

# Utjecaj selena na akumulaciju lipida u morskoj mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije

---

Galić Perećinec, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:990179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Maja Galić Perečinec

**Utjecaj selena na akumulaciju lipida  
u morskoj mikroalgi *Dunaliella  
tertiolecta* tijekom različitih načina  
kultivacije**

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr.sc. Rozelindra Čož-Rakovac  
prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Maja Galić Perečinec

**Influence of selenium on lipid  
accumulation in the marine  
microalgae *Dunaliella tertiolecta*  
during different cultivation modes**

DOCTORAL THESIS

Supervisors: PhD Rozelindra Čož-Rakovac

PhD Mirela Ivančić Šantek, Full Professor

Zagreb, 2023

*Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković, Zagreb pod mentorstvom dr.sc. Rozelindre Čož–Rakovac, znanstvene savjetnice u trajnom zvanju i prof.dr.sc. Mirele Ivančić Šantek, redovite profesorice, u okviru znanstveno istraživačkog projekta „BioProspecting Jadranskog mora“ financiranog od strane Strukturnih i investicijskih fondova EU u sklopu Operativnog programa „Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.“ (Poziv: Vrhunska istraživanje Znanstvenih centara izvrsnosti KK.01.1.1.01).*

*Informacije o mentoru:* **dr.sc. Rozelindra Čož-Rakovac**, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, Institut Ruđer Bošković

Dr. sc. Rozelindra Čož–Rakovac, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju, diplomirala je 1982. godine, magistrirala 1991. godine i doktorirala 1997. godine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 1989. godine zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković (IRB) kao znanstveni asistent. Od 2001. godine radi kao znanstveni suradnik i voditelj laboratorija, od 2008. godine kao viši znanstveni suradnik, od 2012. godine kao znanstveni savjetnik te od 2017. godine kao znanstveni savjetnik u trajnom zvanju. Voditeljica je i suradnica niza međunarodnih (20) i domaćih znanstvenih (41), razvojno-istraživačkih i strukturnih projekata sa posebnim naglaskom na Znanstveni centar izvrsnosti za bioprospecting mora – BioProCro (2015-2023). Dobitnica je mnogobrojnih nagrada i priznanja od kojih su najvažniji: 2019-Utjecajne žene Hrvatske; 2018-Državna nagrada za znanost; 2018, 2017-2 godišnje nagrade za znanstvenu izvrsnost Instituta Ruđer Bošković u različitim kategorijama; 2016-Godišnja nagrada IRB-a za znanstvenu izvrsnost–Posebno priznanje za izniman doprinos znanstvenoj izvrsnosti i prepoznatljivosti IRB-a; 2014-ARCA–12. međunarodna izložba inovacija, brončana medalja za znanstveni rad: Imunomodulatori u akvakulturi; 2008-Priznanje Grada Otočca za organizaciju znanstveno-stručnih konferencija u Otočcu; 2008-Priznanje za doprinos razvoju Hrvatskog centra za autohtone vrste riba i rakova krških voda. Nositeljica je nastave na poslijediplomskom studiju Ribarstvo na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom doktorskom studiju molekularne bioznanosti na Sveučilištu u Dubrovniku, sveučilištu JJ Strossmayera u Osijeku i IRB modulu Biologija mora. Objavila je ukupno 221 rad od kojih je 91 rad citiran u WoS/CC bazi, 97 radova je citirano u SCOPUS bazi, 47 u drugim bibliografskim bazama, 12 radova u zborniku skupa, 86 sažetaka u zborniku skupa i 2 knjige. Organizirala je 7 domaćih i međunarodnih skupova, s naglaskom na organizaciju konferencije "Znanost susreće gospodarstvo", gdje je kao Savjetnica za gospodarstvo IRB-a pokušala približiti znanost gospodarstvu. Osnovala je Laboratorij za biotehnologiju u akvakulturi 2002. godine te je osnovala, opremila i uspostavila jedinicu za histologiju/histokemiju biokemijske analize tkiva, akvatičnu jedinicu za pokuse na ribama zebricama (*Danio rerio*), jedinicu za molekularne analize, mikrobiološki laboratorij te u novije vrijeme i jedinicu za bioprocese sa bioreaktorskim sustavom. Također je suosnivačica Hrvatskog centra za autohtone ribe i rakove krških voda, Otočac zajedno s Gradom Otočac, koji su zajedno opremili preko EU Fondova 2007-2008: PHARE projekt.

*Informacije o mentoru:* **prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek**, redovita profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek rođena je 21. lipnja 1971. godine u Splitu. Diplomirala je 1996. godine i magistrirala 2000. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu (PBF-u), a doktorirala 2005. godine na Tehničkom sveučilištu u Grazu (Technische Universität Graz, Austrija). Od 1997. godine zaposlena je na PBF-u Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva. Od 2007. godine radi u znanstveno-nastavnom zvanju docenta, od 2012. godine u zvanju izvanrednog profesora, a od 2018. godine u zvanju redovitog profesora. Aktivno je bila uključena u realizaciju šest nacionalnih znanstveno-istraživačkih projekata, jednog tehnologijskog razvojno-istraživačkog projekta, te tri međunarodna projekta. Aktivno sudjeluje u radu Znanstvenog centra izvrsnosti za bioprospecting mora BioProCro. Voditeljica je znanstveno-tehnološkog bilateralnog projekta. Područje znanstveno-istraživačke djelatnosti prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek vezano je uz bioproceno inženjerstvo, matematičko modeliranje bioprocena, molekularnu biologiju i proteinsko inženjerstvo. Objavila je ukupno trideset i pet znanstvenih radova od kojih su dvadeset i četiri znanstvena rada klasificirana u a1 skupini, šest radova u a2 skupini, te pet radova s kongresa i skupova u kategoriji a3 rada (327 puta citirana, h-indeks 9 prema ISI Web of Science). Također je objavila poglavlje u znanstvenoj knjizi s međunarodnom recenzijom te jedan međunarodni patent koji se primjenjuje u komercijalnoj proizvodnji lijekova. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek bila je pozvani predavač na pet međunarodnih znanstvenih skupova. Sudjelovala je na dvadeset tri međunarodna i pet nacionalnih znanstvenih skupova s trideset i tri priopćenja. Također je bila predsjedavajući član na jednom međunarodnom znanstvenom skupu te članica znanstvenog odbora dva međunarodna znanstvena skupa. Prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek koordinatrica je dva modula i suradnica na pet modula na diplomskom studiju Bioprocenog inženjerstva te koordinatrica jednog modula na poslijediplomskom studiju Biotehnologije i bioprocenog inženjerstva, prehrambene tehnologije i nutricionizam na PBF-a Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je više domaćih i međunarodnih nagrada: Rektorove nagrade Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studentski rad (1995.), potpore Biotehničke zaklade PBF-a (1997.), godišnje nagrade Biotehničke zaklade PBF-a (2000.), DSM Innovation Award (DSM, Nizozemska, 2007.) te nagrade Dr. Wolfgang Houska Preis (B&C Privatstiftung, Austrija, 2008.). Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa.

# ZAHVALA

*Od srca zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Rozelindri Čož-Rakovac na podršci, stručnim savjetima i kontinuiranoj motivaciji tijekom cijelog procesa izrade ovog doktorskog rada. Hvala Vam što ste mi pružili priliku za doktorat, što ste vjerovali u mene i što ste mi omogućili da ostvarim sve svoje ciljeve.*

*Također, zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Mireli Ivančić Šantek na savjetima, vodstvu i podršci tijekom izrade ovog doktorskog rada. Vaše vrijedne smjernice i stručnost bile su izuzetno važne i značajne za izradu ovog doktorskog rada.*

*Iskreno se zahvaljujem svojim dragim kolegicama dr.sc. Sanji Babić i dr.sc. Lari Čižmek na neizmjerne podršci i pomoći tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala vam na predanosti, strpljenju i na svom uloženom vremenu i trudu kako biste mi pomogle.*

*Također, želim izraziti zahvalnost ostalim članovima Laboratorija za biotehnologiju u akvakulturi na podršci i ohrabrenju tijekom izrade i pisanja doktorskog rada.*

*Veliko hvala mojim kolegicama Luciji, Mariji i Tamari koje su mi olakšale pisanje ovog doktorskog rada. Hvala vam na podršci i prijateljstvu.*

*Hvala mojoj obitelji na njihovoj bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene tijekom čitavog mog akademskog putovanja.*

*Posebno se zahvaljujem suprugu Domagoju. Hvala ti na ljubavi, strpljenju i riječima ohrabrenja. Hvala ti što si uvijek bio tu da me saslušаш. Ti si moja najveća podrška i životni oslonac!*

*Hvala mom sinu Jakovu koji mi je vječna inspiracija i motivacija potičući me da idem dalje i više nego što sam ikada mislila da je moguće.*

Tema doktorskog rada prihvaćena je na redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akad. godinu 2020./2021. održanoj dana 27. siječnja 2021. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 13. rujna 2022. godine.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 604.4:662.6:579:639.64:669.776(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## UTJECAJ SELENA NA AKUMULACIJU LIPIDA U MORSKOJ MIKROALGI *DUNALIELLA TERTIOLECTA* TIJEKOM RAZLIČITIH NAČINA KULTIVACIJE

Maja Galić Perećinec, mag.ing. bioproc.

Rad je izrađen u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković, Zagreb

Mentori: dr.sc. Rozelindra Čož-Rakovac, znanstvena savjetnica u trajnom zvanju

prof.dr.sc. Mirela Ivančić Šantek, redovita profesorica

### Kratki sažetak:

Mikroalge imaju široku primjenu u proizvodnji biomase i biološki aktivnih spojeva. Glavni istraživački ciljevi bili su: utvrditi učinak različitih koncentracija anorganskog oblika selena (natrijevog selenita) na brzinu rasta, fotosintetsku aktivnost, razinu oksidativnog stresa i akumulaciju neutralnih lipida u morskoj mikroalgi *D. tertiolecta*, istražiti učinak selenita u hranjivoj podlozi na akumulaciju lipida tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalgi te ispitati izvedivost povećanja uzgoja i sinteze lipida s mikroalgama u laboratorijskom fotobioreaktoru uz dodatak selenita. Najveće vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{680}=0,67$ ) i gustoće stanica ( $43,11 \times 10^5$  stanica  $mL^{-1}$ ) postignute su tijekom 10. dana dvostupanjskog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru u podlozi obogaćenoj sa  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita. Izlaganje mikroalge *D. tertiolecta* povišenim koncentracijama selenita ( $20,00$  i  $40,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) rezultiralo je povećanom koncentracijom malondialdehida (MDA) i drugih spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), što ukazuje na peroksidaciju lipida u stanicama mikroalgi. I u manjem ( $100 \text{ mL}$ ) i u većem mjerilu ( $2 \text{ L}$ ) uzgoja, najveće povećanje udjela neutralnih lipida zabilježeno je 14. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita. Tijekom uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru najveći udio neutralnih lipida zabilježen je 11. dana uzgoja na  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita te je bio  $27,67$  puta veći u odnosu na najveći udio lipida dobiven tijekom uzgoja u manjem mjerilu ( $100 \text{ mL}$ ). Usporedbom sastava masnih kiselina zabilježeno je značajno povećanje udjela palmitinske kiseline ( $C16:0$ ) i oleinske kiseline ( $C18:1$  cis 9) što je povoljno za proizvodnju biodizela. Također, analiza sastava masnih kiselina pokazala je prisutnost različitih masnih kiselina važnih u kontekstu proizvodnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (palmitoleinska ( $C16:1$  cis 9), linoelaidinska ( $C18:2$  trans 9, 12), linolenska ( $C18:2$  cis 9, 12) i  $\gamma$ -linolenska kiselina ( $C18:3$  cis 6, 9, 12)). Uspoređujući izračunate vrijednosti četiri bitna fizikalna svojstva biodizela (cetanski broj ( $\Phi_b$ ), kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ), gustoća ( $\rho_b$ ) i viša kalorična vrijednost ( $\delta_b$ )) s vrijednostima standarda (ASTM D6751 i EN 14214) zaključeno je da biodizel proizveden transesterifikacijom lipida biomase mikroalgi *D.tertiolecta* uzgajanih pri različitim koncentracijama selenita zadovoljava sve zahtjeve standarda za proizvodnju biodizela. Dodavanje selenita u hranjivi medij mikroalge *D. tertiolecta* predstavlja potencijalnu strategiju za povećanje prinosa neutralnih lipida te poboljšanje potencijala uporabe lipida mikroalge *D. tertiolecta* za proizvodnju biodizela.

Broj stranica: 226

Broj slika: 28

Broj tablica: 16

Broj literaturnih navoda: 284

Broj priloga: 7

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: mikroalge, *D. tertiolecta*, pigmenti, oksidativni stres, karotenoidi, lipidi, fotobioreaktor, dvostupanjski uzgoj

Datum obrane: 27. listopada 2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. prof. dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković
3. dr. sc. Sanja Babić, znanstvena suradnica

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 604.4:662.6:579:639.64:669.776(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### INFLUENCE OF SELENIUM ON LIPID ACCUMULATION IN THE MARINE MICROALGAE *DUNALIELLA TERTIOLECTA* DURING DIFFERENT CULTIVATION MODES

Maja Galić Perečinec, MSc

Thesis performed in Laboratory for Aquaculture Biotechnology, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

Supervisors: PhD Rozelindra Čož-Rakovac, senior scientist

PhD Mirela Ivančić Šantek, Full Professor

#### Short abstract:

Microalgae have a wide range of applications in biomass production and the production of bioactive compounds. The main research objectives were to determine the effect of different concentrations of inorganic selenium (sodium selenite) on the growth rate, photosynthetic activity, oxidative stress levels, and neutral lipid accumulation in the marine microalga *D. tertiolecta*, investigate the effect of selenite in the nutrient medium on lipid accumulation during one-stage and two-stage microalgae cultivation, and examine the feasibility of increasing microalgal growth and lipid synthesis in a laboratory photobioreactor with the addition of selenite. The highest values of optical density ( $OD_{680}=0.67$ ) and cell density ( $43.11 \times 10^5$  cells  $mL^{-1}$ ) were achieved on the 10<sup>th</sup> day of two-stage cultivation in a laboratory photobioreactor in a medium enriched with 20.00 mg  $L^{-1}$  of selenite. Exposure of the microalga *D. tertiolecta* to elevated concentrations of selenite (20.00 and 40.00 mg  $L^{-1}$ ) resulted in an increased concentration of malondialdehyde (MDA) and other thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), indicating lipid peroxidation in microalgal cells. In both small (100 mL) and large-scale (2 L) cultivation, the highest increase in neutral lipid content was recorded on the 14<sup>th</sup> day of two-stage cultivation in a microalgal culture containing 20.00 mg  $L^{-1}$  of selenite. During cultivation in the laboratory photobioreactor, the highest neutral lipid content was recorded on the 11<sup>th</sup> day of cultivation with 20.00 mg  $L^{-1}$  of selenite, and it was 27.67 times higher than the highest lipid content obtained during microalgal cultivation on a smaller scale (100 mL). A comparison of the fatty acid composition showed a significant increase in the proportion of palmitic (C16:0) and oleic acid (C18:1 cis 9), which is favourable for biodiesel production. Additionally, the fatty acid composition analysis revealed the presence of various fatty acids important for the production of polyunsaturated fatty acids (palmitoleic (C16:1 cis 9), linoleic acid (C18:2 trans 9, 12), linolenic (C18:2 cis 9, 12), and  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3 cis 6, 9, 12)). Comparing the calculated values of four essential physical properties of biodiesel (cetane number ( $\Phi_b$ ), kinematic viscosity ( $\eta_b$ ), density ( $\rho_b$ ), and higher heating value ( $\delta_b$ )) with standard values (ASTM D6751 and EN 14214), it was concluded that biodiesel produced by transesterification of microalgal biomass lipids grown at different concentrations of selenite meets all the requirements for biodiesel production standards. Adding selenite to the nutrient medium of the microalga *D. tertiolecta* represents a potential strategy to increase the yield of neutral lipids and improve the potential use of *D. tertiolecta* microalgal lipids for biodiesel production.

Number of pages: 226

Number of figures: 28

Number of tables: 16

Number of references: 284

Original in: Croatian

Key words: *Microalgae*, *D. tertiolecta*, *Oxidative stress*, *Carotenoids*, *Lipids*, *Photobioreactor*, *Two-stage cultivation*

Date of the thesis defense: October 27, 2023

#### Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full Professor
2. PhD Ivana Radojčić Redovniković, Full Professor
3. PhD Sanja Babić, Scientific Adviser

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4. and in University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

## SAŽETAK

Mikroalge su fotosintetski mikroorganizmi s jednostavnom staničnom strukturom koja im omogućava brzi rast, čak i u nepovoljnim okolišnim uvjetima (Dolganyuk i sur., 2020a). Mikroalge imaju široku primjenu u proizvodnji biomase i biološki aktivnih spojeva kao što su proteini, polisaharidi, masne kiseline, vitamini, antioksidansi, pigmenti, lijekovi i imunostimulansi (Brennan i Owende, 2010; Chisti, 2006; Garrido-Cardenas i sur., 2018). Zbog svoje sposobnosti prilagodbe različitim uvjetima uzgoja i proizvodnje mnogobrojnih aktivnih spojeva, mikroalge se također ističu kao potencijalni izvor biogoriva poput biodizela, bioetanela, metana i biovodka. Lipidi mikroalgi predstavljaju vrijedan izvor zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina koje se mogu koristiti za proizvodnju biodizela, ekološki prihvatljivog obnovljivog goriva. Osim toga, lipidi mikroalgi također sadrže vrijedne spojeve, poput višestruko nezasićenih masnih kiselina, koji se primjenjuju u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Guschina i Harwood, 2006). Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se istražuju različiti načini stimulacije sinteze lipida u mikroalgama (Chernova i sur., 2017). Za svoj rast i razvoj morske mikroalge zahtijevaju određene hranjive tvari kao što su ugljik, dušik i fosfor, kao i elemente u tragovima (željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ), bakar ( $\text{Cu}^{2+}$ ), cink ( $\text{Zn}^{2+}$ ), mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ), molibden ( $\text{Mo}^{6+}$ ) i kobalt ( $\text{Co}^{2+}$ )). Ono što selen ( $\text{Se}^{4+}$ ) čini posebno zanimljivim među prirodnim elementima u tragovima je njegova dvostruka uloga kao esencijalnog mikronutrijenta i toksične tvari, koja ovisi o koncentraciji u biološkim sustavima i ekosustavima (Schiavon i sur., 2017). Iako postoje određena saznanja o pozitivnom djelovanju niskih koncentracija Se na brzinu rasta određenih vrsta mikroalgi, u trenutno dostupnoj znanstvenoj literaturi nedostaje informacija o utjecaju različitih koncentracija Se na akumulaciju lipida u mikroalgama. Kako bi se utvrdilo na koji način različite koncentracije Se utječu na akumulaciju lipida u mikroalgama, osobito u kontekstu proizvodnje biogoriva, odnosno biodizela, eksperimentalni dizajn ovog doktorskog rada osmišljen je u vidu testiranja različitih koncentracija natrijevog selenita, kao izvora Se, na zelenu morsku mikroalgu *Dunaliella tertiolecta* tijekom različitih načina uzgoja i u različitim mjerilima.

Tri glavna cilja ovog doktorskog rada su: 1. utvrditi učinak različitih koncentracija anorganskog oblika selena, odnosno natrijevog selenita na brzinu rasta, fotosintetsku aktivnost, razinu oksidativnog stresa i akumulaciju neutralnih lipida u morskoj mikroalgi *D. tertiolecta*; 2. istražiti učinak natrijevog selenita u hranjivom mediju na akumulaciju lipida tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalgi *D. tertiolecta*; 3. ispitati izvedivost

povećanja uzgoja i sinteze lipida s mikroalgama *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru uz dodatak natrijevog selenita.

Najveće vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{680}=0,67$ ) i gustoće stanica ( $43,11 \times 10^5$  stanica  $mL^{-1}$ ) postignute su tijekom 10. dana dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u podlozi obogaćenju sa  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru. Tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu ( $100 \text{ mL}$ ) u kulturama mikroalgi koje su sadržavale koncentracije selenita od  $10,00$  i  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  zabilježeno je povećanje koncentracije oba fotosintetska pigmenta (klorofil a i b), dok je tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja povećanje koncentracije oba fotosintetska pigmenta (klorofil a i klorofil b) zabilježeno u kulturama koje su sadržavale niže testirane koncentracije selenita ( $0,62$ ,  $1,25$  i  $2,50 \text{ mg L}^{-1}$ ). Tijekom 13. i 15. dana dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena  $2 \text{ L}$ ) u svim kulturama mikroalgi (osim kontrolne grupe) zabilježen je značajan pad koncentracije klorofila a u odnosu na 2. dan uzgoja. Suprotno tomu, značajno smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na 2. dan uzgoja zabilježeno je samo u kulturama mikroalgi koje su sadržavale  $80,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita (13. i 15. dan uzgoja). Tijekom 15-dnevnog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u hranjivoj podlozi s  $NaNO_3$  kao izvorom dušika i  $NaH_2PO_4 \times H_2O$  kao izvorom fosfora, u svim testiranim mikroalganim kulturama zabilježena je postepena potrošnja i dušika i fosfora što ukazuje na činjenicu da su mikroalge aktivno koristile i dušik i fosfor za svoj rast i metabolizam. Izlaganje mikroalge *D. tertiolecta* povišenim koncentracijama selenita ( $20,00$  i  $40,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) rezultiralo je povećanom koncentracijom malondialdehida (MDA) i drugih spojeva reaktivnih s tiobarbiturnom kiselinom (TBARS), što ukazuje na peroksidaciju lipida u stanicama mikroalgi. I u manjem ( $100 \text{ mL}$ ) i u većem mjerilu ( $2 \text{ L}$ ) uzgoja, najveće povećanje udjela neutralnih lipida zabilježeno je 14. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita. Tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u podlozi obogaćenju s  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru najveći udio neutralnih lipida zabilježen je 11. dana uzgoja te je bio  $27,67$  puta veći u odnosu na najveći udio lipida dobiven tijekom mikroalgalnog uzgoja u manjem mjerilu ( $100 \text{ mL}$ ). Dodavanje selenita u hranjivi medij mikroalge *D. tertiolecta* predstavlja potencijalnu strategiju za povećanje prinosa neutralnih lipida te poboljšanje potencijala uporabe lipida mikroalge *D. tertiolecta* za proizvodnju biodizela. Usporedbom sastava masnih kiselina lipidnih frakcija kultura mikroalgi uzgajanih pri različitim koncentracijama selenita s kontrolnom skupinom zabilježeno je značajno povećanje udjela palmitinske kiseline ( $C16:0$ ) i oleinske kiseline ( $C18:1 \text{ cis } 9$ ) što je povoljno za proizvodnju biodizela. Osim toga, analiza sastava masnih kiselina

ukazala je na prisutnost različitih masnih kiselina važnih u kontekstu proizvodnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9), linoelaidinska kiselina (C18:2 trans 9, 12), linolenska kiselina (C18:2 cis 9, 12) i  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6, 9, 12)). Na temelju empirijskih jednadžbi i analize sastava masnih kiselina izračunate su vrijednosti četiri bitna fizička svojstva biodizela: cetanski broj ( $\Phi_b$ ), kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ), gustoća ( $\rho_b$ ) i viša kalorična vrijednost ( $\delta_b$ ). Uspoređujući izračunate vrijednosti s vrijednostima standarda (ASTM D6751 i EN 14214) može se zaključiti da biodizel proizveden transesterifikacijom lipida iz biomase mikroalgi uzgajanih pri različitim koncentracijama selenita u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) i laboratorijskom fotobioreaktoru (20,00 mg L<sup>-1</sup>) zadovoljava sve zahtjeve standarda za proizvodnju biodizela. Uz pomoć metode spektrometrije masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS), u svim testiranim mikroalgalnim kulturama zabilježeno je smanjenje koncentracije selenita tijekom vremena što ukazuje na sposobnost mikroalge *D. tertiolecta* da apsorbira selenit iz medija te ga koristi u biološkim procesima. U svrhu istraživanja potencijala biomase mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u prisutnosti varirajućih koncentracija selenita za proizvodnju višestruko nezasićenih masnih kiselina proveden je Ames test. Na temelju rezultata Ames testa provedenog na metanolnoj (F3) i diklorometanskoj (F4) frakciji mikroalge *D. tertiolecta* tretiranih različitim koncentracijama selenita, može se zaključiti da navedene frakcije nisu pokazale nikakve mutagene ili premutagene učinke.

## EXTENDED SUMMARY

Microalgae are photosynthetic microorganisms with a relatively simple cellular structure, enabling them to grow rapidly even in unfavourable environmental conditions. They possess the remarkable ability to convert inorganic compounds (such as carbon dioxide and minerals) into biomass through photosynthesis (Dolganyuk et al., 2020). Microalgae have diverse applications in various fields, including biomass production, the extraction of bioactive compounds (such as antioxidants, pigments, and omega-3 fatty acids), and their potential use as a source of biofuels (Brennan and Owende, 2010; Chisti, 2006; Garrido-Cardenas et al., 2018). Lipids derived from microalgae are of particular interest for biodiesel production and various industries due to their richness in valuable fatty acids and compounds, including polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as omega-3 and omega-6 fatty acids. Microalgae can accumulate a significant amount of lipids, particularly under specific growth conditions. However, inducing lipid production or enhancing lipid content in microalgae has been the focus of intensive research (Chernova et al., 2017). Marine microalgae, like all organisms, depend on a diverse array of nutrients for their growth and development. These nutrients include macro elements such as carbon, nitrogen, and phosphorus, as well as trace elements like iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ), copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), manganese ( $\text{Mn}^{2+}$ ), molybdenum ( $\text{Mo}^{6+}$ ), and cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ). What makes selenium ( $\text{Se}^{4+}$ ) particularly intriguing among natural trace elements is its dual potential as both an essential micronutrient and a toxic substance. This duality depends on its concentration in biological and environmental systems. (Schiavon et al., 2017). While we comprehend that low concentrations of selenium positively influence the growth rate of certain microalgae species, the existing scientific literature lacks information about the precise impact of varying selenium concentrations on lipid accumulation in microalgae. As a result, this doctoral thesis aims to address this knowledge gap and establish three primary goals:

1. to ascertain the impact of varying concentrations of sodium selenite on the growth rate, photosynthetic activity, oxidative stress levels, and accumulation of neutral lipids in the marine microalgae *D. tertiolecta*
2. to investigate the effect of sodium selenite in the nutrient medium on lipid accumulation during one-stage and two-stage cultivation of microalgae *D. tertiolecta*
3. to examine the feasibility of scaling up the cultivation and lipid synthesis with microalgae *D. tertiolecta* in a laboratory-scale photobioreactor with the addition of sodium selenite

## Methodology

This doctoral research comprises several phases. The initial phase involved investigating the impact of cascading dilutions of inorganic selenium, ranging from 0.31 mg L<sup>-1</sup> to 120.00 mg L<sup>-1</sup>, specifically sodium selenite (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>), on the growth of the marine microalga *D. tertiolecta*. The growth inhibition of the algae resulting from selenium exposure was evaluated following the guidelines established by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD, 2011). The second phase of the study centred on investigating the impact of a more confined range of selenite concentrations (0.31-40.00 mg L<sup>-1</sup>) on *D. tertiolecta*. This investigation was conducted during both one-stage and two-stage cultivation, carried out on a smaller scale using 100 mL Erlenmeyer flasks. The concentration of photosynthetic pigments (chlorophyll a and b) was determined using the spectrophotometric method as outlined by Lichtenthaler, 1987 (Pancha et al., 2015). The concentration of individual carotenoids was determined using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Alemán-Nava et al., 2016). Lipid peroxidation was identified by a colour change caused by elevated levels of malondialdehyde and other compounds reactive with thiobarbituric acid under acidic conditions. The concentration of neutral lipids in *D. tertiolecta* was quantified using the spectrophotometric Nile Red (NR) method. Lipid bodies were visualized using NR dye and a fluorescent microscope equipped with a blue fluorescent filter as the light source (Rumin et al., 2015). In the third phase of the doctoral thesis, a more in-depth exploration was conducted on the concentrations of selenite that exhibited the greatest benefit for neutral lipid accumulation in *D. tertiolecta*, as identified in the second phase of the study. Alongside the aforementioned analyses, the concentrations of nitrate and phosphate in the nutrient medium were also measured. Furthermore, the levels of selenite in the nutrient medium during cultivation were quantified using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Levy et al., 2005). The fatty acid composition of *D. tertiolecta* was determined by gas chromatography (GC-FID) after in situ transesterification of lipids, following the protocol of the National Renewable Energy Laboratory (NREL), USA (Wychen, S Van, 2013). The fatty acid composition was utilized to calculate the properties of the resulting biodiesel (Deshmukh et al., 2019). The concluding phase of the research involved conducting batch cultivation of *D. tertiolecta* in a laboratory-scale photobioreactor (3 L) with agitation under continuous illumination. The concentration of selenite employed for cultivation in the photobioreactor was chosen based on the findings from the preceding research phase. This segment of the study sought to offer insights into the scalability of the process and its potential for industrial applications.

## Results and discussion

In the initial phase of the doctoral dissertation, a notable decrease in the optical density of the cell culture was evident at 24, 48, and 72 hours of cultivation across all tested selenite concentrations (ranging from 0.31 mg L<sup>-1</sup> to 120.00 mg L<sup>-1</sup>) when compared to the control group (0.00 mg L<sup>-1</sup> selenite). This observation underscores the considerable influence of selenite on microalgae growth. The second part of the doctoral dissertation explored the impacts of a narrower range of selenite concentrations (0.31-40.00 mg L<sup>-1</sup>) on various factors including growth dynamics, photosynthetic pigments, carotenoids, oxidative stress, and neutral lipid content in *D. tertiolecta* microalgae. This investigation encompassed both one-stage and two-stage cultivation conducted on a smaller scale (100 mL Erlenmeyer flasks). The findings indicated that lower selenite concentrations (0.31, 0.62, 1.25 mg L<sup>-1</sup>) had no adverse effects on microalgae growth in both cultivation modes. However, higher concentrations (10.00, 20.00, and 40.00 mg L<sup>-1</sup>) hindered microalgal growth in the one-stage cultivation mode. Selenite also displayed a stimulating effect on microalgal growth (one-stage cultivation–10.00 and 20.00 mg L<sup>-1</sup>; two-stage cultivation-0.31 mg L<sup>-1</sup>). When comparing cell density results between two-stage cultivations carried out at varying scales (small scale: 100 mL and large scale: 2 L), an earlier manifestation of the inhibitory effect of selenite on microalgal growth was evident in the small-scale cultivation. The peak cell density values ( $43.11 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>) were attained on the 10<sup>th</sup> day of two-stage cultivation of *D. tertiolecta* microalgae in a culture medium enriched with 20.00 mg L<sup>-1</sup> of selenite within a laboratory photobioreactor. The results of one-stage and two-stage cultivation of microalga *D. tertiolecta* in 100 mL volumes with various selenite concentrations (0.31-40.00 mg L<sup>-1</sup>) demonstrated significant increases in both photosynthetic pigments (chlorophyll a and b) concentrations in certain cultures. In one-stage cultivation, higher selenite concentrations (10.00 and 20.00 mg L<sup>-1</sup>) led to increased chlorophyll a and b levels. In two-stage cultivation, chlorophyll a increased at selenite concentrations ranging from 1.25 to 40.00 mg L<sup>-1</sup>, while chlorophyll b increased only at the lowest selenite concentration (0.31 mg L<sup>-1</sup>). Regarding the impact of higher selenite concentrations (20.00, 40.00, and 80.00 mg L<sup>-1</sup>) on photosynthetic pigment concentration during two-stage cultivation in larger volumes (2 L), the inhibitory effect of selenite on pigment synthesis was evident from the 10<sup>th</sup> day onwards. Selenium stimulated chlorophyll a synthesis on all sampling days from the start of the second phase of two-stage cultivation (10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, and 15<sup>th</sup> days), whereas the stimulatory effect on chlorophyll b was observed only in cultures containing 20.00 mg L<sup>-1</sup> of selenite.



In both one-stage and two-stage cultivation, selenium exhibited stimulatory and inhibitory effects on total carotenoid synthesis. In two-stage cultivation, a selenium-induced stimulation of total carotenoid synthesis was observed on the 10<sup>th</sup> day within the selenite concentration range of 0.31 to 10.00 mg L<sup>-1</sup>. Moreover, during two-stage cultivation in larger volumes (2 L) at different selenite concentrations (20.00, 40.00, and 80.00 mg L<sup>-1</sup>), a statistically significant increase in total carotenoids was noted on the 9<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> days compared to the control group.

Over the 15-day cultivation period of microalga *D. tertiolecta* in a nutrient medium with NaNO<sub>3</sub> as the nitrogen source and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2 H<sub>2</sub>O as the phosphorus source, a progressive depletion of both nitrogen and phosphorus was observed in all tested microalgal cultures. This suggests the active utilization of nitrogen and phosphorus by the microalgae for their growth and metabolic processes. Exposing *D. tertiolecta* microalgal cells to selenite concentrations ranging from 2.50 to 20.00 mg L<sup>-1</sup> in smaller volumes (100 mL) led to elevated malondialdehyde (MDA) concentration and other reactive thiobarbituric acid substances (TBARS), indicating lipid peroxidation within the microalgal cells. The heightened TBARS concentrations can be attributed to increased selenite levels, which stimulate the generation of reactive oxygen species (ROS). The most notable surge in neutral lipid content occurred on the 14<sup>th</sup> day of two-stage cultivation in the microalgal culture enriched with 20.00 mg L<sup>-1</sup> of selenite, both in smaller scale (100 mL) and larger scale (2 L) setups. While cultivating microalga *D. tertiolecta* in a medium enriched with 20.00 mg L<sup>-1</sup> of selenite within a laboratory photobioreactor, the highest proportion of neutral lipids was observed on the 11<sup>th</sup> day of cultivation, standing at 27.67 times higher than the peak lipid content achieved during microalgal cultivation in a smaller scale (100 mL). The incorporation of selenite into the nutrient medium of *D. tertiolecta* presents a potential approach to amplify neutral lipid yield and enhance the viability of *D. tertiolecta* lipids for biodiesel production. By comparing the fatty acid composition of lipid fractions from microalgal cultures cultivated at different selenite concentrations with the control group, a notable increase in the proportion of palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1 cis 9) was evident, which is advantageous for biodiesel production. Furthermore, the analysis of fatty acid composition in lipid samples showcased the presence of various fatty acids crucial for the production of polyunsaturated fatty acids, including palmitoleic acid (C16:1 cis 9), linoleic acid (C18:2 trans 9, 12), linolenic acid (C18:2 cis 9, 12), and  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3 cis 6, 9, 12). Based on empirical equations and an analysis of the fatty acid composition, calculations were performed for four crucial physical properties of biodiesel: cetane number ( $\Phi_b$ ), kinematic viscosity ( $\eta_b$ ), density ( $\rho_b$ ), and higher heating value ( $\delta_b$ ). Upon comparing the calculated values

with the standard requirements (ASTM D6751 and EN 14214), it can be inferred that biodiesel produced through the transesterification of lipids derived from microalgae biomass cultivated at varying selenite concentrations on a larger scale (using 2 L Erlenmeyer flasks) (20.00, 40.00, and 80.00 mg L<sup>-1</sup>), as well as in a laboratory photobioreactor (20.00 mg L<sup>-1</sup>), fulfills all the standard prerequisites for biodiesel production. By employing high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), a decline in selenite concentration over time was noted within all examined microalgal cultures. This observation suggests the capability of *D. tertiolecta* microalgae to uptake selenite from the surrounding medium and incorporate it into biological processes. For the purpose of investigating the potential of biomass from microalgae *D. tertiolecta* cultivated in the presence of varying selenium concentrations for the production of polyunsaturated fatty acids, an Ames test was conducted. Based on the results of the Ames test performed on the methanolic (F3) and dichloromethane (F4) fractions of *D. tertiolecta* microalgae, it can be concluded that the mentioned fractions did not exhibit any mutagenic or pre-mutagenic effects.

### Conclusions

1. During 72-hour cultivation of *D. tertiolecta* microalgae in microtiter plates (V=200 µL), selenite hindered microalgal growth across all tested cultures (0.31 to 120.00 mg L<sup>-1</sup>). The most significant inhibitory effect occurred at the highest tested selenite concentrations (80.00, 100.00, and 120.00 mg L<sup>-1</sup>).
2. The second phase of the doctoral dissertation revealed that selenite concentrations notably influence the growth dynamics of *D. tertiolecta* microalgae. Lower concentrations had no negative impact on microalgae growth, while higher concentrations hindered growth, especially in one-stage cultivation. Furthermore, the results highlighted the impact of cultivation scale, as the inhibitory effect of selenite on microalgae growth emerged earlier in smaller-scale cultivation.
3. The results reveal a concentration-dependent relationship between selenium and pigment concentrations. These findings imply that the impact of selenium on the synthesis of chlorophyll a and chlorophyll b is contingent upon the cultivation conditions of the microalga *D. tertiolecta*, including selenium concentration, cultivation process type (one-stage or two-stage), and cultivation vessel volume.
4. Over the course of a 15-day cultivation of *D. tertiolecta* microalgae in a nutrient medium with NaNO<sub>3</sub> as the nitrogen source and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>×2 H<sub>2</sub>O as the phosphorus source, a progressive reduction in nitrogen and phosphorus content was noted across all examined

microalgal cultures. This observation indicates the active uptake of nitrogen and phosphorus by the microalgae for their growth and metabolic activities.

5. Subjecting *D. tertiolecta* microalgae to elevated selenite concentrations led to a rise in malondialdehyde (MDA) concentration and other thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), signifying lipid peroxidation within the microalgal cells. These elevated TBARS levels can be linked to higher selenite concentrations, which trigger the generation of reactive oxygen species (ROS).

6. The addition of 20.00 mg L<sup>-1</sup> selenite to the *D. tertiolecta* microalgae culture, in both smaller (100 mL) and larger (2 L) scales, resulted in the most substantial increase in the neutral lipid proportion, observed on the 14th day of the two-stage cultivation. Furthermore, within the selenite-enriched medium of the laboratory photobioreactor, the highest neutral lipid proportion was recorded on the 11th day, demonstrating a 27.67-fold escalation in comparison to the peak lipid content attained in the smaller scale. These findings underscore the potential of selenite supplementation as a promising strategy to enhance neutral lipid production and elevate the lipid potential of *D. tertiolecta* microalgae for biodiesel manufacturing.

7. The existence of diverse fatty acids, including palmitoleic acid (C16:1 cis 9), linoleic acid (C18:2 trans 9, 12), linolenic acid (C18:2 cis 9, 12), and  $\gamma$ -linolenic acid (C18:3 cis 6, 9, 12), greatly enhances the potential of *D. tertiolecta* microalgae for biodiesel synthesis. These fatty acids offer promising prospects due to their advantageous attributes and suitability for biodiesel manufacturing.

8. By employing empirical equations and analyzing the fatty acid composition, the calculated values for four crucial biodiesel properties – cetane number ( $\Phi_b$ ), kinematic viscosity ( $\eta_b$ ), density ( $\rho_b$ ), and higher heating value ( $\delta_b$ ) – were compared with the standards (ASTM D6751 and EN 14214). The outcomes suggest that biodiesel obtained through the transesterification of lipids sourced from microalgal biomass cultivated at distinct selenite concentrations on a larger scale (using 2 L Erlenmeyer flasks) (20.00, 40.00, and 80.00 mg L<sup>-1</sup>) and within a laboratory photobioreactor (20.00 mg L<sup>-1</sup>) conforms to all the requisites of biodiesel production standards.

9. The utilization of high-resolution mass spectrometry combined with inductively coupled plasma (ICP-MS) analysis provided evidence of *D. tertiolecta* microalgae's active intake and utilization of selenite. The observed decline in selenite concentration within all examined microalgal cultures as time progressed signifies the microalgae's proficient capacity to

assimilate and integrate selenite into their biological mechanisms. These findings underscore the capability of *D. tertiolecta* microalgae to serve as effective bioaccumulators of selenium.

10. The Ames test conducted to explore the biomass potential of *D. tertiolecta* microalgae cultivated with different selenium concentrations for polyunsaturated fatty acid production revealed that the methanolic (F3) and dichloromethane (F4) fractions did not demonstrate any mutagenic or pre-mutagenic effects.

## SADRŽAJ:

### 1. UVOD

### 2. TEORIJSKI DIO

|   |    |
|---|----|
| 2.1. Mikroalge.....   | 3  |
| 2.1. Lipidi mikroalgi .....   | 5  |
| 2.2.1. Polarni lipidi mikroalgi .....   | 5  |
| 2.2.2. Lipidi fotosintetskih membrana .....                                   | 7  |
| 2.2.3. Napolarni lipidi mikroalgi.....  | 8  |
| 2.2.4. Proizvodnja lipida - stimulacija sinteze TAG-a.....                    | 9  |
| 2.2.6. Primjena lipida .....  | 11 |
| 2.2.7. Proizvodnja lipida .....   | 13 |
| 2.3. Pigmenti mikroalgi .....   | 15 |
| 2.4. Fotosintetski metabolizam mikroalgi .....                                | 17 |
| 2.5. Oksidativni stres u mikroalgama .....                                    | 19 |
| 2.6. Utjecaj elemenata u tragovima na mikroalge .....                         | 22 |
| 2.6.1. Utjecaj selena na mikroalge .....                                      | 22 |
| 2.7. Bioreaktori za uzgoj mikroalgi .....                                     | 25 |
| 2.7.1. Uvjeti uzgoja i izvor ugljika za uzgoj fotoautotrofnih mikroalgi ..... | 27 |
| 2.7.2. Podjela fotobioreaktora .....  | 34 |
| 2.7.3. Konfiguracije fotobioreaktora.....                                     | 36 |
| 2.8. Načini uzgoja mikroalgi .....  | 43 |

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Materijali .....   | 52 |
| 3.1.1. Radni mikroorganizam.....  | 52 |
| 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga .....   | 52 |
| 3.1.3. Ostale kemikalije .....  | 53 |
| 3.2. Hranjive podloge .....   | 55 |
| 3.2.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture <i>D. tertiolecta</i> i njezina karakterizacija....   | 55 |
| 3.2.2. Hranjiva podloga korištena za istraživanje utjecaja različitih koncentracija selenita na kinetičke i biokemijske parametre <i>D. tertiolecta</i> ..... | 57 |
| 3.3. Oprema i aparatura .....   | 58 |
| 3.3.1. Laboratorijski fotobioreaktor s mješalom .....   | 58 |
| 3.3.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. <i>High performance liquid chromatography</i> , HPLC) .....                            | 59 |
| 3.3.3. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. <i>gas chromatography</i> , GC) .....   | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.4. Ostali uređaji .....   | 61 |
| 3.4. Metode .....   | 62 |
| 3.4.1. Uzgoj inokulma mikroalge <i>D. tertiolecta</i> za provođenje uzgoja u Erlenmeyer tikvicama različitih volumena i laboratorijskom fotobioreктору..... | 62 |
| 3.4.2. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija natrijevog selenita na rast mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....                                      | 62 |
| 3.4.3. Uzgoj mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u Erlenmeyer tikvicama volumena 100 mL.....  | 62 |
| 3.4.4. Uzgoj mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L.....   | 63 |
| 3.4.5. Šaržni i dvostupanjski uzgoj mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u laboratorijskom fotobioreктору.....   | 64 |
| 3.5. Analitičke metode.....   | 66 |
| 3.5.1. Mjerenje optičke gustoće kulture stanica.....  | 66 |
| 3.5.2. Određivanje broja stanica mikroalgi pomoću Neubarove komorice .....  | 66 |
| 3.5.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase mikroalgi .....  | 66 |
| 3.5.4. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi .....  | 67 |
| 3.5.5. Određivanja koncentracije fosfata u podlozi .....  | 67 |
| 3.5.6. Određivanje koncentracije selena u podlozi .....   | 68 |
| 3.5.7. Spektrofotometrijska analiza sastava pigmenata .....   | 69 |
| 3.5.8. Određivanje razine oksidativnog stresa u stanicama mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 69 |
| 3.5.9. Određivanje udjela neutralnih lipida mikroalge <i>D. tertiolecta</i> Nile Red metodom  | 70 |
| 3.5.10. Fluorescentna mikroskopija lipida mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 71 |
| 3.5.11. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 71 |
| 3.5.12. Određivanje koncentracije pigmenata mikroalge <i>D. tertiolecta</i> primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) .....          | 72 |
| 3.5.13. Procjena svojstava biodizela na temelju profila masnih kiselina.....  | 74 |
| 3.5.14. Izračun pokazatelja uspješnosti procesa .....   | 75 |
| 3.5.15. Određivanje mutagenog/genotoksičog potencijala F3 i F4 frakcije mikroalge <i>D. tertiolecta</i> Ames bakterijskim testom .....                      | 76 |
| 3.5.16. Statistika.....   | 78 |

#### 4. REZULTATI

|  |     |
|--|-----|
| 4.1. Testiranje algalne inhibicije pri različitim koncentracijama selenita .....   | 79  |
| 4.2. Utjecaj selenita na biokemijske i kinetičke parametre mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu ..... | 83  |
| 4.2.1. Utjecaj selenita na rast mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....  | 83  |
| 4.2.2. Utjecaj selenita na sintezu fotosintetskih pigmenata mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....  | 87  |
| 4.2.3. Utjecaj selenita na sintezu karotenoida mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 97  |
| 4.2.4. Utjecaj selenita na razinu oksidativnog stresa u kulturi mikroalge <i>D. tertiolecta</i>  | 105 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.5. Utjecaj selen na sintezu neutralnih lipida u kulturi mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 109 |
| 4.2.6. Fluorescentna mikroskopija neutralnih lipida mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom izlaganja različitim koncentracijama selenita .....                         | 112 |
| 4.3. Utjecaj selenita na biokemijske i kinetičke parametre mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L) .....                    | 115 |
| 4.3.1. Utjecaj viših koncentracija natrijevog selenita na rast morske mikroalge <i>D. tertiolecta</i> .....   | 115 |
| 4.3.2. Utjecaj viših koncentracija selenita na fotosintetsku aktivnost mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L) .....        | 120 |
| 4.3.4. Promjena koncentracije dušika i fosfora u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u većem mjerilu (2 L) .....                      | 125 |
| 4.3.5. Utjecaj selenita na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi <i>D. tertiolecta</i> tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L) .....                    | 128 |
| 4.3.6. Utjecaj selen na sastav masnih kiselina mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom uzgoja u većem mjerilu (2 L) .....   | 129 |
| 4.3.7. Svojstva biodizela .....   | 133 |
| 4.3.8. Promjena koncentracije selenita u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u većem mjerilu (2 L) .....                              | 135 |
| 4.4. Uzgoj mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u laboratorijskom fotobioreaktoru .....  | 136 |
| 4.4.1. Utjecaj selenita (20,00 mg L <sup>-1</sup> ) na rast mikroalge <i>D. tertiolecta</i> u laboratorijskom fotobioreaktoru .....                                     | 136 |
| 4.4.2. Utjecaj selenita (20,00 mg L <sup>-1</sup> ) na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi <i>D. tertiolecta</i> uzgajanoj u laboratorijskom fotobireaktoru ..... | 138 |
| 4.4.3. Utjecaj selenita (20,00 mg L <sup>-1</sup> ) na sastav masnih kiselina mikroalge <i>D. tertiolecta</i> uzgajane u laboratorijskom fotobireaktoru .....           | 140 |
| 4.4.4. Svojstva biodizela .....   | 143 |

## 5. RASPRAVA

|  |     |
|--|-----|
| 5.1. Utjecaj selen na rast mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije i u različitim mjerilima .....  | 152 |
| 5.2. Utjecaj selen na fotosintetsku aktivnost mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije .....  | 164 |
| 5.3. Utjecaj selen na sintezu karotenoida u mikroalgi <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije .....  | 170 |
| 5.4. Utjecaj selenita na potrošnju dušika i fosfora u kulturama mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom uzgoja u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) ..... | 173 |
| 5.5. Utjecaj selen na razinu oksidativnog stresa u kulturi mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije .....                                 | 176 |
| 5.6. Utjecaj selen na sintezu neutralnih lipida u kulturi mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije .....                                  | 178 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.7. Fluorescentna mikroskopija neutralnih lipida mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom izlaganja različitim koncentracijama selenita .....  | 182 |
| 5.8. Utjecaj selen na sastav masnih kiselina kulture mikroalge <i>D. tertiolecta</i> tijekom različitih načina kultivacije.....  | 183 |
| 5.9. Svojstva biodizela.....   | 187 |
| 5.10. Promjena koncentracije selenita u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge <i>D. tertiolecta</i> na višim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L <sup>-1</sup> ) ..... | 188 |
| 5.11. Određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala uzoraka Ames bakterijskim testom .....   | 189 |
| <b>6. ZAKLJUČCI</b>  |     |
| <b>7. POPIS LITERATURE</b>   |     |
| <b>8. PRILOZI</b>  |     |
| 8.1. Baždarni dijagrami.....   | 219 |
| <b>9. ŽIVOTOPIS</b>  |     |



## **1. UVOD**

Mikroalge su fotosintetski organizmi koje karakterizira sposobnost apsorpcije sunčeve svjetlosti te pretvaranja ugljičnog dioksida i vode u kisik i organske tvari kroz proces fotosinteze. Jedna od ključnih prednosti mikroalgi je njihov brzi rast. Naime, mikroalge su vrlo efikasne u iskorištavanju dostupnih hranjivih tvari, što im omogućava brz rast te proizvodnju velike količine biomase u relativno kratkom vremenskom razdoblju (Dolganyuk i sur., 2020). Mikroalge također karakterizira sposobnost sinteze različitih bioloških spojeva, kao što su lipidi, proteini, ugljikohidrati, vitamini, antioksidansi i drugi biološki aktivni spojevi, koji imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, proizvodnji biogoriva, kozmetici i drugim područjima (Brennan i Owende, 2010; Garrido-Cardenas i sur., 2018). Mikroalge mogu uspješno rasti u slatkim, slanim, bočatim i otpadnim vodama, kao i na zemljištima koja nisu prikladna za konvencionalnu poljoprivredu (Pienkos i Darzins, 2009). Također, apsorbirajući ugljični dioksid iz okoline doprinose smanjenju koncentracije ugljičnog dioksida u atmosferi (Zhang i Liu, 2021). *D. tertiolecta*, morska mikroalga s iznimnom sposobnošću preživljavanja u ekstremnim uvjetima predstavlja jednu od mikroalgi s velikim biotehnološkim potencijalom. Naime, mikroalga *D. tertiolecta* ističe se po visokoj koncentraciji karotenoida, posebno  $\beta$ -karotena, ključnih pigmenata koji štite stanice od oksidativnog stresa uzrokovanog UV zrakama. Ovaj bogat sadržaj karotenoida, uključujući  $\beta$ -karoten, čini mikroalgu *D. tertiolecta* izuzetno privlačnom u različitim industrijama poput prehrambene, gdje se koristi kao dodatak prehrani ili bojilo u prehrambenim proizvodima. Osim navedenog, mikroalga *D. tertiolecta* ima sposobnost brzog razmnožavanja i akumulacije lipida (triacilglicerola), što ju čini izuzetno pogodnom za proizvodnju biodizela (Varshney i sur., 2015, Alishah Aratboni i sur., 2019). Triacilgliceroli su neutralni lipidi koji uglavnom služe kao skladišta ugljika i energije te se razlikuju od glikoglicerolipida koji se nalaze u membranama mikroalgi. Naime, glikoglicerolipidi imaju strukturalnu ulogu i uglavnom se sintetiziraju u prisustvu svjetlosti tijekom fotosinteze. Nakon sinteze, triacilgliceroli se skladište u lipidna tjelešca unutar citosola mikroalge te se tijekom perioda tame koriste za sintezu polarnih (strukturalnih) lipida. Zbog mogućnosti nakupljanja većih količina triacilglicerola, posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se proučavaju različiti načini indukcije sinteze lipida u mikroalgama (Chernova i sur., 2017). Mnoge mikroalgalne vrste uslijed izlaganja nepovoljnim uvjetima uzgoja svoj lipidni metabolizam usmjeravaju prema sintezi i akumulaciji neutralnih lipida, uglavnom u formi triacilglicerola te na taj način omogućavaju mikroalgama preživljavanje u nepovoljnim uvjetima (Sharma i sur., 2012). Najčešće korištena metoda indukcije sinteze lipida tijekom uzgoja mikroalgi je limitacija rasta izvorom dušika (Kumar i sur., 2016). Osim makroelementima (dušik (N), fosfor (P), ugljik (C)), na brzinu rasta i udio

lipida u mikroalgama također se može utjecati i elementima u tragovima kao što su bakar ( $\text{Cu}^{2+}$ ), krom ( $\text{Cr}^{2+}$ ), mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ), željezo ( $\text{Fe}^{3+}$ ), cink ( $\text{Zn}^{2+}$ ), itd. (Yang i sur., 2015; Yeessang i Cheirsilp, 2011). Naime, elementi u tragovima neophodni su dijelovi same stanice i enzimskih aktivnih centara u enzimima mikroalgi (Dou i sur., 2013). Od prirodnih elemenata u tragovima, selen ( $\text{Se}^{4+}$ ) je posebno zanimljiv zbog dvostruke mogućnosti djelovanja, kao esencijalni mikronutrijent ili pak kao toksična tvar, ovisno o dozi u biološkim/okolišnim sustavima. Dokazano je da niske koncentracije Se mogu pozitivno utjecati na brzinu rasta određenih vrsta mikroalgi. Takav pozitivan učinak najčešće je zabilježen unutar vrlo uskog raspona koncentracija te ovisi o vrsti mikroalge i vrsti izvora Se (organski ili anorganski). Se se u mikroalgama nalazi u obliku aminokiseline selenocisteina u aktivnom mjestu selenoproteina koji su primarno uključeni u procese detoksikacije i uklanjanja slobodnih radikala (Schiavon i sur., 2017). Visoke koncentracije Se uzrokuju nastajanje slobodnih radikala koji dovode do oksidacije dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), fragmentacije DNK i u konačnici apoptoze (Zhong i Cheng, 2017). Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila fokusirana na utjecaju Se na strukturu, fotosintetske pigmente i rast same mikroalge (Sun i sur., 2014; Vriens i sur., 2016). Unatoč spoznajama da niske koncentracije Se pozitivno utječu na brzinu rasta određenih vrsta mikroalgi, prema trenutno dostupnoj znanstvenoj literaturi nema saznanja o utjecaju različitih koncentracija Se na akumulaciju lipida u mikroalgama. Osim višim udjelom lipida u stanicama mikroalge, nepovoljni uvjeti uzgoja mikroalgi također rezultiraju relativno niskom produktivnošću biomase, odnosno u konačnici niskom lipidnom produktivnošću (Xia i sur., 2013). Kako bi se osigurao ekonomski isplativ proces proizvodnje biodizela, naglasak treba biti i na produktivnosti biomase i na udjelu lipida u stanicama mikroalge. Fototrofni dvostupanjski proces uzgoja omogućava postizanje veće produktivnosti sinteze lipida (Su i sur., 2011; Xia i sur., 2013). U prvoj fazi procesa mikroalge se uzgajaju u uvjetima koji omogućavaju brz rast i visok prinos biomase, a u drugoj fazi procesa mijenjanjem uvjeta uzgoja potiče se nakupljanje lipida u stanicama (Pancha i sur., 2015; X. M. Sun i sur., 2018). Istraživanje dvostupanjskog uzgoja mikroalgi u hranjivoj podlozi obogaćenoj Se do sada nije opisano u literaturi. Osim postizanja visoke produktivnosti sinteze lipida, izazov u području proizvodnje mikroalgalne biomase također predstavlja uvećanje mjerila uzgoja, odnosno tzv. „scale-up“. U tom kontekstu, postoji potreba za razmatranjem različitih načina uzgoja mikroalgi. Dva najčešća načina uzgoja mikroalgi su u otvorenim sustavima (ribnjaci, tankovi, prirodna jezera) i kontroliranim zatvorenim sustavima (fotobioreaktori) (Carvalho i sur., 2014). Glavna prednost otvorenih sustava su relativno niski kapitalni i operativni troškovi. Nedostatci otvorenih sustava su: iznimno visok rizik od kontaminacije drugim mikroorganizmima kao npr. drugim vrstama

mikroalgi, direktna izloženost ultraljubičastom zračenju, nejednolika raspodjela sunčeve svjetlosti, nepovoljni hidrodinamički uvjeti i ovisnost intenziteta svjetlosti o meteorološkim prilikama. Prednosti zatvorenih sustava u odnosu na otvorene sustave su znatno veća fleksibilnost (mogućnost dodavanja ili uklanjanja komponenti ili funkcionalnosti te brza reakcija na promjene okoline ili zahtjeve tržišta), postizanje znatno veće produktivnost proizvodnje biomase mikroalgi, smanjeni rizik kontaminacije te kontrola procesnih parametara. Glavni nedostatak zatvorenih sustava u odnosu na otvorene sustave su viši kapitalni i operativni troškovi (Acién Fernández i sur., 2013; Griffiths i Harrison, 2009).

U sklopu ovog doktorskog rada postavljena su tri glavna cilja. Prvi cilj doktorskog rada je utvrditi utjecaj različitih koncentracija natrijevog selenita na brzinu rasta, fotosintetsku aktivnost, razinu oksidativnog stresa i akumulaciju neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Drugi cilj ovog doktorskog rada je istražiti učinak Se u hranjivoj podlozi na produktivnost sinteze i prinos lipida u jednostupanjskom i dvostupanjskom uzgoju mikroalge *D. tertiolecta*. Zadnji cilj ovog doktorskog rada je ispitati mogućnost provođenja uzgoja i sinteze lipida s mikroalgom *D. tertiolecta* u uvećanom mjerilu, odnosno laboratorijskom fotobioreaktoru uz dodatak selenita.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Mikroalge

Mikroalge su prokariotski ili eukariotski fotosintetski mikroorganizmi koji mogu biti, a odlikuje ih jednostavna stanična struktura koja im omogućava brz rast čak i u nepovoljnim životnim uvjetima. Cijanobakterije (Cyanophyceae) su primjer prokariotskih mikroalgi, dok su zelene mikroalge (Chlorophyta) i diatomi (Bacillariophyta) primjeri eukariotskih vrsta mikroalgi (Li i sur., 2008). Za razliku od heterotrofnih mikroorganizama koji zahtijevaju različite organske tvari za rast, mikroalge imaju sposobnost proizvodnje biomase iz potpuno oksidiranih supstrata, anorganskih tvari i mineralnih elemenata koristeći svjetlosnu energiju tijekom procesa fotosinteze (Dolganyuk i sur., 2020). Mikroalge su velika skupina mikroorganizama od kojih je većina nedovoljno istražena. Smatra se da postoji između 200 000 i nekoliko milijuna vrsta mikroalgi, od kojih je do sada identificirano samo oko 40 000 vrsta (Mata i sur., 2010; Demirbas, 2010; Borowitzka i Reza Moheimani, 2013). Iako se mikroalge koriste u prehrani ljudi već tisućama godina, mikroalgalna biotehnologija smatra se jednom od modernih grana biotehnologije. Zabilježeno je da su cijanobakterija roda *Spirulina* (*Arthrospira*) prikupljane i uzgajane u značajnim količinama još u doba Azteka. Upotreba mikroalgi u prehrani zabilježena je i u Kini prije 1000 godina, gdje se mikroalga roda *Nostoc* koristila u prehrani u vrijeme nestašice hrane. U posljednjih nekoliko desetljeća, zahvaljujući velikoj mikroalgalnoj raznolikosti i napretku u području genetičkog inženjerstva, interes za primjenom mikroalgi u biotehnologiji je značajno porastao. Mikroalge se mogu primijeniti na mnogobrojne načine, no trenutno se izdvajaju dva ključna područja primjene - proizvodnja mikroalgalne biomase i uzgoj mikroalgi s ciljem nakupljanja biološki aktivnih spojeva. Mikroalge se mogu koristiti kao vrijedna sirovina za proizvodnju farmaceutskih, prehrambenih i kozmetičkih proizvoda (proteini, polisaharidi, masne kiseline, vitamini, antioksidansi, pigmenti, lijekovi i imunostimulansi), kao i za proizvodnju biogoriva (biodizel, bioetanol, metan, biovodik) (Chisti, 2006; Brennan i Owende, 2010; Garrido-Cardenas i sur., 2018). Neki od mikroalgalnih bioloških aktivnih spojeva istraženi su za proizvodnju na industrijskoj razini. Osim lipida koji se koriste kao sirovina za proizvodnju biodizela, drugi zanimljivi mikroalgalni proizvodi uključuju proteine, ugljikohidrate, pigmente, enzime i polisaharide. Proteini iz mikroalgi koriste se kao izvor hrane i dodatak prehrani, osobito veganskoj i vegetarijanskoj. Ugljikohidrati iz mikroalgi mogu se koristiti u proizvodnji biogoriva i drugih kemijskih proizvoda. Pigmenti, poput klorofila, karotenoida i fikobiliproteina, koriste se u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji zbog svojih antioksidativnih svojstava. Enzimi mikroalgi mogu se koristiti u industriji hrane, kozmetike i farmaceutskih proizvoda. Uz sve nabrojano,

mikroalge se također mogu primijeniti i u procesima bioremedijacije te imaju potencijal sekvestracije CO<sub>2</sub> za daljnju uporabu u industrijskim procesima (Chisti, 2006a; Benemann, 2013). Biološki aktivni spojevi mikroalgi imaju brojna pozitivna djelovanja na ljudsko zdravlje, uključujući antioksidativna, antibakterijska, antivirusna, antitumorska, regenerativna, antihipertenzivna, neuroprotektivna i imunostimulirajuća djelovanja (Alishah Aratboni i sur., 2023). Također, mikroalge predstavljaju značajan udio u primarnoj fotosintetskoj produkciji, odnosno procijenjeno je da doprinose čak 50 % fotosintetske aktivnosti na Zemlji. Uzgoj mikroalgi ne utječe negativno na okoliš i karakterizira ga nizak otisak ugljika. Osim toga, za proizvodnju mikroalgalne biomase koristi se relativno malo vode u usporedbi s drugim poljoprivrednim kulturama, a mogu se uzgajati i na zemljištima koja nisu prikladna za druge poljoprivredne usjeve (Dias i sur., 2022). Unatoč mnogim prednostima, komercijalna proizvodnja mikroalgi još uvijek nije široko rasprostranjena (Gavrilescu i Chisti, 2005; Chisti, 2006b; Wijffels i sur., 2013). Samo se nekoliko vrsta mikroalgi, kao npr. zelene mikroalge *Chlorella* sp. i *Scenedesmus obliquus* i cijanobakterija *Spirulina* sp. uzgajaju u velikom mjerilu. Za uspješnu proizvodnju proizvoda iz mikroalgalne biomase ključno je odabrati odgovarajuću vrstu mikroalge sa željenim karakteristikama. Prva monoalgalna kultura, *Chlorella vulgaris*, izolirana je 1980. godine, a tijekom proteklih desetljeća, zahvaljujući stručnjacima iz različitih zemalja, stvorene su velike zbirke mikroalgi. Rodovi mikroalgi s najvećim brojem poznatih vrsta pripadaju odjeljcima (*phylum*): Bacillariophyta (diatomeje), Chlorophyta (zelene alge), Chrysophyta (zlatne alge) i Cyanophyta (cijanobakterije ili plavo-zelene alge). Unatoč njihovom iznimnom potencijalu, samo se nekoliko vrsta mikroalgi komercijalno primjenjuje u biotehnološkoj proizvodnji (*Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Spirulina platensis*, *Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus* sp.) (Hamed, 2016). Iako se godišnja proizvodnja mikroalgi, u usporedbi s makroalgama, smatra relativno malom (oko 5 000 tona suhe tvari godišnje za mikroalge naspram  $7,5 \times 10^6$  tona suhe tvari godišnje za makroalge), proizvedena mikroalgalna biomasa i izolirani nusprodukti predstavljaju visoko vrijedne i ekonomski isplative proizvode. Procijenjena tržišna vrijednost mikroalgi je  $1,25 \times 10^9$  USD godišnje, dok je za makroalge  $6 \times 10^9$  USD godišnje. Kontinuirano istraživanje i razvoj procesa mikroalgalnog uzgoja ključni su za postizanje ekonomski i ekološki održivog proizvodnog procesa različitih mikroalgalnih proizvoda te njihovu uspješnu primjenu. Stoga, neprestano ulaganje u istraživanje i razvoj procesa uzgoja mikroalgi predstavlja ključni faktor za ostvarivanje ciljeva održivosti, efikasnosti i kvalitete u proizvodnji mikroalgalnih proizvoda.

## **2.1. Lipidi mikroalgi**

Proučavanje lipida mikroalgi ima višestruku važnost iz različitih aspekata. Prije svega, lipidi mikroalgi predstavljaju vrijedan izvor zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina koje se mogu koristiti za proizvodnju biodizela, odnosno obnovljivog goriva koje je ekološki prihvatljivije od fosilnih goriva. Osim toga, lipidi iz mikroalgi također su izvor vrijednih višestruko nezasićenih masnih kiselina koji se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proučavanje lipida mikroalgi ima ključnu važnost u razumijevanju metabolizma ovih organizama i načina prilagođavanja različitim uvjetima uzgoja. Dodatno istraživanje mehanizama sinteze lipida u mikroalgama pod varijabilnim uvjetima kultivacije pruža značajnu perspektivu za inovativno oblikovanje uzgojnih strategija s ciljem optimizacije nutrijentne efikasnosti i smanjenja proizvodnih troškova. Stoga, istraživanje i razvoj metoda za proizvodnju lipida iz mikroalgi i njihova primjena imaju veliki potencijal za promicanje održivog razvoja i smanjenje ovisnosti o fosilnim gorivima (Adenle i sur., 2013). Lipidi mikroalgi mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine - nepolarne (skladišne) lipide i polarne lipide. Nepolarni lipidi obuhvaćaju razne spojeve poput acilglicerola, sterola, slobodnih masnih kiselina, ugljikovodika, voskova, sterol estera i drugih. S druge strane, polarni lipidi uključuju fosfogliceride i glikozilgliceride, koji su važni u procesu prijenosa signala i održavanju stanične membrane. Razlikovanje između ove dvije skupine lipida je od velike važnosti u proučavanju metabolizma mikroalgi jer imaju različite funkcije i mogu biti korišteni u različitim aplikacijama. Nepolarni lipidi često se koriste u proizvodnji biodizela i drugih kemijskih tvari, dok su polarni lipidi ključni za funkcioniranje stanične membrane i prijenos signala. Poznavanje količine i sastava lipida u mikroalgama može pomoći u optimizaciji procesa proizvodnje i izolacije lipida, što je važno za industrijsku primjenu i korištenje lipida mikroalgi (Guschina i Harwood, 2006).

### **2.2.1. Polarni lipidi mikroalgi**

Polarni lipidi, kao što su fosfogliceridi i glikozilgliceridi, imaju ključnu ulogu u stvaranju i održavanju bioloških membrana. Osim što služe kao strukturne komponente membrana, polarni lipidi također osiguravaju specifične funkcije membrana i stvaraju permeabilnu barijeru između stanica i organela, što je ključno za metabolizam stanice. Polarni lipidi su posebno važni u staničnim signalnim putevima u kojima određene molekule polarnih lipida, kao što su inozitol lipidi, sfingolipidi i višestruko nezasićene masne kiseline, djeluju kao intermedijeri i prenose signale između stanica i unutar stanica. U fotosintetskim membranama, polarni glicerolipidi kao što su glikolipidi i fosfolipidi imaju ključnu ulogu u fotosintetskim procesima kao što su



apsorpcija svjetla, fotokemijske reakcije, transfer elektrona i sinteza ATP-a. S druge strane, steroli i sfingolipidi prisutni su u manjim količinama u tilakoidnim membranama kloroplasta (Murata i Siegenthaler, 2006).

