

Optimizacija uvjeta fototrofnog uzgoja i karakterizacija dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora

Brajković, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:879237>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 19. rujna 2019.

Antonija Brajković

1160/BPI

**OPTIMIZACIJA UVJETA
FOTOTROFNOG UZGOJA I
KARAKTERIZACIJA
DIJATOMEJE IZOLIRANE IZ
JADRANSKOG MORA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirele Ivančić Šantek te uz pomoć mag. ing. Marine Grubišić.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Mireli Ivančić Šantek na pruženoj prilici za izradu ovog rada, srdačnosti i korisnim savjetima.

Također veliko hvala i mag. ing. Marini Grubišić na strpljenju, uloženom trudu, vremenu i ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Osobito zahvaljujem svojoj obitelji i dragim prijateljima koji su mi, u vremenu studija i izrade diplomskog rada, bili najveća podrška.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo,
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

OPTIMIZACIJA UVJETA FOTOTROFNOG UZGOJA I KARAKTERIZACIJA DIJATOMEJE IZOLIRANE IZ JADRANSKOG MORA

Antonija Brajković, 1160/BPI

Sažetak:

Dijatomeje su prepoznate kao izvrsna sirovina za proizvodnju obnovljivih biogoriva, prehrambenih, farmaceutskih i nutraceutskih proizvoda. U ovom istraživanju optimiran je sastav podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora. Najveća specifična brzina rasta od $0,371 \text{ dan}^{-1}$ i koncentracije biomase od $0,47 \text{ g L}^{-1}$ postignuta je na deset puta koncentriranoj f/2 podlozi. Proveden je polukontinuirani uzgoj dijatomeje kako bi se povećala gustoća fototrofne kulture. Maksimalna produktivnost biomase od $0,061 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ i produktivnost biosinteze lipida od $14,64 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ postignuta je treći dan nakon prve prihrane. Najveća produktivnost biosinteze eikosapentaenoične kiseline od $3,28 \text{ mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ postignuta je u četvrtom danu uzgoja. Biomasa je stanica sadržavala klorofile i karotenoide, od kojih je najzastupljeniji bio fukoksantin. Metanolski i heksanski ekstrakti dijatomeje pokazali su snažan antibakterijski učinak na rast *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Ključne riječi: dijatomeje, lipidi, nutrijenti, antimikrobno djelovanje

Rad sadrži: 76 stranica, 21 sliku, 26 tablica, 46 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek*

Pomoć pri izradi: *Marina Grubišić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
3. Prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
4. Prof. dr. sc. Jasna Novak (zamjena)

Datum obrane: 19. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemistry engineering
Laboratory for Biochemistry engineering,
industrial microbiology and beer and malt technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

OPTIMIZATION OF PHOTOTROPHIC CULTIVATION CONDITIONS AND CHARACTERIZATION OF DIATOM ISOLATED FROM THE ADRIATIC SEA

Antonija Brajković, 1160/BPI

Abstract:

Diatoms are being recognised as an excellent source for production of renewable biofuels, food, pharmaceutical and nutraceutical products. In the present research, composition of the growth media for phototrophic growth of diatom isolated from Adriatic Sea was optimized. The highest specific rate and biomass concentration of 0,371 day⁻¹ and 0,47 g L⁻¹, respectively, was achieved in ten times concentrated f/2 media. In order to increase cell density of phototrophic culture, a repeated batch cultivation of diatom was conducted. The maximum biomass and lipid productivity of 0,061 g L⁻¹ d⁻¹ and 14,64 mg L⁻¹ d⁻¹, respectively, was reached third day after the first culture feed. The highest productivity of eicosapentaenoic acid of 3,28 mg L⁻¹ dan⁻¹ was obtained fourth day of cultivation. Cell biomass contained chlorophylls and carotenoids, with fucoxanthin as the most abundant pigment. Methanol and hexane extracts of diatoms showed strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: diatoms, lipids, nutrients, antimicrobial activity

Thesis contains: 76 pages, 21 figures, 26 tables, 46 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD. *Mirela Ivančić Šantek*, Full professor

Technical support and assistance: *Marina Grubišić*, MSc.

Reviewers:

1. PhD. *Blaženka Kos*, Full professor
2. PhD. *Mirela Ivančić Šantek*, Full professor
3. PhD. *Ivana Radojčić Redovniković*, Full professor
4. PhD. *Jasna Novak*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 19th September, 2019

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Mikrolage	2
2.1.1. Podjela algi	2
2.2. Dijatomeje (lat. <i>Bacillariophyceae, diatomeae</i>)	4
2.2.1. Podjela dijatomeja.....	4
2.2.2. Građa dijetomeja.....	5
2.2.3. Kretanje dijatomeja.....	7
2.2.4. Životni ciklus	7
2.2.5. Fotosinteza	10
2.2.6. Uzgoj dijatomeja.....	12
2.2.6.1. Utjecaj svjetla.....	14
2.2.6.2. Utjecaj temperature	15
2.2.6.3. Nutrijenti	15
2.2.6.4. Ostali faktori	15
2.2.7. Primjena dijatomeja	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Materijali	19
3.1.1. Radni mikroorganizam.....	19
3.1.2. Sirovine za pripremu hranjive podloge	19
3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu.....	20
3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj mikroalge.....	21
3.1.4.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture i uzgoj inokuluma	21
3.1.4.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj	22
3.1.4.3. Hranjiva podloga za prihranu tijekom uzgoja u fotobioreaktoru.....	23
3.1.4.4. Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika	24
3.1.4.5. Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima dušika	24
3.1.5. Oprema i aparatura.....	24
3.1.5.1. HPLC	24
3.1.5.2. Sustav za plinsku kromatografiju (GC).....	25
3.1.6. Ostali uređaji.....	25
3.2. Metode.....	26
3.2.1. Uzgoj inokuluma.....	26
3.2.2. Priprema inokuluma za uzgoj u fotobioreaktoru	26
3.2.3. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje.....	27
3.2.4. Uzgoj u fotobioreaktoru	28
3.2.4.1. Šaržni uzgoj u fotobioreaktoru	28
3.2.4.2. Polukontinuirani uzgoj u fotobioreaktoru	28
3.2.5. Uzgoj na različitim izvorima dušika i ugljika	29
3.2.6. Analitičke metode	30

3.2.6.1.	Brojanje stanica u Thomaovoj komorici	30
3.2.6.2.	Mjerenje optičke gustoće kulture	30
3.2.6.3.	Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase dijatomeja	30
3.2.6.4.	Određivanje koncentracije fosfata.....	31
3.2.6.5.	Određivanje koncentracije nitrata u podlozi.....	32
3.2.6.6.	Određivanje koncentracije silikata	32
3.2.6.7.	Kiselinska hidroliza biomase algi.....	33
3.2.6.8.	Određivanje koncentracije monosaharida pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC).....	34
3.2.6.9.	Određivanje udjela proteina	34
3.2.6.10.	Određivanje udjela ukupnih lipida	35
3.2.6.11.	Određivanje sastava masnih kiselina.....	36
3.2.6.12.	Ekstrakcija pigmenata	38
3.2.6.13.	Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila a i c	39
3.2.6.14.	Razdvajanje pigmenata pomoću tankoslojne kromatografije (TLC).....	39
3.2.6.15.	Priprema ekstrakata biomase dijatomeja za određivanje antimikrobne aktivnosti	40
3.2.6.16.	Istraživanje antimikrobnog djelovanja difuzijskom metodom	40
3.2.6.17.	Određivanje udjela mineralnih tvari.....	41
3.2.6.18.	Izračunavanje uspješnosti bioprocesa	42
4.	REZULTATI I RASPRAVA	43
4.1.	Optimizacija f/2 podloge za fototrofni uzgoj u tikvicama	43
4.2.	Uzgoj u fotobioreaktoru.....	48
4.2.1.	Sastav stanica.....	52
4.2.1.1.	Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz mikroalgi.....	54
4.2.1.2.	Sastav pigmenata biomase dijatomeja.....	57
4.3.	Rast na izvorima dušika i ugljika.....	60
4.4.	Antimikrobno djelovanje	64
5.	ZAKLJUČCI	69
6.	LITERATURA	71

1. UVOD

Dijatomeje ili alge kremenjašice su jedna od najzastupljenijih skupina fitoplanktona u morskoj vodi te imaju važnu ulogu u kruženju ugljika i silicija u morima i oceanima. U stresnim uvjetima mnoge alge, pa tako i dijatomeje, mijenjaju tokove ugljika u metaboličkim putevima u cilju sinteze i akumulacije lipida, od kojih su najzastupljeniji triacilgliceroli. U ukupnim staničnim lipidima dijatomeja prevladavaju sljedeće masne kiseline: miristinska (C14:0), plamitinska (C16:1), palmitoleinska (C16:1) i eikosapentaenoična kiselina (C20:5), dok su masne kiseline s osamnaest ugljikovih atoma obično prisutne samo u tragovima (Zulu i sur., 2018). Masne kiseline srednje duljine lanca pogodne su za proizvodnju biodizela jer se time smanjuje viskoznost goriva (Zulu i sur., 2018). Osim toga, dijatomeje sadrže značajne količine pigmenata, posebno karotenoida, kao što su fukoksantin i didinoksantin. Navedeni pigmenti i višestruko nezasićene masne kiseline imaju antioksidacijsko, antimikrobno, antivirusno, antikancerogeno i imunomodulacijsko djelovanje, zbog čega se primjenjuju u prehranbenoj, krmnoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Cilj je ovoga rada bio optimirati sastav hranjive podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje izolirane iz Jadranskog mora. Također, provedeno je istraživanje rasta dijatomeje u miksotrofnim i heterotrofnim uvjetima na različitim izvorima ugljika te rasta na različitim izvorima dušika u fototrofnim uvjetima. U cilju povećanja koncentracije biomase proveden je polukontinuirani fototrofni uzgoj uz dvije prihrane s koncentriranom otopinom hranjivih soli. Tijekom uzgoja praćen je sastav stanice (lipidi, proteini, ugljikohidrati, mineralne tvari), udjel pigmenta i sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima. Osim toga, istraženo je antimikrobno djelovanje ekstrakata dijatomeja na odabrane mikroorganizme (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Candida utilis* i *Aspergillus niger*).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MIKROLAGE

Mikroalge su prokariotski i eukariotski fotosintetski jednostanični i kolonijalni mikroorganizmi jednostavne stanične građe i veličine od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara. Prisutne su u najrazličitijim ekosustavima kao što su tekući i mirujući vodeni ekosustavi (mora, rijeke, jezera, lagune), odnosno staništa u kojima vladaju nepovoljni uvjeti okoline. Najpoznatiji predstavnici industrijski značajnih mikroalgi su cijanobakterije (*Cyanophyceae*), zeleni bičaši (*Euglenophyta*) i neke zelene mikroalge (*Chlorophyta* i *Bacillariophyta*) (Rezić i sur., 2014). Relativno brze stope rasta i jednostavna struktura mikroalge čine ih zanimljivim mikroorganizmima za biotehnošku primjenu (Singh i sur., 2015). Njihove stanične komponente, kao što su ugljikohidrati i proteini, mogu se koristiti u različite svrhe, uključujući proizvodnju prehrambenih i farmaceutskih proizvoda. Različite morfološke i fiziološke karakteristike mikroalgi omogućuju njihovu primjenu u proizvodnji vitamina, antioksidansa, lijekova, imunostimulansa i dodataka prehrani. Triacilgliceridi su glavni izvori energije u stanicama mikroalgi i mogu se iskoristiti za proizvodnju biogoriva (biodizela).

2.1.1. Podjela algi

W. H. Harvey smatra se jednim od prvih algologa koji je predložio prvu opisnu klasifikaciju algi. Predložena klasifikacija temelji se na različitim morfološkim, fiziološkim i biokemijskim značajkama (Baweja i Sahoo, 2016).

Glavna obilježja koji se široko koriste za klasifikaciju algi su:

- I. Fotosintetski pigmenti
- II. Skladištenje rezervi hrane
- III. Sastav stanične stijenke
- IV. Flagele

Ipak, oblik stanica te prisutnost i struktura stanične stijenke važni su elementi za taksonomsku klasifikaciju planktonskih mikroorganizama koje danas svrstavamo u dva carstva (Monera i Protista), koje prema klasičnoj terminologiji nazivamo fitoplanktonom. Fitoplankton ima predstavnike u deset osnovnih viših taksonomskih odjela. Od prokariota u alge se uključuju cijanobakterije (modrozeleno alge) i proklorofita, a eukarioti obuhvaćaju: glaukofite,

euglenofite, dinofite, kriptofite, rafidofite, krizofite, klorofite i rodofite. Slatkovodni i morski taksoni s najpoznatijim rodovima nabrojani su u tablici 1 (Viličić, 2002). Krupnija veličinska frakcija (mikrofitoplankton) sadrži najviše alge kremenjašice i dinoflagelata te kokolitoforida, a ostalo su nanoplanktonske vrste koje nisu dovoljno istražene.

Tablica 1. Taksonomska raspodjela fitoplanktona. Uključeni su slatkovodni (S) i morski (M) taksoni s najpoznatijim rodovima. Usklađeno prema recentnoj literaturi Ettl 1980, Sournia 1986, Chrétiennot-Dinet i sur., 1993 (Viličić, 2002).

Latinski naziv	Hrvatski naziv
Nadcarstvo <i>Procaryota</i>	
Carstvo <i>Monera</i>	
Odjel <i>Cyanobacteria</i>	Cijanobakterija (modrozeleno alge)
Odjel <i>Prochlorophyta</i>	Prazelene alge
Nadcarstvo <i>Eucaryota</i>	
Carstvo <i>Protoctista</i>	
Odjel <i>Glaucophyta</i>	Glaukofita
Odjela <i>Euglenophyta</i>	Zeleni bičaši
Odjel <i>Dinophyta</i>	Svjetleći bičaši
Odjel <i>Cryptophyta</i>	Kriptofita
Odjel <i>Raphidophyta</i>	Rafidofita
Odjel <i>Chrysophyta</i>	Zlatno-smeđe alge
Odjel <i>Chlorophyta</i>	Zelene alge
Odjel <i>Rhodophyta</i>	Crvene alge

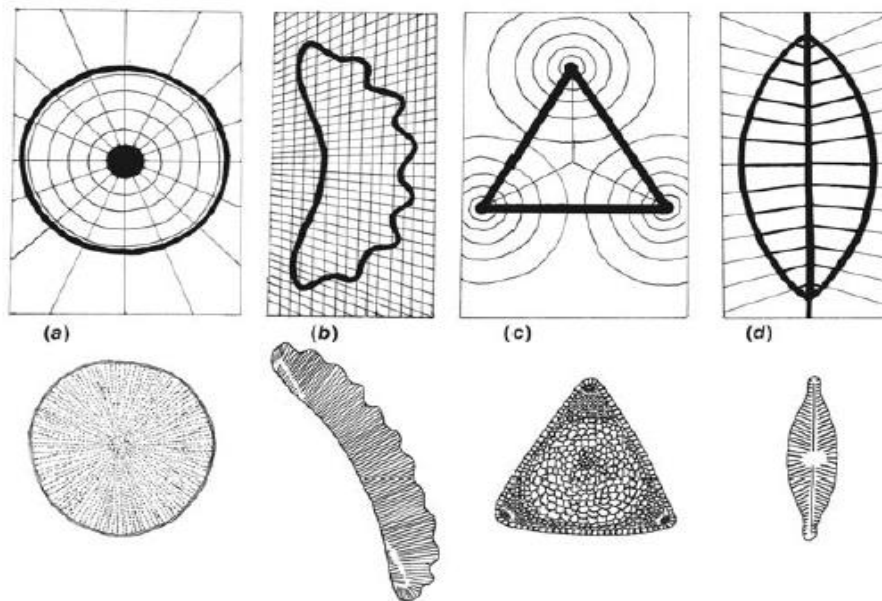
Odjel *Chrysophyta* broji šest razreda. Jedan od njih je *Bacillariophyceae* (sin. *Diatomeae*, *Diatomophyceae*). Dva reda koje ovaj odjel obuhvaća su *Centrales* (S, M) i *Pennales* (S, M). U daljnjem radu naglasak će biti na dijatomejama.

2.2. DIJATOMEJE (LAT. *BACILLARIOPHYCEAE, DIATOMEAE*)

Bacillariophyceae, obično poznate kao dijatomeje, skupina je diploidnih, zlatno ili smeđe pigmentiranih algi. Uglavnom su slobodno plutajući mikroorganizmi morskog ili slatkovodnog okoliša. Ipak 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 (Mann i sur., 2017). Trenutno postoji preko 500 rodova dijatomeja (350 živih i 150 izumrlih) s oko 17000 vrsta (12000 živih i 5000 izumrlih). Nakon uginuća 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. Kada su uvjeti iznimno povoljni i dugotrajni, takve nakupine mogu doseći znatnu debljinu te čine dijatomejsku zemlju ili kieselguhr (Lee, 2008).

2.2.1. Podjela dijatomeja

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 trelioidne 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).



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

2.2.2. Građa dijetomeja

Većina vrsta dijetomeja, osim *Phadactylurm tricornutum* Bohlin i endosimbiotskih vrsta, imaju prepoznatljive silicijeve ljušturice koje okružuju protoplast. Glavna im je uloga zaštita protoplasta, izmjena plinova, unos hranjivih tvari i izlučivanje staničnih produkata (Yi, 2018). Ljušturica je izgrađena od kvarcita (95 %) ili hidratiziranog amorfnog silicija (Kumar i sur., 2016). Dijatomeje nemaju staničnu stijenku već se mlada stanca nakon diobe ili nakon spolnog rasploda s vanjske strane obavija periplastom. Ispod plazmaleme periplasta se nalaze vezikule u kojima se sintetizira amorfnu netopljivi opal ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) iz topljivog silicija koji se u moru nalazi u obliku ortosilicijeve kiseline. Naslaga se kremen u vezikulama povećava i izbija 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 je ljušturica epiteka (lat. *epithaeca*), dok je donja 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., 2017). 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).

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., 2017).

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 i c₁ i c₂ 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., 2011). 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, stoga je to još jedan od načina za determinaciju i identifikaciju ovih mikroorganizama. Neke dijatomeje koje nemaju pigmente (eng. *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 gluklan) 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., 2017).

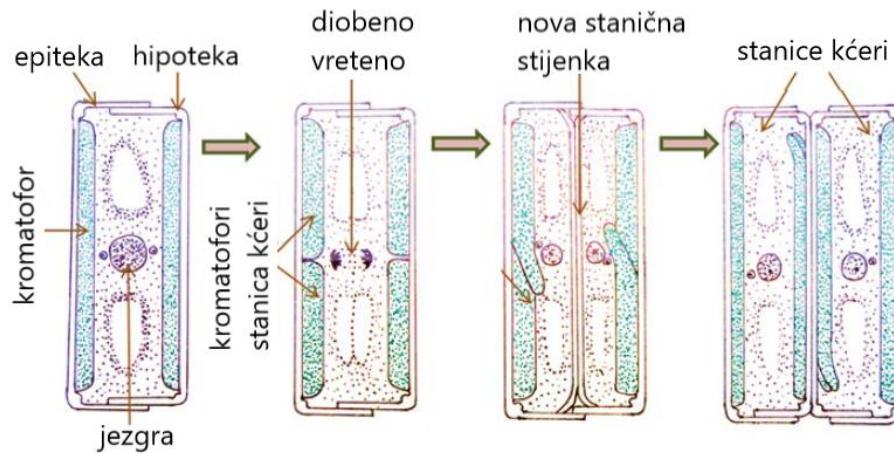
2.2.3. Kretanje dijatomeja

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 prijanjajuće 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., 2017).

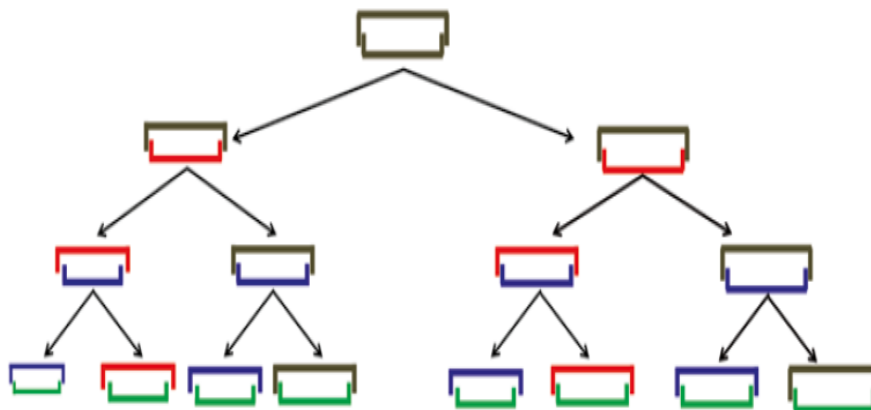
2.2.4. Životni ciklus

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 razmnožavanje (vegetativno), 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 stanica nakon čega stanice, u glavni, ugibaju. Ako ipak dođe do spolnog načina razmnožavanja, veličina se stanica vraća na prvobitnu te one preživljavaju (Mann i sur., 2017).



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



Slika 3. Proces podjele stanica kod dijatomeja i smanjenje veličine stanica (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. prigodna temperatura, svjetlo, hranjive tvari, tragovi metala, organski faktori rasta i osmolarnost (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 trelioidnih 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 su gamete identične, 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).

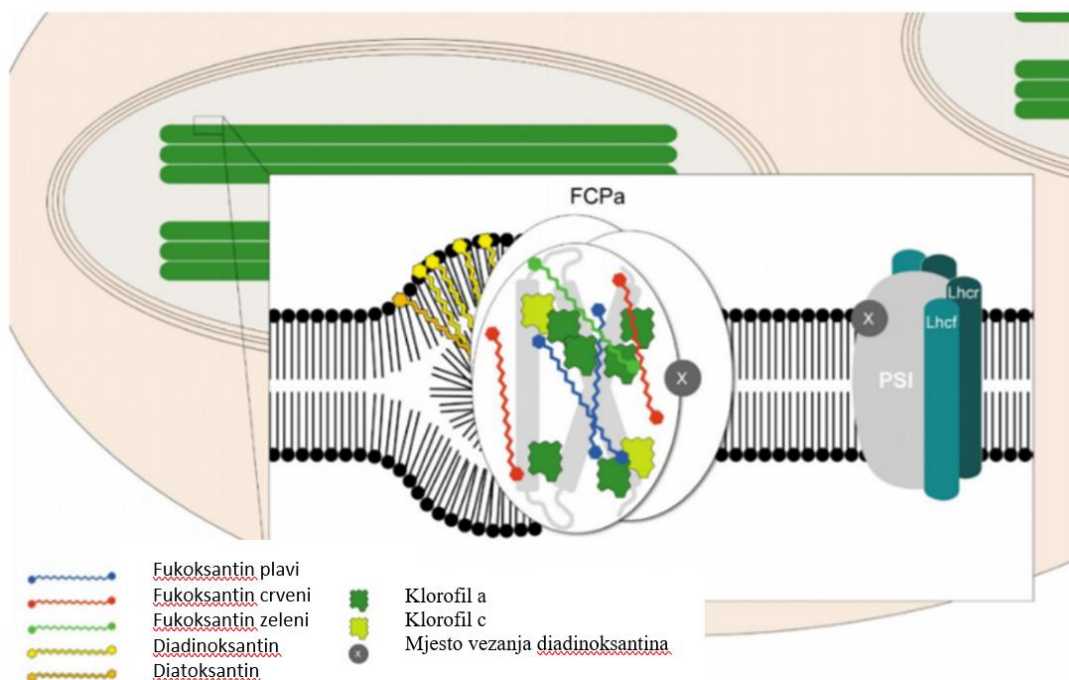
Tijekom autogamije, protoplast diploidne stanice izlučuje sluz. Mejozom nastaju četiri haploidne jezgre. Od četiriju novih jezgara, samo dvije preživljavaju i međusobno se spajaju, što rezultira diploidnom jezgrom. Taj je proces nazvana autogamija. Nakon formiranja

diploidne jezgre protoplast izlazi iz roditeljske frustule i razvija se u auksospore formirajući nove frustule u perizoniju (Kumar i sur., 2016).

