitošću od 80.58%, dok je daljnjim povećanjem pH za pola jedinice (pH=2.5) izdvojeno 72.65% biomase mikroalge (slika 39). Kod veće vrijednosti pH učinkovitost bioflokulacije je s zabilježenih 7.29% (pH 3) i 6.56% (pH 4) bila vrlo mala. Pri pH vrijednostima u lužnatom području nije došlo do adsorpcije mikroalge i hifa plijesni te bioflokulacija nije bila učinkovita (rezultati nisu prikazani). Vrijednost pH ima presudan utjecaj na površinska svojstva stanica kao što su raspodjela naboja i izlučivanje ekstracelularnih tvari koji mogu utjecati na učinkovitost bioflokulacije. Površina peleta plijeni pozitivno je nabijena, a površina većine mikroalgalnih stanica negativno uslijed prisustva amino, karboksilnih i fosfatnih skupina pri čemu je omogućeno njihovo povezivanje. Budući da zeta potencijal teži neutralnom pri nižim vrijednostima pH što dovodi do smanjenja elektrostatskog odbijanja i prevladavanja Van der Walsovih sila. Osim toga, niže pH vrijednosti pogodnije su za rast plijesni te ubrzavaju njihovu agregaciju (Leng i sur., 2021). No, ovako niska pH vrijednost potrebna za proces flokulacije nije pogodna za industrijsku primjenu. Osim potrebne veće količine kiseline postoji opasnost od korozivnog utjecaja na procesnu opremu. Stoga je u idućem koraku ispitano nekoliko omjera mase plijesni i mikroalge pri tri različite pH vrijednosti: 2, 2.5 i 3. Ispitani su i različiti omjeri mase mikroalga:plijesan: 1:5, 1:15, 1:25, 1:35, 1:50 [g g^{-1}]. Za svaki eksperiment uzeto je 100 mL mikroalgalne kulture sa 7.45 mg biomase mikroalge, u koju je potom dodana određena količina plijesni kako bi se dobio željeni omjer. Tijek bioflokulacije prikazan je na slici 40. Gledajući sve tri pH vrijednosti najveća učinkovitost bioflokulacije ostvarena je kod omjera masa 1:50 [g g^{-1}]. Kod pH= 2 učinkovitost je bila najveća sa 71.65% izdvojene biomase, nešto manja od 68.33% ostvarena je kod pH= 2.5, a kod pH= 3 bila je ispod 50%. Kod najviše istražene vrijednosti pH učinkovitost bioflokulacije za sve omjere masa bila je ispod 50%. S porastom omjera masa učinkovitost je rasla s 0.97% do 43.91% za pH= 3. Budući da je učinkovitost bioflokulacija kod ove pH vrijednosti veoma niska ova pH vrijednost nije pogodna za adsorpciju mikroalge *Picochlorum* sp. D3 na hife plijesni *M. isabellina*. Najučinkovitija bioflokulacija postignuta je kod pH vrijednosti 2. Razlika u učinkovitosti kod omjera 1:50 [g g^{-1}] pri pH= 2 i pH= 2.5 bila je mala. Taj omjer je potom primijenjen u slijedećem koraku optimizacije. Istražen je učinak temperature budući da i ona utječe na flokulaciju. Eksperiment je ponovljen za sve tri pH vrijednosti istražene u prethodnom koraku: 2, 2.5 i 3. Iz krivulje kinetike bioflokulacije (slika 41) može se primijetiti kako je najbrži pad vrijednosti optičke gustoće kulture mikroalge bio kod pH vrijednosti 2 i to nakon samo sat vremena. Ono što je također zamjetno je kako više temperature pogoduju procesu bioflokulacije pa su tako najučinkovitija bila pri temperature od 30 °C. Kod pH vrijednosti 3

na temperaturi od 30 °C postignuta je učinkovitost od 73.29% što je značajno veća vrijednost od one zabilježene u prethodnom eksperimentu. Osim toga, ta vrijednost je veća od one zabilježene kod optimalnog pH 2 prilikom flokulacije na sobnoj temperaturi (71.65%). Najučinkovitija bioflokulacija od 88.47% bila je kod pH vrijednosti 2 i temperature od 30 °C. Kod srednje pH vrijednosti od 2.5 postignuta je vrlo slična učinkovitost flokulacije kao kod pH 3 za istu temperaturu. Temperature od 30 °C pokazala se optimalnom za proces bioflokulacije mikroalge *Picochlorum* sp. D3 je što je u skladu s literaturnim podatcima, te je to ujedno i optimalna temperatura za rast mikroalge roda *Picochlorum* sp. (de la Vega i sur., 2011). No, za provođenje bioflokulacije kod ove temperature potrebno je utrošiti dodatnu energiju za zagrijavanje sustava dok za provođenje procesa pri 20 °C, odnosno pri sobnoj temperaturi, nije potrebno dodatno ulaganje za zagrijavanje čime se smanjuje utrošak energije za bioflokulaciju, no uz nešto manju učinkovitost. Na temelju provedenih eksperimenata može se utvrditi da su optimalni uvjeti za bioflokulaciju mikroalge *Picochlorum* sp. D3 izolirane iz Jadranskog mora i plijesni *Mortierella isabellina* slijedeći: pH vrijednost 2, temperatura 30 °C i maseni omjer biomase mikroalge i plijesni 1:50 [g g^{-1}].

5.2. Karakterizacija i optimizacija uzgoja izoliranih slatkovodnih mikroalgi

Budući da za razliku od morskih mikroalgi, puno veći broj slatkovodnih vrsta može rasti na organskim izvorima ugljika, karakterizacija izoliranih slatkovodnih mikroalgi bila je usmjerena ispitivanju mogućnosti miksotrofnog i heterotrofnog načina rasta. Ovaj način uzgoja pokazuje brojne tehnološke prednosti pred fotoautotrofnom kultivacijom uključujući znatno veće prinose biomase, a time i proizvoda što sve povećava isplativost procesa. To je osobita prednost pogotovo ukoliko se mogu koristiti jeftini pa čak i otpadni organski izvori ugljika. Iz tog razloga najprije je provedeno ispitivanje sposobnosti rasta tri izolirane slatkovodne mikroalge, *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3 na različitim izvorima ugljika. Preliminarna istraživanja učinka različitih izvora ugljika na rast mikroalgi omogućila su odabir najpogodnijeg soja i supstrata za daljnju optimizaciju. Budući da na rast i sintezu željenog produkta uvelike utječe molarni omjer ugljika i dušika, ispitan je njegov učinak na rast i biosintezu rezervnih makromolekula. Poznato je kako limitacija dušikom pri višim omjerima C:N potiče njihovu akumulaciju u stanicama mikroalgi. Također, u istu svrhu ispitan je zajednički utjecaj povišene koncentracije izvora ugljika i anorganskih soli te temperature. Istraživanje je također koncipirano na nizu

eksperimenata koji uključuju i postepeno povećanje mjerila, a odabir uvjeta kultivacije temeljio se na saznanjima dobivenim prethodnim eksperimentom. Naposlijetku je proveden i heterotrofni šaržni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u laboratorijskom fotobioreaaktoru volumena 2 litre. Rast mikroalge praćen je kao što je opisano u poglavlju 3.5.1. i 3.5.3., te su iz promjene optičke gustoće kulture, koncentracije stanica i biomase dobivene krivulje rasta. S obzirom da se sastav biomase mijenja ovisno o fazi rasta i uvjetima kultivacije također su promatrane kvalitativne i kvantitativne promjene komponenata stanice tijekom kultivacije. Na kraju ispitana je i mogućnost bioflokulacije mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 pomoću plijesni *Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina* kao alternativni način izdvajanja biomase.

5.2.1. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim izvorima i koncentracijama ugljika

Mogućnost rasta na organskom izvoru ugljika tri izolirane slatkovodne mikroalge *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3 na različitim izvorima ugljika ispitana je u dva uvjeta: uz prisutnost svijetla (miksotrofni uvjeti) i bez prisustva svjetlosti (heterotrofni uvjeti). Ukupno je ispitano dvanaest različitih izvora ugljika: glukoza, fruktoza, saharoza, melasa, glicerol, ksiloza, maltoza, arabinoza, galaktoza, laktoza, celobioza te octena kiselina. Kontrolna podloga bila je izvorna BBM podloga bez dodanog organskog izvora ugljika. Na slikama 43 i 44 prikazan je prirast biomase tijekom miksotrofnog i heterotrofnog uzgoja pojedinog soja na različitim izvorima ugljika te njihova usporedba s kontrolom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost optičke gustoće paralela. Za miksotrofnu i heterotrofnu kultivaciju mikroalgi kao izvor ugljika najčešće se upotrebljava glukoza. Budući da se razgradnjom jednog mola glukoze dobiju veće količine energije u odnosu na ostale izvore ugljika, rastom na glukozi postižu se i veće brzine rasta mikroalgi. Asmilacija glukoze u stanicama mikroalge *Chlorella vulgaris* ne iznenađuje, budući da je poznato da vrste iz roda *Chlorella* posjeduju inducibilni sustav za simport glukoze s H^+ ionima (Perez-Garcia i sur., 2011). Mnogi autori navode glukozu kao optimalan supstrat za rast ove vrste (da Silva i Fonseca, 2018; Daliry i sur., 2017; Sharma i sur., 2016). Iz rezultata ovoga istraživanja vidljivo je kako je miksotrofnom kultivacijom postignut veći porast optičke gustoće kulture. To je u skladu s literaturnim navodima pa su takav trend uočili i Scarsella i

sur. (2010) uspoređujući produktivnost sinteze biomase u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima (Scarsella i sur., 2010). Sojevi *Chlorococcum* sp. i *Tetradesmus obliquus* S3 značajno su slabije rasli na glukozi u miksotrofnim uvjetima u odnosu na soj *Chlorella vulgaris* S2. No, kada se gleda heterotrofna kultivacija, prirast *Chlorococcus* sp. S1 veći je nego u preostala dva ispitana soja. Tijekom heterotrofnog rasta u mikroalgama dominira razgradnja glukoze pentoza-fosfatnim putem, a njegov veći metabolički fluks u odnosu na Embden-Meyerhof-Parnas-ov put koji je aktivan u prisustvu svjetlosti može objasniti značajniji rast ovoga soja u tim uvjetima. Od svih ispitanih heksoza, uz glukozu jedino se galaktoza pokazala prikladnim izvorom za miksotrofni rast soja *Chlorella vulgaris* S2, dok je rast preostala dva soja na ovom izvoru izostao. Rast je u značajno manjoj mjeri zabilježen i u heterotrofnim uvjetima što potvrđuju rezultati ranijih istraživanja (Dvorakova-Hladka, 1967). Kod ispitivanih disaharida jedino je na fruktozi zabilježen rast i to samo soja *Clorococcum* sp. S1. Rast je zabilježen i u miksotrofnim i u heterotrofnim uvjetima, a kod preostala dva okarakterizirana soja rast na ovom izvoru ugljika nije zabilježen. Zanimljivo je kako je rast *Chlorella vulgaris* S2 nije zabilježen na saharozi u heterotrofnim uvjetima, ali je prisutan na melasi. Naime, melasa šećerne repe sadrži saharozu, no uz nju prisutne su i manje količine glukoze i fruktoze. Osim toga ova kompleksna podloga ujedno je i bogat izvor dušika, vitamina i mineralnih tvari koje također podupiru mikroalgalni rast. Soj *Tetradesmus obliquus* S3 pokazao je najmanju prilagodljivost na različite izvore ugljika pa je tako slabi rast zabilježen samo kod glukoze, arabinoze te melase. Najpogodniji izvor za rast ove mikroalge bila je octena kiselina kod koje je zabilježen višestruko veći prirast u odnosu na kontrolu te sukladno literaturi podjednak rast tijekom miksotrofne i heterotrofne kultivacije (Dvorakova-Hladka, 1967). Rast na acetatu zahtijeva posjedovanje ključnih enzima glioksilatnog ciklusa - izocitrat liaze i malat sintetaze. Combres i sur. (1994) zamijetili su značajan porast aktivnosti izocitrat liaze tijekom heterotrofne kultivacije *Scenedesmus obliquus* (Combres i sur., 1994). Analogno, dodatak acetata fotoautotrofno uzgajanoj kulturi omogućio je povećanje specifične brzine rasta. Prema literaturi očekivan je veći porast soja *Tetradesmus obliquus* S3 na melasi (Vidotti i sur., 2014). Literatura navodi kako je za ovu mikroalgu zabilježen i zadovoljavajući rast na glukozi i celobiozi u heterotrofnim uvjetima, te glukozi, fruktozi, galaktozi, maltozi i celobiozi u miksotrofnim uvjetima (Dvorakova-Hladka, 1967). No, treba uzeti u obzir kako afinitet prema pojedinom izvoru ugljika značajno varira između vrsta unutar istoga roda te kako je uslijed agregacije stanica koja se javljala prilikom kultivacije ove mikroalge možda došlo do pogreške u mjerenju optičke gustoće. Acetat se također pokazao prikladnim izvorom ugljika za miksotrofnu kultivaciju *Chlorococcus* sp. S1 i *Chlorella vulgaris* S2. U stanicama

C. vulgaris izocitrat liaza eksprimira se konstitutivno, no glioksilatni ciklus funkcionalan je isključivo u prisustvu acetata (Perez-Garcia i sur., 2011). Budući da su mikroalge interesantne za proizvodnju biodizela, intenzivno se istražuje i primjena nusproizvoda iz industrije biodizela poput glicerola kao sirovine za uzgoj samih mikroalgi. No, u ovome istraživanju za sve ispitane mikroalgalne vrste rast na glicerolu kao izvoru ugljika je izostao. Rast je izostao i kod primjene laktoze i maltoze, što je u skladu i s literaturnim podatcima kako ove mikroalge pokazuju slab rast na ovim izvorima ugljika (Perez-Garcia i sur., 2011). Ova pojava vjerojatno je posljedica izostanka membranskih permeaza koje sudjeluju u transportu laktoze i maltoze u stanicu. Nemogućnost asimilacije saharoze kod *Chlorella vulgaris* S2 vjerojatno je povezana s izostankom ekstracelularnog enzima invertaze kod mikroalgi *C. vulgaris i Scenedesmus* sp. Iz rezultata se može primijetiti i kako pentoze inhibiraju rast svih ispitivanih sojeva.

Sljedeći korak u istraživanju bila je optimizacija koncentracije izvora ugljika, pa su za svaki ispitivani soj mikroalge odabrana tri izvora ugljika te je ispitan širi raspon koncentracija od 10 do 70 g L^{-1}. Kao pogodni izvori rasta za mikroalgu *Chlorella vulgaris* S2 dodatno su ispitani glukoza, galaktoza i octena kiselina, za mikroalge *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3 melasa, saharoza i octena kiselina. Optimizacija je provedena i za miksotrofne i za heterotrofne uvjete rasta. Postojan rast mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u miksotrofnim uvjetima zabilježen je pri koncentracijama glukoze od 10 do 50 g L^{-1} (slika 45). Pri višim koncentracijama primijećen je negativni utjecaj na rast najvjerojatnije uslijed inhibicije rasta supstratom. Isto je primijećeno i za galaktozu kao izvor ugljika. Gledajući uzgoj u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima, primjetno je kako prisustvo izvora svjetlosti pospješuje rast na organskim izvorima ugljika budući da su u miksotrofnim uvjetima zabilježene više vrijednosti optičke gustoće za sve istražene izvore ugljika i njihove koncentracije. Zamjetan prirast biomase ostvaren je tijekom uzgoja na octenoj kiselini do koncentracije od 10 g L^{-1}. Porastom koncentracije octene kiseline, dolazi do potpune inhibicije rasta. Nizak pH podloge omogućuje difuziju nedisocirane kiseline u stanicu, te njenu disocijaciju u citosolu. Ovaj efekt uočen je i kod ostalih sojeva. Kod uzgoja *Chlorococcum* sp. najveći rast zabilježen je kod melase kao izvora ugljika i to kod koncentracije od 35 g L^{-1} (slika 46). Povećanjem koncentracije iznad te vrijednosti rast je u potpunosti inhibiran što je prisutno i u miksotrofnim i u heterotrofnim uvjetima. Iako je rast ove mikroalge na saharozi pri višim koncentracijama (50 i 70 g L^{-1}) bio moguć, inhibicija je bila primjetna. Kod uzgoja u heterotorofnim uvjetima, rast na glukozi je za mikroalgu

Chlorococcum sp. S1 moguć u svim testiranim koncentracijama, ali je najveća vrijednost zabilježena kod koncentracija od 10 i 35 g L^{-1}. U odnosu na ostale sojeve, rast *Tetredesmus obliquus* S3. značajno je slabiji (slika 47). Najbolji rast zabilježen je na melasi kao izvoru ugljika i to uz najnižu koncentraciju (10 g L^{-1}), Inhibicija je primijećena na 35 g L^{-1} uz potpuni izostanak rasta na još višim koncentracijama. Osim toga, zabilježena je i inhibicija s porastom koncentracije melase iznad 10 g L^{-1} u heterotrofnim uvjetima. Rast na saharozi bio je moguć na svim ispitivanim koncentracijama, ali je on bio i značajnije slabiji u heterotrofnim uvjetima u odnosu na miksotrofne.

5.2.2. Uzgoj slatkovodnih mikroalgi na različitim koncentracijama izvora dušika

Na temelju prethodno dobivenih rezultata za nastavak istraživanja odabrana je *Chlorella vulgaris* koje je pokazala stabilan rast na širokom rasponu koncentracija glukoze pri miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima. Za normalan rast i funkcioniranje stanica, osim izvora ugljika važan je izvor fosfora i sumpora te izvor dušika. Budući da molarni omjer ugljika i dušika znatno utječe na rast i proizvodnju specifičnih metabolita pa je njegov učinak istražen u slijedećem koraku. Posebno se pratio učinak molarnog omjera ugljika i dušika na rast te nakupljanje rezervnog materijala, odnosno lipida i ugljikohidrata u stanicama. Krivulja rasta i promjena koncentracije glukoze prilikom uzgoja na različitim koncentracijama natrijevog nitrata kao izvora dušika (2 različita molarna omjera ugljika i dušika) prikazana je na slici 48. U tablici 51 prikazane su vrijednosti pokazatelja uspješnosti bioprocesa izračunate na kraju uzgoja. Pri nižim C:N [mol mol^{-1}] omjerima prirast biomase je veći, a sukladno tome i produktivnost sinteze biomase. Ujedno se može primijetiti i kako je razlika između prinosa pri različitim C:N [mol mol^{-1}] omjerima u heterotrofnim uvjetima veća nego u miksotrofnim. Vrijednost koeficijenta konverzije bila je podjednaka u svim uvjetima. Također, može se primijetiti i kako je veća potrošnja glukoze zabilježena pri manjim C:N [mol mol^{-1}] omjerima i kod miksotrofnog i kod heterotrofnog načina uzgoja budući da veća količina dušika omogućuje i veći rast mikroalgi, a time i veću potrošnju glukoze. Osim toga, praćena je i promjena sastava biomase s obzirom na udjele rezervnih makromolekula u biomasi s porastom molarnog omjera ugljika i dušika. Udio lipida u biomasi bio je veći kod većih C:N [mol mol^{-1}] omjera. To je u skladu sa prethodno potvrđenim kako koncentracija izvora dušika značajno utječe na biosintezu lipida, pa je tako u uvjetima niže koncentracije dostupnog

izvora dušika udio lipida bio veći. Osim toga, nešto veći udio zabilježen je kod miksotrofnog načina uzgoja. Udio ugljikohidrata se s povećanjem omjera smanjio, a heterotrofna kultivacija pogodovala je većim udjelima ugljikohidrata u biomasi, što ukazuje na moguću preferiranu sintezu ugljikohidrata fotosintezom (slika 49). Ovaj trend promjene udjela ugljikohidrata u skladu je s trendom promjene udjela lipida. Najzastupljeniji monosaharid u ugljikohidratima mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 bila je glukoza, što upućuje kako se ugljikohidrati najvjerojatnije pohranjuju u formi škroba, što je u skladu s literaturom (Dragone i sur., 2011). U manjim udjelima u kiselinskim hidrolizatima ove mikroalge zabilježeni su i šećeri ksiloza, galaktoza i arabinoza.

Kako bi se ispitala mogućnost daljnje optimizacije i poboljšanja procesa uzgoja mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 ispitan je utjecaj veće temperature i koncentracije mineralnih soli na rast. Tako je za potrebe daljnje optimizacije korištena BBM podloga koja je sadržavala dvostruku početnu koncentraciju mineralnih soli. Krivulje rasta prikazane su na slici 50, a pokazatelji uspješnosti procesa u tablici 52. Eksperiment je proveden s početnim koncentracijama glukoze od 20 i 50 g L^{-1}. Iz krivulja rasta može se primijetiti kako se s većim C:N [mol mol^{-1}] omjerom produljuje i lag faza rasta. Najveća koncentracija biomase kod početne koncentracije glukoze od 20 g L^{-1} postignuta je pri omjeru C:N [mol mol^{-1}] 50. Veća produktivnost ostvarena je pri omjeru C:N [mol mol^{-1}] 30 budući da je uzgoj kod nižeg C:N [mol mol^{-1}] omjera trajao duže uslijed veće količine dostupnog dušika. Ova razlika još je lakše uočljiva kod C:N [mol mol^{-1}] omjera 75 gdje je rast bio znatno sporiji kao i potrošnja supstrata, a tu je postignuta i najniža koncentracija biomase od 6.84 g L^{-1}. Prethodnim eksperimentom potvrđeno je kako koncentracija od 50 g L^{-1} glukoze ne inhibira rast mikroalge *Chlorella vulgaris* S2. Uzgojem na ovoj koncentraciji glukoze postignute su značajno veće koncentracije biomase na kraju uzgoja. Tako je kod omjera C:N [mol mol^{-1}] 50 postignuto 20.14 g L^{-1} biomase što je najveća koncentracija između svih ispitivanih uvjeta. Ono što je neobično je što je ova najveća koncentracija zabilježena za molarni omjer C/N 50, odnosno za uvjete niže koncentracije dušika. Za ovu koncentraciju glukoze, kod oba molarna omjera do ulaska u stacionarnu fazu došlo je nakon osmog dana uzgoja, što je najvjerojatnije posljedica iscrpljivanja dušika iz podloge. Kada bi se rezultati dobiveni kod početne koncentracije glukoze od 20 g L^{-1} i omjera C:N [mol mol^{-1}] 30 usporedili sa onima u istim uvjetima u prethodnom eksperimentu, može se primijetiti nešto veći rast kulture što se može pripisati višoj temperaturi, dvostrukoj koncentraciji soli ili pak njihovom zajedničkom pozitivnom djelovanju. Iako literatura navodi kako viši omjeri C:N [mol mol^{-1}] koji su bliski

uvjetima limitacije dušikom pogoduje nakupljaju lipida (Ikaran i sur., 2015) rezultati dobiveni u ovome istraživanju nisu u potpunosti u skladu s tim. Pa je tako najniži udio lipida zabilježen kod početne koncentracije glukoze od 20 g L^{-1} i C:N [mol mol^{-1}] omjera 75. Visoke koncentracije glukoze preostale u podlozi na kraju uzgoja također ukazuju kako ona nije utrošena na sintezu lipida. Zelene mikroalge mogu pohranjivati energiju u formi lipida, ali i u formi ugljikohidrata što je kod nekih vrsta preferirani način. Udio ugljikohidrata nije se značajno mijenjao između ispitivanih omjera kod obje koncentracije glukoze (slika 51). No, zamjetno je kako je taj sadržaj veći kod koncentracije glukoze od 20 g L^{-1} u odnosu na 50 g L^{-1}. Osim toga, u ovome eksperimentu udio ugljikohidrata bio je nešto veći od udjela lipida, što je suprotno rezultatima prethodnog eksperimenta (slika 52). Stoga se može zaključiti kako su uvjeti povišene koncentracije anorganskih soli i temperature pogodovale nakupljanju ugljikohidrata u stanicama mikroalge *Chlorella vulgaris* S2. S obzirom na utjecaj koncentracije glukoze na omjer udjela lipida i ugljikohidrata, vidljivo je kako visoka koncentracija glukoze pogoduje i usmjerava metabolizam mikroalge na pohranu viška ugljika u formi lipida, a manje u formi ugljikohidrata. Više vrijednosti C:N [mol mol^{-1}] omjera nisu u ovome slučaju pospješili akumulaciju ugljikohidrata, što nije u skladu s nekim literaturnim navodima (Ikaran i sur., 2015). Pozitivan učinak povećanja temperature i osmotskog pritiska na rast i akumulaciju ugljikohidrata spominje se i u literaturi (Markou i sur., 2012). Ipak, treba uzeti u obzir raspon vrijednosti temperature koji omogućuje nesmetan rast kulture. Osim na rast i sastav biomase, temperatura, koncentracija dušika, ugljika i drugih komponenata podloge ima utjecaja i na sastav masnih kiselina. Na slici 53 prikazan je profil masnih kiselina tijekom miksotrofne kultivacije na različitim C:N [mol mol^{-1}] omjerima i koncentracijama glukoze. Može se primijetiti kako je on po sastavu varirao između ispitivanih uvjeta. Najzastupljenije masne kiseline pri svim uvjetima bile su oleinska (C18:1 cis 9) i linolna (C18:2 cis 9,12) kiselina. Porast udjela oleinske kiseline u ukupnim metilnim esterima masnih kiselina s povećanjem omjera C:N [mol mol^{-1}] zabilježen je i u literaturi (Cho i sur., 2011). Osim prikazanih masnih kiselina, biomasa je u pojedinim slučajevima sadržavala neznatne količine C14:0, C14:1 cis 9, C15:1 cis 10 i C16:1 cis 9 čija ukupna suma nije prelazila 3 %. Osim toga može se primijetiti kako koncentracija izvora ugljika ima značajan utjecaj na omjer zasićenih, jednostruko nezasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina. Tako je omjer zasićenih i višestruko nezasićenih masnih kiselina u biomasi uzgojenoj pri 20 g L^{-1} glukoze uz omjer C:N [mol mol^{-1}] 30 bio gotovo podjednak, dok je za isti molarni omjer pri 50 g L^{-1} glukoze biomasa u većoj mjeri sadržavala jednostruko nezasićene masne kiseline. Ova pojava

zamijećena je i kod istraživanja utjecaja različitih koncentracija glukoze na druge vrste mikroalgi (Mitra i Mishra, 2018).

5.2.3. Šaržni heterotrofni uzgoj s pritokom supstrata mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 u fotobioreaktoru

Na temelju rezultata prethodnih eksperimenata odabran je optimalni C:N [mol mol^{-1}] omjer i koncentracija glukoze za uzgoj u većem mjerilu, odnosno u bioreaktoru laboratorijskog mjerila. Iako su prethodni eksperimenti provedeni u miksotrofnim uvjetima, za uzgoj u većem mjerilu odabran je heterotrofni uzgoj. Budući da izvor svjetlosti u tom slučaju nije bio potreban omogućena je primjena konvencionalnog bioreaktora s miješalom. Ovo je i tehnološki jednostavnije rješenje budući da nije potrebna posebna konstrukcija bioreaktora s osiguranim izvorom svjetlosti ili pak uvođenjem vanjskog izvora svjetlosti, te su time i troškovi cjelokupnog procesa manji. Uzgoj je vođen u dvije faze. U početnoj šaržnoj fazi naglasak je bio na postizanje visoke koncentracije biomase, a potom je uslijedila faza limitacije izvorom dušika u svrhu poticanja akumulacije lipida. Ovaj način uzgoja odabran je budući da veće količine dušika sastavnog građevnog elementa proteina, nukleinskih kiselina i nukleotidnih koenzima pospješuju rast mikroalgi. S druge strane, veće količine dušika u hranjivoj podlozi dovode do manjih udjela lipida u biomasi, stoga je s njegovim iscrpljivanjem u hranjivoj podlozi nastupila druga faza. Prva faza imala je za cilj proizvodnju što veće količine biomase, a u drugoj fazi limitacijom izvorom dušika metabolizam mikroalgi se usmjeravao u nakupljanje rezervnog materijala odnosno triacilglicerola. U drugoj fazi uzgoja zabilježen je i pad specifične brzine rasta. Uzgoj je ukupno vođen 236 h. Praćenje optičke gustoće kulture služilo je kao okvirni pokazatelj trenda rasta stanica, dok je najprecizniji pokazatelj rasta bila koncentracija biomase određena gravimetrijskom metodom (slika 54). Koncentracija biomase na kraju uzgoja iznosila je 19.32 g L^{-1} dok je ukupna produktivnost sinteze biomase bila 0.0747 g L^{-1} h^{1}. Koeficijent konverzije supstrata u biomasu iznosio je 0.3667 g g^{-1}. Izračunata produktivnost gotovo je deset puta viša u usporedbi s nekim literaturnim podatcima (Stephenson i sur., 2010). Specifična brzina rasta određena je za svaku pojedinu fazu rasta: u šaržnom dijelu procesa iznosila je 0.0182 h^{-1}, između prve i druge prihrane 0.0096 h^{-1}, odnosno 0.0064 h^{-1} nakon druge prihrane. Analogno, generacijsko vrijeme za pojedine faze bilo je 23.79 h, 46.42 h, odnosno 51.76 h. Međutim, iz krivulje rasta može se primijetiti izostanak eksponencijalne faze rasta (slika 54). Bioreaktori s

miješalom često se navode kako nisu pogodni za kultivaciju mikroalgi s obzirom na osjetljivost stanica na smična naprezanja, posebice na krajevima lopatica miješala (Wang i Lan, 2018). Linearnost krivulje rasta od 2. do 6. dana uzgoja potencijalni je pokazatelj povećanja udjela liziranih stanica s porastom koncentracije biomase u bioreaktoru. Tijekom uzgoja zamijećeno je povećanje intenziteta zelenog obojenja supernatanta, što je posebice bilo izraženo pri kraju eksponencijalne faze rasta što ukazuje na mogućnost velikog broja liziranih stanica. Dodatni doprinos tome je prirodni porast brzine odumiranja pri ulasku kulture u stacionarnu fazu rasta. Strelice na krivuljama označavaju trenutke prihrane glukozom, kako bi se osiguralo dovoljno izvora ugljika za sintezu rezervnog materijala. Stoga je i prihrana dodavana nakon ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta. Tijekom uzgoja praćena je i promjena udjela ugljikohidrata, lipida i proteina, koje su najzastupljenije makromolekule u sastavu biomase mikroalgi. Osim toga, praćen je i udio pigmenata i profil masnih kiselina. Uzorku izuzetom zadnji dan uzgoja određen je i sadržaj pepela u biomasi koji je iznosio 4%. Od ostalih komponenata biomase, čija količina nije određena analizom, udjelom bi najzastupljenije trebale biti nukleinske kiseline, međutim njihov udio ne prelazi 10 % (Finkel i sur., 2016). Određen udio proteina poprilično je nizak (slika 56). Moguć uzrok tome je neučinkovita ekstrakcija proteina. Problematika ekstrakcije intracelularnih proteina zelenih mikroalgi poznata je i u literaturi te je u korelaciji s rigidnošću njihovih staničnih stijenki (Barkia i sur., 2019) Ovdje je još važno uzeti u obzir kumulativne pogreške tijekom ekstrakcije i analize pojedinih molekulskih vrsta. Ugljikohidrati mikroalgi predstavljaju složenu skupinu dugolančanih razgranatih strukturnih polisaharida kao i zalihu rezervnih ugljikohidrata poput škroba (Mayers i sur., 2013). Ono što podupire tezu kako su proteini ipak činili značajniji udio u biomasi je i to što je kultura cijelo vrijeme uzgoja, tijekom obje faze zapravo rasla eksponencijalno, a poznato je kako se tijekom aktivnog rasta biomase najviše sintetiziraju proteini (slika 56). Putem fotosinteze mikroalge su u stanju akumulirati visoke količine ugljikohidrata, stoga je najveći udio i zabilježen na samom početku uzgoja kada je bioreaktor inokuliran miksotrofno uzgojenom kulturom. Napravljena je i analiza monosaharidnog sastava ugljikohidrata, te je glukoza bila najzastupljenija (slika 55). To ponovno upućuje na pretpostavku da ova mikroalga nakuplja ugljikohidrate u formi škroba u stanicama. Smanjenje udjela ugljikohidrata tijekom uvjeta limitacije izvorom dušika nije u skladu s literaturnim navodima (slika 55). Tako se udio ukupnih ugljikohidrata u biomasi smanjio s početnih 48.61% na 28.1% zabilježenih na kraju uzgoja. Uzrok ovakvom negativnom trendu može biti nedostatna količina glukoze tijekom prihrane budući da je koncentracija stanica u bioreaktoru u drugoj fazi uzgoja bila poprilično visoka. Osim toga, za