#### **2.2.1.1. Fosfolipidi**

Fosfolipidi (fosfolipidi) su važne strukturne komponente u membranama mikroalgi. Oni se sastoje od glicerola koji je esterificiran hidrofobnim alkilnim grupama na pozicijama sn-1 i sn-2, dok je na poziciji sn-3 esterificiran sa fosfatnom skupinom. Tri najčešća fosfolipida u mikroalgama su fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE) i fosfatidilglicerol (PG), dok su fosfatidilserin (PS), fosfatidilinozitol (PI) i difosfatidilglicerol (DPG) također prisutni u značajnim količinama. Fosfolipidi se uglavnom nalaze u membranama kloroplasta, čineći 10-20 % ukupnih polarnih lipida u eukariotskim stanicama mikroalgi. PC je izuzetak jer je u značajnim količinama prisutan u tilakoidnim membranama kloroplasta. Osim toga, u stanicama mikroalgi također su identificirane neke neuobičajne molekule fosfolipida. Tako je npr. u dijatomejama identificiran analog PC-a koji sadrži sulfonij. Za razliku od PC-a, u njegovom analogu (sulfonildiacilglicerol (SDG)) atom dušika zamjenjen je atomom sumpora u kolinu. Fosfatidilsulfokolin (PSC) u potpunosti zamjenjuje PC u nefotosintetskim dijatomejama kao npr. *Nitzschia alba*. U nekoliko drugih vrsta dijatomeja i PC i PSC pronađeni su u udjelu od 6 - 24 % totalne frakcije PC+PSC. Niske razine PC također su zabilježene u dijatomejama *Cyclotella nana* i *Navicula incerta*, kao i u zelenoj mikroalgi *Euglena* spp. (Guschina i Harwood, 2006).

#### **2.2.1.2. Glikolipidi (glikozilgliceridi)**

Glikolipidi ili glikozilgliceridi, su lipidi koji sadrže mono- ili oligo-saharide vezane na sn-3 poziciji molekule glicerola. Glavne molekule lipida u plastidima mikroalgi su galaktozilgliceridi koji su karakteristični po tome što sadrže jednu ili dvije molekule galaktoze na sn-3 poziciji molekule glicerola. Monogalaktozildiacilglicerol (MGDG) i digalaktozildiacilglicerol (DGDG) najzastupljeniji su galaktozilgliceridi u mikroalgama. Također, sulfolipidi poput sulfokinovozil diacilglicerola (SQDG) pripadaju skupini glikozilglicerida. SQDG se može naći u različitim membranama algi, uključujući i fotosintetske i nefotosintetske mebrane, a može doseći udio od čak 30 % u ukupnim lipidima. Galaktozilgliceridi su poznati po visokom udjelu višestruko nezasićenih masnih kiselina. Tako npr. MGDG, koji se nalazi u slatkovodnim algama, sadrži visok udio  $\alpha$ -linoleinske kiseline (C18:3n-3). DGDG i SQDG sadrže visok udjel  $\alpha$ -linoleinske kiseline, uz manje količine palmitinske kiseline (C16:0). Neke vrste zelenih mikroalgi, kao npr. *Trebouxia* spp. i

*Coccomyxa* spp. imaju glikozilgliceride koji su esterificirani nezasićenim C16 masnim kiselinama kao što su heksadekatrienoinska ( $C_{16}H_{26}O_2$ ) ili heksadekatetraenoinska masna kiselina ( $C_{16}H_{24}O_2$ ). Suprotno tomu, glikozilgliceride morskih vrsta mikroalgi karakteriziraju dugolančane višestruko nezasićene masne kiseline kao što su arahidonska ( $C_{20}H_{32}O_2$ ), eikosapentaenska ( $C_{20}H_{30}O_2$ ) (EPA), dokosaheksaenoična ( $C_{22}H_{32}O_2$ ) (DHA) i oktatraenoična ( $C_{18}H_{30}O_2$ ) kiselina. Nadalje, istraživanja su također pokazala da neke vrste crvenih algi, poput *Gracilaria verrucosa*, u svojim glikolipidima mogu sadržavati ne samo galaktozu, već i druge šećere poput manoze i ramoze. Također, u nekim mikroalgama kao što su *Ocromonas danica* (Chrysophyceae) i *Pavlova lutheri* (Haptophyceae) otkriveni su karboksilirani glicerolipidi poput diacilgliceril glukuronida (DGGA). Ovi glicerolipidi čine oko 3 % ukupnih glicerolipida u *O. danica* (Guschina i Harwood, 2006).

### 2.2.2. Lipidi fotosintetskih membrana

Molekule glikolipida u mikroalgama uglavnom su prisutne u fotosintetskim membranama te imaju ključnu ulogu u procesu fotosinteze. Lipidni sastav membrana kloroplasta, koja sadrži visok udio nezasićenih masnih kiselina, kao i prisutnost fosfatidilglicerola i galaktozilglicerida, također su važni za funkcioniranje fotosintetskih procesa u mikroalgama. Četiri glavne molekule glikolipida prisutne u tilakoidnim membranama kloroplasta su MGDG, DGDG, SQDG i PG. MGDG i DGDG, čine oko 50, odnosno 30 % ukupnih lipida u fotosintetskim membranama, dok je udjel SQDG i PG 5 do 12 %. Unutarnja membrana kloroplasta također je građena od četiriju navedenih glikolipida u istim udjelima kao tilakodine membrane kloroplasta. Međutim, za glicerolipide vanjske membrane kloroplasta utvrđeno je da se razlikuju po sastavu od unutrašnje membrane kloroplasta i tilakodnih membrana. Naime, vanjska membrana kloroplasta sadrži PC i PI uz dodatak MGDG, DGDG i PG. Također je utvrđeno da tilakoidne membrane eukariotskih mikroalgi sadrže betain lipide, kao npr. diacilgliceril trimetilhomoserin i diacilgliceroltrimetil- $\beta$ -alanin uz dodatak MGDG, DGDG, SQDG i PG. Lipidi membrane kloroplasta sadrže visoki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina, pri čemu u većini mikroalgalnih vrsta  $\alpha$ -linoleinska kiselina (18:3), sama ili u kombinaciji heksadekatrienoinskom kiselinom (16:3) čini više od 80 % udjela ukupnih masnih kiselina u membranama kloroplasta. Tijekom proteklih trideset godina intenzivno je istraživana fiziološka uloga raznolikosti i varijabilnosti sastava višestruko nezasićenih lipida u membranama kloroplasta. Unatoč tim naporima, povezanost između strukture i funkcije alkilnih lipida u fotosintetskim membranama i dalje je nedovoljno istražena. Istraživanja ukazuju da većina lipida prisutnih u tilakoidnim membranama kloroplasta u kojima su uklopljeni membranski

proteini imaju važnu strukturnu ulogu u održavanju stabilnosti i integriteta fotosintetskih membrana. Osim toga, ovi lipidi imaju ulogu u regulaciji fluidnosti membrane, što je bitno za optimalno funkcioniranje membranskih proteina i procesa fotosinteze. Može se zaključiti da su polarni lipidi važni strukturni elementi koji doprinose održavanju fizičkih svojstava membrane i funkcionalnosti fotosintetskog aparata mikroalgi. Postoji i druga skupina membranskih lipida, odnosno specifične molekule koje se vežu na proteine, poznate kao funkcionalni lipidi. Ovi lipidi imaju važnu ulogu u specifičnim interakcijama s proteinima u membranama stanica. Njihova funkcija je osigurati adekvatnu konformaciju i orijentaciju proteina u membranama, što doprinosi očuvanju strukture i funkcije membranskih proteina te se stoga smatraju ključnim elementima za održavanje uloge membranskih proteina i cjelokupne membrane stanice (Guschina i Harwood, 2006).

### **2.2.3. Napolarni lipidi mikroalgi**

Mnoge vrste mikroalgi posjeduju izuzetnu sposobnost akumulacije napolarnih lipida, uglavnom u obliku triacilglicerola (TAG). Napolarni lipidi, a posebno TAG, predstavljaju glavne skladišne proizvode mikroalgi koji se mogu lako razgraditi u svrhu osiguravanja metaboličke energije. Mikroalge koje imaju sposobnost akumulacije velikih količina napolarnih lipida, poput TAG-a, nazivaju se oleaginoznim mikroorganizmima. Njihov značajan potencijal kao izvor biomase i sirovine za proizvodnju biogoriva i drugih bioproizvoda leži u činjenici da razine akumulacije napolarnih lipida mogu doseći i do 20 – 50 % suhe tvari biomase te se stoga oleaginozni mikroorganizmi smatraju vrlo obećavajućim izvorima lipida za proizvodnju biodizela i drugih obnovljivih izvora energije. Razina akumulacije TAG-a varira između različitih vrsta mikroalgi i može se stimulirati različitim okolišnim čimbenicima. U nepovoljnim uvjetima za rast mikroalgi, kada se smanjuje brzina rasta stanica, sinteza novih membranskih komponenti se obustavlja, a metabolizam masnih kiselina preusmjerava se prema sintezi TAG-a. Ovaj proces traje sve dok se ponovno ne uspostave povoljni uvjeti za rast stanica. Nadalje, uvjeti osvjetljenja potiču sintezu TAG-a koji se nakon toga pohranjuju u lipidne mješince u citosolu. Te pohranjene molekule kasnije se koriste za sintezu polarnih lipida u mraku. Za razliku od glicerolipida koji imaju strukturnu ulogu u membranama, molekule TAG-a služe kao glavno skladište ugljika i energije u stanicama mikroalgi u uvjetima nepovoljnima za njihov rast. Zbog velikog broja oleaginoznih mikroalgalnih vrsta koje brzo rastu i akumuliraju velike količine TAG-a, razmatra se mogućnost korištenja mikroalgi za proizvodnju lipida koji se mogu koristiti za proizvodnju biogoriva i drugih biomaterijala (Khoo i sur., 2023).

#### **2.2.4. Proizvodnja lipida - stimulacija sinteze TAG-a**

Sinteza molekula TAG-a u stanicama mikroalgi potiče se određenim okolišnim uvjetima. Najčešće se inducira kombinacijom visokog intenziteta osvjetljenja i nedostatka nekih nutrijenata u hranjivoj podlozi. Nakon sinteze, molekule TAG-a pohranjuju se u citoplazmatske lipidne mješinice i kasnije se koriste u procesu sinteze polarnih lipida. Uvjeti uzgoja koji potiču sintezu TAG-a su često nepovoljni za rast mikroalgi i dovode do smanjenja brzine rasta i akumulacije biomase. Nedostatak dušika u hranjivoj podlozi ključan je nutritijent za stimulaciju sinteze TAG-a, što dovodi do dvostrukog ili trostrukog povećanja udjela lipida, uglavnom TAG-a, kod mnogih vrsta mikroalgi. (Thompson, 1996; Solovchenko, 2012; Peccia i sur., 2013)

##### **2.2.4.1. Utjecaj temperature na sintezu TAG-a**

Jedna od najdetaljnije opisanih metoda indukcije sinteze molekula TAG-a u mikroalgama je promjena temperature uzgoja. U usporedbi s drugim proučavanim metodama, ova metoda ima najveći utjecaj na promjene sastava masnih kiselina u lipidima mikroalge. Naime, niže temperature uzgoja povećavaju udio višestruko nezasićenih masnih kiselina, kao što su EPA i DHA, dok više temperature povećavaju udio zasićenih masnih kiselina. Osim toga, temperatura uzgoja također utječe na ukupni udio lipida u stanicama mikroalgi (Breuer i sur., 2013; Hu i sur., 2008).

##### **2.2.4.2. Utjecaj intenziteta osvjetljenja na sintezu TAG-a**

Intenzitet osvjetljenja također ima značajan utjecaj na sastav lipida u stanicama mikroalgi. Niska razina osvjetljenja potiče formiranje polarnih lipida, dok visok intenzitet osvjetljenja može uzrokovati oksidativna oštećenja višestruko nezasićenih masnih kiselina, što dovodi do povećanja udjela zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina. Trajanje ciklusa dana i noći također ima utjecaj na lipidni sastav mikroalgi. Tako primjerice udio višestruko nezasićenih masnih kiselina u mikroalgi *Nannochloropsis* sp. ostaje nepromijenjen u uvjetima ograničenog osvjetljenja. Međutim, povećanje intenziteta osvjetljenja rezultira smanjenjem udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina u spomenutoj mikroalgi, uz povećanje udjela zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina (Fábregas i sur., 2004).

##### **2.2.4.3. Utjecaj nutrijenata na sintezu TAG-a**

Limitacija nutrijenata u hranjivoj podlozi predstavlja najčešće korištenu metodu postizanja promjene sastava lipida mikroalgi. Često korišteni nutritijenti koji mogu utjecati na sastav lipida u mikroalgama su dušik, fosfat, silikat i sulfat. Dokazano je da se promjenama koncentracija

silikata u hranjivoj podlozi može utjecati samo na lipidni sastav dijatomeja. Tako npr. nedostatak silikata u hranjivoj podlozi za uzgoj mikroalge *Cylclotella cryptica* rezultira višim udjelima zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina (Roessler, 1988). Od svih istraženih nutrijenata, nedostatak dušika najviše utječe na akumulaciju lipida u mikroalgama, posebno TAG-a. Naime, brojne studije pokazale su da u uvjetima limitacije dušikom mikroalge često pokazuju povećanu akumulaciju lipida, što može biti vrlo korisno za proizvodnju biogoriva i drugih bioloških proizvoda (Basova, 2005). Limitacija fosfora rezultirala je povišenim udjelom lipida, uglavnom TAG-a, u mikroalgama *Monodus subterraneus*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* sp., *Isochrysis galbana* i *Pavlova lutheri*, dok je u mikroalgama *Nannochloris atomus* i *Tetraselmis* sp. zabilježen smanjeni udio TAG-a. Od morskih vrsta mikroalgi limitacija fosforom rezultirala je povišenom razinom udjela palmitinske (C16:0) i elaidinske/oleatne masne kiseline (C18:1 trans 9/ C18:1 cis 9) te smanjenim udjelom stearidonske (C18:4 $\omega$ 3), eikozapentanoične (C20:5 $\omega$ 3, EPA) i dokozaheksanoične (C22:6 $\omega$ 3, DHA) masne kiseline. Studije su također pokazale da nedostatak sumpora rezultira povećanim udjelom totalnih lipida u zelenim algama *Chlorella* sp. i *Chlamydomonas reinhardtii* (Mizuno i sur., 2013).

#### **2.2.4.4. Utjecaj faze rasta i fiziološkog stanje stanice na sintezu TAG-a**

Faza rasta stanice također ima značajan utjecaj na konačni udio lipida i sastav masnih kiselina u mikroalgama. Tijekom logaritamske faze rasta, količina TAG-a obično se smanjuje, dok tijekom stacionarne faze rasta mikroalge dolazi do pojačane sinteze TAG-a. Primjerice, za mikroalgu *Parietochloris incisa* zabilježeno je povećanje udjela TAG-a za 43 % u logaritamskoj fazi rasta, odnosno čak 77 % u stacionarnoj fazi rasta (Bigogno i sur., 2002; Mansour i sur., 2003). U kasnijim fazama kulture primijećeno je povećanje ukupnog udjela lipida u nekoliko vrsta mikroalgi, uključujući zelenu mikroalgu *Chlorococcum macrostigma*, dijatome *Nitzschia palea*, *Thalassiosira fluviatillis* i *Coscinodiscus excentricus*. Međutim, prema istraživanju Alonso i sur. (2000) mikroalga *Phaeodactylum tricornutum* predstavlja iznimku, budući da starenje kulture nije značajno utjecalo na ukupni udio lipida. Također je dokazano da starenjem kulture dolazi do značajnog porasta udjela zasićenih i jednostruko nezasićenih masnih kiselina (C16:0, C16:1 $\omega$ 7 i C18:1 $\omega$ 9) sa manje intenzivnijim rastom udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina (C16:3 $\omega$ 4 i C20:5 $\omega$ 3) (Liang i sur., 2006).

## **2.2.6. Primjena lipida**

### **2.2.6.1. Proizvodnja biogoriva**

Porast svjetske populacije i ubrzani razvoj industrije dovode do značajnog rasta potrošnje energije. S obzirom da fosilna goriva (ugljen, nafta, zemni plin) predstavljaju neobnovljive i neodržive izvore energije čija cijena konstantno fluktuirala, dok njihova potrošnja uzrokuje povišenje temperature Zemlje i emisiju stakleničkih plinova, trenutno se sve više napora ulaže u razvoj alternativnih, odnosno obnovljivih izvora energije. Biodizel ima mnoge prednosti u usporedbi s fosilnim gorivima, što ga čini atraktivnim energetske rješenjem. Primjenom biodizela kao alternativnog goriva, smanjuje se emisija CO<sub>2</sub> i različitih sumporovih spojeva u atmosferu, dok se oslobađanje ugljikovog monoksida (CO) smanjuje za čak 30 %. Biodizel se trenutno proizvodi uglavnom iz biljnih ulja, kao što su ulje soje, uljane repice, kanole, suncokreta, palme, kukuruza i drugih. Međutim, zbog intenzivnog korištenja ovih biljaka za proizvodnju biodizela, cijene hrane mogu biti značajno povećane te je stoga razvoj procesa proizvodnje biodizela iz lipida mikroalgi od velike važnosti. Najvažnije prednosti mikroalgi za proizvodnju biodizela su: sposobnost postizanja visokih brzina rasta te brzo udvostručavanje biomase mikroalgi (uglavnom 1-6 dana); sposobnost produkciranja 10 do 20 puta više ulja u usporedbi sa najefikasnijim poljoprivrednim kulturama; sposobnost rasta u različitim ekološkim uvjetima (slane, bočate i slatkovodne vode); sposobnost korištenja nutritijenata iz otpadnih voda; sposobnost asimilacije CO<sub>2</sub> emitiranog sagorijevanjem fosilnih goriva, itd. (Hu i sur., 2008). Naime, biodizel kao alternativa fosilnom dizelu predstavlja izuzetno atraktivno rješenje jer ne oduzima poljoprivredne površine, odnosno mikroalge se mogu uzgajati na nepogodnim zemljištima uz recirkulaciju otpadne vode, što dovodi do manje konkurencije s drugim sektorima. Mikroalge su izuzetno bogat izvor lipida za proizvodnju biodizela, s lipidnom produktivnošću koja je daleko veća od lipidne produktivnosti različitih uljarica. U usporedbi s biljkama, mikroalge u procesu fotosinteze učinkovitije koriste CO<sub>2</sub>, što ih također čini i ekološki prihvatljivijim izvorom lipida za proizvodnju biodizela. Naime, korištenjem mikroalgi za proizvodnju biodizela dobije se oko 200 puta više ulja po jedinici površine u usporedbi s proizvodnjom biodizela iz soje. To ih čini jednim od ključnih čimbenika u razvoju održive energetske budućnosti (Mata i sur., 2010). Uz proizvodnju lipida, mikroalge također mogu proizvesti različite nusprodukte uključujući karotenoide ( $\beta$ -karoten, astaksantin, kantaksantin, lutein) i ostale pigmente (fikocijanin, fikoeritrin),  $\omega$ -3 masne kiseline (EPA, DHA), vitamine (tokoferoli, vitamin B12 i provitamin A), polisaharide i proteine (Khan i sur., 2018). Da bi se istražile potencijalne mogućnosti korištenja fotosintetskih mikroorganizama u proizvodnji biogoriva, većina istraživanja fokusira se na mikroalgalne vrste čiji je uzgoj

jednostavan te imaju visok udio lipida. Kroz protekla desetljeća, određen je sadržaj lipida u nekoliko tisuća vrsta mikroalgi i cijanobakterija, a nekoliko stotina oleaginoznih vrsta je izolirano i karakterizirano u laboratorijskim uvjetima (Hu i sur., 2008). Istraživanja su pokazala da oleaginozne vrste mikroalgi mogu pripadati različitim taksonomskim grupama, međutim zelene mikroalge su najčešće proučavane mikroalgalne vrste zbog jednostavnosti uzgoja i brzog rasta. Prosječni udio lipida u oleaginoznim vrstama mikroalgi iznosi oko 25,5 % suhe tvari biomase (Hu et i sur., 2008).

#### **2.2.6.2. Proizvodnja višestruko nezasićenih masnih kiselina**

Višestruko nezasićene masne kiseline, poput  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina, imaju ključnu ulogu u održavanju zdravlja tkiva te imaju brojne pozitivne učinke na zdravlje ljudskog organizma. Budući da se ne mogu sintetizirati u tijelu, veoma je važno osigurati njihov unos putem vanjskih izvora, uključujući prehranu i suplemente. Dokosaheksaenoična (DHA), eikosapentaenska (EPA), arahidonska, linolenska i  $\gamma$ -linolenska masna kiselina pripadaju skupini esencijalnih višestruko nezasićenih masnih kiselina koje ljudsko tijelo ne može sintetizirati. One su bitne za održavanje integriteta stanica, funkciju mozga i vida te imaju ključnu ulogu u imunološkom sustavu i regulaciji upala. Nadalje, višestruko nezasićene masne kiseline dokazano smanjuju rizik od kardiovaskularnih bolesti, kao što su srčani udar i moždani udar, djeluju protuupalno te štite od neurodegenerativnih bolesti. Također, pokazano je da su važne za razvoj djeteta tijekom trudnoće te da mogu poboljšati mentalne funkcije i raspoloženje kod odraslih osoba (Bannenberga i sur., 2017). Mnoge vrste mikroalgi, uključujući *Pavlova lutheri*, *Porphyridium cruentum*, *Arthrospira platensis*, *Odontella* sp. i *Isochrysis galbana*, temeljito su proučene zbog mogućnosti sinteze višestruko nezasićenih masnih kiselina. Primjerice, morska mikroalga *Pavlova lutheri* poznata je po visokom udjelu višestruko nezasićenih masnih kiselina, dok se mikroalga *Arthrospira platensis* ističe ne samo značajnom količinom  $\gamma$ -linolenske masne kiseline, već i sintezom stigmasterola i sitosterola (Guedes i sur., 2010; Santhosh i sur., 2016). EPA i DHA masna kiselina iznimno su važne za ljudsko zdravlje i medicinski se koriste u prevenciji upalnih i srčanih bolesti, artritisa, astme, migrene i drugih zdravstvenih problema. Navedene masne kiseline uglavnom se dobivaju iz izvora ribljih ulja koji su ograničeni (održivost ribolova, onečišćenje i toksini, klimatske promjene), međutim mikroalge su također pokazale velik potencijal kao izvor EPA i DHA masnih kiselina te mogu predstavljati održivu i ekološku alternativu ribljim uljima koja ne mogu zadovoljiti svjetsku potražnju (Doughman i sur., 2007; Armenta i Valentine, 2013). Nedavno su postignuti značajni napretci u povećanju proizvodnje EPA i DHA masnih kiselina primjenom tehnologija genetskog inženjeringa za

manipulaciju metaboličkim putevima sinteze lipida u stanicama mikroalgi. Među mikroalgama, dijatomeja *Phaeodactylum tricornutum* se ističe kao iznimno obećavajući izvor EPA i DHA masnih kiselina (Draaisma i sur., 2013; Koller i sur., 2014; Hamilton i sur., 2014). Za uspješnu komercijalnu proizvodnju višestruko nezasićenih masnih kiselina iz mikroalgi, posebno EPA i DHA, neophodno je prevladati određene izazove koji uzrokuju niske prinose ovih kiselina u mikroalgama. Proizvodnja navedenih masnih kiselina u većem mjerilu zahtijeva optimizaciju procesa, uključujući identifikaciju i izolaciju odgovarajućih vrsta mikroalgi, razvoj učinkovitih metoda uzgoja kultura, poticanje sinteze ciljanih proizvoda te razvoj tehnologija za ekstrakciju.

### **2.2.7. Proizvodnja lipida**

Usprkos brojnim obećavajućim svojstvima mikroalgi u području proizvodnje lipida, industrijski proces proizvodnje trenutno se suočava s mnogim tehničkim izazovima. Kako bi se prevladale ove poteškoće, nužna su temeljita istraživanja koja će pridonijeti boljem razumijevanju metabolizma lipida i akumulacije lipida u stanicama mikroalgi. Nova saznanja omogućit će unapređenje procesa proizvodnje biodizela iz lipida mikroalgi te doprinijeti daljnjem razvoju održive industrije koja se oslanja na obnovljive izvore energije. Trenutno proces industrijske proizvodnje mikroalgarnih lipida karakterizira veliki broj tehničkih ograničenja. Budući da nedostaje detaljnih informacija o biosintezi lipida i regulaciji sinteze lipida u mikroalgama, pokušaji manipulacije metaboličkim putevima sinteze lipida stanica mikroalgi radi povećanja proizvodnje lipida često završavaju neuspjehom. Tehnologija proizvodnje lipida iz mikroalgi još uvijek se nalazi u svojim počecima te trenutno na tržištu nema dostupnih ekonomski isplativih industrijskih sustava za proizvodnju biodizela iz mikroalgi. Iako je tehnologija proizvodnje biodizela iz mikroalgi tehnički izvediva, potrebni su značajni napor kako bi se postigao tehnički i ekonomski isplativ proces. Naime, unatoč svim prednostima koje mikroalge nude u odnosu na druge organizme u području proizvodnje biogoriva, biodizel i dalje ima višu cijenu u odnosu na dizel dobiven iz fosilnih goriva. Jedan od načina prevladavanja tehničkih poteškoća proizvodnje biodizela je smanjenje visokih troškova izdvajanja biomase. Trenutno postoji nekoliko metoda izdvajanja biomase mikroalgi uključujući procese flokulacije, koagulacije, flotacije, filtracije, sedimentacije i centrifugiranja. Izbor odgovarajuće metode separacije biomase mikroalgi ovisi o nekoliko faktora kao npr. koncentracija stanica, veličina stanica mikroalgi, gutoća stanice, konačni proizvod, itd. (Koley i sur., 2017). Osim smanjenja troškova izdvajanja biomase, za uspješnu proizvodnju biodizela iz lipida mikroalgi od iznimne je važnosti i poznavanje utjecaja uvjeta uzgoja na sastav masnih kiselina. Naime, osim što utječe na produktivnost, sastav masnih



kiselina ima ključnu ulogu u kvaliteti i karakteristikama dobivenog biodizela. Sastav masnih kiselina lipida mikroalgi značajno varira ovisno o vrsti, genotipu, klimatskim uvjetima, načinu uzgoja, itd.. Neke vrste mikroalgi, kao što su *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. i *Scenedesmus* sp., imaju visoki udio oleinske i linolenske masne kiseline u sastavu lipida, što ih čini poželjnim sirovinama za proizvodnju biodizela. Oleinska kiselina je nezasićena masna kiselina koja smanjuje viskoznost i poboljšava tečljivost pri niskim temperaturama, dok linolenska kiselina povećava temperaturu zapaljivosti. Nadalje, prema rezultatima brojnih istraživanja, neke od najpoželjnijih vrsta biodizela sadrže visok udio metil oleat ili palmit oleat. Metil oleat i palmit oleat su esteri masnih kiselina koji su se zbog svoje visoke oksidacijske stabilnosti, niske viskoznosti i dobre tečljivosti pri niskim temperaturama pokazali kao najpoželjniji metil esteri masnih kiselina za proizvodnju biodizela. Međutim, u mnogim oleaginoznim vrstama mikroalgi, molekule TAG-a sadrže veliki udio višestruko nezasićenih masnih kiselina koje nisu poželjne za proizvodnju biodizela. Naime, višestruko nezasićene masne kiseline karakterizira niža točka taljenja i veća osjetljivost na oksidaciju u usporedbi s zasićenim masnim kiselinama, što znači da prisutnost metil estera nezasićenih masnih kiselina u proizvedenom biodizelu može negativno utjecati na stabilnost i trajnost motornog goriva (Deshmukh i sur., 2019).

Sinteza mikroalgalnih lipida može se provoditi kao zaseban proces ili u kombinaciji s proizvodnjom drugih vrijednih metaboličkih proizvoda mikroalgi. Kombinacija proizvodnje mikroalgalnih lipida s drugim proizvodima omogućuje postizanje višestruke koristi od istog uzgojnog procesa, što je vrlo poželjno u smislu održivosti i ekonomičnosti proizvodnje. Primjeri drugih metaboličkih proizvoda mikroalgi visoke vrijednosti uključuju pigmente, poput astaksantina i fikocijanina koji se koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te omega-3 masne kiseline koje se koriste u prehrambenoj industriji kao dodatak prehrani. Kombinacija proizvodnje mikroalgalnih lipida s drugim vrijednim metabolitima omogućuje postizanje sinergijskih učinaka i maksimalne vrijednosti uzgojnog procesa, odnosno kombinirana proizvodnja lipida i različitih nusprodukata može osigurati ekonomsku isplativost oba procesa. Hidrofobne komponente mikroalgi mogu se simultano ekstrahirati lipidima nakon čega slijedi proces pročišćavanja, dok se hidrofilne komponente, kao što su proteini i šećeri, mogu ekstrahirati iz preostale biomase (Minhas i sur., 2016). Između različitih mikroalgalnih nusprodukata posebno su zanimljivi pigmenti zbog svoje ekonomski i ekološki prihvatljive proizvodnje i široke terapijske primjene. Na primjer,  $\beta$ -karoten se može proizvesti iz oleaginozne mikroalge *Dunaliella salina* koja može akumulirati više od 14 %  $\beta$ -karotena u suhoj tvari biomase. Fikobiliproteini, poput fikocijanina, fikoeritrocijanina i alofikocijanina,

možu se također ekstrahirati iz različitih vrsta morskih mikroalgi. Navedeni pigmenti imaju brojne primjene, uključujući prevenciju i tretman akutnih i kroničnih bolesti (Bai i sur., 2011). Postoji nekoliko analitičkih metoda određivanja udjela lipida u mikroalgama, među kojima je najčešća korištena gravimetrijska metoda. Gravimetrijsko određivanje udjela lipida često se koristi i uključuje postupak ekstrakcije biomase mikroalgi različitim otapalima (kloroform, metanol) Nakon završenog postupka ekstrakcije lipidi se suše, a zatim se težina lipida određuje vaganjem (Chen i sur., 2018). Za kvantitativnu analizu lipida u uzorcima također se može koristiti i Nile Red metoda. Nile Red metoda temelji se na sposobnosti Nile Red boje da se veže na lipide mikroalgi, selektivno oboja lipidna tjelešca unutar stanice mikroalgi i emitira fluorescentnu svjetlost u uvjetima kada je izložena svjetlu određene valne duljine (Chen i sur., 2009). U usporedbi sa gravimetrijskom metodom određivanja udjela lipida koja ima nedostatke poput nedostatne specifičnosti za lipide zbog potencijalne interakcije lipida s drugim tvarima u uzorku, Nile Red metoda ne zahtijeva upotrebu otapala, brza je te zahtijeva malu količinu uzorka (Halim i Webley, 2015). Korištenjem Nile Red boje i fluorescentne mikroskopije, moguće je vizualizirati količinu i distribuciju lipida u stanicama mikroalgi. Nile Red metoda je vrlo korisna za proučavanje utjecaja različitih uvjeta rasta (npr. koncentracije nutrijenata, pH vrijednosti, temperature) na sintezu lipida u mikroalgama. Također se može koristiti za praćenje faze rasta mikroalgi u kojoj se najviše sintetiziraju lipidi, što može biti korisno u optimizaciji procesa proizvodnje bioenergije i biogoriva iz mikroalgi (Chen i sur., 2009). Iako je Nile Red jedna od najčešće korištenih fluorescentnih boja za vizualizaciju lipida, postoji i niz drugih fluorescentnih boja koje se koriste u istraživanju lipida u mikroalgama, uključujući BODIPY i rodamin B (Govender i sur., 2012).

### **2.3. Pigmenti mikroalgi**

Mikroalge sadrže tri glavne skupine fotosintetskih pigmenata: klorofile, karotenoide (karoteni i ksantofili) te fikobiline. Klorofili i karotenoidi su pigmenti topivi u ulju, dok su fikobilini topivi u vodi. Klorofili su skupina zelenih pigmenata koji apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu spektra, a postoje tri tipa klorofila - klorofil a, b i c. Karotenoidi su pigmenti koji daju žutu, narančastu ili crvenu boju, te apsorbiraju svjetlost u plavom dijelu spektra, dok ksantofili apsorbiraju svjetlost u plavom i zelenom dijelu spektra. Fikobilini su pigmenti koji daju crvenu, narančastu ili plavu boju te su specifični za cijanobakterije i crvene alge, a sudjeluju u procesu prijenosa energije između fotosintetskih pigmenata. Svi nabrojani pigmenti imaju ključnu ulogu u procesu fotosinteze te su važni za razvoj i rast mikroalgi (Pagels i sur.,

2020). Strukturu molekule klorofila čini porfirinski makrocikl koji se sastoji od pirolnih prstenova (Humphrey, 2004; Scheer, 2007). U središtu molekule nalazi se atom magnezija. Porfirinska struktura molekule klorofila nastaje vezanjem jednog izocikličkog prstena na jedan od pirolnih prstenova (Humphrey, 2004). Svaki pirolni prsten sadrži četiri atoma ugljika i jedan atom dušika. Formilnu skupinu u prstenu molekule klorofila b zamjenjuje metilna skupina u molekuli klorofila a (Scheer i sur., 2004). Klorofil a i klorofil b su strukturno različite molekule koje imaju različite apsorpcijske karakteristike u spektru elektromagnetskog zračenja. Klorofil a ima karakteristični plavo-zeleni pigment s maksimalnom apsorpcijom u rasponu valnih duljina od 660-665 nm, dok klorofil b ima zeleno-žuti pigment s maksimalnom apsorpcijom u rasponu valnih duljina od 642-652 nm. Ovi pigmenti zajedno doprinose fotosintetskoj aktivnosti mikroalgi, omogućujući im apsorpciju različitih valnih duljina svjetlosnog spektra i pretvaranje energije u kemijsku energiju koja se koristi u reakcijama neovisnim o svjetlosti (npr. reakcije u tami, Calvinov ciklus) (Humphrey, 2004). Karotenoidi su organski pigmenti koji se nalaze u kromoplastima. Poznato je oko 600 vrsta karotenoida, a najpoznatiji među njima su  $\beta$ -karoten, likopen i lutein. Karotenoidi su skupina pigmenata sa karakterističnom molekularnom strukturom građenom od terpenoidnih prstenova načinjenih od 40-C lanca poliena. Molekule karotenoida u svojoj strukturi također mogu sadržavati cikličke i ostale funkcionalne skupine koje sadrže kisik, poput hidroksilnih, epoksi i karboksilnih skupina. Karotenoidi imaju izrazito važnu funkciju u fotosintezi jer su odgovorni za apsorpciju svjetlosne energije i njen prijenos na reakcijski centar fotosintetskog sustava. Naime, karotenoidi djeluju kao dodatni pigmenti koji apsorbiraju svjetlost u različitim dijelovima spektra, što povećava ukupnu učinkovitost apsorpcije svjetlosne energije (Del Campo i sur., 2007). Kako bi se izolirali iz mikroalgi ili drugih izvora, koriste se različiti postupci ekstrakcije i različita otapala. Aceton, metanol i dimetil sulfoksid (DMSO) neka su od otapala koja se često koriste za ekstrakciju karotenoida. Ovisno o tipu otapala i uvjetima ekstrakcije, moguće je dobiti različite frakcije s različitim sadržajem pojedinih karotenoida. Ova skupina pigmenata sastoji se od dvije glavne podskupine - karotena i ksantofila. Ksantofili su uglavnom hidrofobne molekule i često su vezane za membranske strukture ili su nekovalentno vezane za specifične proteine. Tipično se nalaze u tilakoidnim membranama, a imaju ključnu ulogu u fotosintezi apsorbirajući svjetlost i prenoseći energiju na kloroplaste. Karotenoidi mikroalgi imaju brojne primjene, uključujući prevenciju bolesti kao što su dijabetes, rak, moždani udar i gojaznost, koje su povezane s oksidativnim stresom. Osim toga, karotenoidi iz mikroalgi koriste se u prehrani ljudi i životinja, kozmetici i farmaceutskoj industriji. Primjena karotenoida u kozmetici odnosi se na dodavanje boja i hranjivih tvari u proizvode za njegu kože, kose i noktiju, dok se

u farmaceutskoj industriji koriste zbog svojih antioksidativnih svojstava (Henríquez i sur., 2016). Mikroalga *Dunaliella salina* ima visok potencijal proizvodnje karotenoida, a posebno se ističe proizvodnja  $\beta$ -karotena u značajnim količinama. Naime,  $\beta$ -karoten čini oko 10-14 % suhe tvari biomase ove mikroalge. Zbog svoje sposobnosti sinteze  $\beta$ -karotena pod stresnim uvjetima, *Dunaliella salina* se često koristi kao modelni organizam za proučavanje tolerancije na stres i proces fotosinteze kod mikroalgi. Također, zbog svoje visoke koncentracije  $\beta$ -karotena, *Dunaliella salina* se koristi u proizvodnji prehrambenih dodataka i bojila, kozmetičkih proizvoda i farmaceutskih preparata (Sathasivam i Juntawong, 2013). Drugi važan pigment iz skupine karotenoida je astaksantin čija tržišna vrijednost iznosi 2500 USD/kg. Najpozantija mikroalga poznata po produkciji astaksantina u značajnim količinama je *Hematococcus pluvialis* (4-5 % suhe tvari biomase) (Sathasivam i Juntawong, 2013). Proizvodnja astaksantina iz mikroalge *Hematococcus pluvialis* predstavlja jednu od najvećih komercijalnih primjena mikroalgi, budući da se proizvedeni astaksantin deklarira od strane Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih država (FDA; eng. *Food Drug Administration*) kao dozvoljeni dodatak ljudskoj prehrani u nekoliko europskih zemalja. Prema pretkliničkim ispitivanjima, proizvedeni astaksantin pokazuje različite pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, kao što su povećana sinteza antitijela, antitumorna aktivnost, antikancerogena aktivnost, fotozaštitna aktivnost, antiupalna aktivnost, smanjen rizik od arterioskleroze te usporavanje napredovanja neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Astaksantin se pokazao kao snažan antioksidans koji može poboljšati antioksidativni obrambeni sustav enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza. Naime, astaksantin ima sposobnost prodiranja u stanične membrane i neutraliziranja slobodnih radikala unutar stanica, čime se smanjuje šteta uzrokovana oksidativnim stresom. Navedene karakteristike čine astaksantin iznimno korisnim dodatkom prehrani u vidu očuvanja zdravlja i prevencije različitih bolesti (De Jesus Raposo i sur., 2013).

#### **2.4. Fotosintetski metabolizam mikroalgi**

Fotosinteza je proces kojim biljke, alge i neki bakterijski organizmi sintetiziraju organske spojeve koristeći energiju sunčeve svjetlosti. U ovom procesu, mikroalge koriste pigmente koji se nalaze u kloroplastima za apsorpciju svjetlosne energije koju pretvaraju u kemijsku energiju i anorganske komponente, poput vode i CO<sub>2</sub> u organsku tvar. S obzirom da fotosintetski organizmi proizvode kisik kao nusprodukt fotosinteze, koji je neophodan za disanje životinja i ljudi, fotosinteza se smatra ključnim procesom za održavanje života na Zemlji (Masojídek i sur., 2021). Fotosintetske reakcije eukariotskih vrsta mikroalgi odvijaju se u kloroplastima.

Kloroplasti su specijalizirane organele koje sadrže pigmentne molekule poput klorofila, karotenoida i fikobilina, koje mikroalgama omogućavaju apsorpciju svjetlosti. Fotosintetski pigmenti smješteni su u organiziranim strukturama, odnosno fotosistemima koji su dio tilakoidnih membrana kloroplasta i biljaka i eukariotskih algi. Fotosistemi se sastoje od složenih proteinskih kompleksa i različitih pigmenata koji su organizirani u reakcijske centre - FS1 (fotosistem I) i FSII (fotosistem II). FSII apsorbira svjetlost na niskofrekventnom dijelu spektra, što znači da apsorbira plavu svjetlost, dok FS1 apsorbira svjetlost na visokofrekventnom dijelu spektra, što znači da apsorbira crvenu svjetlost. Ovaj proces apsorpcije svjetlosti omogućuje fotosistemu da apsorbira energiju iz sunčeve svjetlosti. Na fotosistemima se odvijaju enzimske reakcije koje koriste svjetlost kao redukcijski element za transport elektrona. Kada se svjetlost apsorbira u fotosistemu, energija se prenosi kroz kompleks pigmenta i proteina, odnosno pobuđeni elektroni transportiraju na proteinske komplekse u tilakoidnoj membrani kloroplasta, poznatom kao elektronski transportni lanac, oslobađajući energiju koja se koristi za stvaranje protonskog gradijenta. Nastali protonski gradijent omogućuje sintezu ATP-a, molekule koja se koristi kao izvor energije za stanični metabolizam. U procesu fotosinteze, FSII i FS1 međusobno se nadopunjavaju kako bi stvorili potrebnu energiju za sintezu organskih spojeva. FS1 također ima važnu ulogu u stvaranju NADPH, molekule koja se koristi u procesima sinteze i redukcije (Okada i sur., 2020) Fotosinteza se može podijeliti u dvije faze: faza ovisna i faza neovisna o svjetlosti (ili reakciju u mraku). Faza ovisna o svjetlosti odvija se na tilakoidima kloroplasta, gdje se svjetlosna energija koristi za sintezu ATP-a i NADPH-a koji su ključni kofaktori potrebni za reakcije u tami. Faza neovisna o svjetlosti, također poznata kao ciklus Calvin-Bensona, odvija se u stromi kloroplasta, izvan tilakoidnih membrana. U fazi neovisnoj o svjetlosti molekule CO<sub>2</sub> se reduciraju te nastaju organski spojevi uz pomoć enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze/oksigenaze (Rubisco) i energije koju osiguravaju molekule ATP-a i NADPH-a, koje su proizvedene u fazi ovisnoj o svjetlosti. Proces fiksacije ugljika u fazi neovisnoj o svjetlosti započinje reakcijom molekule CO<sub>2</sub> s molekulom ribuloza-1,5-bisfosfatom (RuBP) pri čemu nastaju dvije molekule 3-fosfoglicerata (3PG). Ova reakcija katalizirana je enzimom Rubiscom (Buchanan, 2016).

## 2.5. Oksidativni stres u mikroalgama

Oksidativni stres stanice je stanje u kojem je ravnoteža između proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i sposobnosti stanica da neutraliziraju i uklone ROS-ove poremećena u korist prekomjerne količine ROS-ova. ROS-ovi su vrlo reaktivni kemijski spojevi koji se mogu vezati i na taj način oštetiti različite makromolekule u stanicama, uključujući lipide, proteine, ugljikohidrate i nukleinske kiseline te na taj način dovesti do promjena u staničnoj strukturi, disfunkciji organela, mutagenezi i konačno do smrti stanica (Gill i Tuteja, 2010; Chokshi i sur., 2017). Ovi reaktivni spojevi su nusprodukti metabolizma kisika u organizmima koji žive u aerobnim uvjetima (Chokshi i sur., 2017). Međutim, nepovoljni okolišni uvjeti, poremećaji u metaboličkim procesima, poremećaji u imunološkom sustavu ili bolesti, mogu povećati proizvodnju ROS-ova iznad razine koju stanice mogu neutralizirati, što dovodi do akumulacije ROS-ova u stanicama te u konačnici do oksidativnog stresa. Oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom povezana su s različitim patološkim procesima, uključujući upalne bolesti, neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti, kancerogeneze i proces starenja. ROS-ovi uključuju i slobodne radikale i neradikalne (molekularne) oblike. Slobodni radikali uključuju superoksid radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksil radikale ( $OH^{\bullet}$ ), perhidroksi radikale ( $HO_2^{\bullet}$ ) i alkoksi radikale ( $RO^{\bullet}$ ). Navedeni radikali vrlo su reaktivni te mogu oksidirati druge molekule u stanicama. Neradikalni oblici ROS-ova uključuju vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i singletni kisik ( $^1O_2$ ) koji su manje reaktivni od slobodnih radikala, ali mogu i dalje uzrokovati oksidativni stres u stanicama. Svi navedeni oblici ROS-ova djelomično su reducirani oblici atmosferskog kisika ( $O_2$ ) koji nastaju ekscitacijom  $O_2$  u svrhu formiranja  $^1O_2$ . Naime, redukcija  $O_2$  s jednim elektronom dovodi do stvaranja superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet-}$ ), koji je vrlo reaktivni oblik ROS-ova. Ovaj superoksidni anion može inaktivirati nekoliko važnih enzima koji sadrže klastere željeza i sumpora, a koji su potrebni za proizvodnju energije i metabolizam aminokiselina (Chokshi i sur., 2017). Akumulacijom ROS-ova u mikroalgalnoj stanici aktiviraju se različiti obrambeni mehanizmi kako bi se stanica zaštitila od štetnih učinaka ROS-ova. Obrambeni mehanizmi mikroalgalne stanice uključuju enzime kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), glutation reduktaza (GR), itd., koji djeluju kao "čistači" i neutraliziraju višak oksidansa u stanici. Osim enzimatskih „čistača“, postoje i neenzimatske molekule antioksidansa, poput pigmenata, prolina, polisaharida, polifenola, karotenoida, flavonoida, itd., koje se nalaze u različitim dijelovima stanice i također sudjeluju u neutralizaciji ROS-ova. Svi navedeni obrambeni mehanizmi mikroalgalnih stanica djeluju sinergistički kako bi održali homeostazu ROS-ova i zaštitili stanicu od oksidativnog stresa

(Mittler, 2002; Cirulis i sur., 2013). Različiti neenzimatski antioksidansi također su važni u smanjenju oštećenja stanica uzrokovanih oksidativnim stresom. Među njima su karotenoidi, pigmenti toplivi u lipidima, koji smanjuju oksidacijsku toksičnost na nekoliko načina. Karotenoidi direktno inhibiraju formiranje ROS-ova, poput singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) ili ih uklanjaju putem raspršivanja viška energije pobude iz klorofila putem izravnog prijenosa ili ksantofilnog ciklusa. Također, karotenoidi inhibiraju peroksidaciju lipida koja može oštetiti stanične membrane i izazvati oksidativni stres. Sve nabrojane funkcije karotenoida pomažu u održavanju oksidacijske ravnoteže u stanici i štite stanicu od oštećenja uzrokovanih ROS-ovima (Rezayian i sur., 2019). Ukoliko se akumuliraju u velikim količinama, ROS-ovi mogu imati negativan učinak na mikroalgalne stanice. Međutim, ROS-ovi također mogu imati važnu zaštitnu i signalnu ulogu ukoliko se nalaze u odgovarajućoj ravnoteži i kontroliranoj koncentraciji. Koncept oksidativnog stresa, koji je nekada bio široko korišten za opisivanje negativnih učinaka ROS-ova na stanice, danas je reevaluiran i zamijenjen terminom oksidativna signalizacija ili redoks signalizacija. Ovaj novi termin naglašava činjenicu da ROS-ovi nisu uvijek štetni, odnosno da ROS-ovi mogu imati različite funkcije u stanici ovisno o količini i kontekstu u kojem se nalaze. ROS-ovi također mogu služiti i kao signalne molekule koje kontroliraju mnoge važne stanične procese, uključujući signalizaciju rasta i razvoja, apoptozu, itd. (Foyer, 1997; Gratão i sur., 2005; Rezayian i sur., 2019). Lipidna peroksidacija je jedan od najčešćih procesa koji se javljaju kao posljedica oksidativnog stresa u stanicama mikroalgi te se često koristi kao indikator razine oksidativnog stresa u ovim mikroorganizmima. Proces lipidne peroksidacije predstavlja oksidaciju lipida koji se nalaze u staničnim membranama, što može dovesti do formiranja reaktivnih produkata peroksidacije lipida, uključujući aldehide, ketone i alkene. Glavni uzročnici lipidne peroksidacije su ROS-ovi. Naime, ROS-ovi oksidiraju višestruko nezasićene masne kiseline u staničnim membranama, što dovodi do oštećenja membrane, a time i organela, enzima i proteina unutar stanice. Navedena oštećenja mogu rezultirati poremećajima u funkciji stanica, što u konačnici može utjecati na mikroalgalnu sposobnost preživljavanja (Coulombier i sur., 2021).

Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal ( $\text{OH}\bullet$ ), međutim ponekad i drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije. Proces lipidne peroksidacije obilježavaju tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Postoje različite metode detekcije razine lipidne peroksidacije u mikroalgama, uključujući spektrofotometriju, kromatografiju i uporabu fluorescentnih sonda (molekule koje emitiraju svjetlost (fluoresciraju) kada su izložene određenim kemijskim promjenama u lipidima, kao što su promjene uzrokovane lipidnom peroksidacijom). Jedan od najčešće korištenih markera za procjenu oksidativnog stresa u

biološkim sustavima, uključujući i mikroalge, je malondialdehid (MDA). MDA je jedan od glavnih produkata peroksidacije lipidnih membrana koji nastaje reakcijom slobodnih radikala s višestruko nezasićenim masnim kiselinama te se često koristi kao indikator oksidativnog stresa u biološkim sustavima, uključujući i mikroalge. Naime, pod djelovanjem iona željeza ili bakra, lipidni peroksidi stvaraju mnogobrojne razgradne produkte kao npr. aldehide (MDA), ketone, ugljikovodike (etan, eten, pentan), epokside, do aktivnih radikala. Jedna od najčešće korištenih metoda za praćenje razine lipidne peroksidacije naziva se TBARS metoda. Razina lipidne peroksidacije određuje se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom u kiseloj sredini. Pri reakciji nastaju tiobarbiturne reaktivne tvari (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) koje su crveno obojane pa se njihova koncentracija može izmjeriti spektrofotometrijski. Uz korištenje biomarkera poput MDA, razumijevanje procesa lipidne peroksidacije i načina na koje se može mjeriti u mikroalgama može biti korisno za razvoj strategija zaštite i očuvanja mikroalgalnih vrsta u prirodnom okolišu, ali i za poboljšanje proizvodnje biomase i biološki aktivnih tvari koje proizvode (Coulombier i sur., 2020). Upotreba biomarkera poput MDA pruža važan uvid u razumijevanje procesa lipidne peroksidacije u mikroalgama. Naime, razumijevanje ovog procesa i načina na koje se može kvantificirati, može biti korisno za razvoj strategija zaštite i očuvanja mikroalgalnih vrsta u prirodnom okolišu te optimizaciji uvjeta i načina uzgoja s ciljem poboljšanja produktivnosti i kvalitete proizvoda. S obzirom na sve veći interes korištenja mikroalgi u različitim područjima, kao što su proizvodnja biogoriva, prehrambenih dodataka i farmaceutskih spojeva, razumijevanje procesa lipidne peroksidacije i korištenje biomarkera kao alata za procjenu oksidativnog stresa može biti ključno za razvoj održivih i učinkovitih procesa proizvodnje (Osundeko i sur., 2013).

Razina oksidativnog stresa također može utjecati i na sintezu lipida u mikroalgama. Naime, kada se mikroalgalne stanice nalaze u nepovoljnim kultivacijskim uvjetima, odnosno u uvjetima stresa, povećava se proizvodnja ROS-ova. ROS-ovi djeluju na način da oštećuju stanične membrane mikroalgi i povećavaju razinu peroksidacije lipida što rezultira smanjenjem sinteze lipida u mikroalgama. Suprotno tome, umjerena razina oksidativnog stresa može djelovati kao signal za povećanje sinteze lipida u mikroalgalnim stanicama. U ovom slučaju, niska razina oksidativnog stresa djeluje kao stimulator sinteze lipida u mikroalgama, što može biti od velike važnosti u industrijskoj proizvodnji mikroalgalnih lipida i drugih lipidnih proizvoda (Yilancioglu i sur., 2014; Shi i sur., 2020). Osim toga, ROS-ovi, poput vodikovog peroksida, mogu aktivirati enzime poput lipooksigenaze, koji imaju važnu ulogu u biosintezi lipida (Bailly i sur., 2008). Utjecaj oksidativnog stresa na sintezu lipida u mikroalgama ovisi o



razini stresa i trajanju izlaganja. Razumijevanje utjecaja oksidativnog stresa na sintezu lipida u mikroalgalnim stanicama ima izuzetno važnu ulogu u poboljšanju kultivacijskih uvjeta i na taj način povećanju proizvodnje lipida u ovim organizmima. Razumijevanje utjecaja oksidativnog stresa na sintezu lipida u mikroalgama također može biti vrlo korisno u razvoju novih strategija i tehnologija za povećanje proizvodnje lipida i njihovu primjenu u različitim industrijama, poput farmaceutske, prehrambene, kemijske industrije i industrije biogoriva (Song i sur., 2022).

## **2.6. Utjecaj elemenata u tragovima na mikroalge**

Morske mikroalge, kao i ostali organizmi, za svoj rast i razvoj zahtijevaju širok raspon nutrijenata, uključujući makroelemente poput ugljika, dušika i fosfora, kao i elemente u tragovima (željezo (Fe), bakar (Cu), cink (Zn), mangan (Mn), molibden (Mo) i kobalt (Co)). Iako mikroalge elemente u tragovima trebaju u malim količinama, oni su neophodni dijelovi stanične strukture i enzimskih aktivnih centara, a također omogućavaju provođenje vitalnih metaboličkih procesa. S obzirom da čak i nedostatak samo jednog elementa u tragovima može značajno usporiti rast mikroalgi i smanjiti njihov udio lipida, od iznimne je važnosti osigurati adekvatnu količinu svih neophodnih nutrijenata u hranjivoj podlozi kako bi se postigao optimalan rast i razvoj morskih mikroalgi (Dou i sur., 2013). Makronutrijenti, prije svega dušik i fosfor, koji mogu biti u suvišku ili nedovoljnim količinama, bili su predmet brojnih istraživanja, što ukazuje na njihov izuzetan značaj u procesu rasta i razvoja mikroalgi (Ho i sur., 2012; Chu i sur., 2014; Hamouda i Abou-El-Souod, 2018; Lopes i sur., 2019; de Oliveira i sur., 2020). Iako su elementi u tragovima, uključujući Co, Cu, Mn, Mo, Zn i druge, također prisutni u hranjivom mediju mikroalgi, manje se pažnje posvećivalo njihovom utjecaju na rast i razvoj mikroalgi (Fox i Zimba, 2018). Udjel elemenata u tragovima u mikroalgama povezan je s afinitetom stanica za te elemente te njihovom prisutnošću u kultivacijskom mediju (Silva i sur., 2015). Također je zabilježeno da udjel tih elemenata može značajno varirati između različitih vrsta mikroalgi (Zayed i sur., 1998).

### **2.6.1. Utjecaj selena na mikroalge**

Selen (Se) je esencijalni hranjivi element u tragovima s izrazito važnim biološkim funkcijama u ljudskom organizmu. Između ostalog, Se je ključan za normalan rast i razvoj fetusa, održavanje zdrave kose, kože i noktiju te zaštitu stanica od oksidativnog stresa koji može uzrokovati oštećenja stanica i dovesti do raznih bolesti. Također, Se ima važnu ulogu u regulaciji imunološkog sustava te u jačanju otpornosti organizma na virusne infekcije. Brojne epidemiološke studije ukazuju na moguću povezanost nedostatka Se s povećanim rizikom od

različitih patoloških stanja i bolesti, kao što su Keshanova i Kashin-Beckova bolest, različiti karcinomi, neurodegenerativne bolesti i mnoge druge. Nedostatak selena može smanjiti funkciju ključnih enzima za zaštitu stanica od oksidativnog stresa, što može dovesti do oštećenja stanica i razvoja različitih bolesti (Rayman, 2008; Hatfield i sur., 2014; Ren i sur., 2022). Za razliku od većine drugih elemenata u tragovima koji djeluju kao kofaktori, fiziološke funkcije selena obično se ostvaruju putem selenoproteina (Vindry i sur., 2018, Guillin i sur., 2019). Kao glavni proizvođači vodenih ekosustava, mikroalge imaju ključnu ulogu u apsorpciji selena iz vodenog okoliša. Naime, mikroalge su sposobne apsorbirati i koncentrirati selen iz vode putem procesa bioakumulacije, čime postaju glavni izvor selena u prehrani drugih organizama (Morlon i sur., 2005). Za razliku od većine viših biljaka, neke vrste mikroalgi pokazale su da selen ima značajnu ulogu kao element u tragovima za njihov rast kao što su *Alexandrium minnutum*, *Emiliania huxleyi*, *Platymonas subcordiformis*, *Amphiprora hyalina* (Araie i Shiraiwa, 2009). Nisu sve vrste mikroalgi jednako osjetljive na nedostatak selena, odnosno njihova potreba za selenom može varirati ovisno o mnogim čimbenicima, kao što su vrsta mikroalge, fiziološko stanje, koncentracija selena u okolišu, itd. (Zheng i sur., 2017). Prema rezultatima istraživanja Zhang i sur., (2020) selen je također važan za sintezu lipida u mikroalgama. Naime, selen je ključni dio enzima glutathion peroksidaze (GPx) koja štiti stanice od oksidativnog stresa koji može uzrokovati oštećenja lipida u mikroalgalnim stanicama. Enzim glutathion peroksidaza (GPx) koristi selen kao ko-faktor u svojoj katalitičkoj aktivnosti te neutralizira peroksidne spojeve, uključujući hidroperokside lipida, čime sprječava njihovu daljnju peroksidaciju. Uz ulogu u katalitičkoj aktivnosti GPx-a, selen je također potreban za aktivnost drugih enzima koji sudjeluju u različitim metaboličkim procesima, uključujući biosintezu masnih kiselina i oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijima, što ukazuje na važnost selena za održavanje ravnoteže lipida u stanicama i pravilan lipidni metabolizam (Zhang i sur., 2020). Nedostatak selena može uzrokovati smanjenje aktivnosti GPx, što dovodi do povećane osjetljivosti mikroalgi na oksidativni stres. Ovo stanje također može dovesti do nakupljanja lipidnih peroksida, što dodatno oštećuje stanice i može utjecati na kvalitetu lipida te stoga optimalna razina selena u mikroalgama ima značajnu ulogu u regulaciji razine lipida i održavanju njihove kvalitete (Singh i sur, 2023).

#### **2.6.1.1. Mehanizam transporta selena u mikroalgalne stanice**

Proces apsorpcije selena od strane mikroalgalnih stanica je izuzetno složen proces, reguliran različitim mehanizmima. Jedan od ključnih mehanizama koji omogućuje apsorpciju selenita u stanicu mikroalgi je transportni sustav za sulfat. Transportni sustav za sulfat sastoji se od

specifičnih proteina koji se nalaze u staničnoj membrani mikroalgalnih stanica koji djeluju kao transporteri koji omogućuju selektivni prijenos sulfata i selenita kroz staničnu membranu u mikroalgalnu stanicu. Molekula selenita u okolini stanice veže se za transportne proteine te se transportira preko stanične membrane u unutrašnjost stanice. Proces transporta selenita putem sulfatnog transportnog sustava reguliran je različitim čimbenicima kao što su pH, koncentracija sulfata i selenita u okolini stanice te prisutnošću drugih hranjivih tvari. Rezultati istraživanja sugeriraju da postoji proporcionalan porast nakupljanja selenita u stanicama mikroalgi s povećanjem koncentracije selenita u hranjivom mediju. Međutim, u uvjetima uzgoja kada se koncentracija sulfata u mediju povećava opaža se smanjenje nakupljanja selenita u mikroalgalnoj stanici što se može objasniti činjenicom da molekula selena i molekula sumpora imaju slična kemijska svojstva što ukazuje na mogućnost zamjene molekule selena sa molekulom sumpora u mikroalgalnoj stanici. Postoji nekoliko strategija koje se mogu koristiti za povećanje nakupljanja selena u stanicama mikroalgi, kao što su optimalno podešavanje koncentracija sulfata i selenita u hranjivom mediju, primjena niskih temperatura ili osiguravanje dovoljne količine drugih hranjivih tvari koje neće konkurirati transportu selenita u stanicu. Navedene strategije mogu biti korisne u području poboljšanja sposobnosti mikroalgi da apsorbiraju i akumuliraju selen, što je od velike važnosti u području biotehnologije i proizvodnje bioaktivnih spojeva (Araie i Shiraiwa, 2009; Schiavon i sur., 2012). Iako je transportni sustav za sulfat ključan za apsorpciju selena u mikroalgalne stanice, postoje i drugi mehanizmi koji doprinose ovom procesu. To uključuje enzime poput reduktaze selenita, koji pretvara selenit u oblik koji je prikladniji za unutarstaničnu apsorpciju, kao i enzime poput glutation peroksidaze, koji štite stanicu od toksičnog učinka selena. Nadalje, prema istraživanju Morlon i sur. (2006) transport selenita u *C. reinhardtii* odvija se putem dvaju različitih transportskih sustava, ovisno o koncentraciji selenita u hranjivoj podlozi. Pri niskim koncentracijama selenita (< nM), zapaženo je da se transport selenita u *C. reinhardtii* odvija putem specifičnog, ali brzo zasićenog transportnog sustava. Međutim, u uvjetima kada se koncentracija selenita u hranjivoj podlozi povisi, unos selena se provodi putem nespecifičnog transportnog sustava čija je aktivnost proporcionalna koncentraciji selenita izvan stanične membrane. Osim toga, Araie i sur., (2011) u svom su istraživanju primijenili tehniku izotopskog praćenja  $^{75}\text{Se}$  te su u morskoj kalcificirajućoj mikroalgi *E. huxleyi* identificirali dva mehanizma unosa selenita. Rezultati njihovog istraživanja na transportu selena u stanicu mikroalge *E. huxleyi* pokazali su da postoje dva načina transporta selena: ATP-ovisni aktivni transport visokog afiniteta prema selenitu te pasivni transport niskog afiniteta prema selenitu.

### **2.6.1.2. Metabolizam selena u zelenim mikroalgama**

Iako je selen esencijalni nutrijent za mnoge organizme, uključujući i makroalge, postoji ograničena količina informacija o metabolizmu selena i selenoproteinima u mikroalgama. To je djelomično zbog nedostatka istraživanja u tom području, kao i zbog složenosti biokemijskih procesa koji su uključeni u metabolizam selena (Araie i Shiraiwa, 2009). Nakon što se selenit ili selenat transportiraju u mikroalgalnu stanicu, oni se postupno reduciraju do selenida ( $\text{Se}^{2-}$ ). Selenid se može specifično ugraditi u proteine putem mehanizma za dodavanje selenocisteina (SeCys), ili se može dalje metabolizirati u aminokiseline selenometionin (SeMet) i selenocistein (SeCys) (Turanov i sur., 2011). SeMet dalje može ispariti u obliku dimetilselenida (DMSe) ili se može nakupljati unutar stanica mikroalgi (Umysová i sur., 2009; Pulz i Gross, 2004; Gojkovic i sur., 2015).

### **2.6.1.3. Selenoproteini**

Glavni biološki oblik selena u mikroalgama je aminokiselina selenocistein koja se smatra analogom aminokiseline cisteina (Cys) i ponekad se naziva 21. aminokiselinom. Selenocistein se razlikuje od cisteina po tome što u svom bočnom lancu ima atom selena umjesto sumpora (Turanov i sur., 2011). SeCys se najčešće javlja kao komponenta selenoproteina, a karakteristično je da, zbog svoje visoke nukleofilnosti, ima veću sposobnost redukcije peroksida od Cys. S obzirom na svojstva aminokiseline SeCys, većina do sad identificiranih selenoproteina kategorizirana je kao oksidoreduktaze koje za svoju aktivnost zahtijevaju snažnu nukleofilnost SeCys. Zahvaljujući svojim svojstvima, selenoproteini su poznati po većoj redukcijskoj sposobnosti u odnosu na druge oksidoreduktaze koje ne uključuju selenocistein (Araie i sur., 2011).

## **2.7. Bioreaktori za uzgoj mikroalgi**

Komercijalna proizvodnja mikroalgi započela je prije više od 50 godina sa mikroalgalnim vrstama roda *Spirulina* koje se uglavnom koriste kao dodatak hrani. Uz mikroalge roda *Spirulina*, u komercijalne svrhe uzgajaju se i druge vrste mikroalgi kao npr. *Dunaliella salina* i *Hematococcus pluvialis*, koje se koriste za proizvodnju karotenoida (Carvalho i sur., 2006). U početcima, uzgoj mikroalgi uglavnom se provodio u prirodnim vodama (jezera, lagune, bare), dok se danas za mikroalgalni uzgoj sve više koriste fotobioreaktori (Pulz, 2001). Iako se uzgoj mikroalgi čini jednostavnim, još uvijek postoji niz tehnoloških izazova koje je potrebno prevladati. Neki od tih izazova su minimiziranje kontaminacije, efikasna opskrba stanica mikroalgi sa  $\text{CO}_2$  i svjetlošću, kontroliranje uvjeta uzgoja, reduciranje kapitalnih i operativnih

troškova, minimiziranje potrebnog prostora za uzgoj, itd. (Marxen i sur., 2005). Unatoč tim izazovima, i istraživači i industrija rade na razvoju novih tehnologija i inovativnih rješenja u svrhu iskorištavanja potencijala mikroalgi u punom kapacitetu te poboljšanja učinkovitosti i održivosti njihovog uzgoja. Jedna od glavnih prednosti uzgoja mikroalgi je mogućnost proizvodnje nekoliko vrsta obnovljivih goriva. Tako se npr. anaerobnom digestijom biomase mikroalgi može proizvesti metan, koji se može koristiti kao alternativa fosilnim gorivima. Osim toga, lipidi koji se dobivaju iz biomase mikroalgi predstavljaju važnu sirovinu u procesu proizvodnje biodizela. Iako postoji mogućnost proizvodnje i bioetanola iz biomase mikroalgi, ova tehnologija još uvijek nije dovoljno razvijena kao proizvodnja biodizela. Proces proizvodnje bioetanola iz biomase mikroalgi uključuje korištenje enzima za razgradnju šećera u mikroalgama do glukoze, koja se zatim fermentira u bioetanol. Proizvodnja obnovljivih izvora energije iz biomase mikroalgi predstavlja ključno područje za smanjenje emisija stakleničkih plinova i jačanje održivosti energetskog sektora te se zbog toga istraživanja i razvoj u području uzgoja i korištenja mikroalgi, kao izvora obnovljive energije, ubrzano nastavljaju (Gavrilescu i Chisti, 2005).

Mikroalge pripadaju skupini obligatnih fotoautotrofa, što znači da koriste svjetlost kao izvor energije i ugljični dioksid kao izvor ugljika za svoj rast i razvoj. Međutim, postoje neke mikroalgalne vrste koje mogu rasti i u miksotrofnim ili heterotrofnim uvjetima, koristeći organske tvari kao izvor ugljika i energije. Za fotoautotrofni uzgoj mikroalgi potrebno je koristiti fotobioreaktore koji su konstruirani i vođeni na način koji će zadovoljiti potrebe odabrane vrste mikroalgi. Danas je dostupan veliki broj fotobioreaktora različitih konstrukcija i konfiguracija. Međutim, iako postoji mnogo različitih pristupa i strategija u konstruiranju fotobioreaktora, još uvijek ne postoji jedinstvena optimalna konstrukcija. Kako bi se osigurali uvjeti rasta koji će omogućiti optimalnu proizvodnju mikroalgalne biomase i potrebnih spojeva, konstrukcija fotobioreaktora zahtijeva kombinaciju saznanja iz tehničkog i biološkog područja. Pravilno dizajnirani fotobioreaktori smatraju se ključnim elementom u razvoju i komercijalizaciji mikroalgalne proizvodnje. Glavni parametri koji se moraju zadovoljiti u procesu fotoautotrofnog uzgoja mikroalgi su opskrba svjetlom i nutrijentima (anorganski ugljik, dušik, fosfor, itd.), održavanje optimalnih uvjeta rasta (pH, temperatura, itd.) te miješanje kako bi se izbjeglo nastajanje gradijenta navedenih parametara te kako bi se osigurala ravnomjerna raspodjela hranjivih tvari za rast mikroalgi (Fernández i sur., 2014). Zadovoljavanje svih navedenih parametara u laboratorijskim fotobioreaktorima je relativno jednostavno. Međutim, jedan od najvećih problema u proizvodnji mikroalgalne biomase u laboratorijskom

fotobioreктору je uvećanje mjerila fotobioreaktora. Naime, uvećanja mjerila proizvodnje mikroalgi zahtijeva prilagođavanje brojnih elemenata uzgoja, kao što su intenzitet osvjetljenja, miješanje kulture, održavanje optimalnih vrijednosti pH i temperature, itd. Trenutno se provode brojna istraživanja s ciljem rješavanja problema uvećanja mjerila fotobioreaktora, a sve u svrhu postizanja održive i učinkovite proizvodnje biomase mikroalgi (Norsker i sur., 2011).