2.2.5. Fotosinteza

Smatra se da su dijatomeje zaslužne za oko 25 % svjetske primarne proizvodnje, fiksirajući ugljik i oslobađajući kisik, što je ekvivalentno proizvodnji dvaju najproduktivnijih kopnenih ekosustava: tropske šume i savane (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 im pigmenti omogućuju učinkovitiju apsorpciju svjetlosti nego kod zelenih i crvenih algi (Kuczynska i sur., 2015).



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

U tilakoidama kloroplasta su lokalizirani fotosustavi, u kojima se nalaze molekule koje apsorbiraju svjetlosti (eng. *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 pigmentata 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 c₁ i c₂. Različita struktura klorofila c donosi promjene u apsorpcijskom spektru u usporedbi s drugim skupinama algi (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 (eng. *accessory pigments*) (Kuczynska i sur., 2015). Glavni pigment za apsorpciju svjetla je fukoksantin. Ostali ksantofili koji su prisutni u značajnim količinama su diadinoksanin i diatoksantin. Oni su uglavnom uključeni u regulaciju apsorpcije svjetlosti, iako je diadinoksanin također sposoban apsorbirati i učinkovito prenositi energiju na klorofil (Lavaud, 2007). Pobuđeni elektroni se zatim 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 se energije oslobađa kao toplina ili fluorescencija (non-photochemical quenching, NPQ) (Beckmann i sur., 2009). Tri karotenoida, β -karoten, diadinoksanin 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 proizvede diatoksantin (Kuczynska i sur., 2015).

2.2.6. Uzgoj dijatomeja

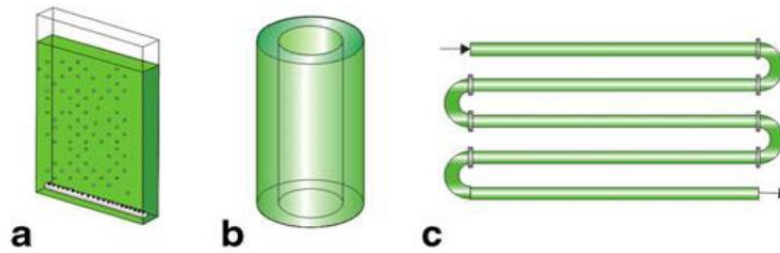
Čimbenici koje treba razmotriti prije kultivacije dijatomeja su: fiziološke karakteristike mikroalge, cijena zemljišta, potrebna energija, hranjive tvari, voda, klima ako je otvoreni sustav i vrsta konačnog proizvoda. Odabir načina uzgoja kulture tada ovisi o: učinkovitosti iskorištavanja svjetla, učinkovitosti kontrole temperature, osjetljivosti dijatomeja na hidrodinamički stres, uvjetima za održavanje aksonične kulture uvjeta i mogućnost povećanja mjerila (Lebeau i Robert, 2003). Postoje dva osnovna načina uzgoja dijatomeja: u zatvorenim i otvorenim sustavima.

Otvoreni sustavi su uglavnom nepokriveni ribnjaci ili prirodna jezera. Ovi se sustavi, gotovo uvijek, oslanjaju na prirodno svjetlo za osvjetljenje. Iako su investicijski i operativni troškovi niski, imaju brojne nedostatke (tablica 2).

Tablica 2. Prednosti i nedostaci otvorenih i zatvorenih sustava za uzgoj dijatomeja (Lebeau i Robert, 2003 i Carvalho i sur., 2014).

Parametar	Otvoreni sustavi	Zatvoreni sustavi (PBR)
Mogućnost kontaminacije	Visoka	Niska
Potrebna površina	Velika	Mala
Gubici vode	Visoki	Neznatni
Gubici CO ₂	Visoki	Neznatni
Kontrola procesa	Nije moguća	Zadovoljavajuća
Standardizacija	Nije moguća	Moguća
Ovisnost o ekološkim čimbenicima	Apsolutna, uzgoj onemogućen za vrijeme padalina	Neznatan; zatvoreni sustavi omogućuju kontrolirani uzgoj neovisno o vremenskim uvjetima
Troškovi	Niski	Visoki
Učinkovitost	Niska	Visoka

U zatvorene se sustave ubrajaju zatvoreni unutarnji ili vanjski fotobioreaktori koji uključuju vreće, cjevaste fotobioreaktore i reaktore s ravnim pločama (slika 5). U kolonskom i cijevnom bioreaktoru poboljšana je difuzija svjetla unutar fotobioreaktora, hranjivi medij je dobro miješan, omogućena je učinkovita izmjena plinova i dobra kontrola temperature, što dovodi do veće produktivnosti biomase i veće gustoće stanica. Također je moguća uporaba i fotoreaktora s mješalom (Lebeau i Robert, 2003).



Slika 5. Vrste zatvorenih fotobioreaktora: a) s ravnim pločama, b) kolonski bioreaktor i c) cijevni (Posten, 2009).

Različite konfiguracije bioreaktora i strategije uzgoja još se uvijek intenzivno istražuju kako bi se poboljšao rast mikroalgi. Budući da svi imaju neke svojstvene probleme, takvi su postupci optimizacije nužni (tablica 2) (Carvalho i sur., 2014).

Komercijalna je primjena dijatomeja još uvijek u razvoju. Daljnji napredak primjene dijatomeja ovisit će o smanjenju troškova proizvodnje i izdvajanja biomase. Zbog rasta ovisnog o svjetlosti, rast dijatomeja je relativno slab zbog ograničene difuzije svjetla u hranjivu podlogu, što zahtijeva razvoj pogodnih fotobioreaktora. Usporedba prinosa biomase i lipida mikroalgi u različitim sustavima prikazana je u tablici 3. Dobivene vrijednosti produktivnosti dijatomeja su značajne ($8,62$ i $9,79 \text{ g m}^{-2} \text{ dan}^{-1}$), dok su prinosi lipida, u usporedbi s drugim mikroalgama, među nižim vrijednostima (Matsumoto i sur., 2017).

Ostali ograničavajući čimbenici, koji značajno utječu na rast, su hranjive tvari (fosfat, dušik, silicij), pH, temperatura itd. (Lebeau i Robert, 2003).

Tablica 3. Usporedba stvarne produktivnosti biomase i lipida kultura mikroalgi u otvorenim sustavima (Matsumoto i sur., 2017).

Mikroalga	Vrsta bioreaktora	Produktivnost biomase [g m ⁻² dan ⁻¹]	Produktivnost lipida [g m ⁻² dan ⁻¹]
<i>Mayamaea sp.</i>	Otvoreni sustav	8,62	0,92
<i>Fistulifera solaris</i>	Otvoreni sustav	9,79	1,8
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Kolonski bioreaktor	10 ± 2,2	-
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Zeleni zidni paneli	9,9	6,5
<i>Tetraselmis suecica</i>	Zeleni zidni paneli	7,6	1,7
<i>Tetraselmis sp.</i>	Otvoreni sustav	7,2 ± 0,4	3,0 ± 0,6
<i>Tetraselmis sp.</i>	Cijevni bioreaktor	7,8 ± 0,2	5,0 ± 0,4
Mikroalge u otpadnoj vodi	Otvoreni sustav	5,9	1,42

2.2.6.1. Utjecaj svjetla

Intenzitet svjetla jedan je od glavnih ograničavajućih čimbenika u uzgoju dijatomeja te su dostupnost i intenzitet svjetlosti glavni faktori koji kontroliraju produktivnost fotosinteze. Svjetlo je potrebno za sintezu ATP i NADPH, molekule koje se koriste kao izvor energije za sintezu organskih spojeva.

Optimizacija rasvjete u fotobioreaktoru nije jednostavna. Homogeni je intenzitet svjetla vrlo važan kako bi sve stanice u populaciji bile jednako izložene svjetlu te da bi se mogla ostvariti maksimalna proizvodnja željenog metabolita potrebne kvalitete. Osnovni je nedostatak primjene imobiliziranih stanica ograničenje difuzije svjetla, što dovodi do nehomogene raspodjele stanica u matriksu (Lebeau i Robert, 2003).

Također je potrebno odrediti trajanje perioda svjetla i tame. Period je svjetla i tame dokazano jedan od čimbenika koji utječe na sinkronizirano dijeljenje stanica. Isto se postiže držanjem dijatomeja u tami tijekom dugog razdoblja, a nakon toga slijedi izlaganje svjetlu. Ako se kultura uzgaja 8 sati na svjetlu i 8 sati u tami, dobivene se stanice sinkronizirano dijele (Lee, 2008). Ako je ciklus skraćen na 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 je studija pokazala da je vrijeme od 16 sati svjetla i 8 sati tame najprikladnije za rast većine algi (Lee, 2008). Optimalna razina intenziteta svjetlosti za većinu mikroalgi vrste su oko 200 – 400 μM fotona m⁻² s⁻¹ (Khan i sur., 2018).

2.2.6.2. *Utjecaj temperature*

Temperatura je još jedan važan čimbenik u rastu dijatomeja i izravno utječe na biokemijske procese. Povećanje temperature na optimaln raspon eksponencijalno povećava rast mikroalgi, ali povećanje ili smanjenje na temperaturu iznad optimalne točke usporava ili čak zaustavlja njihov rast i aktivnost (Bechet i sur., 2017). Optimalan raspon temperature za većinu vrsta mikroalgi je 20-30 °C (Singh i Singh, 2015). Temperature niže od 16 °C usporavaju rast, dok su one više od 35 °C smrtonosne za brojne vrste (Lebeau i Robert, 2003). Uzgoj kultura mikroalgi pri temperaturama iznad ili ispod optimalnog raspona rezultirat će visokim gubitcima biomase, osobito u otvorenim sustavima.

2.2.6.3. *Nutrijenti*

Nekoliko je makronutrijenata nužno za uzgoj dijatomeja, uključujući dušik, silicij i fosfor. Silicij se apsorbira u koncentraciji manjoj od 1 μM te se aktivno transportira kroz membrane (Mishra i sur., 2017), a ukoliko je prekoračena granična koncentracija od 2 μM silikata u moru, dijatomeje će nominalno predstavljati više od 70 % fitoplanktona u ekosustavu (Wang i Seibert, 2017). Važnost dušika iskazuje se činjenicom da u uvjetima limitacije ovim nutrijentom dolazi do povećane sinteze lipida u stanicama dijetomeja (Lebeau i Robert, 2003).

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). Mikronutrijenti, kao što su željezo i mangan, su potrebni u malim koncentracijama (30 - 2,5 ppm), dok su drugi elementi primjerice kobalt, cink, bor, bakar i molibden bitni elementi u tragovima, u koncentracijama od 4,5 - 2,5 ppm (Juneja i sur., 2013).

2.2.6.4. *Ostali faktori*

Kulture mikroalgi moraju se stalno miješati kako bi se sve stanice zadržale u suspenziji sa slobodnim pristupom svjetlu. Pravilan sustav za miješanje fotobioreaktora, ne samo da omogućuje otapanje hranjivih tvari i ravnomjerno osvjetljavanje kulture, nego također omogućuje učinkovitu izmjenu plinova (Khan i sur., 2018). Miješanje se postiže aeriranjem ili uporabom tresilica, različitih mehaničkih mješala, mlaznih ili zračnih pumpi. Na temelju njihove tolerancije na smicanje, može se reći da su zelene alge najosjetljivije, zatim slijede plavo-zelene alge i dijatomeje, dok su dinoflagelati najmanje osjetljivi (Singh i sur., 2015).

Zbog njihove krute frustule (silikatne stanične stijenke), dijatomeje su osjetljive na naprezanje smicanjem (Lebeau i Robert, 2003). Da bi se nadvladao ovaj nedostatak, medij za

uzgoj mikrolagi se upotpunjuje s karboksimetil celulozom (CMC) pri koncentraciji barem 0,2 % (tež) koji štiti stanice algi protiv hidrodinamičkog stresa inducirano aeracijom (Lebeau i Robert, 2003).

pH kulture medija je još jedan važan faktor koji utječe na rast dijatomeja. Većina ih dobro raste u rasponu pH od 6 do 8,7. Ipak, kiselinski pH važan je za formiranje ljušturice dijatomeja jer olakšava brzu nukleaciju i agregaciju čestica silicijevog dioksida, čime se povećava brzina stvaranja zrelih frustula (Martin-Jezequel i sur., 2000).

Mikrolage mogu preživljavati u širokom rasponu koncentracija soli (NaCl). To im omogućuju njihove inherentne sposobnost osmoregulacije, kao što je čvrsta stanična stijenka, regulirani unos soli, sinteza ionskih nenabijenih niskomolekularnih spojeva te izlučivanje vode i soli (Singh i sur., 2015). Međutim, značajno povećanje koncentracije natrijeva klorida u podlozi za rast iznad granične vrijednosti dovodi do inhibicije fotosinteze i rasta u ekstremnim uvjetima, plazmolize ili do pucanja stanica (Singh i sur., 2015). Koncentracija je natrijeva klorida za različite alge drugačija kao i svi ostali faktori, ali optimalna slanost za većinu dijatomeja je u rasponu od 20 - 24 g L⁻¹ (Lebeau i Robert, 2003).

2.2.7. Primjena dijatomeja

Žive dijatomeje, ali i njihove modificirane frustule, imaju važnu industrijsku primjenu. Osim primjene u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, u novije vrijeme sve je češća njihova primjena u nanotehnologiji, biotehnologiji, znanost o okolišu, biofizici ili biokemiji. Njihove najvažnije primjene sažete su u tablici 4.

Tablica 4. Moguća industrijska primjena dijatomeja koja ih čine prikladnima za različite namjene (Mishra i sur., 2017).

Primjena	Svojstva i prednosti proizvoda/komponente
Nanotehnologija i znanost materijala	<ul style="list-style-type: none"> • Frustula od silicija • Mogućnost genetskog inženjerstva i niski troškovi proizvodnje • Poroznost frustule • Toplinski otporna izolacija pogodna za uporabu u kotlovima i visokim pećima
Filtracijski materijal i pročišćavanje vode	<ul style="list-style-type: none"> • Filtracija mikroorganizama • Homogena propusnost i ujednačena veličina pora • ekonomski isplativo • Odobreno od strane američke agencije za zaštitu okoliša
Metaboliti, proizvodnja biogoriva i solarnih panela mikroalgi	<ul style="list-style-type: none"> • Proizvodnja eikosapentaenoične kiseline (EPA) • Rezervna hrana ulje, volutin i krizolaminarin • Proizvodnja anti-bakterijskih, anti-fungalnih i anti-tumorskih peptida • Proizvodnja neutralnih lipida koji su prekursori biodizela • Proizvodnja pigmenata
Bioremedijacija	<ul style="list-style-type: none"> • Otpornost na teške metale zbog sinteze fitokelatina • Učinkovito uklanjanje amonijaka, kadmija, fosfora i ortofosfata • Hrana za akvakulturu (školjke, ribe) • Neinvazivni ako se primjenjuju u okolišu iz kojeg su izolirani
Transport lijekova u tkiva	<ul style="list-style-type: none"> • Jedinstvena struktura nanočestica • Kemijski inertan i biokompatibilan • Postupno oslobađanje lijekova • Svojstvo filtriranja • Netoksičan

Dijatomeje sadrže i značajne bioaktivne spojeve kao što su karotenoidi, esencijalne masne kiseline i polisaharidi.

β - karoten poznatiji još kao provitamin A, primarno se koristi u nutritivne svrhe kao vitaminski suplement. Astaksantin je još jedan predstavnik karotenoida iz grupe ksantofila a smatra se najjačim prirodnim antioksidansom. Sadržaj fukoksantina u *Odontella aurita* može dostići do 18,5 mg g⁻¹ suhe mase u uvjetima limitacije hranjivim tvarima (Xia i sur., 2013).

Osim karotenoida i drugih bioaktivnih spojeva, dijatomeje su također veliki izvor lipida koje pohranjuju u stanicama, u obliku rezervnih kapljica, s udjelom od 23 - 45 % suhe tvari biomase (d'Ippolito i sur., 2015). Najvažniji lipidi i njihova primjena prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Korisni lipidi dijatomeja (Yi, 2018).

Vrsta lipida	Kemijski spoj	Djelovanje i primjena	Izvor dijatomeja
Masne kiseline	HTA ¹ 16:3 (n-3)	antibakterijsko	Sve vrste dijatomeja (razlika u sadržaju masnih kiselina)
	Palmitoleinska kiselina 16:1 (n-7)	antibakterijsko	
	Oleinska kiselina 18:0	antimikrobno	
	EPA ² 20:5 (n-3)	Antikancerogeno, antibakterijsko, antiinflamatorno	<i>Skeletonema menzeli</i> i <i>Phaeodactylum tricornutum</i> imaju potencijal za komercijalnu proizvodnju EPA i DHA
	DHA ³ 22:6 (n-3)		
Neutralni lipidi	Triacilglicerol	Proizvodnja biogoriva	<i>Thalassiosira weissflogii</i> i <i>Cyclotella cryptica</i>
Polarni lipidi	Glikolipidi	Antiinflamatorno, antitumorno, antibakterijsko, antiviralno	<i>Thalassiosira pseudonana</i> i <i>Stephanodiscus sp.</i>
	Fosfolipidi	Primjena u funkcionalnoj hrani, kozmetici i farmaceuticima	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> i <i>Cylindrotheca fusiformis</i>
Steroidi	24-metolenkolesterol	Antiinflamatorno, antimikrobno i antitripanosomalno	90% od ukupnih sterola u <i>Synedra acus</i> .
Oksilipini	PUAs ⁴	Antimitotičko, antiinflamatorno i antimikrobno	<i>Thalassiosira rotula</i>

1- heksadekatrienoična kiselina, 2- eikosapentaenoična kiselina, 3- dokozaheksaenska kiselina, 4 - višestruko nezasićeni aldehidi

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizam

Radni mikroorganizam je dijatomeja, soj 5.4., izolirana iz Jadranskog mora (okolica Šibenika, ožujak 2018). Optimizacija sastava podloge za uzgoj u tikvicama i za uzgoj u bioreaktoru provedena je s kseničnom kulturom koja je sadržavala jednu vrstu mikroalge i jednu ili više vrsti bakterija. Za istraživanje rasta na različitim izvorima ugljika i kompleksnim izvorima dušika korištena je kultura pročišćena od bakterija, odnosno aksenična kultura

3.1.2. Sirovine za pripremu hranjive podloge

Za pripremu hranjivih podloga korištene su sirovine navedene u tablici 6.

Tablica 6. Popis korištenih kemikalija za pripremu hranjivih podloga.

Naziv	Proizvođač
Natrijev nitrat	Kemika, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat	Kemika, Hrvatska
Natrijev metasilikat nanohidrat	Kemika, Hrvatska
Željezov (III) klorid heksahidrat	Sigma, SAD
EDTA dinatrijev dihidrat	Carlo Erba
Bakrov sulfat pentahidrat	Gram Mol
Natrijev molibdat dihidrat	Kemika, Hrvatska
Cinkov sulfat heptahidrat	Merck, SAD
Kobaltov (II) klorid dihidrat	Kemika, Hrvatska
Manganov (II) klorid tetrahidrat	Kemika, Hrvatska
Cijanokobalamin (vitamin B ₁₂)	Sigma, Hrvatska
Biotin (vitamin B ₇)	Sigma, Hrvatska
Tiamin HCl (vitamin B ₁)	Sigma, Hrvatska
Glukoza	Difco, SAD
Fruktoza	Kemika, Hrvatska

Laktoza	Kemika, Hrvatska
Glicerol	Sigma, Hrvatska
Ksiloz	Kemika, Hrvatska
Melasa (50 % suhe tvari)	Sladorana Županja, Hrvatska
Jabučna kiselina	Sigma, Hrvatska
Amonijev klorid	Kemika, Hrvatska
Amonijev acetat	Merck, SAD
Amonijev nitrat	Kemika, Hrvatska
L-glutaminska kiselina	Sigma, Hrvatska
L- cistein	Carlo Erba
Glicin	Sigma, Hrvatska
Urea	Kemika, Hrvatska
Kvašćev ekstrakt	Roth, Austrija
Pepton	Difco, SAD
Kvašćeve dušične baze (eng. <i>Yeast Nitrogen Base</i>)	Biolife

3.1.3. Ostale kemikalije i kitovi korišteni u eksperimentu

Ostale korištene kemikalije navedene su u tablici 7.

Tablica 7. Popis ostalih kemikalija i njihovi proizvođači.

Naziv	Proizvođač
Sumporna kiselina (72 % vol/vol)	Acros Organics, Belgija
Kalcijev karbonat	Kemika, Hrvatska
Fosforna kiselina	Merck
Folin-Ciocalteu reagens	Sigma, Hrvatska
Kalij-natrij tartarat	Fisher Scientific, UK
Natrijev karbonat	Gram Mol
Metanol	J. T. Baker, SAD
Kloroform	Macron Fine Chemicals, SAD
Aceton	Gram Mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	Merck, SAD

Heksan	Chromaslov Honeywell
Kit za određivanje koncentracije fosfata	Merck KGaA, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije nitrata	Merck KGaA, Njemačka
Kit za određivanje koncentracije silicija	Merck KGaA, Njemačka

3.1.4. Hranjive podloge za održavanje i uzgoj mikroalge

3.1.4.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture i uzgoj inokuluma

Za održavanje kulture kao i uzgoj inokuluma korištena je Guillardova obogaćena podloga (f/2 podloga) pogodna za uzgoj morskih dijatomeja i drugih morskih mikroalgi (Guillard, 1975). Umjetna morska voda pripravljena je otapanjem soli navedenih u tablici 8, a kao izvor natrijevog klorida korištena je prirodna, ručno brana, ne jodirana ninska sol (ninski cvijet). Podloga je pripravljena dodavanjem komponenata podloge (anorganske soli, otopina elemenata u tragovima i otopina vitamina) navedenih u tablici 9. u prethodno pripravljenu umjetnu morsku vodu.

Tablica 8. Sastav umjetne morske vode (Cuvelier i Simmons, 2009).

Sastojak/anorganska sol	Koncentracija (g L ⁻¹)
NaCl	24,55
KCl	0,75
MgCl ₂ x 6H ₂ O	4,07
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,47
MgSO ₄ x 7H ₂ O	6,04
NaHCO ₃	0,21

Tablica 9. Sastav f/2 podloge (Guillard, 1975).

Sastojak	Koncentracija (M)
NaNO ₃	8,82·10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3,62·10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ x 9H ₂ O	1,06·10 ⁻⁴
Otopina elemenata u tragovima	1 mL L ⁻¹ podloge

Otopina vitamina	1 mL L ⁻¹ podloge
Otopina elemenata u tragovima	1 mL L⁻¹ podloge
Element	Konačna koncentracija u podlozi (M)
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,17·10 ⁻²
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	1,17·10 ⁻²
MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,10·10 ⁻⁴
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	7,65·10 ⁻⁵
CoCl ₂ x 2H ₂ O	4,20·10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	2,60·10 ⁻⁵
Otopina vitamina	1 mL L⁻¹podloge
Otopina vitamina	Konačna koncentracija u podlozi (M)
Tiamin x HCl (vitamin B ₁)	2,96·10 ⁻⁴
Biotin (vitamin B ₇)	2,05·10 ⁻⁶
Cijanokobalamin (B ₁₂)	3,69·10 ⁻⁷

3.1.4.2. Optimizacija sastava hranjive podloge za fototrofni uzgoj

Uz f/2 izvornu podlogu za uzgoj morskih algi, u prvom dijelu istraživanja s ciljem povećanja brzine rasta dijatomeje, korištena je i modificirana f/2 podloga s dvostruko, četverostruko i deseterostruko većom koncentracijom minerala i vitamina (tablica 10).

Tablica 10. Sastav izvorne i modificiranih f/2 podloga za uzgoj dijatomeje soj 5.4.