akumulaciju ugljikohidrata potrebne su i visoke količine izvora ugljika što u ovom slučaju nije bilo osigurano te su stanice vrlo brzo asimilirale glukozu u svrhu vlastitog održavanja. Uz glukozu u sastavu ugljikohidrata detektirane su i zanemarive količine ksiloze, galaktoze i arabinoze. Ugljikohidrati osim što predstavljaju rezervu energije najčešće pohranjenu u obliku škroba, važne su komponente stanične stijenke zelenih mikroalgi. Osnovni polimer pritom je celuloza, međutim mogu sadržavati manje udjele pentoza (Ho i sur., 2013b). Udio pentoza u staničnom hidrolizatu je u usporedbi s glukozom zanemariv. Udio lipida mijenjao se s promjenom koncentracije dušika te je bio u opadanju, osobito tijekom prve faze uzgoja kada su stanice bile u aktivnoj diobi te nisu nakupljale rezerve energije. U drugoj fazi može se primijetiti kako je udio lipida bio u blagom porastu nakon prihrane. Naime, izvor ugljika nužan je za sintezu lipida (D. Mitra i sur., 2012). No, dodana količina glukoze nije bila dostatna za intenzivniju akumulaciju lipida. Ubrzo nakon prihrane, zalihe lipid i ugljikohidrata počele su se trošiti s obzirom na potrebe brzo rastuće kulture za energijom nužnom za diobu stanica (kultura je održavana u eksponencijalnoj fazi rasta). Konačna koncentracija lipida u bioreaktoru iznosila je 3.01 g L^{-1}. Paes i sur. (2016) miksotrofnim šaržnim uzgojem s pritokom supstrata *Chlorella* sp. postigli su jednak udio lipida u biomasi iako je kultura održavana u uvjetima limitacije dušikom kroz posljednjih 6 dana uzgoja (Paes i sur., 2016). Također, sličan sadržaj lipida tijekom šaržnog uzgoja slatkovodne mikroalge *Chlorella* sp. uočili su Cheirsilp i Torpee (Cheirsilp i Torpee, 2012). Udio lipida određivan je pomoću dvije metode, a rezultati obje analize prikazani su na jednom grafu na slici 57. Dobiveni trend promjene udjela lipida identičan je kod obje metode iako su vrijednosti međusobno u blagom odstupanju. To se može objasniti time što kod ekstrakcije ukupnih lipida Bling i Dyer metode uz lipide zaostaju i ekstrahirani pigmenti i ostale nečistoće. Osim toga, „NREL metodom“ udio ukupnih lipida određen je kao ukupni esteri masnih kiselina, te je glicerol zaostao u polarnoj metanolnoj fazi. Slična pojava uočena je prilikom ekstrakcije lipida u drugim biološkim uzorcima (Dickey i sur., 2002). Chen i Johns (1991) proučavali su učinak aeracije na nakupljanje lipida u biomasi mikroalge *Chlorella sorokiniana* te su uočili negativan učinak na udio ukupnih lipida s porastom aeracije (Chen i Johns, 1995). Pretpostavlja se da porast aeracije dovodi do pojačanog katabolizma lipida u stanicama što je mogući razlog relativno niskog sadržaja lipida u biomasi *Chlorella vulgaris* u ovom slučaju. Na slici 58 prikazana je promjena udjela zasićenih (SFA), jednostruko nezasićenih (MUFA) i višestruko nezasićenih (PUFA) masnih kiselina tijekom uzgoja. Visok sadržaj svih masnih kiselina u prvim satima uzgoja jasan je pokazatelj da je u miksotrofno uzgojenom inokulumu njihov udio značajno viši. Nakon početne lag faze, udio zasićenih i višestruko nezasićenih

masnih kiselina postepeno se povećavao, dok se udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina smanjio. Porast višestruko nezasićenih masnih kiselina zabilježen je prije prve prihrane. Oleinska kiselina je bila najzastupljenija masna kiselina, a profil masnih kiselina značajno je varirao s promjenom uvjeta tijekom uzgoja. U prvim danima uzgoja, odnosno kada je količina dušika bila dostatna, dominiraju oleinska, linolna (C18:2 cis 9,12) i α-linolenska (C18:3 cis 9,12,15). Stearinska kiselina je od velike važnosti (C18:0) u biosintezi dugolančanih zasićenih i nezasićenih masnih kiselina. Njen neznatan udio upućuje na intenzivniju konverziju u korist povećanja udjela nezasićenih masnih kiselina s 18 C-atoma. Udio palmitinske kiseline (C16:0) bio je relativno konstantan tijekom čitavog uzgoja što je u skladu s literaturom (Stephenson i sur., 2010). U uvjetima limitacije dušikom tijekom posljednja tri dana uzgoja prevladavale su oleinska i linolna kiselina, pri čemu je udio linolne kiseline značajno porastao u odnosu na početak uzgoja. Suprotno je zabilježeno s α-linolenskom kiselinom čija se sinteza znatno smanjila u uvjetima limitacije dušikom na kraju uzgoja sukladno literaturi (Wang i sur., 2017). Međutim, u kasnoj eksponencijalnoj fazi dosegla je maksimalne vrijednosti. I ovdje se kao i u slučaju morskih mikroalgi može primijetiti prisutnost margarinske kiseline (C17:0) pri kraju uzgoja. U neznatnim količinama povremeno su bile su prisutne i C10:0, C11:0, C12:0, C14:0, C14:1 cis 9, C15:1 cis 10, C16:1 cis 10, C18:0, C24:0 te C24:1 cis 15. Udio proteina određen metodom po Bradfordu nije značajnije varirao tijekom uzgoja. Kretao se između 6.75 i 10.57% (slika 56). Mikroalga *C. vulgaris* općenito je poznata po visokom sadržaju proteina u biomasi, koji u uvjetima optimalne opskrbe nutrijentima iznosi oko 60%, a u uvjetima limitacije dušikom udio se smanjuje i do svega 20 % (Ho i sur., 2013b; Ikaran i sur., 2015). Rezultati dobiveni u ovome istraživanju nisu u skladu s literaturnim podatcima što može biti rezultat nedovoljno učinkovite ekstrakcije i nedovoljno precizne analize. Uz makromolekule koje čine sastavni dio biomase mikroalgi određen je i udio klorofila. Klorofil predstavlja komponentu bogatu dušikom, koja služi kao svojevrsna intracelularna zaliha dušika te omogućuje daljnji rast i održavanje stanica u uvjetima limitacije izvorom dušika (Benavente-Valdés et al., 2016). Porast udjela klorofila a i klorofila b ukazuje na asimilaciju izvora dušika iz podloge. To se može primijetiti i 7-og dana uzgoja kada je porastao udio klorofila s dodatkom prve prihrane koja je uz glukozu sadržavala i izvor dušika (slika 59). Budući da je druga prihrana dodana 9-tog dana uzgoja sadržavala samo glukozu, pad udjela klorofila nije neočekivan. Većina fotosintetskih organizama u stanju je sintetizirati klorofil i u uvjetima limitacije svjetlošću. Ova pojava izostaje kod mnogih odjeljaka koji su nastali sekundarnom endosimbiozom, što upućuje da je ovom evolucijskom događaju prethodio gubitak gena za sintezu klorofila u mraku. Enzim s ključnom ulogom u sintezi klorofila u

mraku je protoklorofilid oksidoreduktaza koji je neovisan o svjetlosti (Gálová et al., 2008). Ovaj enzim katalizira stereo-specifičnu redukciju u molekulama protoklorofilida, a nastali klorofilid brzo se konvertira u klorofil a. Klorofil b nastaje oksidacijom metilne grupe na 7. C-atomu klorinskog prstena prekursora klorofila a pomoću klorofilid a oksigenaze (Armstrong, 1998). To objašnjava pad udjela klorofila a uz istovremeni rast udjela klorofila b u šaržnom dijelu uzgoja. Ekspresija klorofilid a oksigenaze visoko je regulirana intenzitetom svjetlosti (Biswal i sur., 2012). Poznato je da zelene alge i biljke u uvjetima niskog intenziteta svjetlosti favoriziraju sintezu klorofila b. Klorofil b smatra se pomoćnim pigmentom u fotosintetskim organizmima. Njegova je osnovna funkcija prikupljanje i prijenos svjetlosne energije prema klorofilu a. Interkonverzija između klorofila a i b nudi algama mogućnost adaptacije na varijabilne uvjete svjetlosti. Ipak, fiziološko značenje ovih pigmenata tijekom heterotrofne kultivacije i dalje je nepoznato. Smanjenje omjera klorofila a/b može se pojasniti principima analognim višim biljkama. Naime, u uvjetima limitiranog sunčevog zračenja smanjenje omjera a/b može se smatrati vrstom adaptacije u svrhu maksimizacije efikasnosti apsorpcije svjetlosti, budući da pomoćni pigmenti proširuju raspon apsorpcije svjetlosti. Omjer a/b je tijekom posljednjih 5 dana uzgoja bio konstantan i iznosio je 0,7. Nagli porast udjela ukupnih klorofila u *C. vulgaris* prilikom iscrpljivanja glukoze iz hranjive podloge uočili su i Doucha i Lívanský (Doucha & Lívanský, 2012).

5.2.4. Uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni

Kao zadnji korak u ovome istraživanju, istražena je mogućnost izdvajanja biomase mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 bioflokulacijom uzgojem mješovite kulture mikroalge i plijesni. U te svrhe proveden je miksotrofni uzgoj mješovite kulture *Chlorella vulgaris* S2 i plijesni *Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus* i *Mortierella isabellina* pri C:N [mol mol^{-1}] omjeru 30. Po završetku uzgoja kultura je razdvojena na dvije frakcije. Prvu su činili peleti plijesni s adsorbiranim stanicama mikroalgi, a drugu neadsorbirane stanice mikroalgi (slika 60.). Budući da je generacijsko vrijeme mikroalgi također dugo, te bi plijesni vrlo lako prerasle mikroalgalnu kulturu, kroz prvih 96 sati uzgoja uzgajana je samo mikroalgalna kultura Ona je potom inokulirana suspenzijom spora plijesni s početnim omjerom 1:6000 [spore plijesni: stanice mikroalge] na način opisan u poglavlju 3.4.5.5. Prethodnim eksperimentima utvrđeno je kako lag faza kod *C. vulgaris* traje minimalno 1 dan. Budući da je plijesan *Mortierella isabellina* okarakterizirana sporijim rastom, testiran je i omjer spora plijesni i stanica

mikroalgi u omjeru 1:2700 što je na slici 60 označeno kao *M. isabellina**. Prilikom rasta mikroalge i plijesni u mješovitoj kulturi prisutna je supstratna kompeticija, naročito tijekom heterotrofnog uzgoja. Ukoliko je rast mikroalge i plijesni usklađen, ne dolazi do postizanja maksimalnog prinosa biomase ni jednog partnera, u usporedbi s rastom čistih kultura (Gultom i Hu, 2013). To je i vidljivo na slici 60, gdje se može primijetiti slabiji rast biomase u mješovitoj kulturi. Razlika u koncentracijama frakcija za dva načina uzgoja mješovite kulture mikroalge i plijesni *M. isabellina* dobar je primjer učinka početnog omjera stanica mikroalgi i spora plijesni na konačnu kompoziciju kulture. Brojevna nadmoć stanica mikroalgi u mješovitoj kulturi *M. isabellina** bila je presudna za rast plijesni koji je u pri omjeru 1:6000 gotovo u potpunosti izostao. Iz slike 60 također je vidljivo kako je adsorpcija stanica mikroalgi u svim testiranim kulturama bila relativno niska. Na slici 62 vidljiva je asocijacija *C. vulgaris* s tri ispitivana soja plijesni. Vizualno su peleti plijesni *A. fumigatus* i *M. isabellina** poprimili zelenu boju što ukazuje na vezanje mikroalge s hifama plijesni. Međutim, vidljiv je i velik broj stanica mikroalgi zaostalih u suspenziji. Morfologija nastalih peleta značajno se razlikovala. Prosječni promjer peleta *A. fumigatus* poraslih u mješovitoj kulturi iznosio je 2 mm. Kontrola koja je sadržavala isključivo čistu kulturu navedene plijesni sadržavala je pelete prosječnog promjera 4 mm. Kod ostalih ispitivanih sojeva formirale su se nepravilne flokule. S uzgojem je nastavljeno i nakon potpunog iscrpljivanja glukoze iz podloge. Plijesan *A. niger* posjeduje celulolitičke enzime (Kassim, 1982). Budući da se stanična stijenka mikroalge *C. vulgaris* sastoji od celuloze, hidroliza polisaharida omogućila je nastanak slobodnih šećera koji su bili supstrat za nastavak rasta plijesni te je do asocijaciju hifa i mikroalgi došlo tek nakon iscrpljivanja organskog ugljika iz podloge. Na slici 61 prikazan je udio ukupnih lipida u biomasi mješovite kulture. Najniži udio zabilježen je kod *A. fumigatus* koji je iznosio 23.47%, dok je u biomasi *M. isabellina* ta vrijednost bila gotovo dvostruka. To je u skladu s literaturnim podatcima koja plijesan *M. isabellina* svrstava u oleaginozne plijesni (Du i sur., 2019). Poznato je da tvorba stabilnih peleta nije karakteristična za plijesan *M. isabellina* (Hu i sur., 2013). To često ovisi o C:N [mol mol^{-1}] omjeru i vremenu kultivacije. U čistoj kulturi formirali su se peleti prosječnog promjera 1 mm koji su bili postojani tijekom čitavog vremena uzgoja. U mješovitoj kulturi peleti su bili nepravilnog oblika, a raspodjela veličine heterogena, te se promjer kretao od 0,5 do 5 mm. Najveći prinos lipida ostvaren je kultivacijom mješovite kulture plijesni *M. isabellina* i mikroalge *C. vulgaris* uz početni omjer spora i stanica 1:2700. U slučaju višestruko manjeg omjera, ko-kultivacija s istom plijesni rezultirala je značajno manjim prinosom lipida u odnosu na čistu kulturu plijesni. Iako u manjoj mjeri, pozitivan učinak na prinos lipida uočen

je i u mješovitoj kulturi mikroalge i plijesni *A. fumigatus*. Rezultati provedenog eksperimenta ukazuju na potrebu za optimizacijom procesa u svrhu boljeg razumijevanja interakcija fungalnog micelija i stanica mikroalgi. Prvenstveno se to odnosi na optimiranje početnog omjera stanica i spora. U literaturi se mogu pronaći primjeri uspješne bioflokulacije mikroalge *C. vulgaris*, kao i mnogih drugih vrsta provesti pomoću plijesni *A. fumigatus* (Wrede i sur., 2014). Ovim eksperimentom dokazan je princip bioflokulacije, međutim potrebno je daljnje istraživanje i definiranje uvjeta pri kojima dolazi do nastajanja peleta. Također, važno je istražiti širi raspon potencijalnih partnera sa svrhom usklađivanja brzina rasta mikroorganizama u mješovitoj zajednici. Rezultat adekvatne optimizacije bila bi povećana učinkovitost izdvajanja stanica mikroalgi, te uzajamno potpomognuta biosinteza lipida.

.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog doktorskog rada može se zaključiti slijedeće:

1. U ovome istraživanju izolirano je i identificirano pet morskih mikroalgi i jedna cijanobakterijska vrsta, te je provedena njihova karakterizacija. Najveću specifičnu brzinu rasta ima mikroalgu *Picochlorum* sp. D3 (0.217±0.089 dan^{-1}) i dijatomeja *Nitzschia* sp. S5 (0.15±0.003 dan^{-1}), a najveća koncentracija suhe tvari biomase postignuta je za mikroalge *Tetraselmis* sp. Z3 (0.48±0.11 g L^{-1}) i *Tetraselmis* sp. C6 (0.45±0.04 g L^{-1}). Udio lipida je visok u biomasi dijatomeje *Nanofrustulum* sp. D1 što ju čini dobrim kandidatom za primjenu u industriji proizvodnje biodizela. Biomasa *Tetraselmis* sp. Z3 bogata je na višestruko nezasićenim masnim kiselinama uključujući visokovrijedne eikosapentaenoičnu kiselinu (EPA C20:5), dokosaheksaenoičnu kiselinu (DHA, C22:6) i alfa-linoleničnu kiselinu (ALA, C18:3) što čini ovu mikroalgu prihvatljivom zamjenom ribljim uljima. Sve karakterizirane mikroalge dobar su izvor proteina i pigmenata. Proteini su najzastupljenija makromolekula u biomasi svih istraženih mikroalgi s najvećim udjelom od 57.94 ±5.45% u mikroalgi *Tetraselmis* sp. C6. Sve izolirane mikroalge dobar su izvor proteina za prehranu ljudi i stoke. Karotenoidi su najzastupljeniji pigmenti s najvećim udjelom u zelenim mikroalgama (odjeljak Chlorophyta). Metanolni ekstrakti svih istraženih mikroalgi imaju umjerenu antioksidativnu aktivnost, te snažno inhibitorno djelovanje na rast patogenih bakterija, Gram-negativne *E. coli* i *S. typhimurium* i Gram-pozitivne *S. aureus*.

2. Povećanjem koncentracije makro i mikronutrijenata u f/2 hranjivoj podlozi raste koncentracija suhe tvari biomase i specifična brzina rasta dijatomeje *Nitzschia* sp. S5. Deseterostruko koncentrirana f/2 hranjiva podloga omogućuje najveći prinos biomase. Istraživanje utjecaja triju makronutrijenta (silicij, dušik i fosfor) na rast dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 pokazala su kako koncentracija silicija ima najveći utjecaj. Najveća koncentracija suhe tvari biomase postiže se pri 1 mM silicija u hranjivoj podlozi (0.49±0.09%), kao i najveća produktivnost sinteze biomase (37.61±2.92 mg $L^{-1}dan^{-1}$). Limitacija rasta izvorom dušika i fosfora potiče nakupljanje lipida u biomasi, dok suvišak izvora silicija ima suprotni učinak. Hranjiva podloga bogatija nutrijentima pogoduje sintezi dugolančanih masnih kiselina, a isto je zamijećeno i sa udjelom eikosapentaenoične kiseline u ukupnim lipidima dijatomeje koji je bio najveći pri omjerima $Si:N-NO_3:PO_4^{3-}$ [mmol:mmol:mmol] 5 i 6. Udio ugljikohidrata u biomasi

raste pri limitaciji rasta s izvorom dušika i silicija u hranjivoj podlozi. Proteini su najzastupljenija makromolekula u biomasi mikroalge, čiji udjel ovisi o koncentraciji izvora dušika. Nedostatak izvora dušika u hranjivoj podlozi značajno smanjuje udjel ove makromolekule u biomasi.

3. Optimalan omjer silicija, dušika i fosfora u hranjivoj podlozi za uzgoj dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 je omjer 3 (6.67:23.33:1 [mmol:mmol:mmol]) uz koji se postiže najveća koncentracija biomase od 0.73 g L^{-1} što je 2.64 puta veće (62.07%) u odnosu na šaržni uzgoj na optimiranoj f/2 podlozi, te 5.82 puta veće u odnosu na uzgoj na izvornoj f/2 podlozi. Veća koncentracija nutrijenata u hranjivoj podlozi pogoduje sintezi biomase, ali se negativno odražava na udjel lipida u biomasi koje je 3.1 puta niži u usporedbi s udjelom u biomasi uzgojenoj u izvornoj f/2 podlozi (2.48±0.19%). Šaržnim uzgojem dijatomeje *Nitzschia* sp. S5 s pritokom nutrijenata postiže se koncentracija suhe tvari biomase od 1.63 g L^{-1} što je 2.23 puta veća koncentracija biomase u odnosu na šaržni uzgoj u hranjivoj podlozi optimiranog sastava, te 5.82 puta veća u odnosu na uzgoj na izvornoj f/2 hranjivoj podlozi. Prihranjivanje nutrijentima pogodovalo je sintezi nezasićenih masnih kiselina, a najzastupljenije višestruko nezasićene masne kiseline u ukupnim lipidima su eikosapentaenoična i arahidonska masna kiselina.

4. Prihrana natrijevim bikarbonatom tijekom šaržnog uzgoja s pritokom mikroalge *Picochlorum* sp. D3 u otvorenom bazenu neznatno je povećala koncentraciju suhe tvari biomase u odnosu na uzgoj u izvornoj f/2 hranjivoj podlozi (0.515 g L^{-1} i 0.458 g L^{-1}) i udio lipida u biomasi (13.19% i 7.31%). Najzastupljenije masne kiseline u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. D3 su linolna (C18:2 cis 9, 12), α-linoleinska kiselina (C18:3 cis 9,12,15), palmitinska (C16:0) i heptadekanska (C17:0) masna kiselina. Zahvaljujući karakterističnom profilu masnih kiselina s velikim udjelom višestruko nezasićenih masnih kiselina, mikroalga *Picochlorum* sp. D3 može se koristiti kao dodatak prehrani. Zbog značajnog udjela heptadekanske kiseline (C17:0) ova mikroalga može se primijeniti u proizvodnji masnih kiselina s neparnim brojem ugljikovih atoma za koje je utvrđeno da imaju niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Najpogodniji omjer dušika i ugljika u hranjivoj podlozi za rast mikroalge *Picochlorum* sp. D3 odgovarao je onomu u izvornoj f/2 podlozi. Veći omjeri ugljika i dušika (C:N=13.52; 27.05 i 67.64 [mol mol^{-1}]) u hranjivoj podlozi nisu pogodovali

rastu u odnosu na izvornu f/2 hranjivu podlogu (9.27±0.74% i 5.48±1.31%). Najveći rast biomase postignut je pri šaržnom uzgoju uz pritok supstrata u barbotirajućoj koloni (0.9 g L^{-1}). Limitacija rasta izvorom dušika i fosfora pogoduje nakupljanju ugljikohidrata u biomasi mikroalge *Picochlorum* sp. D3 uz smanjenje udjela proteina i lipida.

5. Za učinkovitu samoflokulaciju (bez dodatka flokulanta) *Picochlorum* sp. D3 potreban je izrazito lužnati pH (učinkovitost 97.81% pri pH 11, te 98.25% pri pH 12) dok je za flokulaciju uz dodatak željezovog klorida i hitozana bila potrebna blago lužnata sredina (pH> 8). Najveća učinkovitost flokulacije željezovim kloridom (96.66%) postiže se pri koncentraciju od 1100 mg L^{-1} i pH 9 dok se najveća učinkovitost flokulacije hitozanom (97.53%) postiže pri koncentraciji od 25 mg L^{-1} i pH vrijednosti 8. Stanice mikroalge *Picochlorum* sp. D3 mogu se uspješno izdvojiti iz hranjive podloge nakon uzgoja adsorpcijom (bioflokulacijom) na hife plijesni *Mortierella isabellina*. Optimalna veličina peleta plijesni *Mortierella isabellina* za bioflokulaciju je 1.3155 ± 0.0635 mm. Maksimalna učinkovitost bioflokulacije od 88.47 %, postiže se pri masenom omjeru mikroalge i plijesni od 1:50 g g^{-1}, pH vrijednosti 2 i temperaturi 30 °C.

6. Sve istražene slatkovodne mikroalge (*Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3) rastu u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima. Šećeri ksiloza, maltoza, arabinoza, laktoza, celobioza, fruktoza i saharoza te glicerol nisu pogodni izvori ugljika za rast mikroalgi *Chlorella vulgaris* S2, *Chlorococcum* sp. S1 i *Tetradesmus obliquus* S3. Octena kiselina pri nižim koncentracijama (do 10 g L^{-1}) dobar je izvor ugljika za rast sve tri istražene mikroalge. Soju *Chlorella vulgaris* S2 pogoduju miksotrofni uvjeti rasta s glukozom i galaktozom kao izvorima ugljika pri koncentracijama do 50 g L^{-1}, nakon čega nastupa inhibicija rasta. Mikroalga *Chlorella vulgaris* S2 raste dobro na glukozi, galaktozi i octenoj kiselini, a slabije raste na fruktozi, melasi i celobiozi. Melasa je do koncentracija od 35 g L^{-1} dobar izvor ugljika za rast *Chlorococcum* sp. S1 i u heterotrofnim i u miksotrofnim uvjetima. Omjeri izvora ugljika i dušika u hranjivoj podlozi potiču u manjoj mjeri nakupljanje ugljikohidrata u biomasi *Chlorella vulgaris* S2, te produljenu lag fazu rasta mikroalge. Veći prinos biomase *Chlorella vulgaris* S2 ostvaruje se pri heterotrofnim uvjetima za razliku od miksotrofnih pri istim C:N omjerima [mol mol^{-1}]. Heterotrofnim šaržnim

uzgojem s pritokom supstrata *Chlorella vulgaris* S2 u dvije faze postiže se veća produktivnosti sinteze biomase mikroalgi u odnosu na šaržni uzgoj u istim uvjetima (0.0747 g L^{-1} h^{-1}). Limitacija izvorom dušika u drugoj fazi uzgoja pogoduje nakupljanju lipida u biomasi *Chlorella vulgaris* S2 te smanjenju udjela ugljikohidrata (s 48.6 na 28.1 %).

7. Uzgojem mješovite kulture mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 s plijesnima *Aspergillus niger* i *Aspergillus fumigatus* dolazi do adsorpcije stanica mikroalgi na hife plijesni te je moguće izdvajanje biomase mikroalgi bioflokulacijom. Omjer spora plijesni i stanica mikroalge ima značajan utjecaj na bioflokulaciju mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 s plijesni *Mortierella isabellina*. Kod omjera spora plijesni *M. isabellina* i stanica mikroalge *C. vulgaris* S2=1:6000 nije došlo do bioflokulacije. Adsorpcija i bioflokulacija moguća je kod omjera spora plijesni *M. isabellina* i stanica mikroalge *C. vulgaris* S2 od 1:2700. Najučinkovitija bioflokulacija stanica mikroalge *Chlorella vulgaris* S2 postiže se s plijesni *Aspergillus niger*, ali je potrebna daljnja optimizacija procesa kako bi se poboljšala učinkovitost.

7. LITERATURA

1. Adams, C., Bugbee, B. (2014). Enhancing lipid production of the marine diatom Chaetoceros gracilis: Synergistic interactions of sodium chloride and silicon. *J. Appl. Phycol.* **26** (3), 1351–1357.
2. Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., i Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry* **165**, 300–306.
3. Alam, M. A., Xu, J. L., Wang, Z. (2020). Microalgae biotechnology for food, health and high value products. U *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*. Springer Singapore.
4. Almendinger, M., Saalfrank, F., Rohn, S., Kurth, E., Springer, M., & Pleissner, D. (2021). Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. *Algal Research* **53**.
5. Alverson, A. J. (2007). Strong purifying selection in the silicon transporters of marine and freshwater diatoms. *Limnol. Oceanogr.* **52** (4), 1420–1429.
6. Anahas, A. M. P., Muralitharan, G. (2018). Characterization of heterocystous cyanobacterial strains for biodiesel production based on fatty acid content analysis and hydrocarbon production. *Energ. Convers. Manage.* **157**, 423–437.
7. Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques* (Robert A. Andersen, Ed.). Elsevier Academic Press,.
8. Andersen, R., & Kawachi, M. (2005). Traditional microalgae isolation techniques. U: *Algal culturing techniques* (R. Andersen ured.), Elsevier Academic Press,. Str. 205–218.
9. Armstrong, G. A. (1998). Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **43** (2), 87–100.
10. Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A., & Pruthi, V. (2016). Synergistic dynamics of nitrogen and phosphorous influences lipid productivity in Chlorella minutissima for biodiesel production. *Biores. Techno.* **213**, 79-87.
11. Assunção, M. F. G., Amaral, R., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Ressurreição, S., Santos, S. D., Varejão, J. M. T. B., & Santos, L. M. A. (2017). Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *J. Appl. Phycol.* **29** (2), 865–877.
12. Babiak, W., & Krzemińska, I. (2021). Extracellular polymeric substances (EPS) as microalgal bioproducts: A review of factors affecting EPS synthesis and application in flocculation processes. *Energies*. **14** (13).
13. Baines, S. B., Twining, B. S., Vogt, S., Balch, W. M., Fisher, N. S., & Nelson, D. M. (2011). Elemental composition of equatorial Pacific diatoms exposed to additions of silicic acid and iron. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **58** (3–4), 512–523.
14. Balder, H. F., de Vogel, J., Jansen, M. C. J. F., Weijenberg, M. P., van den Brandt, P. A., Westenbrink, S., van der Meer, R. D., & Goldbohm, R. A. (2006). Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **15** (4), 717–725.
15. Barka, F., Angstenberger, M., Ahrendt, T., Lorenzen, W., Bode, H. B., & Büchel, C. (2016). Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum*

tricornutum. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids **1861** (3), 239–248.

16. Barkia, I., Saari, N., & Manning, S. R. (2019). Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. *Marine Drugs.* **17** (5). 4.
17. Barten, R. J. P., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Bioprospecting and characterization of temperature tolerant microalgae from Bonaire. *Algal Research* **50**. 102008.
18. Béchet, Q., Laviale, M., Arsapin, N., Bonnefond, H., & Bernard, O. (2017). Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity. *Biotechnol. Biofuels*, **10** (1), 136..
19. Beckmann, J., Lehr, F., Finazzi, G., Hankamer, B., Posten, C., Wobbe, L., & Kruse, O. (2009). Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in Chlamydomonas reinhardtii. *J. Biotechnol.* **142** (1), 70–77.
20. Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crc. Rev. Food Sci* **56** (13), 2209–2222.
21. Benavente-Valdés, J. R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J. C., Méndez-Zavala, A., & Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophycae species. *Biotechnology Reports* **10**, 117–125.
22. Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Kyomugasho, C., Jamsazzadeh Kermani, Z., Vandionant, S., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & van Loey, A. M. (2018). Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides. *Algal Research* **32**, 150–161.
23. Bhattacharjya, R., Kiran Marella, T., Tiwari, A., Saxena, A., Kumar Singh, P., & Mishra, B. (2020). Bioprospecting of marine diatoms Thalassiosira, Skeletonema and Chaetoceros for lipids and other value-added products. *Biores. Technol.***318,** 124073.
24. Bilanovic, D., Shelef, G., & Sukenik, A. (1988). Flocculation of Microalgae with Cationic Polymers-Effects of Medium Salinity. *Biomass* **17**, 65-76.
25. Bishop, N. I. (1971). Photosynthesis: The electron Transport system of green plants. *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 197-226.
26. Biswal, A. K., Pattanayak, G. K., Padney, S. S., Leelavathi, S., Reddy, V. S., & Govindjee, T. B. C. (2012). Light Intensity-Dependent Modulation of Chlorophyll b Biosynthesis and Photosynthesis by Overexpression of Chlorophyllide a Oxygenase in Tobacco. *Plant Physol.* **159**, 433–449.
27. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *The National Research Council Od Canada*, **37** (8), 911-917.
28. Blockx, J., Verfaillie, A., Thielemans, W., & Muylaert, K. (2018). Unravelling the Mechanism of Chitosan-Driven Flocculation of Microalgae in Seawater as a Function of pH. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* **6** (9), 11273–11279.
29. Boopathy, A. B., Jayakumar, T., Chinnasamy, S., Rajaram, M. G., Mohan, N., Nagaraj, S., Rengasamy, R., Manubolu, M., Sheu, J. R., & Chang, C. C. (2020). Biomass and Lipid Production Potential of an Indian Marine Algal Isolate *Tetraselmis striata* BBRR1. *Energies* **13** (2), 341.