### **2.7.1. Uvjeti uzgoja i izvor ugljika za uzgoj fotoautotrofnih mikroalgi**

#### **2.7.1.1. Osvjetljenje – dostupnost, valna duljina i intenzitet svjetlosti u fotobioreaktorima**

Ključni čimbenici koji utječu na rast i produktivnost fotosintetskih mikroorganizama su dostupnost i intenzitet osvjetljenja. Naime, adekvatan izvor i intenzitet osvjetljenja od vitalne su važnosti za odvijanje procesa fotosinteze i stvaranje mikroalgalne biomase te je stoga neophodno osigurati optimalne uvjete osvjetljenja u fotobioreaktorima kako bi se postigla najveća moguća produktivnost procesa mikroalgalnog uzgoja (Acién Fernández i sur., 2013). Za fotoautotrofni uzgoj mikroalgi moguće je koristiti dva tipa izvora svjetlosti, odnosno prirodnu sunčevu svjetlost ili umjetno osvjetljenje. Za vanjski uzgoj mikroalgi preferira se prirodni izvor svjetlosti, odnosno sunčeva svjetlost. Osim što je obilna i besplatna, sunčeva svjetlost omogućuje efikasan utrošak sunčeve energije od strane mikroalgálnih stanica, što u konačnici može pomoći u rješavanju problema visokih troškova i zagađenja okoliša uzrokovanih korištenjem električne energije. Stupanj osjetljivosti mikroalgi na intenzitet osvjetljenja ponajprije ovisi o mikroalgálnoj vrsti. Naime, neke mikroalgálne vrste manje su osjetljive na visoke intenzitete svjetlosti, dok su druge vrlo osjetljive na takve uvjete te je stoga tijekom mikroalgálnog uzgoju intenzitet osvjetljenja važno prilagoditi vrsti mikroalge koja se uzgaja. Naime, potrebno je odrediti optimalan intenzitet svjetlosti koji neće oštetiti stanice mikroalgi, a koji je istovremeno dovoljan za poticanje rasta i produktivnosti (Chisti, 2006c). Općenito, mikroalgálne vrste koje su u prirodi izložene jakom sunčevom svjetlu, poput vrsta koje se uzgajaju u otvorenim sustavima, manje su osjetljive na visoke intenzitete svjetlosti. S druge strane, mikroalge koje se uzgajaju u zatvorenim fotobioreaktorima mogu biti osjetljivije na visoke intenzitete svjetlosti zbog ograničenog prostora za disperziju svjetla i mogućnosti stvaranja lokaliziranih točaka visokog svjetlosnog intenziteta. Visoka razina osvjetljenja može rezultirati efektom fotoinhibicije uzrokovano nastajanjem toksičnih foto-produkata ( $H_2O_2$ ,  $O^{2-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ) te čak prouzročiti oštećenja fotosistema II (Taiz i Zeiger, 2010). Niske razine osvjetljenja limitiraju fotosintetsku aktivnost i rezultiraju postizanjem niske produktivnosti biomase. S obzirom na navedene posljedice uporabe previsokog ili preniskog intenziteta osvjetljenja tijekom uzgoja mikroalgi, od velike je važnosti da stanice mikroalgi budu opskrbljene sa

adekvatnim intezitetom osvjetljenja uz optimalni dizajn, geometriju i orijentaciju izvora svjetlosti (Acién Fernández i sur., 2013b). Brzina rasta mikroalgi ovisi o fotosintetskoj brzini koja je funkcija osvjetljenja kojom su stanice unutar kulture izložene. Fotosintetski mikroorganizmi u stanju su koristiti svjetlosnu energiju koja se nalazi unutar raspona valnih duljina od 400 do 700 nm, što se naziva fotosintetsko aktivno zračenje (Acién Fernández i sur., 2013b). Sustavi za uzgoj mikroalgi koji su prirodno osvjetljeni uključuju otvorene sustave (eng. *open ponds*), pločaste fotobioreaktore (eng. *flat-plate*), horizontalne i vertikalne cijevne fotobioraktore, air lift i koso postavljene barbotirajuće fotobioreaktore (Ugwu i sur., 2008). U zatvorenim sustavima za unutarnji uzgoj mikroalgi koriste se umjetna osvjetljenja, što omogućava kontrolu intenziteta osvjetljenja i temperature tijekom provođenja uzgoja. Laboratorijski fotobioreaktori obično koriste fluorescentne lampe kao izvore osvjetljenja, što može rezultirati velikom potrošnjom energije i visokim operativnim troškovima. Intenzitet i vrsta osvjetljenja također imaju značajan utjecaj na proizvodnju biomase i sadržaj lipida u mikroalgama tijekom uzgoja u laboratorijskim fotobioreaktorima. Ova činjenica naglašava potrebu za pažljivim biranjem optimalnih uvjeta osvjetljenja kako bi se postigao maksimalni prinos biomase i povećao sadržaj lipida u biomasi mikroalgi, uz smanjenje potrošnje energije i operativnih troškova (Alishah Aratboni i sur., 2019). Korištenjem sunčeve svjetlosti u otvorenim bazenima moguće je ostvariti godišnje prinose mikroalgalne biomase u rasponu od 20 do 40 tona suhe tvari biomase po hektaru obrađene površine. Primjenom umjetnih izvora osvjetljenja u laboratorijskim uvjetima, moguće je značajno povećati godišnji prinos suhe tvari biomase, odnosno od 60 do 150 tona po hektaru. Primjenom unutarnjeg osvjetljenja, odnosno osvjetljenja u suspenziji kulture mikroalgi, osigurava se bolji prijenos svjetlosti na mikroalgalne stanice u unutrašnjosti bioreaktora, što rezultira povećanjem prinosa biomase mikroalgi i lipida. Osobiti napredak u osvjetljavanju unutrašnjosti otvorenih bioreaktorskih sustava za uzgoj mikroalgi ostvaren je korištenjem optičkih vlakana (Rezić i sur., 2014).

### **2.7.1.2. Sastav hranjive podloge**

Glavne biološke komponente mikroalgi su ugljik (30-50 % suhe tvari biomase), kisik (30-50 % suhe tvari biomase), vodik (3-7 % suhe tvari biomase), dušik (4-9 % suhe tvari biomase), fosfor (1-3 % suhe tvari biomase) i manje količine drugih elemenata kao što su sumpor, kalij, magnezij, kalcij, itd. Ostali elementi, kao što su kobalt, cink, bor, bakar i molibden predstavljaju esencijalne elemente u tragovima. Određene vrste mikroalgi zahtijevaju prisutnost dodatnih komponenti u hranjivoj podlozi kako bi se osigurali optimalni uvjeti za njihov rast. Tako npr. neke vrste mikroalgi mogu zahtijevati dodatne vitamine, nukleinske kiseline i druge faktore

rasta kako bi se osigurala adekvatna sinteza proteina, stanična dioba i druge vitalne funkcije. S obzirom na navedeni sastav, hranjive podloge za uzgoj mikroalgi moraju sadržavati odgovarajuće hranjive tvari koje će osigurati dostupnost tih elemenata za njihov rast i razvoj. Izbor odgovarajućeg hranjivog medija ključan je korak za postizanje visokih prinosa i kvalitete biomase mikroalgi. Danas postoje recepti za veliki broj hranjivih podloga za uzgoj mikroalgi od koji su najpoznatiji i najčešće korišteni f/2, Algal, BBM, BG11, Zarrouk i Mann & Myers hranjivi medij (Andersen i Kawachi, 2005). CO<sub>2</sub> je ključan izvor ugljika u hranjivim medijima za uzgoj mikroalgi, međutim, samo dio CO<sub>2</sub> koji se dovodi u sustav pretvara se u oblik koji je dostupan za rast i razvoj stanica mikroalgi. Otopljeni CO<sub>2</sub> u vodi je u obliku ugljične kiseline, bikarbonata ili karbonata, ovisno o pH vrijednosti hranjive podloge i količini dostupnih kiselinskih ili alkalnih iona. Navedeni oblici ugljika mogu se koristiti za fotosintezu i rast mikroalgi, pri čemu neke vrste mikroalgi mogu bolje koristiti bikarbonate ili karbonate kao izvore ugljika. Kako bi se osigurao optimalan rast mikroalgi, hranjiva podloga mora sadržavati pravilan omjer dostupnih oblika ugljika za određenu vrstu mikroalge i uvjete uzgoja. Osim toga, neki procesi proizvodnje mogu uključivati i direktno dodavanje bikarbonata ili karbonata u medij. S obzirom da se kisik oslobađa tijekom procesa hidrolize vode koji se događa tijekom fotosinteze, voda predstavlja ključan izvor kisika za mikroalge. Uz to, soli koje se koriste u pripremi hranjive podloge sadrže katione poput natrija, kalija i magnezija te anione poput klora i sulfata, koji osiguravaju izvore kisika i vodika za rast i metabolizam mikroalgi. Molekularni kisik također se proizvodi procesom fotosinteze. S obzirom da previsoke razine kisika u hranjivoj podlozi mogu inhibirati proces fotosinteze te na taj način negativno utjecati na metabolizam i rast mikroalgi, važno je pratiti razine kisika u hranjivom mediju i osigurati da ne prelaze razinu saturacije (0.2247 mol O<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>, 20 °C) koja je kritična za optimalni rast. Naime, visoke koncentracije kisika, pogotovo u kombinaciji s previsokim intenzitetom osvjetljenja, mogu rezultirati fotooksidacijom, što dodatno može narušiti metabolizam mikroalgi i smanjiti prinose (Costache i sur., 2013). Kao izvor dušika u hranjivim medijima za uzgoj mikroalgi najčešće se koriste urea, nitrati i amonijak. Urea se često koristi zbog svoje visoke topljivosti i dostupnosti, dok nitrat može biti preferirani izvor dušika za neke vrste mikroalgi. Amonijak se također može koristiti kao izvor dušika, iako njegova uporaba može biti ograničena zbog njegove toksičnosti za neke vrste mikroalgi. Pravilan odabir izvora dušika u mediju za uzgoj mikroalgi ovisi o vrsti mikroalgi koja se uzgaja i specifičnim uvjetima uzgoja (Chew i sur., 2018). Fosfor je također jedan od važnih elemenata za rast i metabolizam mikroalgi. Za održavanje adekvatne koncentracije fosfora u mediju dodaju se fosfati u koncentraciji od 10 do 100 mg L<sup>-1</sup>. Najčešće korištene soli fosfata su natrijev fosfat i kalijev fosfat, odnosno uporaba



kalcijevog fosfata se izbjegava zbog njegove slabe topivosti u vodi. Ukoliko je koncentracija fosfora u hranjivom mediju previsoka, prilikom ispuštanja medija u okoliš može doći do eutrofikacije vodenih tijela. Stoga je od velike važnosti primjena strategija upravljanja hranjivim tvarima kako bi se smanjio utjecaj mikroalgalnog uzgoja na okoliš. Jedan od glavnih izazova tijekom uzgoja mikroalgi je održavanje optimalnih koncentracija glavnih nutritijenata u mediju, što je ključno za rast i razvoj mikroalgi te stvaranje visokog prinosa biomase. Za postizanje komercijalne proizvodnje mikroalgi, moguće je koristiti napredni sustav za mjerenje i automatsku kontrolu određenih nutrijenata u podlozi. Međutim, upotreba takvih sustava može dovesti do viših operativnih troškova, što je izazov za uspješno poslovanje u industriji mikroalgi. Stoga, postoji potreba za razvojem inovativnih rješenja koja omogućavaju precizno održavanje optimalnih uvjeta rasta mikroalgi uz minimalne troškove proizvodnje (Legrand i sur., 2021).

### **2.7.1.3. Izvor ugljika**

U laboratorijskim uvjetima uzgoja često se za uzgoj mikroalgi koriste podloge koje kao izvor ugljika sadrže bikarbonatne i karbonatne soli (Vasumathi i sur., 2012). Drugi izvor ugljika je plinoviti CO<sub>2</sub>. U odnosu na korištenje bikarbonatnih i karbonatnih soli, korištenje CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika u hranjivim podlogama za uzgoj mikroalgi ima niz prednosti. Prije svega, CO<sub>2</sub> je jeftiniji izvor ugljika od navedenih soli. Osim toga, s obzirom da se većina CO<sub>2</sub> dobiva kao nusprodukt sagorijevanja fosilnih goriva, korištenje CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika može imati pozitivan utjecaj na okoliš. Nadalje, s obzirom da mikroalge tijekom procesa fotosinteze apsorbiraju CO<sub>2</sub> iz zraka i oslobađaju O<sub>2</sub>, korištenjem CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika mikroalge također mogu imati ulogu u smanjenju količine CO<sub>2</sub> u atmosferi. Primjeri uspješne primjene CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika za uzgoj mikroalgi su brojni, a neki od njih uključuju uzgoj mikroalgarnih vrsta poput *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp. i *Botryococcus braunii* koji se koriste za dobivanje niza vrijednih proizvoda (Yoo i sur., 2010). Također, zapažen je i uspješan uzgoj mikroalge *Arthrospira platensis* u cijevnom fotobioreaktoru koristeći CO<sub>2</sub> koji je nastao kao otpad pri etanolnoj fermentaciji. Ovaj način korištenja CO<sub>2</sub> od iznimne je važnosti za održivost procesa uzgoja mikroalgi jer se na taj način smanjuje potreba za korištenjem fosilnih goriva i emisija štetnih plinova u atmosferu (Matsudo i sur., 2011). Količina CO<sub>2</sub> koju je potrebno dodati stanicama mikroalge tijekom uzgoja ovisi o različitim varijablama, kao što su efikasnost raspršivanja CO<sub>2</sub>, gubitak CO<sub>2</sub> iz mikroalgalne kulture te utrošak CO<sub>2</sub> od strane algalnih stanica. Sve ove varijable povezane su sa sustavom dodavanja CO<sub>2</sub>, a time i s tipom fotobioreaktora i njegovom konfiguracijom. Jedan od glavnih nedostataka otvorenih

bioreaktorskih sustava je visoka razina gubitka CO<sub>2</sub> u usporedbi sa zatvorenim fotobioreaktorima. Naime, u zatvorenim fotobioreaktorskim sustavima postiže se duži kontakt stanica mikroalgi s plinom, što omogućuje učinkovitije iskorištavanje CO<sub>2</sub> od strane mikroalgalnih stanica te stoga odabir prave vrste fotobioreaktora i njegove konfiguracije predstavlja ključan korak za optimizaciju procesa uzgoja mikroalgi uz korištenje CO<sub>2</sub> kao izvora ugljika (Doucha i Lívanský, 2006).

#### **2.7.1.4. Miješanje**

Miješanje je još jedan važan parametar mikroalgalnog uzgoja koji ima ključnu ulogu u osiguravanju konstantnog prinosa biomase mikroalgi. Učinkovito miješanje doprinosi jednolikoj raspodjeli hranjivih tvari i plinova u kulturi, smanjuje neravnomjerno raspoređivanje svjetlosti i omogućuje bolju difuziju CO<sub>2</sub> do stanica mikroalgi. Osim toga, učinkovito miješanje pomaže u sprečavanju nakupljanja mikroalgalnih stanica i time smanjuje potencijalni rizika od fotoinhibicije i stvaranja anaerobnih zona u kulturi. Kako bi se tijekom mikroalgalnog uzgoja osiguralo učinkovito miješanje važno je odabrati odgovarajuću opremu za miješanje i prilagoditi brzinu miješanja ovisno o vrsti mikroalgi i njihovim zahtjevima za uzgoj (Alías i sur., 2004). Postoje različiti načini miješanja medija u mikroalgalnim kulturama, poput areacije, miješanja ili cirkulacije medija uz pomoć pumpi. Bez obzira koji način miješanja se koristi, važno je da bude optimiziran s obzirom na količinu utrošene energije i posljedično tome, cijenu procesa. Visoke razine energije potrebne za učinkovito miješanje mogu biti skupe i potencijalno štetne za mikroalgalne stanice te je stoga važno pronaći ravnotežu između učinkovitosti miješanja i cijene procesa. Korištenje naprednih sustava kontrole miješanja i mjerenja parametara u kulturi može pomoći u optimizaciji procesa uzgoja mikroalgi i smanjenju troškova proizvodnje (Barbosa i Wijffels, 2013). Brzina miješanja i smične sile koje se stvaraju prilikom miješanja važni su parametri koji mogu utjecati na rast i proizvodnju mikroalgi. Glavni faktori koji determiniraju osjetljivost mikroalgi na smične sile, odnosno brzinu miješanja su vrsta mikroalge (prisutnost flagela), sastav i debljina staničnog zida, intenzitet miješanja te uvjeti uzgoja kojima su stanice izložene, kao što su pH, temperatura, osvjetljenje itd.. Prilikom odabira brzine miješanja u mikroalgalnom uzgoju važno je uzeti u obzir sve navedene faktore i osigurati da brzina miješanja nije prevelika s obzirom na vrstu mikroalge koja se uzgaja i za uvjete uzgoja kojima su stanice izložene. Osim toga, mogu se koristiti i drugi pristupi poput optimizacije miješanja uz pomoć sofisticiranih sustava kontrole koji uzimaju u obzir prethodno navedene faktore kako bi se osiguralo optimalno miješanje i najbolji mogući rast i proizvodnja mikroalgi (Alías i sur., 2004). Kod miješanja zrakom preporučuje se propuhivanje podloge s većim

mjhurićima zraka kako ne bi došlo do oštećenja mikroalgalnih stanica. Za postizanje većih mjehurića preporučuje se smanjivanje protoka zraka, uz preporuku da protok ne prelazi  $0.1 \text{ v}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Frahm i sur., 2009). Količina otopljenog  $\text{O}_2$  u hranjivoj podlozi tijekom uzgoja mikroalgi ovisi o tipu bioreaktora i načinu miješanja. Visoke razine otopljenog  $\text{O}_2$  toksične su za većinu vrsta mikroalgi te mogu rezultirati fotooksidativnom smrću stanica mikroalgi. Unutar otvorenih bioreaktorskih sustava akumulacija  $\text{O}_2$  koja se generira fotosintezom često dovodi do oštećenja stanica, odnosno do inhibicije mikroalgalnog rasta (Kazbar i sur., 2019).

#### **2.7.1.6. Temperatura**

Temperatura ima ključnu ulogu u rastu i razvoju mikroalgi na način da utječe na brzinu fotosinteze, brzinu respiracije te sintezu lipida, proteina i drugih važnih metaboličkih produkata mikroalgalne stanice. Većina mikroalgi preferira umjerene temperature, odnosno temperature između  $20$  i  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Međutim, postoje i mikroalgalne vrste koje preferiraju ekstremne uvjete, kao što su termofilne vrste koje rastu na temperaturama iznad  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uzgoj mikroalgi pri visokim temperaturama može rezultirati denaturacijom proteina, smanjenjem stabilnosti membrane i inhibicijom fotosinteze, što ima negativan utjecaj na rast i produktivnost mikroalgi. S druge strane, preniska temperatura uzgoja može također usporiti rast, ali u nekim slučajevima može potaknuti i sintezu lipida i drugih metabolita (Legrand i sur., 2021). U svrhu uzgoja i proučavanja mikroalgi u laboratorijskim uvjetima najprije je potrebno utvrditi optimalne uvjete rasta, pri čemu svakako treba uzeti u obzir jedan od ključnih faktora, a to je temperatura uzgoja. Kako bi se odredila optimalna temperatura rasta mikroalgi, važno je uzeti u obzir temperaturu koja prevladava u njihovom prirodnom okolišu, budući da će temperatura okoliša često biti najbliža prirodnom staništu mikroalgi te će stoga poslužiti kao početna točka za daljnja istraživanja. Iako većina tropskih i subtropskih vrsta mikroalgi najbolje raste na temperaturama između  $20$  i  $25^\circ\text{C}$ , postoje i druge vrste mikroalgi koje preferiraju različite temperature rasta. Osim uporabe klimatizacijskih uređaja, postoji i niz drugih metoda za održavanje optimalne temperature tijekom uzgoja, kao što su korištenje termostata i grijača za regulaciju temperature u hranjivom mediju za uzgoj te korištenje LED rasvjete s reguliranjem jačine i boje svjetla, koja također može utjecati na temperaturu u fotobioreaktoru. Izbor odgovarajućeg sustava za kontrolu temperature ovisi o mnogim čimbenicima, kao što su vrsta mikroalge, veličina postrojenja, financijska ograničenja, itd. Tako je npr. za fotobioreaktore u obliku ravnih ploča (eng. *flat-plate*) zabilježeno da, unatoč tomu što su jeftini i jednostavni za održavanje, zbog nemogućnosti održavanja konstantne temperature, uvećanje mjerila još uvijek predstavlja veliki problem. Upotreba cijevnih fotobioreaktora ne predstavlja problem ukoliko se za uzgoj

mikroalgi koriste umjerene temperature. Međutim, s obzirom da temperatura u cijevima može biti 10 do 15 °C viša u odnosu na okolišnu temperaturu tijekom dana, kod korištenja viših temperatura uzgoja njihova upotreba postaje limitirana (Francke i sur., 2022). Kako bi se spriječilo pregrijavanje suspenzije mikroalgi u cijevnim fotobioreaktorima pri korištenju visokih temperatura često je potreban sistem rashlađivanja. Postoje različite metode za održavanje optimalne temperature kulture mikroalgi te su neke od njih već testirane. Jedan od načina je zasjenjivanje cijevnih fotobioreaktora tamnim bojama. Međutim, za postizanje efikasnog sistema zasjenjivanja, do 80 % površine cijevi treba biti prekriveno, što može smanjiti osvjetljenje i na kraju dovesti do smanjenja prinosa biomase. Drugi način hlađenja kulture je špricanjem vode na površinu fotobioreaktora. Nadalje, cijevasti sustav fotobioreaktora također se može pustiti da pluta na velikoj površini vode, čime se osigurava dovoljna izmjena topline. Za rashlađivanje je također moguće koristiti i zavojnice od nehrđajućeg čelika uronjene u kulturu mikroalgi (Bosma i sur., 2007; Huesemann i sur., 2013).

#### **2.7.1.7. pH**

pH vrijednost kulturnog medija također ima važnu ulogu tijekom uzgoja s obzirom da utječe na proces fotosinteze, rast i reprodukciju mikroalgi. Većina mikroalgi najbolje raste unutar pH raspona od 7,0 do 9,0, međutim, optimalna pH vrijednost ovisi o vrsti mikroalge koja se uzgaja. Ukoliko pH vrijednost hranjivog medija nije unutar optimalnog raspona, dolazi do smanjenja brzine mikroalgalnog rasta te čak može doći i do stanične smrti. Kako bi se postigla maksimalna brzina rasta mikroalgi od osobite je važnosti održavati stabilnu pH vrijednost tijekom cijelog procesa uzgoja. Održavanje optimalne pH vrijednosti tijekom mikroalgalnog uzgoja može se postići dodavanjem kiselina ili baza u hranjivu podlogu. Sustavi za kontrolu pH vrijednosti imaju elektrode za mjerenje te automatski dodaju kiseline ili baze u podlogu kako bi održali optimalnu pH vrijednost. Ovisno o potrebama, može se koristiti i ventil za ispuštanje CO<sub>2</sub> ili peristaltička pumpa za dodavanje anorganske kiseline (poput otopine HCl-a) u medij, dok se ne postigne željena pH vrijednost. Ovaj sofisticiraniji način održavanja pH vrijednosti osigurava optimalne uvjete za različite procese koji zahtijevaju preciznu kontrolu pH vrijednosti, kao što su fermentacije, kultivacija stanica, proizvodnja lijekova, itd. U slučajevima kada automatski pH kontrolor nije dostupan, održavanje optimalne pH vrijednosti također je moguće dodavanjem pulseva CO<sub>2</sub> ili čak konstantnim dodavanjem, odnosno potokom CO<sub>2</sub> (Acién Fernández i sur., 2013b). U slučaju postizanja optimalnih uvjeta uzgoja, uključujući i optimalnu pH vrijednost hranjive podloge, mikroalge troše više od 90 % injektiranog CO<sub>2</sub>-a što podrazumijeva maksimalnu potrošnju CO<sub>2</sub> tijekom uzgoja (Demirbas i Fatih Demirbas, 2011).

pH vrijednost ima važnu ulogu i tijekom transporta izvora dušika, kao što su soli amonijaka i urea, u stanicu mikroalge. Naime, pH vrijednost hranjivog medija može utjecati na oblik i dostupnost dušika za mikroalge, što u konačnici utječe na mikroalgalni rast i produktivnost procesa. Na primjer, pri nižim pH vrijednostima, amonijak se prevodi u amonijev ion ( $\text{NH}_4^+$ ) koji je lakše dostupan mikroalgama. S druge strane, pri višim pH vrijednostima, amonijak se može prevesti u amonijev hidroksid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), koji je toksičan za mikroalge te može uzrokovati smanjenje brzine rasta mikroalgi i time smanjenje produktivnosti procesa (Carvalho i sur., 2014). Postoje različiti načini kontrole pH vrijednosti u algalnoj kulturi. Tako se npr. korištenjem različitih sastojaka hranjive podloge za mikroalgalni uzgoj, kao što su soli i kiseline, može utjecati na pH vrijednost hranjive podloge. Količina otopljenog  $\text{CO}_2$  u mediju za uzgoj također ima utjecaj na pH vrijednost medija. Naime,  $\text{CO}_2$  se otapa u podlozi pri čemu nastaje ugljična kiselina koja doprinosi smanjenju pH vrijednosti. S obzirom da se regulacijom temperature kontrolira topivost  $\text{CO}_2$  u vodi, temperatura također ima utjecaj na pH vrijednost hranjive podloge. Pri nižim temperaturama  $\text{CO}_2$  se lakše otapa u vodi stvarajući ugljičnu kiselinu pri čemu dolazi do snižavanja pH vrijednost. S druge strane, pri višim temperaturama,  $\text{CO}_2$  se slabije otapa u vodi što dovodi do povećanja pH vrijednosti hranjivog medija. Na pH vrijednost hranjive podloge također se može utjecati i metaboličkom aktivnošću mikroalgalnih stanica. Naime, tijekom procesa fotosinteze mikroalge troše  $\text{CO}_2$  i oslobađaju  $\text{O}_2$  što rezultira povećanjem pH vrijednost medija. S druge strane, mikroalge također mogu proizvoditi i kiseline kao metabolite što može dovesti do smanjenja pH vrijednosti medija (Fernández i sur., 2014).

### **2.7.2. Podjela fotobioreaktora**

Podjela fotobioreaktora temelji se na nekoliko kriterija. S obzirom na njihovu lokaciju i stupanj izoliranosti sustava fotobioreaktori se dijele na: vanjske ili unutarnje sisteme te otvorene ili zatvorene sisteme. Druga podjela fotobioreaktora je s obzirom na konfiguraciju prema kojoj se fotobioreaktori mogu podijeliti na: otvorene sustave (eng. *open ponds*), pločaste fotobioreaktore (eng. *flat-plate*), cijevne fotobioreaktore i njegove varijacije kao što su horizontalni, nagnuti (eng. *inclined*), vertikalni, spiralni, stožasti (eng. *conical*), s koljenima (eng. *manifold*), serpentina fotobioreaktori itd. (Carvalho i sur., 2014). Unutar ovog doktorskog rada korišten je zatvoreni sustav za uzgoj mikroalgi, odnosno fotobioreaktor s mješalom (vidi poglavlje 3.3.1.).

### **2.7.2.1. Vanjski i unutarnji sustavi za uzgoj mikroalgi**

Vanjski sustavi za uzgoj mikroalgi koriste se na otvorenom, odnosno karakterizira ih direktan kontakt sa okolišem te korištenje sunčeve energije kao izvor svjetlosti (Acién Fernández i sur., 2013b). Otvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi imaju brojne prednosti kao što su jednostavno čišćenje, direktna izloženost prirodnoj svjetlosti, samostalno hlađenje evaporacijom, niska akumulacija O<sub>2</sub> zbog mogućnosti otpuštanja u okoliš, itd. (Acién Fernández i sur., 2013b). Međutim, unatoč tomu što su instalacija i vođenje takvih sustava relativno jeftini, vanjski sustavi za uzgoj mikroalgi pokazuju brojne nedostatke kao što su: ovisnost o vremenu i klimi, povećan rizik mikrobne kontaminacije, visoki gubitak CO<sub>2</sub>, potreba za velikom površinom u odnosu na zatvorene sustave, itd. (Xu i sur., 2009). S obzirom na ograničenu mogućnost kontrole uvjeta uzgoja i kontaminacije, uporaba otvorenih sustava za uzgoj mikroalgi ograničena je na relativno mali broj mikroalgalnih vrsta te je komercijalni vanjski uzgoj mikroalgi uglavnom ograničen na tropska i subtropska područja. Vanjski sustavi za uzgoj mikroalgi pogodni su za uzgoj „robusnijih“ mikroalgalnih vrsta kao npr. mikroalge roda *Chlorella*, *Scenedesmus* i *Nannochloropsis*, odnosno mikroalgalnih vrsta koje imaju mogućnost brzog rasta u vrlo optimalnim uvjetima (kao npr. mikroalge roda *Arthrospira* i *Dunaliella*). Većina fotobioreaktora koja se koristi za vanjski uzgoj mikroalgi karakterizira velika površina izložena osvjetljenju (Carvalho i sur., 2014).

### **2.7.2.2. Otvoreni i zatvoreni sustavi za uzgoj mikroalgi**

U otvorene sustave za uzgoj mikroalgi ubrajaju se ribnjaci, tankovi i prirodna jezera. Otvoreni sustavi uglavnom su smješteni vani te se oslanjaju na prirodno osvjetljenje, odnosno sunčevu energiju. Prednost otvorenih, u odnosu na zatvorene sustave za uzgoj mikroalgi je niska cijena instalacija i upravljanja. Međutim, otvoreni sustavi pokazuju i brojne nedostatke kao npr. nemogućnost održavanja kultura akseničnima, odnosno postoji mogućnost prevladavanja kontaminanata u odnosu na željenu vrstu mikroalge koja se koristi u procesu. Ostali nedostaci su: podložnost vremenskim promjenama, odnosno varijacija u vremenu otežava kontrolu koncentracije nutrijenata, intenziteta svjetlosti i koncentracije CO<sub>2</sub>; slaba mogućnost korištenja svjetla, gubitak vode evaporacijom, potreba za velikim površinama zemlje, manja ostvarena produktivnost biomase, itd.. Osim toga, troškovi izdvajanja biomase mikroalgi su još uvijek preveliki da bi proces u otvorenim sustavima bio ekonomski isplativ (Carvalho i sur., 2006). Otvoreni sustavi uglavnom se koriste za uzgoj biomase mikroalgi koja se koristi za proizvodnju niskovrijednih proizvoda kao što su biogoriva, dok se zatvoreni fotobioreaktori uglavnom koriste za proizvodnju visokovrijednih proizvoda kao što su terapeutici (Pulz i Scheibenbogen,

2007). Fotobioreaktori predstavljaju zatvorene sustave za uzgoj mikroalgi. Najveća zabilježena fotosintetska aktivnost mikroalgi do sad postignuta je mikroalgalnim uzgojem u cijevnim fotobioreaktorima (Xu i sur., 2009).

### **2.7.3. Konfiguracije fotobioreaktora**

Postoje različite konfiguracije fotobioreaktora. Zatvoreni fotobioreaktori dijele se na 3 osnovne kategorije: 1. Vertikalne kolone; 2. Cijevni fotobioreaktori; 3. Pločasti fotobioreaktori. S obzirom na veliku površinu osvijetljenu sunčevom energijom, najprikladniji fotobioreaktori za uzgoj biomase mikroalgi su: pločasti fotobioreaktori, horizontalni i nakošeni cijevni fotobioreaktori (Chisti, 2006a). Trenutno najveći problem navedenih fotobioreaktora je nemogućnost uspješnog uvećanja mjerila.

#### **2.7.3.1. Otvoreni bazeni**

Postoji nekoliko tipova otvorenih bazena razvijenih za industrijski vanjski uzgoj mikroalgi. Najuobičajniji dizajn otvorenih bazena je „raceway pond“. Prednosti otvorenih bazena u odnosu na druge otvorene sustave za uzgoj mikroalgi su: relativno niski troškovi izgradnje i održavanja, mogućnost izgradnje na neobradivim površinama te na taj način sprječavanje korištenja poljoprivrednih područja i povišenje cijene hrane (Tredici, 2007). Druga dva tipa otvorenih bazena su: kružni otvoreni bazeni sa rotirajućim dijelom (eng. *rotating arm*) ili „long channel pond“ za koji je karakteristično da se miješanje ostvaruje sa lopatastim mješalom. Sistemi otvorenih bazena predstavljaju jednostavan sistem za uzgoj mikroalgi koji se sastoji od otvorene posude u kojem se kao izvor osvijetljenja koristi sunčeva energija. Svaki sistem otvorenih bazena je dimenzija približno 1 ha površine, dok je prosječna dubina oko 20 do 30 cm. Miješanje se ostvaruje sa lopatastim mješalom te se na taj način ostvaruje cirkuliranje vode sa nutrijentima i mikroalgama (Borowitzka i Reza Moheimani, 2013). Nedostatci sistema otvorenih bazena su: uvjeti rasta mikroalgi mijenjaju se s lokalnim vremenskim uvjetima, odnosno prinos procesa ovisi o promjenama vremenskih uvjeta, nemogućnost kontroliranja uvjeta uzgoj (u uvjetima kišnog vremena dolazi do značajnog razrjeđenja medija što rezultira kontaminacijom), neefikasno korištenje CO<sub>2</sub>, potreba za velikim površinama zemlje, itd. Nadalje, u otvorenim bazenima monoalgalna kultura teško se održava akseničnom za većinu mikroalgalnih vrsta. Izuzetak su ekstremofilne vrste mikroalgi koje mogu podnijeti ekstremne uvjete okoliša kao npr. mikroalge roda *Dunaliella* koje mogu podnijeti relativno visoke vrijednosti saliniteta. Veliki problem sustava otvorenih bazena je pad intenziteta osvijetljenja dubinom sustava što dovodi do međusobnog zasjenivanja stanica mikroalgi. Kako bi se riješio navedeni problem preporučuje se izgradnja plićih otvorenih bazena. S obzirom na sve navedene

nedostatke, otvoreni bazeni ne mogu se koristiti za proizvodnju hrane ili izolaciju farmaceutskih proizvoda (Xu i sur., 2009). Bazeni s recirkulacijom (eng. *raceway-shaped culture ponds*) komercijalno se koriste u Izraelu, SAD-u i Kini. Bazeni s recirkulacijom imaju oblik kanala obično dubine 0.3 m. Najveća komercijalna proizvodnja mikroalge roda *Spirulina* u bazenima s recirkulacijom površine 440 000 m<sup>2</sup> bazirana je u Kaliforniji (SAD) (Xu i sur., 2009). U bazenima s recirkulacijom dostiže se koncentracija biomase do 0.5 g L<sup>-1</sup> što olakšava prodiranje svjetla do svake stanice mikroalgi. Međutim, u takvim sustavima, s obzirom na nisku ostvarenu biomasu mikroalgi, otežano je provođenje izdvajanja biomase mikroalgi te su takve kulture podložnije kontaminaciji. S obzirom na sve navedeno, bazenima s recirkulacijom moguć je uzgoj robusnijih, brzo-rastućih vrsta mikroalgi koje mogu podnijeti ekstremne uvjete uzgoja. Maksimalna produktivnost biomase zabilježena za ove sustave je 40 g m<sup>-2</sup> dan<sup>-1</sup>. U usporedbi s horizontalnim bazenima s recirkulacijom, ukošena konstrukcija bazena s recirkulacijom ima dvije prednosti, odnosno postizanje turbulentnog protoka i manja dubina kulture mikroalgi (srednja vrijednost dubine bazena s recirkulacijom u dijelu nagiba je 3.5 cm) (Xu i sur., 2009). Komercijalne vrste mikroalgi koje se uspješno uzgajaju u otvorenim bazenima pripadaju skupini ekstremofila, odnosno vrsta mikroalgi koje imaju sposobnost rasta u visoko selektivnim okolišnim uvjetima kao što su visoke pH vrijednosti te visoki salinitet i temperatura. Prednost takvih uvjeta uzgoja je sprječavanje rasta većine drugih algalnih vrsta i bakterija (Xu i sur., 2009). Za izgradnju i instalaciju sistema otvorenih bazena od velike su važnosti izvor i kvaliteta vode te dostupnost zemljišta. Ukoliko su troškovi zemljišta za izgradnju fotobioreaktora preveliki, ostali tipovi fotobioreaktora također se moraju uzeti u obzir, kao npr. cijevni fotobioreaktori. Nadalje, što je veća površina otvorenih bazena, veća je evaporacija vode. Prilikom uzgoja morskih vrsta mikroalgi jedan od načina smanjenja troškova proizvodnje je korištenje morske vode kao hranjivog medija uz dodatak određenih soli. Također, važan faktor koji treba uzeti u obzir prilikom odabira fotobioreaktora je finalni proizvod. Tako npr. ukoliko se biomasa mikroalgi koristi za izolaciju proizvoda za koji nije bitna prisutnost kontaminanata, kao npr. kod proizvodnje biodizela, kao sistemi za uzgoj mikroalgi mogu se koristiti otvoreni bazeni (Acién Fernández i sur., 2013b).

### **2.7.3.2. Cijevni fotobioreaktori**

Cijevni fotobioreaktori predstavljaju najčešće korišten dizajn zatvorenih sustava razvijenih za industrijski uzgoj mikroalgi (Torzillo i Chini Zittelli, 2015). Cijevni fotobioreaktori obično su napravljeni od stakla ili plastike, te mogu biti različite konstrukcije (vertikalni, horizontalni, nagnuti, spiralni cijevni fotobioreaktori itd.) i mogu biti položeni na tlu ili pričvršćeni na



nosačima. Osim po orijentaciji cijevi, cijevni fotobioreaktori također se razlikuju po duljini cijevi, protoku, načinu cirkulacije, geometrijskoj konfiguraciji i načinu osvjetljenja (Xu i sur., 2009). Cirkuliranje mikroalgi kroz cijevne fotobioreaktore ostvaruje se pomoću pumpe ili propuhivanjem s zrakom ili plinom (Molina Grima i sur., 2000). Uporaba air-lift tehnologije nudi određene prednosti u odnosu na uporabu pumpi kao npr. dopušta izmjenu CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> između hranjive podloge i plinova, smanjeno je potencijalno oštećenje stanica mikroalgi, cirkulacija podloge postiže se bez pomičnih mehaničkih dijelova fotobioreaktora. Glavni dijelovi cijevnih fotobioreaktora su: 1. dio za fotosintezu (eng. *photostage loop*), 2. tank za miješanje (eng. *mixing tank*). Dio za fotosintezu predstavlja glavnu sekciju cijevnog fotobioreaktora, odnosno sekciju gdje se odvija fotosinteza i rast biomase, dok se tank za miješanje uglavnom koristi za uklanjanje O<sub>2</sub> i kontroliranje parametara uzgoja. Najvažniji parametar cijevnog fotobioreaktora koji treba odrediti u dijelu za fotosintezu je dijametar cijevi. Dijametar cijevi određen je osvjetljenošću površine reaktora i fotosintetskom efikasnošću vrste koja se koristi te je ograničen, odnosno obično iznosi oko 0.1 m. Povećanje dijametra cijevi rezultira smanjenjem omjera površine i volumena što utječe na brzinu rasta kulture mikroalgi. Naime, tijekom proteka vremena mikroalgalnog uzgoja povećava se gustoća stanica, odnosno mikroalgalne stanice međusobno se sve više zasjenjuju (tzv. samozasjenjivanje). Iz literature proizlazi da optimalni promjer cijevi za osvjetljenje stanica mikroalgi iznosi između 5 i 9 centimetara, što se pokazalo kao najučinkovitiji način osiguravanja adekvatne količine svjetlosti za rast i razvoj mikroalgi (Torzillo i Chini Zittelli, 2015). Duljina cijevi cijevnog fotobioreaktora ponajviše utječe na cirkulaciju hranjivog medija unutar fotobioreaktora, odnosno na vrijeme zadržavanja (Converti i sur., 2006). Povećanje mjerila cijevnog fotobioreaktora može se postići ili povećanjem duljine ili dijametra cijevi (Molina Grima i sur., 2000). Povećanje dijametra cijevi nije poželjno, dok povećanje duljine cijevi također ima određene limitacije. Naime, ukoliko je cijev cijevnog fotobioreaktora predugačka dolazi do akumulacije O<sub>2</sub> koji nastaje fotosintezom, odnosno do zasićenja zraka O<sub>2</sub> što može rezultirati inhibicijom fotosinteze (Taiz i Zeiger, 2010). Zabilježeno je da je koncentracija kisika iznad 35 mg L<sup>-1</sup> toksična za većinu mikroalgalnih vrsta (Carvalho i sur., 2006). Nadalje, u predugačkim cijevima također dolazi do smanjenja CO<sub>2</sub> gradijenta što rezultira nedostatkom izvora ugljika za fotoautotrofni rast mikroalgi. Takav nastali gradijent CO<sub>2</sub> također rezultira stvaranjem gradijenta pH. Naime, zbog visoke brzine fiksacije CO<sub>2</sub> dolazi do nastajanja visoke koncentracije hidroksilnog iona u mediju što može uzrokovati povećanje pH vrijednosti do 11. S druge strane, neadekvatna fiksacija CO<sub>2</sub> koji se raspršuje u medij može rezultirati acidifikacijom uzrokovanom nastajanjem ugljične kiseline. Karakteristika fotobioreaktora kontroliranih uvjeta je uravnotežena pH vrijednost, odnosno

povećana koncentracija hidroksilnih iona koji nastaju fotosintezom poništena je povišenom koncentracijom vodikovih iona uslijed nastajanja ugljične kiseline raspršivanjem CO<sub>2</sub>. Osim dijametra i duljine cijevi, važan parametar cijevnih fotobioreaktora predstavlja i miješanje kulture. Povećanje vremena miješanja uzrokovano je povećanjem duljine cijevnog fotobioreaktora. Zbog navedenih činjenica, prilikom povećanja mjerila cijevnog fotobioreaktora, kako bi se osigurala dovoljna homogenost nutritijenata i njihova distribucija unutar mikroalgne kulture, miješanje je također parametar koji se mora uzeti u obzir (Torzillo i Chini Zittelli, 2015). Budući da povećanje duljine cijevnog fotobioreaktora dovodi do povećanja koncentracije hidroksilnih iona i pH vrijednosti, mjerilo cijevnih fotobioreaktora ne može se uvećavati linearnim povećanjem duljine cijevi. Umjesto toga, učinkovitiji pristup uvećanja mjerila cijevnih fotobioreaktora je dodavanje modularnih jedinica. Međutim, s obzirom da svaka jedinica zahtjeva veliki broj uređaja koji kontroliraju širok raspon parametara rasta, takav pristup može biti ekonomski neodrživ (Kunjapur i Eldridge, 2010). Zbog potrebnih velikih ulaganja i velike potrošnje energije navedeni sustav je pogodan samo u svrhu produkcije visoko vrijednih proizvoda. Mikroalgna produktivnost u cijevnim fotobioreaktorima ovisi o vrsti mikroalge, lokaciji, dijimetru cijevi, koncentraciji biomase, udaljenosti između cijevi, broju horizontalnih cijevi po jedinici modularnih fotobioreaktorskih jedinica itd. Također, bitna je i konstrukcija cijevnih fotobioreaktora. Kada su cijevni fotobioreaktori postavljeni pod pravim kutom u svrhu učinkovite apsorpcije sunčeve energije, moguće je da se u kulturi mikroalgi nakupi značajna količina topline. Ukoliko se temperatura ne kontrolira, može doći do prekomjernog zagrijavanja, što može negativno utjecati na brzinu rasta i metabolizam mikroalgi te je stoga od osobite važnosti osigurati adekvatnu regulaciju temperature kako bi se osigurali optimalni uvjeti za uzgoj kulture mikroalgi (Wang i sur., 2012). Tipične metode za hlađenje cijevnih fotobioreaktora su špricanje vodom na površinu cijevi, zasjenjivanje itd. Prednosti cijevnih fotobioreaktora u odnosu na ostale konfiguracije su visoka produktivnost i manja površina za postavljanje u usporedbi s otvorenim bazenima. Nadalje, cijevni fotobioreaktori koriste se za proizvodnju visoko kvalitetne biomase mikroalgi za izolaciju visoko vrijednih proizvoda. Kapitalni i operativni trošak uzgoja u cijevnim fotobioreaktorima je značajno veći u odnosu na bazene s recirkulacijom (Torzillo i Chini Zittelli, 2015).

#### 2.7.3.2.1. Vertikalni cijevni fotobioreaktori

Vertikalni cijevni fotobioreaktori su među prvim zatvorenim fotobioreaktorskim sustavima koji su se počeli koristiti za uzgoj mikroalgi te se također često koriste u laboratorijskom mjerilu za provođenje eksperimenata. Za rad vertikalnog cijevnog fotobioreaktora potreban je minimalan

dijametar cijevi od 20 cm što rezultira time da središnji dio cijevi nije osvjetljen (Posten, 2009). Konstruirane su i testirane različite vrste vertikalnih cijevnih fotobioreaktora. Njihove glavne karakteristike su: kompaktnost, niski troškovi i jednostavan način rada u aseptičnim uvjetima (Sánchez Mirón i sur., 2002). Vertikalni cijevni fotobioreaktori nude određene prednosti u odnosu na ostale konfiguracije kao npr. mogućnost kontinuiranog propuhivanja kulture plinovima, odnosno izmjenu CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub> i miješanje. Vertikalni cijevni fotobioreaktori uglavnom se koriste zbog njihove jednostavne konstrukcije, odličnih prijenosa mase i topline, niskih operativnih troškova te velikog omjera visine i dijametra cijevi (H/D) (Alfás i sur., 2004)

#### 2.7.3.2.2. „Serpentina“ fotobioreaktori

„Serpentina“ fotobioreaktori predstavljaju najstariji zatvoreni sustav fotobioreaktora. Sastoje se od ravnih cijevi koje su spojene U-zavojima te mogu biti orijentirane vertikalno ili horizontalno. Cirkulacija hranjive podloge (pri brzini od 20 do 30 cm s<sup>-1</sup>) postiže se uporabom pumpi ili air lift tehnologijom (Acién Fernández i sur., 2013b).

#### 2.7.3.2.3. Fotobioreaktor s koljenima (eng. *manifold photobioreactor*)

Manifold fotobioreaktori sastoje se od serije paralelnih cijevi koje su spojene na kraju dvama razdjelnicima od kojih jedan služi za distribuciju, a drugi za izdvajanje suspenzije kulture mikroalgi (Tredici, 2010).

#### 2.7.3.2.4. Spiralni fotobioreaktori

Spiralni fotobioreaktori sastoje se od fleksibilnih cijevi malog dijametra zakrivljenih oko potporne strukture. Spiralni barbotirajući fotobioreaktor koristio se za uzgoj cijanobakterije *Anabaena siamensis* i *A. platensis*. Najčešće korištena struktura spiralnog fotobioreaktora je „Biocoil“ koji koristi biotehnoška kompanija Biotechna (Melbourne, Australija) (Zittelli i sur., 2013).

#### **2.7.3.3. Pločasti fotobioreaktor (eng. *flat plate photobioreactor*)**

Konstrukcija pločastog fotobioreaktora predstavlja najrobusniji dizajn od svih. Pločasti fotobioreaktori napravljeni su od transparentnog materijala u svrhu optimalnog korištenja sunčeve energije te kako bi se postigao veliki omjer površine i volumena (obično od 16 do 80 m<sup>-1</sup>) i u konačnici visoka volumetrijska produktivnost procesa (ponekad iznad 2 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Tredici i sur., 1991). Osnovna konstrukcija pločastog fotobioreaktora sastoji se od dva paralelna panela između kojih protječe jako tanki sloj mikroalgalne kulture (Carvalho i sur., 2006). Efikasan transfer svjetla postiže se sa samo nekoliko cm razmaka između dva transparentna panela koja su obično napravljena od polivinilklorida, polikarbonata, polimetil

metaakrilata, stakla ili polietilena. Dokazano je da se korištenjem pločastog fotobioreaktora može postići visoka fotosintetska efikasnost. Akumulacija otopljenog O<sub>2</sub> u pločastom fotobioreaktoru je relativno niska u usporedbi sa horizontalnim cijevnim fotobioreaktorima. Ostale prednosti pločastog fotobioreaktora su: relativno su jeftini i jednostavni za čišćenje; prigodni su za vanjski uzgoj i uvećanje mjerila; manja potrošnja energije u odnosu na cijevne fotobioreaktore. U usporedbi sa cijevnim fotobioreaktorima, pločasti fotobioreaktori zauzimaju manje prostora (Pulz i Scheibenbogen, 2007). Miješanje kulture u pločastim fotobioreaktorima ostvaruje se zrakom koji se uvodi kroz perforirane cijevi na dnu fotobioreaktora. Paneli pločastog fotobioreaktora osvijetljeni su s jedne strane direktnom sunčevom svjetlošću te mogu biti postavljeni vertikalno ili nagnuti pod optimalnim kutem (Janssen i sur., 2003). Vertikalno postavljeni pločasti fotobioreaktori moraju biti položeni pod odgovarajućim kutem kako bi se maksimiziralo osvijetljenje. Za „istok/zapad“ orijentaciju karakteristično je smanjenje osvijetljenja od vrha prema dnu u odnosu na „sjever/jug“ orijentaciju pločastog fotobioreaktora. Količina svjetlosti po jedinici volumena određena je dubinom prodiranja putanje upadne svjetlosti u sustav ravnih ploča te o vrsti mikroalge koja se koristi u procesu. Za svaku vrstu mikroalge karakterističan je optimalni put svjetlosti pri kojem se postiže maksimalna fotosintetska efikasnost. S obzirom na brojne prednosti koje nude, pločasti fotobioreaktori koriste se i za vanjski i za unutarnji uzgoj mikroalgi. Iako se pločastim fotobioreaktorima mogu postići velike koncentracije biomase (> 80 g L<sup>-1</sup>) postoje određene limitacije kao npr. određeni stupanj adhezije stanica mikroalgi na površinu pločastog fotobioreaktora, potencijal oštećenja stanica mikroalgi uzrokovanog propuhivanjem plinom, pločasti fotobioreaktori se ne mogu sterilizirati, nemogućnost regulacije temperature, itd. (Xu i sur., 2009). Pločasti fotobioreaktori koriste se za uzgoj velikog broj mikroalgalnih vrsta pri čemu se postižu produktivnosti od 5 do 15 g m<sup>-2</sup> dan<sup>-1</sup>. Zabilježeno je da se korištenjem pločastog fotobioreaktora postižu velike vrijednosti fotosintetske efikasnosti (Hu i sur., 1998). Međutim, pločasti fotobioreaktori imaju također određene nedostatke kao npr. promjena temperature i posljedično tomu pregrijavanje kulture. S obzirom na navedene nedostatke, koriste se dva različita sistema hlađenja. Pločasti fotobioreaktori obično se hlade prskanjem površina sa hladnom vodom pri čemu se ta voda može opet kasnije koristiti u procesu. Druga opcija je spajanje dva panela zajedno pri čemu u gornjem panelu struji mikroalgalna kultura, dok u donjem panelu struji voda koja služi za regulaciju temperature. Takav dvostruki pločasti sustav omogućava efikasnu termoregulaciju kulture. Međutim, bez obzira na njihovu prividnu jednostavnost, samo nekoliko od tih sistema koriste se u velikom mjerilu za uzgoj mikroalgi zbog ograničenja prilikom uvećanja mjerila i velikih troškova (Carvalho i sur., 2006).

#### **2.7.3.4. Tankoslojni fotobioreaktor (eng. *thin layer photobioreactor*)**

Tankoslojni fotobioreaktori se sastoje od paralelno postavljenih ploča od prozirnog materijala između kojih protječe dobro izmiješana mikroalgalna suspenzija kontinuirano tankom sloju (6-8 mm) (Doucha i Lívanský, 2006). Takva konstrukcija fotobioreaktora dopušta smanjenje sloja mikroalgi koji je izložen svjetlu koliko je to tehnološki moguće i posljedično tomu povećanje efikasnosti korištenja sunčeve energije i smanjenje fotoinhibicije (Doucha i Lívanský, 2006). U ovim fotobioreaktorima postiže se visoka gustoća stanica mikroalgi (do 40-50 g L<sup>-1</sup>). Visoka produktivnost i postizanje visokih vrijednosti gustoće stanica smanjuje mogućnost kontaminacije, odnosno prisustva neželjenih algalnih vrsta i bakterija. Osim toga, u tankoslojnim fotobioreaktorima osigurana je bolja raspodjela svjetla i omogućeno je bolje kontroliranje temperature (Acién Fernández i sur., 2013b).

#### **2.7.3.5. Air-lift i barbotirajuća kolona**

Air-lift i barbotirajuće kolone predstavljaju kompaktne i jeftine sustave za uzgoj mikroalgi koje karakterizira jednostavan aseptičan način rada (Loubière i sur., 2009). Usporedno sa barbotirajućim kolonama, bolji rast mikroalgi postiže se u air-lift fotobioreaktorima što se može objasniti činjenicom da se u air lift fotobioreaktorima postiže bolje homogeno miješanje stanica mikroalgi koje usmjerava stanice iz slabije osvijetljenih područja u bolje osvijetljena područja fotobioreaktora, dok je u barbotirajućim kolonama smjer kretanja stanica mikroalgi slučajan (Xu i sur., 2002). Jedan od troškova uzgoja mikroalgi u barbotirajućim kolonama i air-lift fotobioreaktorima su plinovi koji se koriste za miješanje. Ključan parametar barbotirajućih kolona koji je potrebno pratiti kako bi se minimiziralo oštećenje stanica mikroalgi je veličina mjehurića. S obzirom da je utjecaj veličine mjehurića specifičan za svaku vrstu mikroalge, prije mikroalgalog uzgoja najprije je potrebno eksperimentalno potvrditi utjecaj različitih veličina mjehurića na mikroalgalni rast. Osim veličine mjehurića, brzina aeracije je također limitirajuća. Povećanjem brzine aeracije povećava se miješanje, cirkulacija hranjive podloge i transfer između plinova i tekućine. Povišenom brzinom aeracije ostvaruje se bolje miješanje i sprječava se akumulaciju O<sub>2</sub> te se osigurava zadovoljavajući prijenos molekula plina između plinovite i tekuće faze što osigurava efikasan utrošak CO<sub>2</sub>. Međutim, prevelika brzina aeracije rezultira povišenjem smičnih sila što može rezultirati oštećenjem stanice mikroalge (Xu i sur., 2009). Air-lift fotobioreaktori posjeduju određene prednosti za uzgoj mikroalgi u odnosu na ostale dizajne fotobioreaktora kao npr: nema pomičnih dijelova, odnosno nema mehaničkog mješala, niska potrošnja energije, visoka brzina transfera mase, homogeno smicanje, kratko vrijeme miješanja, za vertikalnu konstrukciju fotobioreaktora potrebno je manje zemljišta, itd. (Luo i

Al-Dahhan, 2012). Uvećanje mjerila air-lift i barbotirajućih kolona otežava faktor osvjetljenja unutar fotobioreaktora. Naime, prodor svjetlosti unutar fotobioreaktora eksponencijalno se smanjuje sa udaljenošću od izvora svjetla, te isto kao i kod ostalih cijevnih fotobioreaktora, povećanje dijametra cijevi ima određene limitacije (Acién Fernández i sur., 2013a)

## **2.8. Načini uzgoja mikroalgi**

Mikroalge se mogu uzgajati šaržnim procesom, šaržnim procesom s pritokom supstrata, polikontinuiranim procesom, kontinuiranim procesom i dvostupanjskim načinom uzgoja (Matsudo i sur., 2011). Za šaržni proces uzgoja mikroalgi karakteristično je da nema naknadnog dodavanja supstrata niti izdvajanja biomase do završetka uzgoja. Tijekom odvijanja šaržnog procesa može doći do inhibicije rasta mikroalgi niskim koncentracijama supstrata ili proizvodima staničnog metabolizma. Jedna od prednosti šaržnog procesa uzgoja mikroalgi, u odnosu na ostale procese, je što, u kontekstu aspetičnosti, predstavlja najsigurniji način uzgoja. Šaržni proces s pritokom supstrata je način uzgoja mikroalgi kojeg karakterizira dodavanje jednog ili više hranjivih sastojaka tijekom kultivacije, dok stanice mikroalgi i produkti ostaju u sustavu do kraja uzgoja. Ovaj način uzgoja mikroalgi osigurava kontinuirano opskrbljivanje mikroalgi potrebnim hranjivim sastojcima, što rezultira bržim mikroalgalnim rastom. Dodavanje hranjivih sastojaka tijekom uzgoja obično se provodi pomoću dozirne pumpe koja kontrolira količinu dodanog supstrata. Ova metoda uzgoja omogućuje učinkovitu kontrolu parametara rasta, kao što su pH vrijednost, temperatura i koncentracija nutritijenata (Carvalho i sur., 2014). Šaržni proces s pritokom supstrata ima niz prednosti u odnosu na druge načine uzgoja mikroalgi. Jedna od glavnih prednosti je prevencija otpuštanja toksičnih produkata metabolizma mikroalge. Naime, dodavanjem hranjivih tvari u sustav tijekom procesa uzgoja mikroalge imaju dovoljno hranjivih sastojaka te na taj način ne dolazi do stvaranja toksičnih metabolita. Također, ova metoda uzgoja omogućuje kontrolu specifične brzine rasta mikroalgi, što može pomoći u optimizaciji proizvodnje biomase i sekundarnih metabolita. Druga prednost šaržnog procesa s pritokom supstrata je mogućnost precizne kontrole količine i vrste hranjivih tvari koje se dodaju u sustav, što omogućuje postizanje optimalnih uvjeta uzgoja mikroalgi i poboljšava ukupni prinos biomase. Osim toga, ovaj način uzgoja mikroalgi omogućuje jednostavnu manipulaciju uvjetima uzgoja, što omogućava prilagodbu procesa uzgoja različitim vrstama mikroalgi i proizvodnju različitih vrsta bioproizvoda. Nadalje, s obzirom da omogućuje visoke prinose biomase i sekundarnih metabolita uz relativno jednostavnu i jeftinu opremu, šaržni proces s pritokom supstrata također može biti ekonomski isplativiji od drugih načina uzgoja mikroalgi, što ga čini privlačnim za primjenu u industrijskim postrojenjima za

proizvodnju raznih bioproizvoda (Carvalho i sur., 2014). Polukontinuirani proces je način uzgoja mikroalgi koji kombinira elemente šaržnog procesa i kontinuiranog procesa uzgoja mikroalgi. Polukontinuirani proces započinje kao šaržni proces tijekom kojeg se kultura mikroalgi uzgaja do određene koncentracije stanica. U trenutku kada se koncentracija mikroalgalnih stanica ustali, dio hranjive podloge se izdvaja te suspenzija stanica mikroalgi koja ostaje u fotobioreктору služi kao inokulum za daljnji uzgoj. Ovakav način uzgoja omogućuje održavanje stabilne kulture mikroalgi s visokom produktivnošću, dok se istovremeno smanjuju troškovi proizvodnje. S obzirom da se količina dodane podloge koja se dodaje u bioreaktor može kontrolirati prema potrebama mikroalgi, polukontinuirani način uzgoja mikroalgi također omogućuje preciznu kontrolu brzine mikroalgalnog rasta. U slučaju da je brzina rasta mikroalgi niska, dodaje se veća količina hranjivog medija kako bi se stimulirao rast. S druge strane, ukoliko je brzina rasta mikroalgi previsoka, količina hranjivog medija koja se dodaje se smanjuje kako bi se spriječila katabolička represija ili akumulacija toksičnih metabolita. Precizna kontrola brzine rasta mikroalgi omogućuje postizanje visokih prinosa i povećanje kvalitete biomase i sekundarnih metabolita. Polukontinuirani način uzgoja mikroalgi osobito je važan u industrijskoj proizvodnji mikroalgi i proizvodnji bioproizvoda, kao što su biogoriva, hrana, kozmetika i farmaceutski proizvodi. Kontinuirani način uzgoja mikroalgi odvija se kontinuiranim dodavanjem svježeg hranjivog medija u fotobioreaktor određenim protokom, pri čemu se održava stalna razina hranjivih tvari i drugih parametara u sustavu. Istovremeno, kontinuirano se izbacuje stari medij koji sadrži metabolite i druge otpadne tvari koje bi mogle inhibirati rast mikroalgi i smanjiti prinose procesa. Kombiniranjem ovih procesa postiže se tzv. ustaljeno stanje (eng. *steady state*) fotobioreaktora. Jedna od glavnih prednosti kontinuiranog načina uzgoja mikroalgi je postizanje visokih prinosa i produktivnosti procesa, što ga čini vrlo važnim za industrijsku proizvodnju. Ovaj način uzgoja mikroalgi također omogućuje kontrolu brzine rasta, smanjenje rizika od kontaminacije i poboljšanje kvalitete proizvoda. Također, zbog kontinuiranog dodavanja svježeg medija, troškovi hranjivih tvari mogu biti manji u odnosu na druge načine uzgoja. Međutim, kontinuirani način uzgoja mikroalgi također karakteriziraju i određeni nedostaci, kao što je potreba za složenim sustavom za kontrolu i upravljanje procesom, koji zahtijeva stručnjake i posebne vještine za upravljanje. Također, potrebno je provoditi redovitu analizu biomase i kvalitete proizvoda kako bi se održala stabilnost procesa i izbjegle neželjene promjene u kvaliteti proizvoda. S obzirom na navedene nedostatke korištenje kontinuiranog načina uzgoja mikroalgi preporučuje se za uzgoj ekstremofilnih organizama, poput mikroalgi roda *Arthrospira*, koji zahtijevaju visoke vrijednosti pH i saliniteta, što smanjuje mogućnost rasta

neželjenih mikroorganizama. Nadalje, u kulturama s visokom koncentracijom stanica mikroalgi tijekom kontinuiranog načina uzgoja često se pojavljuje fenomen zasjenjivanja. Fenomen zasjenjivanja znači da svaka stanica mikroalge u kulturi dobiva manje svjetlosti zbog velike gustoće stanica u kulturi, što negativno utječe na njihovu fotosintetsku aktivnost i sposobnost fiksacije ugljika. Jedan od načina rješavanja ovog problema je periodično izuzimanje dijela hranjivog medija iz fotobioreaktora na kraju uzgoja te potom ponovno korištenje stanica za sljedeće cikluse uzgoja. Na taj način smanjuje se broj stanica u kulturi, što povećava dostupnost svjetlosti i poboljšava fotosintetsku aktivnost stanica mikroalgi. Dvostupanjski način uzgoja mikroalgi podrazumijeva provođenje uzgoja u dvije odvojene faze koje se razlikuju po uvjetima uzgoja i vrsti hranjivih medija koji se koriste. U prvoj fazi dvostupanjskog uzgoja mikroalge se uzgajaju u hranjivom mediju kojeg karakteriziraju optimalne koncentracije svih potrebnih nutrijenata za mikroalgalni rast i primjena optimalnih uvjeta rasta, a sve s ciljem postizanja visoke koncentracije biomase mikroalgi. U drugoj fazi dvostupanjskog načina uzgoja primjenjuju se specifični uvjeti uzgoja koji potiču stres u mikroalgalnoj stanici, s ciljem postizanja akumulacije željenih proizvoda u mikroalgalnoj biomasi (Nagappan i sur., 2019). Stresni uvjeti uzgoja mogu uključivati izloženost različitim kemijskim i fizičkim čimbenicima kao npr. ograničenje hranjivih tvari, promjena temperature, pH vrijednosti, intenziteta osvjetljenja itd. Dvostupanjski način uzgoja ima mnoge prednosti u odnosu na jednostupanjski način mikroalgi. U prvoj fazi dvostupanjskog načina uzgoja mikroalgi, uzgoj se provodi u kontroliranim uvjetima parametara kao što su temperatura, intenzitet osvjetljenja, pH, koncentracija CO<sub>2</sub> i koncentracija hranjivih tvari. Ova kontrola parametara omogućava postizanje visoke koncentracije kvalitetne mikroalgalne biomase. U drugoj fazi, uzgoj se provodi u uvjetima koji omogućavaju povećanje koncentracije željenog proizvoda mikroalgalne biomase, kao npr., lipida, koji se mogu koristiti kao izvor biogoriva ili hrane za ribe. Naime, dvostupanjski način uzgoja mikroalgi može se koristiti za proizvodnju različitih bioproizvoda, uključujući biogoriva, pigmente, antioksidanse, omega-3 masne kiseline, itd. Osim toga, dvostupanjski način uzgoja osigurava postizanje veće produktivnosti i ekonomičnosti proizvodnje u usporedbi s jednostupanjskim načinom uzgoja (Aziz i sur., 2020).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Radni mikroorganizam

Tijekom izrade ovog doktorskog rada korištena je morska mikroalga *D. tertiolecta* (SAG 13.86) koja je preuzeta iz zbirke kultura mikroalgi, Sveučilišta u Göttingenu, Njemačka.

#### 3.1.2. Kemikalije za pripremu hranjivih podloga

Kemikalija korištene za pripremu hranjivih podloga korištenih za uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* navedene su u tablici 1.

**Tablica 1.** Kemikalije korištene za pripremu hranjivih podloga

| Naziv kemikalije   | Čistoća                | Proizvođač              |
|--|------------------------|-------------------------|
| Natrijev nitrat ( $\text{NaNO}_3$ )  | $\geq 99,00 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) | $\geq 98,00 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Dinatrijev EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )   | 99,00-101,00 %         | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Željezov (III) klorid heksahidrat ( $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )            | 97,00 %                | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Bakrov (II) sulfat pentahidrat ( $\text{Cu(II)SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )           | $\geq 98,00 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Cinkov sulfat heptahidrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )                    | 99,00 %                | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Kobaltov (II) klorid heksahidrat ( $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )             | 98,00 %                | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Manganov (II) klorid tetrahidrat ( $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ )             | $\geq 99,00 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Natrijev molibdat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )         | $\geq 99,50 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Cijanokobalamin ( $\text{B}_{12}$ )  | $\geq 98,00 \%$        | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Biotin ( $\text{B}_6$ )  | $\geq 99,00 \%$ (HPLC) | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Tiamin HCl ( $\text{B}_1$ )  | $\geq 99,00 \%$ (HPLC) | Sigma-Aldrich, Njemačka |
| Natrijev selenit ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )   | 99,00 %                | Sigma-Aldrich, Njemačka |

### 3.1.3. Ostale kemikalije

Tijekom izrade ovog doktorskog rada također su korištene i kemikalije navedene u tablici 2.