Sastojci	f/2 izvorni (M)	2 x f/2 (M)	4 x f/2 (M)	10 x f/2 (M)
NaNO ₃	8,82·10 ⁻⁴	1,76·10 ⁻³	3,53·10 ⁻³	8,82·10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3,62·10 ⁻⁵	7,24·10 ⁻⁵	1,45·10 ⁻⁴	3,62·10 ⁻⁴
Na ₂ SiO ₃ x 9H ₂ O	1,06·10 ⁻⁴	2,12·10 ⁻⁴	4,24·10 ⁻⁴	1,06·10 ⁻³
FeCl ₃ x 6H ₂ O	1,17·10 ⁻⁵	2,34·10 ⁻⁵	5,47·10 ⁻⁵	1,17·10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	1,17·10 ⁻⁵	2,34·10 ⁻⁵	5,47·10 ⁻⁵	1,17·10 ⁻⁴
CuSO ₄ x 5H ₂ O	3,93·10 ⁻⁸	7,86·10 ⁻⁸	1,57·10 ⁻⁷	3,93·10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	2,60·10 ⁻⁸	5,2·10 ⁻⁸	1,04·10 ⁻⁷	2,60·10 ⁻⁷

ZnSO ₄ x 7H ₂ O	7,65·10 ⁻⁸	1,53·10 ⁻⁷	3,06·10 ⁻⁷	7,65·10 ⁻⁷
CoCl ₂ x 2H ₂ O	4,20·10 ⁻⁸	8,40·10 ⁻⁸	1,68·10 ⁻⁷	4,20·10 ⁻⁷
MnCl ₂ x 4H ₂ O	9,10·10 ⁻⁷	1,82·10 ⁻⁶	3,64·10 ⁻⁶	9,10·10 ⁻⁶
B ₁₂	3,69·10 ⁻¹⁰	7,37·10 ⁻¹⁰	1,47·10 ⁻⁸	7,37·10 ⁻⁹
biotin	2,05·10 ⁻⁹	6,19·10 ⁻⁹	1,238·10 ⁻⁸	6,19·10 ⁻⁸
tiamin HCl	2,96·10 ⁻⁷	3,01·10 ⁻⁷	6,02·10 ⁻⁷	3,01·10 ⁻⁶

3.1.4.3. Hranjiva podloga za prihranu tijekom uzgoja 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 11 otopljene su u 200 mL deionizirane vode.

Tablica 11. Sastav hranjivih podloga za prihranu tijekom uzgoja u bioreaktoru.

f/2 podloga za prihranu	7. dan uzgoja	11. dan uzgoja
Sastojak	Koncentracija (M)	
NaNO ₃	8,82·10 ⁻⁴	3,53·10 ⁻³
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,45·10 ⁻⁴	1,45·10 ⁻⁴
Na ₂ SiO ₃ x 9H ₂ O	4,24·10 ⁻⁴	4,24·10 ⁻⁴
FeCl ₃ x 6H ₂ O	5,47·10 ⁻⁵	5,47·10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	5,47·10 ⁻⁵	5,47·10 ⁻⁵
CuSO ₄ x5H ₂ O	1,57·10 ⁻⁷	1,57·10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	1,04·10 ⁻⁷	1,04·10 ⁻⁷
ZnSO ₄ x7H ₂ O	3,06·10 ⁻⁷	3,06·10 ⁻⁷
CoCl ₂ x 2H ₂ O	1,68·10 ⁻⁷	1,68·10 ⁻⁷
MnCl ₂ x 4H ₂ O	3,64·10 ⁻⁶	3,64·10 ⁻⁶
B ₁₂	1,47·10 ⁻⁸	1,47·10 ⁻⁸
biotin	1,238·10 ⁻⁸	1,238·10 ⁻⁸
tiamin HCl	6,02·10 ⁻⁷	6,02·10 ⁻⁷

3.1.4.4. *Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika*

Hranjive su podloge pripremljene otapanjem izvora ugljika u f/2 izvornoj podlozi u koncentraciji od 1 g L⁻¹. Kao izvori ugljika korišteni su: glukoza, fruktoza, laktoza, glicerol, ksiloza, melasa i jabučna kiselina. Kao kontrolna podloga korištena je f/2 podloga bez dodanog izvora ugljika.

3.1.4.5. *Hranjive podloge za istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima dušika*

Za istraživanje rasta pojedinih sojeva mikroalgi na različitim izvorima dušika, korištena je f/2 izvorna podloga u kojoj je natrijevog nitrat zamijenjen jednim od deset ispitivanih izvora dušika. Istražen je rast mikroalgi na jednostavnim (amonijev klorid, amonijev acetat, amonijev nitrat, L-glutaminska kiselina, L-cistein, glicin i urea) i kompleksnim (kvaščeve ekstrakt, pepton i kvaščeve dušikove baze, eng. *Yeast Nitrogen Base*) izvorima dušika koji su dodani u odgovarajućoj količini kako bi koncentracija dušika odgovarala koncentraciji dušika u izvornoj f/2 podlozi (88,2 mM). Kao kontrolna podloga korištena je f/2 podloga bez dodanog izvora dušika te izvorna f/2 podloga s natrijevim nitratom kao izvorom dušika.

3.1.5. Oprema i aparatura

3.1.5.1. *HPLC*

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.

3.1.5.2. Sustav za plinsku kromatografiju (GC)

Korišteni uređaj za plinsku kromatografiju je tvrtke Shimadzu GC 2010 *Plus AF* (Shimadzu, Kyoto, Japan). Sustav se sastoji od: automatskog uzorkivača (150 mjesta; AOC – 20 s), injektora (AOC-20i), peći, ZB-FAME kapilarne kolone (30 m, 0,25 mm i.d., 0,25 µm df; Phenomenex, SAD), plameno-ionizacijskog detektora (eng. Flame-Ionization Detector, FID) i programa za prikupljanje i obradu podataka GC Solutions verzija 2.32.

3.1.6. Ostali uređaji

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal, u izradi ovoga rada korištena je i oprema navedena u tablici 12.

Tablica 12. Popis ostale korištene opreme.

Oprema	Proizvođač
Centrifuga	ThermoScientific, SL 8R, SAD
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 °C

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj inokuluma

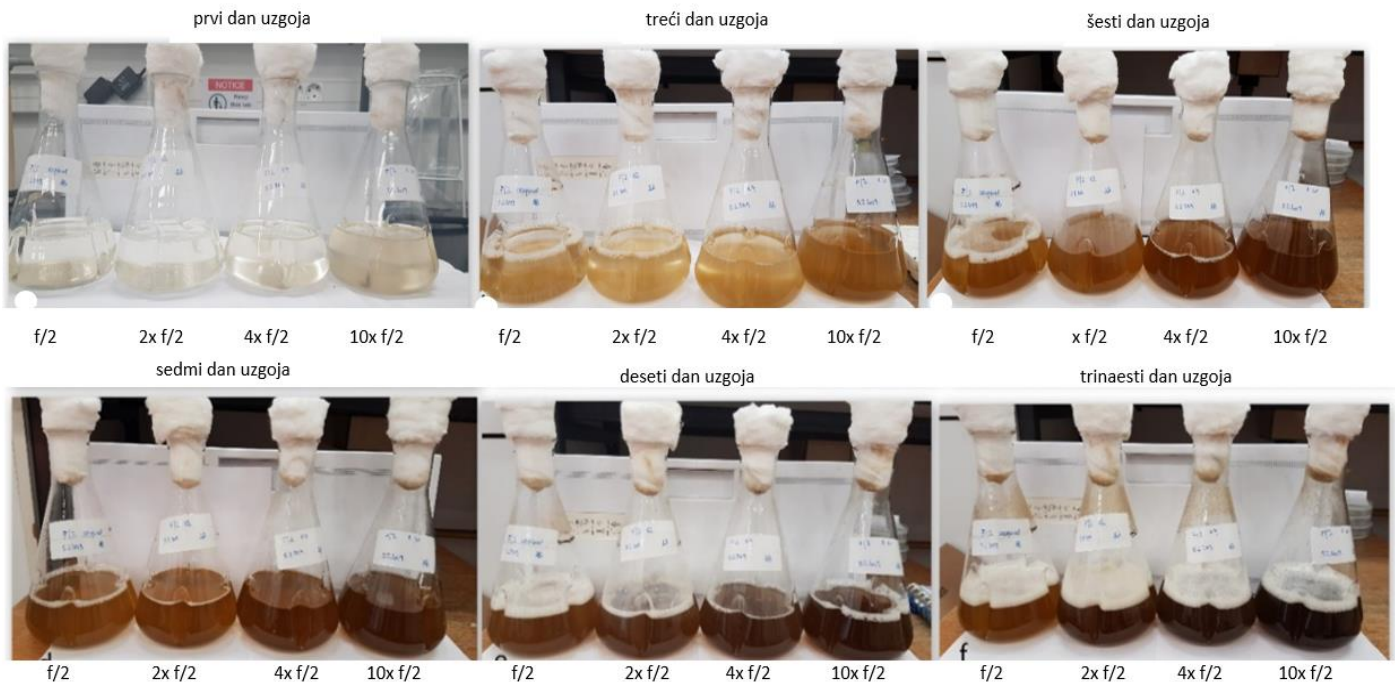
Ksenična ili aksenična kultura dijatomeje, soj 5.4., uzgojena je na podlozi pripremljenoj na način opisan u poglavlju Materijali (3.1.4.). Ksenična kultura korištena je za uzgoje u tikvicama i uzgoj u fotobioreaktoru, dok je aksenična kultura korištena za uzgoj na različitim izvorima ugljika i kompleksnim izvorima dušika. Inokulum je uzgajan sukcesivnim povećavanjem volumena kulture. Uzgoj inokulum je započeo inokulacijom 5 mL originalne kulture u 50 mL podloge u Erlenmeyer tikvici od 100 mL. Inokulum je uzgajan kroz 7 dana na tresilici pri 200 okretaja u minuti, pri temperaturi od 25 °C, uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlosti (2000 K) i režim 12 sati svjetlo, 12 sati tama. Potom je 20 mL tako uzgojene kulture inokulirano u 180 mL podloge u Erlenmeyer tikvici od 500 mL te je inokulum uzgajan u istim uvjetima.

3.2.2. Priprema inokuluma za uzgoj u fotobioreaktoru

Za fototrofni uzgoj u fotobioreaktoru inokulum je uzgojen u pet Erlenmeyer tikvica s odbijačima od 500 mL korisnog volumena 200 mL. Inokulum je uzgajan kroz 7 dana na način opisan u poglavlju 3.2.1. Potom je biomasa iz svih tikvica izdvojena centrifugiranjem u prethodno steriliziranim bocama za centrifugiranje od 500 mL. Biomasa dijatomeje je resuspendirana u 200 mL sterilne f/2 podloge i prelivena u tikvicu. Tako pripremljena ugušćena kultura koristila se kao inokulum za fotobioreaktor.

3.2.3. Optimizacija podloge za fototrofni uzgoj dijatomeje

Sastav ispitivanih podloga za optimizaciju fototrofnog uzgoja dijatomeje naveden je u poglavlju 3.1.4.2. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL s odbijačima (slika 6) i ukupnim volumenom od 300 mL. U 270 mL prethodno sterilizirane hranjive podloge dodano je 30 mL prethodno uzgojenog inokuluma (poglavlje 3.2.1.). 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 praćen izuzimanjem uzoraka kojima je određivana optička gustoća podloge i broj stanica po mililitru suspenzije brojanjem stanica u Thomaovoj komorici. 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 3.2.6.3.), a biomasa izdvojena centrifugiranjem i filtracijom. U filtratu, odnosno podlozi izdvojenoj nakon uzgoja, određena je koncentracija dušika, fosfatnih iona i silikata (poglavlja 3.2.6.4, 3.2.6.5 i 3.2.6.6.). Iz dobivenih rezultata odabrana je najpogodnija podloga za fototrofni uzgoj dijatomeje.



Slika 6. Uzgoj dijatomeja u tikvicama na f/2 i modificiranim f/2 podlogama (vlastita fotografija).

3.2.4. Uzgoj u fotobioreктору

Za uzgoj dijatomeje 5.4. korišten je stakleni bioreaktor s miješalom (slika 7) ukupnog volumena 2 L. Bioreaktor je najprije steriliziran u autoklavu, a potom je u njega dodana sterilna hranjiva podloga. Prema rezultatima prethodnog eksperimenta, za uzgoj je korištena četverostruko koncentrirana $f/2$ podloga (Poglavlje 3.1.4.2.). Početni volumen podloge iznosio je 1,6 L. Podloga je naciepljena s 200 mL inokuluma pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.2.2. i ukupan je volumen u bioreктору 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 dvanaest sati tame i dvanaest sati svjetla. Uzorci su izuzimani svakodnevno te je rast praćen određivanjem optičke gustoće kulture i gravimetrijskim određivanjem koncentracije stanica. Također je praćena potrošnja dušika, fosfata i silikata u podlozi. Prvi dio uzgoja u fotobioreктору se vodio šaržno, a potom polukontinuiranim načinom uzgoja.

3.2.4.1. Šaržni uzgoj u fotobioreктору

Šaržni uzgoj u fotobioreктору je trajao do kraja eksponencijalne faze rasta kulture i ulaska u stacionarnu fazu, na što je upućivalo smanjenje porasta optičke gustoće kulture. Šaržni uzgoj u ovom eksperimentu trajao je sedam dana, a potom se prešlo na polukontinuirani način uzgoja.

3.2.4.2. Polukontinuirani uzgoj u fotobioreктору

Polukontinuirani način uzgoja započinje izuzimanjem 200 mL kulture iz fotobioreaktora i nadomještanjem tog volumena svježom, prethodno steriliziranom $4x f/2$ podlogom odgovarajuće koncentracije izvora dušika. 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 $4x f/2$ podlozi za prihranu umanjena koncentracija izvora dušika za vrijednost preostalog izvora dušika. Sastav za podlogu za prihranu naveden je u poglavlju 3.1.4.3.



Slika 7. Fotobioreaktor (vlastita fotografija)

3.2.5. Uzgoj na različitim izvorima dušika i ugljika

Istraživanje rasta mikroalgi na različitim izvorima ugljika i dušika provedeno je u tekućoj podlozi, u dvije mikrotitarske pločice s 96 jažica. Jedna je korištena za istraživanje miksotrofnog rasta, a druga za istraživanje rasta bez prisustva svjetlosti odnosno, heterotrofnog rasta. Raspored ispitivanih izvora ugljika, odnosno dušika u mikrotitarskoj pločici bio je jednak za oba načina uzgoja. U 180 μL tekuće f/2 podloge odgovarajućeg sastava (poglavlje 3.1.4.4. i 3.1.4.5.) inokulirano je 20 μL prethodno uzgojene kulture (poglavlje 3.2.1.) kako bi korisni volumen u svakoj jažici iznosio 200 μL . Uzgoj je vođen kroz pet dana na tresilici za mikrotitarske pločice uz rotaciju 250 rpm, na 25 °C te u slučaju miksotrofnog rasta uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlošću uz režim 12 sati svjetlo i 12 sati tama. Za postizanje uvjeta za heterotrofni rast, mikrotitarska je pločica umotana aluminijskom folijom kako bi se spriječila izloženost svjetlu. Uzgoj je praćen određivanjem optičke gustoće kulture na 540 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlike promjene optičke gustoće zadnjeg i prvog dana uzgoja, na pojedinim izvorima dušika, odnosno ugljika uspoređivane su međusobno i razlikom optičke gustoće kulture izrasloj na kontrolnoj podlozi.

3.2.6. Analitičke metode

3.2.6.1. Brojanje stanica u Thomaovoj komorici

Prije nanošenja uzorka, Thomaova komorica isprana je destiliranom vodom i etanolom te dobro osušena. Zatim je kap suspenzije mikroalgi prenesena na površinu mrežice i prekrivena je pokrovnicom. Pokrovnica je fiksirana povlačeći je 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 [1]:

$$N = m \cdot n \cdot 400 \cdot 10000 / Q \quad [1]$$

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

3.2.6.2. Mjerenje optičke gustoće kulture

Rast mikroalgi tijekom uzgoja praćen je izuzimanjem uzorka podloge kojom je izmjerena apsorbancija pri 540 nm. Uzorci su prethodno, po potrebi, razrjeđivani destiliranom vodom kako bi apsorbancija bila između 0,1 i 1,0.

3.2.6.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije biomase dijatomeja

Tijekom uzgoja u bioreaktoru praćena je i promjena koncentracije biomase gravimetrijskom analizom. Određeni volumen podloge (7 mL) izuzet tijekom uzgoja profiltriran je kroz prethodno osušeni i izvagani filter papir veličine pora 0,4 μm (m₁). Filtrat je izdvojen radi daljnje analize, a zaostala biomasa je potom isprana destiliranom vodom kako

bi se uklonili ostaci podloge i soli. Filter papir s biomasom osušen je na 100 °C do konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru izvagana je masa filter papira i osušene biomase (m_2). Koncentracija biomase dobivena je kao kvocijent razlike mase m_2 i m_1 i uzetog volumena podloge [2].

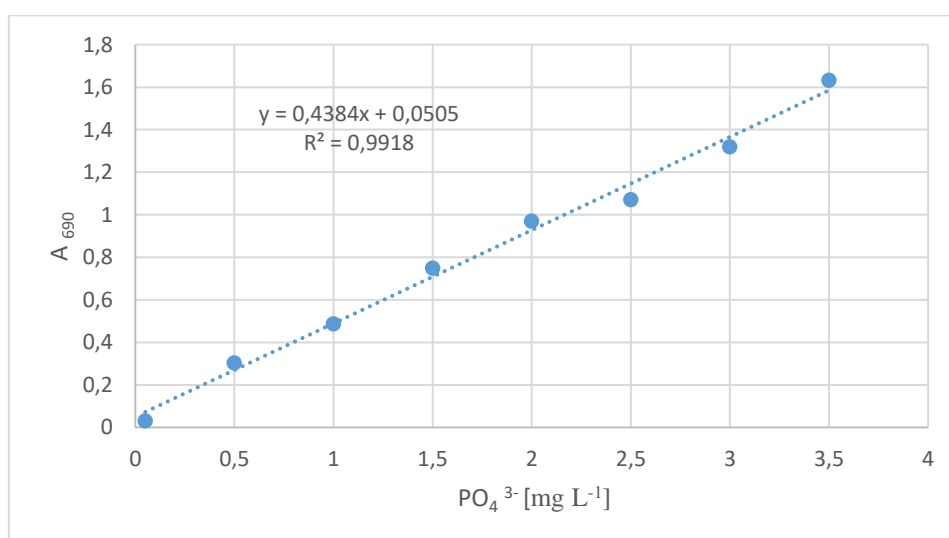
$$\gamma \text{ (g/L)} = \frac{m_2 \text{ (g)} - m_1 \text{ (g)}}{V \text{ (L)}} \quad [2]$$

3.2.6.4. Određivanje koncentracije fosfata

Koncentracija fosfata u uzorcima određivana je pomoću kita (Merck KGaA, Njemačka). Ioni ortofosfata u sumpornoj otopini reagiraju s molibdenovim ionima i daju fosfomolibdensku kiselinu. Istu, askorbinska kiselina reducira u fosfomolibden plavo (PMB) koja daje plavo obojenje, a intenzitet obojenja mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj dužini od 690 nm.

5 mL uzorka dodano je pet kapi reagensa PO₄-1. Nakon miješanja dodana je jedna mikrožličica reagensa PO₄-2. Suspenzija je zatim dobro izmiješana da se reagens potpuno otopi. Nakon 5 minuta potrebnih za reakciju izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm prema slijepoj probi te je izračunata koncentracija fosfatnih iona prema baždarnom pravcu. Slijepa proba sadržavala je demineraliziranu vode umjesto uzorka.

Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem otopine natrijevogdihidrogenfosfata monohidrata koncentracije 1 g L⁻¹ u demineraliziranoj vodi. Koncentracije fosfatnih iona bile su u rasponu od 0,1 do 3,5 mg L⁻¹. Izmjerene su apsorbancije otopina poznatih koncentracija i izrađen je baždarni pravac (slika 8).



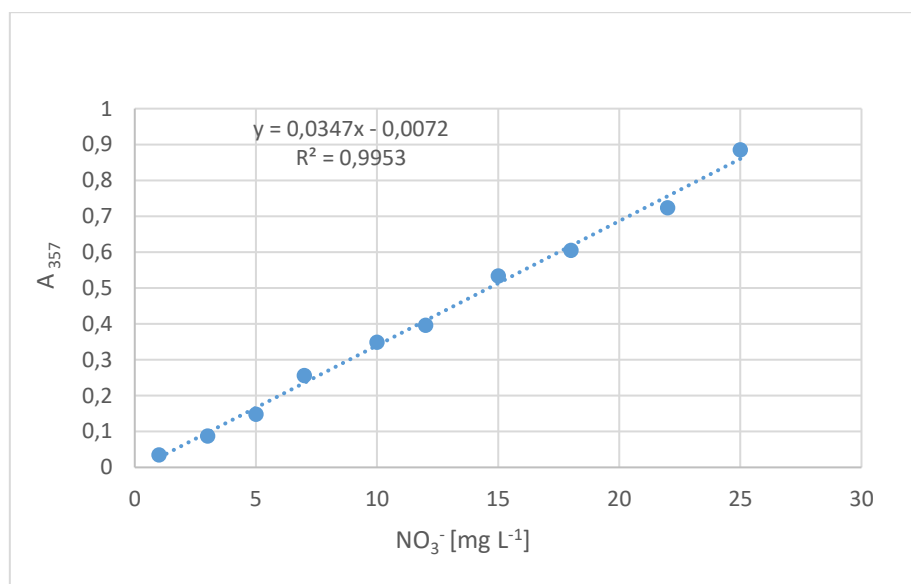
Slika 8. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fosfatnih iona.

3.2.6.5. Određivanje koncentracije nitrata u podlozi

Koncentracija nitrata u uzorcima određivana je pomoću kita (Merck KGaA, Njemačka). U otopini sumporne i fosforne kiseline nitratni ioni reagiraju s 2,6-dimetilfenolom (DMP), pri čemu nastaje 4-nitro-2,6-dimetilfenol čija se koncentracija određuje spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 357 nm.

4 mL reagensa $\text{NO}_3\text{-1}$ dodano je u suhu staklenu epruvetu. Zatim je reagensu dodano 0,5 mL uzorka (5 - 25 °C). Nakon dodatka 0,5 mL reagensa $\text{NO}_3\text{-2}$ sadržaj epruvete je izmiješan. Nakon 10 minuta izmjerena je apsorbancija. Slijepa proba sadržavala je demineraliziranu vodu umjesto uzorka.

Standardi za izradu baždarnog pravca pripremljeni su razrjeđivanjem otopine natrijevog nitrata koncentracije 1 g L^{-1} u demineraliziranoj vodi. Koncentracije dušika bile su u rasponu od 1 do 25 mg L^{-1} . Izmjerene su apsorbancije poznatih koncentracija i izrađen je baždarni pravac (slika 9).