30. Borowitzka, M. (2005). Culturing Microalgae in Outdoor Ponds. U: *Algal Culturing Techniques* (R. Andersen ured.), Elsevier Academic Press.Cambridge, str. 205–218.

31. Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* **25** (3), 743–756.

32. Borowitzka, M. A. (2018). Biology of microalgae. U: *Microalgae in Health and Disease Prevention*. (Levine, I., Fleurence, J., ured.) Elsevier, Cambirdge, str. 23–72.

33. Botte, P., d'Ippolito, G., Gallo, C., Sardo, A., & Fontana, A. (2018). Combined exploitation of CO2 and nutrient replenishment for increasing biomass and lipid productivity of the marine diatoms Thalassiosira weissflogii and Cyclotella cryptica. *J. Appl. Phycol.* **30** (1), 243–251.

34. Bozzo1, G. G., Colman1, B., & Matsuda2, Y. (2000). Chlorella kessleri. *J. Exp. Bot.* **51** (349).

35. 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.

36. Brown, M. R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Mar. Biol. Ecol*. **145**, 91-113.

37. Bruckner, C. G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B., & Kroth, P. G. (2008). Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: Phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. *Appl. Environ. Microb.* **74** (24), 7740–7749.

38. Bušić, A., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Mardetko, N., Šantek, M. I., Komes, D., Novak, S., & Šantek, B. (2018). Recent trends in biodiesel and biogas production. *Food Technol. Biotech.* **56** (2), 152–173.

39. Cai, W., Dunford, N. T., Wang, N., Zhu, S., & He, H. (2016). Audible sound treatment of the microalgae Picochlorum oklahomensis for enhancing biomass productivity. *Biores. Technol.* **202**, 226–230.

40. Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Jpen-parenter enter.* **39**, 18S-32S.

41. Camacho-Rodríguez, J., Cerón-García, M. C., González-López, C. v., Fernández-Sevilla, J. M., Contreras-Gómez, A., & Molina-Grima, E. (2013). A low-cost culture medium for the production of Nannochloropsis gaditana biomass optimized for aquaculture. *Biores. Technol.* **144**, 57–66.

42. Cano, M., Karns, D. A. J., Weissman, J. C., Heinnickel, M. L., & Posewitz, M. C. (2021). Pigment modulation in response to irradiance intensity in the fast-growing alga *Picochlorum celeri*. *Algal Research*, **58**.

43. Carvalho, J. C. M., Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Ferreira-Camargo, L. S., & Sato, S. (2014). Microalgae bioreactors. U *Algal Biorefineries.* (Bajpal, R., Prokop, A., Zappi, M., ured.) Springer, Netherlands str. 83–126.

44. Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.* **57**, (4).

45. Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **73** (3), 203–266.

46. Cavalier-Smith, T. (2010). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.* **6** (3), 342–345.

47. Cerano, C., Cebrian, D., Moreno, S. R., & Bakran-Petricioli, T. (2015). Adriatic Sea: Description of the ecology and identification of the areas that may deserve to be protected. *Ed. RAC/SPA.*

48. Cheirsilp, B., & Torpee, S. (2012). Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Biores. Technol.* **110**, 510–516.

49. Chen, C. Y., Yeh, K. L., Aisyah, R., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Biores. Technol.* **102** (1), 71–81.

50. Chen, G. Q., Jiang, Y., & Chen, F. (2007). Fatty acid and lipid class composition of the eicosapentaenoic acid-producing microalga, *Nitzschia laevis*. *Food Chemistry* **104** (4), 1580–1585.

51. Chen, H. H., & Jiang, J. G. (2017). Lipid Accumulation Mechanisms in Auto- and Heterotrophic Microalgae. *J. Agri.Food Chem.* **65** (37), 8099–8110.

52. Cheng, J., Feng, J., Sun, J., Huang, Y., Zhou, J., & Cen, K. (2014). Enhancing the lipid content of the diatom Nitzschia sp. by 60Co-γ irradiation mutation and high-salinity domestication. *Energy*, **78**, 9–15.

53. Chen, F., & Johns, M. R. (1995). A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates. *J. Appl. Phycol.* **7**.

54. Chi, Z., O'Fallon, J. v., & Chen, S. (2011). Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol.* **29** (11), 537–541.

55. Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of Tetraselmis suecica in annular columns. *Aquaculture*, **261** (3), 932–943.

56. Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. In *Biotechnol. Adv.* 25 (3), 294–306.

57. Cho, S., Lee, D., Luong, T. T., Park, S., Oh, Y. K., & Lee, T. (2011). Effects of carbon and nitrogen sources on fatty acid contents and composition in the green microalga, Chlorella sp. 227. *J. Microbiol. Bio.* **21** (10), 1073–1080.

58. Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* **29** (6), 686–702.

59. Chu, W.-L., Phang, S.-M., & Goh, S.-H. (1996). Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. *J. Appl. Phycol* **8**, 389-396.

60. Chung, R. W. S., Leanderson, P., Lundberg, A. K., & Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **262**, 87–93.

61. Cointet, E., Séverin, E., Couzinet-Mossion, A., Méléder, V., Gonçalves, O., & Wielgosz-Collin, G. (2021). Assessment of the lipid production potential of six benthic diatom species grown in airlift photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **33** (4), 2093–2103.

62. Combres, C., Laliberte, J., Reyssac, S., & de la Noue, J. (1994). Effect of acetate on growth and ammonium uptake in the microalga Scenedesmus obliquus. *Physiologia Plantarum*, **91**, 729–734.

63. Conover, S. A. M. (1975). Partitioning of nitrogen and carbon in cultures of the marine diatom Thalassiosira fluviatilis supplied with nitrate, ammonium, or urea. *Mar. Biol.* **32** (3), 231–246.

64. Costa, J. A. V., & de Morais, M. G. (2013). An Open Pond System for Microalgal Cultivation. U: *Biofuels from Algae*. (Pandey, A., Lee, D.-J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.), Elsevier Inc. Burlington, str. 1–22.

65. Costa, M., Costa-Rodrigues, J., Fernandes, M. H., Barros, P., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2012). Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: A review on the implication of apoptosis. *Marine Drugs* **10** (10), 2181–2207.

66. Coulombier, N., Nicolau, E., le Déan, L., Antheaume, C., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2020). Impact of light intensity on antioxidant activity of tropical microalgae. *Marine Drugs* **18** (2).

67. Craggs, R. J., Lundquist, T. J., & Benemann, J. R. (2013). Wastewater treatment and algal biofuel production. U: *Algae for Biofuels and Energy*, (Borowitzka, M. A., Moheimani, N. R., ured.), Springer Netherlands, str. 153–163.

68. da Silva, A. A., & Fonseca, G. G. (2018). Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using a microplate assay. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, **40** (1).

69. da Silva Ferreira, V., & Sant'Anna, C. (2017). Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **33** (1).

70. Dahlin, L. R., Gerritsen, A. T., Henard, C. A., van Wychen, S., Linger, J. G., Kunde, Y., Hovde, B. T., Starkenburg, S. R., Posewitz, M. C., & Guarnieri, M. T. (2019). Development of a high-productivity, halophilic, thermotolerant microalga *Picochlorum renovo*. *Communications Biology* **2** (1).

71. Dahmen, I., Chtourou, H., Jebali, A., Daassi, D., Karray, F., Hassairi, I., Sayadi, S., Abdelkafi, S., & Dhouib, A. (2014). Optimisation of the critical medium components for better growth of Picochlorum sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *J. Sci. Food Agr.* **94** (8), 1628–1638.

72. D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **58**, 832–841.

73. Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. In *Global J. Environ. Sci.Managem.* **3** (2), 217–230.

74. de Jesus Raposo, M. F., de Morais, R. M. S. C., & de Morais, A. M. M. B. (2013). Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs*, **11** (1), 233–252.

75. de la Vega, M., Díaz, E., Vila, M., & León, R. (2011). Isolation of a new strain of Picochlorum sp and characterization of its potential biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, **27** (6), 1535–1543.

76. Debnath, C., Bandyopadhyay, T. K., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **150**.

77. Demirbas, A. (2009). Biofuels from agricultural biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, **31** (17), 1573–1582.

78. Demirel, Z., Imamoglu, E., & Dalay, M. C. (2017). *Nitzschia* sp. türünde yağ asidi kompozisyonunun taranması. *Turk. J. Biochem.* **42** (3), 273–277.

79. di Lena, G., Casini, I., Lucarini, M., & Lombardi-Boccia, G. (2019). Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food Res. Int.* **120**, 810–818.

80. Dickey, L. A., Teter, B. B., Sampugna, J., & Woods, L. C. (2002). Comparison of a Direct Transesterification Method and the Bligh and Dyer Method to Determine Fatty Acid Content in Striped Bass Tissues and Diet. *North American Journal of Aquaculture*, **64** (2), 158–163.

81. Dogaris, I., Brown, T. R., Loya, B., & Philippidis, G. (2016). Cultivation study of the marine microalga Picochlorum oculatum and outdoor deployment in a novel bioreactor for high-density production of algal cell mass. *Biomass Bioenerg.*, **89**, 11–23.

82. Doucha, J., & Lívanský, K. (2012). Production of high-density Chlorella culture grown in fermenters. *J. Appl. Phycol*, **24**, 35–43.

83. Dragone, G., Fernandes, B. D., Abreu, A. P., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2011). Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. *Applied Energy*, **88** (10), 3331–3335.

84. Du, Z. Y., Alvaro, J., Hyden, B., Zienkiewicz, K., Benning, N., Zienkiewicz, A., Bonito, G., & Benning, C. (2018). Enhancing oil production and harvest by combining the marine alga *Nannochloropsis oceanica* and the oleaginous fungus *Mortierella elongata*. *Biotechnology for Biofuels*, **11** (1).

85. Du, Z. Y., Zienkiewicz, K., Pol N. V, Ostrom, N. E., Benning, C., & Bonito, G. M. (2019). Algal fungal symbiosis leads to photosynthetic mycelium. *ELife*, 1–22.

86. Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* **16** (9), 389–406.

87. Dufourc, E. J. (2008). Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology*, **1**, 63–77.

88. Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Leroi, J.-M., & Jeffrey, S. W. (1994). *Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). Phytochemistry*, **35** (1), 155-161.

89. Duval, B., Shetty, K., & Thomas, W. H. (2000). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. of Appl. Phycol.* **11** (6), 559-566.

90. Dvorakova-Hladka, F. (1967). On the Catabolic Pathways of Sugars in Green Algae. *Biologia Plantarum*, **10** (1), 58–71.

91. Edgar, L., & Pickett-Heaps, J. D. (1983). The mechanism of diatom locomotion. I. An ultrastructural study of the motility apparatus. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **218**. 331-343.

92. Gálová, E., Šalgovičová, I., Demko, V., Mikulová, K., Ševčovičová, A., Slováková, Ľ., Kyselá, V., & Hudák, J. (2008). A short overview of chlorophyll biosynthesis in algae. *Biologia* , **63** (6), 947–951.

93. El-Kassas, H. Y. (2013). Growth and fatty acid profile of the marine microalga Picochlorum Sp. grown under nutrient stress conditions. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **39** (4), 233–239.

94. Encinas-Arzate, J. J., Marquez-Ríos, E., López-Elías, J. A., Torres-Areola, W., Huerta-Ocampo, J. Á., & Ramírez-Suárez, J. C. (2020). Effect of the deficiency of nitrate and silicate on the growth and composition of the benthic diatom *Navicula incerta*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, **48** (2), 280–286.

95. Fabregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B., & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, **42** (3–4), 207–215.

96. Falaise, C., François, C., Travers, M. A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., & Mouget, J. L. (2016). Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. *Marine Drugs*, **14** (9), 159.

97. Farid, M. S., Shariati, A., Badakhshan, A., & Anvaripour, B. (2013). Using nano-chitosan for harvesting microalga Nannochloropsis sp. *Bioresource Technology*, **131**, 555–559.

98. Feng, D., Chen, Z., Xue, S., & Zhang, W. (2011). Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, **102** (12), 6710–6716.

99. Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., & Otero, A. (2009). Enriching rotifers with "Premium" microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. *Marine Biotechnology*, **11** (5), 585–595.

100. Ferruzzi, M. G., & Blakeslee, J. (2007). Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. In *Nutrition Research*, **27** (1), 1–12.

101. Fidalgo, J. P., Cid, A., Torres, E., Sukenik, A., & Herrero, C. (1998). Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, **166**, 105-116.

102. Fields, M. W., Hise, A., Lohman, E. J., Bell, T., Gardner, R. D., Corredor, L., Moll, K., Peyton, B. M., Characklis, G. W., & Gerlach, R. (2014). Sources and resources: Importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98** (11), 4805–4816.

103. Finkel, Z. v., Follows, M. J., Liefer, J. D., Brown, C. M., Benner, I., & Irwin, A. J. (2016). Phylogenetic diversity in the macromolecular composition of microalgae. *PLoS ONE*, **11** (5).

104. Flynn, K. J., & Martin-Jézéquel, V. (2000). Modelling Si-N-limited growth of diatoms. *Journal of Plankton Research*, **22** (3), 447–472.

105. Foflonker, F., Ananyev, G., Qiu, H., Morrison, A., Palenik, B., Dismukes, G. C., & Bhattacharya, D. (2016). The unexpected extremophile: Tolerance to fluctuating salinity in the green alga *Picochlorum*. *Algal Research*, **16**, 465–472.

106. 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), 1–14.

107. Forouhi, N. G., Koulman, A., Sharp, S. J., Imamura, F., Kröger, J., Schulze, M. B., Crowe, F. L., Huerta, J. M., Guevara, M., Beulens, J. W. J., van Woudenbergh, G. J., Wang, L., Summerhill, K., Griffin, J. L., Feskens, E. J. M., Amiano, P., Boeing, H., Clavel-Chapelon, F., Dartois, L., … Wareham, N. J. (2014). Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: The EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, **2** (10), 810–818.

108. Fred Millie, D. (1984). *The effects of silica, nitrogen, and phosphorus limitation on the biochemical composition of Cyclotella meneghiniana Kütz: an experimental analysis*. 1–79.

109. Fu, Z., Piumsomboon, A., Punnarak, P., Uttayarnmanee, P., Leaw, C. P., Lim, P. T., Wang, A., & Gu, H. (2021). Diversity and distribution of harmful microalgae in the Gulf of Thailand assessed by DNA metabarcoding. *Harmful Algae*, **106,** 102063.

110. Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry*, **136** (2), 1055–1062.

111. Gao, G., Wu, M., Fu, Q., Li, X., & Xu, J. (2019). Bioresource Technology A two-stage model with nitrogen and silicon limitation enhances lipid productivity and biodiesel features of the marine bloom-forming diatom *Skeletonema costatum*. *Bioresource Technology*, **289**, 121717.

112. Gao, Y., Yang, M., & Wang, C. (2013). Bioresource Technology Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Bioresource Technology*, **147**, 484–491.

113. Garzon-Sanabria, A. J., Ramirez-Caballero, S. S., Moss, F. E. P., & Nikolov, Z. L. (2013). Effect of algogenic organic matter (AOM) and sodium chloride on *Nannochloropsis salina* flocculation efficiency. *Bioresource Technology*, **143**, 231–237.

114. Gašparović, B., Kazazić, S. P., Cvitešić, A., Penezić, A., & Frka, S. (2017). Corrigendum to "Improved separation and analysis of glycolipids by Iatroscan thin-layer chromatography–flame ionization detection". *Journal of Chromatography A*, **1521**, 168–169.

115. Ghazala, B., & Shameel, M. (2005). Phytochemistry and bioactivity of some freshwater green algae from Pakistan. *Pharmaceutical Biology*, **43** (4), 358–369.

116. Giraldo-Calderón, N. D., Romo-Buchelly, R. J., Arbeláez-Pérez, A. A., Echeverri-Hincapié, D., & Atehortúa-Garcés, L. (2018). Microalgae biorefineries: Applications and emerging technologies. *DYNA (Colombia)*, **85** (205), 219–233.

117. Girija, K., Hemalatha, A., Karthikeyan, P., Saranya, C., Anantharaman, P., & Sampathkumar, P. (2014). Effect of Nutrients on the growth and Biochemical Composition of the Marine Diatom, *Chaetoceros simplex* (Ostenfeld,1901). *International journal of phytopharmacy Research*, **5** (1), 30–35.

118. Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., de Brabanter, J., & de Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. App. Phycol.* **24** (6), 1477–1486.

119. Golbeck, J. H. (1994). *Photosystem I in Cyanobacteria*, Pringer, Dordrecht

120. Golob, J., Klinar, D., Šoštarič, M., Golob, J., Bricelj, M., Klinar, D., & Pivec, A. (2009). Studies on the Growth of Chlorella vulgaris in Culture Media with Different Carbon Sources. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **23** (4), 471-477.

121. Gonzalez-Esquer, C. R., Wright, K. T., Sudasinghe, N., Carr, C. K., Sanders, C. K., Turmo, A., Kerfeld, C. A., Twary, S., & Dale, T. (2019). Demonstration of the potential of *Picochlorum soloecismus* as a microalgal platform for the production of renewable fuels. *Algal Research*, **43**. 101658.

122. Grossmann, L., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2019). Cultivation and downstream processing of microalgae and cyanobacteria to generate protein- based technofunctional food ingredients. *Crit. Rev. Food Sci.* **60**, 1–29.

123. Guedes, A. C., Amaro, H. M., Gião, M. S., & Malcata, F. X. (2013). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chem.* **138** (1), 638–643.

124. Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., & Tremblin, G. (2008). Environmental factors affecting growth and omega 3 fatty acid composition in *Skeletonema costatum*. the influences of irradiance and carbon source. *Diatom Res.* **23** (1), 93–103.

125. Guihéneuf, F., Mimouni, V., Ulmann, L., & Tremblin, G. (2009). Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga *Pavlova lutheri* commonly used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **369** (2), 136–143.

126. Guillard, R. (2005). Purification Methods for Microalgae. U: *Algal Culturing Techniques*, (Andersen, R., ured.), Elsevier Academic Press, Cambridge, str. 117–132)

127. Gultom, S., & Hu, B. (2013). Review of microalgae harvesting via co-pelletization with filamentous fungus. *Energies*, **6** (11), 5921–5939.

128. Guo, B., Liu, B., Yang, B., Sun, P., Lu, X., Liu, J., & Chen, F. (2016). Screening of diatom strains and characterization of *Cyclotella cryptica* as a potential fucoxanthin producer. *Mar. Drugs*, **14** (7). 125.

129. Gupta, P. L., Lee, S. M., & Choi, H. J. (2015). A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World J. Microb. Biot.* **31** (9), 1409–1417.

130. Halim, R., Hosikian, A., Lim, S., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects. In *International Journal of Chemical Engineering*. 1-11.

131. Hallahan, B., & Garland, M. R. (2005). Essential fatty acids and mental health. *Brit. J. Psychiat.* **186**, 275–277.

132. Handa. (1969). Carbohydrate metabolism in the marine diatom. *Mar. Biol.*, **4**, 208–214.

133. Handayani, N. A., Ariyanti, D., & Hadiyanto, H. (2011). Potential Production of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae. *Internat. J. of Sci. Eng*, **2** (1), 13–16.

134. Haoujar, I., Cacciola, F., Abrini, J., Mangraviti, D., Giuffrida, D., el Majdoub, Y. O., Kounnoun, A., Miceli, N., Taviano, M. F., Mondello, L., Rigano, F., & Senhaji, N. S. (2019). The contribution of carotenoids, phenolic compounds, and flavonoids to the antioxidative properties of marine microalgae isolated from mediterranean Morocco. *Molecules*, **24** (22).

135. Haoujar, I., Cacciola, F., Manchado, M., Abrini, J., Haoujar, M., Chebbaki, K., Oteri, M., Rigano, F., Mangraviti, D., Mondello, L., Essafi, A., Chairi, H., & Senhaji, N. S. (2020). Isolation of microalgae from mediterranean seawater and production of lipids in the cultivated species. *Foods*, **9** (11), 1–13.

136. Heimann, K., & Huerlimann, R. (2015). Microalgal Classification: MajorClassesand Genera of CommercialMicroalgal Species. Major Classesand Genera of Commercial Microalgal Species. U: *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, (Se-Kwon, K., ured.), Academic Press, London, str. 25–41.

137. Henley, W. J., Major, K. M., & Hironaka, J. L. (2002). Response to salinity and heat stress in two halotolerant chlorophyte algae. *J. Phycol*, **38** (4), 757-766.

138. Hildebrand, M., Davis, A. K., Smith, S. R., Traller, J. C., & Abbriano, R. (2012). The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels*, **3** (2), 221–240.

139. Hillen, L. W., Pollard, G., Wake, L. v, & White, N. (1982). Hydrocracking of the Oils of Botryococcus braunii to Transport Fuels. *Biotechnol. Bioeng*. **24** (1), 193-205.

140. Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013a). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Biores. Technol.* **135**, 191–198.

141. Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013b). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Biores. Technol.* **135**, 157–165.

142. Holman, R. T., Johnson, S. B., & Kokment, E. (1989). Deficiencies of polyunsaturated fatty acids and replacement by nonessential fatty acids in plasma lipids in multiple sclerosis. *Medical Sciences*, **86** (12), 4720-4724.

143. Hu, B., Ruan, R., Zhang, J., & Zhou, W. (2013). *Microalgae Culture And Harvest* patent WO 2013/055887 A1.

144. Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., & Yang, C. (2017). Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering*, **3** (3), 318–329.

145. Ikaran, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., & Castañón, S. (2015). The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*, **10**, 134–144.

146. Jaramillo-Madrid, A. C., Ashworth, J., Fabris, M., & Ralph, P. J. (2019). Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, **163**, 46–57.

147. Jayasankar, R., & Valsala, K. K. (2008). Influence of different concentrations of sodium bicarbonate on growth rate and chlorophyll content of *Chlorella salina*. *Journal of the Marine Biological Association of India*, **50** (1), 74-78.

148. Jeffrey, S. W., Wright, S. W., & Zapata, M. (2012). Microalgal classes and their signature pigments. U: *Phytoplankton Pigments* (Roy, S., Llewellyn, C. A., Egeland, E. S., Johnsen, G., ured.) Cambridge University Press, United Kingdom, str. 3-77

149. Jeffryes, C., Rosenberger, J., & Rorrer, G. L. (2013). Fed-batch cultivation and bioprocess modeling of *Cyclotella* sp. for enhanced fatty acid production by controlled silicon limitation. *Algal Research* **2** (1), 16–27.

150. Jenkins, B., West, J. A., & Koulman, A. (2015). A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules* **20** (2), 2425–2444.

151. Jiang, X., Han, Q., Gao, X., & Gao, G. (2016). Conditions optimising on the yield of biomass, total lipid, and valuable fatty acids in two strains of Skeletonema menzelii. *Food Chem.* **194**, 723–732.

152. John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Biores. Technol.* **102** (1), 186–193.

153. Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies* **6** (9), 4607–4638.

154. Kassim, E. S. A. (1982). Cellulase Enzyme from Aspergillus niger. *Microbiol. Immunol*, **26**, 449–454.

155. Kassim, M. A., Kirtania, K., de La Cruz, D., Cura, N., Srivatsa, S. C., & Bhattacharya, S. (2014). Thermogravimetric analysis and kinetic characterization of lipid-extracted *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. *Algal Research*, ***6***, 39–45.

156. Kawaroe, M., Prartono, T., Sunuddin, A., & Saputra, D. (2016). Marine Microalgae *Tetraselmis suecica* as Flocculant Agent of Bio-flocculation Method. *HAYATI Journal of Biosciences* **23** (2), 62–66

157. Kaye, Y., Grundman, O., Leu, S., Zarka, A., Zorin, B., Didi-Cohen, S., Khozin-Goldberg, I., & Boussiba, S. (2015). Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous δ12 desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG. *Algal Research*, **11**, 387–398.

158. Keller, M. D., Seluin, R. C., Claus, W., & Guillard, R. R. L. (1987). Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton, *J. Phycol.* ***23***.

159. Kellogg, J., Esposito, D., Grace, M. H., Komarnytsky, S., & Lila, M. A. (2015). Alaskan seaweeds lower inflammation in RAW 264.7 macrophages and decrease lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. *J. Funct. Food.* **15**, 396–407.

160. Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* **17** (1), 1–21.

161. Khaw, K. T., Friesen, M. D., Riboli, E., Luben, R., & Wareham, N. (2012). Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: The EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Medicine*, **9** (7).

162. Khozin-Goldberg, I. (2016). Lipid Metabolism in Microalgae. U: *The Physiology of Microalgae* (Borowitzka, M. A., Beardall, J., Raven, J. A., ured.), Springer International Publishing, str. 413–484.

163. Klein Breteler, W. C. M., Schogt, N., & Rampen, S. (2005). Effect of diatom nutrient limitation on copepod development: Role of essential lipids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **291**, 125–133.

164. Koller, M., Muhr, A., & Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* **6**, 52–63.

165. Koller, M., Salerno, A., Tuffner, P., Koinigg, M., Böchzelt, H., Schober, S., Pieber, S., Schnitzer, H., Mittelbach, M., & Braunegg, G. (2012). Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: A review. *Journal of Cleaner Production* **37**, 377–388.

166. Ková, J., Klejdus, B., & Bač Kor, M. (2010). Physiological Responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C Light. *Photochem. and Photobiol.* **86** (3) 612–616.

167. Krasovec, M., Vancaester, E., Rombauts, S., Bucchini, F., Yau, S., Hemon, C., Lebredonchel, H., Grimsley, N., Moreau, H., Sanchez-Brosseau, S., Vandepoele, K., & Piganeau, G. (2018). Genome analyses of the microalga Picochlorum provide insights into the evolution of thermotolerance in the green lineage. *Genome Biol. Evol. 10* (9(, 2347-2365.

168. Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., & Strzalka, K. (2015). Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs* **13** (9), 5847–5881.

169. Kumar, S., Baweja, P., & Sahoo, D. (2016). Diatoms: Yellow or Golden Brown Algae. U: *The Algae World* (Sahoo, D., Seckbach J., ured.), Springer, Dordrecht, str. 235–258.

170. Kumaran, J., Jose, B., Joseph, V., & Bright Singh, I. S. (2017). Optimization of growth requirements of marine diatom Chaetoceros muelleri using Response Surface Methodology. *Aquac. Res.* **48** (4), 1513–1524.

171. Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., de Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V. F., Bretillon, L., Matute, C., Rodríguez-Puertas, R., Layé, S., & Manzoni, O. J. (2011). Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat. Neurosci.* **14** (3), 345–350.

172. Lal, A., Banerjee, S., & Das, D. (2021). Aspergillus sp. assisted bioflocculation of *Chlorella* MJ 11/11 for the production of biofuel from the algal-fungal co-pellet. *Sep. Purif. Technol.* **272**. 118320.

173. Lama, S., Muylaert, K., Karki, T. B., Foubert, I., Henderson, R. K., & Vandamme, D. (2016). Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation. *Biores. Technol.* **220**, 464–470.

174. Lauritano, C., Andersen, J. H., Hansen, E., Albrigtsen, M., Escalera, L., Esposito, F., Helland, K., Hanssen, K., Romano, G., & Ianora, A. (2016). Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science* **3**, 1–2.

175. Lavaud, J. (2007). Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechonology* **1**. 267-287.

176. Lebeau, T., & Robert, J. M. (2003). Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *App. Microbiol. and Biot.* **60** (6), 612–623.

177. Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research* **12**, 497–512.

178. Lee, R. E. (2008). *Phycology*, 4 izd., Cambridge University Press.

179. Leng, L., Li, W., Chen, J., Leng, S., Chen, J., Wei, L., Peng, H., Li, J., Zhou, W., & Huang, H. (2021). Co-culture of fungi-microalgae consortium for wastewater treatment: A review. *Biores. Technol.* **330**, 125008.

180. Leonardos, N., & Geider, R. J. (2004). Effects of nitrate: Phosphate supply ratio and irradiance on the C:N:P stoichiometry of Chaetoceros muelleri. *Eur. J. Phycol.* **39** (2), 173–180.

181. Li, H. bin, Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, ***102*** (3), 771–776.

182. Liber, J. A., Bryson, A. E., Bonito, G., & Du, Z. Y. (2020). Harvesting Microalgae for Food and Energy Products. *Small Methods* 4 (10), 2000349.

183. Lin, Q., Zhuo, W. H., Wang, X. W., Chen, C. P., Gao, Y. H., & Liang, J. R. (2018). Effects of fundamental nutrient stresses on the lipid accumulation profiles in two diatom species Thalassiosira weissflogii and *Chaetoceros muelleri*. *Bioproc. and Biosyst. Eng.* **41** (8), 1213–1224.

184. Lopes, R. G., Cella, H., Mattos, J. J., Marques, M. R. F., Soares, A. T., Antoniosi Filho, N. R., Derner, R. B., & Rörig, L. R. (2019). Effect of phosphorus and growth phases on the transcription levels of EPA biosynthesis genes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Revista Brasileira de Botanica*, **42** (1), 13–22.

185. López, A., Rico, M., Rivero, A., & Suárez de Tangil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry* **125** (3), 1104–1109.

186. López, C. V. G., del Carmen Cerón García, M., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Biores. Technol.* **101** (19), 7587–7591.

187. Lovio-Fragoso, J. P., de Jesús-Campos, D., López-Elías, J. A., Medina-Juárez, L. Á., Fimbres-Olivarría, D., & Hayano-Kanashiro, C. (2021). Biochemical and Molecular Aspects of Phosphorus Limitation in Diatoms and Their Relationship with Biomolecule Accumulation. *Biology*, ***10*** (7), 565.

188. Lovio-Fragoso, J. P., Hayano-Kanashiro, C., & López-Elías, J. A. (2019). Effect of different phosphorus concentrations on growth and biochemical composition of chaetoceros muelleri. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **47** (2), 361–366.

189. Lubian, L. M. (1989). *Concentrating Cultured Marine Microalgae with Chitosan*. Aquaculture Engineering **8**.

190. Luo, S., Wu, X., Jiang, H., Yu, M., Liu, Y., Min, A., Li, W., & Ruan, R. (2019a). Edible fungi-assisted harvesting system for efficient microalgae bio-flocculation. *Biores. Technol.* **282**, 325–330.

191. Luo, S., Wu, X., Jiang, H., Yu, M., Liu, Y., Min, A., Li, W., & Ruan, R. (2019b). Edible fungi-assisted harvesting system for efficient microalgae bio-flocculation. *Biores. Technol.* **282**, 325–330.

192. Maadane, A., Merghoub, N., el Mernissi, N., Ainane, T., Amzazi, S., Wahby, I., & Bakri, Y. (2017). Antimicrobial activity of marine microalgae isolated from Moroccan coastlines. *J. Microb., Biot. Food Sci.* **6** (6), 1257–1260.

193. Maltsev, Y., & Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Bio.* **20** (2), 515–547.

194. Maneveldt, G. W., & Keats, D. W. (2003). Chromista. *Eng. Life Sci*.

195. Mann, D. G., Crawford, R. M., & Round, F. E. (2017a). Bacillariophyta. U: *Handbook of the Protists: Second Edition* (Archibald, J. M., Simpson, A. G. B., Slamovits, C. H., ured.), Springer International Publishing, str. 205–266.