**Tablica 2.** Kemikalije koje su korištene tijekom izrade doktorskog rada

| Naziv kemikalije  | Čistoća         | Proizvođač               |
|---|-----------------|--------------------------|
| Natrijev hidroksid (NaOH)   | ≥ 98,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Klorovodična kiselina (HCl)   | 37,00 %         | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Metanol   | Min. 99,90 %    | Honeywell, SAD           |
| Kloroform   | HPLC, ≥99,80 %  | Honeywell, SAD           |
| Izopropanol   | HPLC, 99,90 %   | Honeywell, SAD           |
| Nile Red  | za mikroskopiju | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Gliceril-trioleat   | ≥ 99,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Aceton  | HPLC, ≥ 99,80 % | Honeywell, SAD           |
| Trikloroctena kiselina  | ≥ 99,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Tiobarbiturna kiselina  | ≥ 98, 00 %      | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Butilhidroksitoluen   | ≤ 100, 00 %     | Merck, Millipore, SAD    |
| Dimetilsulfoksid  | ≥ 99,70 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Natrijev dihidrogen fosfat dihidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2 H <sub>2</sub> O)        | ≥ 99,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Natrij amonij hidrogenfosfat tetrahidrat (NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> ×4 H <sub>2</sub> O) | ≥ 99,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| 2-aminofluoren  | 98,00 %         | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Aroklor 1254  |                 | Merck, Njemačka          |
| Hranjivi bujon i agar   |                 | DIFCO, UK                |
| Kalijev klorid (KCl)  | ≥ 99,50 %       | Kemika, Hrvatska         |
| Magnezijev klorid (MgCl <sub>2</sub> )  | ≥ 99,00 %       | Kemika, Hrvatska         |
| Magnezijev sulfat 7-hidrat (MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O)                                | ≥98,00 %        | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| Limunska kiselina   | ≥ 99,50 %       | Kemika, Zagreb, Hrvatska |
| Dikalijev hidrogenfosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                                       | ≥ 98,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| L-histidin  | ≥ 99,00 %       | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| D-biotin  |                 | Sigma-Aldrich, Njemačka  |
| β-nikotinamid adenin dinukleotid fosfat dinatrijeva sol (NADP)                                    |                 | Sigma-Aldrich, Njemačka  |

|   |  |  |
|---|--|--|
| Glukoza-6-fosfat  |  | Roche Diagnostics<br>Deutschland GmbH,<br>Njemačka |
| Dinatrijev hidrogen fosfat<br>(Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | ≥ 99,00 %  | Sigma-Aldrich, Njemačka                            |
| Kalijev nitrit (KNO <sub>2</sub> )  | ≥ 96,00 %  | Sigma-Aldrich, Njemačka                            |
| Dušična kiselina (HNO <sub>3</sub> )  | 65,00 %  | Fluka, Švicarska                                   |
| multielementna standardna<br>otopina (Al, As, B, Ba, Be, Bi,<br>Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg,<br>Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Se, Sr, Ti,<br>Tl, V, Zn) | 100,00 ± 0,20 mg L <sup>-1</sup>                 | Analytika, Češka                                   |
| Standardna otopina indija   | 1,00 g L <sup>-1</sup> ± 0,002 g L <sup>-1</sup> | Fluka, Švicarska                                   |
| Borna kiselina (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )  |  | Fluka, Švicarska                                   |
| Fluorovodična kiselina, (HF)  | 48,00 %  | J. T. Baker, Nizozemska                            |
| Klorovodična kiselina (HCl)   | 37,00 %  | Fluka, Švicarska                                   |
| Supelco FAME Mix, C4–C24  |  | Sigma-Aldrich, Njemačka                            |

---

## 3.2. Hranjive podloge

### 3.2.1. Hranjiva podloga za održavanje kulture *D. tertiolecta* i njezina karakterizacija

U svrhu održavanja kulture i uzgoja inokuluma mikroalge *D. tertiolecta* korištena je hranjiva podloga obogaćena morska voda, odnosno f/2 hranjiva podloga, namijenjena uzgoju morskih mikroalgalnih vrsta. Prema protokolu za pripremu f/2 hranjive podloge (tablica 3), koncentracije nutrijenata u izvornoj podlozi „f Medium“ (Guillard i Ryther, 2005), smanjene su za pola. Komponente f/2 hranjive podloge navedene su u tablici 3. Za pripremu f/2 hranjive podloge najprije je uzorkovana morska voda (Rovinj) koja je u uvjetima tame i niskih temperatura prenesena u laboratorij. Po dolasku u laboratorij morska voda je filtrirana membranskim filterima veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (LLG Labware) (slika 1) kako bi se uklonile nečistoće koje bi mogle utjecati na rast i razvoj morskih mikroalgi. Nakon dodavanja otopine soli u filtriranu morsku vodu odgovarajuća pH vrijednost (6,80) hranjive podloge podešena je pomoću klorovodične kiseline (HCl; 1 M). Nadalje, hranjiva podloga sterilizirana je autoklaviranjem na 120 °C kroz 20 minuta. Otopine vitamina i elemenata u tragovima prethodno su sterilizirane filtriranjem kroz sterilne celulozne acetatne filtere (CA) veličine pora 0,20  $\mu\text{m}$  (LLG Labware). Osim za održavanje kulture *D. tertiolecta*, ova hranjiva podloga također je korištena i kao negativna kontrola u svim provedenim eksperimentima ovog doktorskog rada.

**Tablica 3.** Guillard-ova f/2 hranjiva podloga

(a) sastav podloge

| <b>Kemikalija</b>   | <b>Koncentracija osnovne otopine (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu (mL L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Molarna koncentracija u f/2 podlozi (M)</b> |
|---|---|---|--|
| Natrijev nitrat (NaNO <sub>3</sub> )  | 75,00   | 1,00  | 8,82 x 10 <sup>-4</sup>                        |
| Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O) | 5,00  | 1,00  | 3,36 x 10 <sup>-5</sup>                        |
| Otopina metala u tragovima  | Tablica 3. (a)  | 1,00  | -  |
| Otopina vitamina  | Tablica 3. (b)  | 0,50  | -  |

(b) sastav otopine metala u tragovima

| <b>Kemikalija</b>  | <b>Koncentracija osnovne otopine (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu (mL L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Molarna koncentracija u f/2 podlozi (M)</b> |
|--|---|---|--|
| Željezov (III) klorid heksahidrat<br>(FeCl <sub>3</sub> ×6 H <sub>2</sub> O)         | -   | 3,15 g  | 1,17 x 10 <sup>-5</sup>                        |
| Dinatrijev EDTA (Na <sub>2</sub> EDTA)   | -   | 4,36 g  | 1,17 x 10 <sup>-5</sup>                        |
| Bakrov (II) sulfat pentahidrat<br>(Cu(II)SO <sub>4</sub> ×5 H <sub>2</sub> O)        | 9,80  | 1,00  | 3,93 x 10 <sup>-8</sup>                        |
| Cinkov sulfat heptahidrat<br>(ZnSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O)                 | 22,00   | 1,00  | 7,65 x 10 <sup>-8</sup>                        |
| Kobalt (II) klorid heksahidrat<br>(CoCl <sub>2</sub> ×6 H <sub>2</sub> O)            | 10,00   | 1,00  | 4,20 x 10 <sup>-8</sup>                        |
| Manganov (II) klorid tetrahidrat<br>(MnCl <sub>2</sub> ×4 H <sub>2</sub> O)          | 180,00  | 1,00  | 9,10 x 10 <sup>-7</sup>                        |
| Natrijev molibdat dihidrat<br>(Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2 H <sub>2</sub> O) | 6,30  | 1,00  | 2,60 x 10 <sup>-8</sup>                        |

(b) Sastav otopine vitamina

| <b>Kemikalija</b>                  | <b>koncentracija osnovne otopine (g L<sup>-1</sup>)</b> | <b>volumen osnovne otopine koji se dodaje u podlogu (mL L<sup>-1</sup>)</b> | <b>molarna koncentracija u f/2 podlozi (M)</b> |
|------------------------------------|---|---|--|
| Cijanokobalamin (B <sub>12</sub> ) | 1,00  | 1,00 mL   | 1,00 x 10 <sup>-10</sup>                       |
| Biotin (B <sub>6</sub> )           | 0,10  | 10,00 mL  | 2,05 x 10 <sup>-9</sup>                        |
| Tiamin HCl (B <sub>1</sub> )       | -   | 200,00 mg   | 2,96 x 10 <sup>-7</sup>                        |



**Slika 1.** Aparatura korištena za filtraciju uzoraka morske vode u laboratoriju (vlastita fotografija)

### **3.2.2. Hranjiva podloga korištena za istraživanje utjecaja različitih koncentracija selenita na kinetičke i biokemijske parametre *D. tertiolecta***

U svrhu ispitivanja utjecaja različitih koncentracija natrijevog selenita na kinetičke i biokemijske parametre mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina uzgoja (šaržni uzgoj, dvostupanjski uzgoj) i u različitim mjerilima (mikrotitarska ploča, Erlenmeyerove tikvice volumena od 100 mL i 2 L, laboratorijski fotobioreaktor volumena 3 L) korištena je f/2 hranjiva podloga obogaćena anorganskim oblikom selena, odnosno natrijevim selenitom ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), različitih koncentracija. Testirane koncentracije selenita tijekom različitih načina uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* i u različitim mjerilima prikazane su u tablici 4.

**Tablica 4.** Koncentracije selenita u f/2 hranjivoj podlozi tijekom provođenja jednostupanjskog (šaržnog) i dvostupanjskog uzgoja u različitim mjerilima

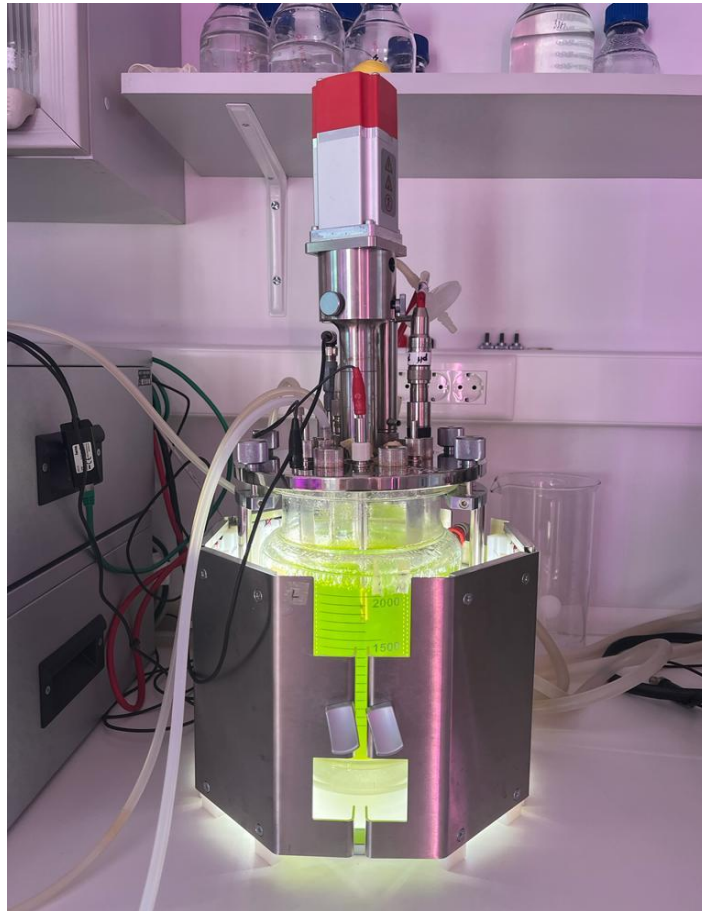
| Volumen u kojem je proveden eksperiment            | Korisni volumen (V <sub>k</sub> ) | Koncentracija selenita u f/2 hranjivoj podlozi (mg L <sup>-1</sup> ) |       |       |        |
|--|-----------------------------------|--|-------|-------|--------|
|  |                                   | 0,00   | 1,25  | 10,00 | 80,00  |
| Mikrotitarske ploče                                | 200,00 µL                         | 0,00   | 1,25  | 10,00 | 80,00  |
|  |                                   | 0,31   | 2,50  | 20,00 | 100,00 |
|  |                                   | 0,62   | 5,00  | 40,00 | 120,00 |
| Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL                 | 70,00 mL                          | 0,00   | 1,25  | 10,00 |        |
|  |                                   | 0,31   | 2,50  | 20,00 |        |
|  |                                   | 0,62   | 5,00  | 40,00 |        |
| Erlenmeyer tikvice volumena 2 L                    | 1,20 L                            | 0,00   |       | 40,00 |        |
|  |                                   | 20,00  |       | 80,00 |        |
| Laboratorijski fotobioreaktor ukupnog volumena 3 L | 2 L                               |  | 20,00 |       |        |

### 3.3. Oprema i aparatura

#### 3.3.1. Laboratorijski fotobioreaktor s mješalom

U svrhu uzgoja morske mikroalge *D. tertiolecta* korišten je stakleni laboratorijski fotobioreaktor s dvostrukim plaštom (Solida Biotech) ukupnog volumena 3 L. Laboratorijski fotobioreaktor sastoji se od kontrolne jedinice (eng. *Control Unit Module*), pumpe (eng. *Pump Unit Module*), „mokre“ jedinice (eng. *Wet Unit Module*) i operativne jedinice (eng. *Operating Unit Module*) (slika 2). Bioreaktor je opremljen mješalom, pH elektrodom i sondom za mjerenje temperature (Pt-100). Na poklopcu bioreaktora nalazi se sustav za uzorkovanje te priključci za punjenje, inokulaciju i korekciju pH vrijednosti podloge. Sustav za aeraciju sastoji se od cijevi za dovod i odvod plina na koje su spojeni filteri za sterilizaciju zraka.





**Slika 2.** Laboratorijski fotobioreaktor (vlastita fotografija)

### **3.3.2. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography, HPLC*)**

Tijekom izrade ovog doktorskog rada korišten je uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Agilent 1100 Series System) proizvođača Agilent, USA koji je opremljen sa VWD detektorom (eng. *variable wavelength detector*). Korištena je C30 kolona obrnutih faza (Thermo Scientific Acclaim) dimenzija 25 cm, 4.6 mm, i.d. 5  $\mu\text{m}$ .

### **3.3.3. Uređaj za plinsku kromatografiju (eng. *gas chromatography, GC*)**

Sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta* određen je pomoću uređaja za plinsku kromatografiju (Agilent 8890, Santa Clara, Kalifornija, SAD) nakon provedenog postupka transesterifikacije *in situ* primjenom protokola za analizu biomase mikroalgi koji je razvio Nacionalni laboratorij za obnovljivu energiju, SAD (eng. *National Renewable Energy Laboratory, USA*) (Van Wychen i sur., 2013). Sustav za plinsku kromatografiju sastoji se od automatskog injektora, termostatirane kapilarne kolone (DB-WAX UI 123-7063UI 60 m $\times$ 0.320 mm $\times$ 0.50  $\mu\text{m}$ ; Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD), plameno-ionizacijskog detektora i

računalnog programa za obradu podataka (OpenLab CDS). Program OpenLab CDS korišten je za kontrolu instrumenta, prikupljanje i analizu podataka (integracija). Uvjeti rada plinskog kromatograma prikazani su u tablici 5. Identifikacija pojedinih masnih kiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedine masne kiseline s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (Supelco FAME Mix, C4–C24; kataloški br.: 18919-1AMP, Bellefonte, PE, SAD) poznatog sastava. Sadržaj određene masne kiseline izražen je masenim udjelom (%) pojedine masne kiseline u smjesi ukupno određenih masnih kiselina u uzorku.

**Tablica 5.** Uvjeti rada na uređaju za plinsku kromatografiju

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Kolona</b>                       | DB-WAX UI 123-7063UI 60 m × 0.320 mm × 0.50 μm; Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD  |
| <b>Temperatura kolone</b>           | 80 °C, 1 min; 25 °C min <sup>-1</sup> , 175 °C, 1 min; 10 °C min <sup>-1</sup> , 185 °C, 5 min; 15 °C min <sup>-1</sup> , 235 °C, 5 min, 15 °C min <sup>-1</sup> , 250 °C, 27 min |
| <b>Plin nosioc</b>                  | Helij   |
| <b>Protok plina nosioca</b>         | 2,69 mL min <sup>-1</sup>   |
| <b>Temperatura injektora</b>        | 80 °C   |
| <b>Omjer razdijeljenja</b>          | 2,50:1  |
| <b>Temperatura detektora</b>        | 260 °C  |
| <b>Količina injektiranog uzorka</b> | 1 μL  |

### 3.3.4. Ostali uređaji

Uz laboratorijsko posuđe i potrošni laboratorijski materijal, u izradi ovog doktorskog rada korištena je i oprema navedena u tablici 6.

**Tablica 6.** Uređaji korišteni u istraživanju

| <b>Oprema</b>  | <b>Proizvođač</b>                                 |
|--|---|
| Centrifuga   | Eppendorf 5804 R, Njemačka                        |
| Laboratorijska tresilica   |   |
| Magnetska mješalica  | Heidolph MR Hei-Tec, Njemačka                     |
| Inkubator  | Innova 42, New Brunswick Scientific, SAD          |
| Analitička vaga  | Kern ABJ-220-4NM, Kern & Sohn GmbH, Njemačka      |
| Tehnička vaga  | Kern & Sohn GmbH                                  |
| UV/VIS spektrofotometar  | Tecan Infinite M200 PRO, Švicarska                |
| Fluorescentni mikroskop  | Olympus BX51, Japan                               |
| Boce plina s dušikom   | Messer Group GmbH, Njemačka                       |
| Autoklav   | Advantage-Lab AL02-06, Njemačka                   |
| Hladnjak i zamrzivač   | Gorenje, Slovenija; Heraeus, Njemačka             |
| Fotobioreaktor   | Solida Biotechnology GmbH, München, Germany       |
| Termoblok  | Eppendorf, ThermoMixer C, Njemačka                |
| pH metar   | Agilent Technologies, 3200P, SAD                  |
| Ledomat  | Brice ES 102W, Brema Group S.p.A., Italija        |
| Uređaj za pripremu vode  | Millipore TankPE030 30 Liter, Njemačka            |
| Ultrazvučna kupelj   | Bandelin, Sonorex digiplus 560W, Berlin, Njemačka |
| Laminar  | HERAsafe HS12, SAD                                |
| Digestor   | Scala Scientific BV, Nizozemska                   |
| Liofilizator   | Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Švicarska              |
| Kuglični mlin  | Tehtnica Millmix 20, Slovenija                    |
| Sustav za mikrovalnu razgradnju                                      | Microwave ECO, Anton Paar, Austrija               |
| Spektrometar masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu | Element 2, Thermo, Bremen, Njemačka               |

### **3.4. Metode**

#### **3.4.1. Uzgoj inokulma mikroalge *D. tertiolecta* za provođenje uzgoja u Erlenmeyer tikvicama različitih volumena i laboratorijskom fotobioreaktoru**

Inokulum morske mikroalge *D. tertiolecta* uzgajan je u f/2 hranjivoj podlozi čiji je sastav opisan u poglavlju 3.2.1. Uzgoj mikroalge započeo je aseptičnom inokulacijom sterilne f/2 hranjive podloge s malom količinom mikroalgalne kulture uzgajane u tekućoj podlozi istog sastava. Uzgoj se provodio na rotacionoj tresilici pri 100 okretaja min<sup>-1</sup> tijekom 5 dana pri uvjetima temperature od 25 ± 2 °C, izvoru osvjetljenja od 7 000 luxa te pH vrijednosti hranjive podloge od 6,80 ± 0,20. Nakon završenog uzgoja inokuluma, mikroalgalne kulture su centrifugirane pri 2 000 okretaja min<sup>-1</sup> kroz 10 minuta, supernatant je odbačen, a zaostala biomasa resuspendirana je u 200 mL sterilnog i svježeg f/2 medija. Tako pripremljena ugušćena mikroalgalna kultura, koja je u eksponencijalnoj fazi rasta, koristila se kao inokulum za postavljanje svih eksperimenata ovog doktorskog rada.

#### **3.4.2. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija natrijevog selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta***

U prvom dijelu doktorskog rada ispitivao se utjecaj širokog kaskadnog raspona koncentracija natrijevog selenita (0,31-120,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast mikroalge *D. tertiolecta*. Praćenje inhibicije rasta mikroalgi uslijed izlaganja različitim koncentracijama selenita provedeno je u skladu s Organizacijom za suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, OECD) iz 2011. godine. Test mikroalgalne inhibicije proveden je u mikrotitarskim pločama. Mikroalga *D. tertiolecta* izlagana je različitim koncentracijama selenita tijekom 72 sata uzgoja. Tijekom izlaganja porast broja stanica mikroalgi kvantificiran je mjerenjem optičke gustoće kulture stanica kao funkcije vremena. Izlaganje je provedeno u uvjetima konstantnog osvjetljenja od 7 000 luks-a, temperature od 25 ± 2 °C i miješanja na rotacionoj tresilici uz brzinu od 100 okretaja s<sup>-1</sup>. Početna pH vrijednost hranjive podloge iznosila je 6,80 ± 0,20.

#### **3.4.3. Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u Erlenmeyer tikvicama volumena 100 mL**

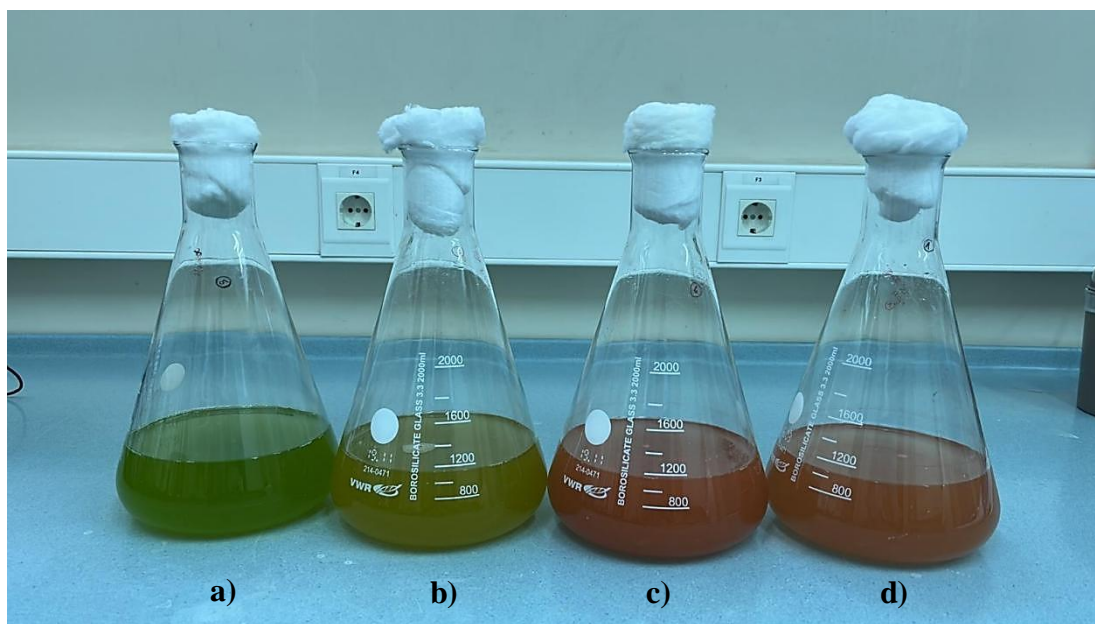
S obzirom na rezultate prvog dijela istraživanja, odnosno informacije o tome koje koncentracije selenita inhibiraju rast mikroalge *D. tertiolecta*, drugi dio doktorskog rada usredotočen je na ispitivanje utjecaja užeg kaskadnog raspona koncentracija selenita (0,31-40,00 mg L<sup>-1</sup>) na kinetičke i biokemijske parametre mikroalge tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu. Za uzgoj su korištene Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL koje su

sadržavale 70 mL f/2 hranjive podloge. Uvjeti pri kojima su provedeni uzgoji su konstantna temperatura od  $25 \pm 2$  °C, pH hranjive podloge od  $6,80 \pm 0,20$ , intenzitet osvjetljenja od 7 000 luks-a te konstantno miješanje od 100 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* mikroalgalne stanice najprije su se uzgajale u 70,00 mL f/2 medija bez dodatka selenita dok nisu dostignule ranu stacionarnu fazu rasta (faza I dvostupanjskog uzgoja). Nakon faze I dvostupanjskog uzgoja slijedi faza u kojoj se dodaju različite prethodno navedene koncentracije selenita u mikroalgalni medij. Paralelno su provedene i negativne kontrole koje su sadržavale samo 70,00 mL f/2 medija bez dodatka selenita. Osim toga, pripremljene su i slijepe probe koje su sadržavale iste koncentracije selenita bez dodavanja stanica mikroalgi. Svaki ekperiment proveden je u triplikatu pri čemu je početna koncentracija stanica mikroalgi u kulturi iznosila  $\sim 1 \times 10^4$  stanica  $\text{mL}^{-1}$ .

#### **3.4.4. Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L**

Treći dio doktorskog rada fokusiran je na daljnje ispitivanje utjecaja onih koncentracija selenita (20,00 i 40,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) koje su se tijekom prethodnog istraživanja pokazale najpogodnijima za nakupljanje neutralnih lipida u stanicama mikroalge *D. tertiolecta*. S obzirom da je mikroalgalni uzgoj proveden u većem mjerilu u odnosu na prethodno istraživanje, odnosno u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L koje su sadržavale 1,2 L hranjive podloge, dodatno je ispitan i utjecaj koncentracije selenita od 80,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Razlog dodatnog ispitivanja utjecaja koncentracije selenita od 80,00  $\text{mg L}^{-1}$  na mikroalgalni rast je veći volumen Erlenmeyer tikvica u kojem se istraživanje, odnosno treći dio doktorskog rada, provodio. Naime, s obzirom na veći volumen tikvice i time veću dubinu mikroalgalne kulture može se zaključiti da se mikroalgalne stanice međusobno više zasjenjuju što rezultira smanjenom brzinom rasta i posljedično tomu mogućem drugačijem mikroalgalnom odgovoru na različite koncentracije selenita. Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu proveo se dvostupanjskim načinom uzgoja. Prva faza dvostupanjskog uzgoja provedena je s ciljem maksimizacije produkcije mikroalgalne biomase. Faza II dvostupanjskog uzgoja započeta je 9. dan uzgoja, odnosno u trenutku kada su stanice mikroalge *D. tertiolecta* dostigle ranu stacionarnu fazu rasta. Na početku faze II dvostupanjskog mikroalgalnog uzgoja kulturama je dodan određeni volumen sterilne otopine natrijevog selenita tako da su koncentracije selenita u konačnom f/2 mediju iznosile 20,00, 40,00 i 80,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Faza II dvostupanjskog uzgoja trajala je 6 dana, odnosno ukupno vrijeme trajanja uzgoja iznosilo je 15 dana. Uvjeti pri kojima je uzgoj proveden jednaki su uvjetima uzgoja u drugom dijelu doktorskog rada. Po završetku uzgoja kultura je centrifugirana 20 min pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$ . Vlažna biomasa podvrgnuta je liofilizaciji, a supernatant je pohranjen na  $-20$  °C do

daljnjih analiza. Uzgoj je praćen izuzimanjem uzoraka kojima je određivana optička gustoća (poglavlje 3.5.1.) i broj stanica po mililitru suspenzije brojanjem stanica u Neubauer komorici (poglavlje 3.5.2.). Na kraju uzgoja biomasa je izdvojena centrifugiranjem. U filtratu, odnosno podlozi izdvojenoj nakon uzgoja, određena je koncentracija dušika, fosfata i selenita (poglavlje 3.5.4. i poglavlje 3.5.5.). Vlažna biomasa korištena je za određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenata i karotenoida (poglavlje 3.5.7.) te udjela neutralnih lipida (poglavlje 3.5.9.). Liofilizirana biomasa korištena je za određivanje sastava masnih kiselina metodom plinske kromatografije (poglavlje 3.5.11.), dok su frakcije ekstrakata liofilizirane biomase korišteni za određivanje koncentracije pojedinačnih karotenoida metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) (poglavlje 3.5.12.) i provedbu Ames testa (poglavlje 3.5.15.).



**Slika 3.** Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita: a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; d) 80,00 mg L<sup>-1</sup> (vlastita fotografija).

### 3.4.5. Šaržni i dvostupanjski uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru

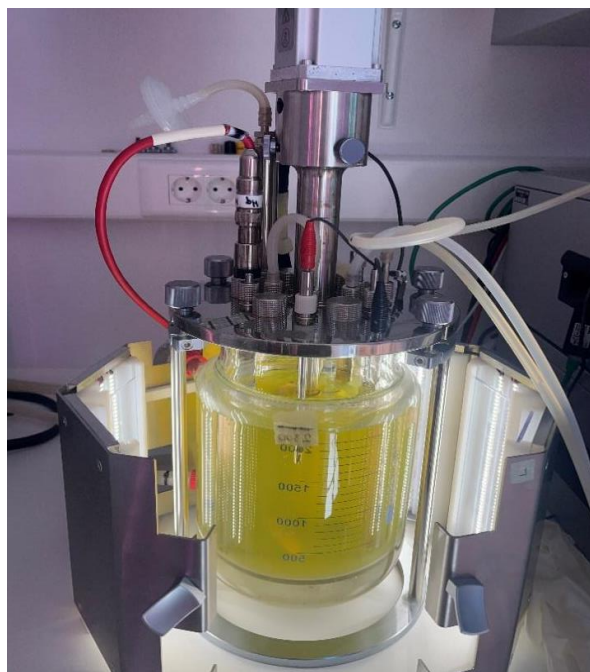
U četvrtom i posljednjem dijelu ovog doktorskog rada proveden je šaržni i dvostupanjski uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru. Tijekom provođenja dvostupanjskog mikroalgalnog uzgoja proučavan je utjecaj koncentracije selenita od 20,00 mg

$L^{-1}$  na kinetičke i biokemijske parametre mikroalge *D. tertiolecta*. Odabir ispitivane koncentracije selenita temeljio se na rezultatima prethodnog dijela doktorskog rada. Za uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* korišten je stakleni bioreaktor s miješalom (slika 2.) ukupnog volumena 3 L. Bioreaktor je najprije steriliziran u autoklavu pri temperaturi od 121 °C tijekom 20 minuta, a potom je u njega dodana sterilna f/2 hranjiva podloga. Početni volumen podloge iznosio je 2 L. Podloga je nacijepljena s 10 mL inokuluma pripremljenog na način opisan u poglavlju 3.4.1. Uzgoj se provodio pri  $25 \pm 2$  °C, intenzitetu osvjetljenja ~6 000 luks-a te uz konstantno miješanje mješalom pri 200 okretaja  $min^{-1}$ . Podešena pH-vrijednost podloge iznosila je 6,80 te je održavana automatskom regulacijom pritoka kiseline i lužine. Uzorci su izuzimani svakodnevno te je rast praćen određivanjem optičke gustoće kulture i određivanjem broja stanica po mililitru suspenzije uz pomoć Neubarove komorice. Po ulasku kulture u stacionarnu fazu rasta, na što je upućivalo smanjenje porasta optičke gustoće kulture i koncentracije stanica, završen je uzgoj. Biomasa je izdvojena centrifugiranjem ( $4\ 200$  okretaja  $min^{-1}$  kroz 10 minuta) te je liofilizirana, dok je supernatant pohranjen na -20 °C do daljnjih analiza.

a)



b)



**Slika 4.** Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru u a) kontrolnoj hranjivoj podlozi i b) hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg  $L^{-1}$  selenita (vlastite fotografije).

### 3.5. Analitičke metode

#### 3.5.1. Mjerenje optičke gustoće kulture stanica

Tijekom provođenja uzgoja mikroalgalni rast praćen je spektrofotometrijski. Najprije su se izuzeli uzorci mikroalgalnih kultura te se odredila optička gustoće kulture stanica mjerenjem uz pomoć UV/VIS spektrofotometra (Tecan Infinite M200 PRO, Švicarska, opremljen sa Magellan software version V 7.2) na valnoj duljini od 680 nm uz uporabu kvarcne kivete širine 1x1 cm. Gustoća stanica izračunata je iz vrijednosti optičke gustoće uz pomoć jednadžbe baždarnog pravca [1].

$$\text{Gustoća stanica (broj stanica mL}^{-1}\text{)} = 6 \times 10^6 \times \text{OD}_{680} + 259\,587 \quad [1]$$

#### 3.5.2. Određivanje broja stanica mikroalgi pomoću Neubarove komorice

Nakon nanošenja 10  $\mu\text{L}$  uzorka kulture mikroalge *D. tertiolecta* na Neubarovu komoricu, pripravak je promatran pod objektivom povećanja 40 puta te su izbrojane stanice. Izračunata je srednja vrijednost broja stanica koja je izražena kao ukupan broj stanica po mililitru suspenzije [2].

$$N = \frac{m \times n \times 400 \times 1000}{Q} \quad [2]$$

gdje je:

N – ukupan broj stanica po mililitru suspenzije;

m – ukupan broj izbrojanih stanica u kvadratima;

n – razrjeđenje suspenzije;

Q – broj malih kvadrata u kojima su izbrojane stanice;

m/Q – prosječan broj stanica po malom kvadratu

#### 3.5.3. Gravimetrijsko određivanje koncentracije suhe tvari biomase mikroalgi

U prethodno osušene i izvagane plastične kivete dodan je određeni volumen mikroalgalne kulture. Kivete s uzorcima su centrifugirane pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, a istaložena biomasa je resuspendirana u destiliranoj vodi kako bi se uklonili ostaci podloge i soli. Nakon ponovnog centrifugiranja supernatant je opet odbačen, a preostali talog biomase osušen je u sušioniku pri 100 °C do postizanja konstantne mase. Nakon hlađenja u eksikatoru, kiveta s osušenim talogom biomase izvagana je ponovno. Koncentracija suhe tvari biomase mikroalge je određena je prema jednadžbi 3.



$$X = \frac{m_2 - m_1}{V_p} \quad [3]$$

X – koncentracija suhe tvari biomase ( $\text{g L}^{-1}$ )

$m_1$  – masa prazne osušene kivete (g)

$m_2$  – masa kivete sa osušenom biomasom (g)

$V_p$  – volumen podloge uzet za analizu (L)

### 3.5.4. Određivanje koncentracije nitrita u podlozi

Koncentracija nitrita u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji se temelji na reakciji nitritnih iona u otopini sumporne kiseline i fosforne kiseline s 2,6–dimetilfenolom (DMP) pri čemu nastaje 4–nitro–2,6–dimetilfenol koji se detektira spektrofotometrijski. Nitriti su određeni u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzoraka mikroalgalne kulture. U kivetu volumena 15 mL otpipetirano je 4 mL reagensa  $\text{NO}_3^{-1}$ , 500  $\mu\text{l}$  uzorka ( $5\text{--}25\text{ }^\circ\text{C}$ ) i 500  $\mu\text{L}$  reagensa  $\text{NO}_3^{-2}$  te je sadržaj kivete potom vorteksiran 30 sekundi. Miješanjem reakcijske smjese dolazi do kemijske reakcije što se primjećuje promjenom boje i oslobađanjem topline. Nakon 10 minuta izmjerena je apsorbancija otopine pri valnoj duljini od 357 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka koristila se demineralizirana voda jednakog volumena. Kako bi se odredila koncentracija nitrita izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrjeđivanjem otopine kalijevog nitrita koncentracije  $1\text{ g L}^{-1}$  s demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija nitrita između 0,00 i 25,00  $\text{mg L}^{-1}$ . Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 357 nm. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu (prilog 5).

### 3.5.5. Određivanja koncentracije fosfata u podlozi

Koncentracija fosfata u podlozi određena je koristeći kit (Merck, Njemačka) koji se temelji na reakciji ortofosfatnih iona u otopini sumporne kiseline s molibdenovim ionima pri čemu nastaje fosfomolibdenska kiselina. Askorbinska kiselina reducira nastali produkt u fosfomolibden plavo (PMB) koji daje plavo obojenje. Fosfati su određeni u uzorcima supernatanta dobivenog nakon centrifugiranja uzoraka mikroalgalne kulture. U kivetu volumena 15 mL otpipetira se 5 mL uzorka ( $15\text{--}35\text{ }^\circ\text{C}$ ), doda se 5 kapi reagensa  $\text{PO}_4\text{--}1$  i jedna mikrožličica reagensa  $\text{PO}_4\text{--}2$  te se sadržaj zatim vorteksira. Nakon 5 minuta izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm. U slijepoj probi koristi se demineralizirana voda umjesto uzorka. Kako bi se mogla odrediti koncentracija fosfata, izrađen je baždarni dijagram. Standardi su pripremljeni razrjeđivanjem otopine kalijevog dihidrogenfosfata monohidrata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) koncentracije  $1\text{ g L}^{-1}$  s

demineraliziranom vodom kako bi se dobila koncentracija fosfata između 0,05 i 3,5 mg L<sup>-1</sup>. Pripremljenim standardima izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 690 nm. Baždarni dijagram prikazan je u prilogu (prilog 6).

### 3.5.6. Određivanje koncentracije selena u podlozi

Koncentracija selena u uzorcima određena je primjenom metode spektrometrije masa visoke razlučivosti uz induktivno spregnutu plazmu (eng. *High resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, HR-ICP-MS). Za uvođenje uzoraka koristi se autosampler povezan s HR ICP-MS instrumentom Element 2 (Thermo, Bremen, Njemačka). Parametri HR-ICP-MS-a korišteni za mjerenje koncentracija elemenata u uzorcima navedeni su u tablici 7.

**Tablica 7.** Parametri HR ICPMS-a korišteni za mjerenje koncentracija selena u uzorcima

| Instrument             | Element 2 (Thermo, Njemačka)                               |
|------------------------|--|
| Rezolucija (m/m)       | niska (LR) = 300, srednja (MR) = 4000, visoka (HR) = 10000 |
| RF snaga               | 1200 W   |
| Pomoćni plin:          | 0.85 L min <sup>-1</sup>                                   |
| Plin za uzorak:        | 1.063 L min <sup>-1</sup>                                  |
| Plazmenik              | Fasselov, 1.5 mm i.d.                                      |
| Raspršivač             | Micro Mist, AR40-1-F02, 0,2 ml/min (Glass Expansion)       |
| Komora za raspršivanje | Twister, 50 ml, Cyclonic (Glass Expansion)                 |
| Konus uzorka           | Nikal, promjera otvora 1.1 mm                              |
| Probirni konus         | Nikal, promjera otvora 0.8 mm                              |
| Način pretrage         | E-scan   |
| Broj pretraga          | 12 za svaku rezoluciju                                     |

Za kvantifikaciju se koristi vanjska kalibracija pomoću multielementnih standardnih otopina u rasponu koncentracija 1-10 µg L<sup>-1</sup> za elemente u tragovima. Po potrebi se dodaju standardne otopine viših koncentracija. Iz osnovne standardne otopine pripremaju se međuotopine u 5 % HNO<sub>3</sub> supra pur, iz kojih se dalje pripremaju otopine za kalibraciju navedenih raspona koncentracija. Za potrebe multielementne analize elemenata u tragovima kalibracijske otopine se pripremaju iz multielementnog standarda uz dodatak elemenata koji nisu sadržani u standardu, kao što su U, Sn i Sb. Sve otopine za kalibraciju pripremljene su u 2 % HNO<sub>3</sub> supra pur uz dodatak internog standarda (IS) u koncentraciji od 1 µg L<sup>-1</sup>. Kao interni standard koristio

se indij. Iz osnovne standardne otopine navedenog elementa pripravljena je međutopina konačne koncentracije  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  u 5 %  $\text{HNO}_3$  supra pur i dodana u sve kalibracijske standarde, slijepe probe i uzorke. Otopina borne kiseline priprema se otapanjem 40 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  u 1 L Milli-Q vode. Prije analize u uzorke je potrebno dodati interni standard, indij (In) ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Fiket i sur., 2007).

### 3.5.7. Spektrofotometrijska analiza sastava pigmenata

U svrhu određivanja koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofil a i klorofil b) i koncentracije ukupnih karotenoida u biomasi mikroalge *D. tertiolecta*, najprije je provedena metanolna ekstrakcija vlažne mikroalgalne biomase (Pancha i sur., 2015). Ekstrakcija je provedena u uvjetima prigušene svjetlosti u svrhu sprječavanja raspada fotosenzitivnih pigmenata. Volumen mikroalgalne kulture od 2 mL centrifugiran je pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  kroz 10 minuta. Supernatant je dekantiran, dok je zaostali talog resuspendiran u destiliranoj vodi te ponovno centrifugiran kako bi se uklonili ostatci hranjive podloge i soli. Nakon ponovljenog postupka supernatant je odbačen te je na dobiveni talog dodano 2 mL metanola. Kiveta je vorteksirana nekoliko puta po 30 sekundi te su uzorci ostavljeni u inkubatoru na  $45^\circ\text{C}$  preko noći. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  kroz 10 minuta. Supernatant je izdvojen u kivetu, dok je preostali talog biomase podvrgnut postupku ponovne ekstrakcije do potpunog obezbojenja biomase. Koncentracija klorofila a i klorofila b u supernatantu određena je spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 665 nm, 652 nm, 470 nm i 750 nm. Koncentracije klorofila a i b te koncentracija karotenoida izračunate su prema jednadžbama 4., 5. i 6.

$$\text{Klorofil a; Chl-a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4} \quad [4]$$

$$\text{Klorofil b b; Chl-b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2} \quad [5]$$

$$\text{Ukupni karotenoidi } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{Chl-a} - 104,9 \times \text{Chl-b}) / 221 \quad [6]$$

### 3.5.8. Određivanje razine oksidativnog stresa u stanicama mikroalge *D. tertiolecta*

Količina produkata lipidne peroksidacije određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije tiobarbiturnih reaktivnih tvari (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) nastalih reakcijom malondialdehida (MDA) i drugih kemijski sličnih spojeva s tiobarbiturnom kiselinom u kiseloj sredini (Pancha i sur., 2015; Hamed i sur., 2017). Volumen mikroalgalne kulture od 2 mL centrifugiran je pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  kroz 10 minuta. Supernatant je odbačen te je na preostali talog mikroalgalne biomase dodano 2 mL etanola (80:20, v:v). Uzorci su homogenizirani na kugličnom homogenizatoru (Tehtnica Millmix 20,

Slovenija) pri uvjetima frekvencije od 25 Hz kroz 10 minuta. Dobiveni mikroalgalni ekstrakt je centrifugiran na 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  tijekom 10 min. Nakon postupka centrifugiranja izuzeto je 900  $\mu\text{L}$  supernatanta koji je pomiješan sa 900  $\mu\text{L}$  0,65 % tiobarbiturne kiseline pripremljene u otopini 20,00 % triklorocetene kiseline koja je sadržavala 0,01 % butilhidroksitoluena. Uzorci su potom vorteksirani i inkubirani na 95 °C kroz 25 minuta. Nakon završenog postupka inkubacije, uzorci su ohlađeni pri 4 °C te je izmjerena absorbancija supernatanta na 450, 532 i 600 nm. Udio TBARS-a izračunat je prema jednadžbi 7:

$$\text{TBARS } [\mu\text{mol} \times 10^6 \text{ stanice}^{-1}] = [6,45 (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0,56 \times \text{OD}^{450}] / 10^6 \text{ stanice}^{-1} \quad [7]$$

### 3.5.9. Određivanje udjela neutralnih lipida mikroalge *D. tertiolecta* Nile Red metodom

Nile Red metoda fluorometrijska je tehnika koja se koristi za kvantifikaciju udjela neutralnih lipida u biološkim uzorcima upotrebom Nile Red boje. Naime, Nile Red boja preferencijalno se veže za neutralne lipide u uzorku te u trenutku kada se izloži ultraljubičastom svjetlu emitira fluorescentno svjetlo u vidljivom spektru, čime se omogućuje detekcija i kvantifikacija neutralnih lipida u uzorku (Chen i sur., 2009). U usporedbi sa konvencionalnim metodama koje se koriste za kvantifikaciju lipida, Nile Red boja pruža brojne prednosti kao npr. za provođenje analize potrebna je mala količina uzorka, nije potrebna uporaba otapala te je metoda relativno jednostavna i brza. Nakon izuzimanja volumena mikroalgalne kulture od 2 mL proveden je postupak centrifugiranja pri 4 200 okretaja  $\text{min}^{-1}$  kroz 10 minuta. Nakon centrifugiranja supernatant je odbačen, dok je preostali talog ispran dva puta sa f/2 medijem. Nakon završenog postupka ispiranja na talog mikroalgalne biomase dodano je 2 mL f/2 medija, 300  $\mu\text{L}$  25 % DMSO-a (25 % v/v) i 5  $\mu\text{L}$  Nile Red boje (0,50  $\text{mg mL}^{-1}$ ) otopljene u acetonu. Sadržaj kivete pomiješan je kroz 30 sekundi i inkubiran na 37 °C kroz 10 minuta. Nakon završenog postupka inkubacije udio neutralnih lipida kvantificiran je uz pomoć spektrofotofluorimetra (Tecan Infinite M200 PRO, Švicarska, opremljen sa Magellan software version V 7.2) mjerenjem na valnim duljinama emisije i ekscitacije od 475 i 580 nm. Koncentracija neutralnih lipida u stanici izražena je kao ekvivalent trioleina prema jednadžbi 8:

$$\mu\text{g triolein mL}^{-1} = [F_L - (F_A + F_{\text{FSW}})]b \quad [8]$$

gdje je:

$F_L$  – fluorescencija stanične suspenzije u f/2 mediju nakon dodavanja Nile Red boje

$F_A$  – autofluorescencija stanične suspenzije u f/2 mediju prije dodavanja Nile Red boje

$b$  – nagib baždarnog pravca krivulje ( $\mu\text{g triolein mL}^{-1}$ )

### **3.5.10. Fluorescentna mikroskopija lipida mikroalge *D. tertiolecta***

Lipidne mješine mikroalgalne stanice vizualizirane su fluorescentnom Nile Red bojom uz uporabu fluorescentnog mikroskopa (svjetlosni binokularni mikroskop Olympus® BX51 opremljen sa Microsoft® AnalySIS Soft Imaging System softverom) i izvora svjetla visokotlačne živine lampe s plavim fluorescentnim filterom (Yilancioglu i sur., 2014).

### **3.5.11. Određivanje sastava masnih kiselina u biomasi mikroalge *D. tertiolecta***

Sastav masnih kiselina u biomasi mikroalge *D. tertiolecta* određen je uz pomoć plinskog kromatografa nakon provedenog postupka transesterifikacije masnih kiselina. Postupak *in situ* transesterifikacije masnih kiselina proveden je prema metodi razvijenoj u NREL laboratoriju (eng. *National Renewable Energy Laboratory*, USA) za određivanje ukupnih lipida (Wyche, S Van, 2013). Za provođenje prema navedenom protokolu najprije je bilo potrebno pripremiti otopine standarda. Standard metil tridekanoat (C13:0ME) u koncentraciji 10,00 mg mL<sup>-1</sup> pripremljen je otapanjem 100 mg metil tridekanoata u 10 mL heksana. Drugi standard, odnosno pentadekan (C15:0) pripremljen je vaganjem 10 mg pentadekana i otapanjem u 1 mL heksana. Dobiveni standard potom je razrijeđen s heksanom u omjeru 1:10. U staklene vijale izvagano je 5–10 mg osušene i usitnjene biomase mikroalge. Biomasi je dodano 20 µL standarda metiltridekanoata, 200 µL otopine kloroform:metanol (2:1, v/v) i 300 µL 0,06 M otopine HCl u metanolu. Staklene vijale su inkubirane u vodenoj kupelji kroz 1 h pri 85 °C. Ohlađenim uzorcima dodan je 1 mL heksana, uzorak je pomiješan te ostavljen na sobnoj temperaturi kroz 1 h kako bi se razdvojile faze. Gornja, heksanska faza, sadržavala je estere masnih kiselina te je izdvojena kako bi se koristila za daljnju analizu. U insert u vijalu izdvojeno je 200 µL gornje faze i 5 µL standarda pentadekana. Uzorci su analizirani plinskim kromatografom opremljenim masenim detektorom (GC–FID) (poglavlje 3.3.3.). Identifikacija masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom vremena zadržavanja njihovih metilnih estera s vremenima zadržavanja metilnih estera smjese standarda koji se sastoji od 37 masnih kiselina (Supelco FAME Mix, C4–C24).

### **3.5.12. Određivanje koncentracije pigmenta mikroalge *D. tertiolecta* primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

#### **3.5.12.1. Priprema ekstrakata mikroalge *D. tertiolecta***

Za pripremu mikroalgalnih ekstrakata u svrhu određivanja koncentracije pigmenta metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (poglavlje 3.3.2.) 50,00 mg liofilizirane biomase mikroalgi resuspendirano je u 0,50 mL mješavine otapala metanol (MeOH)/diklormetan (DCM) (1:1, v/v). Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin, Sonorex digiplus 560W, Berlin, Njemačka) kroz 15 minuta tri puta. Nakon svakog postupka sonifikacije, smjesa je centrifugirana pri 4 200 okretaja min<sup>-1</sup> kroz 10 minuta kako bi se odvojio tekući dio (supernatant) od biomase. Nakon centrifugiranja biomasa je podvrgnuta ponovnoj ekstrakciji te je nakon svakog postupka sonifikacije svaki dobiveni ekstrakt pridružen onome iz prethodnog koraka. Svi sakupljeni supernatanti filtrirani su i pomiješani s malom količinom C18 oktadekilsilikonskog praha. Dobiveni ekstrakti su potom podvrgnuti evaporaciji u struji dušika (5,0, Messer, Hrvatska) kako bi se uklonila organska otapala. Nakon uparavanja dobiveni suhi ekstrakti stavljeni su na predkondicioniranu SPE kolonu (C18, Agilent Bond Elut, Njemačka) te je postupak frakcioniranja napravljen sa otapalima različitih polarnosti (voda>voda:metanol>metanol>diklormetan). Dobivene manje polarne frakcije, odnosno F3 (metanolna frakcija) i F4 (diklormetanska) frakcija su sakupljene, osušene i pohranjene do daljnjih analiza. Nakon sušenja frakcije su otopljene u odgovarajućim otapalima za kromatografske analize, odnosno F3 frakcija je otopljena u metanolu, dok je F4 frakcija otopljena u dimetilsulfoksidu.

#### **3.5.12.2. Određivanje koncentracije pigmenta u F3 i F4 frakciji metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)**

Dobivene F3 i F4 frakcije mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita (poglavlje 3.4.4.) prije analize filtrirane su kroz PTFE filtere (0,22 µm). Uzorci su potom analizirani na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC Agilent 1100 Series, Agilent, SAD) opremljenom sa detektorom s varijabilnim valnim duljinama (eng. *variable wavelength detector*, VWD). Za separaciju pri temperaturi od 20 °C korištena je kolona obrnutih faza (Termo Scientific Acclaim C30) dimenzija 25 cm, 4,6 mm i.d., 5 µm. HPLC analiza provedena je prema metodi opisanoj u radu Cikoš i sur. (2021) s manjim izmjenama. Za separaciju pigmenta korištena je smjesa otapala (A) koja se sastoji od metanola (MeOH), izopropanola i Mili-Q vode u omjeru 80:17:3 (v/v/v) te smjesa otapala (B)

koja se sastoji od metanola (MeOH) i izopropanola u omjeru 20:80 (v/v). Gradijentna elucija provedena je uz sljedeće uvjete: 0 min, 0 % B; 20 min, 100 % B; 30 min, 100 % B, 35 min, 0 % B, dok je brzina protoka otapala bila: 0-20 min, 0,9 mL min<sup>-1</sup>, 20-30 min, 0,9-1,0 mL min<sup>-1</sup> i 30-35 min, 1 mL min<sup>-1</sup>. Valna duljina detekcije bila je 450 nm, volumen injektiranog uzorka bio je 5 µL, a ukupno vrijeme analize jednog uzorka bilo je 35 min. Pojedini pigmenti identificirani su usporedbom vremena zadržavanja pikova u uzorku s vremenima zadržavanja pikova dobivenih propuštanjem otopine standarda. Pripremljene su baždarne krivulje za sedam standardnih spojeva (fukoksantin, astaksantin, lutein, kantaksantin, β-karoten, klorofil a i klorofil b) te su korištene za kvantifikaciju tih spojeva u uzorcima primjenom metode vanjske kalibracije (eng. *external standard method*).

Osnovne otopine standarda pripremljene su otapanjem u acetonu, dok su radni standardi pripremljeni u rasponu od 6,25–500 µg mL<sup>-1</sup>. Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) izračunate su iz parametara dobivenih iz kalibracijske krivulje pomoću jednadžbi  $LOD = 3 s/b$  i  $LOQ = 10 s/b$ , gdje je *s* standardna devijacija y-odsječka regresijske linije, a *b* je nagib baždarnog pravca (Ribani i sur., 2007). Rezultati su izračunati kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (SD) i izraženi kao mg g<sup>-1</sup> suhe frakcije.

### 3.5.13. Procjena svojstava biodizela na temelju profila masnih kiselina

Četiri najvažnija svojstva biodizela su: cetanski broj, viskoznost, gustoća i visoka ogrjevna vrijednost.

Empirijske korelacije koje su korištene za izračun navedenih svojstava biodizela su:

$$\varphi_i = -7,80 + 0,302 \times M_i - 20,00 \times N \quad [9]$$

gdje je  $\varphi_i$  cetanski broj određene masne kiseline ( $M_i$ ),

$$\ln(\eta_i) = -12,503 + 2,496 \times \ln(M_i) - 0,178 \times N \quad [10]$$

gdje je  $\eta_i$  kinematička viskoznost ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ) pri 40 °C određene masne kiseline ( $M_i$ ),

$$\rho_i = 0,8463 + 4,90 / M_i + 0,0118 \times N \quad [11]$$

gdje je  $\rho_i$  gustoća ( $\text{g cm}^{-3}$ ) pri 20 °C određene masne kiseline ( $M_i$ )

i,

$$\delta_i = 46,19 - 1794/M_i + 0,21 \times N \quad [12]$$

gdje je  $\delta_i$  viša ogrjevna vrijednost ( $\text{MJ kg}^{-1}$ ) određene masne kiseline ( $M_i$ ).

Prema brojnim studijama određena fizikalna svojstva biodizela mogu biti procijenjena na temelju fizičkih svojstava pojedinih masnih kiselina koristeći općenitu jednadžbu.

U svrhu izrade ovog doktorskog rada za izračun fizikalnih svojstava biodizela korištena je jednadžba 13.

$$f_b = \sum_{i=1}^n z_i \times f_i \quad [13]$$



### 3.5.14. Izračun pokazatelja uspješnosti procesa

Parametri uspješnosti bioprocesa određeni su prema jednačbama 14., 15. i 16.

#### Prinos biomase:

$$Y_x = X - X_0 \quad [14]$$

Gdje je:

$Y_x$  – prinos biomase ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X$  – koncentracija biomase na kraju uzgoja ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X_0$  – početna koncentracija biomase ( $\text{g L}^{-1}$ )

#### Specifična brzina rasta:

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \times \ln \frac{X}{X_0} \quad [15]$$

gdje je:

$\mu$  – specifična brzina rasta ( $\text{h}^{-1}$ )

$X$  – koncentracija biomase u vremenu  $t_n$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X_0$  – početna koncentracija biomase ( $\text{g L}^{-1}$ )

$\Delta t$  – interval vremena ( $t_n - t_0$ )

#### Produktivnost sinteze biomase:

$$Prx = \frac{X}{tu} \quad [16]$$

gdje je:

$Prx$  – produktivnost sinteze biomase ( $\text{g L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ )

$X$  – koncentracija biomase u vremenu  $t_n$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$tu$  – trajanje uzgoja (dan)

### **3.5.15. Određivanje mutagenog/genotoksičog potencijala F3 i F4 frakcije mikroalge *D. tertiolecta* Ames bakterijskim testom**

Kako bi se utvrdio mogući mutageni/genotoksični učinak testiranih frakcija izvršena je laboratorijska analiza mutagenog potencijala uzoraka Ames bakterijskim testom (ISO 16240, 2005). Ames test na mutagenost izveden je s TA 98 i TA 100 sojevima bakterije *Salmonella typhimurium*. Testiranje je zbog ograničenog volumena uzorka provedeno u duplikatu, dok su kontrole testirane u triplicatima. U svrhu provedbe Ames testa najprije su pripremljeni uzorci i pripravljene Petrijeve zdjelice s minimalnom hranjivom podlogom. Potom je pripravljena bakterijska suspenzija, top agar i aktivacijska smjesa S9 mix.

Za provedbu Ames testa, korišteni su bakterijski sojevi TA 98 i TA100 vrste *S. typhimurium* dobiven od dr. Bruca Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). Genetske karakteristike navedenih sojeva čine ih osjetljivim na širok spektar različitih mutagena koji uzrokuju pomak okvira čitanja (eng. *frameshift*) zbog čega je izrazito pogodan za primarno testiranje uzoraka. Po primitku sojeva (na malom filter disku ili u liofiliziranom obliku) bakterije su kultivirane u tekućoj (5 mL) i na krutoj (rezerva) hranjivoj podlozi pri 37 °C preko noći (16 h maksimum). Potom su napravljeni odgovarajući alikvoti: 0,80 mL tekuće kulture uz dodatak 0,07 mL dimetilsulfoksida (krioprotektor) stavljeno je u 2 mL sterilnu kriogenu bočicu te potom smrznuto u tekućem dušiku i pohranjeno na - 80 °C.

Uzorci su pripremljeni na način da su pripravljene metanolna (F3) i diklormetanska (F4) frakcija koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> mikroalge *D. tertiolecta* nakon tretiranja različitim koncentracijama selenita (poglavlje 3.4.4.). Petrijeve zdjelice s minimalnom podlogom pripravljene su na način da su, nakon pripreme i postupka sterilizacije bakterijskog agara, u otopinu agara sterilno dodane otopine Vogel–Bonnerove hranjive podloge i glukoze (40 %, v/v). Nakon miješanja izliveno je po 25 mL agara (tzv. minimalni hranjivi agar) u Petrijeve zdjelice. Dan prije testiranja hranjivi medij nacjepljen je bakterijskom kulturom te stavljen na inkubaciju na 37 °C. Nakon 12–16 sati inkubacije prekinut je uzgoj uranjanjem kivete s kulturom u ledenu kupelj ili hladnjak (4 °C) gdje je čuvana do upotrebe. Za pripravu top agara nakon pripreme i sterilizacije, u agar je dodano 10 mL sterilne otopine 0,50 mM histidina/0,50 mM biotina. Za pripremu aktivacijske smjese S9 mix najprije je priređena otopina 1,65 M KCl+0,40 M MgCl<sub>2</sub>. Potom je priređena 1,00 M otopina glukoza–6–fosfata, 0,10 M otopina nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADP), 0,20 M natrij fosfatni pufer (pH 7,40) i 0,20 M otopina NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### **3.5.15.7. Test na mutagenu aktivnost**

#### 3.5.15.7.1. Testiranje uzoraka bez metaboličke aktivacije

Za jednu Petrijevu ploču S9 mix sadržavao je: 0,10 mL 0,15 M KCl; 0,01 mL 0,40 M MgCl<sub>2</sub>+1,65 M KCl; 0,25 mL 0,20 M fosfatnog pufera pH 7,40 i 0,14 mL dH<sub>2</sub>O. Smjesa od 0,01–0,10 mL otopine tvari koju ispituujemo, 0,50 mL S9 mix-a bez metaboličke aktivnosti, 0,10 mL bakterijske suspentije ( $1-2 \times 10^9$  bakterija) i 2,00 mL površinskog agara (0,60 % agar, 0,50 % NaCl, u kojeg je dodano 10 mL sterilne otopine 0,50 mM histidina i 0,50 mM biotina, termostatirano na 45 °C) pomiješano je u mikrobiološkoj epruveti i izliveno (u duplikatu) u sterilne Petrijeve zdjelice s 25 mL minimalne hranjive podloge.

#### 3.5.15.7.2. Testiranje uzoraka uz metaboličku aktivaciju

Za jednu Petrijevu ploču +S9 mix sadržavao je: S9 (0,10 M); 0,01 mL 0,40 MgCl<sub>2</sub> + 1,65 M KCl; 0,25 mL 0,20 M fosfatnog pufera pH 7,40; 0,0025 mL 1 M glukoza–6–fosfata; 0,02 mL 0,10 NADP – Na<sub>2</sub> i 0,1175 mL dH<sub>2</sub>O. Za pokuse Ames testom koristi se svježe pripremljen S9 mix, što znači da se neposredno prije samog pokusa svi potrebni sastojci miješaju i filtriraju kroz sterilni filter. Tako pripremljen S9 mix drži se na -4 °C kroz nekoliko sati bez gubitka metaboličke aktivnosti. Smjesa od 0,01 – 0,10 mL otopine tvari koju ispituujemo, 0,50 mL S9 mix-a s metaboličkom aktivacijom, 0,10 mL bakterijske suspentije ( $1 - 2 \times 10^9$  bakterija) i 2,00 mL površinskog agara (0,60 % agar, 0,50 % NaCl, u kojeg je dodano 10 mL sterilne otopine 0,50 mM histidin x 0,50 Mm biotin, termostatirano na 45 °C) pomiješano je u mikrobiološkoj epruveti i izliveno (u triplicatu) u sterilne Petrijeve zdjelice s 25 mL minimalne hranjive podloge.

#### 3.5.15.7.3. Pozitivna i negativna kontrola

Kod izvođenja svakog testa na mutagenost uključene su pozitivne i negativne kontrole. Kao negativna kontrola ubraja se broj spontanih revertanata. Pozitivne kontrole (dijagnostički mutageni) koriste se u potvrdi svojstva povećanja broja revertanata (His- u His+) određenog bakterijskog soja *S. typhimurium* koje je istovremeno povezano s djelotvornošću (bioaktivacijskim potencijalom) S9 frakcije u S9 mix. Kod ispitivanja mutagenog potencijala direktnih mutagena tj. tvari za koje nije potrebna metabolička aktivacija (- S9 mix) kao pozitivne kontrole korišteni su direktni mutageni. Nakon inkubacije 2-3 dana (u mraku) na temperaturi od 37 °C, izbrojane su izrasle kolonije na ploči. Brojanje kolonija izvodilo se ručno. Najmanje dvostruki broj revertanata na ploči s ispitivanom tvari (uzorkom) iznad broja spontanih mutanata kriterij je prema kojem se uzorak smatra mutagenim u Ames testu. Prema smjernicama Myers i sur., 1987 koje je dala američka Agencija za zaštitu okoliša (eng. U.S.

*Environmental Protection Agency, EPA*), tvar testirana Ames testom posjeduje mutageni potencijal (sposobnost kemijske tvari ili fizikalnog agensa da uzrokuje trajne genetske promjene – mutacije) ukoliko je broj kolonija revertanata dvostruko (ili više) veći od broja spontanih revertanata.

### **3.5.16. Statistika**

Statistička obrada i grafički prikaz dobivenih rezultata napravljen je GraphPad Prism 6.01. statističkim programom. Rezultati su izraženi u obliku srednje vrijednosti svih testnih replika uz pridruženu vrijednost standardne devijacije ( $\pm$  SD), a P-vrijednost manja ili jednaka od 0,05 ( $P \leq 0,05$ ) određena je kao granična vrijednost statističke značajnosti. Najmanji broj replika, što je pojedinačno navedeno za svaki provedeni eksperiment unutar ovog doktorskog rada je 2. Pri obradi podataka koristila se metoda deskriptivne statistike (prosječna vrijednost, standardna devijacija). Razlike između eksperimentalnih grupa i kontrolne skupine testirane su jednosmjernom analizom varijance (one way ANOVA i post hoc testom višestrukih usporedbi (Dunnnett test ili Tukey test).

## **4. REZULTATI**

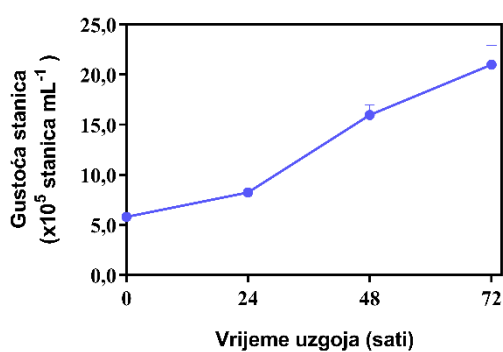
Rezultati istraživanja u sklopu izrade ovog doktorskog rada podijeljeni su u 4 dijela s obzirom na ciljeve istraživanja. Prvi dio istraživanja fokusiran je na ispitivanje utjecaja širokog raspona koncentracija ( $0,31\text{--}120,00\text{ mg L}^{-1}$ ) natrijeva selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu na rast mikroalge *D. tertiolecta*. Rezultati prvog dijela istraživanja dali su informaciju o tome koje koncentracije selenita inhibiraju rast mikroalge *D. tertiolecta*, što je odredilo koncentracijski raspon koji se koristio u sljedećoj fazi istraživanja tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu. Tijekom drugog dijela istraživanja ispitivao se utjecaj selenita na mikroalgalni rast, fotosintetsku aktivnost mikroalgi, razinu oksidativnog stresa te akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgalnoj stanici. Lipidna tjelešca unutar mikroalgalnih stanica dodatno su vizualizirana Nile Red bojom uz pomoć fluorescentnog mikroskopa. Glavni cilj drugog dijela istraživanja bio je usporediti različite pokazatelje učinkovitosti jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge kako bi se utvrdio najbolji način uzgoja za primjenu u trećoj fazi istraživanja. U trećem dijelu istraživanja dodatno se ispitivao utjecaj onih koncentracija selenita za koje je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da najviše pogoduju nakupljanju neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Također, dodatno se ispitao utjecaj koncentracije selenita od  $80,00\text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom trećeg dijela istraživanja ispitivao se utjecaj viših koncentracija selenita na mikroalgalni rast, fotosintetsku aktivnost mikroalgi, potrošnju izvora dušika, izvora fosfora i selenita u hranjivoj podlozi od strane mikroalgi kao i sastav masnih kiselina. Svojstva dobivenog biodizela izračunata su na temelju sastava masnih kiselina. Posljednji dio istraživanja uključivao je šaržni uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru s ciljem ispitivanja mogućnosti uvećanja mjerila procesa i potencijalne primjene u industriji.

#### **4.1. Testiranje algalne inhibicije pri različitim koncentracijama selenita**

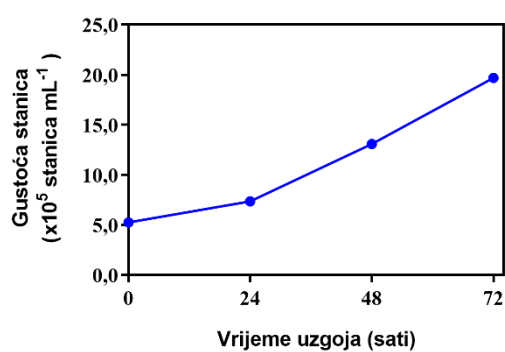
Testiranje inhibicije rasta mikroalge *D. tertiolecta* uslijed izlaganja različitim koncentracijama selenita ( $0,31\text{--}120,00\text{ mg L}^{-1}$ ) provedeno je prema standardiziranom protokolu (OECD, 2011) (poglavlje 3.4.2.). Iz krivulja rasta prikazanih na slici 5 vidljivo je da 24., 48. i 72. sat uzgoja na svim testiranim koncentracijama selenita dolazi do statistički značajnog smanjenja ( $P < 0,001$ ) optičke gustoće kulture stanica u odnosu na kontrolnu grupu ( $0,00\text{ mg L}^{-1}$  selenita). Najveći inhibitorni učinak selenita na mikroalgalni rast zabilježen je pri najvišim testiranim koncentracijama selenita. Naime, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale  $80,00\text{ mg L}^{-1}$  selenita (slika 5j), 24., 48., i 72. sat uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje optičke gustoće stanica u vrijednosti od 19,05 %, 87,24 % i 57,76 % u odnosu na kontrolu (slika 5a).

Nadalje, u istim periodima uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 100,00 mg L<sup>-1</sup>, odnosno 120,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (slika 5k i 5l) zabilježeno je statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) optičke gustoće stanica u iznosu od 23,54 %, 92,55 % i 77,86 %, odnosno 39,14 %, 93,67 % i 82,41 % u odnosu na kontrolnu grupu (slika 5a). Na temelju dobivenih rezultata inhibicije mikroalgi, u nastavku drugog dijela istraživanja odabrane su koncentracije selenita niže od 80,00 mg L<sup>-1</sup>.