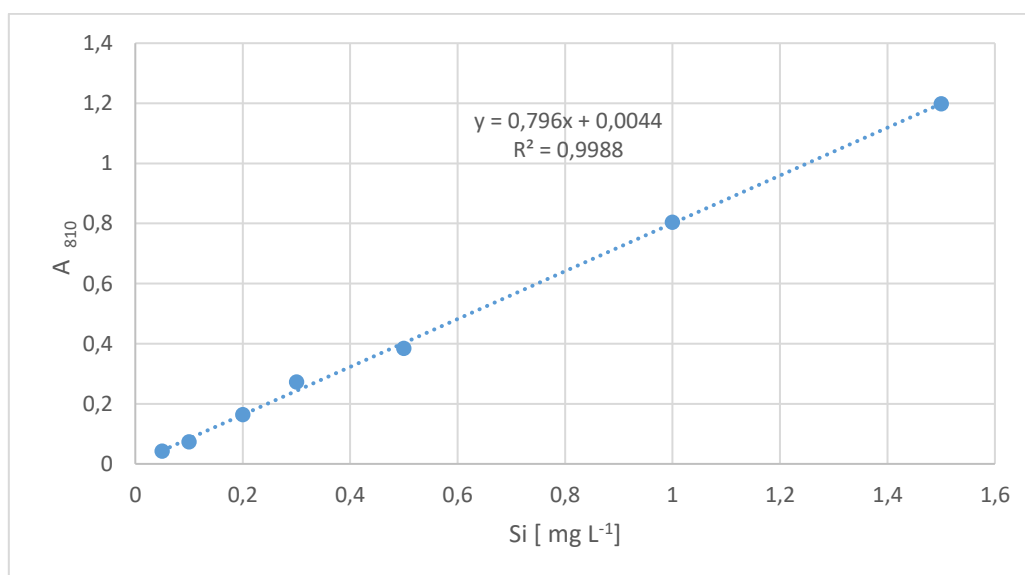
Slika 9. Baždarni pravac za određivanje koncentracije nitrata.

3.2.6.6. Određivanje koncentracije silikata

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 reagensa 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 (slika 10).



Slika 10. Baždarni pravac za određivanje koncentracije silicija.

3.2.6.7. Kiselinska hidroliza biomase algi

U Pirex staklene epruvete odvagano je između 10 i 25 mg prethodno na 50 °C osušene biomase mikroalgi te je dodano 250 µL 72% (w/w) sumporne kiseline. Sadržaj epruvete je polagano miješan kako bi se dobila homogena smjesa biomase dijatomeje u sumpornoj kiselini. Epruvete su inkubirane u termostatu pri 30°C kroz sat vremena, uz miješanje sadržaja svakih 5 - 10 minuta. Nakon sat vremena u epruvete je dodano 7 mL deionizirane vode (koncentracija sumporne kiseline 4 %) te je smjesa pažljivo promiješana. Zatim je smjesa inkubirana sat vremena na 121°C (autoklav). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, iz svake epruvete je uzet alikvot od 3 mL. Alikvotu je podešena pH vrijednost na 5 dodatkom kalcijevog karbonata i

takav uzorak profiltriran je kroz najlonski filter pora veličine 0,22 μm u vijalicu za HPLC analizu.

3.2.6.8. *Određivanje koncentracije monosaharida pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)*

HPLC metodom analizirani su kiselinški hidrolizati biomase mikroalgi. Mobilna faza bila je 0,1% vol/vol otopina H_3PO_4 u redestiliranoj vodi, čija je vodljivost manja od 1 μS . Po 20 μL svakog uzorka injektirano je na kromatografsku kolonu. Temperatura pećnice iznosila je 55 $^\circ\text{C}$, a brzina protoka mobilne faze 0,5 mL min^{-1} . Podaci su analizirani pomoću računalnog programa CLASS-VP verzija 6.10. Jednadžbe baždarnih pravaca prikazuju ovisnost površine ispod krivulje pika (y) o koncentraciji šećera (x) za najzastupljenije monosaharide u hidrolizatima biomase mikroalgi (tablica 13). Sastav ugljikohidrata određivan je prema metodi NREL-a (eng. *National Renewable Energy Laboratory*, USA) (Van Wychen i Laurens, 2013), te su izračunate koncentracije (mg mL^{-1}) pojedinih ugljikohidrata u hidrolizatu biomase mikroalgi. Dobiveni rezultat za svaki monosaharid množen je volumenom hidrolizata biomase (7,25 mL) kako bi se dobila masa šećera izražena u miligramima (mg). Ukupan udio ugljikohidrata u biomasi mikroalgi čini suma svih pojedinih monosaharida.

Tablica 13. Popis monosaharida i odgovarajućih im jednadžbi baždarnih pravaca.

Monosaharid	R_t (min)	Jednadžba pravca
glukoza	13,012	$y=380904x-9253,2$
ksiloza	13,813	$y=368438x-7152,4$

3.2.6.9. *Određivanje udjela proteina*

Količina ukupnih proteina u biomasi mikroalgi određena je metodom po Lowrey-ju (Moheimani i sur., 2013). Metoda se zasniva na Biuret reakciji između Cu^{2+} (u prisustvu baze) i peptidne veze pri čemu nastaje tamno plavo obojenje. Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa, smjesa anorganskih soli reagira s pobočnim lancem tirozina i triptofana što daje plavo - zeleno obojenje.

Za određivanje proteina po Lowry-ju potrebno je oko 100 µg suhe tvari biomase mikroalgi. Prema poznatoj koncentraciji biomase koja je određivana tijekom uzgoja, izračunat je volumen podloge koji sadrži 100 µg suhe tvari biomase mikroalgi (V_{pp}). Dobiveni volumen podloge (V_{pp}) dodan je u plastičnu epruvetu s 0,5 mL vode. Stanice su resuspendirane u tekućini te je dodano 0,5 mL 1 M NaOH. Slijepa proba je sadržavala vodu umjesto podloge. Pripremljena epruveta je začepljena teflonskim čepom te je stavljena u kipuću vodu. Nakon 5 minuta kuhanja sadržaj je ohlađen na sobnu temperaturu te je dodano 2,5 mL otopine C (tablica 14). Nakon 10 minuta uzorku je naglo dodano 0,5 mL otopine D (tablica 14) i sadržaj je promiješan. Epruveta je ostavljena u tami na sobnoj temperaturi kroz 40 minuta. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 550 nm prema slijepoj probi. Prema jednadžbi baždarnog pravca izračunata je masa proteina (m_p). Baždarni pravac definira ovisnost apsorbancije uzorka pri 550 nm (A_{550}) i mase proteina u uzorku: ($y = 2,21498 + 0,05068x$). Udio proteina u suhoj tvari biomase mikroalgi izračuna se prema jednadžbi [3]:

$$\text{Udio proteina u suhoj tvari biomase} = \frac{m_p}{X_{grav} \cdot V_{pp}} \cdot 100 [\%] \quad [3]$$

m_p - masa proteina

X_{grav} - koncentracija biomase (gravimetrijski)

V_{pp} - volumen podloge

Tablica 14. Popis potrebnih otopina za provođenje metode po Lowry-ju.

Otopina A	5 % Na_2CO_3
Otopina B	0,5 % CuSO_4 u 1 % K, Na-tartaratu
Otopina C	pomiješa se otopina A i B u omjeru 50 volumena otopine A na jedan volumen otopine B (prirediti neposredno prije pokusa)
Otopina D	Razrijeđeni Folin-Ciocalteu reagens (u omjeru 1 vol : 1 vol s destiliranom vodom; prirediti neposredno prije pokusa)

3.2.6.10. Određivanje udjela ukupnih lipida

Lipidi iz biomase mikroalgi ekstrahirani su sa smjesom otapala metanol i kloroform prema promijenjenom propisu Bligh i Dyer (1959). Vlažna biomasa mikroalgi najprije je

osušena pri 50°C do konstantne mase i usitnjena u tarioniku. U staklene kivete odvagano je 100 mg biomase te je dodano 4 mL metanola, 2 mL kloroforma i 0,4 mL vode. Sadržaj je potom vorteksiran jednu minutu. Kako bi došlo do razdvajanja faza dodano je još 2 mL kloroforma i 2 mL vode te je ponovljeno vorteksiranje kroz jednu minutu. Ekstrahirana je biomasa mikroalgi uklonjena filtriranjem kroz sinter lijevak. Filtrat je izdvojen u čistu epruvetu, a preostala je biomasa algi zaostala na filteru vraćena u staklenu kivetu te je ponovljena ekstrakcija, ali sa smjesom metanola i kloroforma u omjeru 1:1. Ponovljena je filtracija kroz sinter lijevak da bi se izdvojila biomasa, a dobiveni filtrat pridodan je prethodnom. Nakon razdvajanja faza, donja kloroformska faza izdvojena je staklenom špricom s dugačkom iglom i prenesena u prethodno izvaganu epruvetu. Propuhivanjem s plinovitim dušikom uklonjen je kloroform, a zatim su lipidi dodatno osušeni na 100 °C kroz 1 sat da bi se iz uzorka uklonili eventualni tragovi vode zaostali u kloroformskoj fazi. Osušene epruvete su potom izvagane i udio lipida u biomasi mikroalgi izračunat je prema jednadžbi [4].

$$w_L = (m_{oe} - m_{pe}) / (m_x (1 - w_{H_2O/x})) \times 100 \quad [\%] \quad [4]$$

m_{oe} -mase osušene epruvete s lipidima;

m_{pe} -mase prazne suhe epruvete;

m_x - masa biomase algi korigirana za sadržaj vlage ($w_{H_2O/X}$)

3.2.6.11. Određivanje sastava masnih kiselina

Sadržaj pojedinih masnih kiselina u lipidima uzgajane dijatomeje određen je plinskom kromatografijom. Prije analize masne kiseline u uzorku potrebno je prevesti u metilne estere reakcijom transesterifikacije. Metil esteri masnih kiselina pripremljeni su prema NREL metodi za određivanje ukupnih lipida kao metilnih estera masnih kiselina *in situ* postupkom transesterifikacije (Wyche i Laurens, 2013).

Najprije su pripremljene otopine surogat standarada i internog standarda. Kao surogat standard korišten je metil tridekanoat (C13:0ME) koncentracije 10 mg/mL. Otopina je pripremljena otapanjem 100 mg metil tridekanoata (C13: 0ME) u 10 mL heksana. Za pripremu internog standarda u staklenu vialu izvagano je 10 mg pentadekana koji je potom otopljen u 1 mL heksana. Prije dodatka u uzorke, pripremljeni interni standard razrijeđen je s heksanom u omjeru 1:10. Do njihove primjene, otopine standarda čuvaju se na -20 °C u staklenim vialama

zatvorenim PTFE / silikon / PTFE poklopcem s navojem kako bi se spriječilo isparavanje i time promjena koncentracije standarda u otopinama.

Priprema uzoraka za proces transesterifikacije započinje vaganjem 5-10 mg biomase mikroalgi prethodno osušene na 50 °C preko noći u staklene vialice. U epruvetu s izvaganom biomasom dodano je 20 µL prethodno pripremljenog surogat standarda C13: OME (10 mg mL⁻¹), 200 µL otopine kloroform: metanol (2:1, v v⁻¹) i 300 µL otopine 0,6M HCl : metanol. Reakcijska smjesa je dobro izmiješana vorteksiranjem te su uzorci stavljani u vodenu kupelj na 85 °C kroz sat vremena radi provođenja reakcije transesterifikacije. Istekom vremena reakcije uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu kroz 15 minuta, nakon čega je uzorku dodano 1,0 mL heksana. Sadržaj je dobro izmiješan vorteksiranjem te su uzorci ostavljeni na sobnoj temperaturi do razdvajanja dviju faza (1 - 4 sata). Donja kloroformska faza je odbačena, a gornja heksanska faza koja sadrži estere masnih kiselina izdvojena pomoću staklene šprice s dugačkom iglom i pohranjena u čiste staklene vijalice radi daljnje analize. Prije analize plinskom kromatografijom uzorci su razrijeđeni 10 puta. U 450 µL heksana dodano je 50 µL gornje heksanske faze te je takvim uzorcima dodano 12,5 µL prethodno pripremljenog internog standarda pentadekana. Uzorci su analizirani na plinskom kromatografu GC - 2010 Plus (Shimadzu, Japan) opremljenim masenim detektorom (FID). Uvjeti rada plinskog kromatografa prikazani su u tablici 15. Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedinih masnih kiselina s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4 - C24) analiziranih u istim uvjetima. Sastav metilnih estera masnih kiselina u ukupnim lipidima izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u uzorku.

Za izračunavanje ukupnog udjela lipida u biomasi mikroalgi izraženih kao FAME (eng. *Fatty Acid Methyl Esters*), primijenjene su jednadžbe [5] i [6].

$$\text{Total FAME}_{\text{C13 norm.}} = \sum \frac{\text{koncentracija ukupnih masnih kiselina}}{\text{koncentracija C13 standarda}} \times \text{konc. standarda C13 (dodanog u reakcijsku smjesu)} \quad [5]$$

$$\text{TOTAL FAME (\%)} = \frac{\text{Total FAME}_{\text{C13 norm.}}}{\text{masa uzorka}} \times 100 \quad [6]$$

Tablica 15. Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju.

Kolona	Kapilarna kolona ZB-FAME (Zebron), 30 m x 0,25 mm debljina filma 0,20 μm , stacionarna faza: cijanopropil-silikon
Detektor	FID
Temperatura injektora	250 $^{\circ}\text{C}$
Temperaturni program	100 $^{\circ}\text{C}$ uz zadržavanje 2 min; 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do 140 $^{\circ}\text{C}$; 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do 190 $^{\circ}\text{C}$; 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ do 260 $^{\circ}\text{C}$ uz zadržavanje 2 min
Plin nosač i protok	Helij, 1,2 mL min^{-1}
Parametri FID	Helij (30 mL min^{-1}), dušik (40 mL min^{-1}), kisik (400 mL min^{-1})
Omjer razdijeljenja	1:15
Temperatura detektora	260 $^{\circ}\text{C}$
Količina injektiranog uzorka	2 μL

3.2.6.12. Ekstrakcija pigmenata

Ekstrakcija pigmenata iz vlažne biomase dijatomeje provedena je 90 % - tnom acetonom. Ekstrakcija je provedena u plastičnim epruветama od 15 mL omotanim aluminijskom folijom kako bi se spriječio raspad fotosenzibilnih pigmenata uslijed izlaganja svjetlosti. Alikvot podloge od 14 mL je centrifugiran i supernatant je dekantiran. Izdvojenoj biomasi dodano je 4 g staklenih kuglica (mehaničko razbijanje stanične stijenke) i 2 mL 90 % - tnog acetona. Sadržaj je dva do tri puta miješan na vrtložnoj mješalici pri maksimalnoj brzini rotacije u trajanju od 30 sekundi, a zatim hlađen na ledu da bi se spriječila degradacija pigmenata. Suspenzija je centrifugirana na 5000 min^{-1} deset minuta. Dobiveni supernatant koji je sadržavao ekstrahirane pigmente dekantiran je u plastičnu epruветu, a preostala je biomasa ponovno podvrgnuta postupku ekstrakcije. Ekstrakcija se ponavljala do potpunog obezbojenja biomase dijatomeje, a supernatanti dobiveni nakon svakog koraka ekstrakcije pridodani su supernatantu dobivenom nakon prvog koraka ekstrakcije.

3.2.6.13. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije klorofila a i c

Nakon ekstrakcije pigmenata iz biomase dijatomeje koncentracija pigmenata klorofila određena je spektrofotometrijski prema metodi Jeffrey i Humphrey-a (1975). Izmjerena je apsorbanacija pri valnim duljinama od 630 nm, 647 nm, 664 nm i 750 nm te je snimljen apsorpcijski spektar pri valnim duljinama od 350 do 750 nm. Koncentracija klorofila određena je pomoću jednadžbi [7] i [8].

$$\text{Klorofil a} = (11.85x (\text{OD}_{664}-\text{OD}_{750})-1.54x (\text{OD}_{647}-\text{OD}_{750})-0.08(\text{OD}_{630}-\text{OD}_{750}))x V_e/\alpha x V_f$$

[7]

$$\text{Klorofil } c_1+c_2 = (1,67x (\text{OD}_{664}-\text{OD}_{750})+7,6x (\text{OD}_{647}-\text{OD}_{750})-24,52x (\text{OD}_{630}-\text{OD}_{750})) x V_e/\alpha x V_f$$

[8]

3.2.6.14. Razdvajanje pigmenata pomoću tankoslojne kromatografije (TLC)

Tankoslojna kromatografija (TLC) se temelji na različitom afinitetu analita prema adsorpcijskom materijalu (stacionarnoj fazi). Analit se nanos na staklenu, aluminijsku ili plastičnu ploču na kojoj se nalazi sloj silikagela (stacionarna faza). Komponente uzorka gibaju se različitim brzinama nošene mobilnom fazom kroz stacionarnu fazu.

Za razdvajanje pigmenata ekstrahiranih iz mikroalge, korištene su aluminijske ploče s nanesenim slojem silikagela 60 F₂₅₄ kao adsorbensom. Nakon ekstrakcije 90 % acetonom iz biomase mikroalgi, dobivenim ekstraktima dodan je jednaki volumen dietil etera. Sadržaj je miješan na vrtložnoj mješalici te stavljen u led do razdvajanja faza. Donja faza je potom izvučena pomoću šprice i dugačke igle te je odbačena. U preostalu gornju fazu dodana je mala količina kristala NaCl-a kako bi se maksimalno uklonila zaostala količina vode te je uzorak profiltriran kroz sloj vate postavljene u nastavku za mikropipetu (1 mL). Kako bi se ekstrakt koncentrirao, uparen je na polovicu volumena (oko 500 µL) u struji inertnog dušika. Ukupno 4 µL ekstrakta nanoseno je postepeno (4 x 1 µL) na početnu liniju, na udaljenosti oko 1,5 cm od donjeg ruba ploče. Nakon isparavanja otapala, ploča za tankoslojnu kromatografiju je stavljena u kadicu za razvijanje u kojoj je prethodno dodana mobilna faza. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala petrol etera i acetona u omjeru 7:3 (vol:vol). Kromatografija se odvijala u

tami sve dok fronta mobilne faze nije došla na udaljenost oko 1 cm od gornjeg ruba ploče (5 - 10 minuta). Ploča je potom izvađena iz kadice, a grafitnom olovkom zabilježena je fronta otapala i označene su pozicije pojedinih bendova. Izmjerena je udaljenost pojedinog benda od fronte otapala na temelju čega je izračunat retencijski faktor prema jednadžbi [9].

$$R_f = \frac{\text{udaljenost koju je prešao sastojak}}{\text{udaljenost koju je prošla fronta otapala}} = \frac{X}{X_0} \quad [9]$$

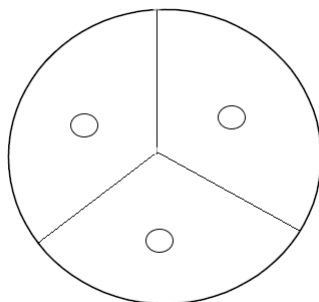
3.2.6.15. Priprema ekstrakata biomase dijatomeja za određivanje antimikrobne aktivnosti

Za pripremu ekstrakata dijatomeja korištena su četiri otapala: voda, metanol, kloroform i heksan. U staklene epruvete izvavano je oko 100 mg biomase prethodno osušene na 50 °C mikroalgi te su epruvete omotane aluminijskom folijom kako bi se spriječio raspad fotosenzibilnih spojeva uslijed izlaganja svjetlosti tijekom ekstrakcije. Zatim je u svaku epruvetu dodano 2 mL otapala (četiri epruvete s četiri različita otapala). Sadržaj svake epruvete je dva do tri puta naizmjenično pomiješan na vrtložnoj mješalici kroz 30 sekundi uz hlađenje u ledu. Ekstrakti su filtrirani te potom upareni na polovicu početnog volumena (oko 500 µL) u struji dušika. Takvi koncentrirani ekstrakti korišteni su za istraživanje antimikrobnog djelovanja.

3.2.6.16. Istraživanje antimikrobnog djelovanja difuzijskom metodom

Difuzijska metoda temelji se na difuziji antimikrobne tvari iz uzorka u krutu hranjivu podlogu koja je inokulirana kulturom test-mikroorganizama. Oko mjesta nanešenog uzorka, nakon određenog vremena inkubacije može se uočiti kružna prozirna zona, bez rasta mikroorganizama, koja je mjera inhibicije rasta test-mikroorganizma.

U istraživanju antimikrobnog djelovanja ekstrakata dijatomeje korišteni su sljedeći test-mikroorganizmi: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Candida utilis* i *Aspergillus niger*. Pripremljena je prekonoćna kultura test-mikroorganizama te je 100 µL te kulture nacijepljeno na površinu odgovarajuće krute hranjive podloge pomoću sterilnog štapića po Drigalskom. Po 20 µL ekstrakta dobivenog u prethodnom koraku (poglavlje 3.2.6.15.) naneseo je na sterilni filter-disk koji je potom nanesen na površinu ploče inokulirane test-mikroorganizmom (slika 11). Osim pripremljenih ekstrakata, za svaki test-mikroorganizam napravljena je pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola korišten je antibiotik, kloramfenikol (50 mg mL⁻¹) za bakterijske kulture i nistatin (50 mg mL⁻¹) za plijesni, a kao negativna kontrola čista otapala: voda, heksan, metanol i kloroform. Petrijeve ploče su inkubirane na 30°C preko noći nakon čega su izmjerene zone inhibicije.



Slika 11. Petrijeva zdjelica s tri filter-diska.

3.2.6.17. Određivanje udjela mineralnih tvari

Lončići za spaljivanje biomase prethodno su žareni u mufolnoj peći na temperaturi od 600 °C do konstantne mase, ohlađeni kroz 1 sat u eksikatoru i izvagani. U pripremljene lončice izvagana je liofilizirana masa biomase ($\pm 0,01$ g). Uzorci su polagano zagrijavani preko Bunsenovog plamenika, dok se biomasa potpuno karbonizirala. Nakon toga se uzorci stavljaju u mufolnu peć, koja je prethodno zagrijana na 550 °C i ostave se sve dok se ne dobije bijeli ili blijedo-zeleni pepeo. Ako je ostatak u lončićima crne boje, potrebno ga je navlažiti s malom količinom vode da bi se razgradile soli, staviti u sušionik i ponovno spaliti. Po završetku spaljivanja lončići se stavljaju u eksikator na hlađenje. Tek nakon potpunog hlađenja, lončići se važu s točnošću od $\pm 0,1$ mg te se izračunava udio mineralnih tvari prema formuli [10].

$$\text{Udio mineralne tvari} = \left(\frac{m_{\text{uzorka nakon spaljivanja u mufolnoj peći}} - m_{\text{lončića}}}{m_{\text{uzorka nakon spaljivanja na plameniku}} - m_{\text{lončića}}} \right) \times 100 \quad [10]$$

3.2.6.18. Izračunavanje uspješnosti bioprocesa

1. Specifična brzina rasta (μ)

$$X = X_0 \times e^{\mu \Delta t}$$

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

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

Δt -interval vremena ($\Delta t = t_n - t_0$)

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} * \ln \frac{X}{X_0} [\text{h}^{-1}]$$

2. Produktivnost sinteze lipida (Pr_L)

$$\text{Pr}_L = \frac{w_L * X}{t_u} [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$$

w_L - udio lipida u biomasi (%)

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

t_u - trajanje uzgoja

3. Produktivnost sinteze biomase (Pr_{XBL})

$$\text{Pr}_{XBL} = \frac{X_{BL}}{t_u} [\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}]$$

X_{BL} -koncentracija biomase bez lipida na kraju uzgoja [g L^{-1}]

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je već ranije navedeno, dijatomeje su većinom fotosintetski mikroorganizmi sposobni za brzu prilagodbu u novom okruženju. Imaju veliki kapacitet proizvodnje lipida i stope fiksacije CO₂. Mogu rasti u prisutnosti visokih koncentracija CO₂, pa se za njihov rast koriste plinovi dobiveni iz industrijskih pogona i termoelektrana. Uz to, sposobne su rasti u onečišćenim vodama kao što su komunalne, industrijske ili poljoprivredne otpadne vode. Uklanjaju prisutan dušik i fosfor iz otpadnih voda, koristeći ga za rast (Lee i sur., 2015). Osim toga, mikroalgalna biomasa može se koristiti za proizvodnju goriva, kao što su biodizel, bioetanol i bioplin.