196. Mann, D. G., & Vanormelingen, P. (2013). An inordinate fondness? The number, distributions, and origins of diatom species. *J. Eukaryot. Microbiol.* **60** (4), 414–420.

197. Markou, G., Angelidaki, I., & Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl. Microb. Biotechnol.* **96** (3), 631–645.

198. Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M., & Brzezinski, M. A. (2000). REVIEW SILICON METABOLISM IN DIATOMS: IMPLICATIONS FOR GROWTH. *J. Phycol.* **36** (5), 821-840.

199. Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14** (1), 217–232.

200. Matter, I. A., Hoang Bui, V. K., Jung, M., Seo, J. Y., Kim, Y. E., Lee, Y. C., & Oh, Y. K. (2019). Flocculation harvesting techniques for microalgae: A review. *Applied Sciences* **9** (15), 3069.

201. Mayers, J. J., Flynn, K. J., & Shields, R. J. (2013). Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Biores. Technol.* **148**, 215–220.

202. Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *Int. J. Mo. Sci.* **14** (7), 13763–13781.

203. Milledge, J. J. (2011a). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. In *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **10** (1), 31–41.

204. Milledge, J. J., & Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **12**, (2), 165-178.

205. Mishra, G. (2015). Polyunsaturated Fatty Acids from Algae. U: *The Algae World* (Sahoo., D., Seckbach, J., ured.) Springer Science, Dourdecht***, str***. 467–481.

206. Mishra, M., Arukha, A. P., Bashir, T., Yadav, D., & Prasad, G. B. K. S. (2017). All new faces of diatoms: Potential source of nanomaterials and beyond. *Frontiers in Microbiology*, **8**.

207. Mitra, D., van Leeuwen, J. (Hans), & Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research* **1**(1), 40–48.

208. Mitra, M., & Mishra, S. (2018). Effect of glucose on growth and fatty acid composition of an euryhaline eustigmatophyte Nannochloropsis oceanica under mixotrophic culture condition. *Biores. Techno. Reports*, **3**, 147–153.

209. Mogany, T., Swalaha, F. M., Allam, M., Mtshali, P. S., Ismail, A., Kumari, S., & Bux, F. (2018). Phenotypic and genotypic characterisation of an unique indigenous hypersaline unicellular cyanobacterium, Euhalothece sp.nov. *Microbiol. Res.* **211**, 47–56.

210. Mohan, S. v., Devi, M. P., Subhash, G. v., & Chandra, R. (2014). Algae oils as fuels. U: *Biofuels from Algae (*Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., ured.), Elsevier, Cambridge, str. 155–187.

211. Moheimani, N. R., Parlevliet, D., McHenry, M. P., Bahri, P. A., & de Boer, K. (2015). Past, Present and Future of Microalgae Cultivation Developments. *J. Apl. Phycol.* **29** (4), 1–18.

212. Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Acién Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2002). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* **20**, 491–515

213. Moll, K. M., Gardner, R. D., Eustance, E. O., Gerlach, R., & Peyton, B. M. (2014). Combining multiple nutrient stresses and bicarbonate addition to promote lipid accumulation in the diatom RGd-1. *Algal Research*, **5** (1), 7–15.

214. Morales, M., Aflalo, C., & Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass Bioenerg.* **150,** 106108.

215. Morales-Sánchez, D., Martinez-Rodriguez, O. A., Kyndt, J., & Martinez, A. (2015). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *W. j. microb.biot.* **31** (1), 1–9.

216. Morris, I., Smith, A. E., & Glover, H. E. (1981). Products of photosynthesis in phytoplankton off the Orinoco River and in the Caribbean Seal. *Limnology and Oceanography*, *26*(6), 1034–1044. https://doi.org/10.4319/lo.1981.26.6.1034

217. Mortensen, L. M., & Gislerød, H. R. (2016). The growth of Chlorella sorokiniana as influenced by CO_2, light, and flue gases. *J. Appl. Phycolog.* **28** (2), 813–820.

218. Mubarak, M., Shaija, A., & Prashanth, P. (2019). Bubble column photobioreactor for Chlorella pyrenoidosa cultivation and validating gas hold up and volumetric mass transfer coefficient. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, 1-15.

219. Muhammad, S., Shah, U., & Azmuddin, M. (2018). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology E ff ects of macro / micronutrients on green and brown microalgal cell growth and fatty acids in photobioreactor and open-tank systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **14**, 10–17.

220. Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (αTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chemistry*, **129** (1), 139–148.

221. Naselli-Flores, L., & Barone, (2000), Phytoplankton dynamics and structure: a comparative analysis in natural and man-made water bodies of different trophic state. Hydrobiologia **438**, 65–74.

222. Nazari, M. T., Freitag, J. F., Cavanhi, V. A. F., & Colla, L. M. (2020). Microalgae harvesting by fungal-assisted bioflocculation. *Rev. Environ. Sci. Bio.* **19** (2), 369–388.

223. Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., & Polle, J. E. W. (2016). Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, **15**, 164–178.

224. Niccolai, A., Chini, G., Rodol, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). *Microalgae of interest as food source : Biochemical composition and digestibility*. **42**. 101617.

225. Nichols, P. D., Volkman, J. K., Palmisano, A. C., Smith, G. A., & W, D. C. (1988). Occurance o fan isoprenoid C25 diunasaturated alkene and high neutral lipid content in Antartic Sea-ice diatom communities. *J. Phycol* **24**, 90-96.

226. Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., & Kawakami, Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int.* **42** (2), 361–370.

227. Nunez, M., & Quigg, A. (2016). Changes in growth and composition of the marine microalgae phaeodactylum tricornutum and nannochloropsis salina in response to changing sodium bicarbonate concentrations. *J. Appl. Phycol.* **28** (4), 2123–2138.

228. Ogbonna, J. C., & Moheimani, N. R. (2015). *Potentials of Exploiting Heterotrophic Metabolism for Biodiesel Oil Production by Microalgae.* U: *Biomass anf Biofuels from Microalgae,* (Moheimani, N., McHenry, M., de Boer, K., Bahri, P., ured.), Springer, Cham, str. 45–61.

229. Ozkan, A., & Rorrer, G. L. (2017). Lipid and chitin nanofiber production during cultivation of the marine diatom Cyclotella sp. to high cell density with multistage addition of silicon and nitrate. *J. Appl. Phycol.* **29** (4), 1811–1818.

230. Paes, C. R. P. S., Faria, G. R., Tinoco, N. A. B., Castro, D. J. F. A., Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of Chlorella sp. and Nannochloropsis oculata under nitrogen starvation. *Lat. Am. J. Aq. Res.* **44** (2), 275–292.

231. Pagels, F., Vasconcelos, V., & Guedes, A. C. (2021). Carotenoids from cyanobacteria: Biotechnological potential and optimization strategies. *Biomolecules*. **11** (5), 735.

232. Park, Y. K., Dulermo, T., Ledesma-Amaro, R., & Nicaud, J. M. (2018). Optimization of odd chain fatty acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology for Biofuels*, **11** (1). 158.

233. Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Biores. Technol.* **102**, (22), 10163–10172.

234. Parrish, C. C., Defreitas, A. S. W., Bodennec, G., Macpherson, E. J., & Ackman, R. G. (1991). Lipid composition of the toxic marine diatom *Nitzschia pugens. Phytochemistry* **30** (1), 113-116.

235. Pei, X. Y., Ren, H. Y., & Liu, B. F. (2021). Flocculation performance and mechanism of fungal pellets on harvesting of microalgal biomass. *Biores. Technol.* **321**. 124463.

236. Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F., & Wang, J. H. (2011). Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, **9** (10), 1806–1828.

237. Peramuna, A., & Summers, M. L. (2014). Composition and occurrence of lipid droplets in the cyanobacterium Nostoc punctiforme. *Arch. Microbiol.* **196** (12), 881–890.

238. Pereira, H., Barreira, L., Custódio, L., Alrokayan, S., Mouffouk, F., Varela, J., Abu-Salah, K. M., & Ben-Hamadou, R. (2013). Isolation and fatty acid profile of selected microalgae strains from the red sea for biofuel production. *Energies*, **6** (6), 2773–2783.

239. Pereira, H., Custódio, L., Rodrigues, M. J., de Sousa, C. B., Oliveira, M., Barreira, L., Neng, N. D. R., Nogueira, J. M. F., Alrokayan, S. A., Mouffouk, F., Abu-Salah, K. M., Ben-Hamadou, R., & Varela, J. (2015). Biological activities and chemical composition of methanolic extracts of selected autochthonous microalgae strains from the Red Sea. *Marine Drugs*, **13** (6), 3531–3549.

240. Pereira, H., Silva, J., Santos, T., Gangadhar, K. N., Raposo, A., Nunes, C., Coimbra, M. A., Gouveia, L., Barreira, L., & Varela, J. (2019). Nutritional potential and toxicological evaluation of *Tetraselmis* sp. CtP4 microalgal biomass produced in industrial photobioreactors. *Molecules*, **24** (17), 1–18.

241. Pérez, L., Salgueiro, J. L., Maceiras, R., Cancela, Á., & Sánchez, Á. (2017). An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. *Biomass Bioenerg.* **97**, 20–26.

242. Perez-Garcia, O., Bashan, Y., Bashan, Y., & Bashan, Y. (2015). Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics. U: *Algal Biorefineries* (Prokop, A i sur., ured.), Springer International Publishing. Str. 61–131.

243. Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. In *Water Res.* ***45***, 11–36.

244. Picardo, M. C., de Medeiros, J. L., Araújo, O. de Q. F., & Chaloub, R. M. (2013). Effects of CO2 enrichment and nutrients supply intermittency on batch cultures of Isochrysis galbana. *Biores. Technol.* **143**, 242–250.

245. Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: Biochemical and topological aspects. In *J. Ind. Microb. Biot.* **40** (8), 781–796.

246. Pimolrat, P., Direkbusarakom, S., Chinajariyawong, C., & Powtongsook, S. (2010). The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, **34** (2), 40- 48.

247. Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chem.* **235**, 34–44.

248. Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae.: *Eng. Life Sci.* **9** (3), 165–177.

249. Priyadarshani, I., & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass* **3** (4), 89–100.

250. Pulz, O. (2001). Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microb. Biot.* 57 (3), 287–293.

251. Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., & Zhang, L. (2016). Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture*, **452**, 311–317.

252. Ra, C. H., Kang, C. H., Jung, J. H., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2016). Enhanced biomass production and lipid accumulation of *Picochlorum atomus* using light-emitting diodes (LEDs). *Bior. Technol.* **218**, 1279–1283.

253. Ramírez, M., Amate, L., & Gil, A. (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum. Dev.* **65**, 95-101.

254. Remize, M., Brunel, Y., Silva, J. L., Berthon, J. Y., & Filaire, E. (2021). Microalgae n-3 PUFAs Production and Use in Food and Feed Industries. *Marine drugs* **19** (2), 113.

255. 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. *J. Appl. Phycol.* **6**, 347-356

256. Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. In *Renew. Sust. Energ. Rev.* **92**, 394–404.

257. Robert R, L, G. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*, 29–60.

258. Rodríguez-Núñez, K., & Toledo-Agüero, P. (2017). Fatty acids profile and nutritional composition of two tropical diatoms from the Costarican pacific coast. *Grasas y Aceites*, **68** (3), 209.

259. Roessler, P. G. (1988). Effects of Silicon Deficiency on Lipid Composition and Metabolism in the Diatom *Cyclotella Cryptica*. *J. Phycol.* **24** (3), 394–400.

260. Roopnarain, A., Gray, V. M., & Sym, S. D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Biores. Technol.* **156**, 408–411.

261. Roux, P., Siano, R., Collin, K., Bilien, G., Sinquin, C., Marchand, L., Zykwinska, A., Delbarre-Ladrat, C., & Schapira, M. (2021). Bacteria enhance the production of extracellular polymeric substances by the green dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *Scientific Reports*, **11** (1), 4795.

262. Sabu, S., Singh, I. S. B., & Joseph, V. (2017). Optimisation of critical medium components and culture conditions for enhanced biomass and lipid production in the oleaginous diatom *Navicula phyllepta*: a statistical approach. *Environ. Sci. Pollut. R.* **24** (34), 26763–26777.

263. Safafar, H., Wagenen, J. van, Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Marine Drugs*, **13**(12), 7339–7356.

264. Sahin, M. S., Khazi, M. I., Demirel, Z., & Dalay, M. C. (2019). Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms Nitzschia sp. and Nanofrustulum shiloi in response to nitrogen and iron. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **17**, 390–398.

265. Sakurai, I., Shen, J. R., Leng, J., Ohashi, S., Kobayashi, M., & Wada, H. (2006a). Lipids in oxygen-evolving photosystem II complexes of cyanobacteria and higher plants. *J. Biochem.* **140** (2), 201–209.

266. Salem, O. M., Ghazi, S. M., & Hanna, S. N. (2014). Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on Nostoc sp. Biofuel production from algae and plants View project production of biofuel from algae and plants View project Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on *Nostoc* sp. *Life Sci. J.* **11** (12).

267. Sanina, N. M., Goncharova, S. N., & Kostetsky, E. Y. (2004). Fatty acid composition of individual polar lipid classes from marine macrophytes. *Phytochemistry*, **65** (6), 721–730.

268. Santhosh Kumar, C., Prabu, V. A., & Prasanna Kumar, C. (2015). DNA Barcode Genes (rbcL, 18s rRNA and ITS Phylogeny. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. **4** (9), 195-203.

269. Sanyano, N., Chetpattananondh, P., & Chongkhong, S. (2013). Coagulation-flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Biores. Technol.* **147**, 471–476.

270. Sapieha, P., Stahl, A., Chen, J., Seaward, M. R., Willett, K. L., Krah, N. M., Dennison, R. J., Connor, K. M., Christopher, †, Aderman, M., Liclican, E., Carughi, A., Perelman, D., Kanaoka, Y., Sangiovanni, J. P., Gronert, K., & Smith, L. E. H. (2011). *5-Lipoxygenase Metabolite 4-HDHA Is a Mediator of the Antiangiogenic Effect of w-3 Polyunsaturated Fatty Acids*.

271. Saramma, A. V., & Saseendran, S. K. (2018). Evaluation of chemical flocculation for harvesting of marine microalga, Nannochloropsis salina. *Eco. Env. Cons*. **24**, 129-133.

272. Sathasivam, R., & Ki, J. S. (2018). A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. *Marine Drugs*, **16** (1), 26.

273. Sayanova, O., Mimouni, V., Ulmann, L., Morant-Manceau, A., Pasquet, V., Schoefs, B., & Napier, J. A. (2017). Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372**, 1728.

274. Scarsella, M., Belotti, G., Filippis, D., & Bravi, P. (2010). Study on the optimal growing conditions of Chlorella vulgaris in bubble column photobioreactors. *Chem. Eng. Trans.* **20**, 85–90.

275. Schaub, I., Wagner, H., Graeve, M., & Karsten, U. (2017). Effects of prolonged darkness and temperature on the lipid metabolism in the benthic diatom *Navicula perminuta* from the Arctic Adventfjorden, Svalbard. *Polar Biology*, **40** (7), 1425–1439.

276. Schüler, L. M., Santos, T., Pereira, H., Duarte, P., Katkam, N. G., Florindo, C., Schulze, P. S. C., Barreira, L., & Varela, J. C. S. (2020). Improved production of lutein and β-carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. *Algal Research* **45**, 101731.

277. Schwenzfeier, A., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2011). Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae Tetraselmis sp. *Biores. Technol.* **102** (19), 9121–9127.

278. Sharma, A. K., Sahoo, P. K., Singhal, S., & Joshi, G. (2016). Exploration of upstream and downstream process for microwave assisted sustainable biodiesel production from microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biores. Technol.* **216**, 793–800.

279. Sharma, N., Simon, D. P., Diaz-Garza, A. M., Fantino, E., Messaabi, A., Meddeb-Mouelhi, F., Germain, H., & Desgagné-Penix, I. (2021). Diatoms Biotechnology: Various Industrial Applications for a Greener Tomorrow. *Frontiers in Marine Science* **8**.

280. Sharmin, T., Monirul Hasan, C. M., Aftabuddin, S., Rahman, M. A., & Khan, M. (2016). Growth, fatty acid, and lipid composition of marine microalgae skeletonema costatum available in Bangladesh coast: Consideration as biodiesel feedstock. *Journal of Marine Biology*, 1-8.

281. Sibi, G., Shetty, V., & Mokashi, K. (2016). Enhanced lipid productivity approaches in microalgae as an alternate for fossil fuels – A review. *Journal of the Energy Institute*, **89** (3), 330–334.

282. Singh, P., Guldhe, A., Kumari, S., Rawat, I., & Bux, F. (2015). Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae Ankistrodesmus falcatus KJ671624 using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* **94**, 22–299.

283. Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (1), 133–159.

284. Sournia, A., Chretiennot-Dinet, M.-J., & Ricard, M. (1991). Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? In *Journal of Plankton Res.* **13**, 1093-1099.

285. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101** (2), 87–96.

286. Stephenson, A. L., Dennis, J. S., Howe, C. J., Scott, S. A., & Smith, A. G. (2010). Influence of nitrogen-limitation regime on the production by Chlorella vulgaris of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* **1** (1), 47–58.

287. Suh, S. I., & Lee, C.-G. (2003). Photobioreactor Engineering: Design and Performance. *Biotechnol. and Bioproc. E.* **8**, 313–321.

288. Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **115**.

289. Surendhiran, D., & Vijay, M. (2014). Exploration on bioflocculation of nannochloropsis oculata using response surface methodology for biodiesel production. *The Scientific World Journal*, 1-9.

290. ’t Lam, G. P., Giraldo, J. B., Vermuë, M. H., Olivieri, G., Eppink, M. H. M., & Wijffels, R. H. (2016). Understanding the salinity effect on cationic polymers in inducing flocculation of the microalga *Neochloris oleoabundans*. *J. Biotechnol.* **225**, 10–17.

291. Tachihana, S., Nagao, N., Katayama, T., Hirahara, M., Yusoff, F. M., Banerjee, S., Shariff, M., Kurosawa, N., Toda, T., & Furuya, K. (2020). High Productivity of Eicosapentaenoic Acid and Fucoxanthin by a Marine Diatom Chaetoceros gracilis in a Semi-Continuous Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*.

292. Taguchi, S., Hirata, J. A., & Laws, E. A. (1987). Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *J. Phycol.* **23**, 260–267.

293. Tallima, H., & el Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. In *Journal of Advanced Research* **11**, 33–41.

294. Tan, X. B., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Wong, C. Y., & Lee, K. T. (2018). Cultivation of microalgae for biodiesel production: A review on upstream and downstream processing. *Chinese J. Chem. Eng.* **26**, 17–30.

295. Tantanasarit, C., Englande, A. J., & Babel, S. (2013). Nitrogen, phosphorus and silicon uptake kinetics by marine diatom Chaetoceros calcitrans under high nutrient concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **446**, 67–75.

296. Thajuddin, N., Ilavarasi, A., Baldev, E., MubarakAli, D., Alharbi, N., Chinnathambi, A., & Alharbi, S. (2015). Stress Induced Lipids Accumulation in Naviculoid Marine Diatoms for Bioenergy Application. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **4** (1), 18–24.

297. Ungsethaphand, T., Peerapornpisal, Y., & Whangchai, N. (2009). Production of Spirulina platensis using dry chicken manure supplemented with urea and sodium bicarbonate. *Maejo Int. J. Sci. Technol* **3** (03), 379–387.

298. Valenzuela, J., Mazurie, A., Carlson, R. P., Gerlach, R., Cooksey, K. E., Peyton, B. M., & Fields, M. W. (2012). Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in Phaeodactylum tricornutum. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 1–17.

299. van Eerden, F. J., de Jong, D. H., de Vries, A. H., Wassenaar, T. A., & Marrink, S. J. (2015). Characterization of thylakoid lipid membranes from cyanobacteria and higher plants by molecular dynamics simulations. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1848** (6), 1319–1330.

300. van Wychen, S., Ramirez, K., & Laurens, L. M. L. (2013). Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. *Contract* **303**, 275–3000.

301. Vandamme, D., Beuckels, A., Vadelius, E., Depraetere, O., Noppe, W., Dutta, A., Foubert, I., Laurens, L., & Muylaert, K. (2016). Inhibition of alkaline flocculation by algal organic matter for *Chlorella vulgaris*. *Water Res.* **88**, 301–307.

302. Vargas, M. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., del Campo, J. A., Rivas, J., & Guerrero, M. G. (1998). Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.*, **34** (5), 812–817.

303. Veillette, M., Chamoumi, M., Nikiema, J., Faucheux, N., & Heitz, M. (2012). *Production of Biodiesel from Microalgae*.

304. Veillette, M., Giroir-Fendler, A., Faucheux, N., & Heitz, M. (2018). Biodiesel from microalgae lipids: from inorganic carbon to energy production. *Biofuels*, **9** (2), 175–202.

305. Verma, E., Singh, S., Niveshika, & Mishra, A. K. (2019). Salinity-induced oxidative stress-mediated change in fatty acids composition of cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *In. J. Environ. Sci. T.* **16** (2), 875–886.

306. Vidotti, A. D. S., Coelho, R. S., Franco, L. M., & Franco, T. T. (2014). Miniaturized culture for heterotrophic microalgae using low cost carbon sources as a tool to isolate fast and economical strains. *Chem. Engineer. Trans.* **38**, 325–330.

307. Viličić, D. (2002). *Fitoplankton Jadranskoga mora – Biologija i taksonomija* (D. Viličić & J. Matekalo-Draganović, Eds.). Školska knjiga.

308. Viso, A.-C., & Marty, J.-C. (1993). Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34 (6), 1521-1533.

309. Vitova, M., Bisova, K., Kawano, S., & Zachleder, V. (2014). Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, **33** (6), 1204–1218.

310. Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., & Dewhurst, R. J. (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Tech.* **131**, (3–4), 389–417.

311. Volkman, J. K. (2003). Sterols in microorganisms. In *Appl. Microbiol. Biot.* **60** (5), 495–506.

312. Volkman', J. K., Jeffrey2, S. W., Nichols', P. D., Rogers', G. I., Garland3, C. D., & Volkman, J. K. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mur. Bioi. Ecol* **128** (3), 219-240.

313. Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Kedar, L., & Oren, A. (2006). Structure of euhalothece-362, a novel red-shifted mycosporine-like amino acid, from a halophilic cyanobacterium (*Euhalothece* sp.). *FEMS Microbiol. Lett.* **258** (1), 50–54.

314. Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnol. Adv.* **30** (4), 904–912.

315. Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO2 bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biot.* **79** (5), 707–718.

316. Wang, C., & Lan, C. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. In *Biotechnol. Adv.* **36** (4), 986–1002.

317. Wang, S., Lambert, W., Giang, S., Goericke, R., & Palenik, B. (2014). Microalgal assemblages in a poikilohaline pond. *J. Phycol.* **50** (2), 303–309.

318. Wang, T., Tian, X., Liu, T., Wang, Z., Guan, W., Guo, M., Chu, J., & Zhuang, Y. (2017). A two-stage fed-batch heterotrophic culture of Chlorella protothecoides that combined nitrogen depletion with hyperosmotic stress strategy enhanced lipid yield and productivity. *Process Biochem.* **60**, 74–83.

319. Watanabe,', Y., de La Noue, J., & Hall', D. 0. (1994). Photosynthetic Performance of a Helical Tubular Photobioreactor Incorporating the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng*. **47** (2), 261- 269.

320. Weissman, J. C., Likhogrud, M., Thomas, D. C., Fang, W., Karns, D. A. J., Chung, J. W., Nielsen, R., & Posewitz, M. C. (2018). High-light selection produces a fast-growing *Picochlorum celeri*. *Algal Research*, **36**, 17–28.

321. White, D. A., Pagarette, A., Rooks, P., & Ali, S. T. (2013). The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.* **25** (1), 153–165.

322. Wijesinghe, W. A. J. P., & Jeon, Y. J. (2012). Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: A review. In *Int. Journal of Food Sci. Nutr.* **63** (2), 225–235.

323. Wijffels, R. H. (2008). Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol.* **26** (1), 26–31.

324. Wrede, D., Taha, M., Miranda, A. F., Kadali, K., Stevenson, T., Ball, A. S., & Mouradov, A. (2014). Co-cultivation of fungal and microalgal cells as an efficient system for harvesting microalgal cells, lipid production and wastewater treatment. *PLoS One* **9** (11), 1–22.

325. Wychen, S. van, & Laurens, L. M. L. (2013). *Determination of Total Carbohydrates in Algal Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised)*. www.nrel.gov/publications.

326. Wynne, M. J., & Hallan, J. K. (2016). Reinstatement of Tetradesmus G. M. Smith (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Feddes Repertorium* **126** (3–4), 83–86.

327. Xiao, R., & Zheng, Y. (2016). Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* **34** (7), 1225–1244.

328. Yalcin Duygu, D. (2019). Determination of growth kinetics and biochemical composition of Nitzschia palea (Kützing) W. Smith isolated from freshwater sources in Turkey. *Trakya University Journal of Natural Sciences* **20** (1), 63-70.

329. Yang, F., Long, L., Sun, X., Wu, H., Li, T., & Xiang, W. (2014). Optimization of medium using response surface methodology for lipid production by *Scenedesmus* sp. *Marine Drugs*, **12** (3), 1245–1257.

330. Yang, H. W., Song, J. Y., Cho, S. M., Kwon, H. C., Pan, C. H., & Park, Y. il. (2020). Genomic Survey of Salt Acclimation-Related Genes in the Halophilic Cyanobacterium *Euhalothece* sp. Z-M001. *Scientific Rep.* **10** (1), 676.

331. Yang, M., Zhao, W., & Xie, X. (2014). Effects of nitrogen, phosphorus, iron and silicon on growth of five species of marine benthic diatoms. *Acta Ecologica Sinica*, **34** (6), 311–319.

332. Yang, Y., Du, L., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2020). Total lipids content, lipid class and fatty acid composition of ten species of microalgae. *Journal of Oleo Science*, **69** (10), 1181–1189.

333. Yao, L., Gerde, J. A., Lee, S. L., Wang, T., & Harrata, K. A. (2015). Microalgae lipid characterization. *J. Agr. Food Chem.* **63** (6), 1773–1787.

334. Yen, H. W., Hu, I. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2013). Design of Photobioreactors for Algal Cultivation. U: *Biofuels from Algae* (Soccol, C. R., Chisti, Y., Pandey, A., Lee, D-J., ured.), Elsevier Inc., Cambridge, str. 23–45.

335. Yi, Z., Xu, M., Di, X., Brynjolfsson, S., & Fu, W. (2017). Exploring valuable lipids in diatoms. *Frontiers Mar. Sci.* **4**, 1–10.

336. Yodsuwan, N., Sawayama, S., & Sirisansaneeyakul, S. (2017). Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. *Agriculture and Natural Resources*, **51** (3), 190–197.

337. Yongmanitchai, W., & Ward, O. P. (1991). Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions. *Appl. and Environ. Microb.* **57** (2), 419–425.

338. Young, E., Beardall, J., & Giordano, M. (2001). Inorganic carbon acquisition by Dunaliella tertiolecta (Chlorophyta) involves external carbonic anhydrase and direct HCO 3 − utilization insensitive to the anion exchange inhibitor DIDS. *Eur. J. Phycol.* **36** (1), 81–88.

339. Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, Isochrysis galbana. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, **46** (2), 153–158.

340. Zhou, W., Min, M., Hu, B., Ma, X., Liu, Y., Wang, Q., Shi, J., Chen, P., & Ruan, R. (2013). Filamentous fungi assisted bio-flocculation: A novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Sep. Purif. Technol.* **107**, 158–165.

341. Zhu, L., Li, Z., & Hiltunen, E. (2018). Microalgae Chlorella vulgaris biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. *Biotechnology for Biofuels*, **11** (1), 183.

342. Zhu, S., Wang, Y., Shang, C., Wang, Z., Xu, J., & Yuan, Z. (2015). Characterization of lipid and fatty acids composition of *Chlorella zofingiensis* in response to nitrogen starvation. *J. of Biosci. and Bioeng.* **120** (2), 205–209.

343. Zhu, Y., & Dunford, N. T. (2013). Growth and biomass characteristics of *Picochlorum oklahomensis* and *Nannochloropsis oculata*. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **90** (6), 841–849. https://doi.org/10.1007/s11746-013-2225-0

344. Zienkiewicz, K., Du, Z. Y., Ma, W., Vollheyde, K., & Benning, C. (2016). Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular, cellular and physiological insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1861** (9), 1269–1281.

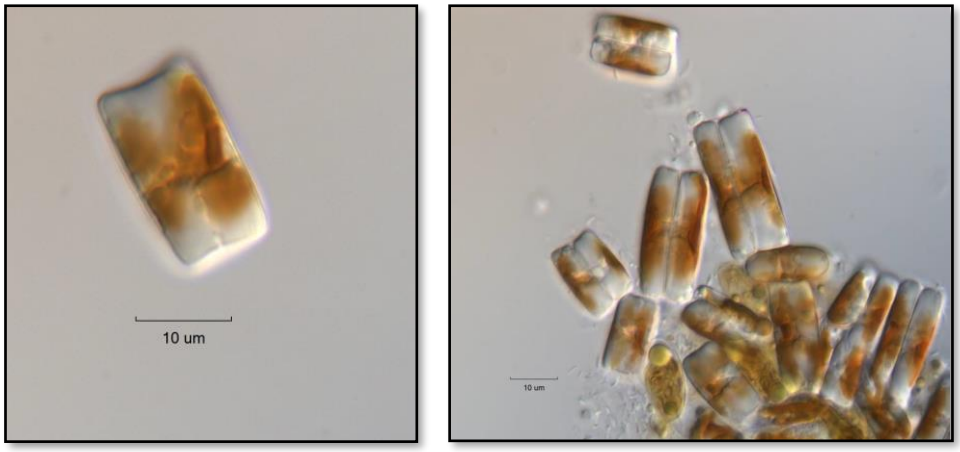
345. Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J. P. (2019). Microalgae cultivation systems.U: *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (Yousuf, A., ured.),Elsevier, Cambridge. str. 11–29.

346. Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Prog. Lipid Res.* **70**, 1–16.