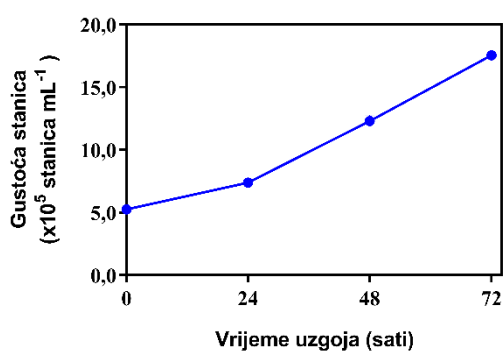
a)



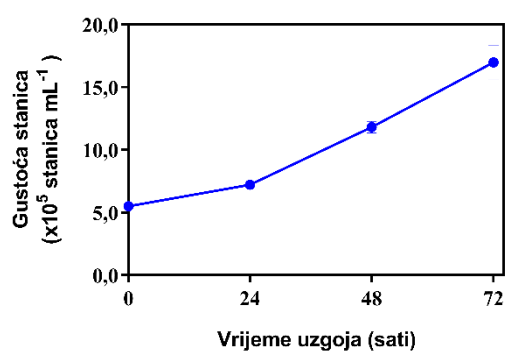
b)



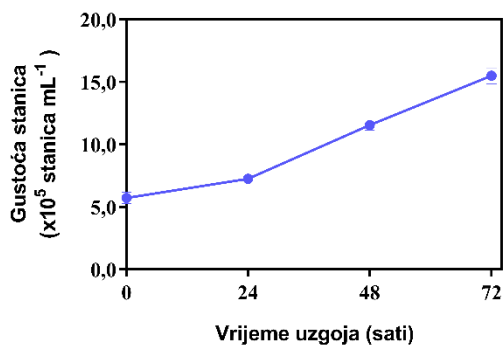
c)



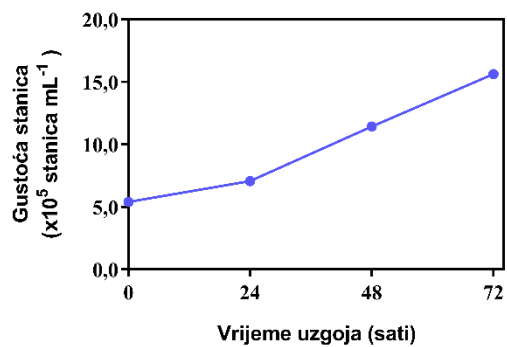
d)



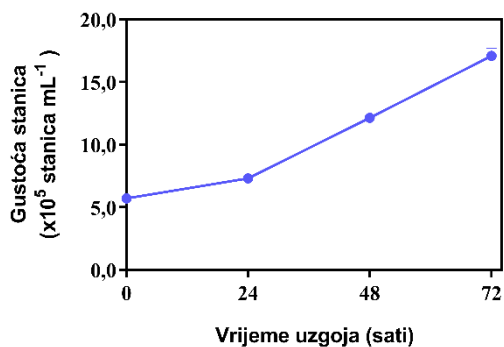
e)



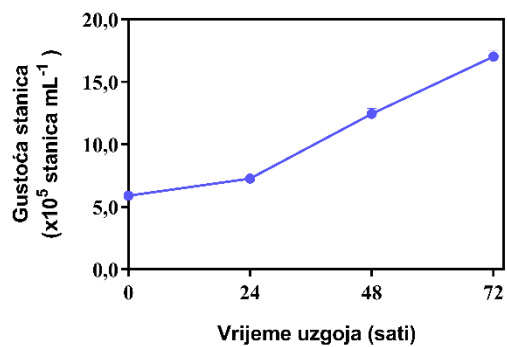
f)



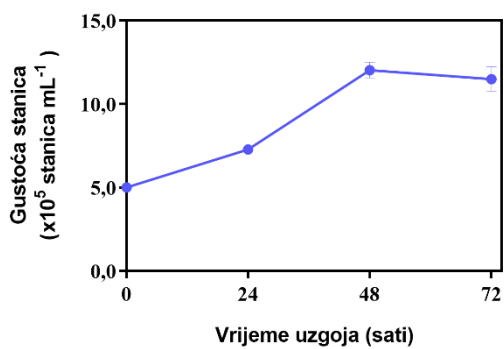
g)



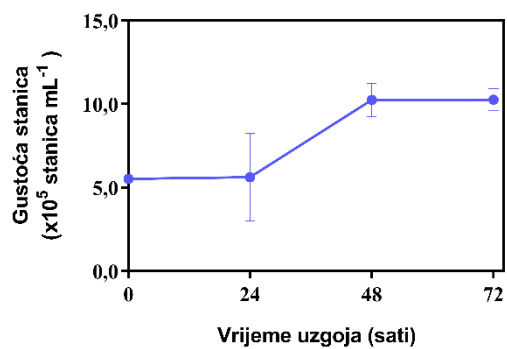
h)



i)

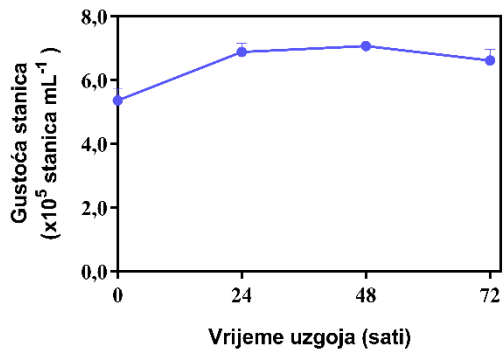


j)

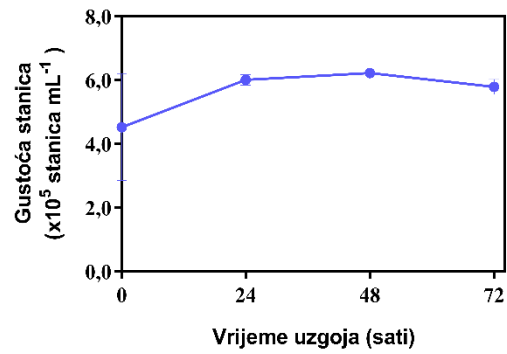




k)



l)



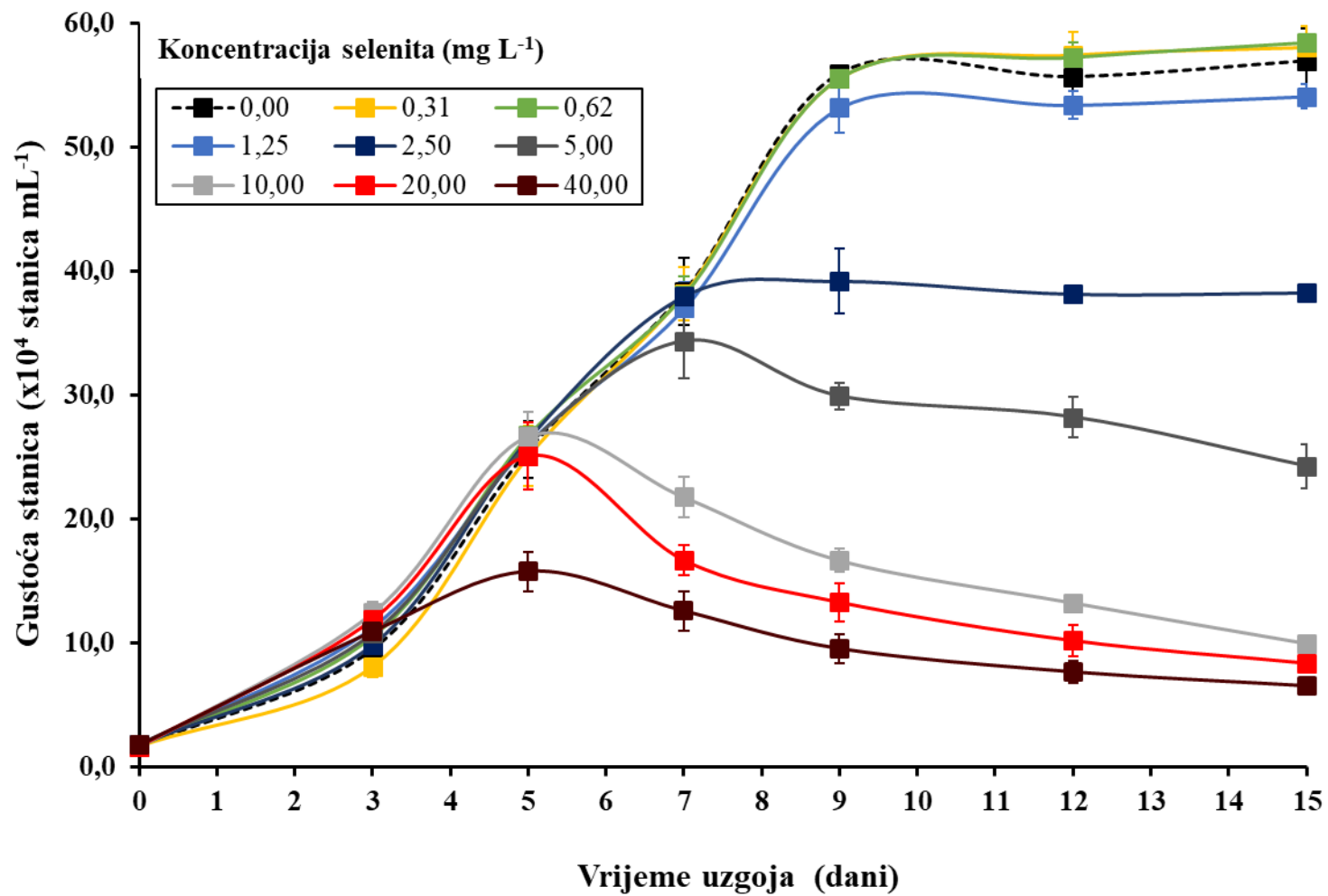
**Slika 5.** Utjecaj različitih koncentracija selenita ((a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (c) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (d) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (e) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (f) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (g) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (h) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (i) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (j) 80,00 mg L<sup>-1</sup>; (k) 100,00 mg L<sup>-1</sup>; (l) 120,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom 72 h uzgoja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata.

## **4.2. Utjecaj selenita na biokemijske i kinetičke parametre mikroalge *D. tertiolecta* tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu**

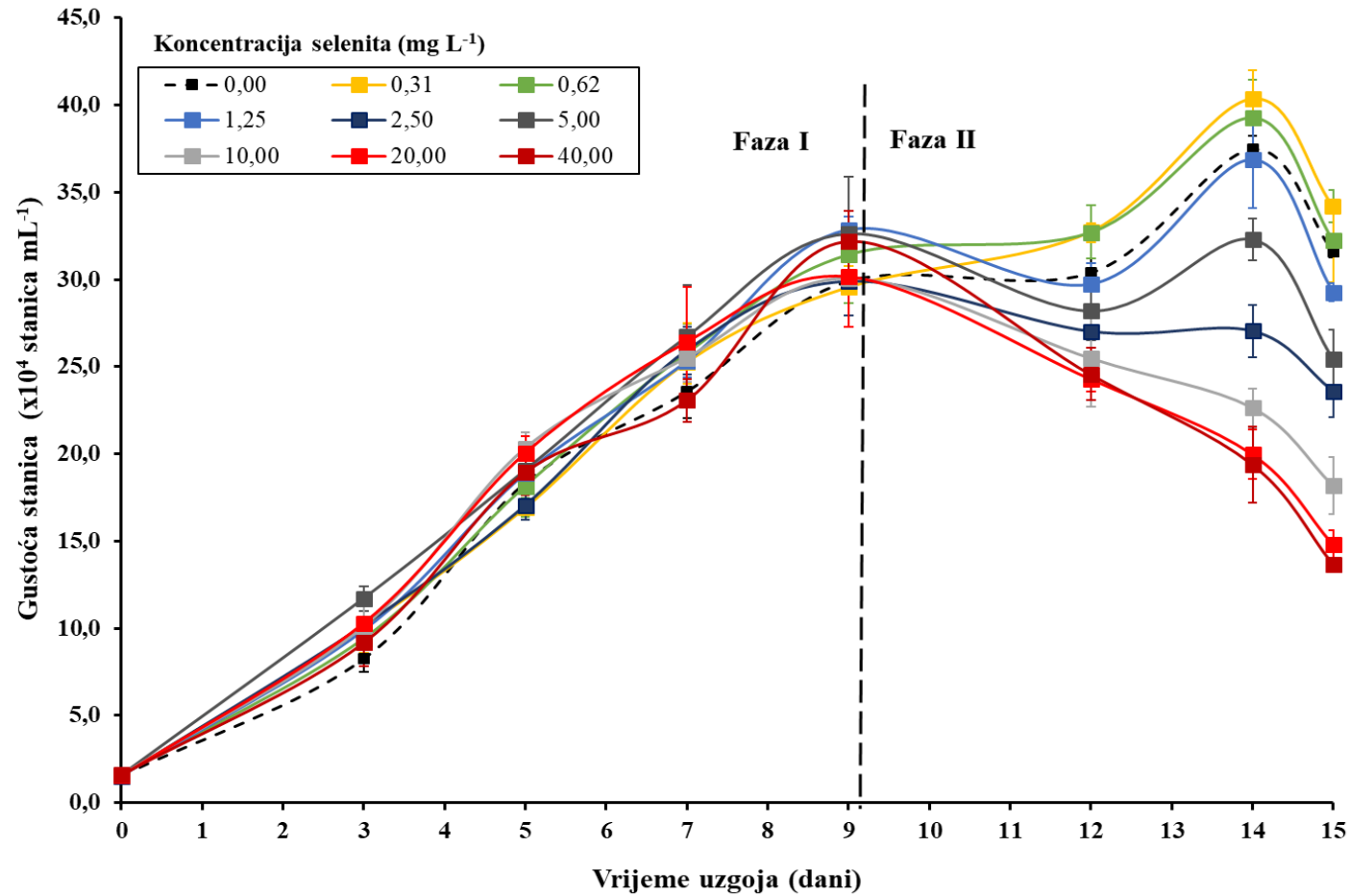
Ispitivan je utjecaj užeg raspona koncentracija selenita, odabranog na temelju rezultata prvog dijela istraživanja, na kinetičke i biokemijske parametre morske mikroalge *D. tertiolecta*. Tijekom istraživanja pratio se utjecaj različitih koncentracija selenita (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast, koncentraciju fotosintetskih pigmenata (klorofil a, klorofil b), koncentraciju karotenoida, razinu oksidativnog stresa i akumulaciju neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Utjecaj selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom oba načina uzgoja, odnosno tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog načina uzgoja (različite koncentracije selena dodane su u hranjivi medij 9. dan uzgoja) određivao se spektrofotometrijski mjerenjem optičke gustoće kulture stanica (poglavlje 3.5.1.). Koncentracija fotosintetskih pigmenata i karotenoida također se određivala spektrofotometrijskim mjerenjem nakon provedenog postupka metanolne ekstrakcije biomase mikroalgi (poglavlje 3.5.7.). Kao biomarker stresa određivala se koncentracija produkata lipidne peroksidacije koja se očitovala promjenom boje do koje dolazi prilikom povećanja koncentracije malondialdehida i drugih spojeva reaktivnih sa tiobarbiturnom kiselinom u kiselim uvjetima (poglavlje 3.5.8.). Utjecaj različitih koncentracija selenita na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* određivao se spektrofotometrijski Nile Red metodom (poglavlje 3.5.9.). Lipidna tjelešca unutar mikroalgalne stanice dodatno su vizualizirana Nile Red bojom uz pomoć fluorescentnog mikroskopa i visokotlačne živine žarulje s plavim fluorescentnim filterom kao izvorom svjetlosti (poglavlje 3.5.10.).

### **4.2.1. Utjecaj selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta***

Utjecaj kaskadnog raspona koncentracija natrijevog selenita (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast morske mikroalge *D. tertiolecta* ispitivan je tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL). Uzgoj je trajao 15 dana. Osim mjerenjem optičke gustoće kulture stanica, rast mikroalge *D. tertiolecta* prilikom izlaganja različitim koncentracijama selenita također je okarakteriziran praćenjem promjene koncentracije biomase tijekom vremena. Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta* prikazani su na slikama 6a i 6b.



**Slika 6a.** Utjecaj različitih koncentracija selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom jednostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.



**Slika 6b.** Utjecaj različitih koncentracija selenita na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL). Vrijeme dodavanja različitih koncentracija natrijevog selenita u f/2 hranjivu podlogu tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* označeno je sa isprekidanom linijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata.

Kao što je prikazano na slici 6a, tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama koje su sadržavale 10,00, odnosno 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, 3. dan uzgoja zabilježen je statistički značajan rast gustoće stanica ( $P < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (kultura mikroalge *D. tertiolecta* koja je uzgajana u f/2 hranjivoj podlozi bez dodatka selenita) u iznosu od 23,32 %, odnosno 19,79 %. Suprotno tomu, u kulturama mikroalge *D. tertiolecta* koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, 5. dan uzgoja zabilježen je značajan pad gustoće stanica ( $P < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu, dok je od 7. dana uzgoja značaj pad gustoće stanica ( $P < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu zabilježen i u kulturama mikroalge *D. tertiolecta* koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Naime, u kulturama mikroalge koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. dan uzgoja zabilježen je značajan pad gustoće stanica u iznosu od 38,34 % ( $P < 0,01$ ), dok je 7. dan uzgoja značajan pad gustoće stanica u iznosu od 43,19 % ( $P < 0,01$ ) i 56,49 % ( $P < 0,001$ ) zabilježen u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Nadalje, tijekom zadnja tri dana izuzimanja uzoraka tijekom jednostupanjskog uzgoja, (9., 12. i 15. dan uzgoja) značajan pad gustoće stanica ( $P < 0,001$ ) zabilježen je na skoro svim testiranim koncentracijama selenita, odnosno u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Zadnji, odnosno 15. dan uzgoja u kulturama mikroalge *D. tertiolecta* koje su sadržavale 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita također je zabilježen statistički značajan pad gustoće stanica ( $P < 0,001$ ) u iznosu od 32,82 %, 57,39 %, 82,40 %, 85,23 % i 88,45 %. Maksimalna vrijednost gustoće stanica ( $5,85 \times 10^5$  stanica mL<sup>-1</sup>) postignuta tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita zabilježena je u kulturi mikroalge koja je sadržavala 0,62 mg L<sup>-1</sup> selenita 1. dan uzgoja te je bila 1,06 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu.

Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (slika 6b) statistički značajan rast gustoće stanica u odnosu na kontrolnu grupu ( $P < 0,05$ ) zabilježen je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 0,31 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 14., odnosno 15. dana uzgoja u iznosu od od 7,22 %, odnosno 7,55%. Nadalje, 12. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježen je statistički značajan pad gustoće stanica ( $P < 0,01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 20,07 %, ( $P < 0,01$ ), odnosno 19,21 % ( $P < 0,01$ ). Zadnja dva dana, odnosno 14. i 15. dan uzgoja, osim u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, statistički značajan pad gustoće stanica u odnosu na kontrolnu grupu također je zabilježen i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Naime, 14. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg

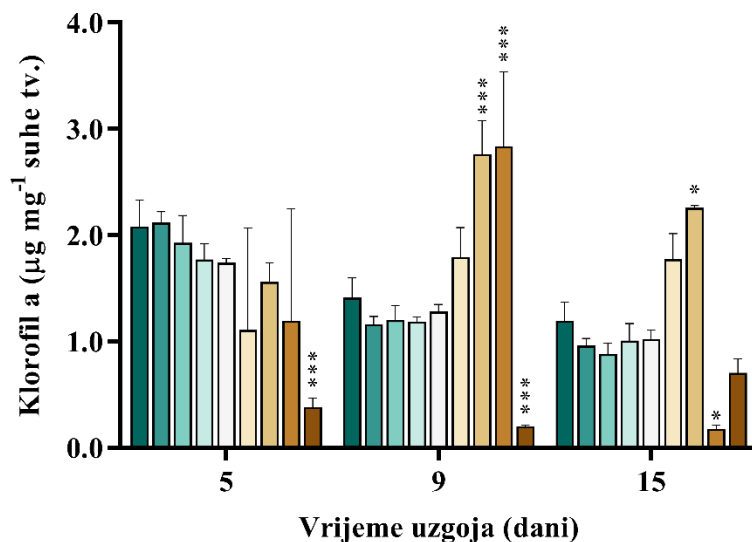
L<sup>-1</sup> selenita zabilježen je statistički značajan pad gustoće stanica u iznosu od 13,78 % ( $P < 0,05$ ), 43,90 % ( $P < 0,01$ ), 49,13 % ( $P < 0,001$ ) i 47,36 % ( $P < 0,001$ ), dok je zadnji, odnosno 15. dan uzgoja na istim testiranim koncentracijama selenita zabilježen pad gustoće stanica u iznosu od 19,49 % (5,00 mg L<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ), 46,85 % (10,00 mg L<sup>-1</sup>,  $P < 0,01$ ), 54,11 % (20,00 mg L<sup>-1</sup>,  $P < 0,001$ ) i 53,29 % (40,00 mg L<sup>-1</sup>,  $P < 0,001$ ). Nadalje, u odnosu na jednostupanjski uzgoj gdje je maksimalna gustoća stanica postignuta zadnji, odnosno 15. dan uzgoja, tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita, maksimalno postignuta vrijednost gustoće stanica u iznosu od  $4,04 \times 10^5$  stanica mL<sup>-1</sup> postignuta je jedan dan ranije, odnosno 14. dan uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi koja je sadržavala 0,31 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bila 1,08 puta veća u odnosu na kontrolu grupu.

#### **4.2.2. Utjecaj selenita na sintezu fotosintetskih pigmenata mikroalge *D. tertiolecta***

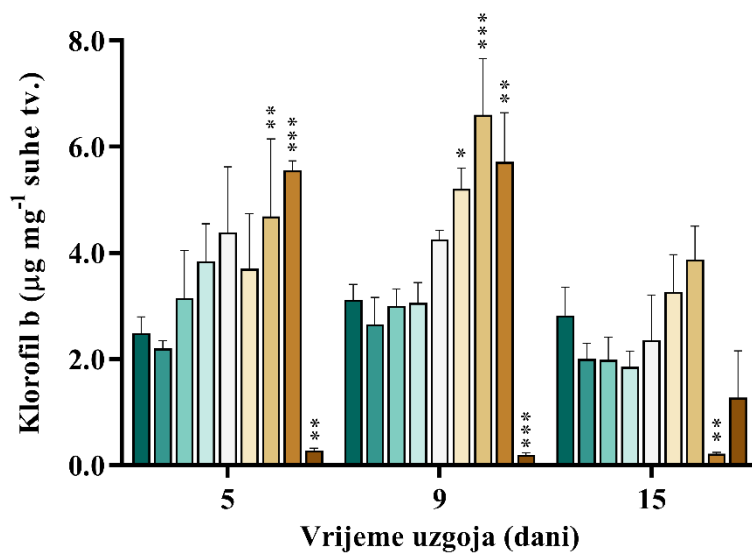
U svrhu razumijevanja utjecaja selenita na kloroplast i utvrđivanja odnosa različitih koncentracija selenita kojima je mikroalga *D. tertiolecta* izložena i mikroalgalne sposobnosti sinteze fotosintetskih pigmenata, tijekom izrade ovog doktorskog rada također je određivana i koncentracija fotosintetskih pigmenata, odnosno klorofila a i klorofila b. Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na fotosintetsku aktivnost mikroalge *D. tertiolecta*, odnosno koncentraciju klorofila a i klorofila b tijekom jednostupanjskog uzgoja prikazani su na slikama 7a i 7b.

Kao što je vidljivo iz slike 7a, tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita, testirane niske koncentracije selenita (do 5,00 mg L<sup>-1</sup>) imale su neznatan utjecaj na sintezu klorofila a. Suprotno tomu, u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale najvišu testiranu koncentraciju selenita (40,00 mg L<sup>-1</sup>), 5. i 10. dan uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila a u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 81,63 % (5. dan) i 88,09 % (10. dan). Statistički značajno smanjenje koncentracije klorofila a ( $P < 0,05$ ) u iznosu od 83,93 % također je zabilježeno zadnji dan uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Suprotno tomu, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 10. dan uzgoja ( $P < 0,001$ ) te u kulturama mikroalgi koja su sadržavale 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 15. dan uzgoja ( $P < 0,05$ ) zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije klorofila a u iznosu od 50,15 % i 48,85 % te 47,02%.

a)



b)



**Slika 7.** Koncentracija klorofila a (a) i klorofila b (b) u mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom jednostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita: (■) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (■) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (■) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (■) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (□) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (■) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (■) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (■) 20,00 mg L<sup>-1</sup> i (■) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

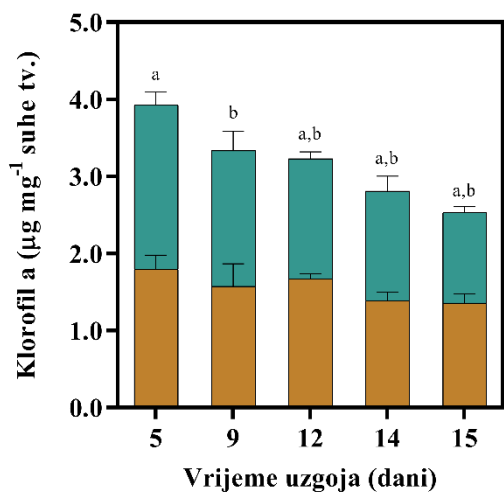
Nadalje, u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 5. dana jednostupanjskog uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila a u odnosu na ostale testirane koncentracije selenita (0,31–10,00 mg L<sup>-1</sup>). U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 10. dan jednostupanjskog uzgoja zabilježeno je statistički značajno povećanje ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila a u odnosu na kulture mikroalgi koje su sadržavale 0,31-5,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Statistički značajno povećanje koncentracije klorofila a u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u odnosu na kulture mikroalgi koje su sadržavale 0,31-2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita također je zabilježeno i zadnji dan uzgoja (podaci nisu prikazani).

Nadalje, osim koncentracije klorofila a, tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* također je određivana i koncentracija klorofila b te je utvrđeno da u kulturama mikroalgi koje sadrže više testirane koncentracije selenita (10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup>) osim povećanja koncentracije klorofila a, također dolazi i do povećanja koncentracije klorofila b. Naime, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, 5., odnosno 10. dan jednostupanjskog uzgoja, utvrđeno je statistički značajno povećanje koncentracije klorofila b u iznosu od 46,99 % ( $P < 0,01$ ) i 55,25 % ( $P < 0,001$ ), odnosno 52,83 % ( $P < 0,001$ ) i 57,69 % ( $P < 0,01$ ). U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. ( $P < 0,01$ ) i 9. dan ( $P < 0,001$ ) jednostupanjskog uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 88,99 % i 93,69%. Značajno smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na kontrolnu grupu također je zabilježeno i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zadnji dan uzgoja ( $P < 0,01$ , 54,92 %). Nadalje, 5. dan jednostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije klorofila b u odnosu na mikroalgalne kulture koje su sadržavale niže testirane koncentracije selenita (0,31 i 0,62 mg L<sup>-1</sup>). 10. dan uzgoja, osim u kulturi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, značajno povećanje koncentracije klorofila b u odnosu na kulture sa niskom koncentracijom selenita (0,31-1,25 mg L<sup>-1</sup>) također je zabilježeno i u kulturama koje su sadržavale 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Suprotno tomu, zadnji dan uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na kulture sa 2,50-10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, 5. i 9. dan jednostupanjskog uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na ostale tretmane (0,31–20,00 mg L<sup>-1</sup>).

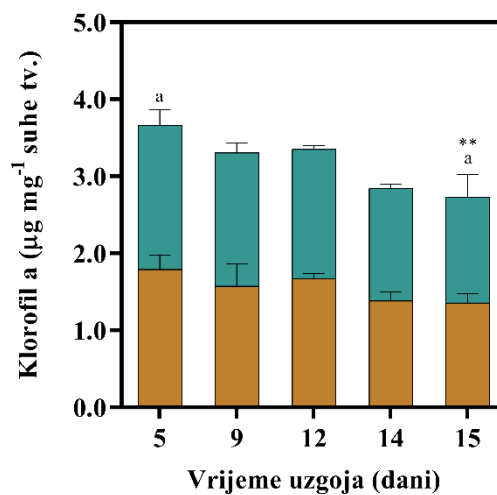


Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na fotosintetsku aktivnost mikroalge *D. tertiolecta*, odnosno koncentraciju klorofila a i klorofila b, tijekom dvostupanjskog uzgoja prikazani su na slikama 8 i 9.

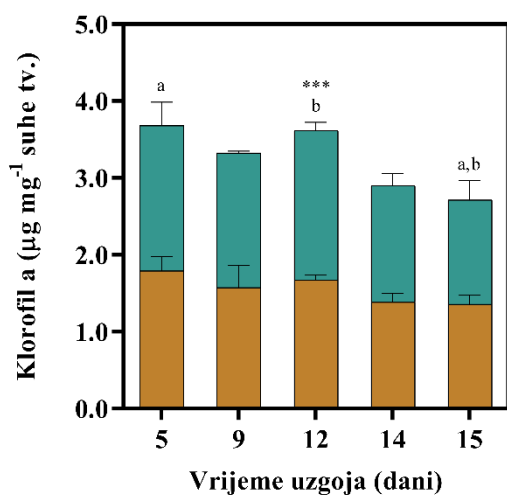
a)



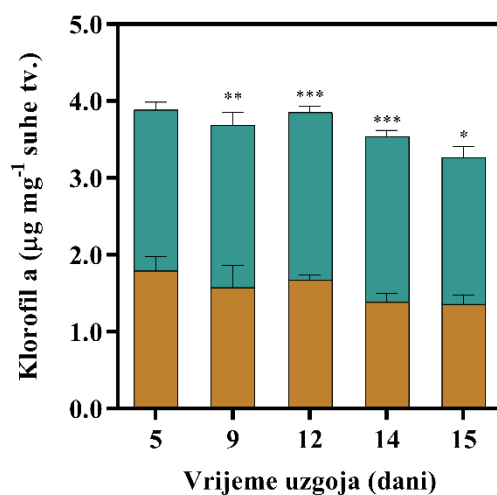
b)



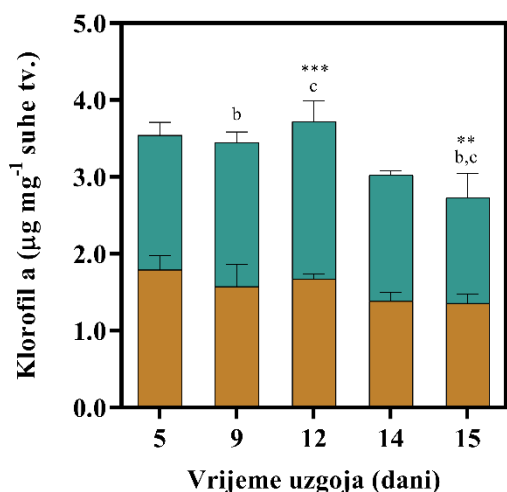
c)



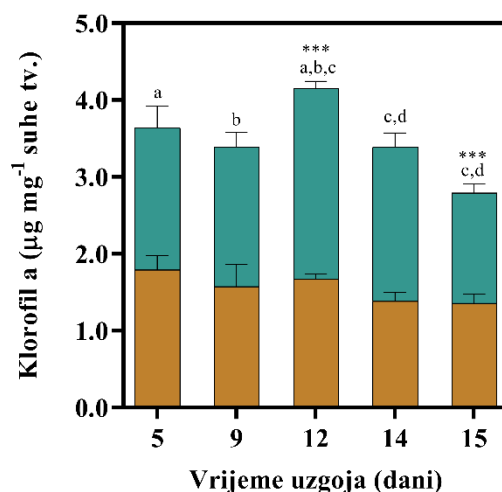
d)



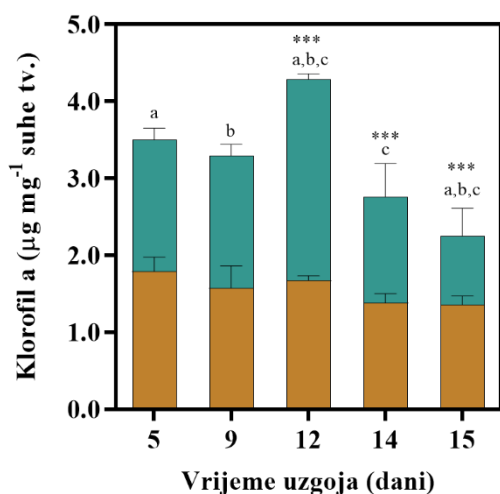
e)



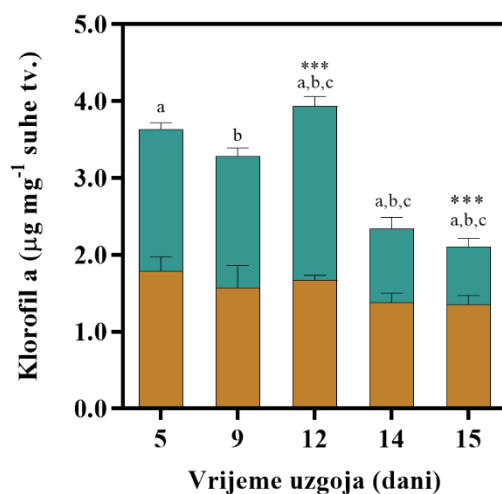
f)



g)



h)

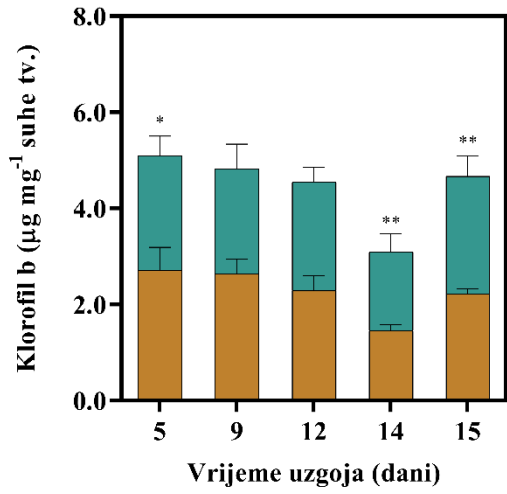


\*\*\*

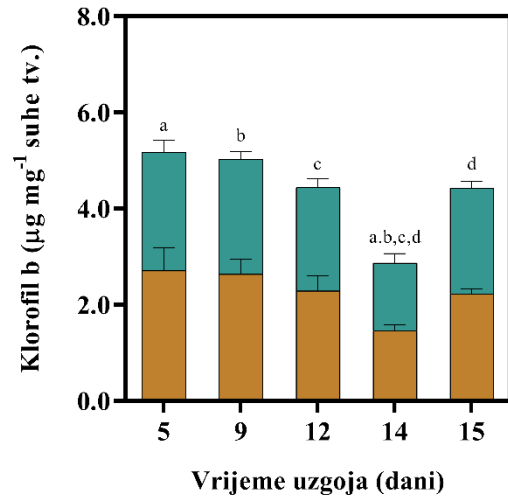
**Slika 8.** Koncentracija klorofila a u mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (b) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (c) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (d) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (e) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (f) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (g) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (h) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita (■) i kontrole (■). Statistički značajna razlika između kultura mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale različite koncentracije selenita označene su istim slovima.

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da dugotrajno izlaganje mikroalge višim koncentracijama selenita (20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) rezultira smanjenjem koncentracije oba fotosintetska pigmenta, odnosno i klorofila a i klorofila b. Statistički značajno smanjenje koncentracije klorofila a ( $P < 0,001$ ) zabilježeno je 14. i 15. dana dvostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 (14. dan (0,44 %), 15. dan (34,03 %)) i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (14. dan (31,31 %), 15. dan (44,76 %)). Suprotno tomu, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 1,25-40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 12. dan uzgoja zabilježeno je statistički značajno povećanje ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila a u iznosu od 13,82 %, 23,01 %, 18,16 %, 32,32 %, 35,90 % i 25,92 %. Zadnji, odnosno 15. dan uzgoja, statistički značajno povećanje koncentracije klorofila a u odnosu na kontrolnu grupu zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 0,84 % ( $P < 0,01$ ) i 5,25 % ( $P < 0,001$ ). Suprotno koncentraciji klorofila a, povećanje koncentracije klorofila b ( $P < 0,01$ ) zabilježeno je samo u kulturama mikroalgi koje su sadržavale najnižu testiranu koncentraciju selenita (0,31 mg L<sup>-1</sup>) predzadnji (11,38 %) i zadnji dan (8,38 %) uzgoja. U kulturama mikroalgi koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita (5,00-40,00 mg L<sup>-1</sup>) 12., 14. i 15. dan uzgoja zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije klorofila b pri čemu je najveće smanjenje ( $P < 0,001$ ) zabilježeno zadnji dan uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 (70,60 %) i 40,00 mg L<sup>-1</sup> (75,31 %) selenita. Najveća koncentracija klorofila a (2,61 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.) zabilježena je 12. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, dok je najveća koncentracija klorofila b (2,94 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.) zabilježena u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. dan uzgoja.

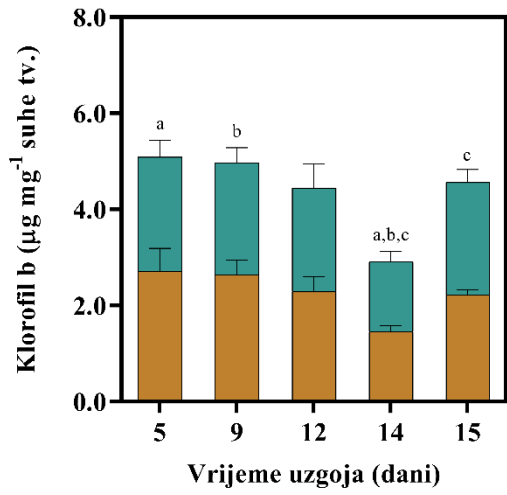
a)



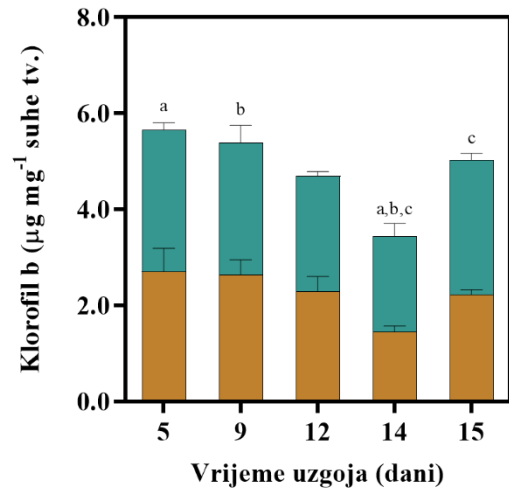
b)

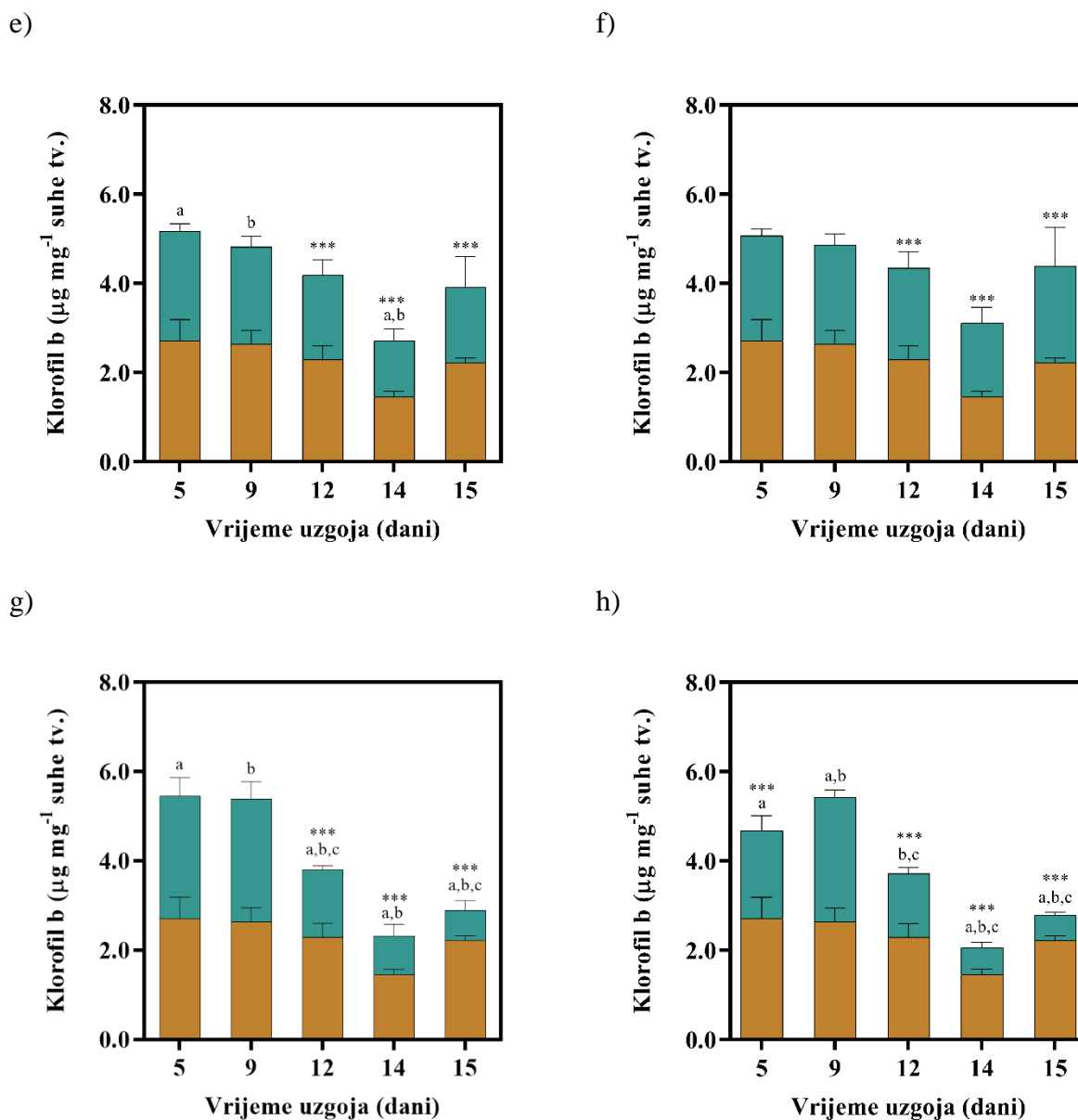


c)



d)





**Slika 9.** Koncentracija klorofila b u mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (b) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (c) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (d) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (e) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (f) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (g) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (h) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplicate (\**P*<0,05; \*\**P*<0,01; \*\*\**P*<0,001). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita (■) i kontrole (■). Statistički značajna razlika između kultura mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale različite koncentracije selenita označene su istim slovima.

Na temelju dobivenih rezultata koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofil a i klorofil b) također je izračunat njihov omjer (klorofil a/klorofil b). Povećanje omjera klorofil a/klorofil b upućuje na povećanje razine oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici i redukciju aktivnosti fotosistema II fotosintetskog sustava (Pancha i sur., 2015). Omjeri fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b) dobivenih tijekom jednostupanjskog uzgoja prikazani su u tablici 8a, dok su omjeri fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b) dobivenih tijekom dvostupanjskog uzgoja prikazani u tablici 8b. Iz rezultata omjera fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b) dobivenih tijekom jednostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (tablica 8a) vidljivo je da je tijekom 5. dana uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno statistički značajno smanjenje ( $P < 0,01$ ) omjera fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 57,7 % i 68,3 %. Suprotno tomu, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno ( $P < 0,01$ ) povećanje omjera fotosintetskih pigmenata u iznosu od 38,9 %. Nadalje, zadnji, odnosno 15. dan uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno povećanje omjera fotosintetskih pigmenata u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 51,10 % ( $P < 0,05$ ) i 58,30 % ( $P < 0,01$ ).

Iz rezultata omjera fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b) dobivenih tijekom dvostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (tablica 8b) vidljivo je da je u svim kulturama mikroalgi 10. dan uzgoja utjecaj različitih koncentracija selenita na omjere fotosintetskih pigmenata bio neznatan. Tijekom 12. i 14. dana uzgoja u kulturama mikrolagi koje su sadržavale 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno povećanje omjera fotosintetskih pigmenata i to za 34,00 %, 39,90 %, 56,98 % i 53,20 % u odnosu na kontrolnu grupu, dok je tijekom 14. dana uzgoja zabilježeno povećanje omjera u iznosu od 28,60 %, 22,77 %, 40,26 % i 39,50 %. Zadnji dan uzgoja (15. dan) značajno povećanje omjera fotosintetskih pigmenata zabilježeno je u kulturi mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 51,00 % ( $P < 0,05$ ) i 58,30 % ( $P < 0,01$ ). Nadalje, iz rezultata prikazanih u tablici 8b također se može zaključiti da su omjeri fotosintetskih pigmenata kultura mikrolagi koje sadrže 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita značajno viši u odnosu na ostale kulture mikrolagi tijekom 12., 14. i 15. dana uzgoja.

**Tablica 8.** Omjeri fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b) u mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom (a) jednostupanjskog uzgoja i (b) dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama natrijevog selenita. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrolne grupe.

a)

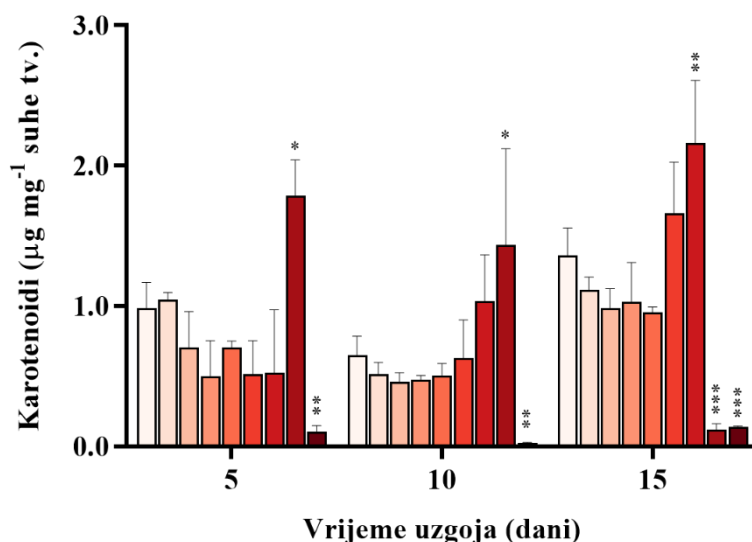
| Koncentracija selenita<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Vrijeme uzgoja (dani) |                  |                   |
|---|-----------------------|------------------|-------------------|
|   | 5                     | 9                | 15                |
| 0,00  | 0,85 $\pm$ 0,20       | 0,45 $\pm$ 0,07  | 0,43 $\pm$ 0,13   |
| 0,31  | 0,96 $\pm$ 0,07       | 0,45 $\pm$ 0,12  | 0,49 $\pm$ 0,10   |
| 0,62  | 0,64 $\pm$ 0,16       | 0,40 $\pm$ 0,06  | 0,45 $\pm$ 0,07   |
| 1,25  | 0,47 $\pm$ 0,10       | 0,39 $\pm$ 0,04  | 0,54 $\pm$ 0,01   |
| 2,50  | 0,42 $\pm$ 0,10       | 0,30 $\pm$ 0,02  | 0,47 $\pm$ 0,13   |
| 5,00  | 0,47 $\pm$ 0,16       | 0,37 $\pm$ 0,007 | 0,55 $\pm$ 0,08   |
| 10,00   | 0,36 $\pm$ 0,15**     | 0,43 $\pm$ 0,12  | 0,64 $\pm$ 0,08   |
| 20,00   | 0,27 $\pm$ 0,02**     | 0,44 $\pm$ 0,25  | 0,88 $\pm$ 0,04*  |
| 40,00   | 1,39 $\pm$ 0,11**     | 0,84 $\pm$ 0,18  | 1,03 $\pm$ 0,29** |

b)

| Koncentracija selenita<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Vrijeme uzgoja (dani) |                 |                    |                    |                    |
|---|-----------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|   | 5                     | 10              | 12                 | 14                 | 15                 |
| 0,00  | 0,68 $\pm$ 0,19       | 0,62 $\pm$ 0,16 | 0,74 $\pm$ 0,12    | 0,95 $\pm$ 0,05    | 0,61 $\pm$ 0,04    |
| 0,31  | 0,91 $\pm$ 0,13       | 0,82 $\pm$ 0,16 | 0,69 $\pm$ 0,06    | 0,88 $\pm$ 0,09    | 0,49 $\pm$ 0,07    |
| 0,62  | 0,77 $\pm$ 0,13       | 0,72 $\pm$ 0,05 | 0,78 $\pm$ 0,05    | 1,05 $\pm$ 0,13    | 0,62 $\pm$ 0,14    |
| 1,25  | 0,79 $\pm$ 0,10       | 0,76 $\pm$ 0,10 | 0,92 $\pm$ 0,16    | 1,04 $\pm$ 0,05    | 0,58 $\pm$ 0,12    |
| 2,50  | 0,71 $\pm$ 0,07       | 0,78 $\pm$ 0,14 | 0,91 $\pm$ 0,06    | 1,09 $\pm$ 0,16    | 0,68 $\pm$ 0,07    |
| 5,00  | 0,71 $\pm$ 0,02       | 0,86 $\pm$ 0,03 | 1,11 $\pm$ 0,30*   | 1,33 $\pm$ 0,22*   | 0,85 $\pm$ 0,17    |
| 10,00   | 0,78 $\pm$ 0,07       | 0,81 $\pm$ 0,04 | 1,23 $\pm$ 0,16*** | 1,23 $\pm$ 0,14    | 0,73 $\pm$ 0,27    |
| 20,00   | 0,64 $\pm$ 0,14       | 0,64 $\pm$ 0,13 | 1,72 $\pm$ 0,09*** | 1,59 $\pm$ 0,04*** | 1,35 $\pm$ 0,09*** |
| 40,00   | 0,96 $\pm$ 0,18       | 0,62 $\pm$ 0,07 | 1,58 $\pm$ 0,05*** | 1,57 $\pm$ 0,07*** | 1,36 $\pm$ 0,03*** |

### 4.2.3. Utjecaj selenita na sintezu karotenoida mikroalge *D. tertiolecta*

U svrhu razumijevanja utjecaja selenita na sintezu ukupnih karotenoida u stanici mikroalga *D. tertiolecta* tijekom izlaganja različitim koncentracijama natrijevog selenita, tijekom izrade ovog doktorskog rada također je određivana i koncentracija ukupnih karotenoida. Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na sintezu karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja prikazani su na slikama 10 i 11.

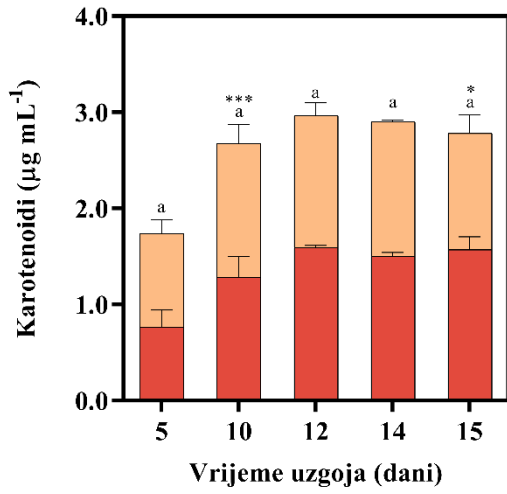


**Slika 10.** Koncentracija ukupnih karotenoida u mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom jednostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita: (□) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (◻) 20,00 mg L<sup>-1</sup> i (◻) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrolne grupe.

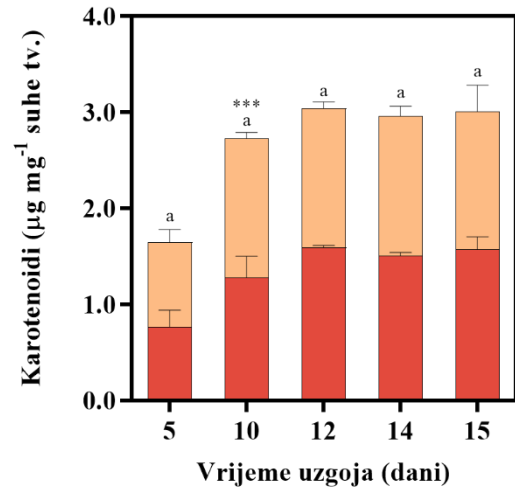
Iz rezultata prikazanih na slici 10 i na slici 11 može se zaključiti da je tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita zabilježen i stimulativni i inhibitorni učinak selenita na sintezu ukupnih karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u iznosu od 44,06 % ( $P < 0,05$ ) zabilježeno je 5. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita.



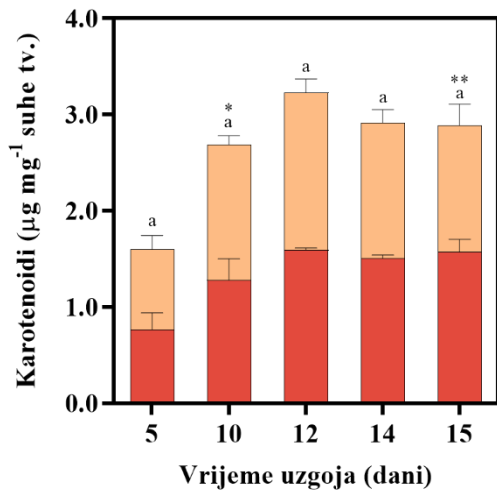
a)



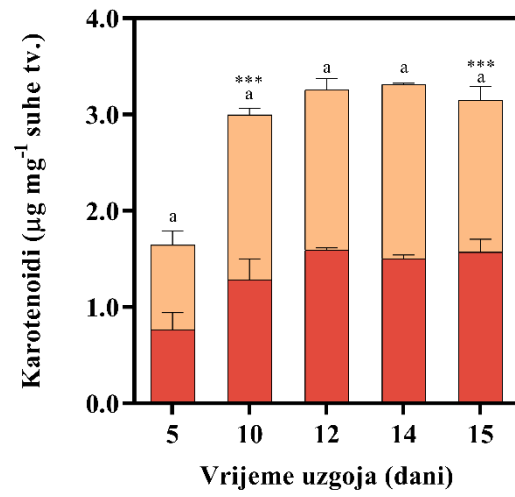
b)

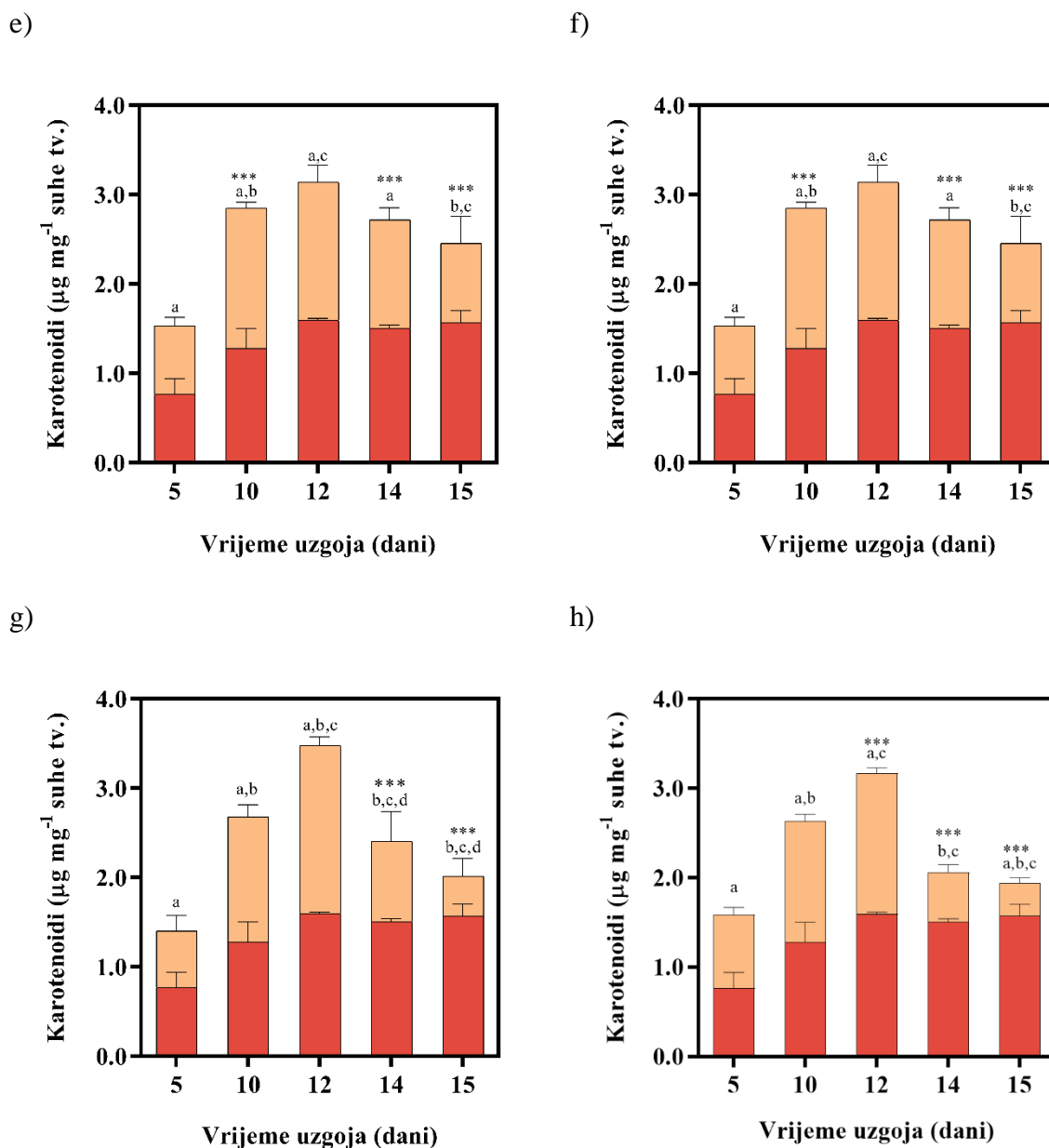


c)



d)





**Slika 11.** Koncentracija ukupnih karotenoida u mikroalgi *Dunaliella tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,31 mg L<sup>-1</sup>; (b) 0,62 mg L<sup>-1</sup>; (c) 1,25 mg L<sup>-1</sup>; (d) 2,50 mg L<sup>-1</sup>; (e) 5,00 mg L<sup>-1</sup>; (f) 10,00 mg L<sup>-1</sup>; (g) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (h) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\**P*<0.05; \*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita (□) i kontrole (■). Statistički značajna razlika između kultura mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale različite koncentracije selenita označene su istim slovima.

Tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja stimulatívni učinak selenita na sintezu ukupnih karotenoida zabilježen je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 0,31, 0,62, 1,25, 2,50, 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita i to odmah slijedeći dan po dodatku selena, odnosno 10. dan uzgoja. Naime, tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima sa 0,31, 0,62, 1,25, 2,50, 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 8,11 % ( $P < 0,001$ ), 11,27 % ( $P < 0,001$ ), 21,66 % ( $P < 0,05$ ), 25,11 % ( $P < 0,001$ ), 18,02 % ( $P < 0,001$ ) i 14,88 % ( $P < 0,001$ ). U svim narednim danima uzorkovanja (11., 12., 14. i 15. dan) dvostupanjskog uzgoja zabilježen je inhibitorni učinak selenita na sintezu ukupnih karotenoida u stanici. Naime, već 12. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statističko značajno smanjenje koncentracije karotenoida ( $P < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 1,05 %. U istoj kulturi mikroalgi tijekom 14., odnosno 15. dana uzgoja zabilježena je sve niža koncentracija karotenoida, odnosno zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije karotenoida u iznosu od 62,83 % ( $P < 0,001$ ), odnosno 76,35 % ( $P < 0,001$ ). Osim u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida također je bilo vidljivo i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00, 10,00, odnosno 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 14. i 15. dana uzgoja. Naime, 14. dan uzgoja u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 5,00, 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida u iznosu od 19,32 % ( $P < 0,001$ ), 8,47 % ( $P < 0,001$ ), odnosno 40,05 % ( $P < 0,001$ ), dok je 15. dan uzgoja na istim testiranim koncentracijama selenita zabilježeno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida u iznosu od 43,85 % ( $P < 0,001$ ), 50,62 % ( $P < 0,001$ ) i 71,72 % ( $P < 0,001$ ). Zadnji dan, odnosno 15. dan uzgoja statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida također je bilo vidljivo i u kulturi koja je sadržavala 1,25 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 16,06 % ( $P < 0,05$ ).

Nadalje, iz rezultata dvostupanjskog uzgoja također je vidljivo da je u kulturama mikroalgi koje sadrže 0,31, 0,62, 1,25 i 2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 10., 11., 12., 14. i 15. dana uzgoja zabilježeno statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na 5. dan uzgoja. U kulturama mikroalgi koje sadrže više testirane koncentracije selenita, odnosno 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na 5. dan uzgoja bilo je vidljivo tijekom 10., 12 i 14. dana uzgoja, dok je u kulturama mikroalgi koje sadrže najviše testirane koncentracije selenita, odnosno 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na 5. dan uzgoja bilo vidljivo

samo tijekom 10. i 12. dana uzgoja. Naime, u kulturi mikrolagi koje sadrže 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 15. dan uzgoja zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu 5. dan uzgoja.

Tijekom jednostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* pri niskim koncentracijama selenita (0,31–5,00 mg L<sup>-1</sup>), utjecaj selena na koncentraciju ukupnih karotenoida u mikroalgalnoj stanici bio je zanemariv. Suprotno tomu, 5. i 10. dan jednostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 45,10 % ( $P < 0,001$ ) i 54,72 % ( $P < 0,05$ ). Značajno povećanje ( $P < 0,01$ ) koncentracije ukupnih karotenoida također je zabilježeno i u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 37,03 % zadnji dan jednostupanjskog uzgoja. Značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita kroz sva tri dana uzorkovanja i analiza. Naime, u kulturama mikrolagi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 5., 10., odnosno 15. dan uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 89,28 % ( $P < 0,01$ ), 96,16 %, ( $P < 0,01$ ) odnosno 89,54 % ( $P < 0,001$ ). Osim u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida također je zabilježeno zadnji dan uzgoja u kulturama koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (91,35 %,  $P < 0,01$ ). Iz rezultata prikazanih na slici 10 također je vidljivo da je tijekom jednostupanjskog uzgoja pri 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno statistički značajno povećanje ukupnih karotenoida u odnosu na ostale tretmane (0,31–5,00 mg L<sup>-1</sup>).

Osim omjera fotosintetskih pigmenata (klorofil a / klorofil b), na povećanje razine oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici i redukciju aktivnosti fotosistema II fotosintetskog sustava također upućuje i omjer ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila (ukupni sadržaj karotenoida/ (klorofil a+klorofil b) (Pancha i sur., 2015). Omjeri ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila dobivenih tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja prikazani su u tablici 9a,b. Iz rezultata omjera ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila u mikrolagi *D. tertiolecta* dobivenih tijekom jednostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita može se zaključiti da je tijekom 5. i 9. dana uzgoja statistički značajno ( $P < 0,001$ ) smanjenje omjera u odnosu na kontrolnu grupu zabilježeno samo u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 20,00 % i 73,3 %. Suprotno tomu, tijekom 15. dana jednostupanskog uzgoja u kulturama mikrolgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita dolazi do statistički značajnog rasta ( $P < 0,05$ ) omjera ukupni sadržaj karotenoida/ukupni sadržaj klorofila u iznosu od 17,10 %.

Nadalje, iz rezultata se također može vidjeti da je 5. i 15. dana uzgoja u kulturi mikroalgi koja sadrži 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježen statistički značajan rast ovog omjera u odnosu na ostale tretmane (0,62 – 10,00 mg L<sup>-1</sup>). Zadnji, 15. dan uzgoja, osim u kulturama mikroalgi koje sadrže 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, značajan rast omjera ( $P < 0.001$ ) u odnosu na druge kulture (0,31–10,00 mg L<sup>-1</sup>) također je zabilježen pri 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Nadalje, iz rezultata ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila u mikrolagi *D. tertiolecta* dobivenih tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge na različitim koncentracijama selenita može se vidjeti da je tijekom 5. i 10. dana uzgoja utjecaj različitih koncentracija selenita na ovaj omjer neznatan. Suprotno tomu, u kulturama mikroalgi koje sadrže 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježen je statistički značajan pad omjera ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila u odnosu na kontrolnu grupu. Iz rezultata prikazanih u tablici 9b također se može zaključiti da tijekom svih dana praćenja uzgoja na svim testiranim koncentracijama selenita dolazi do statistički značajnog povećanja omjera ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila u odnosu na 5. dan uzgoja, odnosno tijekom trajanja 1. faze dvostupanjskog uzgoja.

**Tablica 9.** Omjeri ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila (ukupni sadržaj karotenoida/(klorofil a + klorofil b)) u mikrolagi *D. tertiolecta* tijekom (a) jednostupanjskog uzgoja i (b) dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama natrijevog selenita. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrolne grupe.

a)

| Koncentracija selenita (mg L <sup>-1</sup> ) | Vrijeme uzgoja (dani)          |                                |                                |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|  | 5                              | 9                              | 15                             |
| 0,00   | 0,21 $\pm$ 0,04                | 0,15 $\pm$ 0,03                | 0,34 $\pm$ 0,07                |
| 0,31   | 0,24 $\pm$ 0,004               | 0,14 $\pm$ 0,03                | 0,38 $\pm$ 0,06                |
| 0,62   | 0,14 $\pm$ 0,05                | 0,11 $\pm$ 0,02                | 0,35 $\pm$ 0,02                |
| 1,25   | 0,09 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>   | 0,11 $\pm$ 0,01                | 0,36 $\pm$ 0,04                |
| 2,50   | 0,07 $\pm$ 0,06                | 0,10 $\pm$ 0,01                | 0,29 $\pm$ 0,06                |
| 5,00   | 0,09 $\pm$ 0,02                | 0,25 $\pm$ 0,06                | 0,33 $\pm$ 0,01                |
| 10,00  | 0,04 $\pm$ 0,05                | 0,11 $\pm$ 0,04                | 0,41 $\pm$ 0,03 <sup>*</sup>   |
| 20,00  | 0,36 $\pm$ 0,41                | 0,11 $\pm$ 0,08                | 0,28 $\pm$ 0,06 <sup>***</sup> |
| 40,00  | 0,17 $\pm$ 0,08 <sup>***</sup> | 0,04 $\pm$ 0,01 <sup>***</sup> | 0,04 $\pm$ 0,04 <sup>***</sup> |

b)

| Koncentracija selenita<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Vrijeme uzgoja (dani) |             |              |               |                |
|---|-----------------------|-------------|--------------|---------------|----------------|
|   | 5                     | 10          | 12           | 14            | 15             |
| <b>0,00</b>                                     | 0,17 ± 0,05           | 0,30 ± 0,05 | +0,40 ± 0,02 | 0,53 ± 0,03   | 0,43 ± 0,04    |
| <b>0,31</b>                                     | 0,22 ± 0,04           | 0,36 ± 0,07 | 0,36 ± 0,05  | 0,47 ± 0,07   | 0,34 ± 0,08    |
| <b>0,62</b>                                     | 0,20 ± 0,02           | 0,35 ± 0,01 | 0,38 ± 0,01  | 0,51 ± 0,007  | 0,40 ± 0,04    |
| <b>1,25</b>                                     | 0,19 ± 0,02           | 0,34 ± 0,05 | 0,41 ± 0,07  | 0,48 ± 0,03   | 0,36 ± 0,02    |
| <b>2,50</b>                                     | 0,17 ± 0,03           | 0,35 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02  | 0,44 ± 0,03   | 0,34 ± 0,02*   |
| <b>5,00</b>                                     | 0,18 ± 0,01           | 0,39 ± 0,03 | 0,39 ± 0,05  | 0,42 ± 0,001  | 0,29 ± 0,008   |
| <b>10,00</b>                                    | 0,19 ± 0,01           | 0,37 ± 0,01 | 0,40 ± 0,02  | 0,38 ± 0,02   | 0,22 ± 0,05    |
| <b>20,00</b>                                    | 0,14 ± 0,05           | 0,31 ± 0,04 | 0,45 ± 0,01  | 0,39 ± 0,03   | 0,28 ± 0,03*** |
| <b>40,00</b>                                    | 0,21 ± 0,03           | 0,30 ± 0,02 | 0,43 ± 0,01  | 0,36 ± 0,01** | 0,28 ± 0,01*** |

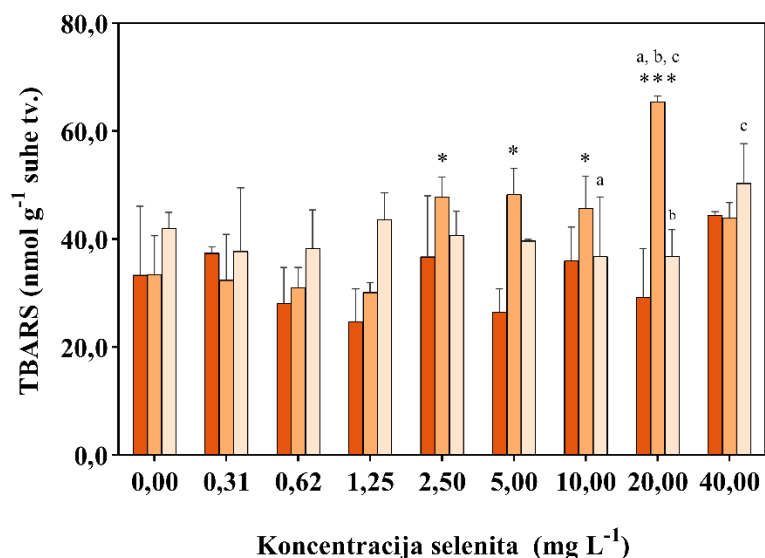
#### 4.2.4. Utjecaj selenita na razinu oksidativnog stresa u kulturi mikroalge *D. tertiolecta*

U svrhu kvantifikacije razine oksidativnog stresa u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita tijekom oba načina uzgoja, određena je koncentracija produkata lipidne peroksidacije (Pancha i sur., 2015). Lipidna peroksidacija očitovala se promjenom boje do koje dolazi prilikom povećanja koncentracije MDA i drugih spojeva reaktivnih sa TBA u kiselim uvjetima. Rezultati razine oksidativnog stresa u stanicama mikroalge *D. tertiolecta* uslijed izlaganja različitim koncentracijama selenita tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja prikazani su na slikama 12 i 13.