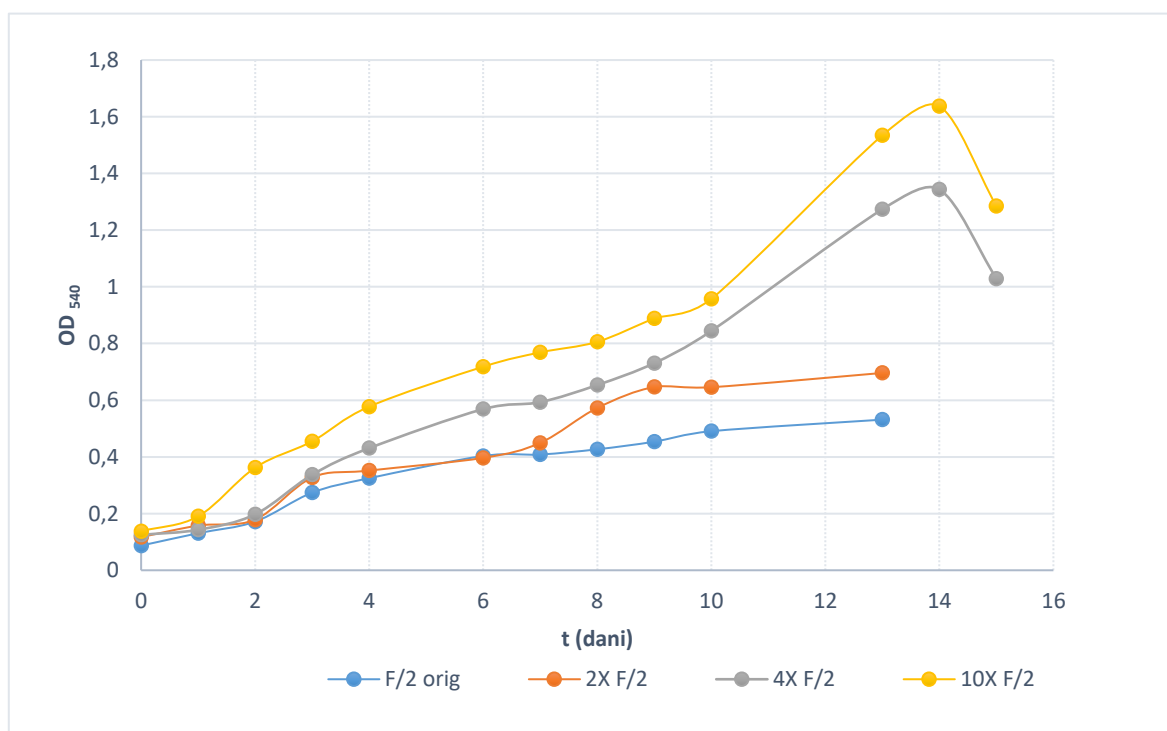
Kao radni mikroorganizam u ovom je radu korištena dijatomeja, soj 5.4., izolirana s područja Šibenika (43.7264° geografske širine i 15.8419° geografske dužine) u ožujku 2018. godine. Uzgoj inokuluma prikazan je u poglavlju 3.2.1., nakon čega je istražen rasta dijatomeja na podlogama različitog sastava. Korištena je f/2 podloga izvorne koncentracije nutrijenata te još tri podloge u kojima su koncentracije soli i vitamina dva, četiri i deset puta veće od njihove koncentracije u f/2 podlozi. Sastav korištenih podloga za fototrofni uzgoj dijatomeje naveden je u poglavlju 3.1.4.2. Uzgoj je proveden u Erlenmeyerovim tikvicama od 500 mL s odbijačima vrtloga. Tijekom uzgoja izuzimani su uzorci te je određivana optička gustoća i broj stanica u Thomaovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se odredila optimalna podloga za fototrofni uzgoj u biorekatoru.

4.1. OPTIMIZACIJA f/2 PODLOGE ZA FOTOTROFNI UZGOJ U TIKVICAMA

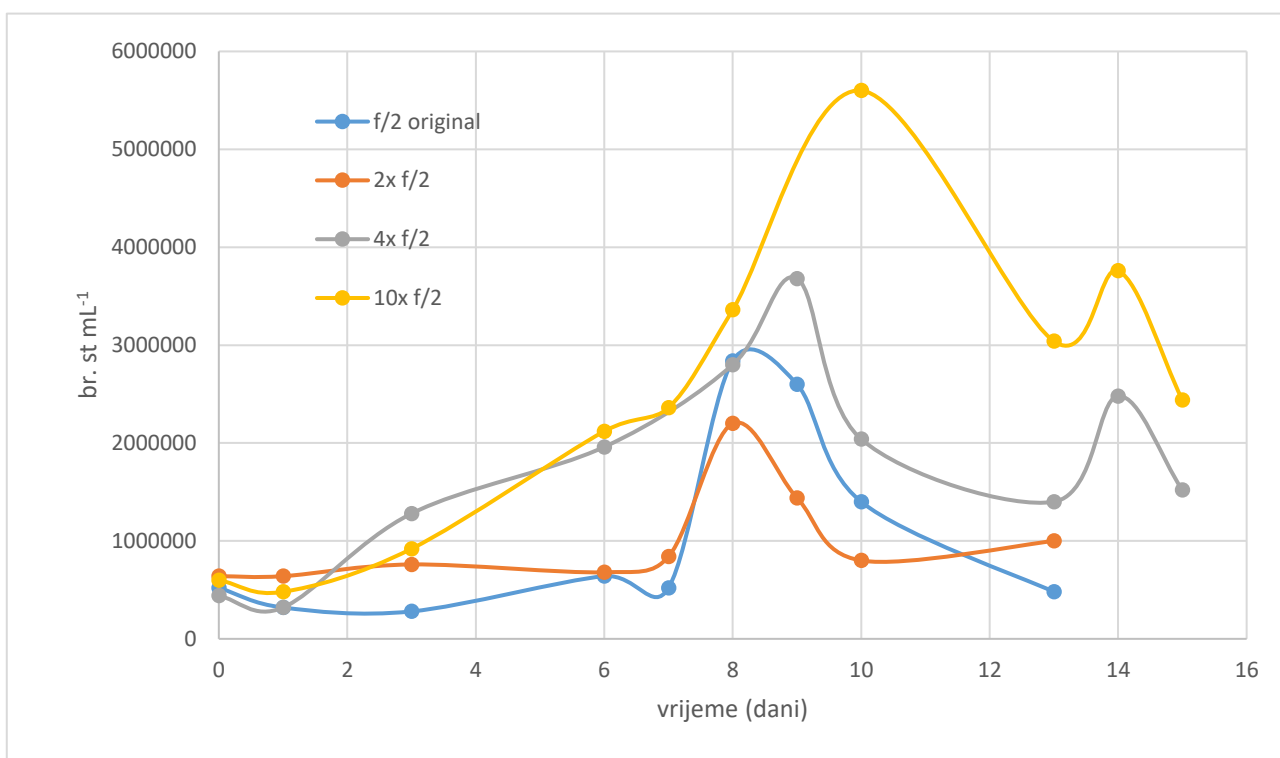
Na slici 12 prikazana je promjena optičke gustoće tijekom uzgoja u sve četiri podloge. Kinetika rasta dijatomeje pratila se određivanjem optičke gustoće kulture i promjenom broja stanica tijekom vremena. Općenito, rast se mikroalgi može podijeliti u šest faza: lag faza, eksponencijalna faza, linearna faza, faza usporenog rasta, stacionarna faza i faza odumiranja (Lee i sur., 2015). Iz krivulja rasta prikazanih na slici 12 mogu se prepoznati pojedine faze rasta. Prva je lag fazi rasta u kojoj je rast odgođen zbog prilagodbe kulture na nove uvjete (Lee i sur., 2015). Lag faza rasta je bila najkraća kod uzgoja u f/2 podlozi koncentriranoj 10 puta gdje je već nakon 24 sata uzgoja kultura ušla u eksponencijalnu fazu. U slučaju ostalih podloga lag

faza trajala je oko 48 sati, nakon čega je kultura također ušla u eksponencijalnu fazu rasta. Prema literaturi, tijekom eksponencijalne faze, intenzitet svjetlosti i hranjivih sastojaka ne ograničavaju rast mikroalgi. U fazi je linearnog rasta, u kojoj količina svjetlosti postaje ograničavajuća, dioba stanica mikroalgi usporena te se biomasa istih akumulira konstantnom brzinom sve dok hranjive tvari ili inhibitori u mediju ne postanu ograničavajući čimbenici (Lee i sur., 2015). Daljnjim iscrpljivanjem nutrijenata iz podloge i nakupljanjem inhibitora kultura ulazi u fazu usporenog rasta, a potom u stacionarnu fazu rasta kada je brzina rasta jednaka nuli (Lee i sur., 2015). Na krivuljama rasta za uzgoj na originalnoj f/2 i dvostruko koncentriranoj f/2 podlozi može se primijetiti stacionarna faza rasta koja je trajala od 9. do 13. dana uzgoja. Prije ulaska u fazu odumiranja, uzgoj je zaustavljen i izdvojena je biomasa za daljnje analize. Kod uzgoja na četiri i deset puta koncentriranoj f/2 podlozi, stacionarna faza nije vidljiva na krivulji rasta, nego se može primijetiti faza odumiranja koja je nastupila u 24 sata, od 14. do 15. dana. Tijekom faze odumiranja koncentracija stanica drastično opada, najčešće uslijed potrošnje nutrijenata, promjene pH kulture, pregrijavanja, oslobađanja inhibitornih supstanci tijekom odumiranja stanica, kontaminacije itd. (Lee i sur., 2015). Nakon primjetnog ulaska kulture u fazu odumiranja uzgoj je prekinut i biomasa je izdvojena za daljnje analize.

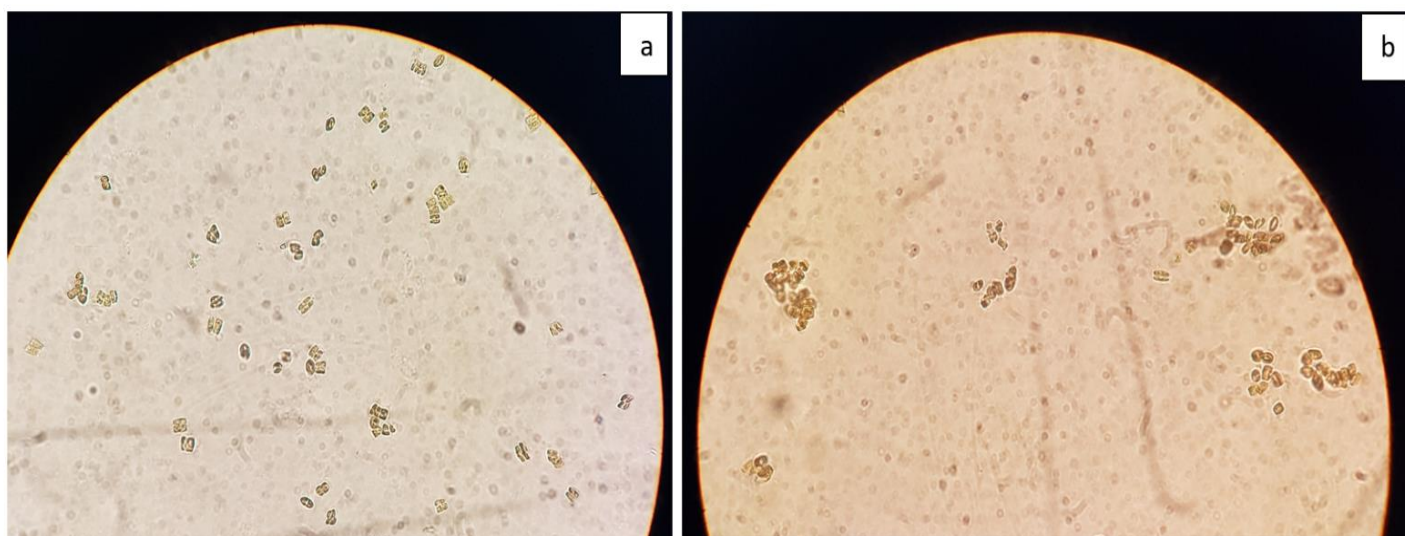
Slika 12. Promjena OD₅₄₀ tijekom uzgoja soja 5.4. na f/2 podlogama s različitim koncentracijama nutrijenata.



Na slici 13 prikazana je promjena broja stanica tijekom uzgoja. Broj stanica po mililitru određen je brojanjem stanica u Thomaovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Promatrajući slike 12 i 13 možemo vidjeti kako krivulja koja pokazuje promjenu broja stanica djelomično prati krivulju promjene optičke gustoće kulture tijekom uzgoja. Naime, ova dijatomeja pokazuje tendenciju rasta u nakupinama (slika 14 b) što je otežalo precizno određivanje broja stanica brojanjem u Thomaovoj komorici. Naime, za dijatomeje je karakteristično izlučivanje ekstracelularnih polisaharida koji čine matriks s pomoću kojeg su dijatomeje u prirodnom okruženju u bliskom kontaktu i interakciji s bakterijama. Ekstracelularni polisaharidni matriks uglavnom je sastavljen od šećera arabinoze, fruktoze, ksiloze, manoze, galaktoze koji mogu poslužiti heterotrofnim mikroorganizmima odnosno bakterijama kao izvor ugljika, dok dijatomeje pak koriste dušik koji fiksiraju bakterije (Bruckner i sur, 2008). Kako bi određivanje broja stanica, ali i određivanje optičke gustoće stanica bilo točnije, u daljnjim eksperimentima izuzeti volumen kulture je prije analiza podvrgnut ultrazvučnom tretmanu tijekom 20-ak sekundi što je rezultiralo razbijanjem nakupine stanica (slika 14 a). Usporedbom grafova na slikama 12 i 13 vidljivo je kako su s porastom koncentracije nutrijenata u podlozi postignute veće vrijednosti i optičke gustoće i broja stanica po mililitru, te su tako najviše vrijednosti postignute kod deset puta koncentrirane f/2 podloge.



Slika 13. Promjena broja stanica tijekom uzgoja soja 5.4. na f/2 podlogama s različitim koncentracijama nutrijenata.



Slika 14. a) pojedinačni rast dijatomeja, b) rast dijatomeja u nakupinama (vlastite fotografije).

Tablica 16. Koncentracija glavnih nutrijenata: silicija, dušika i fosfora na kraju i na početku uzgoja.

Hranjiva podloga	Koncentracija (mg L ⁻¹)					
	Si		NO ₃ -N		PO ₄ -P	
	Na početku	Na kraju uzgoja	Na početku	Na kraju uzgoja	Na početku	Na kraju uzgoja
f/2 original	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	/

U tablici 16 prikazan je sadržaj glavnih nutrijenata na kraju i na početku uzgoja u f/2 podlogama s različitim koncentracijama nutrijenata. Koncentracije preostalih nutrijenata u f/2 originalnoj podlozi upućuju na limitaciju silicijem i fosfatom u pojedinim ispitivanim podlogama te suvišak dušika u sve 4 varijacije f/2 podloge. Koncentracija preostalog fosfora u podlogama f/2 original i f/2 koncentrirana 10 puta bila je preniska za detekciju dostupnom metodom određivanja koncentracije fosfora (poglavlje 3.2.6.4.) odnosno bila je ispod 0,1 mg L⁻¹. Osim toga, kod f/2 originalne podloge silicij je preostao u vrlo niskoj koncentraciji. Kako stanice dijatomeja nemaju rezerve silicija koji bi stanice mogle koristiti, tijekom limitacije rasta silicijem otežano je formiranje ljušturice i dioba stanica (Martin-Jézéquel i sur., 2000).

Limitacija fosforom i silicijem u originalnoj f/2 podlozi moguće je i objašnjenje za nepotpun utrošak dušika kojeg je preostalo u koncentraciji od 2,39 mg L⁻¹. Limitaciju fosforom potvrđuje i potrošnja dušika kod f/2 podloge dvostruko koncentrirane gdje je utrošeno dvostruko više dušika, a fosfora je i dalje preostalo u podlozi. Naime, ukupni utrošak dušika u originalnoj f/2 podlozi iznosi 9,974 mg L⁻¹, a u f/2 koncentriranoj dva puta 22,226 mg L⁻¹. Budući da je koncentracija preostalog silicija i u dva puta koncentriranoj f/2 podlozi vrlo niska (0,027 mg L⁻¹), limitacija rasta silicijem mogući je razlog nepotpunog utroška dušika. Kod svih f/2 podloga s različitim koncentracijama nutrijenata, postotak utroška dušika u odnosu na njegovu početnu koncentraciju iznosio je u prosjeku 20 % (18 % f/2 original; 2x f/2 20 %; f/2 4x 21 %; f/2 10x 20 %). Postotak utroška silicija u odnosu na početnu koncentraciju silicija iznosio je 98,66 % za originalnu f/2 podlogu, 99,55 % za dvostruko koncentriranu f/2, 95,07 % za 4x f/2, dok je za 10x f/2 bio najmanji i iznosi 88,24 %. Nepotpuni utrošak silicija i dušika može se objasniti limitacijom fosforom čija je koncentracija bila preniska za kvantifikaciju. Zbog visoke koncentracije soli u f/2 podlozi koncentriranoj deset puta, kod pripreme podloge došlo je do taloženje soli na dnu tikvice čime je dio nutrijenata postao nedostupan mikroorganizmu za rast. To je i dodatno objašnjenje za niži utrošak silicija u ovoj podlozi.

U tablici 17 prikazane su dobivene koncentracije biomase i izračunate specifične brzine rasta. Najveća brzina rasta stanica od 0,3709 dan⁻¹ kao i najveća koncentracija biomase od 0,47 g L⁻¹, određene su u podlozi u kojoj je koncentracija minerala i vitamina bila deset puta veća od originalne f/2 podloge. Dobivene rezultate potvrđuju i slike 12 i 13, gdje je vidljiv najveći rast broja stanica po mililitru i najveći OD₅₄₀. Najniže koncentracije biomase od 0,19 g L⁻¹ i 0,24 g L⁻¹ postignute su u originalnoj f/2 i 2x f/2 podlozi, što bi se moglo objasniti upravo limitacijom silicijem koji je potreban za formiranje silicijske ljušturice karakteristične za dijatomeje i neophodan je za dijeljenje i rast stanice. Iako je postignuta koncentracija biomase od 0,27 g L⁻¹ niža od one u 10x f/2, četverostruko koncentrirana f/2 podloga odabrana je kao optimalna za uzgoj u bioreaktoru. Iz koncentracija preostalih nutrijenata vidljivo je kako je kod te podloge preostalo još silicija, fosfora i dušika, a tijekom pripreme podloge nije došlo do taloženja nekih od soli kao kod 10x f/2. Također, kod 10x f/2 koncentracija biomase nije se povećala proporcionalno količini nutrijenata. Na temelju ovih rezultata i nedostataka koji su utvrđeni za 10x f/2 podlogu, kao optimalna podloga odabrana je ona s koncentracijom minerala i vitamina četiri puta većom od originalne f/2 podloge.

Tablica 17. Koncentracija biomase i specifična brzina rasta u različitim f/2 podlogama.

Podloga	Koncentracija biomase (g L ⁻¹)	μ (dan ⁻¹)
f/2 original	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

4.2. UZGOJ U FOTOBIOREAKTORU

Nakon provedenog uzgoja u tikvicama i određivanja optimalne podloge za rast dijatomeja, započet je uzgoj u staklenom bioreaktoru s mješalom. Bioreaktor je opremljen izvorom svjetlosti (Tween light LED Fiexband, 1200 L m⁻¹, toplo bijela svjetlost 3000 K, duljina 10 m) kako bi bio pogodan za fototrofni uzgoj. Uzgoj je proveden na f/2 podlozi s koncentracijom soli i vitamina četiri puta većoj od originalne podloge. Početni volumen podloge iznosio je 1,6 L. Podloga je naciyepljena s 200 mL inokuluma pripremljenog na način opisan u Poglavlju 3.2.2. Uzgoj se provodio pri 22 °C , pH \approx 7.4 te na 200 rpm, uz umjetni izvor toplo-bijele svjetlosti (LED lampice) uz režim dvanaest sati u tami i dvanaest sati uz svjetlo. Uzgoj u fotobioreaktoru vođen je šaržno do ulaska kulture u stacionarnu fazu rasta, nakon čega je započet polukontinuirani način uzgoja kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.2.

Kinetika rasta tijekom uzgoja u fotobioreaktoru praćena je izuzimanjem uzoraka svakih 24 sata kojima je potom određena optička gustoća, koncentracija stanica gravimetrijom, broj stanica po mililitru te koncentracija limitirajućih supstrata potrebnih za rast (N, P i Si). Cilj uzgoja bio je pratiti promjenu sastava biomase (ugljikohidrata, proteina, lipida i pigmenata) i profila masnih kiselina. Literatura navodi kako je jedan od glavnih mehanizama usmjeravanja metabolizma na nakupljanje rezervnih materijala stanice, u slučaju mikroalgi lipida, upravo limitacija dušikom (Mohan i sur., 2012, Levitan i sur., 2015). No, limitacija ili pak uvjeti suviška dušika uvelike utječu i na profil masnih kiselina u mikroalgi. U literaturi se navodi kako limitacija dušikom potiče nakupljanje lipida u stanicama dijatomeja koje su bogatije zasićenim masnim kiselinama. Suprotno tome, uvjeti suviška dušika dovode do nižih udjela lipida u

sastavu biomase, ali su ti lipidi bogatiji na nezasićenim masnim kiselinama (Yang i sur., 2013). Morske dijatomeje posebice se ističu visokim udjelima višestruko nezasićenih masnih kiselina EPA, ARA i DHA. Koncentracija dušika dostupna u podlozi za rast također utječe na njihove udjele u ukupnim masnim kiselinama. Suvišak dušika predstavlja povoljne uvjete za rast dijatomeja, što se vidi i iz većih postignutih koncentracija biomase u odnosu na uvjete limitacije dušika. Osim toga, ti povoljni uvjeti za rast također potiču na sintezu poli nezasićenih masnih kiselina i pogoduju višim udjelima masnih kiselina EPA, DHA i ARA u ukupnim masnim kiselinama (Yang i sur., 2013). Limitacija dušikom preusmjerava metabolizam na nakupljanje zasićenih masnih kiselina za čiju je sintezu potreban manji utrošak energije i posljedično tome udio nezasićenih masnih kiselina, a time i visokovrijednih poli nezasićenih masnih kiselina (EPA, ARA, DHA) u ukupnim masnim kiselinama je manji. To potvrđuju i rezultati istraživanja iz prethodnih eksperimenata s istim sojem dijatomeja 5.4. Pokazano je da je povećanje koncentracije dušika za 50 % više od originalne podloge rezultiralo povećanjem nezasićenih masnih kiselina sa 58,41 % na 65,23% i povećanje udjela EPA s 3,90 % na 7,98 % u usporedbi s originalnom f/2 podlogom (Grubišić i sur., 2018).

Na slici 15 prikazana je kinetika rasta tijekom uzgoja u fotobioreaktoru. Kao što je vidljivo iz grafa šaržni je uzgoj trajao sedam dana. Iz krivulje rasta može se primijetiti izostanak lag faze rasta. Budući da dijatomeje relativno sporo rastu, odnosno vrijeme udvostručenja je od 15 do 17 sati (d'Ippolito i sur., 2015), bilo je u cilju izbjeći dugu logaritamsku fazu rasta. To je napravljeno na način da je priređen koncentrirani inokulum kao što je opisano u poglavlju 3.2.2. Biomasa u eksponencijalnoj fazi rasta iz jedne je litre podloge koncentrirana centrifugiranjem i njome su inokulirane dvije litre podloge u bioreaktoru. Time je početna koncentracija biomase u bioreaktoru bila značajno veća, stoga je i faza prilagodbe bila vrlo kratka, a kultura je vrlo brzo ušla u eksponencijalnu fazu rasta koja je trajala do četvrtog dana uzgoja. Zatim je uslijedila stacionarna faza do šestog dana uzgoja. Sedmog dana uzgoja dodana je prihrana koncentriranom podlogom koja je pripremljena kao što je opisano u poglavlju 3.2.4.2. U supernatantu je najprije određena koncentracija dušika kako bi se ona prihranom približno podesila na onu koja je u 4x f/2 podlozi. Ostali nutrijenti su dodani u onoj koncentraciji kako bi se u preostalom mediju u fotobioreaktoru postigla koncentracija koja odgovara koncentraciji u originalnom f/2 mediju (poglavlje 3.1.4.3.). S tim ciljem, u fotobioreaktor je dodano 200 mL svježije koncentrirane hranjive podloge te je time započeo polukontinuirani uzgoj.