8. PRILOZI

8.1. Identifikacija izoliranih mikroalgi

8.1.1. Rezultati identifikacije izolata B1



Prilog 1. Mikroskopska slika stanica izolata B1

Prilog 2. Sekvenca 18s rRNA gena izolata B1

Gen	18s rRNA
Sekvenca	CTGCCCTATCAGCTTTGACGGTACTGTATTGGAGTACCGTGGCGGTAACGGGTAACGGAAAATTAGGGTTTGACACCGG AGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAGG TAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGCCTTTGTAGGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGA TCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATAAAGTTGTTGCAGTTAAA AAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCCAGTGCCGTGGCGTCCATTTATTTGGTTCAGCCGTGGCCTTGCCATCCTTGGGTGGA TCCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTAT GCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATAAGATAGGTCTTTGGTCCTATTTTGTTGGTTTGCGGGCCGGAGAAATGATTA ACAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACTACTGCGAAA GCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAA CCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGCGGGGTTTCGTTACGTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAGTTTTTGG GTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGG CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTC TATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCTGCC TGCTAAATAGTCCCGTGAGTGAATTTCACTGGCGAGGACTTCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAGATGCAGGAAGATA GGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGTTCTACC TTGGCCGAGAGGCCTGGGCAATCTTTTGAACGTGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGG AATTCCTAGTAAACGCAGATCATCAATCTGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGA TTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGTGGCCGTTGCCTTTATTGGTGTCGGTTGCGAGAACTTGTCTAAACCTTATC ATT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillariophyta sp. MBIC10102 gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC10102	Bacillariophyta ...	2636	2636	100%	0.0	99.86%	1737	AB183593.1
Prestauroneis integra 18S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis i...	2577	2577	100%	0.0	99.09%	1737	AM502025.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis krie...	2558	2558	100%	0.0	98.88%	1736	AM501990.1
Parlibellus delognei f. ellipticus strain TA387 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Parlibellus delo...	2553	2553	100%	0.0	98.81%	1659	KY320352.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-101.02	Stauroneis krie...	2553	2553	100%	0.0	98.81%	1737	AM502037.1
Stauroneis gracilior 18S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis gra...	2547	2547	100%	0.0	98.74%	1737	AM501988.1
Stauroneis anceps 18S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis anc...	2545	2545	100%	0.0	98.74%	1734	AM502008.1
Sternimirus shandongensis isolate SZCZCH968 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sternimirus sh...	2518	2518	95%	0.0	99.85%	1646	KT943637.1
Craticula importuna 18S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula impor...	2514	2514	100%	0.0	98.33%	1734	AM501978.1
Stauroneis latistauros strain Xmm1W4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latis...	2508	2508	99%	0.0	98.46%	1693	KY054994.1
Craticula accomoda isolate TCC107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Craticula acco...	2497	2497	100%	0.0	98.12%	1687	KF959652.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-219.03	Craticula cuspi...	2497	2497	100%	0.0	98.12%	1734	AM502000.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-200.05	Craticula cuspi...	2494	2494	100%	0.0	98.05%	1734	AM501998.1
Craticula molestiformis 18S rRNA gene, strain AT-5Nav02	Craticula mole...	2492	2492	100%	0.0	98.05%	1734	AM501977.1

Prilog 3. Rezultati usporedbe sekvence 18s rRNA gena izolata B1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 4. Sekvenca ITS gena izolata B1

Gen	ITS
Sekvenca	TGGAGGGCTAGATGCCGCGGCGGTTGTTTGCTTGGATAGGAATTCTATTCTATTTGGGTGGGCAACCGGTGGTGTTTGGC TTTCACCCGACGGAGGTTGGTTGCTTGTGGCTCGTTGATTTGTGATTGAGATCGCGATCGATCCGCTGCACTTGGCTGGC TTTTGTCACTAAACAATCTATTTTTTAAAAATCCCTTGACTAGACTTTGGGTAGTCTAGGAGAGCTTTTTACAATGATCAC CCGCCATGACCAAAGGACCCTGAAGCGTGAAGGGATTGTATTCTGTTGCACCATGGTGTGCAAGCAAGGTACTCTTCCG GATCGACAGCTTACGAAGAATGAAAAGCGTAGCTTTTACAACTTTCAGCAACGGATGTCTAGGCTCCCACAACGATGAA GAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAAACCTCGTGAATCATTAAAATATTGAACGCACATTGCGCTTC TGGGATTTTCCCGGGAGCATGCCTGTCTGAGTGTCAGCGAACCCCTCTCGGCGCATGCAAGGCTTTTGCTTTGATTGTTG TGCACGGAATTTGACAGCTGCCACGGCAATTTATATCTGAATTGTTTGTGGCTCTGTTTGAGTTGGTTTAGCAGCAGCTG GAGTTGTTGGGAGAGTGGGAATTGATCCTATCTTTTTGAGCAACTGGCTGCATGTTGTGCTTGCAAGAGAGTAAGACTTT GCTGTAATTGCAGCAATGTCTTTCTTTCCATGAGAATTCTCAATGTGTTCCGTCTTTGGTAGATGGCTGTGTAAACGATCA ACGCTGTTGTTTGTTTTGCTGCAGAATTCGAAGAAGACTTGTATTGGCACCTTGTGCCTGTACTGAGTGAATGGATTGTT GAATTGTTAGTGGTATTTTGACTTTTGCAAGGAGGAGAAAAAGAAAAAACGGATCAGCCTTGGGCTGGTTGTTATTTCTT TTTCTTTTTGATTCTTTCCTGATCTCAGCTCAAGCAAGAAGACC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sellaphora pupula 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strai...	Sellaphora pupula	268	268	17%	6e-67	94.29%	706	AJ544676.1
Navicula microdigitoradiata voucher PAUL-BELOW-A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Navicula microd...	267	267	17%	2e-66	93.79%	1071	MG968684.1
Navicula phyllepta strain BA-04-08 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624230.1
Navicula phyllepta strain BA-04-09 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624229.1
Navicula phyllepta strain BA-04-07 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624227.1
Navicula phyllepta strain BA-04-04 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624226.1
Navicula phyllepta strain CO 0401 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624225.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193569.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193567.1

Prilog 5. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata B1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

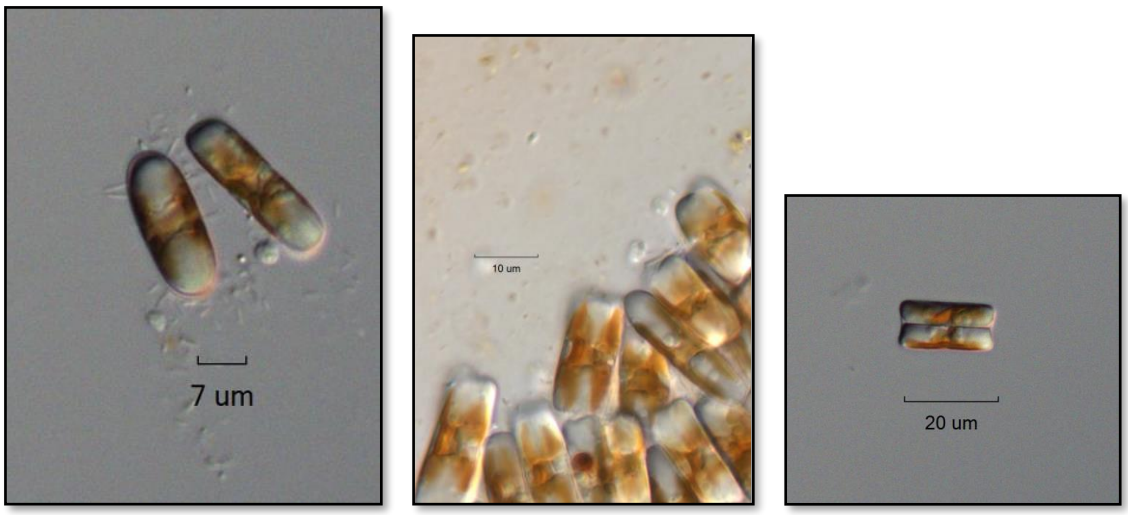
Prilog 6. Sekvenca LSU gena izolata B1

Gen	LSU
Sekvenca	AGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACCAGGATTCCCTCAGTAAGGGCGACTGAAGCGGGAATAGCCCATAC GAAATCTGCGCTCTGCGCCGAATTGTGGTCTGGAGACGCTTGCGTTACTGGCCGGGCCAAGTCCCTTGGAACGGGGCAG CTGAGAGGGTGAGACTCCCGTCCGCCCGGCCGTGTGAGCGAGTAGTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCTCTA AGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGTGGGAGACCGATAGCGTACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGCA AAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAATTGCTGAAAAGGAAGCGAAGGAAACCAGTGCCAGGTGCGTCA TACTTCCCCAACCGCTTGCGGCCGGGGCGCTGTGGCCACCGTTGCCAAGCTTGGTTGATTTGGCTGGAAGTGCGCTCAGG GAGTTGACCTGGGTATTCCGCAGCCAATTCGACCGAGGCTGGCGAAATGGTTTTCTTTTTCCCGTCTTG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Prestauroneis integra partial 28S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis i...	832	832	96%	0.0	95.41%	530	AM710581.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H09 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	773	773	100%	0.0	92.45%	570	KM407597.1
Stauroneis gracilior partial 28S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis grac...	769	769	97%	0.0	92.88%	532	AM710543.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	767	767	100%	0.0	92.27%	570	KM407599.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H10 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	767	767	100%	0.0	92.27%	570	KM407598.1
Stauroneis anceps partial 28S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis anc...	750	750	97%	0.0	92.28%	530	AM710564.1
Psammothidium abundans voucher MIC5_40b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium...	730	730	100%	0.0	90.99%	889	KU565395.1
Craticula cuspidata strain UTEX FD35 voucher Theriot Lab Voucher HK061 large subunit ribosomal RNA...	Craticula cuspid...	725	725	100%	0.0	90.84%	544	MH017629.1
Stauroneis kriegeri partial 28S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis krie...	725	725	97%	0.0	91.39%	532	AM710545.1
Craticula cuspidata strain FLMan10 rostrate Nav-A14 voucher Theriot Lab Voucher HK499 large subunit ri...	Craticula cuspid...	719	719	99%	0.0	90.76%	541	MH017633.1

Prilog 7. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata B1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.2. Rezultati identifikacije izolata A12



Prilog 8. Mikroskopska slika izolata A12

Prilog 9. Sekvenca gena 18S rRNA izolata A12

Gen	18S rRNA
Sekvenca	CTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCCTTACTACTCGGATTTAACCGTAGTAATTCTAGAGCT AATACGTGCGTCAATACTCTTCGGAGTAGTATTTATTAGATTGAAACCAACTGCTTCGGCATGATGTGGTGATTCATAAT AAGCTTGCGGATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGACGGTACTGTATTGGA GTACCGTGGCGGTAACGGGTAACGGAAAATTAGGGTTTGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCA AGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGCCTTTG TAGGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCCAGTGCCGT GGCGTCCATTTATTTGGTTCAGCCGTGGCCTTGCCATCCTTGGGTGGATCCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGA TGCCCATCGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATAAG ATAGGTCTTTGGTCCTATTTTGTTGGTTTGCGGGCCGGAGAAATGATTAACAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCAT TGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGA ACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGCGGGG TTTCGTTACGTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAA CTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCA GGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTG GTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCTGCCTGCTAAATAGTCCCGTGAGTGAATTTCACTGG CGAGGACTTCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAGATGCAGGAAGATAGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT GTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGTTCTACCTTGGCCGAGAGGCCTGGGCAATCTTTTGAACG TGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAGATCATCAATCTGCA TTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGTGG CCGTTGCCTTTATTGGTGTCGGTTGCGAGAACTTGTCTAAACCTTAT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillariophyta sp. MBIC10102 gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC10102	Bacillariophyta ...	3020	3020	100%	0.0	99.94%	1737	AB183593.1
Prestauroneis integra 18S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis i...	2953	2953	100%	0.0	99.21%	1737	AM502025.1
Parlibellus delognei f. ellipticus strain TA387 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Parlibellus delo...	2926	2926	100%	0.0	98.90%	1659	KY320352.1
Stauroneis gracilior 18S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis gra...	2926	2926	100%	0.0	98.90%	1737	AM501988.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis krie...	2924	2924	100%	0.0	98.90%	1736	AM501990.1
Stauroneis anceps 18S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis anc...	2916	2916	100%	0.0	98.84%	1734	AM502008.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-101.02	Stauroneis krie...	2907	2907	100%	0.0	98.72%	1737	AM502037.1
Stauroneis latistauros strain Xmm1W4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latis...	2900	2900	99%	0.0	98.71%	1693	KY054994.1
Sternimirus shandongensis isolate SZCZCH968 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sternimirus sh...	2896	2896	96%	0.0	99.81%	1646	KT943637.1
Craticula importuna 18S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula impor...	2861	2861	100%	0.0	98.23%	1734	AM501978.1
Stauroneis gracilis strain C_35 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis gra...	2846	2846	97%	0.0	98.81%	1615	MN907461.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-219.03	Craticula cuspi...	2844	2844	100%	0.0	98.05%	1734	AM502000.1
Craticula accomoda isolate TCC107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Craticula acco...	2841	2841	100%	0.0	97.99%	1687	KF959652.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-200.05	Craticula cuspi...	2841	2841	100%	0.0	97.99%	1734	AM501998.1
Craticula molestiformis 18S rRNA gene, strain AT-5Nav02	Craticula mole...	2839	2839	100%	0.0	97.99%	1734	AM501977.1

Prilog 10. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata A12 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 11. Sekvenca ITS gena izolata

Gen	ITS
Sekvenca	CTCTTTTGTGAATGGAGGGCTAGATGCCGCGGCGGTTGTTTGCTTGGATAGGAATTCTATTCTATTTGGGTGGGCAACCG GTGGTGTTTGGCTTTCACCCGACGGAGGTTGGTTGCTTGTGGCTCGTTGATTTGTGATTGAGATCGCGATCGATCCGCTG CACTTGGCTGGCTTTTGTCACTAAACAATCTATTTTTTAAAAATCCCTTGACTAGACTTTGGGTAGTCTAGGAGAGCTTTT TACAATGATCACCCGCCATGACCAAAGGACCCTGAAGCGTGAAGGGATTGTATTCTGTTGCACCATGGTGTGCAAGCAA GGTACTCTTCCGGATCGACAGCTTACGAAGAATGAAAAGCGTAGCTTTTACAACTTTCAGCAACGGATGTCTAGGCTCCC ACAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAAACCTCGTGAATCATTAAAATATTGAACGC ACATTGCGCTTCTGGGATTTTCCCGGGAGCATGCCTGTCTGAGTGTCAGCGAACCCCTCTCGGCGCATGCAAGGCTTTTG CTTTGATTGTTGTGCACGGAATTTGACAGCTGCCACGGCAATTTATATCTGAATTGTTTGTGGCTCTGTTTGAGTTGGTTT AGCAGCAGCTGGAGTTGTTGGGAGAGTGGGAATTGATCCTATCTTTTTGAGCAACTGGCTGCATGTTGTGCTTGCAAGAG AGTAAGACTTTGCTGTAATTGCAGCAATGTCTTTCTTTCCATGAGAATTCTCAATGTGTTCCGTCTTTGGTAGATGGCTGT GTAAACGATCAACGCTGTTGTTTGTTTTGCTGCAGAATTCGAAGAAGACTTGTATTGGCACCTTGTGCCTGTACTGAGTG AATGGATTGTTGAATTGTTAGTGGTATTTTGACTTTTGCAAGGAGGAGAAAAAGAAAAAACGGATCAGCCTTGGGCTGG TTGTTATTTCTTTTTCTTTTTGATTCTTTCCTGATCTCAGCTCAAGCAAGAAGACCCGCTG

Prilog 12. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata A12 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sellaphora pupula 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strai...	Sellaphora pupula	268	268	17%	6e-67	94.29%	706	AJ544676.1
Navicula microdigitoradiata voucher PAUL-BELOW-A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Navicula microd...	267	267	17%	2e-66	93.79%	1071	MG968684.
Navicula phyllepta strain BA-04-08 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624230.1
Navicula phyllepta strain BA-04-09 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624229.1
Navicula phyllepta strain BA-04-07 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624227.1
Navicula phyllepta strain BA-04-04 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624226.1
Navicula phyllepta strain CO 0401 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624225.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193569.
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193567.
Navicula phyllepta isolate BA4 clone 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193564.
Navicula phyllepta isolate BA4 clone 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193565.

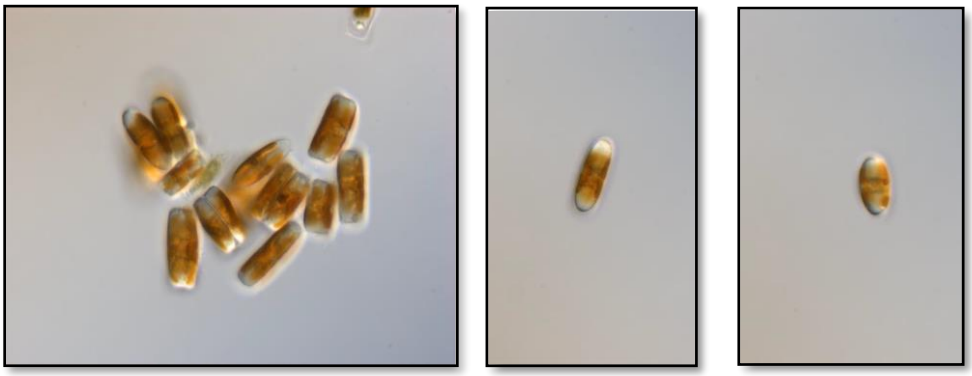
Prilog 13. Sekvenca LSU gena izolata A12

Gen	LSU
Sekvenca	AGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACCAGGATTCCCTCAGTAAGGGCGACTGAAGCGGGAATAGCCCATAC GAAATCTGCGCTCTGCGCCGAATTGTGGTCTGGAGACGCTTGCGTTACTGGCCGGGCCAAGTCCCTTGGAACGGGGCAG CTGAGAGGGTGAGACTCCCGTCCGCCCGGCCGTGTGAGCGAGTAGTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCTCTA AGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGTGGGAGACCGATAGCGTACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGCA AAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAATTGCTGAAAAGGAAGCGAAGGAAACCAGTGCCAGGTGCGTCA TACTTCCCCAACCGCTTGCGGCCGGGGCGCTGTGGCCACCGTTGCCAAGCTTGGTTGATTTGGCTGGAAGTGCGCTCAGG GAGTTGACCTGGGTATTCCGCAGCCAATTCGACCGAGGCTGGCGAAATGGTTTTCTTTTTCCCGTCTT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Prestauroneis integra partial 28S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis in...	832	832	96%	0.0	95.41%	530	AM710581.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H09 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	771	771	100%	0.0	92.44%	570	KM407597.1
Stauroneis gracilior partial 28S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis graci...	769	769	98%	0.0	92.88%	532	AM710543.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	765	765	100%	0.0	92.25%	570	KM407599.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H10 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	765	765	100%	0.0	92.25%	570	KM407598.1
Stauroneis anceps partial 28S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis ance...	750	750	98%	0.0	92.28%	530	AM710564.1
Psammothidium abundans voucher MIC5_40b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium...	728	728	100%	0.0	90.98%	889	KU565395.1
Stauroneis kriegeri partial 28S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis krieg...	725	725	98%	0.0	91.39%	532	AM710545.1
Craticula cuspidata strain UTEX FD35 voucher Theriot Lab Voucher HK061 large subunit ribosomal RNA ...	Craticula cuspid...	723	723	100%	0.0	90.83%	544	MH017629.1
Craticula cuspidata strain FLMan10 rostrate Nav-A14 voucher Theriot Lab Voucher HK499 large subunit ri...	Craticula cuspid...	719	719	99%	0.0	90.76%	541	MH017633.1
Craticula importuna partial 28S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula import...	713	713	98%	0.0	90.98%	532	AM710533.1

Prilog 14. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata A12 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.3. Rezultati identifikacije izolata E7



Prilog 15. Mikroskopska slika izolata E7

Prilog 16. Sekvenca gena 18S rRNA izolata E7

Gen	18S rRNA
Sekvenca	CTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCCTTACTACTCGGATTTAACCGTAGTAATTCTAGAGCT AATACGTGCGTCAATACTCTTCGGAGTAGTATTTATTAGATTGAAACCAACTGCTTCGGCATGATGTGGTGATTCATAAT AAGCTTGCGGATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGACGGTACTGTATTGGA GTACCGTGGCGGTAACGGGTAACGGAAAATTAGGGTTTGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCA AGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGCCTTTG TAGGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCCAGTGCCGT GGCGTCCATTTATTTGGTTCAGCCGTGGCCTTGCCATCCTTGGGTGGATCCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGA TGCCCATCGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATAAG ATAGGTCTTTGGTCCTATTTTGTTGGTTTGCGGGCCGGAGAAATGATTAACAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCAT TGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGA ACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGCGGGG TTTCGTTACGTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAA CTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCA GGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTG GTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCTGCCTGCTAAATAGTCCCGTGAGTGAATTTCACTGG CGAGGACTTCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAGATGCAGGAAGATAGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGAT GTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGTTCTACCTTGGCCGAGAGGCCTGGGCAATCTTTTGAACG TGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAGATCATCAATCTGCA TTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGTGG CCGTTGCCTTTATTGGTGTCGGTTGCGAGAACTTGTCT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillariophyta sp. MBIC10102 gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC10102	Bacillariophyt...	3003	3003	100%	0.0	99.94%	1737	AB183593.1
Prestauroneis integra 18S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis...	2937	2937	100%	0.0	99.20%	1737	AM502025.1
Parlibellus delognei f. ellipticus strain TA387 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Parlibellus del...	2909	2909	100%	0.0	98.90%	1659	KY320352.1
Stauroneis gracilior 18S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis gr...	2909	2909	100%	0.0	98.90%	1737	AM501988.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis kri...	2907	2907	100%	0.0	98.90%	1736	AM501990.1
Stauroneis anceps 18S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis an...	2900	2900	100%	0.0	98.83%	1734	AM502008.1
Sternimirus shandongensis isolate SZCZCH968 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Sternimirus s...	2896	2896	96%	0.0	99.81%	1646	KT943637.1
Stauroneis latistauros strain Xmm1W4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis lat...	2891	2891	100%	0.0	98.71%	1693	KY054994.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-101.02	Stauroneis kri...	2891	2891	100%	0.0	98.71%	1737	AM502037.1
Stauroneis gracilis strain C_35 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis gr...	2846	2846	98%	0.0	98.81%	1615	MN907461.1
Craticula importuna 18S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula imp...	2844	2844	100%	0.0	98.22%	1734	AM501978.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-219.03	Craticula cus...	2828	2828	100%	0.0	98.04%	1734	AM502000.1
Craticula accomoda isolate TCC107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Craticula acc...	2824	2824	100%	0.0	97.97%	1687	KF959652.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-200.05	Craticula cus...	2824	2824	100%	0.0	97.97%	1734	AM501998.1
Craticula molestiformis 18S rRNA gene, strain AT-5Nav02	Craticula mol...	2822	2822	100%	0.0	97.98%	1734	AM501977.1

Prilog 17. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata E7 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 18. Sekvenca gena ITS izolata E7

Gen	ITS
Sekvenca	TCTTCTTGCTTGAGCTGAGATCAGGAAAGAATCAAAAGAAAAAGAAATAACAACCAGCCCAAGGCTGATCCGTTTTTTC TTTTTCTCCTCCTTGCAAAAGTCAAAATACCACTAACAATTCAACAATCCATTCACTCAGTACAGGCACAAGGTGCCAAT ACAAGTCTTCTTCGAATTCTGCAGCAAAACAAACAACAGCGTTGATCGTTTACACAGCCATCTACCAAAGACGGAACAC ATTGAGAATTCTCATGGAAAGAAAGACATTGCTGCAATTACAGCAAAGTCTTACTCTCTTGCAAGCACAACATGCAGCC AGTTGCTCAAAAAGATAGGATCAATTCCCACTCTCCCAACAACTCCAGCTGCTGCTAAACCAACTCAAACAGAGCCACA AACAATTCAGATATAAATTGCCGTGGCAGCTGTCAAATTCCGTGCACAACAATCAAAGCAAAAGCCTTGCATGCGCCGA GAGGGGTTCGCTGACACTCAGACAGGCATGCTCCCGGGAAAATCCCAGAAGCGCAATGTGCGTTCAATATTTTAATGAT TCACGAGGTTTTGCAATTCGCATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGTTGTGGGAGCCTAGACATCCGTTGCTG AAAGTTGTAAAAGCTACGCTTTTCATTCTTCGTAAGCTGTCGATCCGGAAGAGTACCTTGCTTGCACACCATGGTGCAAC AGAATACAATCCCTTCACGCTTCAGGGTCCTTTGGTCATGGCGGGTGATCATTGTAAAAAGCTCTCCTAGACTACCCAAA GTCTAGTCAAGGGATTTTTAAAAAATAGATTGTTTAGTGACAAAAGCCAGCCAAGTGCAGCGGATCGATCGCGATCTCA ATCACAAATCAACGAGCCACAAGCAACCAACCTCCGTCGGGTGAAAGCCAAACACCACCGGTTGCCCACCCAAATAGA ATAGAATTCCTATCCAAGCAAACAACCGCCGCGGCATCTAGCCCTCCATTCAC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sellaphora pupula 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strai...	Sellaphora pupula	268	268	17%	6e-67	94.29%	706	AJ544676.1
Navicula microdigitoradiata voucher PAUL-BELOW-A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequenc...	Navicula microd...	267	267	17%	2e-66	93.79%	1071	MG968684.1
Navicula phyllepta strain BA-04-08 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624230.1
Navicula phyllepta strain BA-04-09 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624229.1
Navicula phyllepta strain BA-04-07 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624227.1
Navicula phyllepta strain BA-04-04 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624226.1
Navicula phyllepta strain CO 0401 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tra...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624225.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193569.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193567.1
Navicula phyllepta isolate BA4 clone 3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193564.1

Prilog 19. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata E7 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

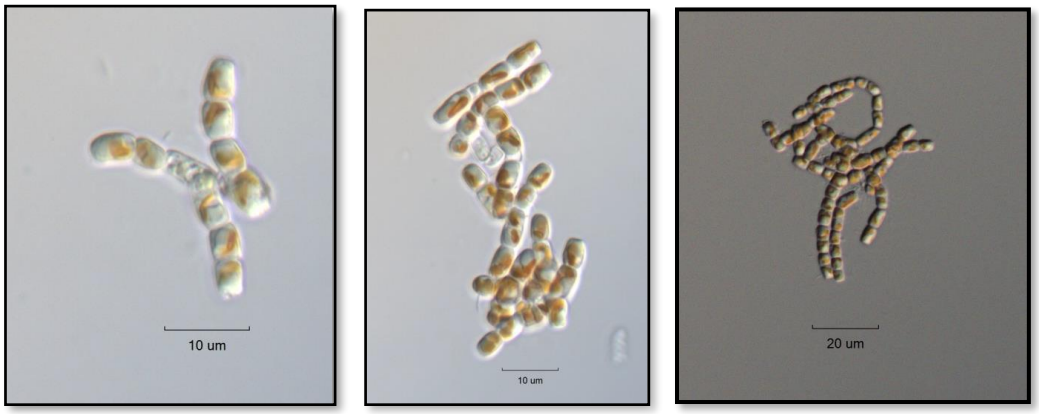
Prilog 20. Sekvenca gena LSU izolata E7

Gen	LSU
Sekvenca	CAAGACGGGAAAAAGAAAACCATTTCGCCAGCCTCGGTCGAATTGGCTGCGGAATACCCAGGTCAACTCCCTGAGCGCA CTTCCAGCCAAATCAACCAAGCTTGGCAACGGTGGCCACAGCGCCCCGGCCGCAAGCGGTTGGGGAAGTATGACGCACC TGGCACTGGTTTCCTTCGCTTCCTTTTCAGCAATTTCAGGTACTCTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTGCATCTTTCCCT CACGGTACTTGTACGCTATCGGTCTCCCACCAGTATTTAGCCTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCAATCCC AAACAACTCGACTCGTAGACTACTCGCTCACACGGCCGGGCGGACGGGAGTCTCACCCTCTCAGCTGCCCCGTTCCAAG GGACTTGGCCCGGCCAGTAACGCAAGCGTCTCCAGACCACAATTCGGCGCAGAGCGCAGATTTCGTATGGGCTATTCCC GCTTCAGTCGCCCTTACTGAGGGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTAATTATATGCTT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Prestauroneis integra partial 28S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis in...	832	832	96%	0.0	95.41%	530	AM710581.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H09 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	774	774	100%	0.0	92.46%	570	KM407597.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407599.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H10 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407598.1
Stauroneis gracilior partial 28S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis graci...	769	769	97%	0.0	92.88%	532	AM710543.1
Stauroneis anceps partial 28S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis ance...	750	750	97%	0.0	92.28%	530	AM710564.1
Psammothidium abundans voucher MIC5_40b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium...	732	732	100%	0.0	91.01%	889	KU565395.1
Craticula cuspidata strain UTEX FD35 voucher Theriot Lab Voucher HK061 large subunit ribosomal RNA...	Craticula cuspid...	725	725	99%	0.0	90.84%	544	MH017629.1
Stauroneis kriegeri partial 28S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis krieg...	725	725	97%	0.0	91.39%	532	AM710545.1
Craticula cuspidata strain FLMan10 rostrate Nav-A14 voucher Theriot Lab Voucher HK499 large subunit ri...	Craticula cuspid...	719	719	99%	0.0	90.76%	541	MH017633.1
Psammothidium sp. LFS-2014 isolate Ant022-H05 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium...	715	715	100%	0.0	90.48%	572	KM407593.1

Prilog 21. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata E7 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.4. Rezultati identifikacije izolata D1



Prilog 22. Mikroskopska slika izolata D1

Prilog 23. Sekvenca gena 18S rRNA izolata D1

Gen	18S rRNA
Sekvenca	GCTCGTAGTTGGATTTGTGGGTGGAGCGAGCGTCCCGACGCTCAGCGTGGGTGAGGTTCGTCTCCGTCCATCCTTGGGTG GAATCCGCGTGGCATTGAGTTGTCGTGCGGGGGATGCCCATCTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTT ACGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATGAGATAGGACCTGGGTACTATTTTGTTGGTTTGCGCACCGAGGTAATGAT TAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACGACTGCGA AAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTT AACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGTGGGCGTTTGTATGACCCCATCAGCACCTTAGGAGAAATCACAAGTTTTT GGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAACCTGC GGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACACAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGA TTCTGTGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCT GCCTGCTAAATAGTTGGGCGAATGAATGTTCATTGGCTGCAGCTTCTTAGAGGGACGTGCGTTCTATTAGACGCAGGAA GATAGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGCGCGTTACACTGATGCACTCAACGAGTC TACCTTGGCCGAGAGGCCTGGGAAATCTTGTTAACATGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAAC GAGGAATTCCTAGTAAACGCAGATCATCAATCTGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTA CCGATTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGCGATGAGTTTCCTTCATTGGGAGTTTGTCGCGAGAACTTGTCTAAAC CT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Nanofrustulum shiloi isolate CCMP1306 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2052	2052	100%	0.0	99.91%	1203	MF093126.1
Nanofrustulum shiloi strain CCMP1306 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2050	2050	100%	0.0	99.82%	1904	AY485505.1
Nanofrustulum cf. shiloi strain TAU-MAC 2215 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2047	2047	100%	0.0	99.82%	1204	MN510855.1
Nanofrustulum shiloi small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2047	2047	100%	0.0	99.82%	1741	AF525658.1
Fragilaria pinnata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Fragilaria pinnata	2041	2041	100%	0.0	99.73%	1211	EF192988.1
Nanofrustulum shiloi clone P194 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2037	2037	100%	0.0	99.64%	1786	EF491891.1
Nanofrustulum shiloi partial 18S rRNA gene, strain p194	Nanofrustulum ...	2025	2025	100%	0.0	99.46%	1783	AM746971.1
Nanofrustulum cf. shiloi strain TAU-MAC 2115 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2023	2023	99%	0.0	99.64%	1174	MN510854.1
Nanofrustulum wachnickianum isolate SZCZCH194 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nanofrustulum ...	2002	2002	100%	0.0	99.10%	1732	KU851874.1
Pseudostaurosira elliptica isolate s0398 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudostauros...	1991	1991	100%	0.0	98.92%	1732	MF093080.1
Pseudostaurosira brevistriata gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: s0398	Pseudostauros...	1991	1991	100%	0.0	98.92%	1779	AB430608.1
Staurosira sp. I-141 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staurosira sp. I...	1991	1991	100%	0.0	98.92%	1791	EF465491.1
Pseudostaurosira elliptica isolate SZCZCH1348 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudostauros...	1986	1986	100%	0.0	98.83%	1781	KU851878.1
Pseudostaurosira elliptica isolate SZCZCH1249 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Pseudostauros...	1980	1980	100%	0.0	98.74%	1198	KU851872.1

Prilog 24. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata D1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 25. Sekvenca gena ITS izolata D1