Kao što se može vidjeti iz slike 12 tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* pri koncentracijama selenita od 2,50, 5,00, 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> tijekom 9. dana uzgoja došlo je do statistički značajnog povećanja udjela TBARS-a u iznosu od 30,04 % ( $P < 0,05$ ), 30,75 % ( $P < 0,05$ ), 26,89 % ( $P < 0,05$ ) i 48,89 % ( $P < 0,001$ ). Nadalje, u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 9. dan uzgoja također je zabilježeno statistički značajno povećanje udjela TBARS-a u iznosu od 55,31 % u odnosu na 5. dan uzgoja ( $P < 0,001$ ). Zadnji dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajano smanjenje udjela TBARS-a u iznosu od 43,67 % ( $P < 0,001$ ) u odnosu na 9. dan uzgoja.

Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama obogaćenim različitim koncentracijama selenita statistički značajno povećanja udjela TBARS-a zabilježeno je tijekom 14. i zadnjeg, odnosno 15. dana uzgoja (slika 13d i e). Naime, 14. dan uzgoja statistički značajno povećanje udjela TBARS-a zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale koncentracije selenita od 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> u iznosu od 61,72% ( $P < 0,001$ ) i 45,53 % ( $P < 0,01$ ).

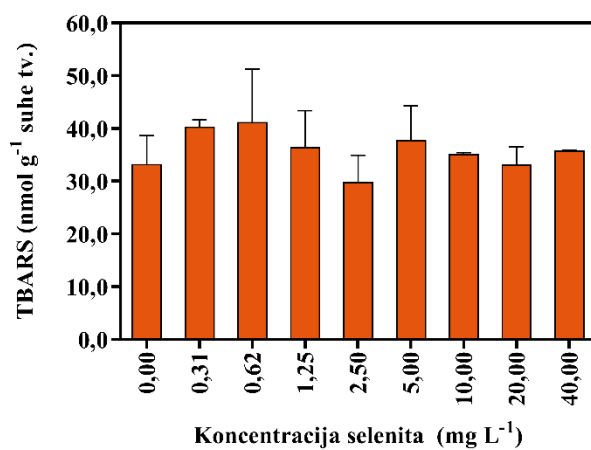




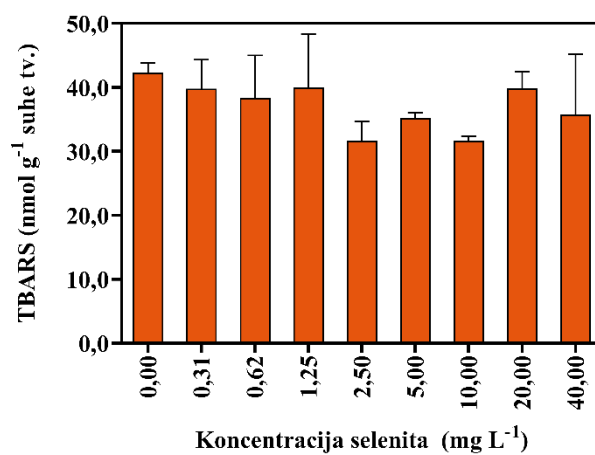
**Slika 12.** Spojevi reaktivni sa tiobarbiturnom kiselinom (TBARS) u mikroalgi *D. tertiolecta* izloženoj različitim koncentracijama selenita tijekom 5. (■), 9. (□) i 15. dana (▤) jednostupanjskog uzgoja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). Zvijezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrolne grupe.

Tijekom zadnjeg, odnosno 15. dana uzgoja, osim u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, do povećanja udjela TBARS-a također je došlo u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 2,50, 5,00 i 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Naime, tijekom uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* u f/2 podlogama koje su bile obogaćene selenitom u koncentracijama od 2,50, 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> došlo je do statistički značajnog povećanja udjela TBARS-a u iznosu od 1,88 % ( $P < 0,05$ ), 35,32 % ( $P < 0,05$ ), 40,43 % ( $P < 0,05$ ), 35,49 % ( $P < 0,001$ ) i 43,19 % ( $P < 0,001$ ). Nadalje, tijekom 5. i 10. dana dvostupanjskog uzgoja nije zabilježena statistički značajna razlika u udjelu TBARSa između tretmana. Suprotno tomu, tijekom 12. dana uzgoja u kulturi mikrolagi koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježen je statistički značajan rast udjela TBARS-a (slika 13c) u odnosu na ostale tretmane u iznosu od 36,46 % (0,31 mg L<sup>-1</sup>), 45,60 % (0,62 mg L<sup>-1</sup>), 43,74 % (1,25 mg L<sup>-1</sup>), 39,30 % (2,50 mg L<sup>-1</sup>) 31,17 % (5,00 mg L<sup>-1</sup>), 37,93 % (10,00 mg L<sup>-1</sup>), 21,50 % (20,00 mg L<sup>-1</sup>).

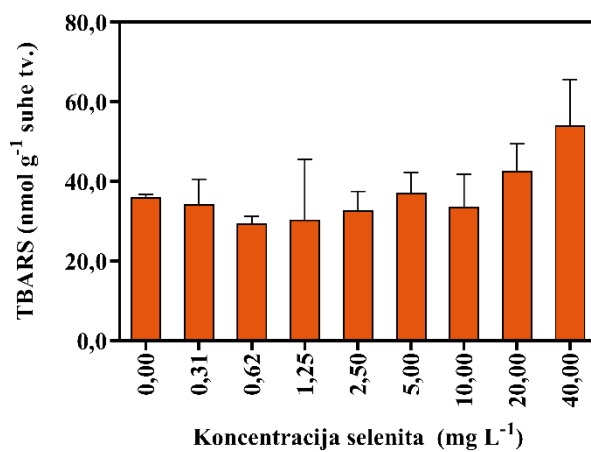
a)



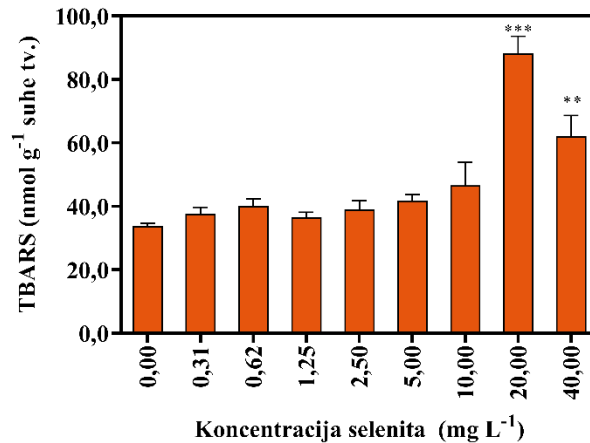
b)



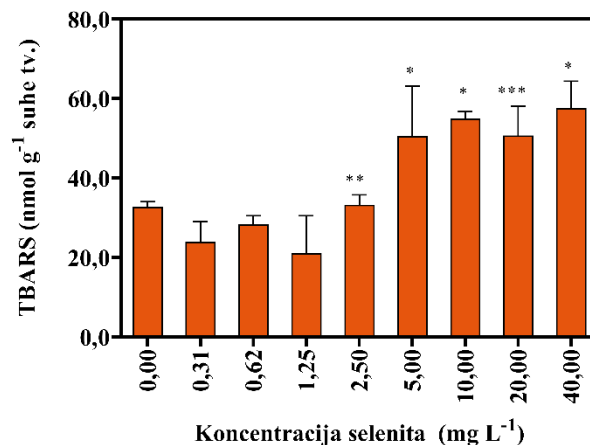
c)



e)



f)



**Slika 13.** Koncentracija tiobarbiturnih reaktivnih tvari (TBARS) u mikroalgi *D. tertiolecta* izloženoj različitim koncentracijama selenita tijekom dvostupanjskog uzgoja: (a) 5. dan; (b) 10. dan; (c) 12. dan; (d) 14. dan; (e) 15. dan. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD triplikata (\* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i kontrolne grupe.

Predzadnji dan uzgoja, osim u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, statistički značajan rast udjela TBARS-a u odnosu na ostale tretmane (0,31 mg L<sup>-1</sup>, 0,62 mg L<sup>-1</sup>, 1,25 mg L<sup>-1</sup>, 2,50 mg L<sup>-1</sup>, 5,00 mg L<sup>-1</sup>, 10,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježen je i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Zadnji dan uzgoja statistički značajan rast ( $P < 0,001$ ) u odnosu na ostale tretmane (0,31 mg L<sup>-1</sup>, 0,62 mg L<sup>-1</sup>, 1,25 mg L<sup>-1</sup>) zabilježen je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00, 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Maksimalna vrijednost udjela TBARS-a postignuta tijekom jednostupanjskog uzgoja u iznosu 53,55 nmol TBARS g<sup>-1</sup>

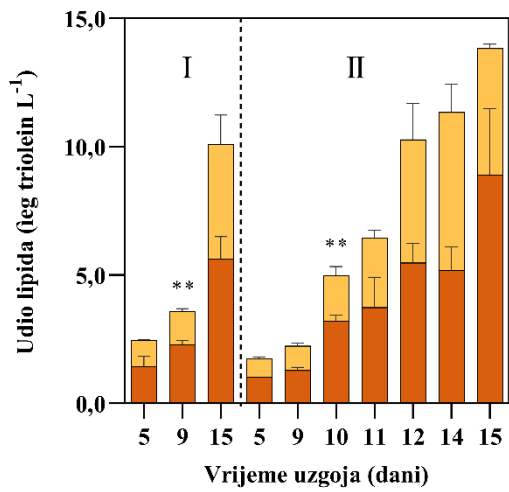
suhe tvari postignuta je 9. dan uzgoja u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Maksimalna vrijednost udjela TBARS-a tijekom dvostupanjskog uzgoja postignuta je 14. dan uzgoja, također u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te je iznosila 81,59 nmol TBARS g<sup>-1</sup> suhe tvari.

#### **4.2.5. Utjecaj selenita na sintezu neutralnih lipida u kulturi mikroalge *D. tertiolecta***

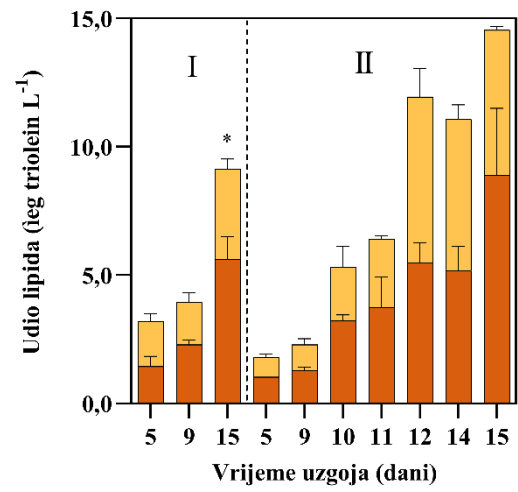
Tijekom izrade ovog doktorskog rada Nile Red metoda uspješno je implementirana u svrhu detekcije i kvantifikacije neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita. Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na razinu neutralnih lipida u stanicima mikroalge *D. tertiolecta* tijekom jednostupanjskog (I) i dvostupanjskog (II) uzgoja prikazani su na slici 14.

Tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu zabilježeno je u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. i 9. dan uzgoja u iznosu od 34,21 % ( $P < 0,05$ ), odnosno 58,43 % ( $P < 0,001$ ). Osim u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida u iznosu od 32,37 % ( $P < 0,05$ ) također je zabilježeno i pri 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 9. dan jednostupanjskog uzgoja. Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu zabilježeno je u kulturama mikrolagi koje su sadržavale 2,50, 5,00, 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 10., 11., 12. i 14. dan uzgoja. Maksimalne vrijednosti povećanja udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* postignuto je u kulturi mikrolagi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 11., 12. odnosno 14. dana uzgoja u iznosu od 81,62 % ( $P < 0,001$ ), 77,95 % ( $P < 0,001$ ), odnosno 82,54 % ( $P < 0,01$ ). Statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida tijekom dvostupanjskog uzgoja u iznosu od 76,53 % ( $P < 0,001$ ) također je postignuto u kulturi mikroalge koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja. Tijekom zadnjeg, odnosno 15. dana uzgoja povećanje udjela neutralnih lipida u stanicima mikroalge *D. tertiolecta* zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 2,50 (40,32 %,  $P < 0,05$ ), 5,00 (55,23 %,  $P < 0,001$ ), 10,00 (41,92 %,  $P < 0,05$ ), 20,00 (48,57 %,  $P < 0,05$ ) i 40,00 mg L<sup>-1</sup> (44,29 %,  $P < 0,001$ ).

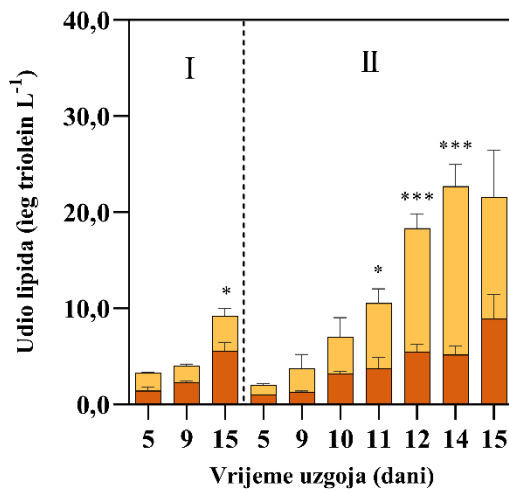
a)



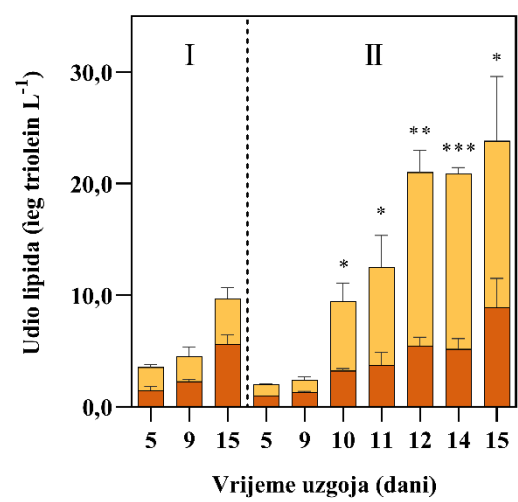
b)



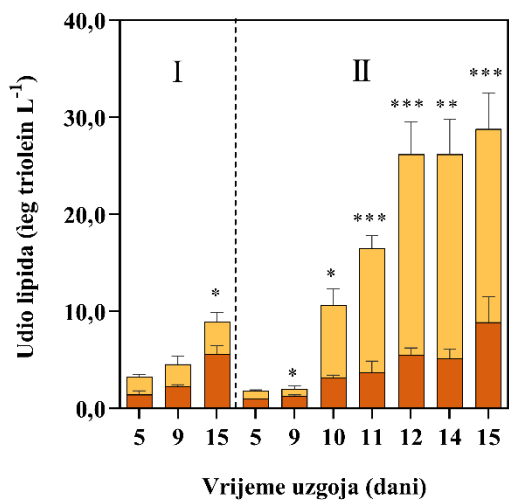
c)



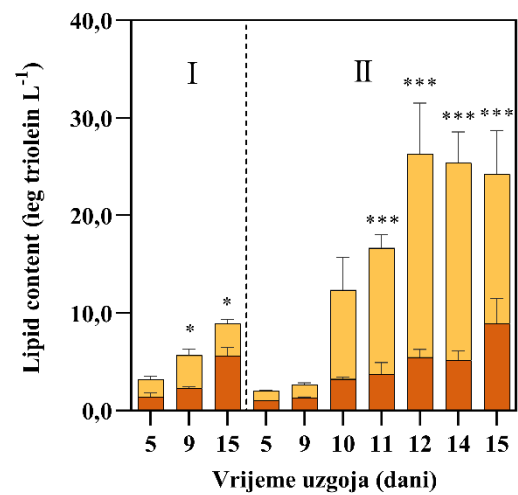
d)



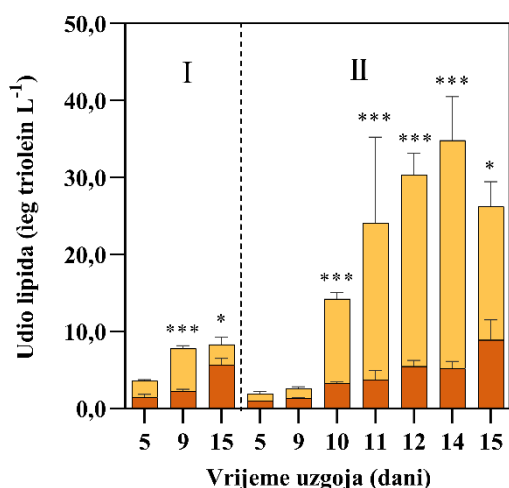
e)



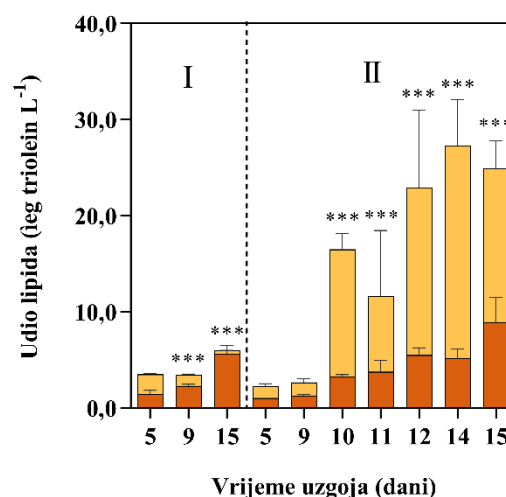
f)



g)



h)



**Slika 14.** Udio neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita tijekom jednostupanjskog (I) i dvostupanjskog uzgoja (II): a) 0,31 mg L<sup>-1</sup>, b) 0,62 mg L<sup>-1</sup>, c) 1,25 mg L<sup>-1</sup>, d) 2,50 mg L<sup>-1</sup>, e) 5,00 mg L<sup>-1</sup>, f) 10,00 mg L<sup>-1</sup>, g) 20,00 mg L<sup>-1</sup>, h) 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triplicate (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). Zvezdice označavaju statistički značajnu razliku između tretmana (■) i kontrolne grupe (■).

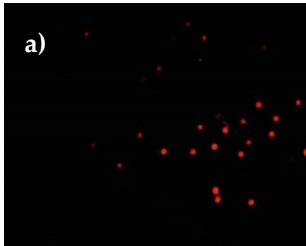
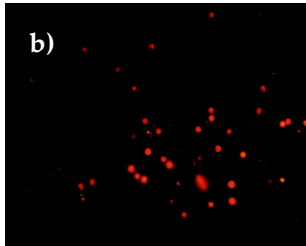
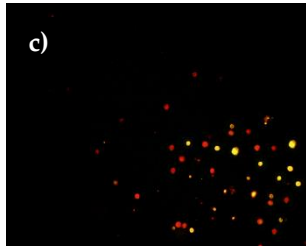
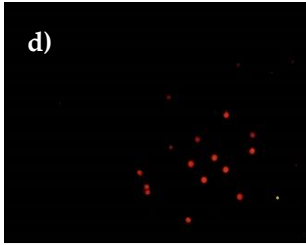
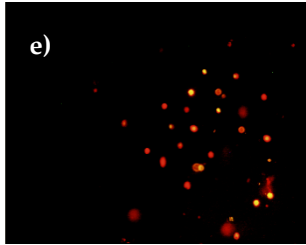
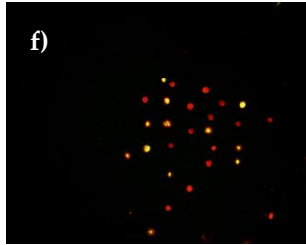
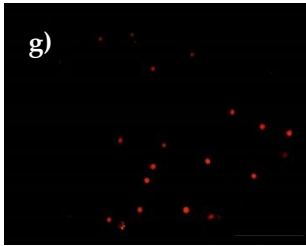
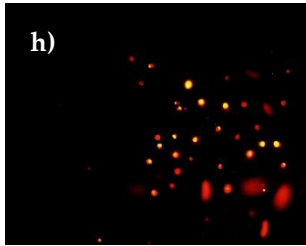
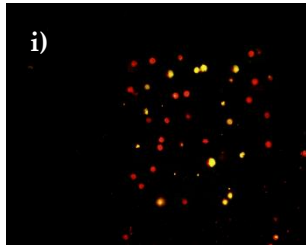
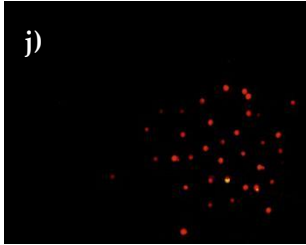
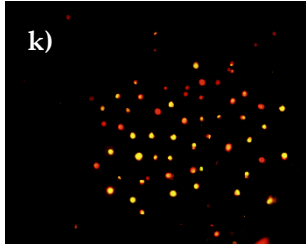
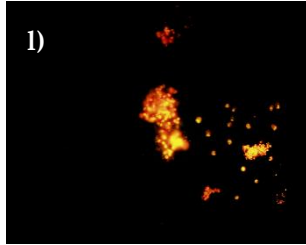
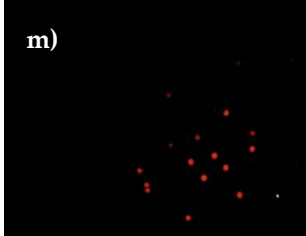
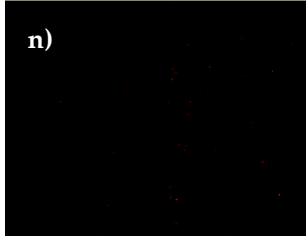

Iz rezultata je također vidljivo da tijekom jednostupanjskog uzgoja u svim kulturama mikroalgi (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) zadnji dan uzgoja dolazi do statistički značajnog povećanja udjela neutralnih lipida u odnosu na 5. dan uzgoja. Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u skoro svim kulturama mikroalgi (1,25–40,00 mg L<sup>-1</sup>) tijekom 12., 14. i 15. dana uzgoja zabilježeno je statistički značajno ( $P < 0,001$ ) povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na 5. dan uzgoja. Iznimka su kulture mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale najniže testirane koncentracije selenita (0,31 i 0,62 mg L<sup>-1</sup>) u kojima nije zabilježena statistički značajna razlika udjela neutralnih lipida između pojedinih dana uzgoja. Maksimalna vrijednost udjela neutralnih lipida (5,48 µg triolein L<sup>-1</sup>) dobivena tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita dobivena je 9. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bila 2,40 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu. Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* maksimalna vrijednost udjela neutralnih lipida (29,63 µg triolein L<sup>-1</sup>) postignuta je 14. dana uzgoja (5. dan uzgoja nakon dodavanja različitih koncentracija selenita u f/2 hranjivu podlogu) u kulturi mikroalge koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> te je bila 5,37 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu. Usporedbom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim

koncentracijama selenita može se zaključiti da je najveći udio neutralnih lipida postignut tijekom dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja. Također, maksimalna vrijednost udjela neutralnih lipida postignuta tijekom dvostupanjskog uzgoja bila je 5,40 puta veća u odnosu na maksimalnu vrijednost udjela neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* postignutu tijekom jednostupanjskog uzgoja.

#### **4.2.6. Fluorescentna mikroskopija neutralnih lipida mikroalge *D. tertiolecta* tijekom izlaganja različitim koncentracijama selenita**

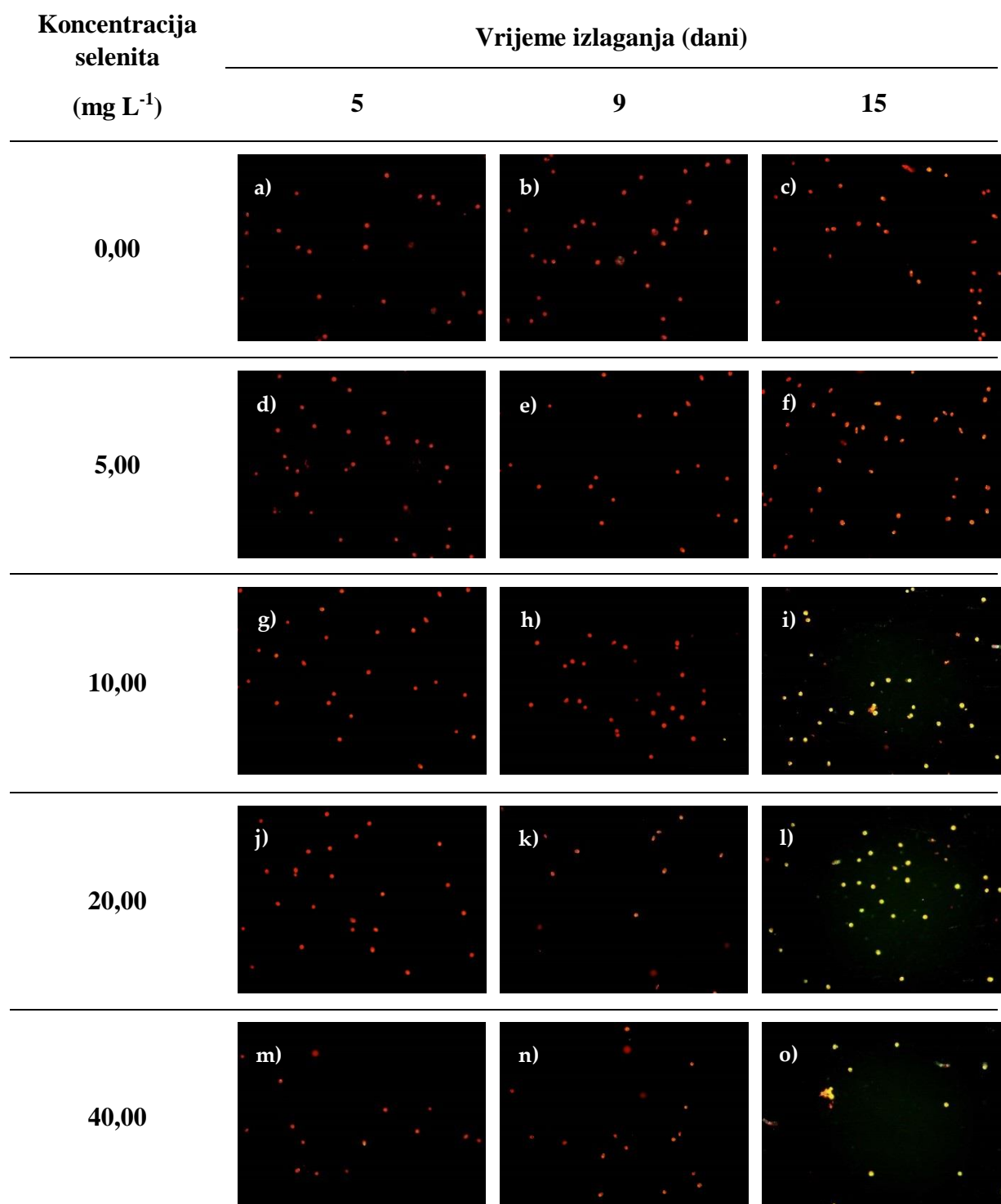
U svrhu vizualizacije neutralnih lipida unutar mikroalgarnih stanica obojanih Nile Red bojom korištena je tehnika fluorescentne mikroskopije. Na temelju dobivenih mikroskopskih slika kulture mikroalge *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja može se zaključiti da je udio neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* ovisan o koncentraciji selenita kojoj je mikroalga izložena. Naime, na temelju mikroskopskih slika prikazanih na slici 15 može se zaključiti da su 5. dan jednostupanjskog uzgoja na svim testiranim koncentracijama selenita mikroalgalne stanice uglavnom bile crveno obojane što upućuje na činjenicu da 5. dana jednostupanjskog uzgoja sinteza lipida u mikroalgarnim stanicama još nije započela. Nadalje, u odnosu na 5. dan, tijekom 9. dana jednostupanjskog uzgoja mikroalgalne stanice tretirane različitim koncentracijama selenita sadržavale su brojne lipidne mješinice neutralnih lipida obojanih žutom bojom (slika 15I (b, e, h, k, n)). Također, na temelju mikroskopskih slika može se zaključiti da se povišenjem koncentracije selenita povećava i broj te veličina citoplazmatskih lipidnih mješinica u stanici. Najveći broj i najveća veličina lipidnih mješinica tijekom jednostupanjskog uzgoja vidljivi su 9. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (slika 15I (k)). Zadnji, odnosno 15. dan jednostupanjskog uzgoja vidljivo je smanjenje broja i veličine lipidnih mješinica u svim kulturama mikroalgi. Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita, 5. i 9. dana uzgoja (faza dvostupanjskog uzgoja prije dodavanja različitih koncentracija selenita u medij) mikroalgalne stanice uglavnom su bile obojane crvenom bojom (slika 15II (a, b, d, e, g, h, j, k, m, n)). Nadalje, na temelju mikroskopskih slika može se zaključiti da je najveći broj žuto obojanih lipidnih mješinica vidljiv 15. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (slika 15II, l).

l)

| Koncentracija<br>selenita<br>(mg L <sup>-1</sup> ) | Vrijeme izlaganja (dani)  |  |   |
|--|---|--|---|
|  | 5   | 9  | 15  |
| 0,00   |    |    |    |
| 5,00   |    |    |    |
| 10,00  |   |   |   |
| 20,00  |  |  |  |
| 40,00  |  |  |  |



II)



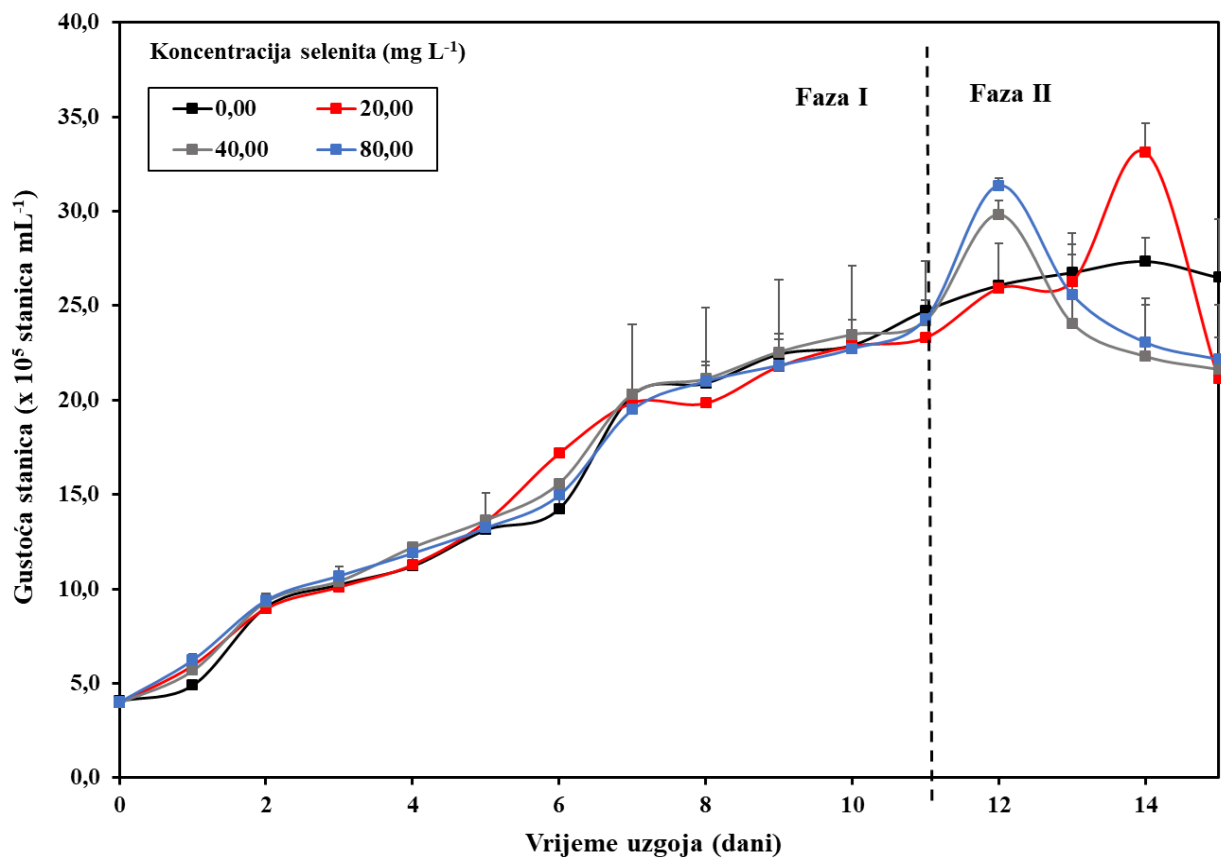
**Slika 15.** Slike fluorescentne mikroskopije lipida mikroalge *D. tertiolecta* obojanih Nile Red bojom. Mikroalga *D. tertiolecta* izložena je različitim koncentracijama selenita tijekom (a) jednostupanjskog i (b) dvostupanjskog uzgoja. Mikroalgalne stanice obojane su crvenom bojom, dok su intracelularne lipidne mješine obojane žutom bojom. Povećanje=40 puta.

### **4.3. Utjecaj selenita na biokemijske i kinetičke parametre mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L)**

U trećem dijelu ovog doktorskog rada prikazani su rezultati istraživanja dodatnog ispitivanja utjecaja onih koncentracija natrijevog selenita za koje je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da najviše pogoduju nakupljanju neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Ispitivan je utjecaj viših koncentracija natrijevog selenita (20,00, 40,00, 80,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast, koncentraciju fotosintetskih pigmenata (klorofil a, klorofil b), koncentraciju karotenoida te sintezu neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Nadalje, određene su koncentracije nitrata, fosfata i selenita zaostalih u hranjivoj podlozi nakon provedenih uzgoja. Metodom plinske kromatografije određen je sastav masnih kiselina. Iz sastava masnih kiselina, primjenom različitih empirijskih formula, dodatno su izračunata svojstva dobivenog biodizela. Osim koncentracije selenita od 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, dodatno je ispitivan i utjecaj koncentracije selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup>. U odnosu na prethodno istraživanje, uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u ovom dijelu doktorskog rada proveden je u većem mjerilu, odnosno u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L koje su sadržavale 1,4 L hranjive podloge te je utjecaj viših koncentracija natrijevog selenita ispitivan kroz 15 dana uzgoja.

#### **4.3.1. Utjecaj viših koncentracija natrijevog selenita na rast morske mikroalge *D. tertiolecta***

U ovom dijelu doktorskog rada ispitivan je utjecaj viših koncentracija natrijevog selenita (10,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast morske mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu, odnosno u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L koje su sadržavale 1,4 L volumena. Uzgoj je trajao 15 dana pri sljedećim uvjetima: konstantno osvjetljenje od 7000 lux-a, temperatura od 25±1 °C te pH-vrijednost od 6.80±0.2. Različite ispitivane koncentracije natrijevog selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) dodane su u f/2 podlogu na početku druge faze dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta*, odnosno nakon što su stanice mikroalgi dostignule ranu stacionarnu fazu rasta, što je evidentirano 11. dan uzgoja. Na slici 3. (poglavlje 3.4.4.) prikazan je izgled kultura, dok su na slici 14. prikazane krivulje rasta mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama natrijevog selenita (0,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>).



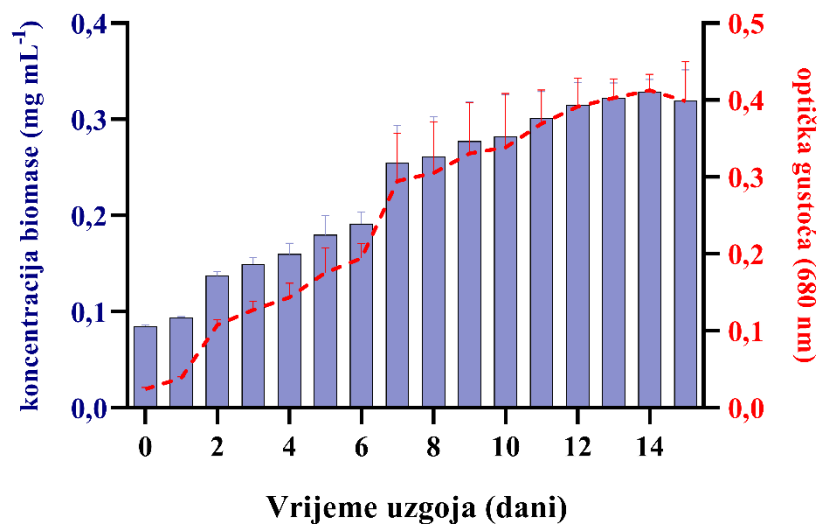
**Slika 16.** Dvostupanjski uzgoj morske mikroalge *Dunaliella tertiolecta* u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim testiranim koncentracijama selenita (0,00; 20,00; 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) tijekom 15 dana uzgoja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

Prema rezultatima vidljivima iz slike 16 može se zaključiti da je 12. i 14. dan dvostupanjskog uzgoja, odnosno 1. i 3. dan izlaganja mikroalge *D. tertiolecta* različitim koncentracijama selenita, zabilježeno statistički značajno povećanje gustoće stanica u odnosu na kontrolnu grupu. Naime, u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (12. dan) gustoća stanica se povećala za 16,85 % ( $P < 0.01$ ), dok se u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita gustoća stanica povećala za 17,47 % ( $P < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu (14. dan). Suprotno tomu, pri 40,00 mg L<sup>-1</sup> i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno smanjenje gustoće stanica tijekom 14. (40,00 mg L<sup>-1</sup>–18,45 % ( $P < 0,05$ ); 80,00 mg L<sup>-1</sup>–15,68 % ( $P < 0.05$ )) i 15. dana uzgoja (40,00 mg L<sup>-1</sup>–18,41 % ( $P < 0,05$ ); 80,00 mg L<sup>-1</sup>–16,39 % ( $P < 0,05$ )) u odnosu na kontrolnu grupu. Zadnji, odnosno 15. dan uzgoja statistički značajno smanjenje gustoće stanica također je zabilježeno pri 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 20,20 % ( $P < 0,01$ ).

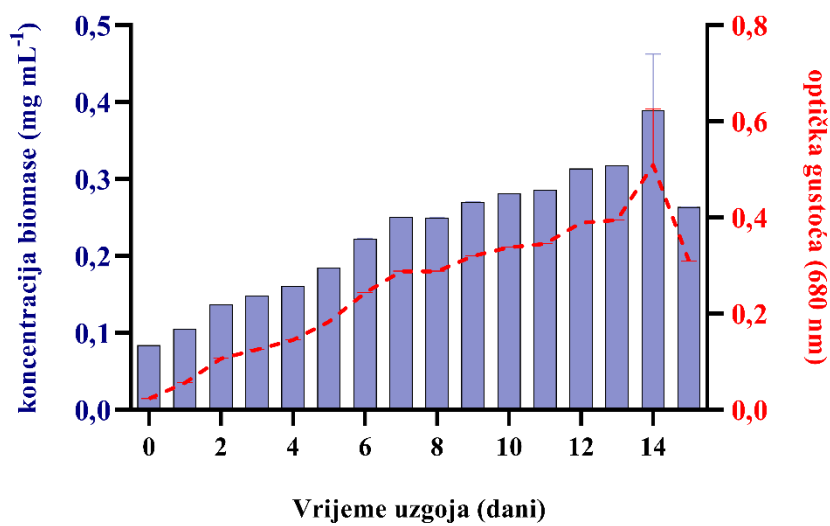
Rast mikroalge u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita također je okarakteriziran praćenjem promjene koncentracije suhe tvari biomase tijekom vremena (slika 17). Gravimetrijskom metodom određena je koncentracija suhe tvari biomase na temelju koje je izračunata i produktivnost sinteze biomase ( $Pr_x$ ; mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) za svaku kulturu mikroalge *D. tertiolecta*. Osim toga, iz krivulje rasta izračunate su i specifične brzine rasta ( $\mu$ ; dan<sup>-1</sup>) (tablica 10).

Kao što je prikazano na slici 17, na svim testiranim koncentracijama selenita (0,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) od 3. dana pa do kraja uzgoja zabilježen je statistički značajan rast koncentracije suhe tvari biomase u odnosu na početni dan uzgoja. Najveća koncentracija suhe tvari biomase postignuta je 14. dan dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bila 1,19 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu. Iz rezultata se također može zaključiti da je vrijednost maksimalno postignute koncentracije suhe tvari biomase (20,00 mg L<sup>-1</sup>; 14. dan uzgoja) značajno veća u odnosu na vrijednosti postignute 14. dan uzgoja u ostalim tretmanima (40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita).

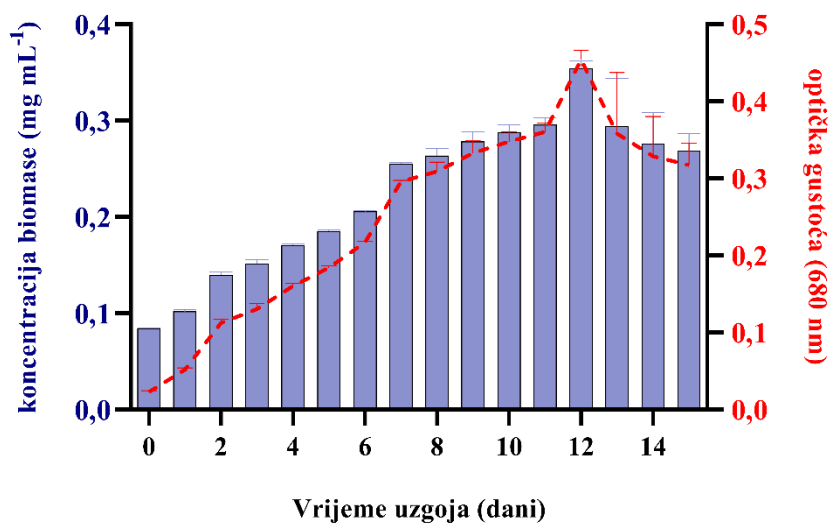
a)



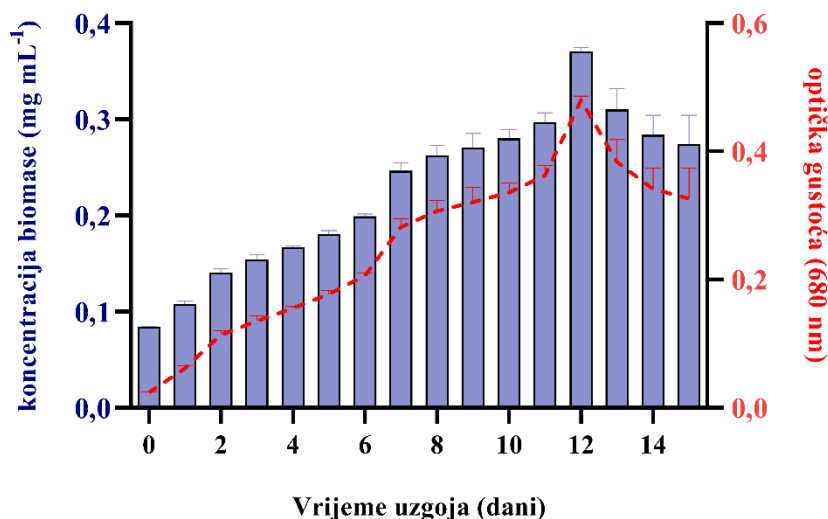
b)



c)



d)



**Slika 17.** Promjena koncentracije suhe tvari biomase i optičke gustoće mikrolge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

Iz rezultata prikazanih u tablici 10. može se zaključiti da su najveće vrijednosti koncentracije biomase (0,39 g L<sup>-1</sup>), produktivnosti sinteze biomase (27,86 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) i specifične brzine rasta (0,103 dan<sup>-1</sup>) postignute u kulturi mikrolagi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja.

**Tablica 10.** Koncentracija biomase ( $X$ ; g L<sup>-1</sup>), produktivnost sinteze biomase ( $Pr_x$ ; mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>) i specifična brzina rasta ( $\mu$ ; dan<sup>-1</sup>) mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

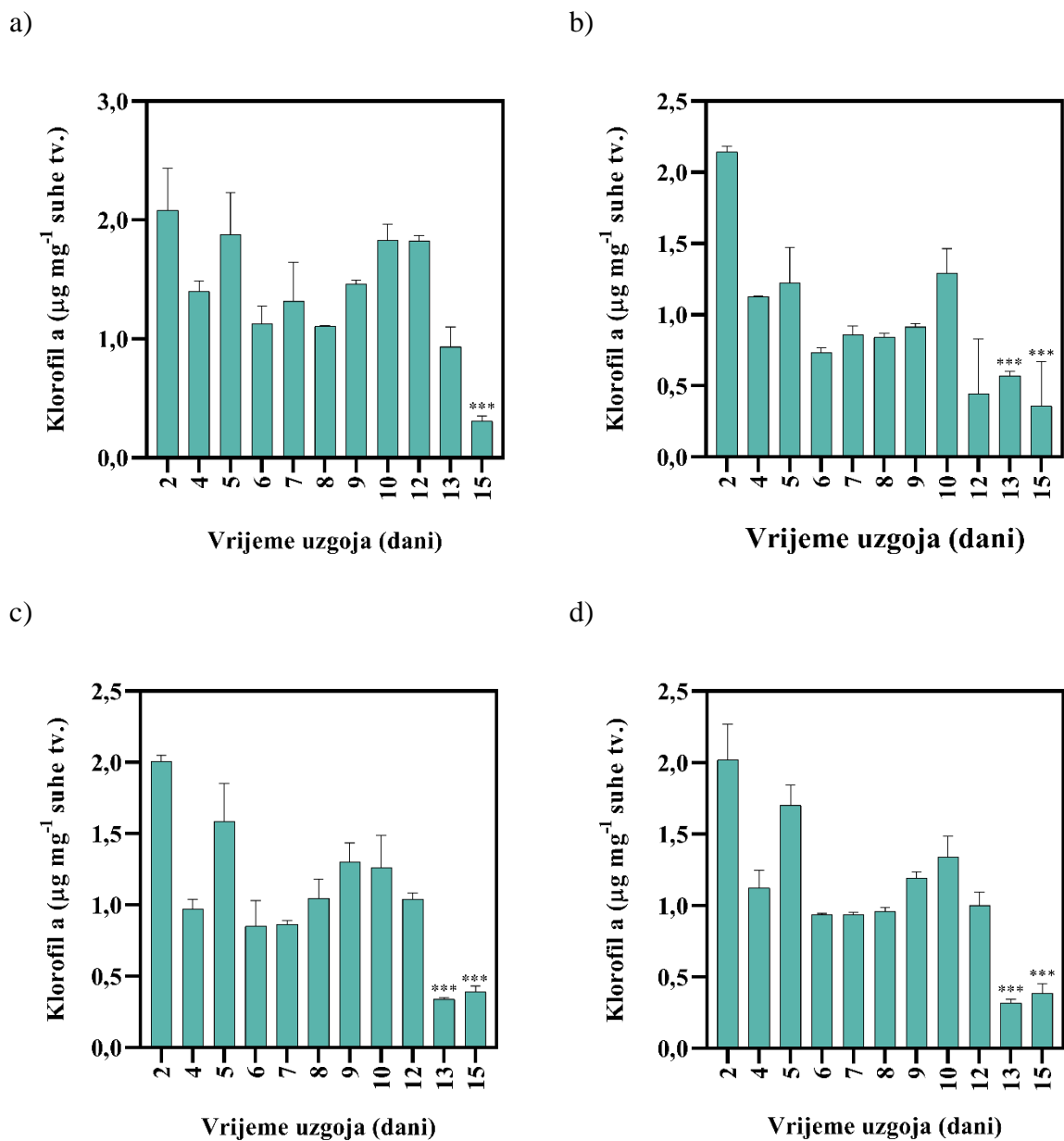
| Kinetički parametar                                     | Testirana koncentracija selenita (mg L <sup>-1</sup> ) |               |               |               |
|---|--|---------------|---------------|---------------|
|   | 0,00   | 20,00         | 40,00         | 80,00         |
| X (g L <sup>-1</sup> )                                  | 0,32 ± 0,01  | 0,39 ± 0,07   | 0,27 ± 0,03   | 0,28 ± 0,01   |
| Pr <sub>x</sub> (mg L <sup>-1</sup> dan <sup>-1</sup> ) | 22,85 ± 0,92   | 27,86 ± 0,005 | 19,28 ± 2,31  | 20,00 ± 1,18  |
| μ (dan <sup>-1</sup> )                                  | 0,095 ± 0,003  | 0,103 ± 0,01  | 0,084 ± 0,009 | 0,085 ± 0,003 |

#### 4.3.2. Utjecaj viših koncentracija selenita na fotosintetsku aktivnost mikroalge *D.*

##### *tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L)

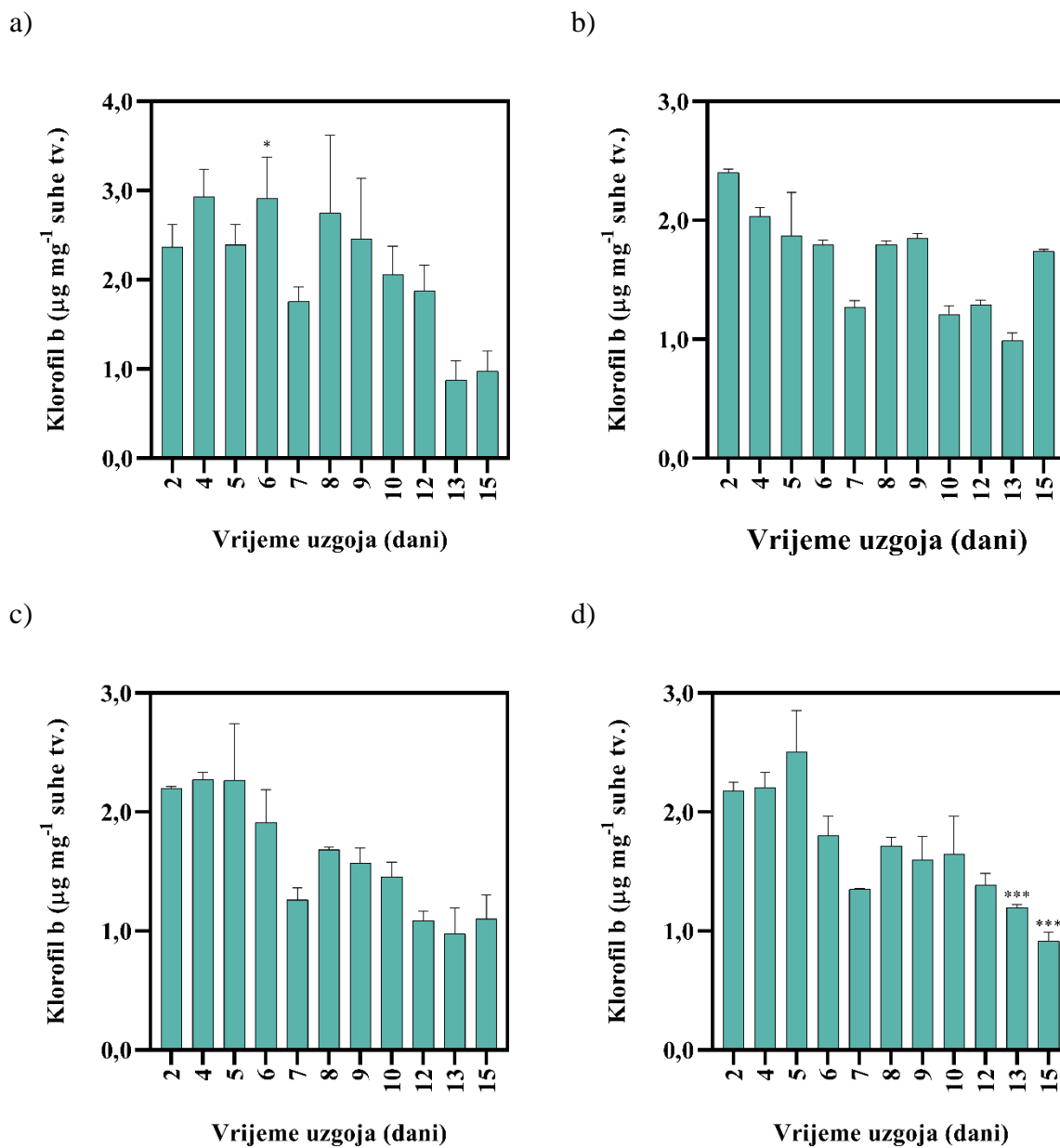
Osim rasta, u ovom dijelu doktorskog rada također je ispitan i utjecaj različitih koncentracija selenita na koncentraciju fotosintetskih pigmenata u biomasi mikroalge *D. tertiolecta*. Koncentracija fotosintetskih pigmenata (klorofil a i b) određivana je spektrofotometrijskom metodom nakon provedenog postupka metanolne ekstrakcije vlažnog taloga biomase mikroalge *D. tertiolecta* (poglavlje 3.5.7.). Rezultati koncentracije klorofila a i b u biomasi mikroalge *D. tertiolecta* prikazani su na slikama 18 i 19.

Tijekom 13. i 15. dana dvostupanjskog uzgoja u svim kulturama mikroalgi zabilježen je statistički značajan pad koncentracije klorofila a u odnosu na 2. dan uzgoja (slika 18). Iznimka je kontrolna grupa u kojoj je do značajnog pada koncentracije klorofila a u odnosu na 2. dan uzgoja došlo zadnjeg, odnosno 15. dana uzgoja. Naime, u kulturama mikroalgi koje sadrže 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zadnji dan uzgoja zabilježen je značajan pad ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila a u odnosu na 2. dan uzgoja u iznosu od 74,80 %, 80,42 % i 80,80 %. Iz rezultata je također vidljivo da je tijekom 10., 12. i 13. dana dvostupanjskog uzgoja u svim testiranim kulturama mikroalgi (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježen značajan pad koncentracije klorofila a u odnosu na kontrolnu grupu. Nadalje, iz rezultata prikazanih na slici 19 može se vidjeti da je u kulturama mikroalgi koje sadrže 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 13. i zadnji dan uzgoja zabilježen značajan pad ( $P < 0,001$ ) koncentracije klorofila b u odnosu na 2. dan uzgoja u iznosu od 43,39 % i 61,29 %. Zadnji dan uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita također je zabilježeno statistički značajno ( $P < 0,001$ ) smanjenje koncentracije klorofila b u odnosu na kontrolu grupu u iznosu od 6,02 %.



**Slika 18.** Promjena koncentracije klorofila a u biomasi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj različitim koncentracijama natrijevog selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

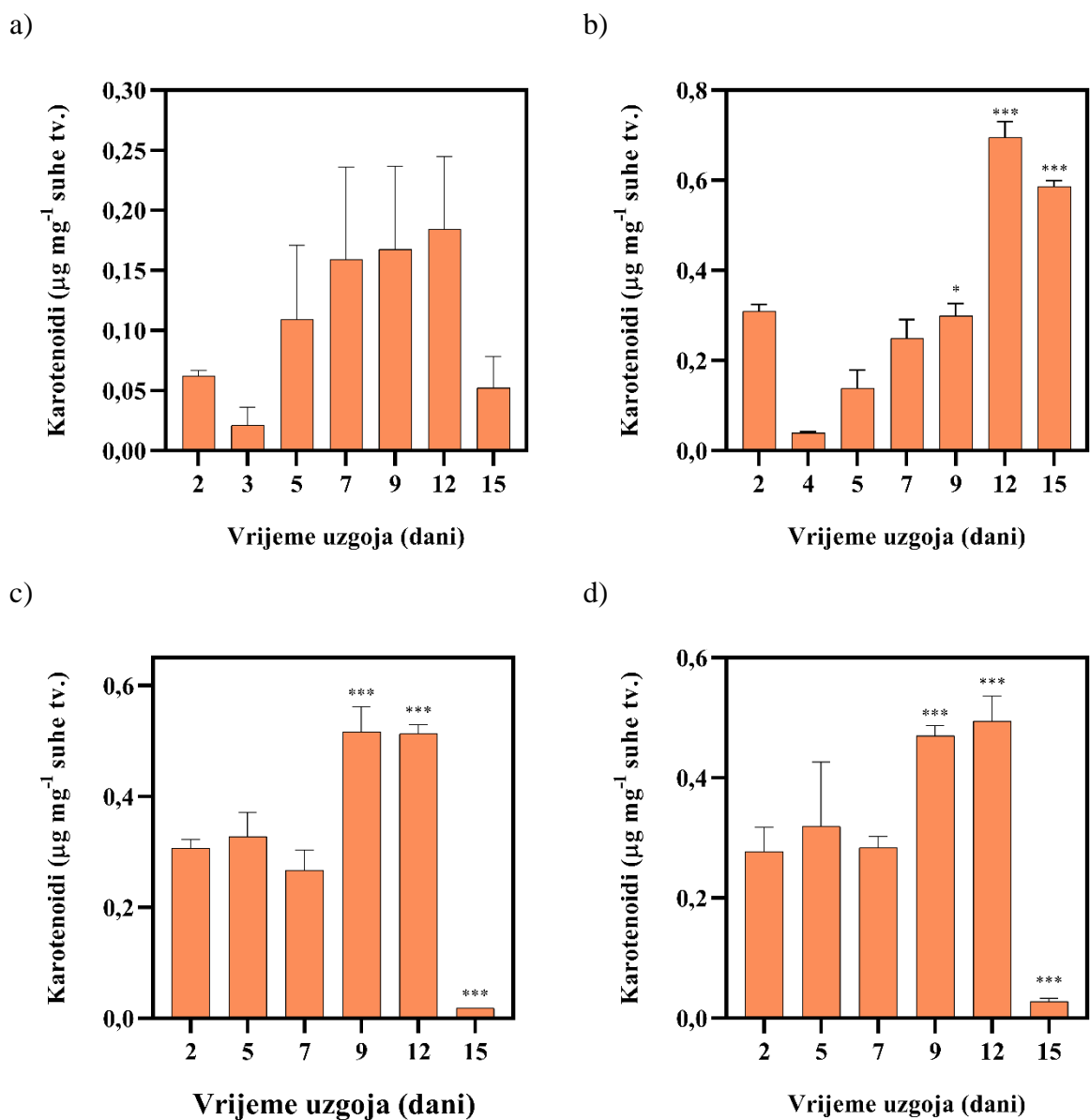




**Slika 19.** Promjena koncentracije klorofila b u biomasi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj različitim koncentracijama natrijevog selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata.

### 4.3.3. Utjecaj viših koncentracija selenita na sintezu karotenoida mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L)

Rezultati utjecaja različitih koncentracija selenita na sintezu karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većim volumenima prikazani su na slici 20.



**Slika 20.** Promjena koncentracije ukupnih karotenoida u biomasi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj različitim koncentracijama natrijevog selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>.

Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita u većim volumenima (2 L) u svim kulturama mikroalgi (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita) tijekom 9. i 12. dana uzgoja zabilježen je statistički značajan rast ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolnu grupu. U kulturi mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, osim 9. i 12. dana uzgoja, statistički značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na 2. dan uzgoja također je zabilježeno i zadnji, odnosno 15. dan uzgoja u iznosu od 48,00 %. Najveća koncentracija karotenoida (0,70 µg mL<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> suhe tv.) postignuta je u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 12. dan uzgoja te je bila 1,70 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu.

Osim utjecaja testiranih koncentracija selenita na sintezu ukupnih karotenoida (slika 20.), nakon završenog dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) također su određene i koncentracije pojedinačnih karotenoida uključujući lutein, zeaksantin, fukoksantin, neoksantin, violaksantin, astaksantin i β-karoten. Koncentracije pojedinačnih karotenoida određene su u ekstraktima biomase mikroalge *D. tertiolecta* dobivene nakon 15. dana dvostupanjskog uzgoja, koristeći metodu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (poglavlje 3.5.12.) (tablica 11).

**Tablica 11.** Koncentracija karotenoida (lutein, zeaksantin, fukoksantin, neoksantin, violaksantin, astaksantin i β-karoten) u ekstraktima mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj različitim koncentracijama selenita (0,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>).

| Koncentracija karotenoida (mg g <sup>-1</sup> ekstrakta) | koncentracija selenita (mg L <sup>-1</sup> ) |               |               |               |
|--|--|---------------|---------------|---------------|
|  | 0,00   | 20,00         | 40,00         | 80,00         |
| lutein   | 17,58±0,12                                   | 1,74±0,80***  | 1,86±0,41***  | 5,23±0,33***  |
| zeaksantin   | 25,03±0,07                                   | 4,18±0,001*** | 9,10±0,007*** | 6,51±0,22***  |
| fukoksantin  | 1,29±0,22                                    | -             | 0,12±0,001*** | 0,43±0,001*** |
| neoksantin   | 2,83±0,005                                   | -             | -             | -             |
| violaksantin   | 2,37±0,007                                   | -             | -             | -             |
| astaksantin  | -  | -             | -             | 0,46±0,14     |
| β - karoten  | 0,45   | 1,39*         | 0,31          | 0,49          |

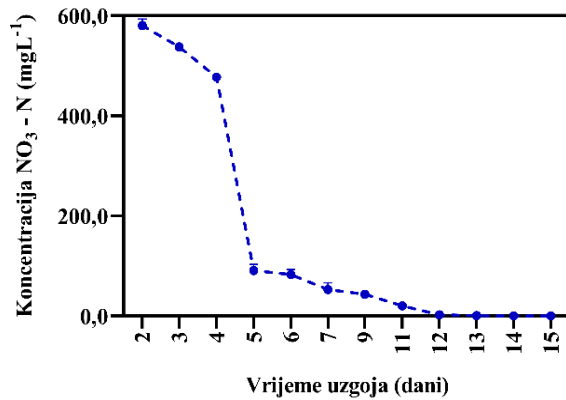
U tablici 11 prikazane su koncentracije karotenoida detektiranih u frakcijama ekstrakata biomase mikroalgi *D. tertiolecta* dobivenih uzgojem u kontrolnoj podlozi (0,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Identificirani karotenoidi uključuju lutein, zeaksantin, fukoksantin, neoksantin, violaksantin i β-karoten. U frakcijama ekstrakata biomase mikroalge *D. tertiolecta* dobivene uzgojem na koncentracijama selenita od 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>, u usporedbi s kontrolnom grupom, nije zabilježeno prisustvo karotenoida neoksantina, violaksantina i astaksantina. S druge strane, u frakcijama ekstrakata biomase mikroalgi uzgajanih na koncentraciji selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita nije zabilježeno prisustvo karotenoida neoksantina i violaksantina. U frakcijama ekstrakata mikroalgi *D. tertiolecta* uzgajanih na koncentracijama selenita od 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije luteina i zeaksantina u usporedbi s kontrolnom grupom ( $P < 0,001$ ). U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita također je zabilježeno i statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) koncentracije fukoksantina u usporedbi s kontrolnom grupom. Suprotno tomu, u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno povećanje koncentracije β-karotena ( $P < 0,05$ ).

#### **4.3.4. Promjena koncentracije dušika i fosfora u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (2 L)**

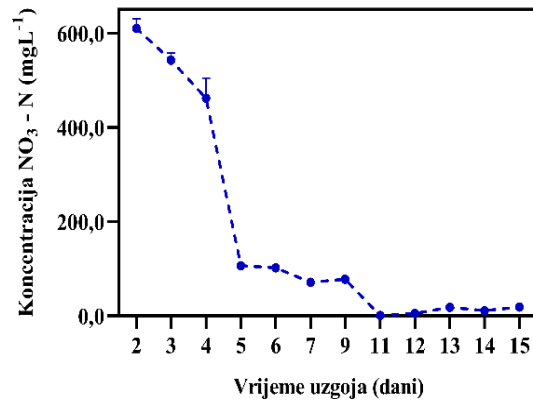
Tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) također je praćena i promjena koncentracije dušika i fosfora u hranjivom mediju tijekom vremena (slike 21 i 22). Iz rezultata dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u Erlenmeyer tikvicama volumena 2 L na različitim koncentracijama selenita (slika 21) može se zaključiti da je općeniti trend pada koncentracije dušika u hranjivom mediju tijekom vremena za sve provedene tretmane sličan (0,00; 20,00; 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Iz rezultata prikazanih na slici 21 također se može zaključiti da u svim mikroalgalnim tretmanima tijekom vremena dolazi do pada koncentracije dušika uslijed rasta kulture. U kontrolnoj grupi tijekom 4.–15. dana uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) koncentracije dušika u odnosu na 2. dan uzgoja u iznosu od 7,24 % (3. dan), 17,69 % (4. dan), 84,39 % (5. dan), 85,77 % (6. dan), 90,86 % (7. dan), 90,87 % (9. dan), 92,54 % (11. dan), 96,48 % (12. dan), 99,60 % (13. dan), 99,60 % (14. dan) i 99,90 % (15. dan). U mikroalgalnim grupama koje su sadržavale 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 4. – 15. dana uzgoja također je zabilježeno statistički značajno smanjenje koncentracije dušika u hranjivom mediju u odnosu na 2. dan uzgoja. Nadalje, kao što je vidljivo iz slike 21, u svim

mikroalgalnim grupama do 11. dana uzgoja zabilježena je gotovo potpuna potrošnja dušika u hranjivom mediju što također označava početak stacionarne faze rasta (poglavlje 4.3.1.).