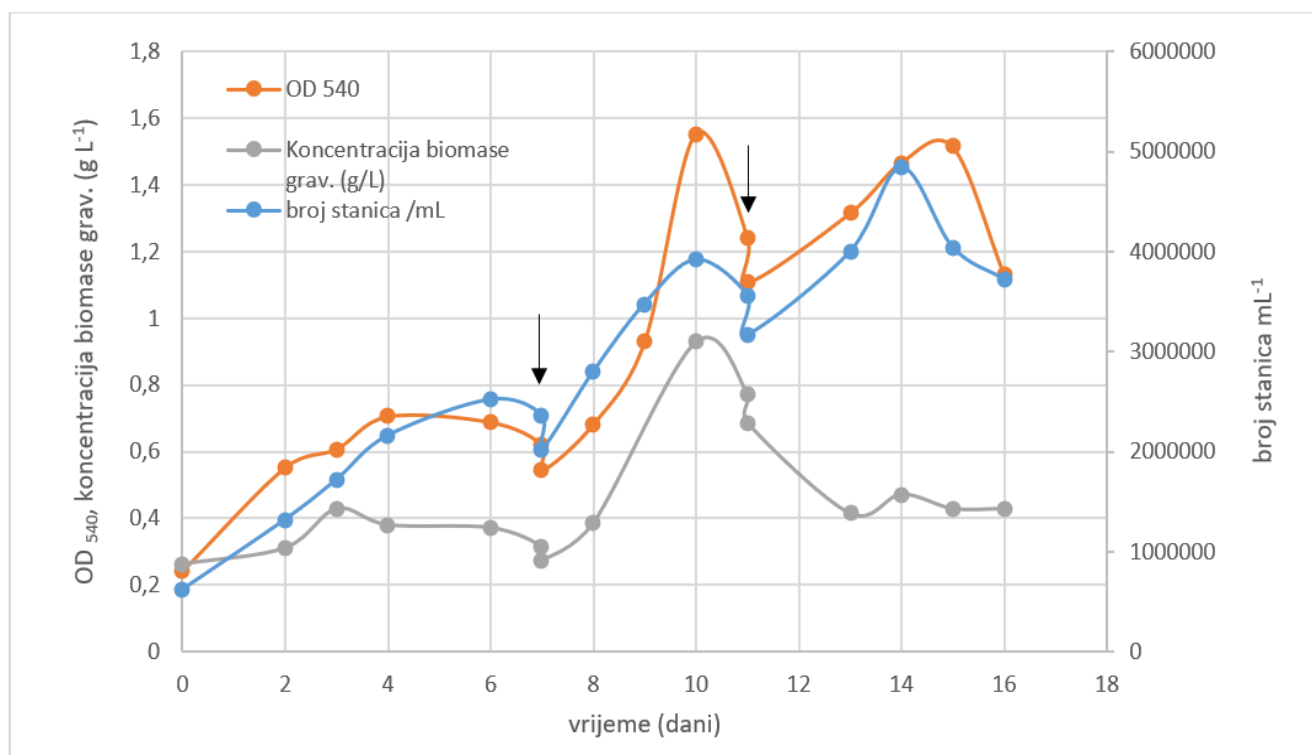
Tijekom ovog eksperimenta dodane su dvije prihrane koje su na slikama 15 i 16 označene strelicama. Na slici 15 može se primijetiti kako je nakon prve prihrane ponovno došlo

do rasta kulture što je vidljivo iz povećanja vrijednosti optičke gustoće, broja stanica po mililitru i koncentracije biomase. Slika 16 prikazuje potrošnju dušika, fosfora i silicija tijekom vremena. Na slici 15 može se primijetiti značajan porast koncentracije dušika te blagi porast koncentracije silicija i fosfora nakon prihrane kao i konstantan blagi pad njihove koncentracije tijekom vremena. Potrebno je naglasiti kako tijekom provođenja eksperimenta, zbog tehničkih razloga, koncentracija se silikatnih i fosfatnih iona nije mogla svakodnevno određivati, pa se njihova koncentracija nije mogla uskladiti s potrebama same kulture. Nakon prve prihrane optička gustoća kulture, a sukladno tome broj stanica i koncentracija biomase počeo je opadati nakon tri dana (deseti dan uzgoja). Naknadna analiza koncentracije silicija pokazuje kako je silicij skoro u potpunosti potrošen za vrijeme šaržnog uzgoja te da prihranom nije dodana dovoljna količina silicija za rast bez limitacije. Stoga naknadna analiza nutrijenata upućuje na moguću limitaciju silicijem, zbog čega je kultura vrlo brzo ponovno ušla u fazu odumiranja, iako je preostala dovoljna količina dušika (slika 15). Potom je ponovno napravljena prihrana, tako da je koncentracija dušika u podlozi nakon prihrane iznosila približno njegovoj koncentraciji u $4x f/2$, kako bi se ponovno postigli uvjeti suviška dušika. Kao što je prethodno objašnjeno, uvjeti su suviška dušika odabrani kako bi se potaknulo nakupljanje nezasićenih masnih kiselina i što veća produktivnost biomase. Ipak, porast optičke gustoće, broja stanica i koncentracije biomase bio je značajno slabiji, u odnosu na porast nakon prve prihrane. Moguće je objašnjenje limitacija silicijem i fosforom, čije su koncentracije bile vrlo niske, čak i neposredno nakon druge prihrane, a do kraja uzgoja njihova je koncentracija bila ispod 1 mg L^{-1} za fosfor, dok se silicij gotovo u potpunosti utrošio.

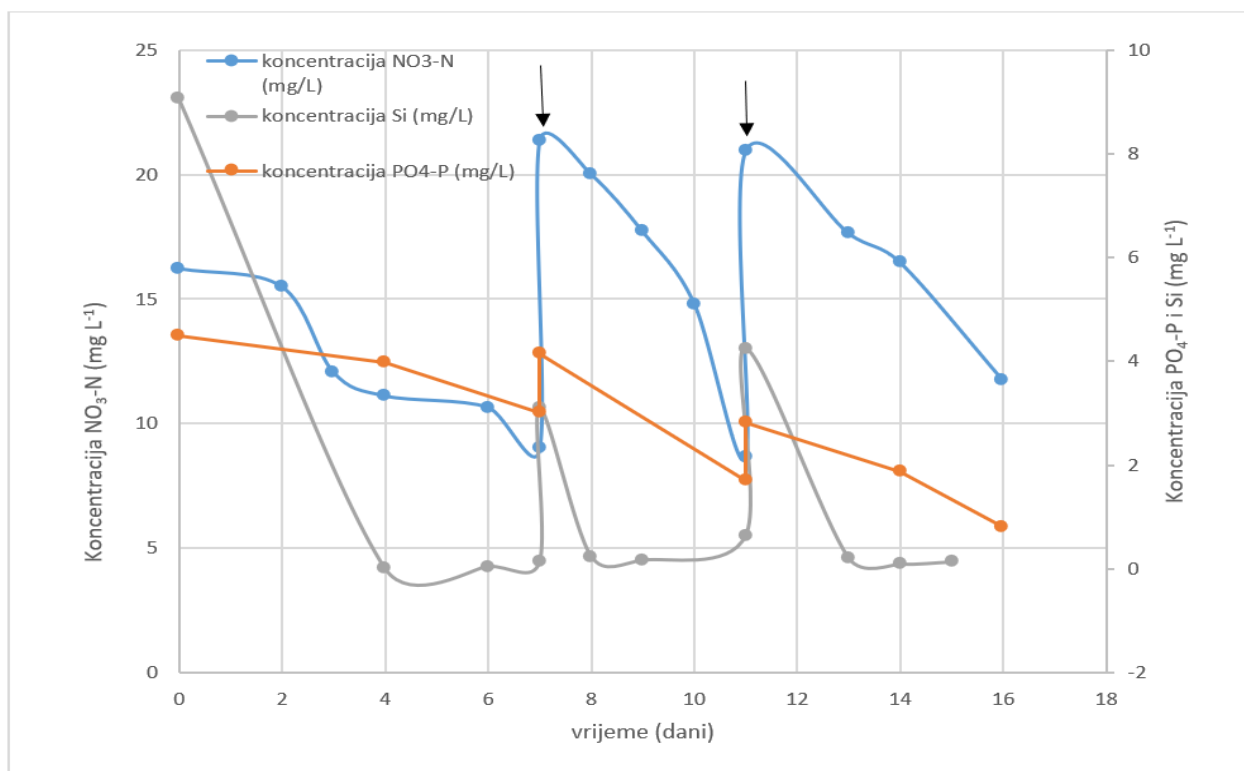
Nakon inokulacije, koncentracija biomase iznosila je $0,26 \text{ g L}^{-1}$. Kao što je ranije objašnjeno, eksponencijalna je faza trajala do petog dana uzgoja i koncentracija biomase je pri kraju ove faze rasta iznosila $0,42 \text{ g L}^{-1}$. Potom je uslijedila stacionarna faza te faza odumiranja. To je razlog je sedmi dan uzgoja uočen blagi pad koncentracije biomase (kao i optičke gustoće i broja stanica po mililitru). Nakon prihrane, koncentracija biomase je ponovno u pozitivnom trendu te je najveća koncentracija biomase od $0,93 \text{ g L}^{-1}$ postignuta desetog dana uzgoja (slika 14). Već je jedanestog dana uzgoja kultura ponovno ušla u fazu odumiranja i iz tog je razloga koncentracija biomase blago opala te je prije druge izmjene podloge iznosila $0,77 \text{ g L}^{-1}$. Pad koncentracije biomase praćen je padom broja stanica po mililitru podloge. Nakon druge prihrane koncentracija biomase i dalje opada, iako broj stanica po mililitru podloge raste. Ovaj trend može se pripisati limitaciji silicijem i fosforom koji nisu dodani u dovoljnoj količini kod druge izmjene podloge. U literaturi je potvrđeno da period intenzivnog dijeljenja stanica

rezultira smanjenjem njezine veličine (Mann i sur., 2017). Koncentracija je biomase na kraju polukontinuiranog uzgoja u fotobioreктору iznosila $0,43 \text{ g L}^{-1}$ što je ipak veća koncentracija biomase od one postignute u šaržnom dijelu uzgoja u fotobioreктору ($0,31 \text{ g L}^{-1}$) te uzgoja na f/2 4x podlozi u tikvicama ($0,27 \text{ g L}^{-1}$).

Tijekom polukontinuiranog uzgoja postignuta je maksimalna vrijednost produktivnosti biomase od $0,061 \text{ g}_{\text{biomase}} \text{ L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ i produktivnosti biosinteze lipida $14,64 \text{ mg}_{\text{lipida}} \text{ L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ desetog dana uzgoja, dok je maksimalna vrijednost produktivnosti biosinteze eikosapentaenoične kiseline (C20:5) od $3,28 \text{ mg}_{\text{EPA}} \text{ L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ postignuta četvrtog dan uzgoja.



Slika 15. Promjena OD $_{540}$, koncentracije biomase i broja stanica u vremenu tijekom fototrofnog uzgoja u fotobioreктору.



Slika 16. Promjena koncentracije dušika, fosfora i silicija u vremenu tijekom fototrofnog uzgoja u fotobioreaktoru.

4.2.1. Sastav stanica

Na kraju polukontinuiranog fototrofnog uzgoja provedenog u fotobioreaktoru, u izdvojenoj su biomasi mikroalgi određeni udjeli ugljikohidrata, proteina, lipida, ugljikohidrata i pigmenta (poglavlje 3.2.6.8., 3.2.6.9., 3.2.6.10., i 3.2.6.13.).

Tablica 18 prikazuje koncentraciju biomase i glavnih nutrijenata tijekom uzgoja. Koncentracija proteina ne varira značajno (od 22 do 29 %). Odstupanje od ovoga raspona vrijednosti kod jedanaestog dana može se pripisati analitičkoj pogrešci. Udio ugljikohidrata određen je prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6.8. U kiselinskom hidrolizatu najzastupljeniji monosaharid bila je ksiloza, dok su ostali monosaharidi (npr. glukoza) bili ispod granice kvantifikacije te je udio ugljikohidrata izračunat samo preko koncentracije ksiloze. Udio ugljikohidrata određen je tek za jedanaesti i šestaesti dan uzgoja, kada je koncentracija biomase bila dovoljno visoka kako bi u izuzetom uzorku bilo dovoljno biomase za provedbu

analize. Udio ugljikohidrata neznatno je varirao između ova dva dana uzgoja te je jedanaesti dan iznosio 5,53 %, a šesnaesti dan 4,88 %. Udio pigmenata u biomasi dijatomeja je određen prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6.13. te je udio neznatno varirao tijekom vremena uzgoja u rasponu od 1,47 % do 4,33 %. U biomasi je također određen i udio pepela odnosno mineralnih tvari prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6.17. te je on iznosio 44,1 %.

Budući da je inokulum činila kultura u sredini eksponencijalne faze, udio je lipida u početnom dijelu šaržnog uzgoja bio nizak. Udio lipida postepeno raste te je osmog dan uzgoja, odnosno na kraju šaržnog dijela uzgoja iznosio 18,40 %. Udio lipida i dalje raste nakon prve izmjene podloge i najviši je udio postignut jedanaestog dana uzgoja, kada je iznosio 24,7 %. Maksimalan udio lipida određen je prije druge prihrane, kada je koncentracija nitratah iona u mediju bila najmanja (38,29 mg L⁻¹), što je u skladu s literaturnim navodima Yanga i sur., (2013), koji navode kako je udio ukupnih lipida bio 29,2 % veći u uvjetima limitacije dušikom. Osim toga, prije druge izmjene podloge i koncentracija je silicija postala limitirajuća što je doprinjelo povećanju udjela lipida zato što nedostatak ključnog nutrijenta smanjuje brzinu rasta stanice i potiče na nakupljanje lipida kao rezervnog materijala. Nakon druge izmjene podloge udio se lipida smanjio i četrnaestog je dana je iznosio 13,27 %, a to se smanjenje može pripisati upravo dodatkom nutrijenata, posebice dušika u medij i intenzivnom rastu stanica. Kako su se nutrijenti postupno trošili, te je do kraja polukontinuiranog uzgoja nastupila limitacija silicijem i fosforom udio lipida je ponovno porastao te je zadnji dan uzgoja iznosio 22,73 %. U biomasi izdvojenoj na kraju uzgoja određen je udio ukupnih lipida prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.6.10., te udio lipida izraženih kao ukupne masne kiseline što je opisano u poglavlju 3.2.6.11. Udio ukupnih lipida iznosio 18,6 % dok je isti udio izražen kao ukupne masne kiseline iznosio 22,73 %. Odstupanje je između ovih dvaju udjela manje od 10 % što ukazuje na točnost dobivenih rezultata.

Tablica 18. Sastav stanice.

Vrijeme uzgoja (dan)	Udjel (%)				
	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

4.2.1.1. *Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz mikroalgi*

Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima izoliranim iz dijatomeja određen je za četvrti, sedmi, jedanaesti i šesnaesti dan uzgoja u fotobioreaktoru. Sadržaj pojedinih masnih kiselina određen je plinskom kromatografijom, a masne kiseline u uzorku prije analize prevedene su u metilne estere transesterifikacijom (poglavlje 3.2.6.11.).

Sastav masnih kiselina u lipidima dijatomeje, kao i promjena sastava tijekom uzgoja u fotobioreaktoru prikazana je u tablici 19. Iz nje je vidljivo kako su najzastupljenije masne kiseline sljedeće: zasićene masne kiseline C16:0 (palmitinska kiselina) i C14:0 (miristinska kiselina), mononezasićena kiselina C16:1 cis9 (palmitoleinska kiselina) i polinezasićena masna kiselina C20:5 cis 5,8,11,14,17 (EPA; eikosapentaenoična kiselina). Ovakav sastav masnih kiselina u lipidima morskih dijatomeja u skladu je s literaturnim podacima gdje se upravo ove četiri masne kiseline navode kao najzastupljenije (Zulu i sur., 2018). Udjeli ovih masnih kiselina mijenjali su se tijekom uzgoja u fotobioreaktoru kao posljedica promjene koncentracije nutrijenata koji, kako je prethodno opisano, utječu različito na sintezu masnih kiselina. Promjena je pojedinih masnih kiselina posljedično uzrokovala i promjenu udjela ukupnih zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA).

Najviša koncentracija zasićenih masnih kiselina bila je na početku uzgoja te je peti dan iznosila 45,70 %, a s vremenom se udio smanjivao te je na kraju uzgoja iznosi 34,71 %. Promjena udjela zasićenih masnih kiselina najviše je povezana s promjenom najzastupljenije masne kiseline u ovoj grupi, palmitinske kiseline, čiji se udio s početnih 42,53 % smanjio na konačnih 19 %. Posljedično smanjenju koncentracije zasićenih masnih kiselina, udio ukupnih nezasićenih, jednostruko i višestruko nezasićenih, se tijekom vremena povećavao. Tijekom polukontinuiranog dijela uzgoja u fotobioreaktoru udio SFA nije se značajnije mijenjao te je bio u rasponu od 32 do 35 %, a time se i udio nezasićenih masnih kiselina nije značajno mijenjao. Ali, odnos između MUFA i PUFA se tijekom uzgoja značajno mijenjao ovisno o koncentraciji nutrijenata što je u skladu s literaturom. Naime, Qiao i suradnici navode kako se omjer DHA / EPA i postotak PUFA povećao u početku uzgoja, ali kasnije se smanjilo. Prema njihovim rezultatima, tijekom rane linearne faze udio je PUFA iznosio 45,03 %, a na kraju uzgoja 31,06 %. Suprotno tome, jednostruko nezasićene masti pokazuju suprotnu tendenciju, s udjelom od 28,53 % u ranoj linearnoj fazi te 41,77 % na kraju uzgoja.

Iz tablice 19 vidljivo je značajno povećanje jednostruko nezasićenih masnih kiselina (s 29,69 % na 48,77%) prije prve izmjene podloge, na račun SFA, ali i PUFA čiji se udio smanjio s 24,61 % na 15,77 %. Naime, Klein Breteler i suradnici utvrdili su da je, pri rastu u podlozi s dovoljno hranjivih tvari (bez limitacije), udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina značajno manji u odnosu na udio višestruko nezasićenih masnih kiselina (Klein Breteler i sur., 2005). To objašnjava i veći udio PUFA (24,61 %) i manji udio MUFA (29,69 %) na početku uzgoj, gdje limitacije silicijem i fosforom nije bilo. Nakon prve prihrane, povećanjem količine dostupnih nutrijenata udio PUFA je ponovno porastao na 20,99 %, te nakon druge izmjene podloge udio se još više povećao i petnaesti dana uzgoja iznosio je 31,85 %. U posljednjim danima uzgoja nastupila je limitacija silicijem i fosforom (slika 16) te je zbog toga udio PUFA pao na 11,17 %.

Udio MUFA se nakon druge izmjene podloge i petnaestog dana uzgoja smanjio s 45,51% na 35,75%, da bi se, također zbog limitacije, potom povećao do kraja uzgoja na 54,13 %. Povećanje udjela ukupnih mononezasićenih masnih kiselina povezana je s promjenom najzastupljenije masne kiseline u ovoj skupini, C16:1 cis 9 (palmitoleinska kiselina) čiji se udio s početnih 18,92 % povećao na 47,71 % na kraju uzgoja. Nadalje, iz tablice 19 može se vidjeti i blago povećanje udjela EPA u uvjetima suviška dušika, čiji je udio na kraju uzgoja iznosio 7,98 %. Najveći udio DHA, još jedne visokovrijedne masne kiseline uz EPA, postignut je dvanaestog dana uzgoja kada je iznosio 3,09 %.

Tablica 19. Sastav metil estera masnih kiselina u ukupnim staničnim lipidima.

Metil ester masne kiseline	dan uzgoja				
	4	7	11	14	16
	udio % (g g ⁻¹)				
C11:0, undekanska kiselina		0,37	0,34	*	*
C12:0, dodekadska kiselina	1,17	*	0,28	*	*
C14:0, miristinska kiselina		8,75	8,92	6,49	10,69
C14:1 cis 9, miristoleična kiselina		1,16	0,35	1,9	0,07
C15:0, pentadekanska kiselina	0,82	2,50	2,53	3,42	1,05
C15:1 cis 10, pentadekanoična kiselina		0,91	1,54	1,31	1,05
C16:0, palmitinska kiselina	42,53	14,97	15,68	7,90	19,00
C16:1 cis 9, palmitoleinska kiselina	18,92	41,75	38,99	26,88	47,71
C17:0, heptadekanska (margarinska) kiselina	1,18	5,16	0,56	7,01	2,32
C17:1 cis 10, heptadekanoična kiselina	10,78	1,48	3,48	1,56	4,34
C18:0, stearinska kiselina		1,93	1,06	0,98	*
C18:1 trans 9, elaidinska kiselina		2,53	0,54	4,10	0,65
C18:2 cis 9,12, linolna kiselina	1,88	2,39	0,32	14,86	0,34
C18:3 cis 6,9,12, γ -linolenska kiselina		1,93	2,16	2,31	0,53
C20:0, arahidska (eikozanoidna) kiselina		*	0,11	*	*
C20:2 cis 11,14, eikosadienična kiselina		*	0,64	*	0,07
C20:3 cis 8,11,14 n6, eikozatetraenoična kiselina		2,95	4,01	4,3	0,63
C20:4 cis 5,8,11,14 n6; arahidonska kiselina (ARA)		2,12	3,15	3,43	1,07
C22:0, behenijska (dokozaenoidna) kiselina		*	0,33	5,28	0,9
C22:1 cis 13 n9, eručna kiselina		*	*	*	*
C20:5 cis 5,8,11,14,17 n3, ikosapentaenska (eikosapentaenoična) kiselina (EPA)	22,73	6,39	7,62	6,14	7,98
C24:0, lignocerinska kiselina		1,78	3,69	1,47	0,74
C24:1 cis 15, tetrakozenoična kiselina		0,94	0,61	*	0,32
C22:6 cis 4,7,10,13,16,19;(n3), dokosaheksaenska kiselina		*	3,09	0,81	0,55
SFA ⁵	45,70	35,46	33,50	32,55	34,71
MUFA ⁶	29,69	48,77	45,51	35,75	54,13
PUFA ⁷	24,61	15,77	20,99	31,85	11,17
Ukupni lipidi (%)	3,44	18,40	24,70	13,27	22,73

*metilesteri masnih kiselina detektirana u uzorku, ali ispod granice kvantifikacije, 5- (eng. saturated fatty acids) zasićene masne kiseline, 6- (eng. monounsaturated fatty acids) jednostruko nezasićene masne kiseline, 7- (eng. polyunsaturated fatty acids) višestruko nezasićene masne kiseline.

4.2.1.2. *Sastav pigmenata biomase dijatomeja*

Dijatomeje sadrže dvije vrste pigmenata: klorofile i karotenoide. Klorofili apsorbiraju svjetlosnu energiju u plavom i crvenom dijelu elektromagnetskog spektra, a posebno oni koji se koriste u fotosintezi. Molekula klorofila građena je od četiri pirolna prstena, međusobno povezanih metilenskim mostom u tetrapirolni prsten. Atom magnezija u klorofilu vezan je s četiri atoma dušika u središtu porfirinskog prstena. Najznačajniji su klorofil a i c. Druga skupina pigmenata, karotenoidi, sastoji se od karotena (ugljikovodika) i njihovih kisikovih derivata, ksantofila. Karotenoidi (karoteni i ksantofili) se još nazivaju „sekundarnim pigmentima“ jer podupiru zadaću „primarnih pigmenata“ odnosno klorofila u apsorpciji svjetlosne energije. Osim toga, oni djeluju kao snažni antioksidansi koji štite stanicu od oksidativnog djelovanja slobodnih radikala.