Gen	ITS
Sekvenca	TCATTGAAACTTTGAACGCACATTGCGCTTCCGGGCCATTCCCGGTAGCATACTTATCTGAGTGTCCGCGAACCCCACTC AGCGTGTGTGCCATCAATCAATAGTGGCGCGTACTGCTGGACTGTGGCTCTACAACAATTTATTCTTGTTGAGTCCAAGT GAGATGACAACCTCCTTGCGCATTTGACCCCTTCCAATGAGGGGTGTCTGAGCTAGTTTGTTCCATCGTGGAATCGAACG GGGATGTTCCTAGTAGGGCGGAGCCAGCCTCCATCTAATCCAGGAACTCGTCTTCTGCCGAGACCATACCATTGAATAA GCCAGCCCAA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Fragilaria pinnata culture-collection CCMP:398 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp...	Fragilaria pinn...	126	126	26%	1e-24	93.02%	419	GQ330340.1
Tabularia cf. tabulata strain CCMP846 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, p...	Tabularia cf. ta...	124	124	23%	4e-24	96.05%	406	EU883364.1
Grammatophora sp. B LG-2014 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa...	Grammatopho...	122	122	25%	2e-23	92.86%	609	KJ671768.1
Tabularia affinis strain 206AUK 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial s...	Tabularia affinis	122	122	25%	2e-23	92.86%	347	EU883366.1
Fragilaria sp. RCC4616 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, c...	Fragilaria sp. ...	121	121	26%	6e-23	91.86%	923	MH643527.1
Grammonema striatula culture-collection CCMP:1094 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcri...	Grammonema...	121	121	26%	6e-23	91.86%	426	GQ330341.1
Grammonema striatula voucher IK_MTA4 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Grammonema...	121	121	26%	6e-23	91.86%	435	FJ864286.1
Grammatophora oceanica voucher IK_MTA110 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	Grammatopho...	119	119	26%	2e-22	90.70%	424	FJ864287.1

Prilog 26. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata D1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

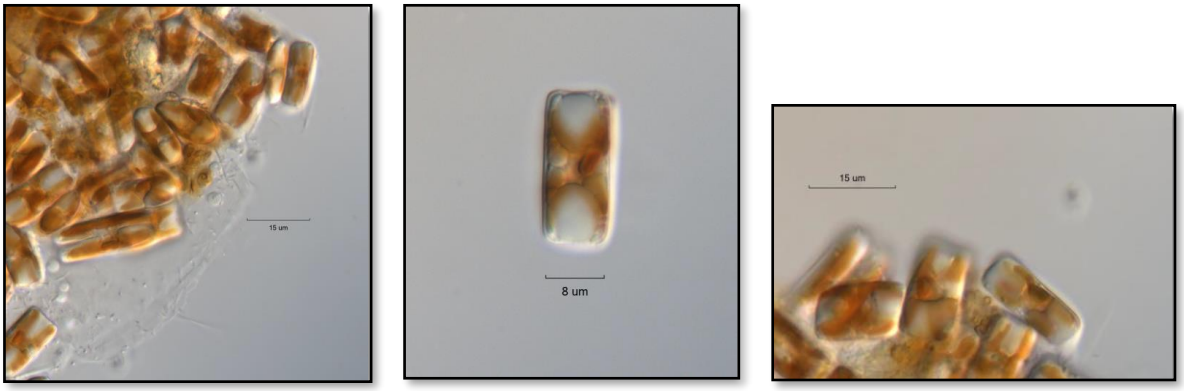
Prilog 27. Sekvenca gena LSU izolata D1

Gen	LSU
Sekvenca	CATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACCAGGATTCCCCTAGTAAGGGCGACTGAAGCGGGAAGAGCCCAACATG CGAATCTGTGCCTTGGCACCGAATTGTGGTCTGTTCGCGCTACGTGGCTCGGGCCAAGTCCCTTGGAAAAGGGCAGCTG AGAGGGTGAGACTCCCGTCCGCCCGAGCCAGTGAGCGAGCATGTTGGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCTCAAAGCG GGTGGTAAATTCCATCGAAGGCTAAATATTGGTGGGAGACCGATAGCGTACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGCAAAGA ACTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAATTGCTGAAAGGGAAGCGAAGGAAACCAGTGTTGCTGCGCAGTCATA CTTCTCCGTCCGCTTGCGGGCGGGGCGCTGTGTCTGCGCTCGGGTCAGGCTTGGTTGGGGGCGCCGCAAAGGCTCCTCTG GGAGTTGACCGCTGGAGCTGGCGGTGGTCCCGACCGAGGTTGGCGAAATGGTTTTCTTTACCCCGTCTTGAAA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Nanofrustulum shiloi gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: p194	Nanofrustulum shiloi	989	989	100%	0.0	99.27%	574	AB430640.1
Pseudostaurosira brevistriata gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: s0398	Pseudostaurosira brevistriata	837	837	100%	0.0	94.32%	572	AB430648.1
Cyclotella caspia 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cyclotella caspia	754	754	98%	0.0	91.91%	549	AY496197.1
Opephora sp. s0357 gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: s0357	Opephora sp. s0357	734	734	100%	0.0	90.94%	572	AB430643.1
Plagiostriata goreensis gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: s0388	Plagiostriata goreensis	645	645	100%	1e-180	87.96%	572	AB430644.1
Asterionella formosa gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: s0339	Asterionella formosa	628	628	100%	1e-175	87.73%	563	AB430632.1
Diatoma moniliforme gene for 28S rRNA, partial sequence, strain: s0383	Diatoma moniliforme	616	616	100%	1e-171	87.36%	563	AB430635.1
Eunotia bilunaris voucher SPAG24 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Eunotia bilunaris	614	614	100%	4e-171	87.39%	892	MH272973.1
Eunotia bilunaris voucher NOS14 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Eunotia bilunaris	614	614	100%	4e-171	87.39%	879	MH272969.1

Prilog 28. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata D1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.5. Rezultati identifikacije izolata B2



Prilog 29. Mikroskopska slika izolata B2

Prilog 30. Sekvenca gena 18S rRNA izolata B2

Gen	18S rRNA
Sekvenca	CGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCCTTACTACTCGGATTTAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGT GCGTCAATACTCTTCGGAGTAGTATTTATTAGATTGAAACCAACTGCTTCGGCATGATGTGGTGATTCATAATAAGCTTG CGGATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGACGGTACTGTATTGGAGTACCGT GGCGGTAACGGGTAACGGAAAATTAGGGTTTGACACCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGG CAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGCCTTTGTAGGTCTG GCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT TCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCCAGTGCCGTGGCGTCCA TTTATTTGGTTCAGCCGTGGCCTTGCCATCCTTGGGTGGATCCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATC GTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATATTAGCATGGAATAATAAGATAGGTCTT TGGTCCTATTTTGTTGGTTTGCGGGCCGGAGAAATGATTAACAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGG TGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTT AGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGCGGGGTTTCGTTAC GTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGA AATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGA CATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTG ATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCTGCCTGCTAAATAGTCCCGTGAGTGAATTTCACTGGCGAGGACT TCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAGATGCAGGAAGATAGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG CCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGTTCTACCTTGGCCGAGAGGCCTGGGCAATCTTTTGAACGTGCATCGT GATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAGATCATCAATCTGCATTGATTAC GTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGGTCCGGTGAAGCCTCGGGATTGTGGCCGTTGCC TTTATTGGTGTCGGTTGCGAGAACTTGTCTAAACCTTATCATT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillariophyta sp. MBIC10102 gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC1...	Bacillarioph...	3014	3014	100%	0.0	99.94%	1737	AB183593.1
Prestauroneis integra 18S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauron...	2948	2948	100%	0.0	99.21%	1737	AM502025.1
Parlibellus delognei f. ellipticus strain TA387 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Parlibellus ...	2920	2920	100%	0.0	98.90%	1659	KY320352.1
Stauroneis gracilior 18S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis ...	2920	2920	100%	0.0	98.90%	1737	AM501988.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis ...	2918	2918	100%	0.0	98.90%	1736	AM501990.1
Stauroneis anceps 18S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis ...	2911	2911	100%	0.0	98.84%	1734	AM502008.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-101.02	Stauroneis ...	2902	2902	100%	0.0	98.72%	1737	AM502037.1
Stauroneis latistauros strain Xmm1W4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis l...	2887	2887	99%	0.0	98.71%	1693	KY054994.1
Sternimirus shandongensis isolate SZCZCH968 18S ribosomal RNA gene, partial s...	Sternimirus ...	2883	2883	96%	0.0	99.81%	1646	KT943637.1
Craticula importuna 18S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula im...	2856	2856	100%	0.0	98.23%	1734	AM501978.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-219.03	Craticula cu...	2839	2839	100%	0.0	98.04%	1734	AM502000.1
Craticula accomoda isolate TCC107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Craticula ac...	2835	2835	100%	0.0	97.98%	1687	KF959652.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-200.05	Craticula cu...	2835	2835	100%	0.0	97.98%	1734	AM501998.1
Stauroneis gracilis strain C_35 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis ...	2833	2833	97%	0.0	98.81%	1615	MN907461.1

Prilog 31. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata B2 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 32. Sekvenca gena ITS izolata B2

Gen	ITS
Sekvenca	ATGCCGCGGCGGTTGTTTGCTTGGATAGGAATTCTATTCTATTTGGGTGGGCAACCGGTGGTGTTTGGCTTTCACCCGAC GGAGGTTGGTTGCTTGTGGCTCGTTGATTTGTGATTGAGATCGCGATCGATCCGCTGCACTTGGCTGGCTTTTGTCACTAA ACAATCTATTTTTTAAAAATCCCTTGACTAGACTTTGGGTAGTCTAGGAGAGCTTTTTACAATGATCACCCGCCATGACC AAAGGACCCTGAAGCGTGAAGGGATTGTATTCTGTTGCACCATGGTGTGCAAGCAAGGTACTCTTCCGGATCGACAGCT TACGAAGAATGAAAAGCGTAGCTTTTACAACTTTCAGCAACGGATGTCTAGGCTCCCACAACGATGAAGAACGCAGCGA AATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAAACCTCGTGAATCATTAAAATATTGAACGCACATTGCGCTTCTGGGATTTTCCC GGGAGCATGCCTGTCTGAGTGTCAGCGAACCCCTCTCGGCGCATGCAAGGCTTTTGCTTTGATTGTTGTGCACGGAATTT GACAGCTGCCACGGCAATTTATATCTGAATTGTTTGTGGCTCTGTTTGAGTTGGTTTAGCAGCAGCTGGAGTTGTTGGGA GAGTGGGAATTGATCCTATCTTTTTGAGCAACTGGCTGCATGTTGTGCTTGCAAGAGAGTAAGACTTTGCTGTAATTGCA GCAATGTCTTTCTTTCCATGAGAATTCTCAATGTGTTCCGTCTTTGGTAGATGGCTGTGTAAACGATCAACGCTGTTGTTT GTTTTGCTGCAGAATTCGAAGAAGACTTGTATTGGCACCTTGTGCCTGTACTGAGTGAATGGATTGTTGAATTGTTAGTG GTATTTTGACTTTTGCAAGGAGGAGAAAAAGAAAAAACGGATCAGCCTTGGGCTGGTTGTTATTTCTTTTTCTTTTTGATT CTTTCCTGATCTCAGCTCAAGCAAGAAGACCCGCTG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sellaphora pupula 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain BL...	Sellaphora pupula	268	268	17%	6e-67	94.29%	706	AJ544676.1
Navicula microdigitoradiata voucher PAUL-BELOW-A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; in...	Navicula microdi...	267	267	17%	2e-66	93.79%	1071	MG968684.1
Navicula phyllepta strain BA-04-08 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624230.1
Navicula phyllepta strain BA-04-09 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624229.1
Navicula phyllepta strain BA-04-07 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624227.1
Navicula phyllepta strain BA-04-04 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624226.1
Navicula phyllepta strain CO 0401 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	954	FJ624225.1
Navicula phyllepta isolate BA3 clone 2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1...	Navicula phyllepta	267	267	17%	2e-66	93.79%	1021	DQ193569.1

Prilog 33. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata B2 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

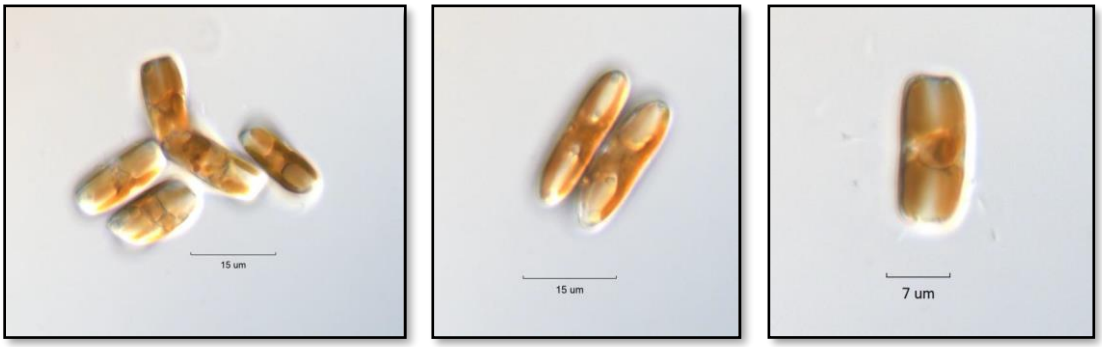
Prilog 34. Sekvenca gena LSU rRNA izolata B2

Gen	LSU
Sekvenca	AAGCATATAATTAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACCAGGATTCCCTCAGTAAGGGCGACTGAAGCGGGAATAGCCCATA CGAAATCTGCGCTCTGCGCCGAATTGTGGTCTGGAGACGCTTGCGTTACTGGCCGGGCCAAGTCCCTTGGAACGGGGCA GCTGAGAGGGTGAGACTCCCGTCCGCCCGGCCGTGTGAGCGAGTAGTCTACGAGTCGAGTTGTTTGGGATTGCAGCTCT AAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAATACTGGTGGGAGACCGATAGCGTACAAGTACCGTGAGGGAAAGATGC AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTTAAAGAGTACCTGAAATTGCTGAAAAGGAAGCGAAGGAAACCAGTGCCAGGTGCGTC ATACTTCCCCAACCGCTTGCGGCCGGGGCGCTGTGGCCACCGTTGCCAAGCTTGGTTGATTTGGCTGGAAGTGCGCTCAG GGAGTTGACCTGGGTATTCCGCAGCCAATTCGACCGAGGCTGGCGAAATGGTTTTCTTTTTCCCGTCTTG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Prestauroneis integra partial 28S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis in...	832	832	96%	0.0	95.41%	530	AM710581.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H09 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	774	774	100%	0.0	92.46%	570	KM407597.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407599.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H10 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407598.1
Stauroneis gracilior partial 28S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis gracil...	769	769	97%	0.0	92.88%	532	AM710543.1
Stauroneis anceps partial 28S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis anceps	750	750	97%	0.0	92.28%	530	AM710564.1
Psammothidium abundans voucher MIC5_40b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium ...	732	732	100%	0.0	91.01%	889	KU565395.1
Craticula cuspidata strain UTEX FD35 voucher Theriot Lab Voucher HK061 large subunit ribosomal RNA gen...	Craticula cuspidata	725	725	99%	0.0	90.84%	544	MH017629.1

Prilog 35. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata B2 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.6. Rezultati identifikacije izolata D5



Prilog 36. Mikroskopska slika izolata D5

Prilog 37. Sekvenca gena 18S rRNA izolata D5

Gen	18S rRNA
Sekvenca	TATAAATCTTTTACTTTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGATAGTCCCTTACTACTCGGATTT AACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTCAATACTCTTCGGAGTAGTATTTATTAGATTGAAACCAACTGCTTCGG CATGATGTGGTGATTCATAATAAGCTTGCGGATCGCATGGCTTTGCCGGCGATGGATCATTCAAGTTTCTGCCCTATCAG CTTTGACGGTACTGTATTGGAGTACCGTGGCGGTAACGGGTAACGGAAAATTAGGGTTTGACACCGGAGAGGGAGCCTG AGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCTTGACACAAGGAGGTAGTGACAATAA ATAACAATGCCGGGCCTTTGTAGGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCCCTTATCGAGGATCAATTGGAGGG CAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT GGATTTGTGGCCAGTGCCGTGGCGTCCATTTATTTGGTTCAGCCGTGGCCTTGCCATCCTTGGGTGGATCCTGTGTGGCAT TAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATA TTAGCATGGAATAATAAGATAGGTCTTTGGTCCTATTTTGTTGGTTTGCGGGCCGGAGAAATGATTAACAGGGACAGTTG GGGGTATTCGTATTCCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGGAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGG ATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACCATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGC CGACAAGGGATTGGCGGGGTTTCGTTACGTCTCCGTCAGCACCTTATGAGAAATCACAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGA GTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTC AACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGG TGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCCCTGCCTGCTAAATAGTC CCGTGAGTGAATTTCACTGGCGAGGACTTCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAGATGCAGGAAGATAGGGGCAATAACA GGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGTTCTACCTTGGCCGAGAGG CCTGGGCAATCTTTTGAACGTGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAA ACGCAGATCATCAATCTGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCACCTACCGATTGAATGGTCCG GTGAAGCCTCGGGATTGTGGCCGTTGCCTTTATTGGTGTCGGTTGCGAGAACTTGTCTAAACCTTATCA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Bacillariophyta sp. MBIC10102 gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: MBIC1...	Bacillarioph...	3062	3062	100%	0.0	99.94%	1737	AB183593.1
Prestauroneis integra 18S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauron...	2996	2996	100%	0.0	99.22%	1737	AM502025.1
Stauroneis gracilior 18S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis ...	2968	2968	100%	0.0	98.92%	1737	AM501988.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-70.12	Stauroneis ...	2966	2966	100%	0.0	98.92%	1736	AM501990.1
Stauroneis anceps 18S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis ...	2959	2959	100%	0.0	98.86%	1734	AM502008.1
Stauroneis kriegeri 18S rRNA gene, strain AT-101.02	Stauroneis ...	2950	2950	100%	0.0	98.74%	1737	AM502037.1
Parlibellus delognei f. ellipticus strain TA387 18S ribosomal RNA gene, partial sequ...	Parlibellus ...	2944	2944	99%	0.0	98.91%	1659	KY320352.1
Stauroneis latistauros strain Xmm1W4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis l...	2939	2939	99%	0.0	98.73%	1693	KY054994.1
Sternimirus shandongensis isolate SZCZCH968 18S ribosomal RNA gene, partial s...	Sternimirus ...	2935	2935	96%	0.0	99.81%	1646	KT943637.1
Craticula importuna 18S rRNA gene, strain AT-70Gel14a	Craticula im...	2904	2904	100%	0.0	98.25%	1734	AM501978.1
Craticula accomoda isolate TCC107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Craticula ac...	2883	2883	100%	0.0	98.01%	1687	KF959652.1
Craticula cuspidata 18S rRNA gene, strain AT-219.03	Craticula cu...	2881	2881	100%	0.0	98.01%	1734	AM502000.1
Craticula molestiformis 18S rRNA gene, strain AT-5Nav02	Craticula m...	2881	2881	100%	0.0	98.01%	1734	AM501977.1

Prilog 38. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata D5 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 39. Sekvenca gena ITS izolata D5

Gen	ITS
Sekvenca	GTGAATGGAGGGCTAGATGCCGCGGCGGTTGTTTGCTTGGATAGGAATTCTATTCTATTTGGGTGGGCAACCGGTGGTGT TTGGCTTTCACCCGACGGAGGTTGGTTGCTTGTGGCTCGTTGATTTGTGATTGAGATCGCGATCGATCCGCTGCACTTGG CTGGCTTTTGTCACTAAACAATCTATTTTTTAAAAATCCCTTGACTAGACTTTGGGTAGTCTAGGAGAGCTTTTTACAATG ATCACCCGCCATGACCAAAGGACCCTGAAGCGTGAAGGGATTGTATTCTGTTGCACCATGGTGTGCAAGCAAGGTACTC TTCCGGATCGACAGCTTACGAAGAATGAAAAGCGTAGCTTTTACAACTTTCAGCAACGGATGTCTAGGCTCCCACAACG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAAAACCTCGTGAATCATTAAAATATTGAACGCACATTGC GCTTCTGGGATTTTCCCGGGAGCATGCCTGTCTGAGTGTCAGCGAACCCCTCTCGGCGCATGCAAGGCTTTTGCTTTGAT TGTTGTGCACGGAATTTGACAGCTGCCACGGCAATTTATATCTGAATTGTTTGTGGCTCTGTTTGAGTTGGTTTAGCAGCA GCTGGAGTTGTTGGGAGAGTGGGAATTGATCCTATCTTTTTGAGCAACTGGCTGCATGTTGTGCTTGCAAGAGAGTAAGA CTTTGCTGTAATTGCAGCAATGTCTTTCTTTCCATGAGAATTCTCAATGTGTTCCGTCTTTGGTAGATGGCTGTGTAAACG ATCAACGCTGTTGTTTGTTTTGCTGCAGAATTCGAAGAAGACTTGTATTGGCACCTTGTGCCTGTACTGAGTGAATGGAT TGTTGAATTGTTAGTGGTATTTTGACTTTTGCAAGGAGGAGAAAAAGAAAAAACGGATCAGCCTTGGGCTGGTTGTTA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Sellaphora pupula 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (partial), strain BL...	Sellaphora pupula	268	268	18%	6e-67	94.29%	706	AJ544676.1
Navicula microdigitoradiata voucher PAUL-BELOW-A12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, in...	Navicula microdi...	267	267	18%	2e-66	93.79%	1071	MG968684.1
Navicula phyllepta strain BA-04-08 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	18%	2e-66	93.79%	954	FJ624230.1
Navicula phyllepta strain BA-04-09 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	18%	2e-66	93.79%	954	FJ624229.1
Navicula phyllepta strain BA-04-07 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	18%	2e-66	93.79%	954	FJ624227.1
Navicula phyllepta strain BA-04-04 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr...	Navicula phyllepta	267	267	18%	2e-66	93.79%	954	FJ624226.1
Navicula phyllepta strain CO 0401 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcri...	Navicula phyllepta	267	267	18%	2e-66	93.79%	954	FJ624225.1

Prilog 40. Rezultati usporedbe sekvence ITS gena izolata D5 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

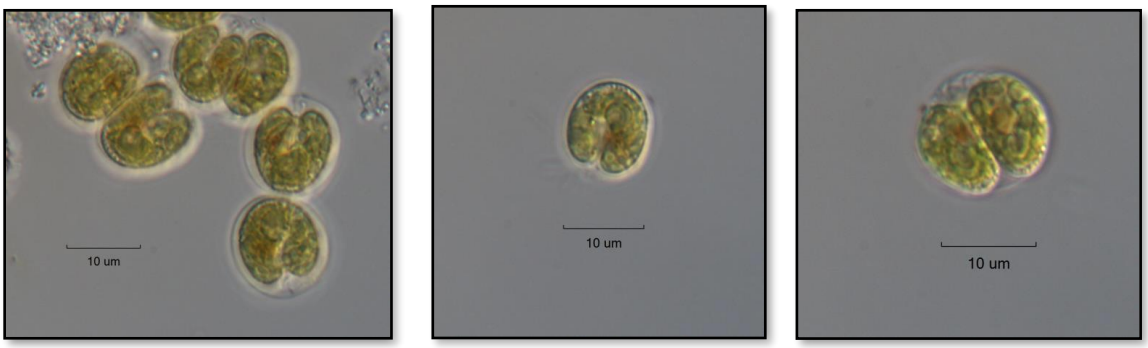
Prilog 41. Sekvenca gena LSU izolata D5

Gen	LSU
Sekvenca	CAAGACGGGAAAAAGAAAACCATTTCGCCAGCCTCGGTCGAATTGGCTGCGGAATACCCAGGTCAACTCCCTGAGCGCA CTTCCAGCCAAATCAACCAAGCTTGGCAACGGTGGCCACAGCGCCCCGGCCGCAAGCGGTTGGGGAAGTATGACGCACC TGGCACTGGTTTCCTTCGCTTCCTTTTCAGCAATTTCAGGTACTCTTTAACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTGCATCTTTCCCT CACGGTACTTGTACGCTATCGGTCTCCCACCAGTATTTAGCCTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCAATCCC AAACAACTCGACTCGTAGACTACTCGCTCACACGGCCGGGCGGACGGGAGTCTCACCCTCTCAGCTGCCCCGTTCCAAG GGACTTGGCCCGGCCAGTAACGCAAGCGTCTCCAGACCACAATTCGGCGCAGAGCGCAGATTTCGTATGGGCTATTCCC GCTTCAGTCGCCCTTACTGAGGGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTAATTATATGCTT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Prestauroneis integra partial 28S rRNA gene, strain AT-177.13	Prestauroneis in...	832	832	96%	0.0	95.41%	530	AM710581.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H09 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	774	774	100%	0.0	92.46%	570	KM407597.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H11 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407599.1
Stauroneis latistauros isolate Ant007-H10 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Stauroneis latist...	769	769	100%	0.0	92.28%	570	KM407598.1
Stauroneis gracilior partial 28S rRNA gene, strain AT-117Gel17	Stauroneis gracil...	769	769	97%	0.0	92.88%	532	AM710543.1
Stauroneis anceps partial 28S rRNA gene, strain AT-160Gel11	Stauroneis anceps	750	750	97%	0.0	92.28%	530	AM710564.1
Psammothidium abundans voucher MIC5_40b 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Psammothidium...	732	732	100%	0.0	91.01%	889	KU565395.1
Craticula cuspidata strain UTEX FD35 voucher Theriot Lab Voucher HK061 large subunit ribosomal RNA gen...	Craticula cuspidata	725	725	99%	0.0	90.84%	544	MH017629.1

Prilog 42. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata D5 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.7. Rezultati identifikacije izolata Z3



Prilog 43. Mikroskopska slika izolata Z3

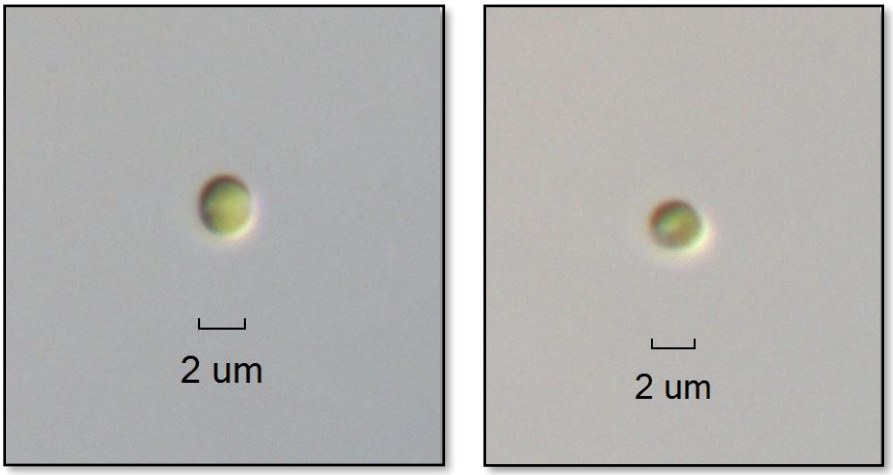
Prilog 44. Sekvenca gena 18S rRNA izolata Z3

Gen	18S rRNA
Sekvenca	CTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTA ATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATTTAAGGCCAACCGAGCTCTGCTCGTCTCTTGGT GAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTCCGCGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAATTGGCGA TGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGTTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAA ATGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGATACAGGGAGGTAGTGACAATAAATA ACAATACCGGGCTTTTCAAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAA GTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTG GATTTCGGATGGGACTTGCCGGTCCGTCGTTGCGATGTGCACTGGCCAGTCCTATCTTGTTGTCGGGGACTAGCTCCTG GGCTTCACTGTCCGGGACTAGGAGCTGACGAGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGA ATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTTATCCTGTTGGTCTGTGAGACCAGAGTAATGATTAAGAGGG ACAGTCGGGGACATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATT TGTCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCAT AAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGACGTTTTTTTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGG TTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGG CTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGAT TCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCA GCCTGCTAAATAGTTACTCCTACTTTGGTAGGAGGCGAACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAGCCAATGGAAGTG TGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTA GCCTTGACCGAGAGGTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGCTAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACG AGGAATGCCTAGTAAGCGTGATTCATCAAATCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tetraselmis rubens strain RCC133 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2863	2863	100%	0.0	100.00%	1565	KT860871.1
Tetraselmis marina strain CTM 20015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2863	2863	100%	0.0	100.00%	1636	KT023599.1
Tetraselmis marina strain NZmm1W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2857	2857	100%	0.0	99.94%	1744	KY054995.1
Tetraselmis rubens isolate CCAP 66/6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2837	2837	99%	0.0	99.87%	1603	KX904700.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_R_9_2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2824	2824	98%	0.0	99.93%	1585	KX904703.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_R_9_3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2822	2822	98%	0.0	100.00%	1587	KX904704.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_V_2_2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2817	2817	98%	0.0	99.87%	1586	KX904705.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_Mes_5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2809	2809	99%	0.0	99.55%	1603	KX904702.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_Mes_17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2809	2809	99%	0.0	99.55%	1600	KX904701.1
Tetraselmis marina isolate MP0060 small subunit ribosomal RNA gene, partial seq...	Tetraselmis...	2791	2791	100%	0.0	99.16%	1740	KY655019.1
Tetraselmis marina 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (par...	Tetraselmis...	2787	2787	100%	0.0	99.10%	5630	HE610131.1
Tetraselmis marina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis...	2785	2785	100%	0.0	99.10%	1669	KY045847.1

Prilog 45. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata Z3 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.8. Rezultati identifikacije izolata D3



Prilog 46. Mikroskopska slika izolata D3

Prilog 47. Sekvenca gena 18S rRNA izolata D3

Gen	18S rRNA
Sekvenca	AGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCCTTTGGTCTG GTAATTGGAATGAGTACAACCTAAACACCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT TCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGGCCTGCCGGTCCGC CGTTTCGGTGTGCACTGGCCNGGGCCCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCGCTGTCCGGGACCCGGAGTCG GCGAGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGG ACTCTGGCCTATCCTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCA GAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGA AAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGGTGTTT TTTTGATGACCCCGCCGGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTT AAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGT CCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTG GGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAACTAGTCACGCGTGCTCCGGCACGCGGCG GACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCT GGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAACGAGCCTATCCTTGGCCGAGAGGTCCGGGTAATCTTTGAATCTGCATC GTGACGGGGATAGATTATTGCAATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATT ACGTCCCTGCCC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Nannochloropsis oculata strain Xmm23S2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochlorops...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1708	KY054986.1
Nannochloris sp. KMMCC 161 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1668	JQ315641.1
Nannochloris sp. KMMCC C103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1669	GQ122342.1
Nannochloris sp. KMMCC C-75 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1669	GQ122337.1
Picochlorum oculatum 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochlorops...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1692	AY422075.1
Nanochlorum eucaryotum 18S rDNA	Picochlorum eu...	2209	2209	100%	0.0	99.83%	1796	X06425.1
Picochlorum eukaryotum sensu Mainz 1 strain Xmm7W2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Picochlorum eu...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1711	KY054971.1
Picochlorum eukaryotum sensu Mainz 1 strain Xmm7W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Picochlorum eu...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1642	KY054970.1
Picochlorum eukaryotum isolate Xmm37W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Picochlorum eu...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1711	KU561201.1
Nannochloropsis oculata isolate Xmm36S2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochlorops...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1709	KU561163.1
Nannochloris sp. KMMCC 326 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1668	JQ315648.1
Nannochloris sp. KMMCC 861 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1668	JQ315646.1
Nannochloris sp. KMMCC 312 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1668	JQ315643.1
Nannochloris sp. KMMCC 119 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2204	2204	100%	0.0	99.75%	1668	JQ315639.1
Nannochloris sp. KMMCC 118 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2198	2198	100%	0.0	99.67%	1667	JQ315638.1
Nannochloris sp. KMMCC C-166 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nannochloris s...	2198	2198	100%	0.0	99.67%	1669	GQ122350.1