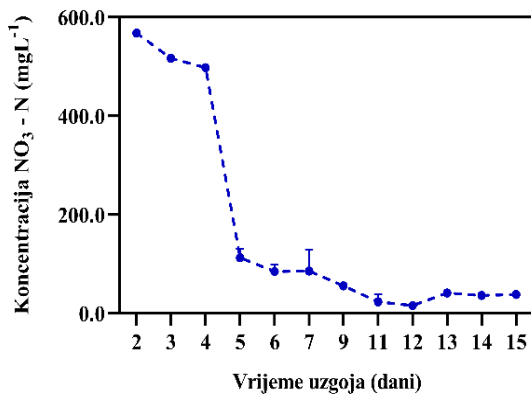
a)



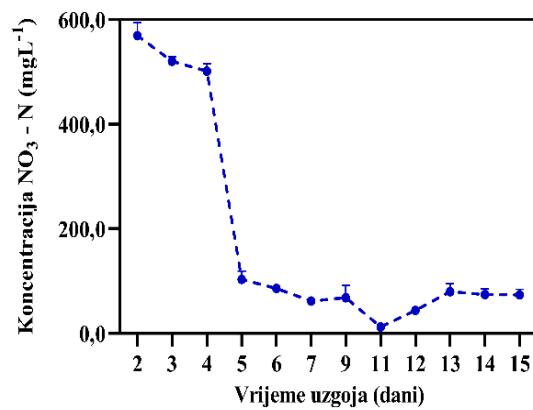
b)



c)

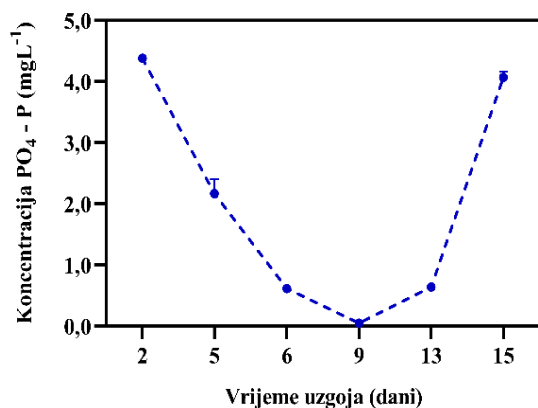


d)

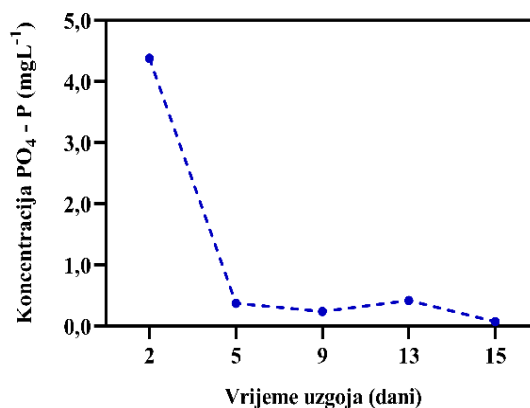


**Slika 21.** Promjena koncentracije dušika u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvica volumena 2 L) na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>.

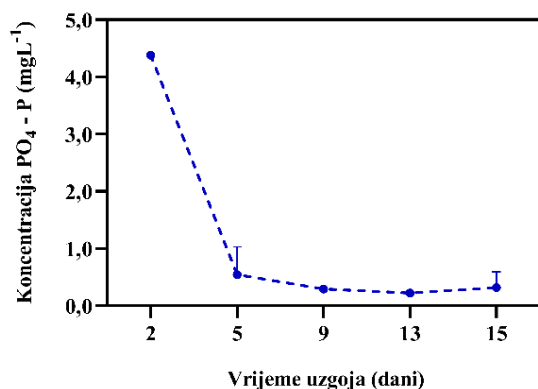
a)



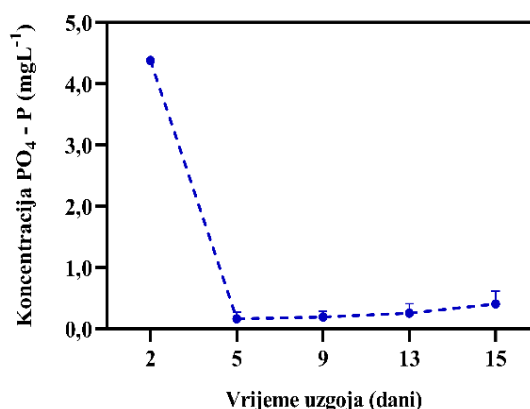
b)



c)



d)



**Slika 22.** Promjena koncentracije fosfora u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvica volumena 2 L) na različitim koncentracijama selenita: (a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; (b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; (c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; (d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>.

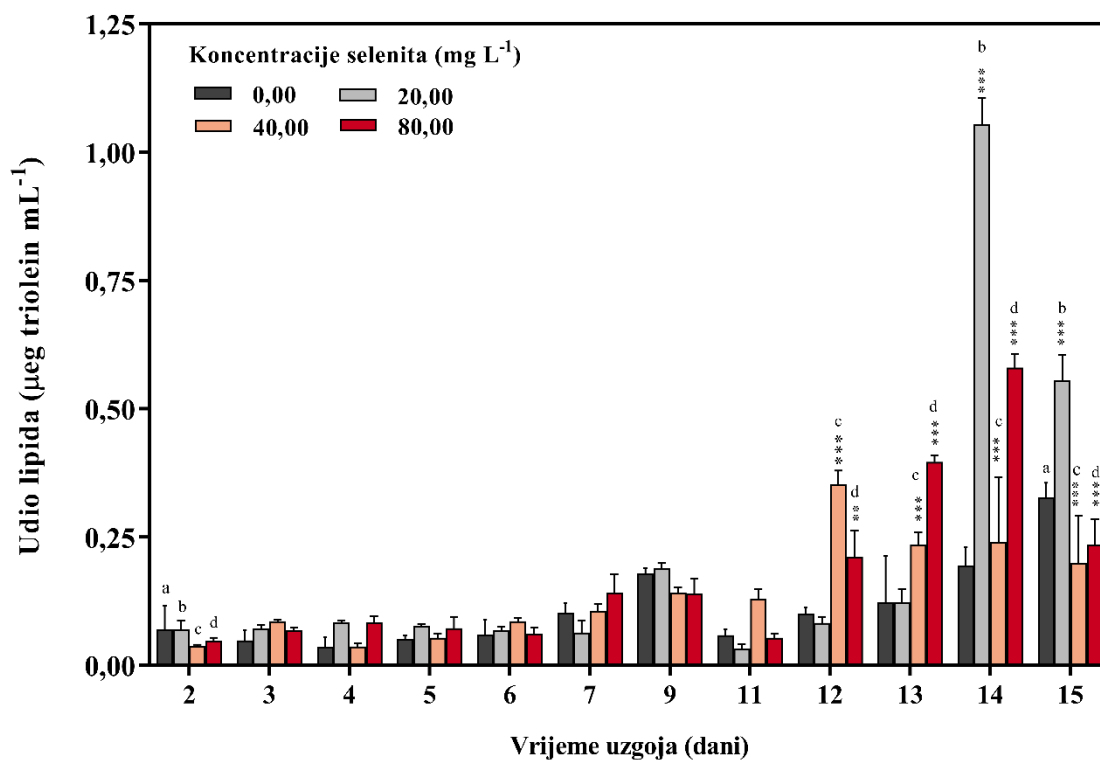
Uz praćenje promjene koncentracije dušika, tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu također je praćena i promjena koncentracije fosfora u hranjivom mediju. Kao što je prikazano na slici 22, tijekom rasta mikroalge *D. tertiolecta*, u svim testiranim mikroalgalnim grupama zabilježeno je smanjenje koncentracije fosfora u hranjivom mediju. U kontrolnoj grupi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom 5., 9., 13. i 15. dana uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje ( $P < 0,001$ ) koncentracije fosfora u odnosu na 2. dan uzgoja u iznosu od 62,37 % (5. dan), 98,88 % (9. dan), 85,42 % (13. dan) i 7,20 %

(15. dan). U mikroalgalnim grupama koje su sadržavale 20,00, 40,00, odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 5., 9., 13. i 15. dana uzgoja također su zabilježena statistički značajna smanjenja koncentracije fosfora u hranjivom mediju u odnosu na 2. dan uzgoja.

#### **4.3.5. Utjecaj selenita na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (2 L)**

Utjecaj različitih koncentracija selenita na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* određivao se spektrofotometrijski Nile Red metodom primjenom fluorescentne Nile Red boje (poglavlje 3.5.9.) (slika 23).

Povećanje udjela neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 12. dan i 13. dan uzgoja (slika 23). Naime, pri 40,00, odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 12. dan uzgoja zabilježeno je statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 71,62 % ( $P < 0,001$ ), odnosno 52,83 % ( $P < 0,001$ ). Tijekom 13. dana dvostupanjskog uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 80,00 mg L<sup>-1</sup> zabilježeno je daljnje povećanja udjela neutralnih lipida (52,89 %,  $P < 0,001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Nadalje, u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježen je pad udjela neutralnih lipida u odnosu na 12. dan (za 33,30 %), iako je to u odnosu na kontrolnu grupu i dalje bilo 20,73 % ( $P < 0,001$ ) povećanje udjela neutralnih lipida. Nadalje, 14. dan uzgoja koncentracija selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup> utjecala je na povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu u iznosu od 66,52 % ( $P < 0,001$ ). U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita statistički značajno povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu zabilježeno je 14. i 15. dan uzgoja u iznosu od 81,58 % ( $P < 0,001$ ) i 41,11 % ( $P < 0,001$ ). Maksimalna vrijednost udjela neutralnih lipida (1,05 µe triolein mL<sup>-1</sup>) postignuta tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita zabilježena je pri 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja te je bila 5,53 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu.



**Slika 23.** Udio neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita (0,00; 10,00; 20,00; 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\*\**P*<0,01; \*\*\**P*<0,001). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i negativne kontrole. Statistički značajna razlika između kultura mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale različite koncentracije selenita označene su istim slovima.

#### 4.3.6. Utjecaj selena na sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta* tijekom uzgoja u većem mjerilu (2 L)

Analiza sastava masnih kiselina u uzorcima mikroalge *D. tertiolecta* koja je uzgajana na različitim koncentracijama natrijevog selenita (20,00, 40,00, 80,00 mg L<sup>-1</sup>) određena je pomoću plinske kromatografije (poglavlje 3.5.11.). Provedena je in situ ekstrakcija i transesterifikacija masnih kiselina te je sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita prikazan u tablici 12.

Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* pri različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježeno je statistički značajno povećanje udjela palmitinske kiseline (C16:0), oleinske kiseline (C18: 1 (cis-9)) i alfa-linolenske kiseline (C18:3 (cis – 6, 9,



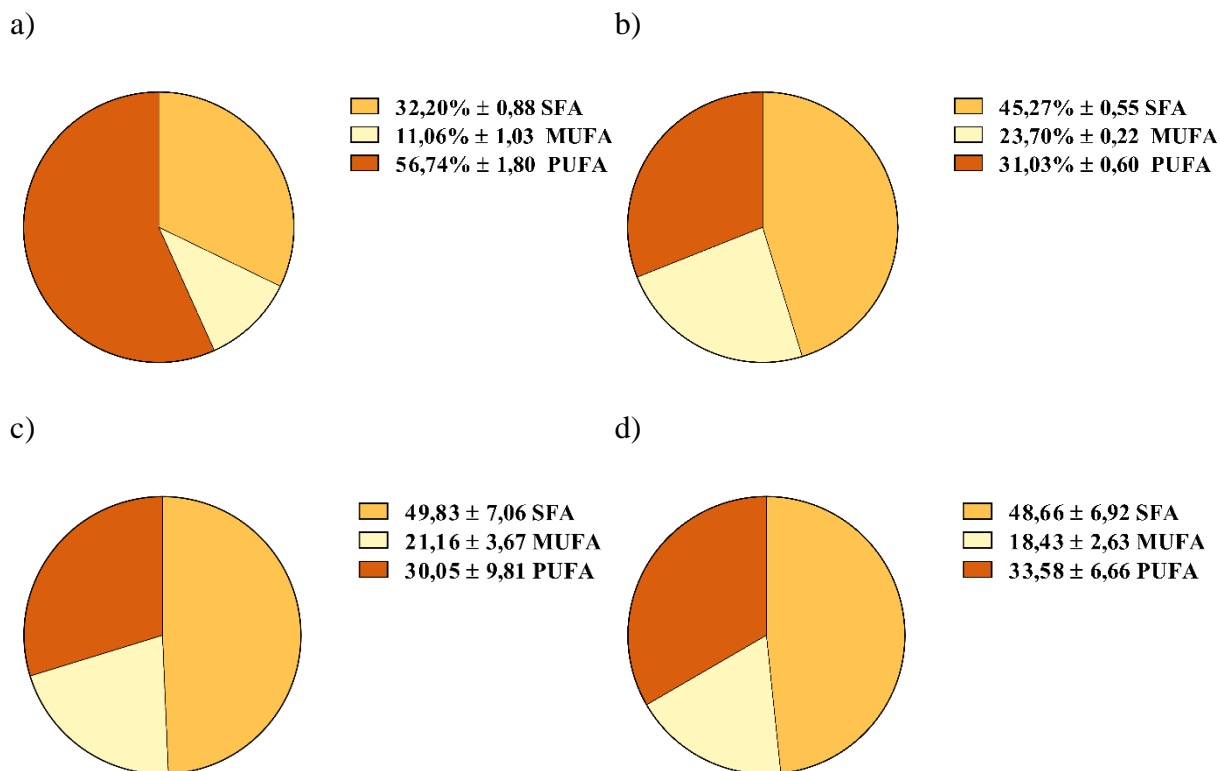
12). U kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00, 40,00, odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita najveći udio u sastavu masnih kiselina ima palmitinska masna kiselina u iznosu od 35,90 ± 0,53 %, 38,08 ± 3,72 %, odnosno 39,99 ± 5,91 %. Osim palmitinske masne kiseline, najveći udio također imaju oleinska i alfa-linolenska masna kiselina. Naime, u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* izloženima 20,00, 40,00, odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, oleinska masna kiselina je zastupljena u udjelu od 18,47 % ± 0,23, 15,66 % ± 2,70, odnosno 12,99 % ± 1,97, dok je alfa-linolenska masna kiselina zastupljena u udjelu od 21,66 % ± 0,19, 22,81 % ± 10,30, odnosno 26,78 % ± 5,43. Statistički značajno povećanje udjela palmitinske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu vidljivo je pri 20,00, 40,00, odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u iznosu od 19,55 % ( $P < 0.01$ ), 24,15 % ( $P < 0.001$ ), odnosno 27,78 % ( $P < 0.001$ ). Nadalje, statistički značajno povećanje udjela oleinske kiseline i alfa-linolenske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu također je vidljivo u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 20,00, 40,00 odnosno 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Naime, statistički značajno povećanje udjela oleinske kiseline u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je u iznosu od 53,02 % ( $P < 0,001$ ), 44,60 % ( $P < 0,01$ ), odnosno 33,23 % ( $P < 0,05$ ), dok je statistički značajno povećanje udjela alfa-linolenske kiseline zabilježeno u iznosu od 57,45 % ( $P < 0,001$ ) (20,00 mg L<sup>-1</sup>), 55,19 % ( $P < 0,01$ ) (40,00 mg L<sup>-1</sup>), odnosno 47,39 % ( $P < 0,05$ ) (80,00 mg L<sup>-1</sup>).

**Tablica 12.** Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama natrijevog selenita.

| Masna kiselina<br>%        | Koncentracija selenita(mg L <sup>-1</sup> ) |                 |                  |                 |
|----------------------------|---|-----------------|------------------|-----------------|
|                            | 0,00  | 20,00           | 40,00            | 80,00           |
| <b>C8:0</b>                | nd  | 1,45 ± 0,02     | nd               | nd              |
| <b>C10:0</b>               | nd  | nd              | 1,76 ± 0,25      | 1,75 ± 0,43     |
| <b>C12:0</b>               | nd  | 2,17 ± 0,15     | 2,55 ± 0,77      | 2,31 ± 0,34     |
| <b>C14:0</b>               | 1,05 ± 0,04                                 | 2,01 ± 0,05     | 2,03 ± 0,26      | 2,07            |
| <b>C14:1 cis 9</b>         | 1,03 ± 0,06                                 | 1,17 ± 0,06     | 1,52 ± 0,22      | 1,60 ± 0,24     |
| <b>C15:0</b>               | nd  | nd              | nd               | nd              |
| <b>C16:0</b>               | 28,88 ± 0,81                                | 35,90 ± 0,53**  | 38,08 ± 3,72***  | 39,99 ± 5,91*** |
| <b>C16:1 cis 9</b>         | 0,72 ± 0,01                                 | 4,05 ± 0,03     | 3,97 ± 0,74      | 3,83 ± 0,76     |
| <b>C17:0</b>               | 0,78 ± 0,04                                 | nd              | nd               | nd              |
| <b>C18:0</b>               | 1,53 ± 0,06                                 | 4,44 ± 0,07     | 4,75 ± 1,13      | 4,50 ± 0,58     |
| <b>C18:1 cis 9 trans 9</b> | 8,67 ± 1,08                                 | 18,47 ± 0,23*** | 15,66 ± 2,70**   | 12,99 ± 1,97*   |
| <b>C18:2 trans 9, 12</b>   | 5,13 ± 0,66                                 | 4,14 ± 0,05     | 3,69 ± 0,56      | 3,90 ± 0,25     |
| <b>C18:2 cis 9,12</b>      | 0,82 ± 0,13                                 | 2,24 ± 1,17     | 1,44 ± 0,006     | 1,35 ± 1,23     |
| <b>C18:3 cis 6, 9, 12</b>  | 50,91 ± 2,33                                | 21,66 ± 0,19*** | 22,81 ± 10,30*** | 26,78 ± 5,43*** |
| <b>C18:3 cis 9, 12, 15</b> | nd  | 1,21 ± 0,02     | nd               | nd              |
| <b>C20:2 cis 11, 14</b>    | nd  | 2,79 ± 0,20     | 1,38 ± 0,04      | 1,79 ± 0,62     |
| <b>C22:1 cis 13</b>        | 0,65 ± 0,003                                | nd              | nd               | nd              |

\*nd = nije determinirano

Na temelju sastava masnih kiselina ukupnih lipida mikrolage *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita izračunat je udio zasićenih masnih kiselina (SFA, eng. *saturated fatty acids*), jednostruko nezasićenih masnih kiselina (MUFA, eng. *monounsaturated fatty acids*) i višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, eng. *polyunsaturated fatty acids*) u udjelu ukupnih lipida te su rezultati prikazani na slici 24.



**Slika 24.** Udio zasićenih (eng. *saturated fatty acid*, SFA), jednostruko nezasićenih (eng. *monounsaturated fatty acid*, MUFA) i višestruko nezasićenih (eng. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) masnih kiselina u ukupnim lipida mikroalge *D. tertiolecta* izložene različitim koncentracijama selenita: a) 0,00 mg L<sup>-1</sup>; b) 20,00 mg L<sup>-1</sup>; c) 40,00 mg L<sup>-1</sup>; d) 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost triplikata ± SD.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 24 može se vidjeti da su u kontrolnoj grupi zasićene masne kiseline prisutne u udjelu od  $32,20 \pm 0,88$  %, jednostruko nezasićene masne kiseline u udjelu od  $11,16 \pm 1,03$  % i višestruko nezasićene masne kiseline u udjelu od  $56,74 \pm 1,80$  %. Suprotno kontrolnoj grupi, u mikroalgama izloženima 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, najveći udio u ukupnom udjelu lipida imale su zasićene masne kiseline u iznosu od  $49,83 \pm 7,06$  % (20,00 mg L<sup>-1</sup>),  $45,27$  % (40,00 mg L<sup>-1</sup>), odnosno  $48,66$  % (80,00 mg L<sup>-1</sup>). Najveći udio zasićenih masnih kiselina postignut je u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita ( $49,83 \pm 7,06$  %) (1,54 puta veći u odnosu na kontrolnu grupu). Nadalje, jednostruko nezasićene masne kiseline bile su zastupljene u udjelu od  $21,16 \pm 3,67$  % (20,00 mg L<sup>-1</sup>),  $23,70 \pm 0,22$  % (40,00 mg L<sup>-1</sup>) i  $18,43 \pm 6,66$  % (80,00 mg L<sup>-1</sup>). U odnosu na kontrolnu grupu, u kulturama mikroalgi koje su bile izložene različitim koncentracijama selenita, udio višestruko nezasićenih masnih kiselina značajno je smanjen ( $P < 0,001$ ). Naime, pri 20,00, 40,00

180,00 mg L<sup>-1</sup> selenita udio višestruko nezasićenih masnih kiselina iznosio je 30,05 ± 9,81, 31,03 ± 0,60 %, odnosno 33,58 ± 6,66 %.

#### **4.3.7. Svojstva biodizela**

Na temelju sastava masnih kiselina (tablica 12) i uz pomoć empirijskih jednadžbi (pogavlje 3.5.13.) izračunata su četiri fizikalna svojstva biodizela, odnosno cetanski broj ( $\Phi_b$ ) (jednadžba 9), kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ; mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) (jednadžba 10), gustoća ( $\rho_b$ ; g cm<sup>-3</sup>) (jednadžba 11) i veća ogrijevna vrijednost ( $\delta_b$ ; MJ kg<sup>-1</sup>) (jednadžba 12). Vrijednosti izračunatih fizikalnih svojstava biodizela (tablica 13) uspoređena su s literaturnim vrijednostima i vrijednostima propisanim standardima ASTM D6751 i EN 142.

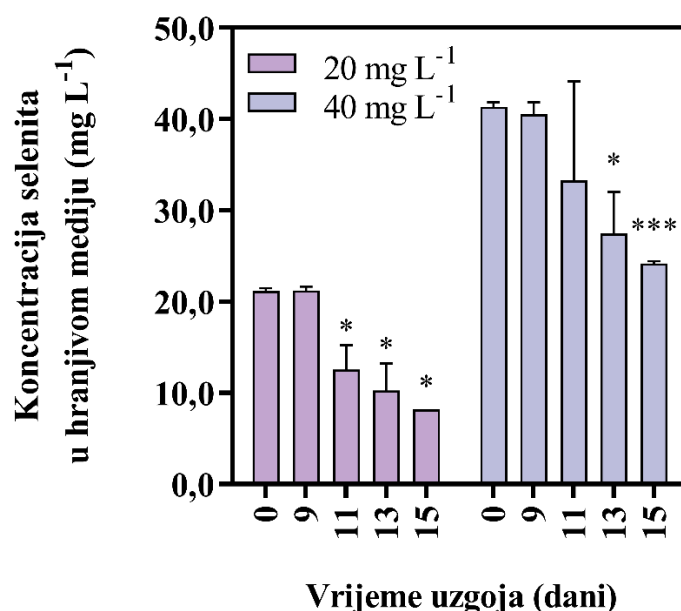
Na temelju rezultata prikazanih u tablici 13 može se vidjeti da sva izračunata svojstva svih testiranih uzoraka biodizela zadovoljavaju vrijednosti propisane američkim (ASTM, 6751-12) i europskim (EN14214) standardima za proizvodnju biodizela. Vrijednosti cetanskog broja, kinematičke viskoznosti, gustoće i kalorijske vrijednosti uzoraka biodizela dobivenih transesterifikacijom lipida biomase mikroalgi uzgajane na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) su u rasponu od 52,00–56,00, 3,89–3,94, 0,87–0,88, odnosno 39,33–39,47.

**Tablica 13.** Usporedba izračunatih svojstava biodizela (cetanski broj ( $\Phi_b$ ); kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ;  $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ), gustoća ( $\rho_b$ ;  $\text{g cm}^{-3}$ ); kalorijska vrijednost ( $\delta_b$ ;  $\text{MJ kg}^{-1}$ ) s literaturnim vrijednostima i vrijednostima propisanim standardima ASTM D6751 i EN 142.

|  |   | Koncentracija selenita ( $\text{mg L}^{-1}$ )  |              |              |              |
|--|---|--|--------------|--------------|--------------|
|  |   | 0,00   | 20,00        | 40,00        | 80,00        |
| Izračunate vrijednosti   | <b>Cetanski broj:</b> $\Phi_b$  | 44,12 ± 0,98                                   | 56,26 ± 4,61 | 55,96 ± 0,36 | 52,85 ± 2,46 |
|  | <b>Kinematička viskoznost</b><br>$\eta_b$ ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ) | 3,73 ± 0,03                                    | 3,94 ± 0,10  | 3,94 ± 0,10  | 3,89 ± 0,04  |
|  | <b>Gustoća;</b> $\rho_b$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )                           | 0,88 ± 0,00                                    | 0,87 ± 0,00  | 0,87 ± 0,00  | 0,88 ± 0,00  |
|  | <b>Kalorijska vrijednost</b><br>$\delta_b$ ( $\text{MJ kg}^{-1}$ )        | 39,52 ± 0,00                                   | 39,44 ± 0,00 | 39,49 ± 0,00 | 39,47 ± 0,00 |
| Literaturne vrijednosti  | <b>Cetanski broj:</b> $\Phi_b$  | 70,0; 48,3; 50,07; 51,74; 47,30; 32,90; 46,50  |              |              |              |
|  | <b>Kinematička viskoznost</b><br>$\eta_b$ ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ) | 5,66; 4,47; 4,19; 3,75; 3,89; 3,74; 4,63; 5,06 |              |              |              |
|  | <b>Gustoća;</b> $\rho_b$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )                           | 0,86; 0,88; 0,86; 0,88; 0,88; 0,89; 0,91; 0,91 |              |              |              |
|  | <b>Kalorijska vrijednost</b><br>$\delta_b$ ( $\text{MJ kg}^{-1}$ )        | 45,60; 40,72; 39,52; 39,58; 39,86              |              |              |              |
| Svojstva biodizela propisana standardima <b>EN14214</b> <sup>9</sup> <b>ASTM, 6751-12</b> <sup>10</sup> i <b>Australia</b> <sup>11</sup> | <b>Cetanski broj:</b> $\Phi_b$  | 51,00 min; 47,00 min; 51,0 min                 |              |              |              |
|  | <b>Kinematička viskoznost</b><br>$\eta_b$ ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ) | 3,50 – 5,00; 1,90 – 6,0; 3,50 – 5,00           |              |              |              |
|  | <b>Gustoća;</b> $\rho_b$ ( $\text{g cm}^{-3}$ )                           | 0,86 – 0,90; 0,86 – 0,89                       |              |              |              |
|  | <b>Kalorijska vrijednost</b><br>$\delta_b$ ( $\text{MJ kg}^{-1}$ )        | 35 min   |              |              |              |

#### 4.3.8. Promjena koncentracije selenita u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (2 L)

Praćenje promjene koncentracije selenita tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* pri višim koncentracijama selenita provedeno je uz pomoć spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP – MS; slika 25).



**Slika 25.** Promjena koncentracije selenita u vremenu u f/2 hranjivoj podlozi tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na višim koncentracijama selenita (20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>).

Početno smanjenje koncentracije selenita u svim testiranim kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* (20,00, 40,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježeno je 11. dan dvostupanjskog uzgoja (slika 25). Naime, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita statistički značajno ( $P < 0,05$ ) smanjenje koncentracije selenita u odnosu na 0. dan zabilježeno je tijekom 11., 13. i 15. dana uzgoja, dok je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita statistički značajno smanjenje koncentracije selenita u f/2 hranjivoj podlozi zabilježeno tijekom 13. i 15. dana uzgoja. Brzina potrošnje selenita u kulturama mikroalgi koje sadrže 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita iznosi 1,14 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>, dok u kulturama mikroalgi koje sadrže 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita izračunata brzina potrošnje selenita iznosi 0,87 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>.

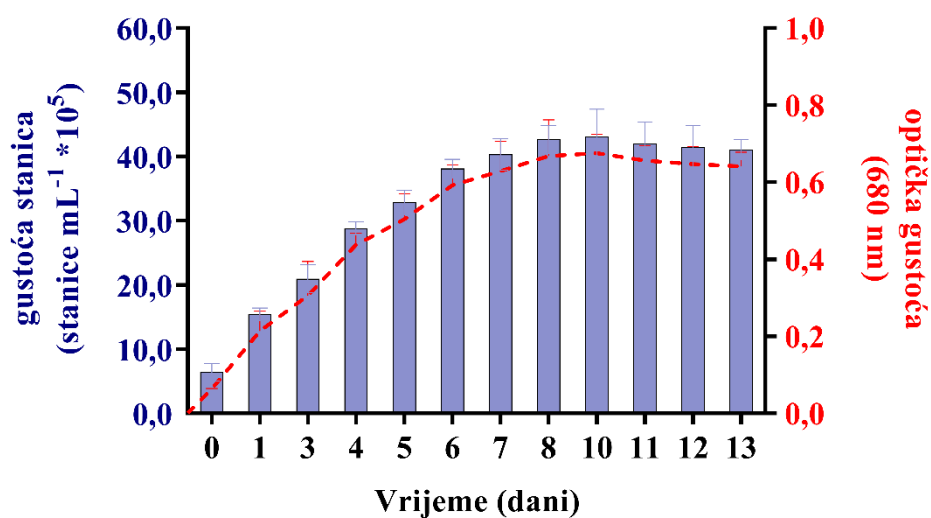
#### 4.4. Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru

U zadnjem, četvrtom dijelu ovog doktorskog rada proveden je šaržni uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru volumena 3 L s miješalom pri kontinuiranom osvjetljenju. Koncentracija selenita koja je ispitivana tijekom šaržnog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru odabrana je na temelju rezultata prethodno opisanog dijela istraživanja, odnosno ispitivana koncentracija selenita bila je 20,00 mg L<sup>-1</sup>.

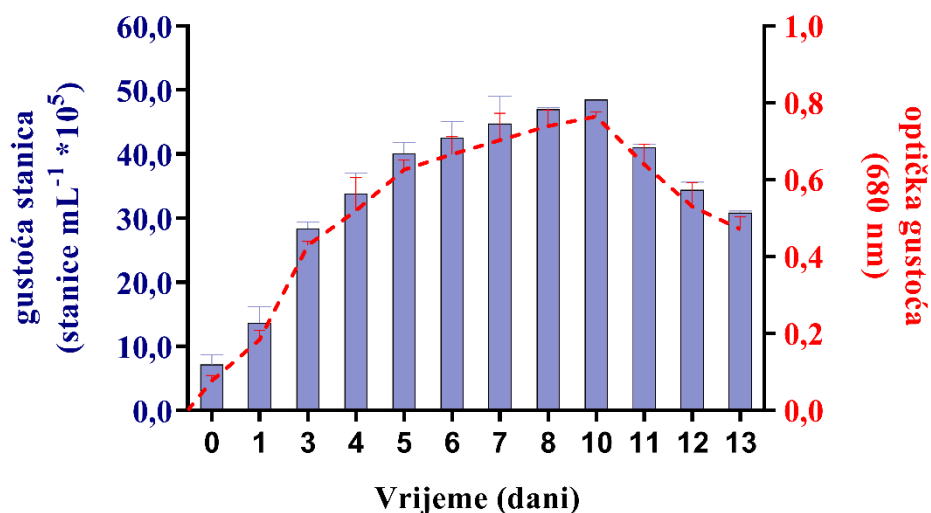
##### 4.4.1. Utjecaj selenita (20,00 mg L<sup>-1</sup>) na rast mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru

Na slici 26a prikazane su vrijednosti optičke gustoće (680 nm) i gustoće stanica (stanice mL<sup>-1</sup> × 10<sup>5</sup>) mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u f/2 hranjivoj podlozi u laboratorijskom fotobioreaktoru, dok su na slici 26b prikazane vrijednosti optičke gustoće (680 nm) i gustoće stanica (stanice mL<sup>-1</sup> × 10<sup>5</sup>) mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane pri 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita.

a)



b)



**Slika 26.** Promjena optičke gustoće (680 nm) i gustoće stanica (stanice mL<sup>-1</sup>×10<sup>5</sup>) mikroalge *D. tertiolecta* tijekom: (a) šaržnog uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi i (b) dvostupanjskog uzgoja u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u laboratorijskom bioreaktoru.

Prema rezultatima vidljivima iz slike 26a može se zaključiti da su tijekom šaržnog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivoj podlozi bez dodatka selenita najveće vrijednosti optičke gustoće (0,67) i gustoće stanica (43,11×10<sup>5</sup> stanice mL<sup>-1</sup>) postignute 8. dan uzgoja. Maksimalna vrijednost gustoće stanica postignuta 8. dan šaržnog uzgoja značajno je veća ( $P < 0,001$ ) u odnosu na ostale dane uzgoja (0.–7. dana uzgoja). Nakon 8. dana pa do kraja uzgoja zabilježeno je smanjenje vrijednosti optičke gustoće i gustoće stanica mikroalge *D. tertiolecta*. Stanice mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita dostižu stacionarnu fazu rasta 11. dan dvostupanjskog uzgoja (slika 26b). Naime, tijekom 10. dana uzgoja (početak stacionarne faze) u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita vidljivo je statistički značajno ( $P < 0,001$ ) povećanje vrijednosti optičke gustoće i gustoće stanica u odnosu na kontrolnu grupu. Zabilježeno je da su vrijednosti gustoće stanica mikroalge *D. tertiolecta* postignute 10. dan šaržnog uzgoja 1,12 puta veće u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 10. dana šaržnog uzgoja vidljivo je smanjenje gustoće stanica mikroalge *D. tertiolecta*.

Koncentracija suhe tvari biomase određena je gravimetrijskom metodom, na temelju čega je izračunata i produktivnost sinteze biomase. Osim toga, izračunate su i specifične brzine rasta te su rezultati prikazani u tablici 7.



**Tablica 14.** Prinos biomase ( $X$ ;  $\text{g L}^{-1}$ ), produktivnost sinteze biomase ( $\text{Pr}_x$ ;  $\text{mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) i specifična brzina rasta ( $\mu$ ;  $\text{dan}^{-1}$ ) mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobireктору u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita.

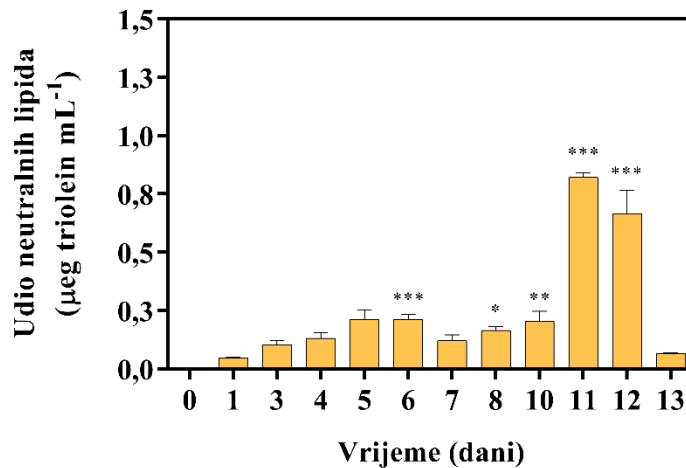
| Kinetički parametar                                   | Koncentracija selenita ( $\text{mg L}^{-1}$ ) |                    |
|---|---|--------------------|
|   | 0,00  | 20,00              |
| $X$ ( $\text{g L}^{-1}$ )                             | $0,470 \pm 0,002$                             | $0,410 \pm 0,001$  |
| $\text{Pr}_x$ ( $\text{mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) | $39,570 \pm 0,240$                            | $33,460 \pm 0,070$ |
| $\mu$ ( $\text{dan}^{-1}$ )                           | $0,120 \pm 0,0003$                            | $0,102 \pm 0,0003$ |

Za 12. dan dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreктору u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita izračunate su vrijednosti prinosa biomase ( $\text{g L}^{-1}$ ), produktivnosti sinteze biomase ( $\text{mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ) te specifične brzine rasta ( $\text{dan}^{-1}$ ). Navedeni parametri odnose se na 12. dan uzgoja s obzirom da je tog dana detektirana najveća razina neutralnih lipida u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* obogaćenoj sa selenitom (poglavlje 4.4.3.). Iz rezultata prikazanih u tablici 14 može se zaključiti da su vrijednosti prinosa biomase ( $0,41 \text{ g L}^{-1}$ ), produktivnosti sinteze biomase ( $33,46 \text{ mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ), odnosno specifične brzine rasta ( $0,102 \text{ dan}^{-1}$ ) postignute u kulturi mikroalge obogaćenoj selenitom samo 1,14, 1,18, odnosno 1,17 puta manje u odnosu na vrijednosti prinosa biomase ( $0,47 \text{ g L}^{-1}$ ), produktivnosti sinteze biomase ( $39,57 \text{ mg L}^{-1} \text{ dan}^{-1}$ ), odnosno specifične brzine rasta ( $0,12 \text{ dan}^{-1}$ ) postignute u kontrolnoj grupi.

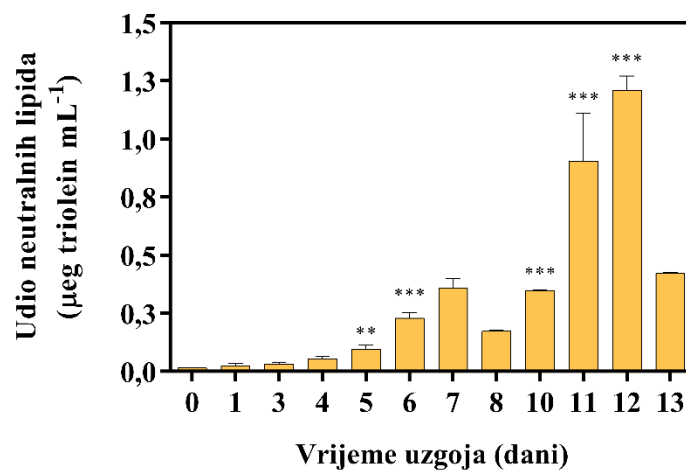
#### **4.4.2. Utjecaj selenita ( $20,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) na akumulaciju neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* uzgajanoj u laboratorijskom fotobireктору**

U svrhu istraživanja utjecaja selenita na sintezu neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobioreктору ispitan je utjecaj koncentracije selenita od  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  na sintezu neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom 13. dana uzgoja (slika 27).

a)



b)



**Slika 27.** Udio neutralnih lipida u mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u (a) f/2 hranjivoj podlozi bez dodatka selenita i (b) f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD triplikata (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ). Zvezdice (\*) označavaju statistički značajnu razliku između kultura mikroalgi koje su sadržavale različite koncentracije selenita i negativne kontrole.

Iz rezultata prikazanih na slici 27 vidljivo je da je u svim mikroalgalnim kulturama (kontrolna grupa, 20,00 mg L<sup>-1</sup>) od 5. dana uzgoja zabilježeno statistički značajno povećanja udjela neutralnih lipida u stanicama mikroalgi. Najveći udio neutralnih lipida kontrolne grupe (0,82 µg triolein mL<sup>-1</sup>) postignut je 11. dan uzgoja, dok je najveći udio neutralnih lipida u kulturi

mikroalgi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> (1,21 µg triolein mL<sup>-1</sup>) selenita postignut 12. dan uzgoja.

#### **4.4.3. Utjecaj selenita (20,00 mg L<sup>-1</sup>) na sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobireктору**

Uz pomoć plinske kromatografije određen je sastav masnih kiselina u uzorcima mikroalge *D. tertiolecta* koja je uzgajana u laboratorijskom fotobioreктору u f/2 hranjivoj podlozi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (tablica 14). Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je statistički značajno ( $P < 0,001$ ) povećanje udjela miristoleinske kiseline (C14:1 cis 9), linolelaidne kiseline (C18:2, trans 9, 12) i γ-linolenske kiseline (C18:3 (cis 6, 9, 12) u iznosu od 69,99, 36,4 % i 40,20 % u odnosu na kontrolnu grupu. Osim navedenih masnih kiselina, u kulturi mikroalge koja sadrži 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita pristune su i miristinska kiselina (C14:0), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1, cis 9), heptadekanska kiselina (C17:0), stearinska kiselina (C18:0) i linolna kiselina (C18:2, cis 9, 12). Nadalje, u kulturama mikroalge koje sadrže 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita linolenska kiselina (C18:3 cis 9, 12, 15), 11-eikozenska kiselina (C20:1 cis 11), eruka kiselina (C22:1 cis 13) i trikozilna kiselina (C23:0) nisu detektirane, dok su u kontrolnim grupama detektirane u iznosu od 0,49 ± 0,0005 %, 0,37 ± 0,006 %, 0,69 ± 0,0007 % i 0,78 ± 0,09 %.

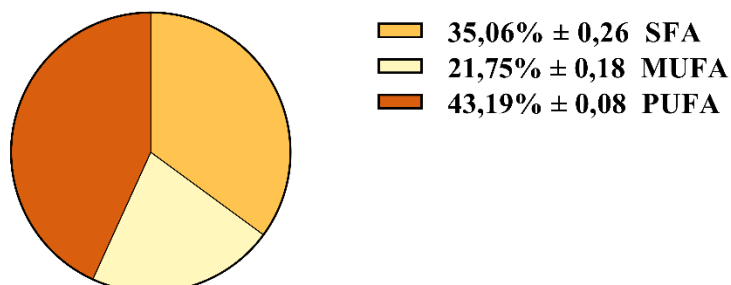
**Tablica 14.** Sastav masnih kiselina u ukupnim lipidima mikroalge *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru (zadnji dan uzgoja).

| Masna kiselina      |  | Koncentracija selenita (mg L <sup>-1</sup> ) |              |
|---------------------|--|--|--------------|
|                     |  | 0,00   | 20,00        |
| Oznaka              | Naziv                                      | Av ± SD, %                                   | Av ± SD, %   |
| C14:0               | Miristinska kiselina                       | nd   | 1,46 ± 0,006 |
| C14:1 cis 9         | Miristoleinska kiselina                    | 0,50 ± 0,01                                  | 1,66 ± 0,002 |
| C16:0               | Palmitinska kiselina                       | 31,84±0,19                                   | 31,46 ± 0,41 |
| C16:1 cis 9         | Palmitoleinska kiselina                    | nd   | 1,32 ± 0,33  |
| C17:0               | Heptadekanska kiselina                     | 0,62 ± 0,007                                 | 0,89 ± 0,01  |
| C18:0               | Stearinska kiselina                        | 1,82 ± 0,03                                  | 2,04 ± 0,02  |
| C18:1 cis 9 trans 9 | Elaidinska kiselina +<br>Oleinska kiselina | 20,17 ± 0,20                                 | 2,38 ± 0,006 |
| C18:2 cis 9, 12     | Linolna kiselina                           | 8,57 ± 0,009                                 | 1,82 ± 0,03  |
| C18:2 trans 9, 12   | Linoelaidna kiselina                       | 0,42 ± 0,005                                 | 0,66 ± 0,02  |
| C18:3 cis 6, 9, 12  | γ-linolenska kiselina                      | 33,70 ± 0,06                                 | 56,29 ± 0,17 |
| C18:3 cis 9, 12, 15 | Linolenska kiselina                        | 0,49 ± 0,0005                                | nd           |
| C20:1 cis 11        | 11-eikozenska kiselina                     | 0,37 ± 0,006                                 | nd           |
| C22:1 cis 13        | Eruka kiselina                             | 0,69 ± 0,0007                                | nd           |
| C23:0               | Trikozilna kiselina                        | 0,78 ± 0,09                                  | nd           |

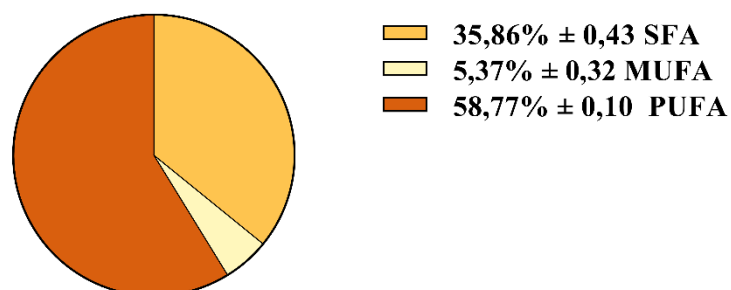
nd – nije detektirano; Av—srednja vrijednost tri replike izražena kao postotak (%)

Na temelju sastava masnih kiselina ukupnih lipida mikroalge *D. tertiolecta* izložene 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita izračunat je udio zasićenih masnih kiselina, mononezasićenih masnih kiselina i polinezasićenih masnih kiselina u udjelu ukupnih lipida te su rezultati prikazani na slici 28.

a)



b)



**Slika 28.** Udio zasićenih (eng. *saturated fatty acid*, SFA), jednostruko nezasićenih (eng. *monounsaturated fatty acid*, MUFA) i višestruko nezasićenih (eng. *polyunsaturated fatty acid*, PUFA) masnih kiselina u ukupnim lipida mikroalge *D. tertiolecta* u: a) kontrolnoj grupi (0,00 mg L<sup>-1</sup>) i b) koncentraciji selenita od 20,00 mg L<sup>-1</sup> tijekom dvostupanjskog uzgoja u laboratorijskom fotobioreктору. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost triplikata ± SD.

#### 4.4.4. Svojstva biodizela

Iz rezultata prikazanih u tablici 15 može se zaključiti da sva izračunata svojstva biodizela (cetanski broj ( $\Phi_b$ ); kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ;  $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ); gustoća ( $\rho_b$ ;  $\text{g cm}^{-3}$ ); kalorijska vrijednost ( $\delta_b$ ;  $\text{MJ kg}^{-1}$ )) zadovoljavaju vrijednosti propisane američkim (ASTM, 6751-12) i europskim (EN14214) standardima za proizvodnju biodizela. Vrijednosti cetanskog broja, kinematičke viskoznosti, gustoće i kalorijske vrijednosti uzoraka biodizela dobivenog transesterifikacijom lipida biomase mikroalgi uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru s 20,00  $\text{mg L}^{-1}$  selenita su  $42,93 \pm 0,14$ ,  $0,64 \pm 0,004 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,88 \pm 0,00009 \text{ g cm}^{-3}$  i  $39,47 \pm 0,001 \text{ MJ kg}^{-1}$ .

**Tablica 15.** Usporedba literaturnih i izračunatih svojstava biodizela (cetanski broj ( $\Phi_b$ ); kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ;  $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ), gustoća ( $\rho_b$ ;  $\text{g cm}^{-3}$ ); kalorijska vrijednost ( $\delta_b$ ;  $\text{MJ kg}^{-1}$ )) na temelju sastava metil estera masnih kiselina.

| Biodizel | $\Phi_b$ |       | $\Phi_b = \sum_{i=1}^n x_i *$ | $\eta_b (\text{mm}^2/\text{s})$ |      | $\eta_b = \exp(\sum_{i=1}^n \omega_i * \ln(\eta_i))$ |
|----------|----------|-------|-------------------------------|---------------------------------|------|--|
|          |          |       | $\Phi_i$                      |                                 |      | $\text{mm}^2/\text{s}$                               |
| 0,00     | 70,0     | 51,74 | $50,95 \pm 0,07$              | 5,66                            | 3,89 | $4,00 \pm 0,003$                                     |
| 20,00    | 48,3     | 47,30 | $42,93 \pm 0,14$              | 4,47                            | 3,74 | $3,64 \pm 0,004$                                     |

|       | $\rho_b (\text{g/cm}^3)$ |      | $\rho_b = \sum_{i=1}^n \omega_i *$ | $\delta_b (\text{MJ/kg})$ |       | $\delta_b = \sum_{i=1}^n \omega_i * \delta_i$ |
|-------|--------------------------|------|------------------------------------|---------------------------|-------|---|
|       |                          |      | $\rho_i$                           |                           |       | (MJ/kg)                                       |
|       |                          |      | $\text{g/cm}^3$                    |                           |       |   |
| 0,00  | 0,86                     | 0,88 | $0,87 \pm 0,00005$                 | 45,6                      | 39,58 | $39,62 \pm 0,00030$                           |
| 20,00 | 0,88                     | 0,89 | $0,88 \pm 0,00009$                 |                           |       | $39,47 \pm 0,001$                             |

#### 4.5. Određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala uzoraka Ames bakterijskim testom

U svrhu utvrđivanja mogućeg mutagenog/genotoksičnog učinaka metanolnih (F3) i diklormetanskih (F4) frakcija mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) proveden je Ames test (ISO 16240, 2005; tablica 16).

**Tablica 16.** Mutagena aktivnost testiranih frakcija utvrđena pomoću TA 98 i TA 100 sojeva bakterije *S. typhimurium*, izražena kao pojedinačna i srednja vrijednost broja revertanata po ploči (N=3).

| UZORAK<br>(1 mg mL <sup>-1</sup> / ploča)    |       | <i>Salmonella typhimurium</i> – TA 98 soj |          |  |   | <i>Salmonella typhimurium</i> – TA 100 soj |          |  |          |
|--|-------|---|----------|--|---|--|----------|--|----------|
|  |       | bez metaboličke aktivacije (-S9 mix)      |          | sa metaboličkom aktivacijom (+ S9 mix) |   | bez metaboličke aktivacije (-S9 mix)       |          | sa metaboličkom aktivacijom (+ S9 mix) |          |
|  |       | br. His+ revertanata                      | prosjeak | br. His+ revertanata                   | prosjeak                                      | br. His+ revertanata                       | prosjeak | br. His+ revertanata                   | prosjeak |
| Metanolna frakcija                           | 0,00  | 24  | 24,00    | 31                                     | 33,00   | 102  | 98,00    | 137                                    | 137,50   |
|  |       | 24  |          | 35                                     |   | 94   |          | 138                                    |          |
|  | 20,00 | 21  | 22,00    | 42                                     | 42,00   | 88   | 87,00    | 143                                    | 140,50   |
|  |       | 23  |          | 86                                     |   | 138  |          |  |          |
| 40,00  | 29    | 27,50                                     | 42       | 43,50                                  | 82  | 85,00                                      | 151      | 155,00                                 |          |
|  | 26    |   | 45       |  | 88  |  | 159      |  |          |
| 80,00  | 26    | 27,00                                     | 44       | 43,00                                  | 94  | 91,00                                      | 156      | 158,50                                 |          |
|  | 28    |   | 42       |  | 88  |  | 161      |  |          |
| Diklormetanska frakcija                      | 0,00  | 25  | 26,50    | 45                                     | 48,50   | 100  | 98,50    | 142                                    | 145,00   |
|  |       | 28  |          | 52                                     |   | 97   |          | 148                                    |          |
|  | 20,00 | 27  | 25,00    | 38                                     | 39,50   | 116  | 113,50   | 146                                    | 143,50   |
|  |       | 23  |          | 41                                     |   | 111  |          | 141                                    |          |
| 40,00  | 29    | 28,00                                     | 38       | 39,50                                  | 92  | 89,50                                      | 136      | 139,00                                 |          |
|  | 27    |   | 41       |  | 87  |  | 142      |  |          |
| 80,00  | 27    | 29,00                                     | 37       | 41,00                                  | 88  | 87,00                                      | 138      | 137,50                                 |          |
|  | 31    |   | 45       |  | 86  |  | 137      |  |          |
| <b>Kontrole postupka</b>                     |       |   |          |  |   |  |          |  |          |
| <i>Salmonella typhimurium</i> – strain TA 98 |       |   |          |  | <i>Salmonella typhimurium</i> – strain TA 100 |  |          |  |          |

|  | (-S9 mix) |                 | (+ S9 mix) |                 | (-S9 mix) |                 | (+ S9 mix) |                 |
|--|-----------|-----------------|------------|-----------------|-----------|-----------------|------------|-----------------|
| Kontrola ploče                                     | 0         |                 | 0          |                 | 0         |                 | 0          |                 |
| Kontrola -<br>spontani<br>revertanti               | 22        | <b>22,33</b>    | 34         | <b>33,67</b>    | 87        | <b>86,33</b>    | 145        | <b>139,67</b>   |
|  | 24        |                 | 37         |                 | 89        |                 | 133        |                 |
|  | 21        |                 | 30         |                 | 83        |                 | 141        |                 |
| Pozitivna<br>kontrola <b>NOPD</b><br>(10 µg/ploča) | >1000     | <b>&gt;1000</b> |            |                 |           |                 |            |                 |
|  | >1000     |                 |            |                 |           |                 |            |                 |
|  | >1000     |                 |            |                 |           |                 |            |                 |
| Pozitivna<br>kontrola <b>2-AA</b> (5<br>µg/ploča)  |           |                 | >2000      | <b>&gt;2000</b> |           |                 | >2000      | <b>&gt;2000</b> |
|  |           |                 | >2000      |                 |           |                 | >2000      |                 |
|  |           |                 | >2000      |                 |           |                 | >2000      |                 |
| Pozitivna<br>kontrola <b>MMS</b><br>(2µl/ploča)    |           |                 |            |                 | >2000     | <b>&gt;2000</b> |            |                 |
|  |           |                 |            |                 | >2000     |                 |            |                 |
|  |           |                 |            |                 | >2000     |                 |            |                 |



Iz rezultata Ames testa može se zaključiti da je laboratorijski postupak proveden korektno, odnosno da na pločama bez bakterija nije bilo spontanih revertanata koji bi ukazivali na zagađenje. Broj spontanih revertanata na negativnoj kontroli bio je unutar očekivanih vrijednosti za TA 98 i TA 100 soj te su izravni i neizravni mutageni spojevi uzrokovali očekivano visoki broj revertanata. Nadalje, na temelju dobivenih rezultata testiranja mutagenog i premutagenog potencijala uzoraka utvrđeno je da prilikom testiranja frakcija ne dolazi do pojave dvostruko većeg broja revertanata, odnosno rezultati ne ukazuju na prisustvo premutagenih i/ili mutagenih tvari prema međunarodno prihvaćenim kriterijima za bakterijski Ames test.

## **5. RASPRAVA**

## **5.1. Utjecaj selena na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije i u različitim mjerilima**

U svrhu ispitivanja utjecaja selena na rast mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije (šaržni uzgoj, dvostupanjski način uzgoja) i u različitim mjerilima (Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL i 2 L, laboratorijski fotobioreaktor (3 L)), rezultati ovog doktorskog rada podijeljeni su u 4 dijela. Prvi dio istraživanja fokusiran je na ispitivanje utjecaja širokog raspona koncentracija ( $0,31\text{--}120,00\text{ mg L}^{-1}$ ) anorganskog oblika selena, odnosno natrijeva selenita ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), u odnosu na kontrolu (uzgoj bez dodatka selenita), na rast mikroalge *D. tertiolecta*. Prema rezultatima prikazanim na slici 5 može se zaključiti da tijekom 72. sata uzgoja sve testirane koncentracije selenita imaju inhibitorni učinak na rast mikroalge *D. tertiolecta* pri čemu je najveći inhibitorni učinak selena na mikroalgalni rast zabilježen u kulturama koje su sadržavale najviše testirane koncentracije selenita (80,00, 100,00 i 120,00  $\text{mg L}^{-1}$ ). Osim kao stimulans, ovisno o koncentraciji i trajanju izlaganja mikroalgalne stanice različitim koncentracijama selenita, selen može djelovati i kao toksikant inhibirajući mikroalgalni rast (Zhong i Cheng, 2017). Inhibitorni efekt selena na mikroalgalni rast tijekom izlaganja višim koncentracijama selenita također je zabilježen tijekom provođenja eksperimenata u sklopu ovog doktorskog rada. Jedno od mogućih objašnjenja toksičnosti selena na rast mikroalge *D. tertiolecta* je formacija malformiranih proteina (Schiavon i sur., 2017). Formacija malformiranih, odnosno nepravilno oblikovanih proteina, rezultira inhibicijom stanične diobe i posljedično tomu smanjenjem brzine rasta mikroalgi. Nadalje, budući da ultrastruktura kloroplasta i fotosintetski transport elektrona također mogu biti oštećeni uslijed proizvodnje ROS-ova (Schiavon i sur., 2017), smanjenje brzine rasta mikroalgi tijekom izloženosti mikroalgálnih stanica visokim koncentracijama selenita djelomično se pripisuje i oštećenju fotosintetskog aparata. Naime, izloženost mikroalgálnih stanica visokim koncentracijama selenita rezultira inhibicijom fotosinteze i oštećenjem stanične ultrakstrukture (tilakoidne membrane nalik otiscima prstiju, granulirana (zrnasta) i manje gusta stroma kloroplasta). Drugo moguće objašnjenje toksičnosti selena na mikroalgalni rast je sposobnost molekula selena da reagiraju sa sulfhidrilnim grupama i na taj način inhibiraju sulfhidrilne enzime tijekom odvijanja citratnog ciklusa što rezultira smanjenjem mikroalgálnog rasta.

U drugom dijelu doktorskog rada utjecaj selena na dinamiku rasta mikroalge *D. tertiolecta* okarakteriziran je izlaganjem mikroalge užem kaskadnom rasponu koncentracija natrijevog selenita ( $0,31\text{--}40,00\text{ mg L}^{-1}$ ) tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog načina uzgoja u

manjem mjerilu, odnosno u Erlenmeyer tikvicama volumena 100 mL koje su sadržavale 70 mL f/2 medija (poglavlje 3.4.3). Prilikom dizajniranja pokusa u obzir je uzeta i činjenica da je brzina rasta mikroalgalnih stanica ponajviše determinirana kvalitetom podloge koja se primjenjuje za mikroalgalni uzgoj te da izbor odgovarajuće podloge predstavlja ključan korak u procesu proizvodnje visokokvalitetne mikroalgalne biomase u velikom mjerilu (Lam i Lee, 2012; Li i sur., 2012; Prathima Devi i sur., 2012; Xin i sur., 2010). U brojnim studijama dokazano je da uzgoj monokulture mikroalgalnih vrsta zahtijeva daleko kompleksniji sastav hranjivih tvari podloge u odnosu na uzgoj mješovitih mikroalgalnih kultura, te da je u slučaju uzgoja monokulture mikroalgalnih vrsta potrebna primjena podloge specifičnog sastava. Jedna od takvih podloga je i f/2 podloga koja se, osim za potrebe mikroalgalne kultivacije, također koristi i u svrhe održavanja velikog broja monoalgalnih kultura (*Nannochloropsis* sp., *Isochrysis* sp., *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp., *Thalassiosira* sp., *Skeletonema* sp., *Dunaliella* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, *Emiliana huxleyi* (Bartley i sur., 2014; Wahidin i sur., 2013). f/2 hranjiva podloga je često korištena hranjiva podloga na bazi morske vode namijenjena za uzgoj morskih mikroalgalnih vrsta, osobito dijatomeja (Guillard i Ryther, 2005). f/2 hranjiva podloga sadrži različite hranjive tvari koje su neophodne za rast mikroalgi, uključujući makronutrijente kao što su dušik, fosfor i kalij, i mikronutrijente kao što su željezo, mangan i cink (Guillard i Ryther, 2005). Trenutno postoji veliki broj studija koji se bave ispitivanjem utjecaja različitih podloga na brzinu rasta različitih mikroalgalnih vrsta. Lananan i sur. (2013) ispitivali su utjecaj dvije vrste hranjivih podloga (f/2 i Conway) na specifičnu brzinu rasta mikroalge *Dunaliella* sp. Prema rezultatima navedene studije specifična brzina rasta mikroalge *Dunaliella* sp. uzgajane u f/2 podlozi bila je za otprilike 72,00 % veća u odnosu na specifičnu brzinu rasta dobivenu uzgojem mikroalge u Conway podlozi. Osim produktivnosti biomase, važan kinetički parametar mikroalgalnog rasta također predstavlja i specifična brzina rasta ( $\mu$ ;  $h^{-1}$ ). Izračun specifične brzine rasta također predstavlja i način karakterizacije relativne ekološke uspješnosti pojedinih mikroalgalnih vrsta na prilagodbu eksperimentalnom okruženju i mogućim stresorima. Charioui i sur. (2015) ispitivali su utjecaj f/2 podloge i Semenenkove podloge na rast mikroalge *Dunaliella* sp. Prema rezultatima dobivenima u navedenoj studiji uzgojem mikroalge *Dunaliella* sp. u f/2 hranjivoj podlozi dobiva se trenutni fiziološki odgovor mikroalgalne stanice, odnosno dobivene vrijednosti optičke gustoće mikroalgalne kulture puno su veće u odnosu na vrijednosti dobivene uzgojem mikroalge *Dunaliella* sp. u Semenenkovoj podlozi. Na temelju svih navedenih pozitivnih karakteristika f/2 podloge i pregleda dostupne literature uzgoja mikroalgi roda *Dunaliella* (Becerra-Dórame i sur., 2010; Achour i sur., 2019; Watsuji i sur., 2021; Cezare-Gomes i sur., 2022), kao hranjiva podloga za uzgoj mikroalge

*Dunaliella tertiolecta* tijekom izrade ovog doktorskog rada, odabrana je f/2 hranjiva podloga. Nadalje, osim zbog činjenice da se uporabom f/2 podloge, u odnosu na ostale podloge, za uzgoj mikroalgi roda *Dunaliella* postižu veće vrijednosti brzine rasta, f/2 podloga odabrana je i zbog dokazanog manjeg troška u ukupnom trošku procesa proizvodnje mikroalgalne biomase. Naime, prema istraživanju Colusse i sur. (2020) na temelju ekonomske analize svake testirane podloge (f/2, Conway, Johnson) utvrđeno je da f/2 podloga najmanje doprinosi ukupnom trošku proizvodnje mikroalgalne biomase. Doprinos f/2 podloge ukupnom trošku proizvodnje biomase je samo USD 4,64/kg, dok je doprinos Conway podloge, odnosno Johnson podloge ukupnom trošku proizvodnje biomase čak 3,50 (USD 16,24), odnosno 65,00 (USD 301,62) puta veći u odnosu na f/2 podlogu.

Isto kao i u prvom dijelu, tako je i u drugom dijelu doktorskog rada rast mikroalge *D. tertiolecta* uslijed izlaganja različitim koncentracijama selenita tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (100 mL) praćen spektrofotometrijskim mjerenjem, odnosno mjerenjem optičke gustoće kulture tijekom vremena. Iz krivulja rasta kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* prikazanih na slici 6a i slici 6b vidljivo je da su one oblika karakterističnog za rast jednostaničnih mikroorganizama. Naime, tijekom provođenja šaržnog uzgoja mikroalgalni rast, kao i rast ostalih mikroorganizama, sastoji se od 6 različitih faza, odnosno lag faze, ekspanzionalne faze, linearne faze, faze usporenog rasta, stacionarne faze i faze odumiranja. U lag fazi rasta mikroalgalni rast je odgođen, ili zbog prisutnosti mrtvih stanica mikroalgi u kulturi, ili zbog potrebne fiziološke prilagodbe mikroalgalnih stanica novim kultivacijskim uvjetima. Nakon lag faze rasta slijedi ekspanzionalna faza rasta u kojoj mikroalgalne stanice rastu i dijele se kao ekspanzionalna funkcija vremena. Za ekspanzionalnu fazu rasta karakteristično je da niti intenzitet osvjetljenja, niti koncentracija nutritijenata ne predstavljaju ograničavajuće faktore za mikroalgalni rast. U fazi linearnog rasta dolazi do usporavanja diobe mikroalgalnog rasta uslijed potrošnje hranjivih tvari prisutnih u podlozi, ili uslijed nakupljanja inhibitora. Fazu usporenog mikroalgalnog rasta karakterizira smanjenje brzine diobe stanica uslijed ograničavajućih faktora rasta kao što su smanjena koncentracija hranjivih tvari, ugljičnog dioksida (CO<sub>2</sub>), itd. Nadalje, u stacionarnoj fazi rasta, s obzirom da su sve hranjive tvari koje su bile prisutne u hranjivoj podlozi potrošene od strane mikroalgalnih stanica, ukupna brzina rasta je jednaka nuli. Osim toga, za stacionarnu fazu mikroalgalnog rasta karakteristično je da dolazi do nakupljanja skladišnih produkata ugljika kao što su molekule škroba i neutralnih lipida, koje predstavljaju važne proizvode mikroalgalne biomase. U fazi odumiranja, koja se također naziva i faza pada rasta, uslijed iscrpljivanja hranjivih tvari iz

hranjive podloge, pregrijavanja hranjive podloge i/ili promjene pH vrijednosti ili kontaminacije dolazi do brzog pada gustoće mikroalgalnih stanica (Lee i sur., 2015). Iz krivulja rasta kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* prikazanih na slici 6a i b vidljivo je da tijekom izvođenja oba eksperimenta, odnosno tijekom i jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja, mikroalgalne stanice naprije ulazu u lagu fazu rasta koja traje do 3. dana uzgoja. Nakon lag faze rasta slijede eksponencijalna faza, linearna faza i faza usporenog rasta koje traju do 9. dana uzgoja. Nakon 9. dana uzgoja slijedi stacionarna faza rasta koja traje sve do 14. dana uzgoja nakon čega započinje faza odumiranja. Uzgoj mikroalge *D. tertiolecta*, i tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog načina uzgoja u malim volumenima (100 mL), vođen je sve do smanjenja brzine rasta, odnosno smanjivanja gustoće stanica i ulaska mikroalgalnih stanica u stacionarnu fazu rasta.

Iz rezultata trećeg dijela doktorskog rada, odnosno krivulja rasta kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* uzgajanih u većem volumenu (2 L) (slika 16) može se vidjeti da mikroalgalne stanice najprije ulaze u lag fazu rasta koja traje samo jedan dan uzgoja. Naime, već od 1. dana uzgoja mikroalgalne stanice ulaze u eksponencijalnu fazu rasta koja traje sve do 11. dana uzgoja. Nakon 11. dana uzgoja slijedi stacionarna faza rasta koja traje do 14. dana uzgoja nakon čega započinje faza odumiranja. Iz krivulja rasta kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* uzgajanih u laboratorijskom fotobioreктору može se vidjeti da eksponencijalna faza rasta traje do 8. dana uzgoja nakon čega slijede stacionarna faza rasta i faza odumiranja. Prema rezultatima studije Chen i sur., 2011 tijekom provođenja šaržnog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u Erdschreiberovoj podlozi u tikvicama volumena 650 mL nakon inicijalne lag faze rasta, slijedi kratka eksponencijalna faza rasta u kojoj je postignuto vrijeme udvostručavanja od 19 h. Maksimalna brzina rasta biomase postignuta je 5. dan uzgoja., dok je već od 10. dana uzgoja zabilježena faza odumiranja. Prema studiji Tang i sur. (2011) tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u istoj hranjivoj podlozi maksimalna gustoća stanica ( $1.2 \times 10^7$  stanica mL<sup>-1</sup>) postignuta je 9. dan šaržnog uzgoja. Usporedbom rezultata prikazanih na slikama 6a i 6b i na slici 16 također se može zaključiti da, u odnosu na uzgoj u manjim volumenima (100 mL) u kojem mikroalgalne stanice dostižu stacionarnu fazu rasta 9. dan uzgoja, tijekom uzgoja u većim volumenima (2 L) stacionarna faza rasta dostignuta je 3 dana kasnije, odnosno 11. dan uzgoja. Razlog kasnijeg ulaska mikroalgalnih stanica u stacionarnu fazu rasta tijekom uzgoja u većim volumenima može se objasniti činjenicom da se tijekom uzgoja u većim volumenima, u odnosu na mikroalgalni uzgoj u manjim volumenima, stanice međusobno zasjenjuju. Naime, tijekom odvijanja fototrofnog mikroalgalnog uzgoja izvor i intenzitet osvjetljenja predstavljaju ključne

faktore uzgoja te je stoga od osobite važnosti osiguravanje konstante opskrbe osvjetljenja mikroalgalnim stanicama. Za molekule klorofila karakteristično je da imaju visoku efikasnost prikupljanja svjetlosti, odnosno mikroalgalne stanice, unatoč tome što ne mogu iskoristiti sve fotone, imaju sposobnost absorpcije velike količine svjetlosti koja dolazi do njih. Međutim, čak i u slučaju zadovoljavajućeg intenziteta osvjetljenja, odnosno kada je dovoljan broj fotona isporučen po površini osvjetljenja mikroalgalne kulture, s obzirom na činjenicu da fotoni ne mogu prodrijeti duboko u hranjivi mediji, tijekom uzgoja mikroalgi dolazi do značajnog smanjenja efikasnosti iskorištenja osvjetljenja od strane mikroalgalnih stanica. Nemogućnost prodora fotona duboko u hranjivi medij osobito je naglašen u gustim mikroalgalnim kulturama. Naime, u takvim kulturama opskrba mikroalgalnih stanica svjetlom zapravo postaje ograničena sa rastom koncentracije stanica u kulturi te se može zaključiti da, što je veća gustoća mikroalgalne kulture efekt međusobnog zasjenjivanja, odnosno samozasjenjivanja mikroalgalnih stanica, je veći. Samozasjenjivanje mikroalgalnih stanica u konačnici rezultira time da mikroalgalne stanice koje su udaljenije od površine osvjetljenja primaju manji intenzitet osvjetljenja što u konačnici rezultira manjom brzinom rasta (Park i Lee, 2001). Nadalje, u odnosu na kontrolne grupe mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u Erlenmeyer tikvicama u manjem volumenu (100 mL) i većem volumenu (2 L), za kontrolne grupe mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru zabilježeno je da najprije postižu stacionarnu fazu rasta, odnosno već 8. dan uzgoja. Osim toga, u odnosu na uzgoje u Erlenmeyer tikvicama (100 mL i 2 L) koji traju 15. dana, uzgoji u laboratorijskom fotobioreaktoru traju 2 dana kraće, odnosno 13. dana. Razlog ranijeg ulaska kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* u stacionarnu fazu rasta te kraćeg trajanja uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru, u odnosu na uzgoje u Erlenmeyer tikvicama, može se objasniti činjenicom da je tijekom provođenja uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru moguće postići i održavati sve potrebne uvjete za odvijanje procesa fototrofnog uzgoja mikroalgi kao što je npr. opskrba određenog izvora i intenziteta osvjetljenja, određenih nutrijenata (ugljik, dušik, fosfor, itd.), održavanje adekvatnih pH vrijednosti i temperature, itd. Osim prethodno navedenih parametara, tijekom provođenja uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru također je moguće provoditi konstantno miješanje kulture s ciljem minimiziranja gradijenata određenih parametara (pH, temperatura, koncentracija nutrijenata) i na taj način povećati prinos u biološkim sustavima (Posten, 2009; Acien Fernández i sur., 2013a). S obzirom na činjenicu da je tijekom provođenja mikroalgalnog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru moguće konstantno osiguravanje optimalnih mikroalgalnih uvjeta (temperatura, pH, intenzitet osvjetljenja, koncentracija nutrijenata, koncentracija CO<sub>2</sub>), fotobioreaktori se smatraju idealnim sustavima za uzgoj mikroalgi (Sirohi

i sur., 2022). Nedavni razvoj i brojne inovacije u području inženjerstva fotobioreaktora dodatno su povećali naglasak i važnost razvoja bioprocesnog inženjerstva u smjeru smanjenja troškova proizvodnje proizvoda iz mikroalgalne biomase i prepoznavanja svih mogućnosti koje mikroalge nude (Sirohi i sur., 2022). Naime, mikroalge, kao fotosintetske organizme, karakterizira sposobnost proizvodnje značajnih količina lipida, proteina i ugljikohidrata u relativno kratkom vremenu (Deprá i sur., 2019). Navedeni mikroalgalni proizvodi su od osobite važnosti s obzirom da se mogu koristiti kao sirovine za proizvodnju biogoriva i ostalih visoko vrijednih nusproizvoda (Brennan i Owende, 2010; D'Alessandro i Antoniosi Filho, 2016; Barta i sur., 2021; de Carvalho Silvello i sur., 2022). Nadalje, iz krivulja rasta mikroalge *D. tertiolecta* dobivenih tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjim volumenima (100 mL) u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita (slika 6a i 6b) može se zaključiti da u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale niske koncentracije selenita (0,31, 0,62, 1,25 mg L<sup>-1</sup>) tijekom cijelog vremena trajanja oba načina uzgoja nije zabilježen inhibicioni efekt selena na mikroalgalni rast. Suprotno tomu, tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita (10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>), inhibicioni efekt selena na rast mikroalge *D. tertiolecta* zabilježen je već od 5. dana (40,00 mg L<sup>-1</sup>), odnosno 7 dana uzgoja (10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup>). Od 9. dana, pa sve do kraja uzgoja, osim na spomenutim višim koncentracijama selenita (10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) inhibicioni efekt selena na rast mikroalge *D. tertiolecta* zabilježen je i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 2,50 i 5,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Zadnji dan, odnosno 15. dan uzgoja, u f/2 hranjivim podlogama koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita (10,00, 20,00, 40,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježena je najveća razina inhibicijskog djelovanja selena na mikroalgalni rast (preko 80 %). Nadalje, u odnosu na jednostupanjski uzgoj tijekom kojeg su kulture mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale koncentracije selenita od 2,50 do 40,00 mg L<sup>-1</sup> dostignule stacionarnu fazu rasta prije 9. dana uzgoja, u dvostupanjskom uzgoju mikroalgalne kulture koje su sadržavale jednake testirane koncentracije selenita (2,50–40,00 mg L<sup>-1</sup>) stacionarnu fazu rasta dostignule su 10. dan uzgoja, odnosno 1. dan izlaganja selenitu. Osim toga, suprotno jednostupanjskom uzgoju, tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja inhibicioni efekt selenita na mikroalgalni rast zabilježen je tek tijekom 12. dana uzgoja na višim testiranim koncentracijama (20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) selenita. Osim na višim testiranim koncentracijama, tijekom 14. i 15. dana dvostupanjskog uzgoja inhibicioni efekt selenita na mikroalgalni rast također je zabilježen i u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 5,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Kasniji ulazak mikroalgalnih kultura u stacionarnu fazu rasta te kasniji početak inhibicionog djelovanja selenita na mikroalgalni rast (tek tijekom 12. dana



dvostupanjskog uzgoja), u odnosu na jednostupanjski uzgoj, može se pripisati mikroalgalnoj kultivacijskoj strategiji koja se koristi, odnosno dvostupanjskom načinu uzgoja mikroalgi.