Ekstrakcija pigmenata iz vlažne biomase dijatomeja provedena je 90 % - tnim acetonom te je nakon ekstrakcije koncentracija pigmenata klorofila a i klorofila b određena spektrofotometrijski, prema metodi Jeffrey i Humphrey-a (1975).

Iz tablice 20 vidljivo je da je udio klorofila a najmanji (0,18 %) prije prve prihrane, dok je udio klorofila c₁ i c₂ značajno veći (4,15 %). Odnosno, udio klorofila a je najveći prije druge prihrane (1,38 %), dok je tada najmanji udio klorofila c₁ i c₂ od samo 0,09 %. Na kraju uzgoja udio ukupnog klorofila iznosio je 2,32 %, od čega je 0,19 % činio klorofil a, a 2,13 % klorofil c₁ i c₂.

Tablica 20. Udio klorofila a i c u biomasi mikroalgi tijekom fototrofnog uzgoja u fotobioreaktoru.

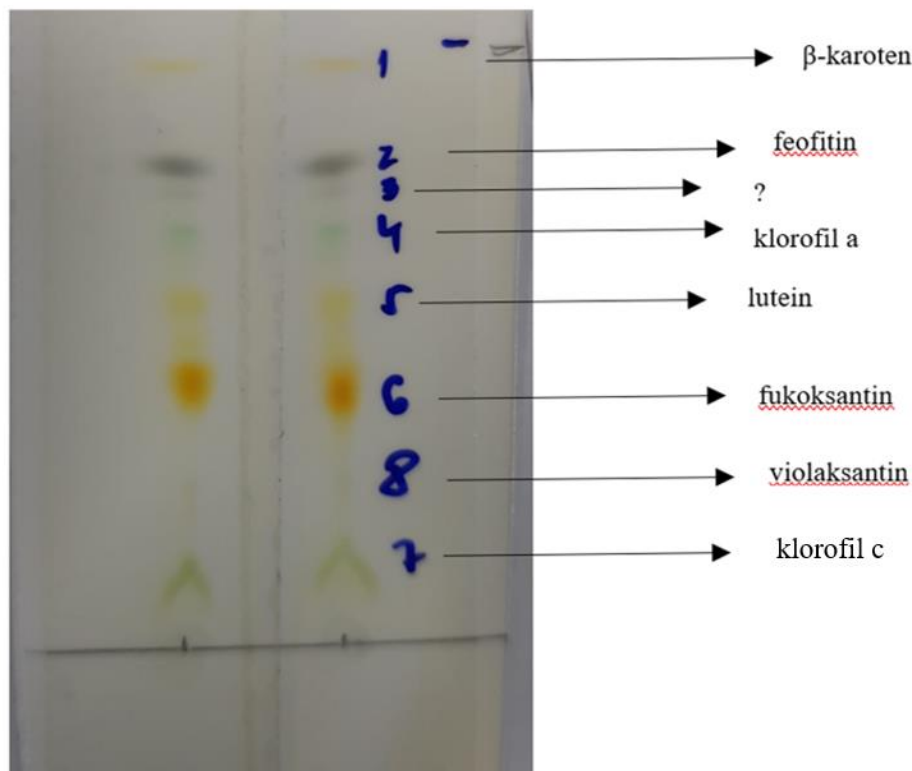
Vrijeme uzgoja (dani)	Klorofil a (%)	Klorofil c ₁ i c ₂ (%)	Ukupni klorofil (%)
4	0,25	2,06	2,31
7	0,18	4,15	4,33
11	1,38	0,09	1,47
14	0,18	1,94	2,11
16	0,19	2,13	2,32

Tablica 21. R_f vrijednosti pojedinih pigmenata TLC, (Robertson, 2018).

Pigment	R _f
β-karoten	0,94
Klorofil a	0,68
Klorofil b	0,54
Fukoksantin	0,51
Lutein	0,43
Violaksantin	0,22
Neoksantin	0,08
Klorofil c	0,03

Tablica 22. R_f vrijednosti analiziranih pigmenata.

	R _f (uzorak)	Pigment
1.	0,97	β-karoten
2.	0,83	feofitin
3.	0,78	?
4.	0,69	Klorofil a
5.	0,59	lutein
6.	0,5	fukoksantin
7.	0,24	violaksantin
8.	0,09	klorofil c



Slika 17. Analiza pigmenata TLC.

Ekstrahirani pigmenti su potom razdvojeni pomoću tankoslojne kromatografije kako je opisano u Poglavlju 3.2.6.14. Slika 16 prikazuje pločicu s razdvojenim pigmentima, a tablica 22 dobivene R_f vrijednosti koje su uspoređene s R_f vrijednostima navedenim u literaturi (tablica 21) za pigmente karakteristične za dijatomeje, a koji su razdvojeni tankoslojnom tekućinskom kromatografijom u istom sustavu otapala. (The Robertson Laboratory, 2018).

Manje odstupanje R_f vrijednosti od literaturnih vrijednosti posljedica je promjene sastava mobilne faze uslijed isparavanja otapala pri višim temperaturama u laboratoriju tijekom ljetnih mjeseci.

Kao što je vidljivo na slici 17, u ekstraktu pigmenata dijatomeje detektirani su sljedeći pigmenti: β -karoten, feofitin, klorofil a, lutein, violaksantin, fukoksantin i klorofil c. Najzastupljeniji pigment prema kvalitativnoj TLC analizi je fukoksantin (narančaste boje). Upravo je fukoksantin jedan od najzastupljenijih pigmenata u dijatomejama koji im daje karakteristično zlatno-smeđe obojenje. Fukoksantin ima antioksidativno, protuuplano, antikancerogeno, antiinflamatorno i antiviralno djelovanje, te niz pozitivnih učinaka na zdravlje jetre, kostiju, kože, očiju i krvožilnog sustava (Peng i sur., 2011).

4.3. RAST NA IZVORIMA DUŠIKA I UGLJIKA

Istraživanje rasta dijatomeja na različitim izvorima dušika i ugljika provedeno je u tekućoj podlozi na mikrotitarskoj pločici s 96 jažica. Korištene su dvije mikrotitarske pločice s jednakim rasporedom izvora ugljika i dušika, kako je prikazano na slici 18. Jedna mikrotitarska pločica korištena je za istraživanje heterotrofnog, a druga mikotrofnog rasta.

Podloge za ispitivanje rasta dijatomeja na različitim izvorima ugljika, odnosno dušika, opisane su u poglavlju 3.1.4.4 i 3.1.4.5.

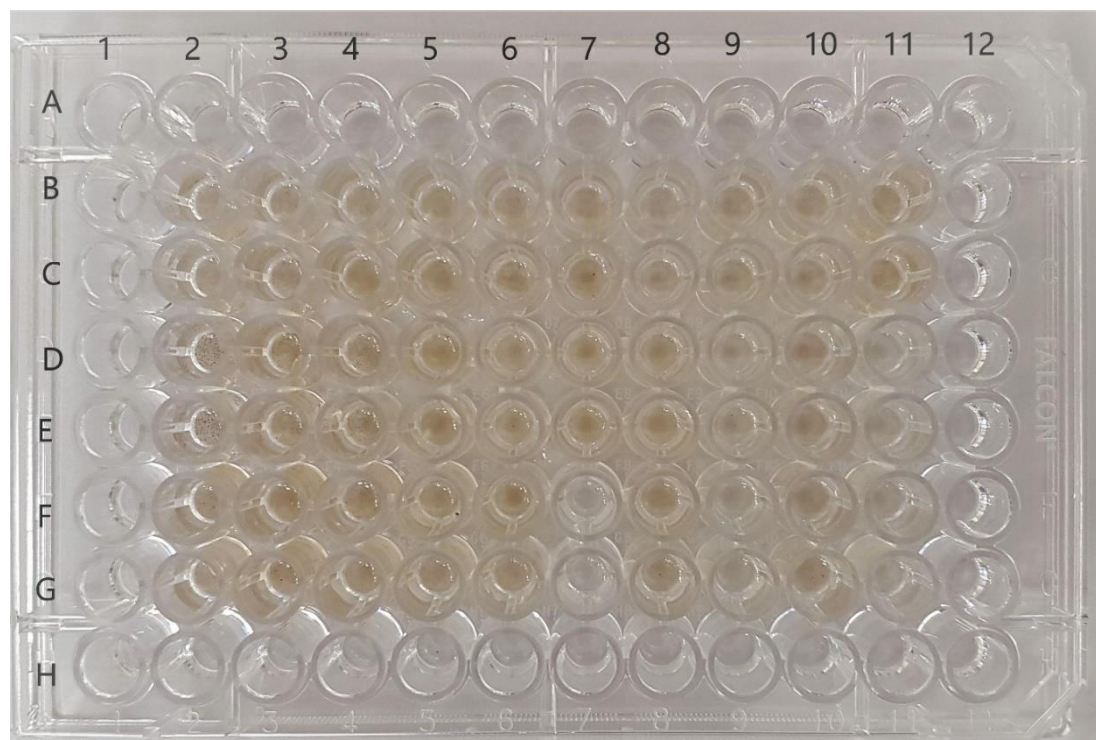
Uzgoj je vođen kroz pet dana na tresilici za mikrotitarske pločice na 25 °C te u slučaju mikotrofnog rasta uz osvjetljenje toplo-bijelom svjetlošću uz režim 12 sati svijetlo i 12 sati tama. Za postizanje uvjeta za heterotrofni rast mikrotitarska pločica umotana je aluminijskom folijom kako bi se spriječila izloženost svjetlu. Svrha eksperimenta bila je utvrditi koji izvori dušika i ugljika najviše odgovaraju rastu dijatomeja. Raspored ispitivanih izvora dušika i ugljika u mikrotitarskoj pločici prikazan je na slici 18.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-
B	K-	Glc	Fru	K+	Lac	Xyl	K+	Malic acid	Glicerol	K+	Me	K-
C	K-	Glc	Fru	K+	Lac	Xyl	K+	Malic acid	Glicerol	K+	Me	K-
D	K-	Kv. eks.	Pepton	Urea	K+	K-	Gly	L-Cys	L-Gln	K+	K-	K-
E	K-	Kv. eks.	Pepton	Urea	K+	K-	Gly	L-Cys	L-Gln	K+	K-	K-
F	K-	Amonijev klorid	Amonijev nitrat	Amonijev acetat	K+	K-	YNB	K+	K-	K+	K-	K-
G	K-	Amonijev klorid	Amonijev nitrat	Amonijev acetat	K+	K-	YNB	K+	K-	K+	K-	K-
H	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-	K-

Slika 18. Shema mikrotitarske ploče s rasporedom izvora dušika i ugljika (Kvaščeve dušikove baze, eng. *YNB-Yeast Nitrogen Base*, K⁺ podloga s natrijevim nitratom, K⁻ podloga bez natrijeva nitrata).

Tablica 23. Miksotrofni rast dijatomeja (- nema rasta; +/- vro slabi rast; + slab rast; ++ zamjetan rast; +++ izrazito dobar rast).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻
B	K ⁻	Glc +/-	Fru +/-	K ⁺	Lac +/-	Xyl +/-	K ⁺	Malic acid +/-	Glicerol +/-	K ⁺	Me ++	K ⁻
C	K ⁻	Glc +/-	Fru +/-	K ⁺	Lac +/-	Xyl +/-	K ⁺	Malic acid +/-	Glicerol +/-	K ⁺	Me ++	K ⁻
D	K ⁻	Kv. eks. ++	Pepton ++	Urea +	K ⁺	K ⁻	Gly +/-	L- Cys +/-	L-Gln +/-	K ⁺	K ⁻	K ⁻
E	K ⁻	Kv. eks. ++	Pepton ++	Urea +	K ⁺	K ⁻	Gly +/-	L- Cys +/-	L-Gln +/-	K ⁺	K ⁻	K ⁻
F	K ⁻	Am. klorid ++	Am. nitrat +++	Am. acetat +/-	K ⁺	K ⁻	YNB -	K ⁺	K ⁻	K ⁺	K ⁻	K ⁻
G	K ⁻	Am. klorid +++	Am. nitrat +++	Am. acetat +/-	K ⁺	K ⁻	YNB -	K ⁺	K ⁻	K ⁺	K ⁻	K ⁻
H	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻



Slika 19. Miksotrofni rast dijatomeja na izvorima C i N.

Tablica 24. Razlike optičke gustoće prvog i posljednjeg dana uzgoja tijekom miksotrofnog uzgoja.

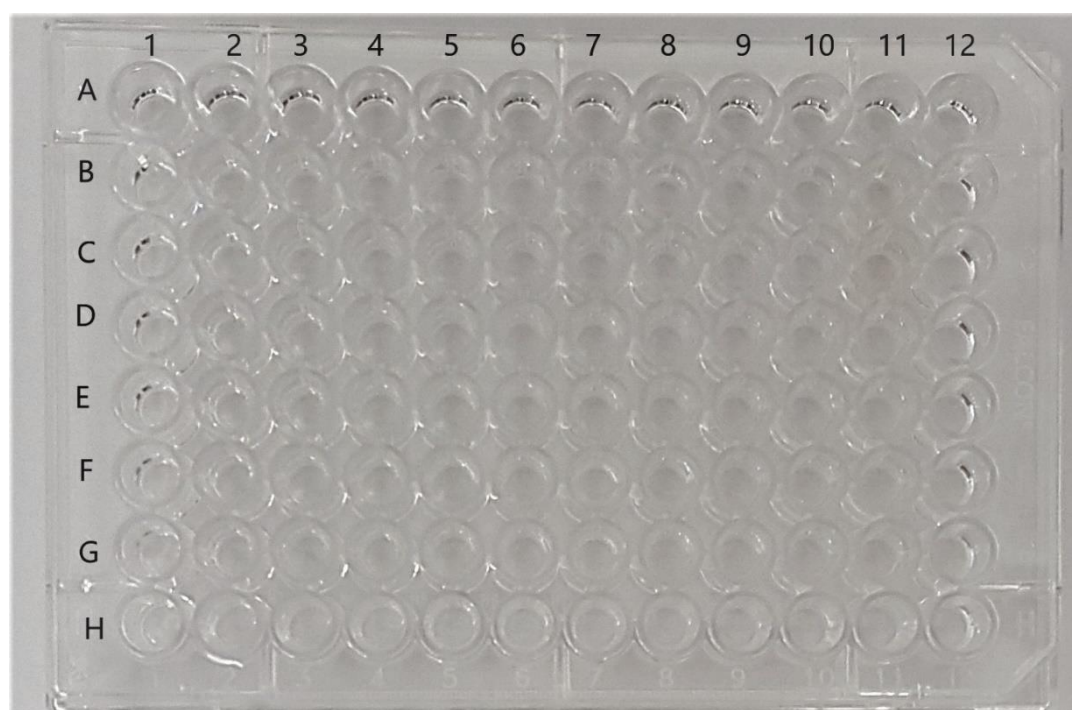
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-0,005	-0,004	-0,003	0,0157	0,0319	0,0262	0,0125	0,0113	0,0131	0,0331	0,034	0,054
B	-0,002	0,0657	0,1022	0,0918	0,1404	0,0524	0,1153	0,1199	0,1695	0,1363	0,1809	0,0083
C	-0,002	0,1391	0,1415	0,0832	0,1177	0,0475	0,1398	0,0859	0,1166	0,192	0,1215	0,0214
D	-0,004	0,1142	0,0675	0,117	0,1138	0,1325	0,0546	0,1118	0,0821	0,2342	0,0996	0,0171
E	0,0057	0,0479	0,0902	0,1066	0,1091	0,1347	0,0759	0,1092	0,0502	0,111	0,1145	0,0263
F	0,0057	0,1006	0,0809	0,0301	0,0778	0,142	0,0471	0,1365	0,1522	0,0934	0,1047	0,0434
G	0,0044	0,0737	0,1102	0,1099	0,0811	0,0461	0,0594	0,0846	0,0855	0,0698	0,0502	0,0119
H	0,0066	0,0051	0,0006	-0,001	0,0106	0,025	0,0202	0,0295	0,0396	0,1233	0,0184	0,0043

Slike 19 i 20 prikazuju rast dijatomeja na različitim izvorima dušika i ugljika u mikrotitarskim pločama nakon pet dana uzgoja. Rast je ocjenjen na temelju vizualnog uspoređivanja rasta (tablica 23 i 25), i određivanjem optičke gustoće kulture. Iz razlike promjene optičke gustoće zadnjeg i prvog dana uzgoja (tablica 24) rast na pojedinim izvorima dušika, odnosno ugljika, međusobno je uspoređivan, pritom uzimajući u obzir rast u kontrolnoj podlozi.

Odsustvo rasta tijekom miksotrofnog uzgoj ove dijatomeje zapaženo je na kvašćevim dušikovim bazama (eng. *YNB, Yeast Nitrogen Base*). Rezultati za L-glutaminsku kiselinu vrlo su slični onima za YNB. Malo značajniji rast uočen je na glicinu, L-cisteinu i amonijevom acetatu te urei (vrlo sličan rast kontroli K^+). Dobar rast ostvaren je dodatkom kvašćevog ekstrakta. U tom mediju dijatomeje formiraju sitne nakupine, a slična pojava primijećena je i kod rasta stanica na peptonu. Najznačajniji rast uočen je na amonijevom kloridu i amonijevom nitratu. Rezultati koje navode Pahl i sur. vrlo su slični prethodno navedenim. Oni su pokazali da je najveća stopa rasta *Cyclotella cryptica* postignuta dodatkom amonijeva nitrata, amonijeva klorida, ali i uree (Pahl i sur.,2012). Ipak, rezultati dobiveni u ovom radu pokazuju značajan rast i na urei te L-cisteinu.

Tablica 25. Heterotrofni rast dijatomeja (- nema rasta; +/- vro slabi rast; + slab rast; ++ zamjetan rast; +++ izrazito dobar rast).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻
B	K ⁻	Glc -	Fru -	K ⁺	Lac -	Xyl -	K ⁺	Malic acid -	Glicerol -	K ⁺	Me -	K ⁻
C	K ⁻	Glc -	Fru -	K ⁺	Lac -	Xyl -	K ⁺	Malic acid -	Glicerol -	K ⁺	Me -	K ⁻
D	K ⁻	Kv. eks. -	Pepton -	Urea -	K ⁺	K ⁻	Gly -	L- Cys -	L-Gln -	K ⁺	K ⁻	K ⁻
E	K ⁻	Kv. eks. -	Pepton -	Urea -	K ⁺	K ⁻	Gly -	L- Cys -	L-Gln -	K ⁺	K ⁻	K ⁻
F	K ⁻	Am. klorid -	Am. nitrat -	Am. acetat -	K ⁺	K ⁻	YNB -	K ⁺	K ⁻	K ⁺	K ⁻	K ⁻
G	K ⁻	Am. klorid -	Am. nitrat -	Am. acetat -	K ⁺	K ⁻	YNB -	K ⁺	K ⁻	K ⁺	K ⁻	K ⁻
H	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻	K ⁻



Slika 20. Heterotrofni rast dijatomeja na izvorima C i N.

Kod miksotrofnog uzgoja na različitim izvorima ugljika, najslabiji rast zamijećen je na ksilozi, zatim jabučnoj kiselini i glukozu. Rast na fruktozi i laktozi je bolji, dok nabolje rezultate pokazuju glicerol i melasa. Dobiveni su rezultati u suglasju s literaturom gdje se navodi kako su miksotrofni uvjeti bolji za rast dijetomeja od heterotrofnoih te se kao najpogodniji izvor ugljika navodi glicerol (Liu i sur., 2009). Naime, prema literaturi, dijetomeje mogu asimilirati glicerol kao izvor ugljika samo u prisutnosti svjetlosti i bez vanjske opskrbe CO₂. Glicerol i svjetlost korišteni kao supstrati za miksotrofni uzgoj daju značajne rezultate. Na primjer, rast *Phaeodactylum tricorutum* u mediju s glicerolom u koncentraciji od 0,1 M te osvjetljenjem s 165 mmol fotona m⁻² s⁻¹, bio je za 74 % veći u usporedbi s autotrofnom kulturom (koja raste samo uz prisustvo svjetla) (Perez-Garcia i sur., 2011).

Uzgoj u heterotrofnim uvjetima bio je vrlo slab. Kako je vidljivo na slici 20, u jažicama nema vidljivog rasta dijetomeja. Uspoređujući heterotrofni i miksotrofni uzgoj na različitim izvorima ugljika s literaturom (Perez- Garcia i sur., 2011), vidljivo je da se miksotrofni način pokazao znatno efikasnijim. Izloženost svjetlosnoj energiji dovelo je do boljeg rasta.

4.4. ANTIMIKROBNO DJELOVANJE

Mikroalge čine najveću i vjerojatno najraznolikiju skupinu fotosintetskih organizama u slatkovodnim i morskim sustavima. Budući da se pojavljuju nove tehnologije za proučavanje bioaktivnih spojeva iz mikroalgi, ova skupina privlači pažnju kao obećavajući izvor prirodnih proizvoda koji imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Bioaktivni spojevi iz mikroalgi potencijalni su izvor novih lijekova s obzirom na njihovu strukturnu raznolikost i biološku dostupnost.

Često se u ekstrakciji aktivnih komponenata koriste kombinacije otapala koji obično sadrže metanol, etanol, izopropanol te manje polarna otapala poput heksana ili kloroforma u različitim omjerima. Otapala poput acetona i heksana, pokazala su dobru sposobnost ekstrakcije, upravo zato što je većina antimikrobnih spojeva hidrofobna (Yi, 2018).