Prilog 48. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata D3 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

Prilog 49. Sekvenca gena 16S rRNA izolata D3

Gen	16S rRNA
Sekvenca	TCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACAGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTGATTGGGCGTAAAGCGTCTG TAGGTGGTTTATCCAGTCTTCTGTCAAAGATCAGGGCTTAACCTTGGATAGGCAGGAGAAACTAATAGACTAGAGTTCG GTAGGGGCAGAGGGAATTCCCGGTGGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAAAGGCGAAAGCACTCTG CTGGGCCGCGACTGACACTGAGAGACGAAAGCGAGGGGAGCAAATGGGATTAGATACCCCAGTAGTCCTCGCCGTAAA CGATGGATACTAGGTGTTGGGTGATATTACATTCAGTACCGTAGCTAACGCGTGAAGTATCCCGCCTGGGGAGTATGCTC GCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAA GAACCTTACCAGGGCTTGACATGCCACTTTTTTCTTGAAAAAGAAAGTTCCCGAGTGGACACAGGTGGTGCATGGCTGTC GTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTTTGTGTTGCTATTTTTAGGAAACTC AAAAGACTGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTACGCCCTGGGCCACACA CGTGCTACAATGGCTGGGACAAAGAGATGCAACCCCGCGAGGGCAAGCCAACCTC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Picochlorum sp. RCC475 chloroplast partial 16S rRNA gene, strain RCC 475	Picochlorum sp....	1395	1395	98%	0.0	99.87%	791	LN735427.3
Picochlorum sp. 'soloecismus' strain DOE 101 chloroplast, complete genome	Picochlorum sp. '...	1393	1393	100%	0.0	99.48%	72741	MG552671.1
Chlorella sp. UMPCCC 1312 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	Chlorella sp. UM...	1393	1393	100%	0.0	99.48%	1114	KT438808.1
Chlorella sp. UMPCCC 1231 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	Chlorella sp. UM...	1393	1393	100%	0.0	99.48%	1114	KM218898.1
Chlorella sp. UMPCCC 1222 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	Chlorella sp. UM...	1393	1393	100%	0.0	99.48%	1113	KM218896.1
Uncultured organism clone L73_ML_035 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	uncultured organ...	1336	1336	95%	0.0	99.46%	842	FJ353941.1
Nannochloris sp. 5-RCC9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid	Nannochloris sp....	1247	1247	100%	0.0	95.97%	898	AY702134.1
Chlorella sp. UMPCCC 1309 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; chloroplast	Chlorella sp. UM...	1245	1245	100%	0.0	95.97%	1061	KT438813.1

Prilog 50. Rezultati usporedbe sekvence 16S rRNA gena izolata D3 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

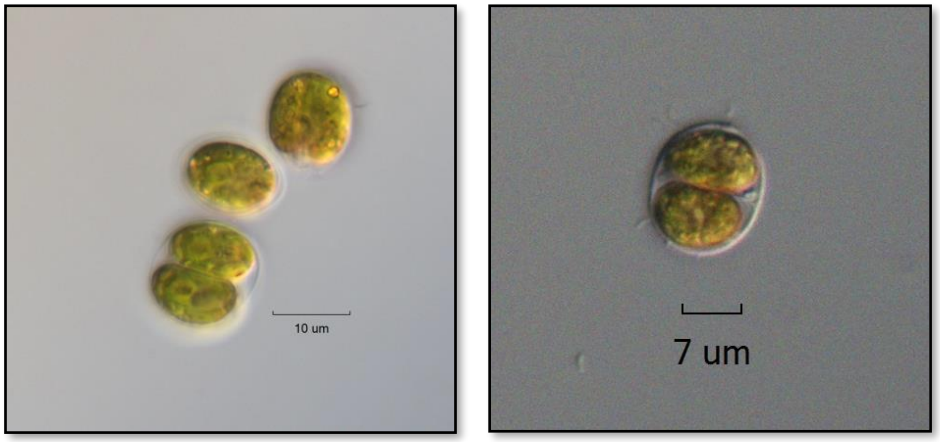
Prilog 51. Sekvenca gena LSU izolata D3

Gen	LSU
Sekvenca	AAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACTAACCAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAGAGCCCAAC GTGAAAATCTCCAGCCTTYGGCTGGCGAATTGTAGTCTAGAGACGCGTGCTCTGTGCCTGYTCCGGCCCAAGTCCCCTGG AAAGGGGCGTCCGAGAGGGTGAGAACCCCGTGGGGCCGGTGCTTGGGCACCTCACGAGCCGCCGTCGTCGAGTCGGGT TGCTTGGGAATGCAGCCCAAAGCAGGTGGTAAATCCCATCTAAGGCTAAATACCGACGGGAGACCGATAGCGAACAAG TACCGTGAGGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGTACTTGAAATTGTTGAGAGGGAAGAGATGGG GTCGCCGCGGGTGCGCCCAGGCACACGCCCGCCCTGGTGGCTGGTTGAATGCACTGGGCGCTGGTCAGCATGGGTTGGT GGGGCGGGATACCCCCGGGGCTTTGTGCCCCGGTCGTTGCCGCCCCGTCGACCGAGGAACTGCAGGGCGCTCTCCGAGT CCTTTTGGAACTGCGCCCTCGAGATGCTGGCGG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Chloroidium saccharophilum voucher MZCH 10155 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib...	Chloroidium sacc...	676	676	100%	0.0	87.71%	1629	KX525236.1
Chlorella vulgaris 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella vulgaris	665	665	100%	0.0	87.39%	630	KM272627.1
Micractinium sp. KNUA032 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Micractinium sp. ...	662	662	99%	0.0	87.33%	612	KM243323.1
Chlorella sp. 'South China Sea' 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ri...	Chlorella sp. 'So...	662	662	100%	0.0	87.22%	1411	KF998566.1
Dictyosphaerium sp. HN362 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	Dictyosphaerium ...	660	660	99%	0.0	87.20%	3461	MF664526.1
Dictyosphaerium sp. GL29 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5,...	Dictyosphaerium ...	660	660	99%	0.0	87.20%	3005	MF664498.1
Dictyosphaerium ehrenbergianum strain GL26_2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Dictyosphaerium ...	658	658	99%	0.0	87.16%	3019	MF664495.1
Dictyosphaerium sp. HN361 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	Dictyosphaerium ...	654	654	99%	0.0	87.14%	3462	MF664525.1
Dictyosphaerium sp. HND35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribos...	Dictyosphaerium ...	654	654	99%	0.0	87.14%	3459	MF664524.1

Prilog 52. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata D3 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.9. Rezultati identifikacije izolata C6



Prilog 53. Mikroskopska slika izolata C6

Prilog 54. Sekvenca gena 18S rRNA izolata C6

Gen	18S rRNA
Sekvenca	ATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTAC CTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGA TTTAAGGCCAACCGAGCTCTGCTCGTCTCTTGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCCCTGCGCCGGCGATG TTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAATTGGCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGTTAACGGGTGACGGAGGATTA GGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATC CTGATACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTTTTCAAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAAT CCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAG TTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGATGGGACTTGCCGGTCCGTCGTTGCGATGTGCACTGGCCAGTCCT ATCTTGTTGTCGGGGACTAGCTCTTGGACTTAACTGCCCGGGACTAGGAGCTGACGAGGTTACTTTGAGTAAATTAGAGT GTTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCTTATCCTGTTGGTCTGTGAG ACCAGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGACATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAG ACGAACTTCTGCGAAAGCATTTGTCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGAT ACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCAGACGTTTTTTTGATGACTCTGCCAGCACCTTATGA GAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACC AGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTG AGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAA CGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTTACTCCTACTTTGGTAGGAGGCGAACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTTTAG CCAATGGAAGTGTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATT CAACGAGCCTAGCCTTGACCGAGAGGTCCGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGCTAGATTATTGCAATTATTA ATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGTGATTCATCAAATCGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCG TCGCTCCTACCGATTGAGTGTGTTGGTGAGGAGTTCGGATTGGCTCTTAGTGGTGGTTCGCCACCACCTAGAGCTGAGAA GTTCTCCAAACCGCCCCACT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tetraselmis marina strain NZmm1W1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis ma...	3088	3088	99%	0.0	99.64%	1744	KY054995.1
Tetraselmis marina isolate MP0060 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis ma...	2994	2994	99%	0.0	98.64%	1740	KY655019.1
Tetraselmis marina 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS...	Tetraselmis ma...	2992	2992	100%	0.0	98.58%	5630	HE610131.1
Tetraselmis marina strain CTM 20015 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis ma...	2977	2977	96%	0.0	99.51%	1636	KT023599.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_Mes_5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis rub...	2955	2955	94%	0.0	99.94%	1603	KX904702.1
Tetraselmis rubens isolate Tetr_Mes_17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis rub...	2950	2950	94%	0.0	99.94%	1600	KX904701.1
Prasinophyte symbiont of radiolarian 257/331/333 from cf. Spongodrymus 257 18S ribosomal RNA g...	prasinophyte s...	2950	2950	100%	0.0	98.17%	1793	AF166379.1
Tetraselmis marina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis ma...	2948	2948	98%	0.0	98.56%	1669	KY045847.1
Uncultured marine eukaryote clone SA2_1B6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured mar...	2940	2940	99%	0.0	98.11%	1840	EF527133.1
Tetraselmis sp. MBIC11125 gene for 18S rRNA, partial sequence	Tetraselmis sp....	2940	2940	100%	0.0	98.05%	1752	AB058392.1
Prasinophyte symbiont of radiolarian 257/331/333 from cf. Spongodrymus 333 18S ribosomal RNA g...	prasinophyte s...	2940	2940	100%	0.0	97.99%	1793	AF166381.1
Tetraselmis sp. AL-FL22 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis sp....	2939	2939	100%	0.0	98.05%	1755	MH055454.1
Prasinophyte symbiont of radiolarian 257/331/333 from cf. Spongodrymus 331 18S ribosomal RNA g...	prasinophyte s...	2939	2939	100%	0.0	98.05%	1793	AF166380.1

Prilog 55. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata C6 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

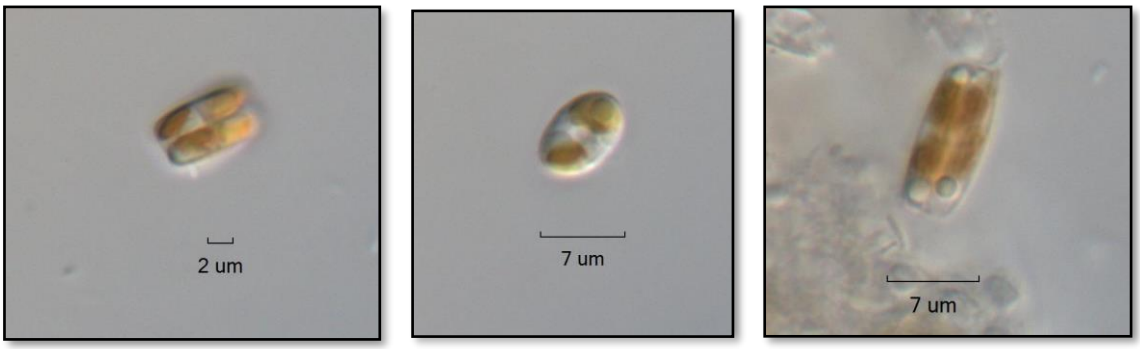
Prilog 56. Sekvenca gena LSU izolata C6

Gen	LSU
Sekvenca	TGAACGCAGCTCCGAAGGCAAAGCGTTCTTAAACCTCGATCGACGAAGCGGCATAGGCAGTGTAACAATCACTACTTTT GTCCCGCTAGGCCAATCCATGCTGACCAGCTTCTAGCACTGAGGGGCAGTCCTGTTAGAGACTACATACAGCCTAGAAG CACCCACGCCTCTAATACACTTCCCCCTCAACAATTTCAAGCACTTTTTAACTCTCTTTTCAAAGGCCTTTTCATCTTTCCC TCGCGGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCCTACCGGTATTTAGCCTTAGAAGGGATGTACCTCCCAATTAGGGCTGGATTCTC AACCAACCCGACTCTGCGAAAGCATCTCGTGAAGAGGCTAAGACCAAGGATGACGGGGTTCTCACCCTCTCTGACGTCC CCTTCCAGGGAACTTAATCCAGGTCCGCCTCAGAGGTTGCTTCTATAGACTACAATTCGGCAGACAAAGCCTGCAGATTT TCAAGTTGGGCTTATCCCGTTTCACTCGCCGTTACTAAGGGAATCCTAGTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGCTT AAA

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tetraselmis suecica isolate MK1 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis sue...	931	931	99%	0.0	96.46%	850	KC415759.1
Tetraselmis marina isolate MP0060 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis marina	931	931	99%	0.0	96.46%	1238	KY655021.1
Tetraselmis marina 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, strain...	Tetraselmis marina	931	931	99%	0.0	96.46%	5630	HE610131.1
Tetraselmis marina isolate MP0018 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetraselmis marina	928	928	99%	0.0	96.45%	807	KY655018.1
Tetraselmis sp. SMS19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Tetraselmis sp. ...	880	880	99%	0.0	94.85%	3575	MT489380.1
Symbiodinium sp. strain SMS5 strain SMS19 internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA ...	Symbiodinium s...	880	880	99%	0.0	94.85%	1435	MT489354.1
Tetraselmis striata 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA gene, 28S rRNA gene (partial), ITS1 and ITS2, strain ...	Tetraselmis striata	857	857	99%	0.0	94.15%	4027	HE610129.1
Tetraselmis chuii gene for 26S rRNA, partial sequence, strain: NIES-2432	Tetraselmis chuii	832	832	91%	0.0	95.74%	2844	AB491617.1

Prilog 57. Rezultati usporedbe sekvence LSU gena izolata C6 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.10. Rezultati identifikacije izolata S5



Prilog 58. Mikroskopska slika izolata S5

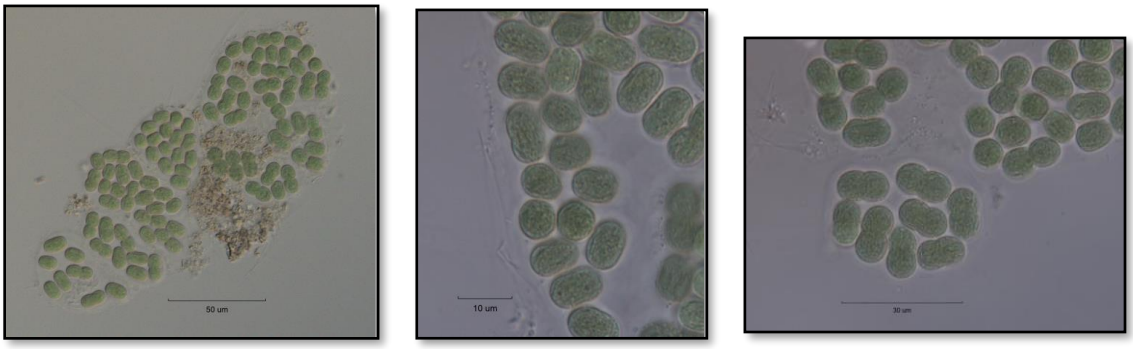
Prilog 59. Sekvenca gena 18S rRNA izolata S5

Gen	18S rRNA
Sekvenca	GATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAATCTCTTACTTTGAAACTGCGAACGGCTCATTATATCAGTTATAGTTTATTTGA TAGTCCCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACATGCGTCAATACCCTTCTGGGGTAGTATTTATTA GATTGAAACCAACCCCTTCGGGGTGATGTGGTGATTCATAATAAGCTTGCGGATCGCATGCCTTACGGCGGCGATGGAT CATTCAAGTTTCTGCCCTATCAGCTTTGGATGGTAGGGTATTGGCCTACCATGGCTTTAACGGGTAACGGGAAATTAGGG TTTGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAGACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGTAAATTACCCAATCCTG ACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATGCCGGGCCTTTGTAGGTCTGGCAATTGGAATGAGAACAATTTAAACCC CTTATCGAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGTCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTG TTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTGTGGCTGTCGGTCGCGGCCTATCACTCAGTGTTAGTGCCTGCAGCCGTCGC CATCCTTGGGTGGAGCCTGTGTGGCATTAGGTTGTCGTGCAGGGGATGCCCATCGTTTACTGTGAGAAAATTAGAGTGTT CAAAGCAGGCTTATGCCGTTGAATATGTTAGCATGGAATAATAAGATAGGACCTCGGTACTATTTTGTTGGTTTGCGCAC CGAGGTAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGGTATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTCTGAAAGACG AACTACTGCGAAAGCATTTACCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGATGATTAGATACC ATCGTAGTCTTAACCATAAACTATGCCGACAAGGGATTGGTGGAGTTCCGTTTTGTCTCCATCAGCACCTTATGAGAAAT CACAAGTCTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGA GTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACAGATTGAGAG CTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAA CGAGACCCCTGCCTGCTAAATAGCTTGCCGAGTGAGTTTTCACTGGGTGAAGCTTCTTAGAGGGACGTGCATTCTATTAG ATGCAGGAAGATAGGGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATT CAACGAGTCCTTCCTTGGCCGAGAGGCCTGGGTAATCTTTTGAACGTGCATCGTGATAGGGATAGATTATTGCAATTATT AATCTTGAACGAGGAATTCCTAGTAAACGCAGTTCATCAAACTGCATTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCC GTCGCACCTACCGATTGAATGGT

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured marine eukaryote clone I-7-MC660-OTU-28 18S ribosomal RNA gene, p...	uncultured ...	2802	2802	100%	0.0	97.96%	1786	KC771178.1
Nitzschia sp. SZCZCH658 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nitzschia sp...	2796	2796	100%	0.0	97.90%	1733	KT943651.1
Nitzschia traheaformis isolate SZCZCH972 18S ribosomal RNA gene, partial sequen...	Nitzschia tr...	2796	2796	100%	0.0	97.90%	1731	KT943644.1
Nitzschia sp. AnM0026 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Nitzschia sp...	2796	2796	100%	0.0	97.90%	1711	EU090031.1
Nitzschia dubiformis gene for 18S rRNA, partial sequence, strain: s0311	Nitzschia d...	2791	2791	100%	0.0	97.83%	1780	AB430616.1
Nitzschia navis-varingica isolate MC5366 small subunit ribosomal RNA gene, partial ...	Nitzschia n...	2787	2787	100%	0.0	97.78%	1710	MT239347.1
Nitzschia sp. (in: Bacillariophyta) strain KSA2015-11 acute rect-ED-1 small subunit ri...	Nitzschia sp...	2774	2774	100%	0.0	97.65%	1724	MH063490.1
Nitzschia sp. (in: Bacillariophyta) strain KSA2015-23 penn-B1 small subunit ribosom...	Nitzschia sp...	2769	2769	100%	0.0	97.59%	1739	MH063486.1
Nitzschia dubia strain TA37 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nitzschia d...	2765	2765	98%	0.0	97.93%	1680	KY320381.1
Psammodictyon pustulatum strain KSA2015-38 FORAM pandur-FO1 small subunit r...	Psammodic...	2758	2758	100%	0.0	97.46%	1745	MH063502.1
Nitzschia linearis culture TCC:386 small subunit ribosomal RNA gene, partial seque...	Nitzschia lin...	2758	2758	100%	0.0	97.46%	1785	MN696696.1
Nitzschia linearis culture TCC:387 small subunit ribosomal RNA gene, partial seque...	Nitzschia lin...	2752	2752	100%	0.0	97.40%	1790	MN696697.1
Nitzschia dubiformis strain SH366 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Nitzschia d...	2747	2747	99%	0.0	97.57%	1659	KY320382.1
Nitzschia sp. (in: Bacillariophyta) strain Nate Site 1 elongate peanut Nitz small subu...	Nitzschia sp...	2743	2743	98%	0.0	97.68%	1623	MH040324.1

Prilog 60. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata S5 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.11. Rezultati identifikacije izolata C1



Prilog 61. Mikroskopska slika izolata C1

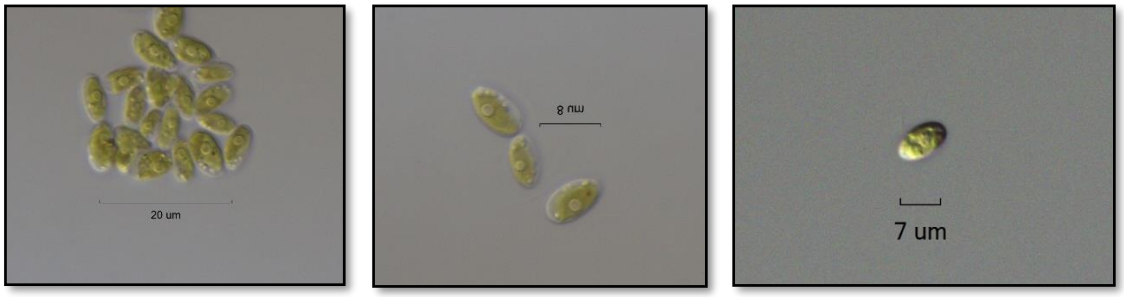
Prilog 62. Sekvenca gena 16S rRNA izolata C1

Gen	16S rRNA
Sekvenca	CGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCCTTCGGGCTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGA ATCTACCTTCAAGATGGGGACAACCGTTGGAAACGACGGCTAATCCCCAATAAGCCGAAAGGTGAAAAGGGTTTCCGCT TGAAGAGGAGCTCGCGTCCGATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAGAGCCTACCAAGGCAGCGATCGGTAGCTGGTCTGAGAG GATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGC GAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTGGGAAGAAGGCTTTTGGGCTGTCAACCACTTTTCTCAGGGAAGAAGTTCTG ACGGTACCTGAGGAATCAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAGGCAAGCGTTATCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGGGGCACATCAAGTCTGCTGTCAAAGGTCGGAGCTTAACTCCGGTTCGGCAGTG GAAACTGGGGTGCTAGAGGGCGACAGGGGTAGAGGGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAAGAA CACCGGTGGCGAAAGCGCTCTACTGGGTCGCACCTGACCCTCAGGGACGAAAGCTAAGGTAGCGAAAGGGATTAGATA CCCCTGTAGTCTTAGCCGTAAACGATGGATACTAGGCGTGGTTTGTATCGACCCAAGCCGTGCCGAAGCTAACGCGTTA AGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGGAT GTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCCGCGAATCTTGCTGAAAGGTGAGAGTGCCT TCGGGAACGCGGAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC GCAACCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGAGG ATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCTTATGCTCTGGGCAACACACGTCCTACAATGGTCGGGACAAAGGGGAGCAAGCTCG CGAGAGTAAGCGAATCCCATCAAACTCGGCCTCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAAGGAGGAATCG CTAGTAATCGCCGGTCAGCATACGGNCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGCT GGCCAAGCCCGAAGTCGTTACCC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Euhalothece sp. 16S rRNA gene, strain MPI 95AH13	Euhalothece sp....	2346	2346	99%	0.0	97.94%	1399	AJ000710.1
Euhalothece sp. BDU 130911 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Euhalothece sp....	2316	2316	100%	0.0	97.43%	1376	KM350247.1
Euhalothece sp. BDU 130192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Euhalothece sp....	2316	2316	100%	0.0	97.43%	1379	KF498709.1
Euhalothece sp. 16S rRNA gene, strain MPI 96N304	Euhalothece sp....	2298	2298	100%	0.0	97.21%	1452	AJ000713.1
Euhalothece sp. 16S rRNA gene, strain MPI 96N303	Euhalothece sp....	2298	2298	100%	0.0	97.21%	1452	AJ000712.1
Halothece sp. PCC 7418 chromosome, complete genome	Halothece sp. P...	2287	6850	100%	0.0	97.06%	4179170	CP003945.1
Cyanothece sp. GSL007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cyanothece sp....	2287	2287	100%	0.0	97.06%	1410	FJ546715.1
Cyanothece sp. 113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cyanothece sp....	2287	2287	100%	0.0	97.06%	1455	DQ243689.1
Euhalothece sp. 16S rRNA gene, strain MPI 95AH10	Euhalothece sp....	2283	2283	100%	0.0	96.99%	1436	AJ000709.1
Halothece sp. PCC 7418 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Halothece sp. P...	2281	2281	100%	0.0	96.99%	1442	AF296872.1
Cyanothece sp. 115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cyanothece sp....	2281	2281	100%	0.0	96.99%	1455	DQ243690.1
Cyanothece sp. 109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cyanothece sp....	2281	2281	100%	0.0	96.99%	1455	DQ243688.1

Prilog 63. Rezultati usporedbe sekvence 16S rRNA gena izolata C1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.12. Rezultati identifikacije izolata S1



Prilog 64. Mikroskopska slika izolata S1

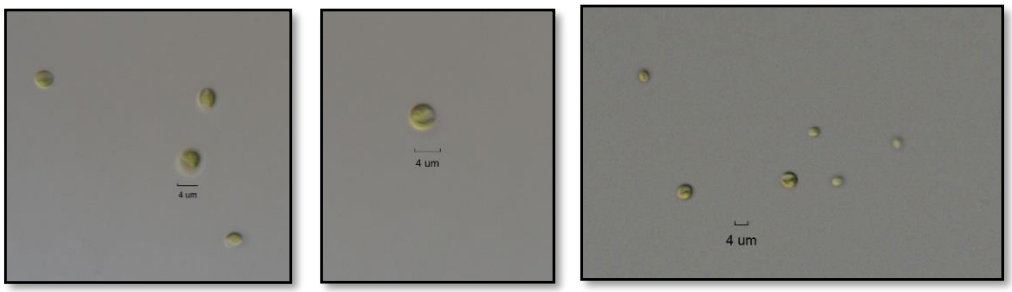
Prilog 65. Sekvenca gena 18S rRNA izolata S1

Gen	18S rRNA
Sekvenca	TGCTTATACGGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATGGTACCTCCTACTTGGATAACCGTA GGAAATCTAGAGCTAATACATGCGTAAATCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTATTAGATAAAAGGCCAGCCGGGCTTG CCCGACCTTAGGCGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTA TCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGA GCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACACGGGGAGGTAGTGAC AATAAATAACAATACTGGGCATTTATGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATGTAAATATCTTAACGAGTATCCATTGGA GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGT AGTTGGATTTCGGGTGCGTCGACGCGGTCTGCCTCTGGTATGTACTGCGCTCGGTGCACCTTTCAGCTGAATACGCTCTC CTGGGCTTAACTGCTTGGGAAGTGGAGTCAGCAGAGTGACCTTGAGCAAACAAGAGTGTTCAAAGCAAGCCGACGCTCT GAATTTTTTAGCATGGAATCACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTTGGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGG ACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTATGAAAGACGAACTTCTGCGAAAGCATTTG CCAAGGATGTTTTCATTGATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAA CGATGCCGACTAGGGATTGGCAGGTGTTCCATTGATGACCCTGCCAGCACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCG GGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAAT TTGACTCAACACGGGGAAACTTACCAGGTCCAGACACGGGGAGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTGTGG GTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTA AATAGTCACGGGTACCTTGGTACACGCCTGACTTCTTAGAGGGACTATTGGCGTCTAGTCAATGGAAGTGTGAGGCAAT AACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGATGCATTCAAC GAGCCTAT

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☑	Chlorococcum sp. z1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2614	2614	100%	0.0	99.93%	1692	MK954470.1
☑	Chlorococcum sp. K2/11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2614	2614	100%	0.0	99.93%	1752	MG784552.1
☑	Chlorococcum sp. K2/5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2614	2614	100%	0.0	99.93%	1750	MG784550.1
☑	Chlorococcum sp. GRK6-DB6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2612	2612	99%	0.0	99.93%	1754	KF144185.1
☑	Chlorococcum sp. RK261 gene for 18S rRNA, partial sequence	Chlorococcum sp...	2608	2608	100%	0.0	99.86%	1794	AB490286.1
☑	Chlorococcum sp. GRK7-WB4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2604	2604	100%	0.0	99.79%	1753	KF144186.1
☑	Chlamydomonas debaryana genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA g...	Edaphochlamys ...	2604	2604	100%	0.0	99.79%	2519	FR865523.1
☑	Chlorococcum sp. GRK7-WB5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2603	2603	100%	0.0	99.79%	1768	KF144187.1
☑	Chlorococcum sp. A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorococcum sp...	2577	2577	100%	0.0	99.51%	1789	KC492079.1
☑	Chlamydomonas sp. NIES-2211 gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	Chlamydomonas...	2569	2569	98%	0.0	99.79%	1647	AB701516.1

Prilog 66. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata S1 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.13. Rezultati identifikacije izolata S2



Prilog 67. Mikroskopska slika izolata S2

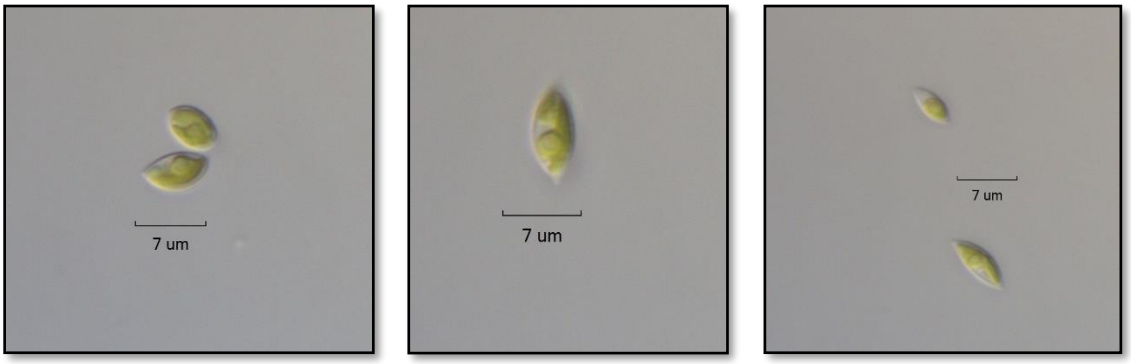
Prilog 68. Sekvenca gena 18S rRNA izolata S2

Gen	18S rRNA
Sekvenca	GCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTATTTGATG GTACTTACTACTCGGATACCCGTAGTAAATCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGACGTATTTAT TAGATAAAAGGCCGACCGGGCTTCTGCCCGACTCGCGGTGAATCATGATAACTTCACGAATCGCATGGCCTTGTGCCGG CGATGTTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGTGACGGAG GATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACC CAATCCTGACACAGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACTGGGCCTTTTCAGGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAAT CTAAACCCCTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATA TTTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGACCTGCCGGTCCGCCGTTTCGGTGTGCACTGGCA GGGCTCACCTTGTTGCCGGGGACGGGCTCCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGGCGCTGTTACTTTGAGTAAAT TAGAGTGTTCAAAGCAGGCCTACGCTCTGAATACATTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCCTGTTGGTC TGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGATTTA TGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAGACGA TTAGATACCGTCCTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATCGGCGGATGTTTCTTCGATGACTCCGCCGGCACC TTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCA CCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATTGACA GATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTGATTCC GGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCACGGTTGGTTCGCCAGCCGGCGGACTTCTTAGAGGGACTATTGGC GACTAGCCAATGGAAGCATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGA TGCATTCAACGAGCCTAGCCTTGGCCGAGAGGCCCGGGTAATCTTCGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTATTGCA ATTATTAATCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTACACA CCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTG TTCGGATTGGCGACCTGGGG