Za pripremu ekstrakata dijetomeja, u ovom radu korištena su četiri otapala: voda, metanol, kloroform i heksan. Dobiveni ekstrakti su korišteni za određivanje antimikrobnog djelovanja difuzijskom metodom (poglavlje 3.2.6.16.). U istraživanju antimikrobnog djelovanja

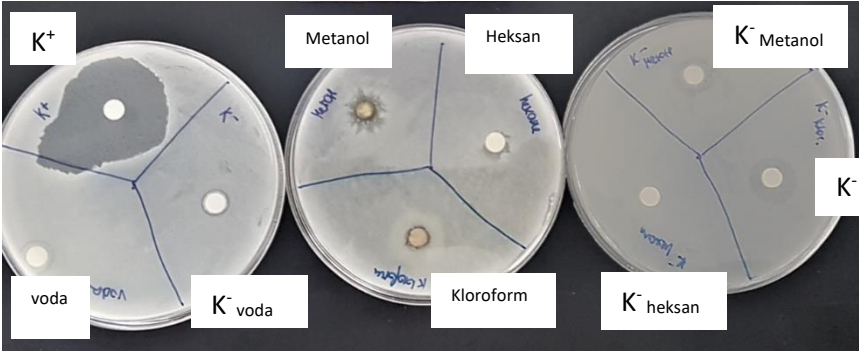
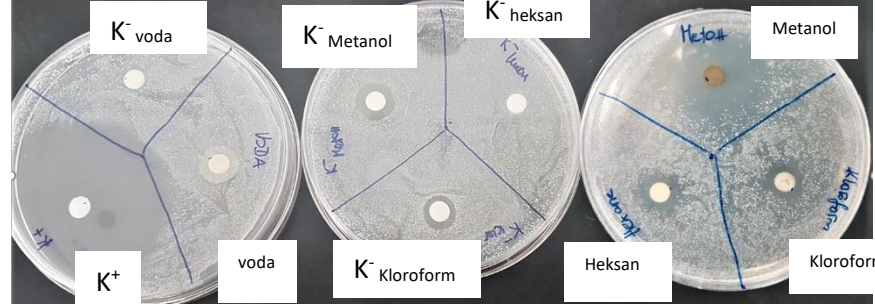
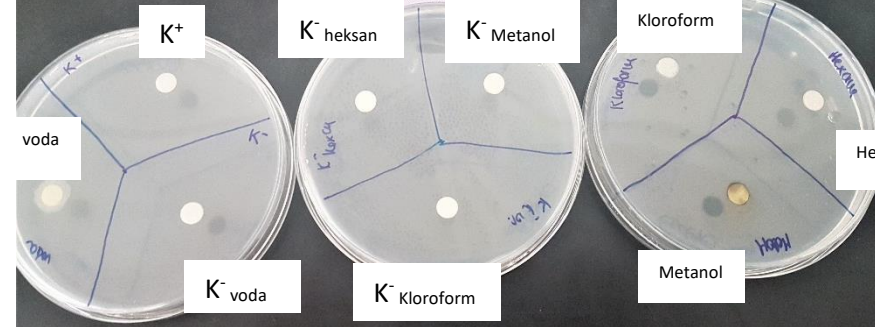
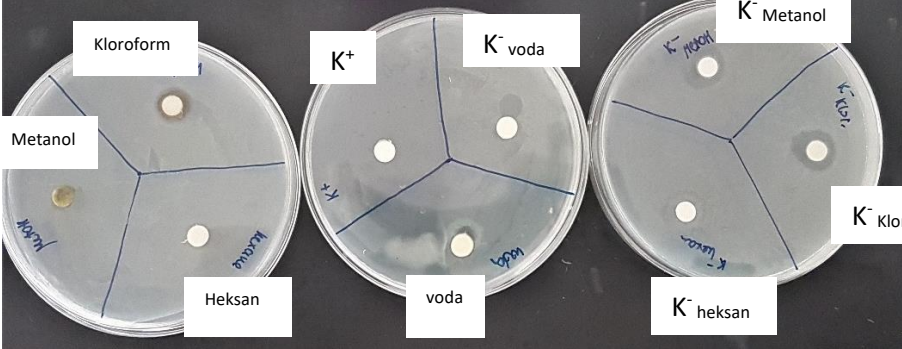
ekstrakata dijatomeja korišteni su sljedeći test-mikroorganizmi: gram pozitivni *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, gram negativni *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, kvasac *Candida utilis* i plijesan *Aspergillus niger*. Osim pripremljenih ekstrakata, za svaki test-mikroorganizam napravljena je pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola korišteni je antibiotik, kloramfenikol za bakterijske kulture i nistatin za plijesni, a kao negativna kontrola čista otapala: voda, heksan, metanol i kloroform. Negativna kontrola je korištena kako bi se utvrdila inhibicija test-mikroorganizma samim otapalom te time bilo moguće razlučiti je li inhibicija rezultat djelovanja ekstrahirane bioaktivne supstancije ili je posljedica samog otapala.

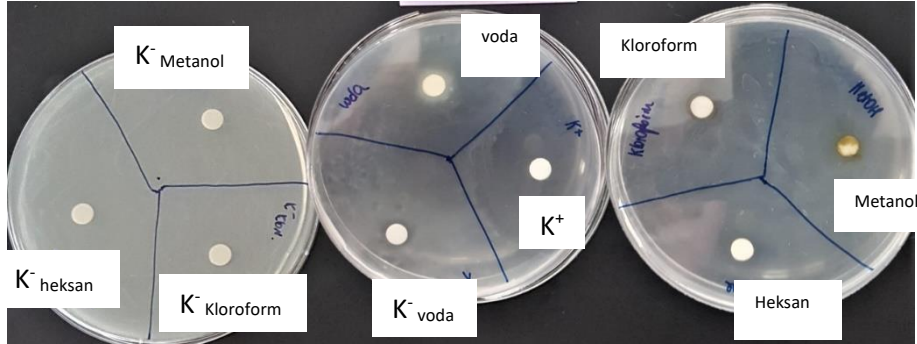
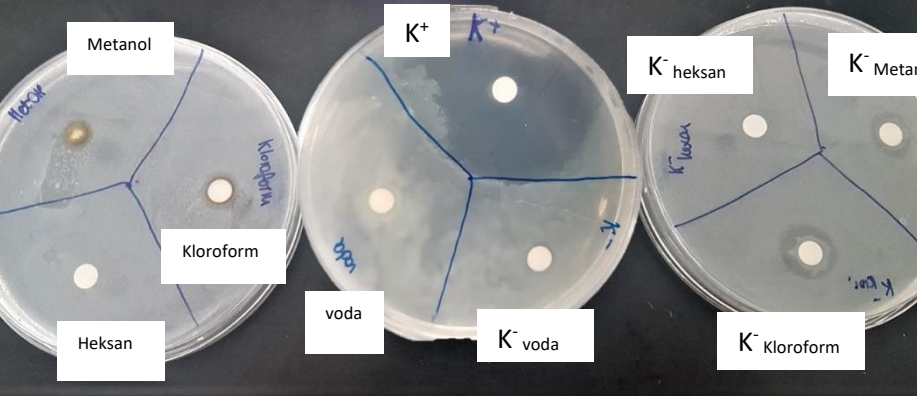
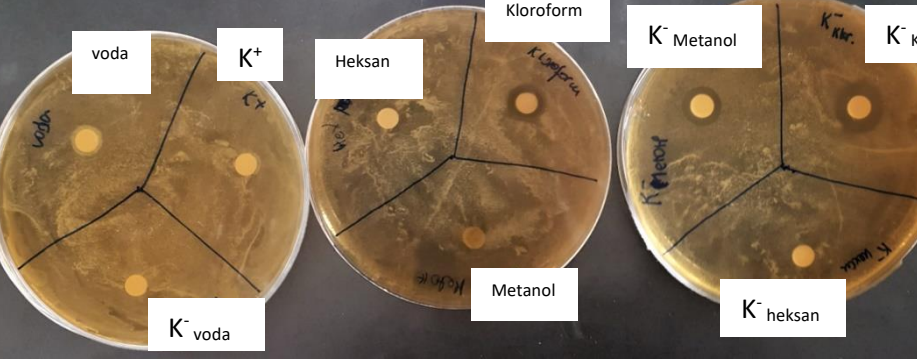
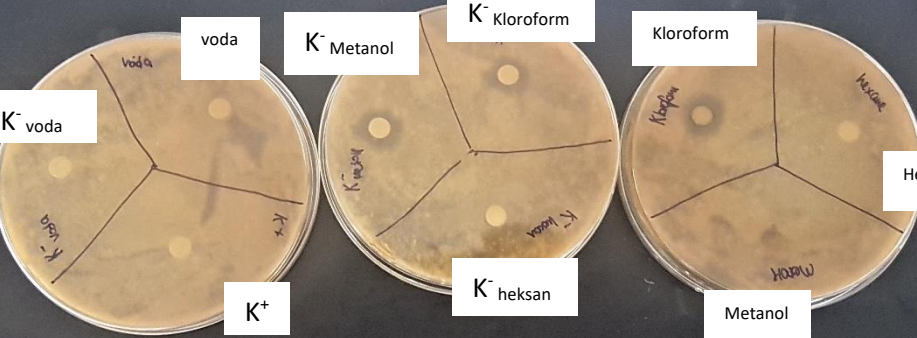
Tablica 26 prikazuje osjetljivost istraženih sojeva na djelovanje ekstrakta dijatomeja. Promjer korištenog diska bio je 6 mm. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kloramfenikol (korišteno 20 μL , 50 mg mL^{-1}) pokazuje jako inhibicijsko djelovanje na sve bakterijske vrste. Najveći inhibicijski učinak na gram pozitivne bakterije, *B.subtilis* i *S. aureus*, imao je metanolski ekstrakt, dok heksanski i kloroformski ekstrakt također pokazuju djelovanje na *S. aureus*. To je vidljivo iz promjera zona inhibicije koji je za navedene ekstrakte veći od kontrola. Rezultate potvrđuje i slika 21 a i 21 b. Heksanski i kloroformski ekstrakti pokazuju antibakterijsko djelovanje na gram negativnu bakteriju *P. aeruginosa*, ali ne i na *E. coli* i *Salmonella sp.* gdje su zone inhibicije samog otapala (kontrola) veće od ekstrakta (slike 21 d i 21 f). Ipak, vodeni ekstrakt pokazuje najbolje antibakterijsko djelovanje na *E. coli*.

Svi su se ekstrakti pokazali učinkovitim inhibitorima rasta kvasca *C. utilis* i plijesni *A. niger*. Kloroformski ekstrakt pokazuje naizgled inhibicijsko djelovanje na *A.niger* i *C.utilis*. Inhibicijsko djelovanje slično je djelovanju čistog otapala tj. kontroli pa se može zaključiti da je inhibicijski učinak na rast plijesni i kvasca bio samim otapalom odnosno, kloroformom, a ne nekim aktivnim spojem iz ekstrakta.

Tablica 26. Osjetljivost odabranih sojeva bakterija, kvasca i plijesni na djelovanje ekstrakta dijatomeja (+ inhibicija rasta, - nema inhibicijsko djelovanje).

Mikroorganizam	Prisutnost inhibicije djelovanjem ekstrakta (+/-) i promjer u mm													
	K ⁺		Metanol			Kloroform			Voda			Heksan		
			K ⁻ metanol	ekstrakt	djelovanje	K ⁻ kloroform	ekstrakt	djelovanje	K ⁻ voda	ekstrakt	djelovanje	K ⁻ heksan	ekstrakt	djelovanje
<i>Bacillus subtilis</i>	+	33	0	8	+	0	0	-	7	0	-	0	0	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	55	12	35	+	10	13	+	0	0	-	0	15	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	35	0	0	-	0	0	-	0	0	-	0	0	-
<i>Escherichia coli</i>	+	30	11	7	-	12	8	-	7	10	+	0	0	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	35	0	0	-	0	10	+	7	0	-	0	22	+
<i>Salmonella sp.</i>	+	55	13	8	-	14	10	-	0	0	-	0	0	-
<i>Candida utilis</i>	-	0	10	0	-	14	10	-	0	0	-	0	0	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	0	13	0	-	12	12	-	0	0	-	0	0	-

Mikroorganizam	Slika 21. Djelovanje ekstrakata dijatomeja na test-mikroorganizme
<p>a) <i>Bacillus subtilis</i></p>	 <p>Three petri dishes showing the effect of diatom extracts on <i>Bacillus subtilis</i> in different solvents. Each dish is divided into three sectors. The first dish shows growth in water (voda) and K⁺ water, but inhibition in K⁻ water. The second dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in methanol (Metanol) and hexane (Heksan). The third dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ methanol, K⁻ hexane, and K⁻ chloroform (Kloroform).</p>
<p>b) <i>Staphylococcus aureus</i></p>	 <p>Three petri dishes showing the effect of diatom extracts on <i>Staphylococcus aureus</i>. The first dish shows growth in water (voda) and K⁺ water, but inhibition in K⁻ water. The second dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ methanol and K⁻ hexane. The third dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ chloroform, hexane, and Kloroform.</p>
<p>c) <i>Enterococcus faecalis</i></p>	 <p>Three petri dishes showing the effect of diatom extracts on <i>Enterococcus faecalis</i>. The first dish shows growth in water (voda) and K⁺ water, but inhibition in K⁻ water. The second dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ hexane and K⁻ methanol. The third dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in Kloroform, hexane, and Metanol.</p>
<p>d) <i>Escherichia coli</i></p>	 <p>Three petri dishes showing the effect of diatom extracts on <i>Escherichia coli</i>. The first dish shows growth in water (voda) and K⁺ water, but inhibition in Kloroform and methanol. The second dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ water. The third dish shows growth in water and K⁻ water, but inhibition in K⁻ methanol, K⁻ chloroform, and K⁻ hexane.</p>

<p>e) <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	
<p>f) <i>Salmonella sp.</i></p>	
<p>g) <i>Candida utilis</i></p>	
<p>h) <i>Aspergillus niger</i></p>	

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti:

1. Najpogodnija podloga za fototrofni uzgoj biomase dijatomeje S 5.4. je deset puta koncentrirana f/2 podloga. Specifična brzina rasta dijatomeje iznosila $0,371 \text{ dan}^{-1}$ (generacijsko vrijeme $1,87 \text{ h}^{-1}$) pri čemu je postignuta maksimalna koncentracija biomase od $0,47 \text{ g L}^{-1}$, uz produktivnost biomase od $0,0312 \text{ g biomase L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$.
2. Tijekom polu-kontinuiranog uzgoja postignuta je maksimalna vrijednost produktivnosti biomase od $0,061 \text{ g biomase L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ i produktivnosti biosinteze lipida $14,64 \text{ mg lipida L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ desetog dana uzgoja, dok je maksimalna vrijednost produktivnosti biosinteze eikosapentaenoične kiseline (C20:5) od $3,28 \text{ mg EPA L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ postignuta četvrtog dan uzgoja.
3. Tijekom polukontinuiranog šaržnog uzgoja u fotobioreaktoru kemijski sastav stanice dijatomeje se značajno mijenjao.
 - U biomasi stanice najzastupljenije su bile mineralne tvari čiji je udjel na kraju polukontinuiranog uzgoja iznosio 44,1 %.
 - Sadržaj lipida se najznačajnije mijenjao i to u rasponu od 3 do 24 %. Najveći udio lipida od 24,7 % postignut je na početku stacionarne faze (jedanaesti dan uzgoja).
 - Udjel proteina (22 - 29 %) i ugljikohidrata (4,88 - 5,53%) nije se značajnije mijenjao tijekom uzgoja.
 - Udjel ukupnih klorofila iznosio je 2,11 - 4,15 %. Najveći udjel postignut je na kraju šaržnog dijela uzgoja. Veći dio uzgoja udjel klorofila c_1 i c_2 u stanici bio je višestruko veći od udjela klorofila a.
4. Najzastupljenije masne kiseline u ukupnim lipidima dijatomeje soj 5.4. su: plamitinska (C16:1), palmitoleinska (C16:1), heptadekanoična (C17:1) i eikosapentaenoična kiselina (C20:5).
 - Tijekom uzgoja udjeli najzastupljenijih masnih kiselina se značajno mijenjaju.
 - Palmitinska kiselina (C16) je najzastupljenija tijekom eksponencijalne faze rasta u šaržnom dijelu uzgoja, dok je tijekom polukontinuiranog dijela uzgoja prevladavala palmitoleinska kiselina (C16:1 cis).

- U eksponencijalnoj fazi rasta tijekom šaržnog dijela uzgoja udjel višestruko nezasićene eikosapentaenoične kiselina (C20:5) iznosio je 22,73 %, dok je prijelazom na polukontinuirani uzgoj njezin udjel pao na trećinu navedene vrijednosti.
 - Limitacijom rasta sa silicijem udio jednostruko nezasićenih masnih kiselina raste sa 29,69 % na 54,13 %, dok udio zasićenih masnih kiselina pada s 45,7 % na 34,7 %.
5. Dijatomeja soj 5.4. raste u fototrofnim i miksotrofnim uvjetima dok je rast u potpunosti izostao u heterotrofnim uvjetima. Amonijev klorid i amonijev nitrat pokazali su se najboljim izvorima dušika u fototrofnim uvjetima, dok su se glicerol i melasa najpogodniji izvori ugljika u miksotrofnim uvjetima.
 6. Kloroformski ekstrakt biomasa dijatomeje soj 5.4. sadrži sljedeće pigmente: β -karoten, feofitin, klorofil a, lutein, violaksantin, fukoksantin i klorofil c od kojih je najzastupljeniji fukoksantin.
 7. Nepročišćeni metanolski i heksanski ekstrakti biomase dijatomeje soj 5.4. pokazali su antibakterijsko djelovanje na rast pojedinih gram pozitivnih i gram negativih bakterija, dok je fungicidni učinak nije utvrđen. Metanolski ekstrakt učinkovito je inhibirao rast bakterije *S. aureus*, dok je heksanski ekstrakt inhibirao rast bakterije *S. aureus* i *P. aeruginosa*.
Vodeni i kloroformski ekstrakt biomase dijatomeje soj 5.4. nisu pokazali fungicidno i antibakterijsko djelovanje.

6. LITERATURA

Baweja, P., Sahoo, D. (2016) Classification of Algae. U: *The Algae World* (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.) Springer, Jerusalem, str. 30-55.

Bechet, Q., Laviale, M., Arsapin, N., Bonnefond, H., Bernard, O. (2017) Modeling the impact of high temperatures on microalgal viability and photosynthetic activity. *BiotechnolBiofuels*. **10**, 136.

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*. *JBiotechn*. **142**, 70-77.

Bligh, E.G., Dyer. W.J. (1959) *A rapid method of total lipid extraction and purification*. *CanJ BiochemPhysiol*. **37**, 911-917.

Bruckner, C.G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B., and Kroth, P.G. (2008) Bacteria associated with benthic diatoms from Lake Constance: phylogeny and influences on diatom growth and secretion of extracellular polymeric substances. *ApplEnvironMicrobiol*. **74**, 7740-7749.

Carvalho, J.C.M., Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Ferreira-Camargo, L.S. i Sato, S. (2014) Microalgae Bioreactors. U: *Algal Biorefineries* (Bajpai, R., Prokop, A., Zappi, M., ured.), Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/978-94-007-7494-0

Cuvelier, M., Simmons, M. (2009, 20. travnja) Keller (K) medium in artificial seawater (Keller et al., 1987). *Worlden Lab* [online], < <https://www.mbari.org/wp-content/uploads/2015/11/KASW.pdf> >. Pristupljeno 29. kolovoza, 2019.

d'Ippolito, G., Sardo, A., Paris, D., Vella, F.M., Adelfi, M.G., Botte, P., Gallo, C., Fontana, A. (2015) Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*. doi: 10.1186/s13068-015-0212-4.

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

Edlund, M.B., Stoermer, E.F. (1997) Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *JPhycol.* **33**, 897–918.

Grubišić, M., Ivančić Šantek, M., Šantek, B. (2018) Fatty acid profile of microalgae from adriatic sea // *Book of Abstracts: PhD Candidate Symposium 2018*
Zagreb, Hrvatska (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Guillard, R. R. L. (1975) Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. U: Culture of Marine Invertebrates Animals, (Smith, M.L., Chanley, M.H., ured.), Plenum Press, New York, 29-60. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3

Jeffrey, S. W., Humphrey, G.F. (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a,b,c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem PhysiolPflanzen.* **167**, 191-194.

Jeffrey, S.W., Wright, S.W., Zapata, M. (2011) Microalgal classes and their signature pigments. U: *Phytoplankton characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*, (Roy, S., Llewellyn, C.A., Egeland, E.S., Johnsen, G., ured.), Cambridge University Press, Cambridge, str. 3–77.

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. *Energies*, **6**, 4607-4638.

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. *MicrobCellFact.* **17:36**, doi: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.

Klein Breteler, W.C.M., Schogt, N., Rampen, S. (2005) Effect of diatom nutrient limitation on copepod development: role of essential lipids. *MarEcolProgSer.* **291**, 125–133.

Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K. (2015) Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Mar. Drugs.* **13**, 5847-5881.

Kumar, S., Baweja, P., Sahoo, D. (2016) Diatoms: Yellow or Golden Brown Algae. U: *The Algae World* (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.) Springer, Jerusalem, str. 235-258.

Lavaud, J. (2007) Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *FunctPlantSciBiotechnol.* **1**, 267-287.

Lebeau, T., Robert, J.M. (2003) Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *ApplMicrobiolBiotechnol.* **60**, 612–623.

Lee, R.E. (2008) *Phycology*, 4.izd. Cambridge University Press, Cambridge.

Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q. (2015) Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *AlgalRes.* **12**, 497–512.

Levitan, O. , Jorge Dinamarca, J., Zelzion, E., Lun, D. S., Guerra, L.T., Kim, M.K., Kim, Van Mooy, B.A.S., Bhattacharya,D., Falkowski, P.G. (2015) Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* under nitrogen stress. *PNAS***112**, 412-417.

Liu, X., Duan, S., Li, A., Xu, N., Cai, Z., Hu, Z. (2009) Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum*. *JApplPhycol.* **21**, 239–246.

Mann, D., G., Crawford, R., M., Round, F., E. (2017) Bacillariophyta. U: *Handbook of the Protists*, 2. izd. (Archibald, J., M., Simpson, A.,G.,B., Slamovits, C., H., Margulis, L., Melkonian, M., Chapman, D., J., Corliss, J., O., ured.), Springer, Cham, str. 1-49.

Martin-Jezequel, V., Hildebrand, M., Brzezinski, M.A. (2000) Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *JPhycol.* **36**, 821–840.

Matsumoto, M., Nojima, D., Nonoyama, T., Ikeda, K., Maeda, Y., Yoshino, T., Tanaka, T. (2017) Outdoor cultivation of marine diatoms for year-round production of biofuels. *Mar. Drugs.* **15**, 94, doi:10.3390/md15040094.

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. *Front. Microbiol.* **8**:1239, doi: 10.3389/fmicb.2017.01239.

Mohan, N., Rajaram, M.G., Baskara Boopathy, A., Rengasamy, R. (2012) Biomass and lipid production of marine diatom *Amphiprora paludosa* W. Smith at different nutrient concentrations. *J. Algal Biomass Utln.* **3** (4), 52–59.

Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., Fon Sing, S. (2013) Standard Methods for Measuring Growth of Algae and Their Composition. U: *Algae for Biofuels and Energy* [online] (Borowitzka, M. A., Moheimani, N. R., ured.) Springer, 282-283. < <http://www.jlakes.org/ch/book/978-94-007-5479-9.pdf> >. Pristupljeno 29. kolovoza 2019.

Pahl, S.L., Lewis, D.M., King, K.D., Chen, F. (2012) Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effect of nitrogen

source and concentration. *JApplPhycol.* **24**, 301–307.

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. *Mar. Drugs*, **9**, 1806-1828.

Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., Bashan, Y., (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *WaterRes.* **45**, 11-36.

Posten, C. (2009) Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *EngLifeSci.* **9**, 165-177.

Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B. (2014) Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **9**, 26-36.

Robertson, D. (2018) ALGAL PIGMENTS TABLE OF CONTENTS, The Robertson Laboratory, Clark University Worcester, <
https://wordpress.clarku.edu/debrobertson/laboratory-protocols/algal-pigments/?fbclid=IwAR3P_xUsIcauYnqchW5wfKqTbQ3Il5qLRaNI3RgAD-5sHyL-5atZPZMHknE >. Pristupljeno 13. kolovoza 2019.

Singh, P., Gupta, S. K., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F. (2015) Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques. U: *Handbook of Marine Microalgae* (Kim, S.K., ured.), Elsevier Applied Science, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>.

Singh, S.P., Singh, P. (2015) Effect of temperature and light on the growth of algae species. *RenewSustEnergyRev.* **50**, 431–44.

Van Wychen, S., Laurens, L. M. L. (2013) Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by *in situ* Transesterification. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National laboratory of the U.S. Department of Energy.

Viličić, D. (2002) Fitoplankton jadranskog mora: biologija i taksonomija, Školska knjiga, Zagreb.

Wang, J. K, Seibert, M. (2017) Prospects for commercial production of diatoms. *BiotechnolBiofuels*. **10:16**. doi: 10.1186/s13068-017-0699-y.

Xia, S., Wang, K., Wan, L. L., Li, A. F., Hu, Q., Zhang, C.W. (2013) Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Mar Drugs*, **11**, 2667-2681.

Yang, Z.K, Niu, Y.F., Ma, Y.H., Xue, J., Zhang, M.H., Yang, W.D., Liu, J.S., Lu, S.H., Guan, Y., Li, H.Y. (2013) Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *BiotechnolBiofuels*, **6:67**. doi:10.1186/1754-6834-6-67.

Yi, Z. (2018) Biotechnological approaches to enhance fucoxanthin production in a model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation submitted in partial fulfillment of a Philosophiae Doctor degree in Biology. Faculty of Life and Environmental Sciences. School of Engineering and Natural Sciences, University of Iceland, Reykjavik, 2018.

Zulu, N.N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., Feussner, K. (2018) Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *ProgrLipidRes*. **70**, 1–16.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, reading "Antonija Bajković", is written over a horizontal line.

Ime i prezime studenta