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Chlorella vulgaris strain CCAP 211/21B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2496	MN248530.1
Chlorella vulgaris strain CCAP 211/21A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed ...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2496	MN248529.1
Chlorella vulgaris strain CCAP 211/19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2350	MK541792.1
Chlorella vulgaris isolate CCAP 211/52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	1752	MG022722.1
Chlorella vulgaris isolate CCAP 211/11B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	1754	MG022720.1
Chlorella vulgaris strain KNUA027 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	1771	KU306723.1
Chlorella vulgaris isolate LH10HG6052 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	1735	KX094756.1
Chlorella vulgaris strain S3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2456	OM472013.1
Chlorella vulgaris strain Ab5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 an...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2455	OM472012.1
Chlorella vulgaris strain ChloN4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer ...	Chlorella vulgaris	3046	3046	100%	0.0	100.00%	2456	OM472011.1

Prilog 69. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata S2 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.14. Rezultati identifikacije izolata S3



Prilog 70. Mikroskopska slika izolata S3

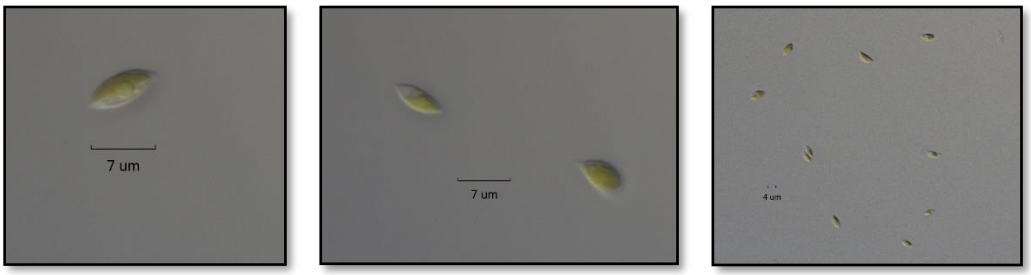
Prilog 71. Sekvenca gena 18S rRNA izolata S3

Gen	18S rRNA
Sekvenca	AAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTTA TTTGGTGGTACCTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGAC GTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTCACGAAGCGCATGGCCTT GTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGT GACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA AATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTTATGTCTGGTAATTGGAATGAG TACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAG CGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACT GCTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGT AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTT GGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGA TTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAG ACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAG CACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG GGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATT GACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTG ATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCAGCTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTA TTGGCGTTTAGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC ACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTAT TGCAATTATTAG TCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGC

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tetradesmus obliquus isolate CCAP 276/3C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	2613	MG022741.1
Tetradesmus obliquus strain CCAP 276/3A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	1792	KU900221.1
Scenedesmus bijugus var. obtusiusculus voucher IZTA:1830 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Scenedesmus bij...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	1677	KJ808696.1
Acutodesmus obliquus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence,...	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	2424	AB917101.1
Acutodesmus obliquus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence,...	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	2424	AB917100.1
Tetradesmus obliquus isolate D22-6-2B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	1758	KF144164.1
Acutodesmus obliquus 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	1772	KF898122.1
Scenedesmus basiliensis strain ACKU 646-06 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, parti...	Scenedesmus b...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	1763	KF898121.1
Tetradesmus obliquus strain CCAP 276/1A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	2611	MW471023.1
Scenedesmus obliquus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene...	Tetradesmus obli...	2861	2861	100%	0.0	100.00%	2568	FR865738.1

Prilog 72. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata S3 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

8.1.15. Rezultati identifikacije izolata S4



Prilog 73. Mikroskopska slika izolata S4

Prilog 74. Sekvenca gena 18S rRNA izolata S4

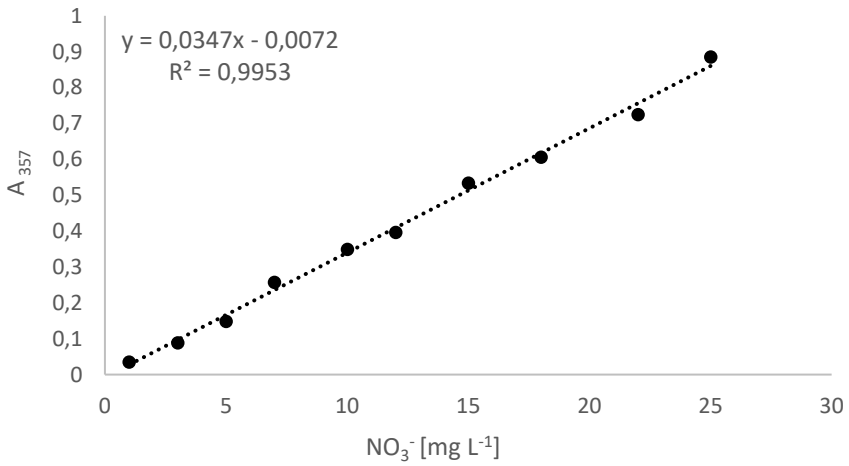
Gen	18S rRNA
Sekvenca	AAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAACTGCTTATACTGTGAAACTGCGAATGGCTCATTAAATCAGTTATAGTTT ATTTGGTGGTACCTTACTACTCGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATACGTGCGTAAATCCCGACTTCTGGAAGGGA CGTATATATTAGATAAAAGGCCGACCGAGCTTTGCTCGACCCGCGGTGAATCATGATATCTTCACGAAGCGCATGGCCTT GTGCCGGCGCTGTTCCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTAGGATAGAGGCCTACCATGGTGGTAACGGGT GACGGAGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA AATTACCCAATCCTGATACGGGGAGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCATTTTATGTCTGGTAATTGGAATGAG TACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAG CGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCGGGTGGGTTCTAGCGGTCCGCCTATGGTGAGTACT GCTATGGCCTTCCTTTCTGTCGGGGACGGGCTTCTGGGCTTCACTGTCCGGGACTCGGAGTCGACGTGGTTACTTTGAGT AAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCTTACGCCAGAATACTTTAGCATGGAATAACACGATAGGACTCTGGCCTATCTTGTT GGTCTGTAGGACCGGAGTAATGATTAAGAGGGACAGTCGGGGGCATTCGTATTTCATTGTCAGAGGTGAAATTCTTGGA TTTATGAAAGACGAACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAGTTGGGGGCTCGAAG ACGATTAGATACCGTCGTAGTCTCAACCATAAACGATGCCGACTAGGGATTGGCGAATGTTTTTTTAATGACTTCGCCAG CACCTTATGAGAAATCAAAGTTTTTGGGTTCCGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG GGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAACTTACCAGGTCCAGACATAGTGAGGATT GACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGGTTGCCTTGTCAGGTTG ATTCCGGTAACGAACGAGACCTCAGCCTGCTAAATAGTCTCAGTTGCTTTTTGCAGCTGGCTGACTTCTTAGAGGGACTA TTGGCGTTTAGTCAATGGAAGTATGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGCTAC ACTGATGCATTCAACAAGCCTATCCTTGACCGAAGGGTCTGGGTAATCTTTGAAACTGCATCGTGATGGGGATAGATTAT TGCAATTATTAGTCTTCAACGAGGAATGCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCGTTGATTACGTCCCTGCCCTTTGTA CACACCGCCCGTCGCTCCTACCGATTGGGTGTGCTGGTGAAGTGTTCGGATTGGCAGCTTAGGGTGGCAACACCTCAGGT

select all 10 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

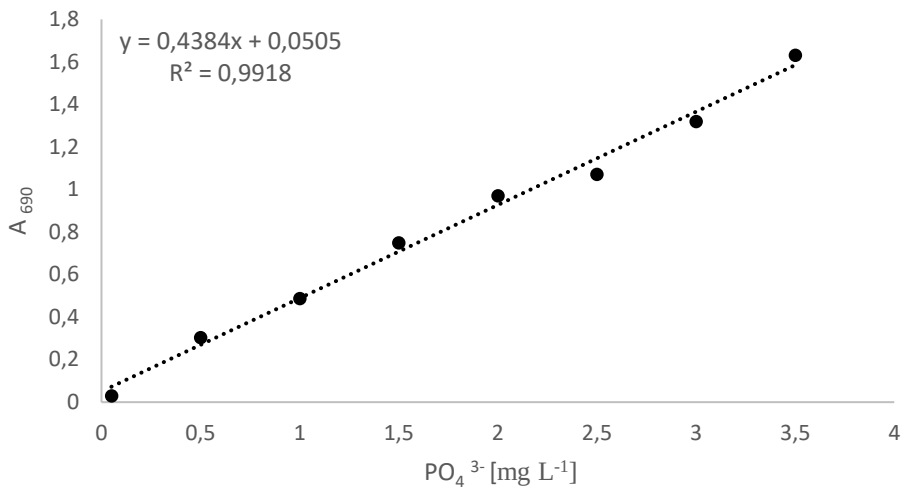
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Tetradesmus obliquus isolate CCAP 276/3C small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2613	MG022741.1
Tetradesmus obliquus strain CCAP 276/3A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	1792	KU900221.1
Acutodesmus obliquus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence,...	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2424	AB917101.1
Acutodesmus obliquus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence,...	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2424	AB917100.1
Tetradesmus obliquus isolate D22-6-2B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	1758	KF144164.1
Acutodesmus obliquus 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, partial sequence	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	1772	KF898122.1
Scenedesmus basiliensis strain ACKU 646-06 18S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 1, parti...	Scenedesmus b...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	1763	KF898121.1
Tetradesmus obliquus strain CCAP 276/1A small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr...	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2611	MW471023.1
Scenedesmus obliquus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene...	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2568	FR865738.1
Scenedesmus obliquus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2, 28S rRNA gene...	Tetradesmus obli...	3085	3085	100%	0.0	100.00%	2518	FR865737.1

Prilog 75. Rezultati usporedbe sekvence 18S rRNA gena izolata S4 sa NCBI bazom pomoću BLAST algoritma

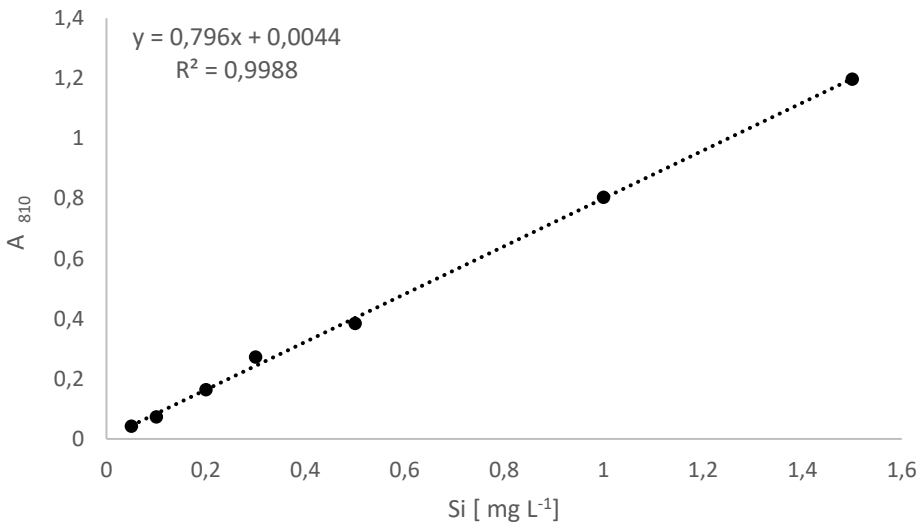
8.2. Baždarni dijagrami



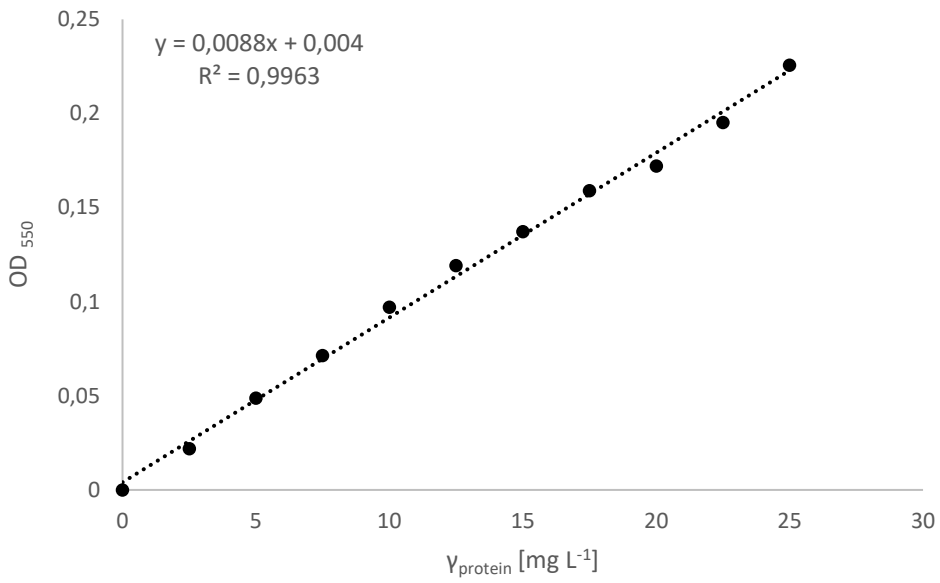
Prilog 76. Baždarni pravac za određivanje koncentracije nitrita



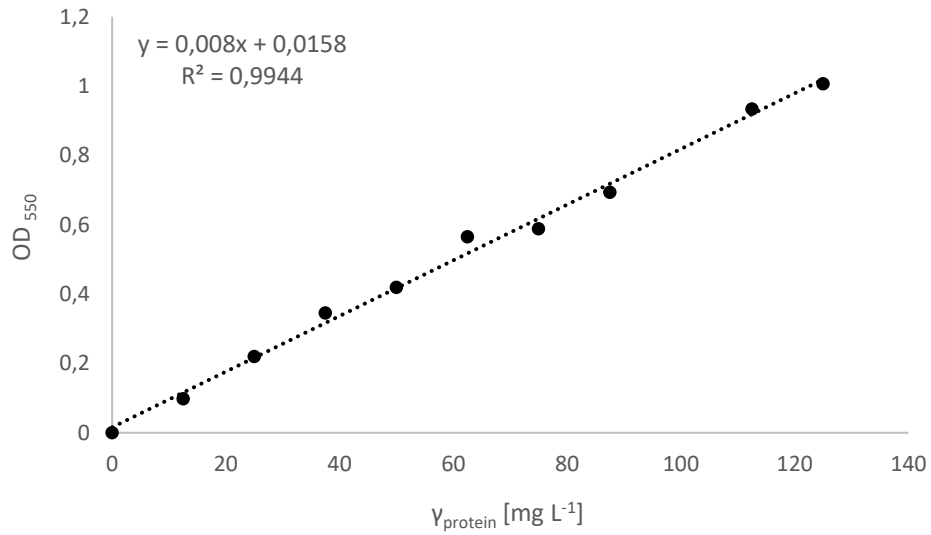
Prilog 77. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fosfatnih iona



Prilog 78. Baždarni pravac za određivanje koncentracije silicija



a)

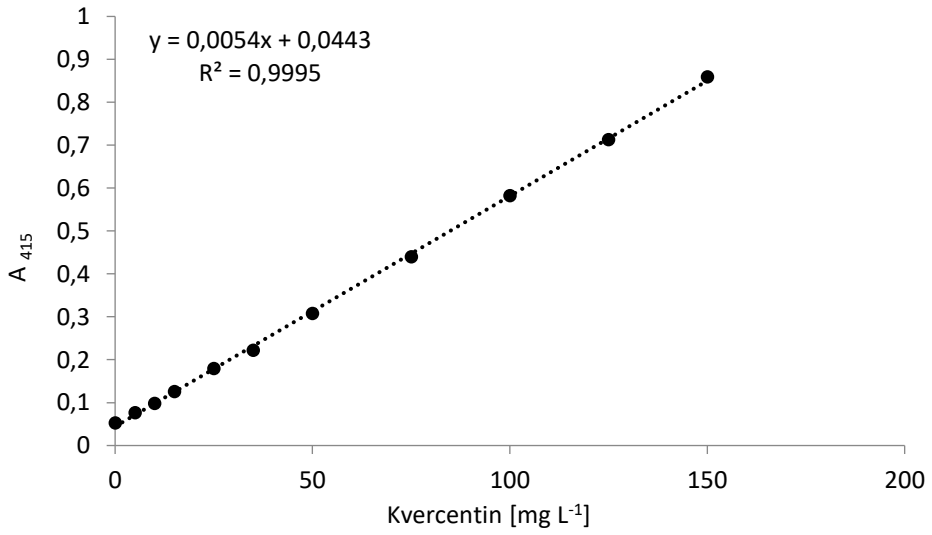


b)

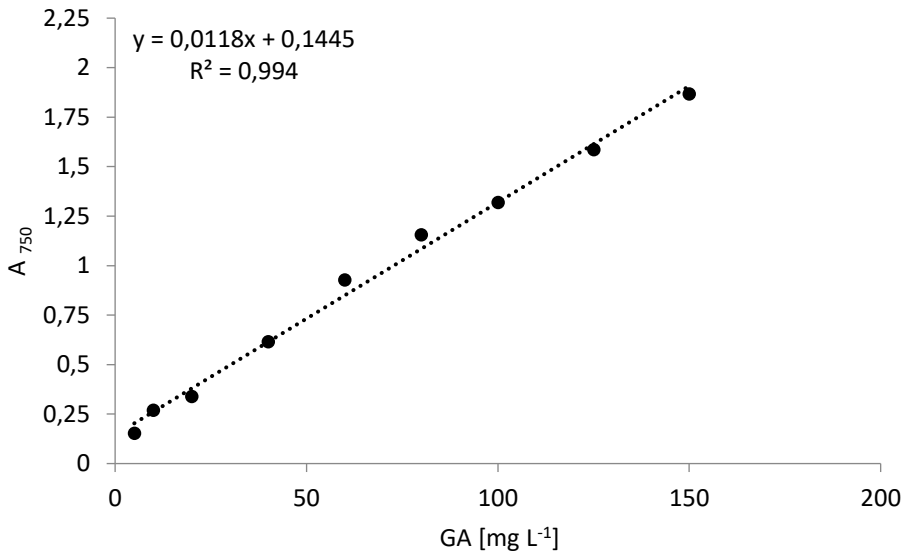
Prilog 79. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina u biomasi: a) niži raspon koncentracija; b) viši raspon koncentracija

Prilog 80. Monosaharidi i pripadajuće jednadžbe pravca određene UPLC metodom

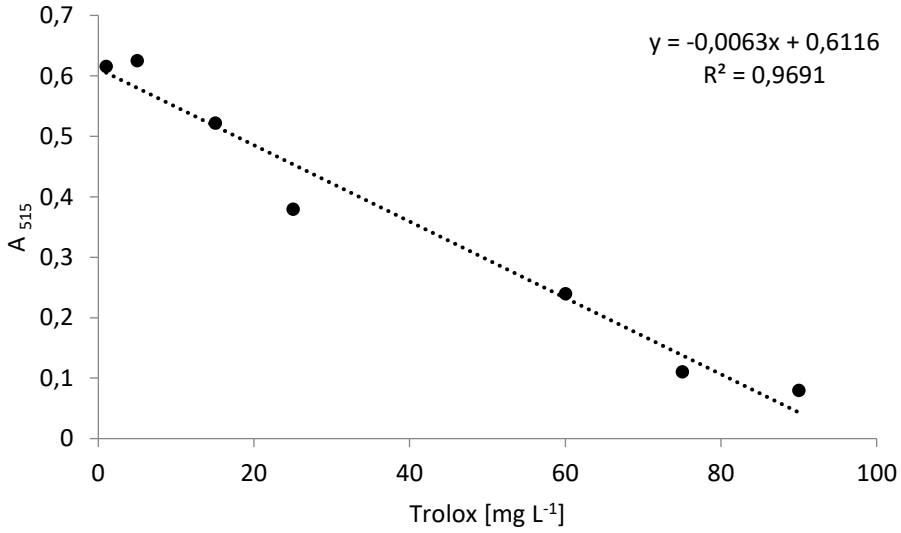
Standard	RT (min)	Jednadžba pravca	R^2
celobioza	4.07	y = 134183x + 1363,5	1.0000
maltoza	4.155	y = 113613x + 1658,9	0.9999
D-glukuronska kiselina	4.341	y = 113192x + 44,361	0.9999
glukoza	4.967	y = 135278x - 3377	0,9997
manoza	5.278	y = 128302x - 5039,7	0.9962
galaktoza	5.292	y = 132077x + 987,09	0.9999
ksiloza	5.307	y = 129878x - 627,53	0.9998
fruktoza	5.357	y = 125211x + 3745,8	1.0000
L-ramnoza	5.56	y = 113900x + 479,24	0.9999
arabinoza	5.763	y = 128443x - 3314,1	0.9989
fukoza	6.053	y = 136441x - 2965,8	0.9989
glucozamine hidroklorid	3.368	y = 128,54x +279,1	0.9794
mliječna kiselina	6.784	y = 61091x+8832,5	0.9934
glicerol	7.139	y = 107908x +955,97	1.0000
mravlja kiselina	7.157	y = 47328x +53,595	1.0000
octena kiselina	7.755	y = 57358x+697,25	1.0000
etanol	10.657	y = 55421x +1343	1.0000



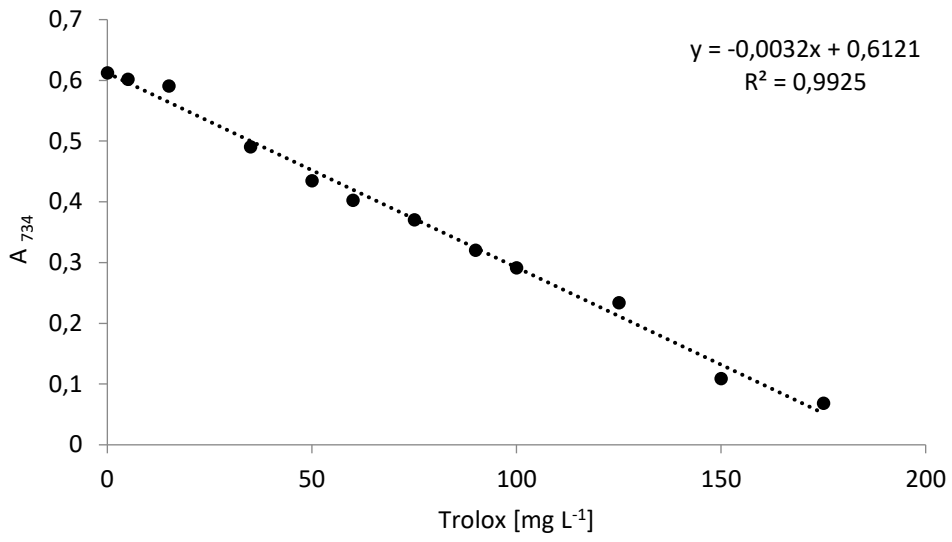
Prilog 81. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih flavonoida izraženih kao mg kvercentina po L



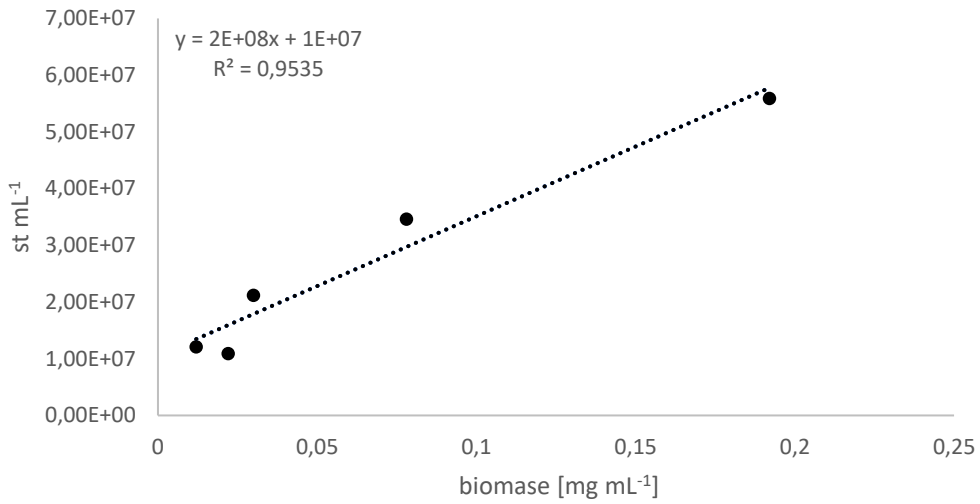
Prilog 82. Baždarni dijagram za određivanje ukupnih fenola određenih kao mg galne kiseline po L



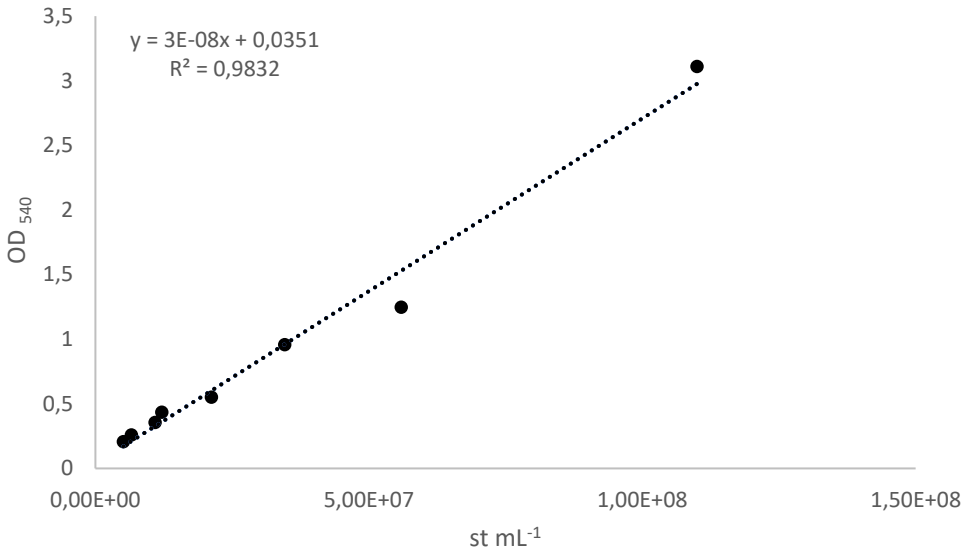
Prilog 83. Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijskog potencijala DPPH metodom



Prilog 84. Baždarni dijagram za određivanje antioksidacijskog potencijala ABTS metodom



Prilog 85. Ovisnost koncentracije stanica mikroalge *Picochlorum* sp. D3 koncentraciji biomase



Prilog 86. Ovisnost optičke gustoće kulture *Picochlorum* sp. D3 o koncentraciji stanica

5. ŽIVOTOPIS

Marina Grubišić rođena je 30. ožujka 1994. godine u Slavonskom Brodu. Nakon završene opće gimnazije u Srednje škole ban Josip Jelačić u Zaprešiću, 2012. godine upisala je smjer Biotehnologija na Prehrambeno- biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Završni rad pod naslovom „Uvođenje delecije u gen Scw4 upotrebnom PCR metode megapočetnice“ izradila je pod mentorstvom prof. dr.sc. Renate Teparić u Laboratoriju za biokemiju te time stječe diplomu prvostupnika biotehnologije. Potom upisuje smjer Bioprocesno inženjerstvo te je 2017. godine diplomirala i stekla stupanj mag. ing. bioproc. obranom diplomskoga rada pod naslovom „Proizvodnja bioetanola na blago kiselinskim hidrolizatima pšenične slame dobivenim pomoću sumporne kiseline u različitim mjerilima“. Diplomski rad izradila je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva i to u okviru HRZZ projekta „Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina“ (SPECH_LRM, šifra projekta 9158). Osim zbog izrade diplomskoga rada, na istome projektu uključila se i volonterski u istraživački rad na istom projektu. Tijekom studija bila je dobitnica stipendije Sveučilišta u Zagrebu u kategoriji A za izvrsnost (2014./2015) i stipendije grada Zaprešića (2016./2017.).Nakon diplome zaposlila se 2018. godine u istom Laboratoriju kao stručni suradnik na projektu „Bioprospecting Jadranskog mora“ te iste godine upisala poslijediplomski studij Biotehnologije i bioprocesnog inženjerstva, prehrambene tehnologije i nutricionizma. Područje istraživačkoga rada obuhvaća: izolacija i pročišćavanje mikroalgalnih vrsta, kultivacija mikroalgi ,uzgoj u različitim bioreaktorskim sustavima (barbotirajuća kolona, otvoreni bazen, fotobioreaktori), optimizacija uvjeta uzgoja, bioaktivnost mikroalgalnih vrsta, analiza lipida, primjena analitičkih metoda (UPLC, HPLC, GC). Osim u znanastveno istraživačkom radu sudjeluje kao pomoć u izradi diplomskih i završnih radova te je sudjelovala na radionicama na Danima otvorenih vrata PBF-a (2022.) i Festivalu znanosti (2021.). Nagrađena je srebrnom medaljom 2020. Udruge inovatora Hrvatske na međunarodnom sajmu inovacija Agro Arca za predstavljen rad pod naslovom „Microbial lipids- feedstock for biodiesel production“. Na istom sajmu 2021. godine nagrađena je brončanom medaljom za predstavljeni rad naslova „Mikroalga *Picochlorum* sp. za proizvodnju zelenog goriva budućnosti“.

Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisu indeksiranom u CC ili SCI:

1. Grubišić, M., Šantek, B., Zorić, Z., Čošić, Z., Vrana, I., Gašparović, B., Čož-Rakovac, R., Ivančić Šantek, M. (2022) Bioprospecting of Microalgae Isolated from the Adriatic Sea: Characterization of Biomass, Pigment, Lipid and Fatty Acid Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Molecules*, **27**, 1248.
2. Grubišić, M., Galić Perečinec, M., Peremin, I., Mihajlovski, K., Beluhan, S., Šantek, B., Ivančić Šantek, M. (2022) Optimization of pretreatment conditions and enzymatic hydrolysis of corn cobs for production of microbial lipids by *Trichosporon oleaginosus*. *Energies*, **15**, 3208.
3. Ivančić Šantek, M., Grubišić, M., Galić Perečinec, M., Beluhan, S., Šantek, B. (2021) Lipid production by *Mortierella isabellina* from pretreated corn cobs and effect of lignocellulose derived inhibitors on growth and lipid synthesis
4. Didak Ljubas, B., Novak, M., Trontel, A., Rajković, A., Kelemen, Z., Marđetko, N., Grubišić, M., Pavlečić, M., Petravić Tominac, V., Šantek, B. (2022) Production of Different Biochemicals by Paenibacillus polymyxa DSM 742 From Pretreated Brewers' Spent Grains. *Frontiers in Microbiology*, **13**, 812457.
5. Pavlečić, M., Novak, M., Trontel, A., Marđetko, N., Grubišić, M., Didak Ljubas, B., Petravić Tominac, V., Čož Rakovac, R., Šantek, B. (2022) Mathematical modelling of bioethanol production from raw sugar beet cossettes in a horizontal rotating tubular bioreactor. *Fermentation*, **8**, 13.
6. Marđetko, N., Trontel, A., Novak, M., Pavlečić, M., Didak Ljubas, B., Grubišić, M., Petravić Tominac, V., Ludwig, R., Šantek, B. (2021) Screening of Lignocellulolytic Enzyme Activities in FungalSpecies and Sequential Solid-State and Submerged Cultivationfor the Production of Enzyme Cocktails. *Polymers*, **13**, 3736.
7. Grubišić, M., Ivančić Šantek, M., Šantek, B. (2019) Poteintial of microalgae for the production of different biotechnological products. *Chem. Biochem. Eng. Q*. **33**, 161.
8. Marđetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M.,; Šantek, B. (2018) Bioethanol Production from Dilute-acid Pre- treated Wheat Straw Liquor Hydrolysate by Genetically Engineered Saccharomyces cerevisiae. *Chem. Biochem. Eng. Q*. **32**, 483.