Prema brojnim studijama primjena odgovarajućeg načina uzgoja mikroalgi ima značajan utjecaj na efikasnost produkcije mikroalgalne biomase i određenih mikroalgalnih proizvoda kao npr. lipida (Nagappan i sur., 2019; Amaral i sur., 2020; Trivedi i sur., 2022). Pet je osnovnih načina uzgoja mikroalgi: šaržni proces, šaržni proces s pritokom supstrata, polukontinuirani proces, kontinuirani proces i dvostupanjski uzgoj (eng. *two-stage cultivation strategies*, TSCS) (Aziz i sur., 2020; Ryu i sur., 2019). Tijekom provođenja šaržnog i kontinuiranog načina uzgoja mikroalgi nije zabilježeno postizanje visokih vrijednosti lipidne produktivnosti (Ho i sur., 2014). Suprotno tomu, tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja ili primjenom polukontinuiranog načina vođenja procesa, zabilježeno je značajno povećanje vrijednosti lipidne produktivnosti (Bhujade i sur., 2017; Singh i sur., 2014; Narala i sur., 2016). S obzirom na činjenicu da primjena stresnih faktora tijekom mikroalgalne kultivacije često ima negativan utjecaj na mikroalgalni rast, istraživanja i razvoj u području dvostupanjskog mikroalgalnog načina uzgoja predstavljaju važan iskorak prema razvoju ekonomski održivog procesa proizvodnje mikroalgalne biomase i određenih mikroalgalnih produkata (lipida, proteina, ugljikohidrata). Naime, primjena stresnih faktora tijekom uzgoja mikroalgi, osim što negativno utječe na mikroalgalni rast, u konačnici rezultira i nižom ukupnom vrijednošću lipidne produktivnosti procesa. Ukoliko tijekom provođenja uzgoja mikroalgi nije postignuta određena vrijednost koncentracije biomase i udjela lipida u mikroalgalnoj stanici, odnosno određena vrijednost lipidne produktivnosti, proces se ne može smatrati ekonomski održivim (Shokravi i sur., 2020). Jedan od načina poboljšanja efikasnosti mikroalgalnih kultivacijskih sistema, odnosno načina povećanja i produktivnosti biomase i prinosa mikroalgalnih lipida je primjena odgovarajućeg načina uzgoja mikroalgi (Garrido-Cardenas i sur., 2018). Trenutno postoji nekoliko studija koje se bave razvojem dvostupanjskog načina uzgoja mikroalgi u kojem se također koriste različiti induktori sinteze lipida. Tako je u studijama Liang i sur. (2019), Che i sur. (2016) i Chen i sur. (2019) uporabom stresora kao što su fulvinska kiselina, trietilamin i natrijev azid, u drugoj fazi dvostupanjskog načina uzgoja mikroalgi, zabilježeno značajno povećanje udjela lipida u mikroalgama *Dunaliella tertiolecta* i *Monoraphidium* sp. U studiji Sun i sur. (2014) dodatak željeza ( $Fe^{3+}$ ) u hranjivu podlogu u drugoj fazi dvostupanjskog načina uzgoja mikroalgi, uz limitaciju dušikom i uz visoki intenzitet osvjetljenja, rezultirao je akumulacijom lipida u mikroalgi *Neochloris oleoabundans*. Rashid i sur. (2015) proučavali su

utjecaj različitih intenziteta osvjetljenja i koncentracije nutrijenata tijekom dvostupanjskog načina uzgoja na brzinu rasta i sintezu lipida mikroalge *Chlorella vulgaris*. Prema rezultatima dobivenima u navedenoj studiji primjenom dvostupanjskog načina uzgoja postignuto je značajno povećanje brzine rasta kulture mikroalgi te povećanje prinosa lipida. Nadalje, iz rezultata prikazanih na slikama 6a i 6b također se može zaključiti da se tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na višim testiranim koncentracijama selenita (10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) postižu otprilike dva puta veće vrijednosti maksimalne gustoće stanica u odnosu na iste mikroalgalne kulture tijekom jednostupanjskog uzgoja. Veći prinos biomase dobiven tijekom dvostupanjskog uzgoja, u odnosu na jednostupanjski uzgoj, također se može pripisati primjeni dvostupanjskog načina mikroalgalnog uzgoja. Naime, tijekom prve faze dvostupanjskog načina uzgoja mikroalge se uzgajaju u mediju koji zadovoljava sve nutritivne potrebe mikroalgálnih stanica te se na taj način postižu maksimalne vrijednosti produktivnosti biomase. Za drugu fazu dvostupanjskog uzgoja karakteristična je primjena određenog faktora stresa s ciljem povećanja akumulacije neutralnih lipida u stanici mikroalge. Druga faza dvostupanjskog mikroalgalnog uzgoja počinje u trenutku kada se u prvoj fazi uzgoja postigne maksimalna koncentracija biomase. Iz rezultata prikazanih na slici 6b može se zaključiti da se maksimalna koncentracija biomase tijekom dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (100 mL) postiže 9. dan uzgoja, odnosno u tom trenutku počinje druga faza dvostupanjskog uzgoja. U sklopu ovog istraživanja jednostupanjski uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* predstavlja šaržni uzgoj u kojem su različite testirane koncentracije selenita (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) dodane u f/2 hranjivu podlogu na početka uzgoja (0. dan uzgoja). Suprotno jednostupanjskom, dvostupanjski mikroalgální uzgoj sastoji se od dvije faze. Prvu fazu dvostupanjskog uzgoja karakterizira osiguravanje optimalnih kultivacijskih uvjeta s ciljem postizanja maksimalne produktivnosti biomase. Postizanjem stacionarne faze mikroalgalnog rasta završava prva faza, odnosno počinje druga faza dvostupanjskog uzgoja. Druga faza dvostupanjskog uzgoja predstavlja fazu stresa, odnosno, u sklopu izrade ovog doktorskog rada, fazu u kojoj se u f/2 hranjivu podlogu dodaju različite koncentracije selenita te na taj način potiče indukcija sinteze željenih mikroalgálnih komponenata (Liyanaarachchi i sur., 2021).

U trećem dijelu doktorskog rada dodatno se ispitivao utjecaj onih koncentracija natrijevog selenita za koje je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da najviše pogoduju nakupljanju neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Naime, s obzirom na rezultate dobivene u drugom dijelu (slika 6a i slika 6b), u trećem dijelu doktorskog rada ispitivao se utjecaj koncentracija selenita od 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Osim prethodno navedenih koncentracija

selenita, u trećem dijelu doktorskog rada dodatno se ispitivao i utjecaj koncentracije selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup>. Razlog dodatnog ispitivanja utjecaja koncentracije selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup> je veći volumen Erlenmeyer tikvica u kojem se treći dio doktorskog rada, u odnosu na drugi dio rada, provodio. Naime, s obzirom na veći volumen tikvice i time veću dubinu mikroalgalne kulture tijekom provođenja trećeg dijela doktorskog rada, može se zaključiti da se mikroalgalne stanice međusobno više zasjenjuju što rezultira smanjenom brzinom rasta i posljedično tomu mogućem drugačijem mikroalgalnom odgovoru na različite koncentracije selenita. Usporedbom rezultata gustoće stanica mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom dvostupanjskog uzgoja u različitim mjerilima može se zaključiti da je u manjem mjerilu (100 mL) inhibicijski učinak selenita na mikroalgalni rast primjetan već 12. dana uzgoja (2. dan nakon dodavanja selenita u medij), dok je u većem mjerilu (2 L) takav učinak zabilježen tek od predzadnjeg, odnosno 14. dana uzgoja. Naime, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita inhibitorno djelovanje selenita na mikroalgalni rast zabilježeno je tijekom 14. i 15. dana uzgoja, dok je u kulturama koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita inhibitorno djelovanje selenita na mikroalgalni rast zabilježeno tek 15. dan uzgoja. Brži odgovor mikroalgalnih stanica na selenit tijekom uzgoja u manjim volumenima (100 mL), u odnosu na uzgoj u većim volumenima (2 L), također se može objasniti fenomenom samozasjenjivanja mikroalgalnih stanica. Naime, za mikroalgalne kulture karakteristično je da svjetlost primaju preko osvijetljene površine sustava u kojoj se mikroalgalni uzgoj provodi. Energija svjetla kojoj je mikroalgalna stanica izložena te distribucija osvijetljenja determinirani su omjerom osvijetljene površine mikroalgalne kulture i volumena kulture. Generalno, što je omjer s/v veći (s=površina mikroalgalne kulture koja je osvijetljena; v=volumen kulture), odnosno što je volumen kulture manji, moguće je postizanje veće gustoće stanica i veće vrijednosti volumetrijske produktivnosti procesa (Lee, 2016).

Prema rezultatima prikazanima na slici 26b vidljivo je da je tijekom dvostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* u f/2 hranjivoj podozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru najveća gustoća stanica ( $43,11 \times 10^5$  stanice mL<sup>-1</sup>) postignuta 10. dan uzgoja, odnosno 3 dana ranije u odnosu na kulturu mikrolage *D. tertiolecta* uzgajanu na istoj koncentraciji selenita (20,00 mg L<sup>-1</sup>) u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvica volumena 2 L), kada je najveća vrijednost gustoće stanica postignuta 14. dan uzgoja. Također, maksimalna gustoća stanica postignuta tijekom dvostupanjskog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru je 1,46 puta veća u odnosu na maksimalnu gustoću stanica postignutu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na istoj koncentraciji selenita (20,00 mg L<sup>-1</sup>) u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvica volumena 2 L). Veća vrijednost maksimalne gustoće stanica postignute

tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru, u odnosu na uzgoj u Erlenmeyer tikvici volumena 2 L, može se objasniti činjenicom da mikroalgalni uzgoj u laboratorijskom fotobioreaktoru ima određene prednosti u odnosu na uzgoj mikroalgi u tikvicama. Neke od prednosti uzgoja mikroalgi u laboratorijskom fotobioreaktoru u odnosu na uzgoj u tikvicama su: mogućnost postizanja veće vrijednosti produktivnosti biomase (u fotobioreaktoru se može proizvesti ista količina mikroalgalne biomase u mnogo kraćem vremenu trajanja uzgoja u odnosu na uzgoj u tikvicama); bolja kontrola okolišnih uvjeta (fotobioreaktori osiguravaju bolju kontrolu okolišnih faktora kao što su temperatura, intenzitet osvjetljenja, pH vrijednost, odnosno parametri koji predstavljaju kritične parametre za rast mikroalgi; optimizacijom navedenih uvjeta uzgoja moguće je postići visoke vrijednosti prinosa mikroalgalne biomase); smanjenje rizika kontaminacije (fotobioreaktori predstavljaju zatvorene sustave i stoga omogućavaju puno bolju zaštitu mikroalgalnih kultura od kontaminacije bakterijama ili drugim neželjenim mikroorganizmima; Erlenmeyer tikvice su puno podložnije riziku kontaminacije); lakše uvećanje mjerila (fotobioreaktori mogu biti jednostavno uvećani s ciljem proizvodnje veće količine mikroalgalne biomase što ih čini prikladnijima za komercijalnu produkciju mikroalgalne biomase i različitih proizvoda, dok su Erlenmeyer tikvice pogodnije za provođenje laboratorijskih eksperimenata u manjem mjerilu); efikasnost energije (fotobioreaktori su dizajnirani na način da se postigne lakša i efikasnija apsorpcija i korištenje svjetlosne energije što rezultira smanjenjem ukupne potrošnje eergije koja je potrebna za mikroalgalnu kultivaciju, dok je za provođenje uzgoja u Erlenmeyer tikvicama potrebna puno veća količina topline i osvjetljenja). Na temelju svih navedenih prednosti može se zaključiti da je uzgoj mikroalgi u fotobioreaktorima puno efikasniji i pouzdaniji način uzgoja u odnosu na uzgoj u Erlenmeyer tikvicama, osobito za proizvodnju mikroalgalne biomase i produkata u većem mjerilu.

Osim inhibitornog učinka selena, tijekom provođenja eksperimenata također je zabilježen i stimulativni efekt selena na mikroalgalni rast. Stimulativni efekt selena na mikroalgalni rast zabilježen je tijekom oba načina uzgoja, odnosno tijekom i jednostupanjskog i dvostupanjskog načina uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita. Naime, tijekom jednostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na mikroalgalni rast zabilježen je 3. dan uzgoja u kulturama mikrolagi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, dok je tijekom dvostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na mikroalgalni rast zabilježen predzadnji i zadnji dan uzgoja, odnosno 14. i 15. dan uzgoja, u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 0.31 mg L<sup>-1</sup> selenita. Uočena razlika u vremenu početka stimulativnog efekta selena na mikroalgalni

rast između jednostupanjskog i dvostupanjskog načina uzgoja može se objasniti razlikom u načinu uzgoja mikroalgi. Naime, tijekom jednostupanjskog uzgoja različite testirane koncentracije selenita dodaju se u f/2 hranjivu podlogu odmah na početku uzgoja, tj. 0. dan uzgoja, dok se tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* različite koncentracije selenita dodaju u hranjivu podlogu 9. dan uzgoja, odnosno u trenutku kada počinje rana stacionarna faza rasta mikroalgi. Iz rezultata prikazanih na slici 16 također se može zaključiti da je stimulativni efekt selenita na mikroalgalni rast postignut tijekom dvostupanjskog uzgoja u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) manji, u odnosu na stimulativni efekt selenita postignut u manjem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 100 mL). Naime, maksimalni stimulativni efekt selenita na mikroalgalni rast postignut tijekom dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (7,55 % ) zabilježen je 15. dan uzgoja u kulturi mikroalge koja je sadržavala 0,31 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bio 2,31 puta veći u odnosu na maksimalno postignuti stimulativni efekt selenita tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (17,47 % ) (postignut je u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja). Također, maksimalna gustoća stanica postignuta dvostupanjskim uzgojem u manjem mjerilu (40,36x10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>) veća je za 1,29 puta u odnosu na maksimalnu gustoću stanica postignutu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalgi na različitim koncentracijama selenita u većem mjerilu (31,38x10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>). Najveća gustoća stanica (48,47x10<sup>5</sup> stanica mL<sup>-1</sup>) postignuta je tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru u podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Razlika između stimulativnog efekta selena na mikroalgalni rast tijekom uzgoja u različitim mjerilima također se može objasniti razlikama u samozasjenjivanju mikroalgalnih stanica s obzirom na različite volumene sustava u kojima se uzgoji mikroalgi provode (Lee, 2016).

Prema velikom broju znanstvenih studija selen je okarakteriziran kao prirodni element u tragovima koji je metabolički esencijalan za ljude, ali i za mnoge vrste mikroalgi i bakterija. Selen je neophodan za rast najmanje 33 vrste mikroalgi, posebno za zelene mikroalge koje imaju sposobnost asimilacije anorganskog oblika selena i njegove ugradnje u aminokiseline putem metaboličkog puta asimilacije sumpora. Selen kao mikronutrijent ima važnu ulogu u održavanju redoks homeostaze organizma i posljedično tomu može imati pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje kao npr. prevencija raka i srčanih bolesti, jačanje imunoloških funkcija i reguliranje procesa starenja (Gojković i sur., 2015). Jedno od mogućih objašnjenja stimulativnog efekta selena na rast morske mikroalge *D. tertiolecta* tijekom uzgoja u različitim mjerilima je povećana aktivnost selenoproteina. Naime, funkcija selena u organizmu uglavnom

je posredovana selenoproteinima. Nakon što su molekule Se apsorbirane od strane mikroalgi, zahvaljujući svojoj kemijskoj sličnosti sa molekulama sumpora, molekule selena mogu ući u sumpor reduktivni asimilacijski put kojim se konvertiraju do molekule selenida koje dalje predstavljaju supstrate za sintezu Se-aminokiselina, odnosno selenocisteina (SeCys) i selenometionina (SeMet) (Schiavon i sur., 2012). Mikroalge kojima je selen metabolički esencijalan posjeduju mehanizme kontroliranja specifične ugradnje Se-aminokiseline selenocistein (SeCys) u katalitičko mjesto esencijalnih selenoproteina (Schiavon i sur., 2012). Većina identificiranih mikroalgarnih selenoproteina pripadaju skupini oksidoreduktaza koje za svoju aktivnost na katalitičkom mjestu zahtijevaju jaku nukeofilnost molekule selena (Araie i Shiraiwa, 2009). Povećana aktivnost selenoproteina rezultira efikasnijim uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*; ROS) i posljedično tomu povećanjem brzine rasta mikroalge. Mikroalge također imaju sposobnost aktivacije specifičnih obrambenih mehanizama kao odgovor na toksičnost selena, prvenstveno stimulaciju aktivnosti antioksidativnih enzima i/ili sintezu neenzimskih molekula, kao i aktivaciju metaboličkih puteva koji potiču prevođenje molekula selena u manje toksične hlapljive spojeve dimetildiselenida (DMDS<sub>2</sub>) i/ili dimetilselenida (DMS<sub>2</sub>) (Schiavon i sur., 2012).

Dobiveni rezultati utjecaja selena na rast mikrolage *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije i u različitim mjerilima unutar ovog doktorskog rada u skladu su s rezultatima drugih studija (Dazhi i sur., 2003; Zheng i sur., 2017; Zhong i Cheng, 2017; Jiang i sur., 2023; Guimarães i sur., 2023). Naime, stimulacija mikroalgarnog rasta uslijed izlaganja selenu zabilježena je za mnoge mikroalgalne vrste kao npr. *Dunaliella salina* (Dazhi i sur., 2003), *Chlorella pyrenoidosa* (Zhong i Cheng, 2017), *Amphiprora hyalina* (Harrison i sur., 1988), *Alexandrium minutum* (Doblin i sur., 1999), *Spirulina platensis* (Li i sur., 2003); *Thalassiosira pseudonana* (Price i sur., 1987), *Gymnodinium catenatum* (Doblin i sur., 1999), *Chaetoceros cf. tenuissimus* (Doblin i sur., 1999). Prema istraživanju Reunova i sur. (2007) koncentracije selenita u rasponu od 0,01 do 0,50 mg L<sup>-1</sup> pokazale su stimulatívni efekt na rast mikroalge *D. salina* tijekom 14. dana jednostupanjskog uzgoja dok je prema istraživanju (Dazhi i sur., 2003) koncentracija selenita od 5,00 mg L<sup>-1</sup> stimulirala rast 4 vrste mikroalgi, odnosno *D. salina*, *D. bardawill*, *S. platensis*, *P. tricorutum*. Suprotno navedenim studijama, u studiji Zheng i sur. (2017) niske testirane koncentracije selenita (3,00 mg L<sup>-1</sup>) nisu pokazale stimulatívni efekt na brzinu rasta mikroalge *Hematococcus pluvialis*, odnosno gustoća stanica mikroalgarnih kultura tretiranih selenom nije bila značajno veća u odnosu na gustoću stanica kontrolnih grupa. Opisana razlika u djelovanju selena na različite mikroalgalne vrste može se objasniti činjenicom

da je raspon koncentracija selenita, pri kojem selen djeluje pozitivno na rast mikroalgalnih stanica, obično uzak i varira ovisno o mikroalgalnoj vrsti i izvoru selena (Gojkovic i sur., 2015). Inhibitorski efekt selena također je zabilježen u mnogim mikroalgalnim vrstama kao npr. *Dunaliella salina* ( $> 250,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Jiang i sur., 2023), *Hematococcus pluvialis* ( $> 13,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Zheng i sur., 2017), *Chlorella pyrenoisoda* ( $> 40,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Zhong i Cheng, 2017), *Nannochloropsis oceanica* ( $> 90,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Guimarães i sur., 2023), *Chlorella pyrenoides* ( $> 10,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Zhao i sur., 2019).

## **5.2. Utjecaj selena na fotosintetsku aktivnost mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije**

U svrhu razumijevanja utjecaja selena na fotosintetsku aktivnost mikroalge *D. tertiolecta* praćena je i koncentracija fotosintetskih pigmenata tijekom uzgoja, odnosno koncentracija klorofila a i b. Smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenata uslijed izlaganja mikroalgalne kulture različitim koncentracijama selenita predstavlja rani odgovor mikroalgalne stanice na toksičnost selena i upućuje na smanjenu mikroalgalnu fotosintetsku aktivnost. Opseg učinka selena na mikroalgalnu fotosintetsku aktivnost ponajviše ovisi o koncentraciji selena kojoj je mikroalgalna kultura izložena te u manjoj mjeri vremenu izlaganja selenu i uvjetima uzgoja (intenzitet osvjetljenja, temperatura i pH vrijednosti kulturnog medija) (Zhong i Cheng, 2017).

Iz rezultata koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofil a i b) dobivenih tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u manjim volumenima (100 mL) na različitim testiranim koncentracijama selenita ( $0,31 - 40,00 \text{ mg L}^{-1}$ ) može se vidjeti da je tijekom provođenja i jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u određenim mikroalgalnim kulturama zabilježeno značajno povećanje koncentracije oba fotosintetska pigmenta (klorofila a i b). Tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja povećanje koncentracije klorofila a i klorofila b zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita, odnosno  $10,00$  i  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja povećanje koncentracije klorofila a zabilježeno je u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale  $1,25-40,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita, dok je povećanje koncentracije klorofila b zabilježeno samo u kulturama koje su sadržavale najnižu testiranu koncentraciju selenita ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ). Tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja kulture mikroalge *D. tertiolecta* izložene su različitim koncentracijama selenita od početka trajanja uzgoja, dok su tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalgalne stanice izložene različitim koncentracijama selenita tek od 9. dana uzgoja, odnosno od 0. dana druge faze (II) dvostupanjskog uzgoja.

Iz rezultata koncentracije fotosintetskih pigmenata može se zaključiti da je, u odnosu na jednostupanjski uzgoj, tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* stimulativni efekt selena na sintezu fotosintetskih pigmenata puno izraženiji. Naime, tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na sintezu klorofila a zabilježen je na skoro svim testiranim koncentracijama selenita ( $1,25-40,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), dok je stimulativni efekt selenita na sintezu klorofila a tijekom provođenja jednostupanjskog uzgoja zabilježen samo u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale  $10,00$  i  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  selenita.

Nadalje, tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na sintezu klorofila b zabilježen je samo predzadnji i zadnji, odnosno 14. i 15. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala nižu koncentraciju selenita ( $0,31 \text{ mg L}^{-1}$ ), dok je tijekom jednostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na sintezu klorofila b zabilježen 5. i 10. dan uzgoja u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita ( $10,00$  i  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$ ). Povećanje koncentracije klorofila uslijed izlaganja mikroalgalne kulture različitim koncentracijama selenita može se objasniti antioksidativnim djelovanjem određenih enzima u mikroalgalnoj stanici. Naime, ovisno o vremenu izlaganja i koncentraciji selenita kojoj je mikroalgalna stanica izložena, selen se može ponašati kao antioksidans pri čemu dolazi po povećanja aktivnosti određenih antioksidativnih enzima (superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GR)) (Sun i sur., 2014). Kroz literaturu zabilježeno je puno načina izražavanja toksičnosti metala, kao npr. selena, na različite morske mikroalgalne vrste. Jedan od načina izražavanje je promjenom koncentracije ROS-ova unutar mikroalgalne stanice tijekom vremena (Perl-Treves i Galun, 1991.; Okamoto i sur., 1996). Naime, uslijed izlaganja mikroalgalnih kultura različitim stresnim uvjetima dolazi do povećanja koncentracije ROS-ova, kao npr. superoksid aniona ( $\text{O}_2^-$ ), vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), singletnog kisika ( $^1\text{O}_2$ ) i hidroksilnog radikala ( $\text{HO}\cdot$ ). Navedeni ROS-ovi uzrokuju disrupciju ravnoteže koncentracije prooksidansa i antioksidansa i na taj način dovode do stanja oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici (Bowler i sur., 1992). S obzirom da izlaganje mikroalgalnih stanica metalima može rezultirati stanjem oksidativnog stresa, indukcija antioksidativnih enzima, kao npr. enzima koji sadrže selen (glutacion peroksidaza (GSH-Px) i superoksid dismutaza (SOD)), od velike je važnosti te predstavlja mehanizam obrane mikroalgalnih stanica od stresa (Bowler i sur., 1992; Eshdat i sur., 1997; Pelah i Cohen, 2005). Nadalje, izraženiji stimulativni efekt selena na koncentraciju fotosintetskih pigmenta tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja, u odnosu na jednostupanjski uzgoj, može se objasniti činjenicom da fotosintetska aktivnost mikroalgalnih vrsta uvelike ovisi o načinu provođenja



uzgoja mikroalgi. Nadalje, iz dobivenih rezultata jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u manjem mjerilu (100 mL) također se može zaključiti da izlaganje mikroalge višim testiranim koncentracijama selenita (20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) rezultira smanjenjem udjela oba fotosintetska pigmenta tijekom oba načina kultivacije. Naime, tijekom odvijanja jednostupanjskog uzgoja smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenta bilo je vidljivo već 5. dan uzgoja, dok je smanjenje udjela fotosintetskih pigmenta tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja bilo vidljivo tek 14. dan uzgoja, odnosno 5. dan izlaganja kulture mikroalge *D. tertiolecta* selenitu. Opisana razlika u počecima inhibitornog djelovanja selenita na sintezu fotosintetskih pigmenta može se objasniti činjenicom da su mikroalgalne stanice tijekom dvostupanjskog uzgoja bile izložene različitim koncentracijama selenita tek nakon 9. dana uzgoja, dok su stanice mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane jednostupanjskim načinom uzgoja na različitim koncentracijama selenita bile izložene već od početka eksperimenta, odnosno od 0. dana uzgoja. Na temelju rezultata prikazanih na slici 7, slici 8. i slici 9 može se zaključiti, da u odnosu na stimulativni efekt selenita na sintezu fotosintetskih pigmenta koji je bio izraženiji tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja, inhibitorni efekt selenita na udio fotosintetskih pigmenta izraženiji je tijekom odvijanja jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta*. Tako je tijekom odvijanja jednostupanjskog uzgoja najveći inhibitorni efekt klorofila a (88,10 %) postignut 10. dan uzgoja u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bio 1,49 puta veći u odnosu na najveći inhibitorni efekt sinteze klorofila a (59,30 %) postignut tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja (15. dan uzgoja u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Najveći inhibitorni efekt klorofila b (96,10 %) postignut je 10. dan jednostupanjskog uzgoja u mikroalgalnoj kulturi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te je bio 1,26 puta veći u odnosu na najveći inhibitorni efekt (76,13 %) postignut tijekom dvostupanjskog uzgoja (15. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Nadalje, maksimalna koncentracija klorofila a (2,61 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.) tijekom dvostupanjskog uzgoja postignuta je u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 12. dan uzgoja, dok je maksimalna koncentracija klorofila a (2,83 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.) postignuta tijekom jednostupanjskog uzgoja također detektirana u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, 10. dan uzgoja.. Nadalje, maksimalna koncentracija klorofila b tijekom dvostupanjskog uzgoja postignuta je u kulturi koja je sadržavala 2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. dan uzgoja (2,94 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.), dok je maksimalna koncentracija klorofila b tijekom jednostupanjskog uzgoja (6,61 µg mg<sup>-1</sup> suhe tv.) postignuta 10. dan uzgoja u kulturi koja je sadržavala 10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Smanjenje koncentracije fotosintetskih pigmenta uslijed izlaganja mikroalge *D. tertiolecta* različitim koncentracijama

selenita može se objasniti činjenicom da više koncentracije selenita rezultiraju akumulacijom ROS-ova i stoga induciraju stanje oksidativnog stresa u stanici mikroalge (Liu i sur., 2012). Drugo moguće objašnjenje je da uslijed kemijske sličnosti između molekule selena i molekule sumpora, a u slučaju nedostatka molekula sumpora u mikroalgarnom kulturnom mediju te na taj način smanjenja kompeticije između molekula selena i molekula sumpora, dolazi do povećanja potrošnje molekula selena od strane mikroalgarnih stanica (Guimarães i sur., 2022). Opisana pojava dovodi do disrupcije fotosintetskog lanca transporta elektrona uzrokujući značajno smanjenje primarne produkcije biomase. Naime, fotosintetski transport elektrona odvija se na tilakoidnim membranama kloroplasta. Tilakodine membrane unutar kloroplasta predstavljaju lipidnu dvojslojnu membranu raspoređenu na način da tvori zatvoreni sustav koji odvaja intratilakoidni prostor (lumen) od strome koja okružuje vanjsku membranu tilakoida. Glavne komponente uključene u fotosintetski transport elektrona, a nalaze se na tilakoidnim membranama kloroplasta, su: fotosistem II (PS II) (oksidoreduktaza koja je povezana sa kompleksom za prikupljanje svjetlosti (LCH II), citokrom  $b_6f$  kompleks (Cyt  $b_6f$ ), fotosistem I (PS I) (oksidoreduktaza), ATP sintaza (ATP hidrolaza koja prenosi protone) (Allen i sur., 2011). U slučaju izlaganja mikroalgarnog kulture selenu, kloroplast predstavlja najintenzivnije pogođenu organelu mikroalgarnog stanice. To se također može potvrditi ultrastrukturnim promjenama koje su uobičajne kod svih ispitivanih zelenih mikroalgarnih vrsta u slučaju izlaganja selenu. Ultrastrukturne promjene, odnosno modifikacije uključuju: tilakodine membrane nalik otiscima prstiju (smanjene, odnosno stisnute regije), gusti citosl, granulirana i manje gusta stroma, autofagne vakuole, prekomjerna proizvodnja škroba, itd. (Babaei i sur., 2017). Opseg navedenih ultrastrukturnih promjena ovisi ponajprije o koncentraciji selena kojoj je mikroalgarna stanica izložena. Nadalje, fotosintetski transport elektrona između fotosistema I (PS I) i fotosistema II (PS II) odvija se preko lanca nosača elektrona kroz seriju reakcija transporta elektrona od višeg prema nižem redoks potencijalu (Masojídek i sur., 2013). Za prethodno navedene komponente koje su uključene u fotosintetski transport elektrona karakteristično je da su neravnomjerno raspoređene unutar tilakodne membrane kloroplasta. Način na koji selen utječe na fotosintetski transport elektrona je moguća modifikacija kompleksa citokrom  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ) (Araie i Shiraiwa, 2016; Li i sur., 2003). Kao što je prethodno opisano, uslijed kemijske sličnosti između molekula sumpora i molekula selena, može doći do zamjene molekule sumpora sa molekulom selena u strukturi željezo–sumpor proteina (eng. *iron-sulphur protein*) koji predstavlja strukturni dio kompleksa citokrom  $b_6f$ . S obzirom da kompleks Cyt $b_6f$  ima važnu ulogu transportera elektrona od fotosistema II (PS II) do fotosistema I (PS I), opisana zamjena molekula rezultira malformacijom navedenog kompleksa

i posljedično tomu može rezultirati disrupcijom fotosintetskog lanca transporta elektrona (Geoffroy i sur., 2007). Drugo moguće objašnjenje je da, uslijed izlaganja mikroalge *D. tertiolecta* različitim koncentracijama selenita, više testirane koncentracije selenita sprječavaju fotosintetski transport elektrona između PSII i PSI uslijed prekomjerne redukcije prijenosnika elektrona plastokinona zbog čega dolazi do promjene između ekscitacije i brzine prijenosa elektrona što rezultira smanjenjem stanja reakcijskog centra fotosistema II (Babaei i sur., 2017). Nadalje, iz rezultata utjecaja viših testiranih koncentracija selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) na koncentraciju fotosintetskih pigmenata tijekom dvostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* u većem mjerilu (2 L) (slike 18 i 19) može se zaključiti da je inhibitorni efekt selenita na sintezu fotosintetskih pigmenata vidljiv na svim testiranim koncentracijama selenita već od 10. dana uzgoja. Razlike u utjecaju selena na fotosintetsku aktivnost mikroalgi tijekom provođenja uzgoja u različitim mjerilima (100 mL/2 L) može se objasniti činjenicom da tijekom mikroalgalnog uzgoja vrijednosti produktivnosti procesa i prinosa biomase uvelike ovisi o gustoći same mikroalgalne kulture. Naime, ukoliko je početna gustoća stanica mikroalgalne kulture preniska dolazi do pojave fotoinhibicije te posljedično tome do smanjenja produktivnosti procesa. Suprotno tomu, do smanjenja produktivnosti procesa također može doći i u „gustim“ kulturama, odnosno kulturama mikroalgi koje karakterizira povišena gustoća stanica. Naime, u takvim kulturama s obzirom na veliku gustoću stanica i činjenicu da je dostupnost osvjetljenja svakoj individualnoj mikroalgalnoj stanici smanjena, dolazi do međusobnog zasjenjivanja mikroalgalnih stanica (Masojídek i sur., 2011; Masojídek i sur., 2021; Richmond, 2013). Prema svim dobivenim rezultatima koncentracije fotosintetskih pigmenata (klorofil a i b) tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u različitim mjerilima (100 ml, 2 L) može se zaključiti da mikroalgalna fotosintetska aktivnost ponajviše ovisi o koncentraciji selenita kojoj je izložena, vremenu izlaganja mikroalgalne stanice selenitu, dubini mikroalgalne kulture, odnosno mjerilu u kojem se provodi mikroalgalna kultivacija te primjenjenom načinu uzgoja mikroalgi (šaržni uzgoj ili dvostupanjski način uzgoja). Sličan trend utjecaja selena na fotosintetsku aktivnost mikroalgi zabilježen je i u drugim studijama. Naime, prema rezultatima Sun i sur., 2014 kontinuirano povećanje koncentracije klorofila a zabilježeno je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale koncentracije selenita od 25,00, 50,00 i 75,00 mg L<sup>-1</sup>, dok je u kulturama koje su sadržavale koncentracije selenita od 100,00, 150,00 i 200,00 mg L<sup>-1</sup> zabilježeno smanjenje koncentracije klorofila a. U studiji Babaei i sur. (2017) također je istraživana utjecaj selena na rast i fotosintetsku aktivnost mikroalge *Chlorella vulgaris*. Prema rezultatima dobivenima u toj studiji testirane niske koncentracije selenita (2,50 mg L<sup>-1</sup> i 8,50 mg L<sup>-1</sup>) pokazale su stimulativan efekt na rast i fotosintetsku aktivnost mikrolage,

dok je testirana koncentracija selenita viša od 85,00 mg L<sup>-1</sup> imala inhibicijski efekt. Dobiveni rezultati također su slični rezultatima dobivenima u studijama Geoffroy i sur. (2007) (*Chlamydomonas reinhardtii*), Gojkovic i sur. (2015) (*Chlorella sorokiniana*); Li i sur. (2003) (*Spirulina platensis*) i Morlon i sur. (2005) (*Chlamydomonas reinhardtii*). Nadalje, prema rezultatima Zhong i Cheng (2017) izlaganje fotosistema II mikrolage *C. pyrenoidosa* koncentracijama selenita od 40,00 i 60,00 mg L<sup>-1</sup> rezultiralo je značajnom inhibicijom fotosintetskog transporta elektrona. Suprotno tomu, značajno i kontinuirano povećanje koncentracije klorofila zabilježeno je u kulturama mikroalge *Chlorella pyrenoidosa* koje su bile izložene koncentraciji selenita manjoj ili jednakoj od 40,00 mg L<sup>-1</sup>. Sličan inhibitorni efekt selenita na produkciju klorofila zabilježen je i u mikroalgama rodova *Desmodesmus* i *Pseudokirchneriella* izloženima visokim koncentracijama selenita (Pastierová i sur., 2009).

Osim individualnih koncentracija fotosintetskih pigmenata, tijekom izrade ovog doktorskog rada također je izračunat i prikazan omjer fotosintetskih pigmenata, odnosno klorofil a/klorofil b i omjer ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila. Prikaz navedenih omjera je od velike važnosti, s obzirom da predstavljaju indirektno indikatore oksidativnog stresa i reducirane aktivnosti fotosistema II (Pancha i sur., 2015) u mikroalgalnoj stanici. Tijekom prvih 10 dana dvostupanjskog uzgoja selenit nema značajan utjecaj na omjere pigmenata. Suprotno tomu, tijekom jednostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita 5. i 9. dan uzgoja zabilježeno je statistički značajno smanjenje omjera pigmenata. Iz rezultata prikazanih u tablici 8b može se zaključiti da su omjeri fotosintetskih pigmenata kultura koje sadrže 10,00, 20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita značajno viši u odnosu na ostale kulture mikroalgi tijekom 12., 14. i 15. dana uzgoja što upućuje na činjenicu da više koncentracije selenita uzrokuju veću razinu oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici. Prema rezultatima dobivenim u studiji Pancha i sur. (2015) povećanjem natrijevog klorida kojem je kultura mikroalge *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 bila izložena raste i omjer fotosintetskih pigmenata, što upućuje na povećanje razine oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici. Viši omjer fotosintetskih pigmenata također upućuje na redukciju veličine kompleksa zaduženog za prikupljanje svjetlosti (eng. *light-harvesting antenna*), što upućuje na protektivnu funkciju kompleksa za prikupljanje svjetlosti protiv fotooksidativnog stresa. Sličan trend povećanja omjera fotosintetskih pigmenata također je zabilježen i tijekom uzgoja mikroalge *Nannochloropsis oculata* u uvjetima povišenog saliniteta (Pal i sur., 2011).

### 5.3. Utjecaj selena na sintezu karotenoida u mikroalgi *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije

U svrhu razumijevanja utjecaja selena na sintezu karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom izlaganja različitim koncentracijama natrijevog selenita, tijekom izrade ovog doktorskog rada također je određena i koncentracija ukupnih karotenoida. Tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita zabilježen je i stimulativni i inhibitorni efekt selena na sintezu ukupnih karotenoida. U odnosu na jednostupanjski uzgoj, tijekom kojeg je je stimulativni efekt selena na sintezu ukupnih karotenoida zabilježen samo u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja stimulativni efekt selena na sintezu ukupnih karotenoida zabilježen je 10. dan uzgoja unutar koncentracijskog raspona selenita od 0,31 do 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Pri 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je značajno povećanje ukupnih karotenoida u odnosu na ostale tretmane (0,31–5,00 mg L<sup>-1</sup>), dok je iz rezultata dvostupanjskog uzgoja vidljivo da je u kulturama mikroalgi koje sadrže 0,31–2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita tijekom 10.-15. dana uzgoja zabilježeno značajno povećanje koncentracije ukupnih karotenoida u odnosu na 5. dan uzgoja. U svim daljnjim danima uzorkovanja i provođenja analiza (11., 12., 14. i 15. dan) dvostupanjskog uzgoja zabilježen je inhibitorni efekt selena na sintezu ukupnih karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta*. Nadalje, tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivim podlogama koje su sadržavale niske koncentracije selenita (0,31–5,00 mg L<sup>-1</sup>) utjecaj selena na koncentraciju ukupnih karotenoida u mikroalgalnoj stanici je bio zanemariv, dok je u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale više testirane koncentracije selenita (20,00 i 40,00 mg L<sup>-1</sup>) također zabilježen inhibitorni efekt selena na sintezu ukupnih karotenoida. Kao što je vidljivo iz rezultata dvostupanjskog uzgoja u svim kulturama mikroalgi 10. dan uzgoja zabilježen je značajan rast ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je najveća koncentracija karotenoida (1,81 µg mL<sup>-1</sup>; 2,06 puta veća u odnosu na kontrolnu grupu) postignuta pri 2,50 mg L<sup>-1</sup> selenita 14. dan uzgoja. Povišenje koncentracije karotenoida, kao odgovor na visoke koncentracije selenita u mikroalgalnom hranjivom mediju, zapravo predstavlja jedan od mehanizama obrane mikroalgalne stanice sa toksičnošću selena. Naime, molekule karotenoida, kao jedni od neenzimatskih antioksidansa, pokazuju protektivni efekt na integritet membrane kloroplasta uslijed oštećenja kloroplasta nastalog nakupljanjem ROS-ova u uvjetima stresa (Schiavon i sur., 2016). Generalno, kada je razina oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici niska udio karotenoida raste pa se može zaključiti da karotenoidi imaju protektivnu ulogu u

mikroalgalnom staničnom odgovoru na oksidativni stres na način da smanjuju razinu ROS-ova u stanici (Cirulis i sur., 2013). Mikroalge također imaju sposobnost sinteze molekula karotenoida odgovornih za apsorpciju energije. Naime, mikroalgalna stanica, koristeći primarne molekule karotenoida (lutein), prikupljenu svjetlosnu energiju dalje može transferirati do molekula klorofila te na taj način proširiti spektar apsorpcije svjetlosti unutar stanice (Lepetit i sur., 2012). Trenutno postoji veliki broj studija koji se bave optimizacijom procesa ekstrakcije pigmenata iz biomase mikroalgi (Cha i sur., 2010; Herrero i sur., 2006; Rao i sur., 2006; Macías-Sánchez i sur., 2009), međutim samo se nekoliko studija bavi ekstrakcijom molekula klorofila i karotenoida kao odgovor na oksidativni stres unutar mikroalgalne stanice. Sličan trend povećanja koncentracije ukupnih karotenoida tijekom izlaganja mikroalge *Chlorella pyrenoidosa* različitim koncentracijama selenita zabilježen je i u studiji Zhong i Cheng, 2017. Naime, tijekom izlaganja mikroalgalne kulture koncentraciji selenita većoj ili jednakoj od 40,00 mg L<sup>-1</sup> zabilježeno je značajno povećanje koncentracije karotenoida. Maksimalna koncentracija karotenoida (13,40 mg L<sup>-1</sup>) postignuta je nakon 12. dana uzgoja u kulturi mikroalge koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Suprotno tomu, pri koncentracijama selenita višima od 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno je značajno smanjenje koncentracije svih pigmenata (ukupni karotenoidi, klorofil a i b). Nadalje, prema literaturi, intracelularnom sintezom molekula vodikovog peroksida kroz proces oksidativnog stresa induciranog dodavanjem selenita u hranjivu podlogu, također je moguće potaknuti i produkciju karotenoida astaksantina u stanici mikroalge. Naime, zabilježeno je da dodatkom selenita u mikroalgalnu hranjivu podlogu dolazi do značajnog povišenja razine aktivnosti antioksidativnih enzima što upućuje na stanje oksidativnog stresa. Kao stanični antioksidativni odgovor na stanje oksidativnog stresa u stanici mikroalge *Hematococcus pluvialis* zabilježeno je povećanje koncentracije astaksantina (Zheng i sur., 2017).

Osim omjera fotosintetskih pigmenata (klorofil a/klorofil b), indirektni indikator povećanja razine oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici i redukcije aktivnosti fotosistema II fotosintetskog sustava također predstavlja i omjer ukupnog sadržaja karotenoida i ukupnog sadržaja klorofila (ukupni sadržaj karotenoida/ (klorofil a + klorofil b) (Pancha i sur., 2015). Iz rezultata omjera dobivenih tijekom jednostupanjskog uzgoja može se vidjeti da je tijekom 5. i 9. dana u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno značajno smanjenje omjera ukupnog sadržaja karotenoida/ (klorofil a + klorofil b) u odnosu na kontrolnu grupu. Suprotno tomu, tijekom 15. dana jednostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 20,00 selenita zabilježen je značajan rast omjera, što upućuje na

stanje oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici. Nadalje, iz rezultata omjera ukupnog sadržaja karotenoida/(klorofil a + klorofil b) mikrolage *D. tertiolecta* dobivenih tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge na različitim koncentracijama selenita može se zaključiti da tijekom 10., 11., 12., 14. i 15. dana uzgoja na svim testiranim koncentracijama selenita dolazi do značajnog povećanja omjera u odnosu na 5. dan uzgoja. U studiji Pancha i sur. (2015) uslijed izlaganja mikroalge *Scenedemus* sp. CCNM 1077 povišenim koncentracijama natrijevog klorida također je zabilježeno povećanje omjera ukupnog sadržaja karotenoida/(klorofil a + klorofil b) što upućuje na indukciju stanja oksidativnog stresa u mikroalgalnoj stanici i redukciju aktivnosti fotosistema II fotosintetskog sustava.

Kako bi se istražio utjecaj selenita na profil karotenoida mikroalge *D. tertiolecta*, nakon završenog dvostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita (0,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti određena je koncentracija pojedinačnih karotenoida, uključujući lutein, zeaksantin, fukoksantin, neoksantin, violaksantin, astaksantin i β-karoten. U kontrolnoj grupi mikroalge *D. tertiolecta* detektirani su sljedeći karotenoidi: lutein, zeaksantin, fukoksantin, neoksantin, violaksantin i beta-karoten. Najveće koncentracije zabilježene su za lutein (17,58 ± 0,12 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta) i zeaksantin (25,03 ± 0,07 mg g<sup>-1</sup> ekstrakta). Sličan sastav karotenoida u mikroalgi *D. tertiolecta* zabilježen je i u prethodnim studijama. U studiji Kim i sur. (2013), detektirani su karotenoidi violaksantin, antraksantin, lutein, β-karoten, α-karoten i γ-karoten, dok su u radu Diprat i sur. (2017) detektirani karotenoidi violaksantin, luteoksantin, lutein, zeaksantin, α-karoten i β-karoten. Zbog svojih antioksidativnih svojstava, zaštite očiju, protuupalnih svojstava te potencijalnog utjecaja na zdravlje mozga, lutein i zeaksantin su prepoznati kao važni nutrijenti u održavanju optimalnog zdravlja ljudi. Lutein (L) i zeaksantin (Z) su ciklički oksikarotenoidi koji se značajno nakupljaju kao pigmenti u makuli mrežnice kod ljudi i životinja. Lutein i zeaksantin djeluju kao važni prekursori vitamina A koji su ključni za održavanje zdravlja očiju. Oni pružaju zaštitu od oksidativnog stresa i mogu pomoći u očuvanju vida te smanjiti rizik od određenih očnih bolesti poput makularne degeneracije. Osim toga, lutein i zeaksantin se koriste kao prirodna bojila i aditivi u prehrambenoj industriji. Njihova prisutnost u hrani može poboljšati vizualni dojam hrane i privlačnost proizvoda. Njihovo prisustvo u mikroalgama, poput *D. tertiolecta*, može pružiti prirodan izvor ovih važnih karotenoida u prehrani, odnosno razumijevanje njihove uloge i djelovanja može imati značajan utjecaj na područja očne zdravstvene njege, prehrane i prevencije bolesti (Zafar i sur., 2021). Smanjenje koncentracije karotenoida u frakcijama ekstrakata (F3 i F4 frakcije) biomase mikroalge *D. tertiolecta*

dobivenih uzgojem na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) u usporedbi s kontrolnom grupom može se objasniti vremenskim faktorom uzorkovanja. Naime, analiza koncentracije pojedinačnih karotenoida provedena je na uzorcima prikupljenima zadnjeg, odnosno 15. dana dvostupanjskog uzgoja. Dobiveni rezultati ukazuju na činjenicu da, s obzirom na složene metaboličke procese koje mikroalge prolaze kroz različite faze rasta, pažljivo odabiranje dana uzorkovanja može biti ključno za dobivanje preciznih i pouzdanih podataka o karotenoidnom profilu mikroalge *D. tertiolecta* te je stoga, kako bi se dobio cjelovitiji uvid u dinamiku karotenoidnog profila mikroalge, potrebno provođenje analiza karotenoida u različitim vremenskim točkama tijekom dvostupanjskog uzgoja.

#### **5.4. Utjecaj selenita na potrošnju dušika i fosfora u kulturama mikroalge *D. tertiolecta* tijekom uzgoja u većem mjerilu (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L)**

Osim načina (šržni uzgoj, šaržni uzgoj s pritokom suptrata, polukontinuirani uzgoj, kontinuirani uzgoj ili dvostupanjski uzgoj) i primijenjenih uvjeta (vrijednosti temperature, intenziteta osvjetljenja, trajanje perioda svjetla i tame tijekom uzgoja, saliniteta, pH vrijednosti, miješanja, turbulencije, koncentracije ugljikovog dioksida) značajan utjecaj na rast i produktivnost procesa mikroalgalnog uzgoja također ima i koncentracija hranjivih tvari u podlozi, osobito koncentracija dušika i fosfora (Arkronrat i sur., 2016; Yaakob i sur., 2021; Zarrinmehr i sur., 2020). Naime, dušik i fosfor predstavljaju esencijalne makronutritijente potrebne za rast i regulaciju metaboličkih aktivnosti mikroalgi. Osim toga, različite primjenjene koncentracije dušika i fosfora u hranjivom mediju također mogu utjecati na prinos lipida i sastav masnih kiselina mikroalgi (Xin i sur., 2010; L. Yang i sur., 2018). Dušik je esencijalni makronutritijent potreban za mikroalgalni rast, te ima važnu ulogu u sintezi proteina, lipida i ugljikohidrata (Yodsuwan i sur., 2017; Zarrinmehr i sur., 2020). Koncentracija dušika u hranjivom mediju ima značajan utjecaj na rast i biokemijski sastav mikroalgi. U uvjetima nedostatka dušika u hranjivom mediju zabilježeno je smanjenje brzine mikroalgalnog rasta te istovremeno povećanje vrijednosti lipidne produktivnosti (Van Vooren i sur., 2012). Fosfor je druga esencijalna komponenta koja ima značajnu ulogu u rastu mikroalgi, produkciji lipida, sastavu masnih kiselina te metaboličkim procesima transfera energije, signala i procesu fotosinteze (Ota i sur., 2016; L. Yang i sur., 2018). Fosfor je također esencijalni element za produkciju staničnih komponenata kao što su fosfolipidi te molekule DNA, RNA i ATP-a (Atiku i sur., 2016).

Tijekom 15-dnevnog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivoj podlozi s NaNO<sub>3</sub> kao izvorom dušika (75,00 mg L<sup>-1</sup>) za sve testirane kulture mikroalgi (0,00, 20,00, 40,00 i 80,00 mg



L<sup>-1</sup> selenita) zabilježena je potrošnja dušika tijekom vremena (slika 21). U kontrolnoj grupi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom prva 4 dana uzgoja zabilježeno je postupno smanjenje koncentracija dušika s početnih 75,00 mg L<sup>-1</sup> na 47,74 mg L<sup>-1</sup>. Zatim je, između 4. i 5. dana uzgoja, došlo do naglog smanjenja koncentracije dušika u hranjivoj podlozi uz vrijednost brzine potrošnje supstrata od 38,69 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>. Nadalje, od 5. pa sve do 12. dana uzgoja, zabilježeno je postupno smanjenje koncentracije dušika s 9,05 mg L<sup>-1</sup> na 0,23 mg L<sup>-1</sup>, što ukazuje na visoku brzinu potrošnje dušika. Nakon 12. dana uzgoja koncentracija dušika u hranjivoj podlozi postala je zanemariva, što ukazuje na činjenicu da je mikroalga *D. tertiolecta* iskoristila sav dostupan dušik za svoj rast i razvoj te ušla u stacionarnu fazu rasta. Postupno početno smanjenje koncentracije dušika, nakon čega je uslijedio drastičan pad koncentracije dušika u hranjivoj podlozi, može se objasniti činjenicom da se potrošnja dostupnog oblika dušika, odnosno nitrata, iz hranjive podloge tijekom uzgoja postupno povećava s povećanjem brzine rasta i gustoće mikroalgalne kulture. Naime, u početnoj fazi uzgoja, kada je gustoća mikroalgalne kulture niska, obično je i ukupna brzina potrošnje dušika niska. Međutim, daljnjim povećanjem gustoće kulture, kako bi se zadovoljile potrebe mikroalgi za rast i proizvodnju biomase, istovremeno se povećava i potreba za dušikom (Yaakob i sur., 2021). Naposljetku, kada se tijekom mikroalgalnog uzgoja dostigne ograničavajuća koncentracija nekog od nutritijenata, kao npr. dušika ili fosfora, smanjuje se brzina rasta stanica, odnosno gustoća mikroalgalne kulture prestane se povećavati te mikroalgalne stanice dostižu stacionarnu fazu rasta. Smanjena potrošnja dušika u stacionarnoj fazi rasta može se objasniti činjenicom da se u stacionarnoj fazi rasta smanjuje brzina rasta stanica mikroalgi, a samim time i njihova potreba za velikom količinom dušika za sintezu proteina i klorofila (Vo i sur., 2022). Nadalje, za sve testirane mikroalgalne kulture (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita) zabilježen je sličan trend smanjenja koncentracije dušika u hranjivom mediju, kao i u kontrolnoj grupi (0,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Sličan trend smanjenja koncentracije dušika u hranjivom mediju tijekom vremena za sve testirane mikroalgalne kulture može se objasniti činjenicom da se selenit ne smatra elementom koji direktno utječe na uklanjanje dušika iz podloge tijekom mikroalgalne kultivacije, međutim selen ima kritičnu ulogu u različitim fiziološkim procesima mikroalgi, uključujući antioksidativno djelovanje, sintezu proteina i druge metaboličke procese (de Morais i sur., 2022). U kulturama mikroalgi *D. tertiolecta* koje su sadržavale 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita je nakon, postizanja stacionarne faze rasta (12. dan uzgoja), zabilježeno povećanje koncentracije dušika u hranjivom mediju. To se može objasniti činjenicom da se u stacionarnoj fazi rasta razmnožavanje mikroalgi usporava, odnosno s trajanjem uzgoja starije mikroalgalne stanice odumiru i liziraju se. Lizom stanica dolazi do otpuštanja hranjivih tvari u podlogu,

uključujući dušikove spojeve, što dovodi do povećanja koncentracije dušika u podlozi. Osim postizanja stacionarne faze rasta, raspad stanica također može biti posljedica staničnog stresa, toksičnih uvjeta u okolišu ili drugih čimbenika koji utječu na vitalnost stanice (Churro i sur., 2010). Sličan trend smanjenja koncentracije dušika u hranjivoj podlozi od strane različitih vrsta mikroalgi zabilježen je i u drugim studijama (Araujo i sur., 2020; Go i sur., 2012).

Osim potrošnje dušika, tijekom provođenja 15. dnevnog dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u većem mjerilu (Erlenmeyerove tikvice volumena 2 L), od strane mikroalgalnih stanica također je zabilježena i postepena potrošnja fosfora (slika 22). Sve testirane mikroalgalne kulture uzgajane su u f/2 hranjivoj podlozi koja je sadržavala 5,00 mg L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O kao izvor fosfora. Tijekom dvostupanjskog uzgoja kontrolne grupe mikroalge *D. tertiolecta* tijekom prvih devet dana uzgoja zabilježeno je postupno smanjenje koncentracije fosfora s početnih 5,00 na 0,048 mg L<sup>-1</sup>, uz brzinu potrošnje supstrata od 0.55 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>. Međutim, nakon 9. dana pa sve do kraja dvotupanjskog uzgoja zabilježeno je postupno povećanje koncentracije fosfora u hranjivom mediju. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da mikroalgalne stanice za svoj rast i razvoj staničnih komponenata, osim dušika, zahtijevaju i prisutnost fosfora u hranjivom mediju, što ukazuje na važnost osiguravanja adekvatne količine oba nutritijenta u hranjivoj podlozi u svrhu osiguravanja optimalnih uvjeta za rast i razvoj mikroalgi. Međutim, kada potroše sav dostupan fosfor u hranjivom mediju usporava se brzina rasta te mikroalge ulaze u stacionarnu fazu rasta. Povećanje koncentracije fosfora u kontrolnoj grupi nakon stacionarne faze rasta može se objasniti lizom stanica i otpuštanjem fosfora iz starih stanica mikroalgi u hranjivi medij (Mine i sur., 2021). U odnosu na dušik, koncentracija fosfora u hranjivom mediju povezana je s utjecajem selenita na kinetičke i biokemijske parametre mikroalgi. Naime, faktori koji imaju najveći utjecaj na akumulaciju selenita u stanicu mikroalge i posljedično tomu njegovu toksičnost su: koncentracija selenita u mediju (Gojkovic i sur., 2015; Guimarães i sur., 2021; Zhao i sur., 2019; Zheng i sur., 2017), pH vrijednosti, vrsta mikroalgi koja se koristi (Pastierová i sur., 2009), anorganski oblik selena koji se koristi (selenit ili selenat) (Guimarães i sur., 2021; Umysová i sur., 2009; Vriens i sur., 2016), koncentracija sumpora (Fournier i sur., 2010; Guimarães i sur., 2023) i koncentracija fosfora u podlozi (Vriens i sur., 2016). Jedno od mogućih objašnjenja akumulacije selenita unutar mikroalgalnih stanica i negativnog utjecaja na rast je potrošnja fosfora od strane mikroalgalnih stanica u hranjivoj podlozi nakon čega stanice ulaze u stacionarnu fazu rasta. Naime, fosfor je esencijalni element u strukturi fosfolipida, molekula DNA, proteina, ATP-a i drugih metabolita te je u nekoliko istraživanja uspješno primjenjen kao strategija povećanja akumulacije selenita u stanicu

(Morlon i sur., 2006; Vriens i sur., 2016). U istraživanju Morlon i sur. (2006) istražen je utjecaj limitacije fosforom na akumulaciju selenita u slatkovodnoj mikroalgi *C. reinhardtii*. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da niske koncentracije fosfora u hranjivom mediju poboljšavaju akumulaciju selenita u stanicama mikroalge, odnosno manja dostupnost fosfora u okolišu može djelovati na način da se poveća mikroalgalna sposobnost akumulacije selenita čime se u konačnici povećava i toksični efekt selenita na mikroalgalni rast. Prema rezultatima studija Guimarães i sur. (2023) i Umysová i sur. (2009) limitacija i fosfora i sumpora u hranjivoj podlozi također utječe na povišenje toksičnosti selenita.

### **5.5. Utjecaj selenita na razinu oksidativnog stresa u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije**

Razumijevanje veze između stresnih uvjeta induciranih akumulacijom visokih razina ROS-ova i procesa sinteze lipida od iznimne je važnosti. Stresni uvjeti uzrokovani ROS-ovima su jedna od vodećih i najvažnijih metoda indukcije akumulacije neutralnih lipida u mikroalgalnim stanicama (Breuer i sur., 2013). Koncentracija ROS-ova i produkata lipidne peroksidacije dobro su poznati indikatori oksidativnog stresa te se smatraju glavnim uzročnicima smanjenja brzine mikroalgalnog rasta. Koncentracijski raspon selenita od 2,50 do 20,00 mg L<sup>-1</sup> tijekom jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u manjim volumenima (100 mL) utječe na povećanje koncentracije MDA i TBARS-a u stanici mikroalge *D. tertiolecta* što ukazuje na pojavu lipidne peroksidacije u mikroalgalnoj stanici. Povećanje koncentracije TBARS-a u mikroalgalnoj stanici uslijed izlaganja različitim koncentracijama selenita može se objasniti činjenicom da povišene koncentracije selenita u mikroalgalnim kulturama rezultiraju povećanom produkcijom ROS-ova. ROS-ovi su vrlo nestabilne kemijske čestice koje u vanjskoj ljusci imaju nespareni elektron zbog čega pripadaju skupini vrlo reaktivnih spojeva. Tijekom procesa protoka elektrona, koji se odvija kroz procese stanične respiracije i fotosinteze, dolazi do konstantnog formiranja slobodnih radikala, odnosno reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-ova) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS-ova). ROS-ovi i RNS-ovi imaju značajnu ulogu u mnogobrojnim biološkim procesima živih organizama kao npr. za unutarstaničnu signalizaciju, proliferaciju, apoptozu, te imunološki odgovor (Matés i sur., 1999). Postoje brojni eksperimentalni dokazi nastanka radikala kao npr. aniona superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), singlet kisika (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), peroksilnog radikala (ROO<sup>•</sup>), hidroksilnog radikala (OH<sup>•</sup>), dušikovog oksida (NO) i ostalih radikala u stanicama živih organizama (Halliwell, 2006; Pikula i sur., 2019). Međutim, ukoliko su navedene molekule u mikroalgalnoj stanici prisutne u povišenoj koncentraciji mogu

uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA i proteina te oksidirati gotovo sve organske tvari (McCord, 2000; Gill i Tuteja, 2010; Pikula i sur., 2019). Prisutnost ROS-ova također može rezultirati i citotoksičnim djelovanjem što u konačnici rezultira staničnom smrti (Štefan i sur., 2007). Naime, u optimalnim uvjetima uzgoja povišena koncentracija navedenih molekula inaktivirana je djelovanjem staničnih antioksidacijskih sustava zaštite. Međutim, ukoliko nastupi stanje neravnoteže između nastajanja ROS-ova i RNS-ova i zaštitnog djelovanja staničnih sustava nastupa stanje oksidativnog stresa. Sistem antioksidativne obrane može se koristiti samo u ranim fazama izlaganja mikroalgalne stanice nekom stresu, te se koriste svi dostupni antioksidansi (Halliwell i Gutteridge, 1985). Za žive organizme karakteristični su enzimatski sistemi antioksidativne obrane (superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), glutation reduktazu (GR)) koji imaju ulogu uklanjanja oštećenih molekula proteina, lipida i DNA te svojstvo prilagodbe promjenama u razini oksidativnog stresa na način da sintetiziraju dodatne antioksidanse (Alscher i sur., 1997; Woodside i sur., 2005). Osim enzimatskih sistema, postoje i neenzimatske antioksidativne molekule kao npr. molekule pigmenata (karotenoidi, flavonoida, aminokiselina (prolin), polisaharida, polifenola (Mittler i sur., 2004; Cirulis i sur., 2013). Molekule neenzimatskih antioksidansa imaju važnu ulogu u sprječavanju staničnih oštećenja izazvanih oksidativnim stresom. Karotenoidi, koji predstavljaju skupinu pigmenata topivih u organskim otapalima, štite mikroalgalne stanice od oksidativnog stresa raspršivanjem viška energije iz klorofila izravnim prijenosom ili putem ksantofilnog ciklusa (Telfer, 2005; Kumar i sur., 2011). Činjenica da molekule karotenoida također sudjeluju u zaštiti mikroalgalne stanice od oksidativnog stresa objašnjava povećanje koncentracije karotenoida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom izlaganja selenitu u različitim mjerilima (100 mL, 2 L). Koristeći biomolekularne markere, kao što su povećanje koncentracije ROS-ova ili aktivnost antioksidativnih enzima, moguće je utvrditi razinu oksidativnog oštećenja u organizmu kao odgovor na izlaganje nekom stresu. Uloga štetnog, zaštitnog ili signalnog djelovanja ROS-ova u organizmu ovisi ponajprije o ravnoteži između brzine sinteze i brzine uklanjanja ROS-ova u mikroalgalnoj stanici (Gratão i sur., 2005). Slični rezultati dobiveni su u studiji (Zhong i Cheng, 2017) Naime, tijekom jednostupanjskog uzgoja mikroalge *C. pyrenoidosa* na koncentracijama selenita višima od 40,00 mg L<sup>-1</sup> detektirana je povišena razina lipidne peroksidacije pri čemu je maksimalna razina lipidne peroksidacije postignuta u kulturama mikroalge *C. pyrenoidosa* koje su sadržavale 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Nadalje, u studiji Chen i sur. (2008) ispitivan je utjecaj širokog raspona koncentracija natrijevog selenita (0,00–250,00 mg L<sup>-1</sup>) na mikroalgu *Spirulina platensis*. Prema rezultatima dobivenima u toj studiji utvrđeno je da se povišenjem koncentracije selenita od 40,00 mg L<sup>-1</sup> smanjuje razina

lipidne peroksidacije, pri čemu je minimalna razina lipidne peroksidacije postignuta u kulturi mikroalge *Spirulina platensis* koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Nadalje, povišenjem koncentracije selenita kojoj je mikroalgalna stanica izložena (80,00–250,00 mg L<sup>-1</sup>) dolazi do povišenja razine lipidne peroksidacije pri čemu je maksimalna razina postignuta u kulturi *S. platensis* obogaćenoj sa 250,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Usporedbom rezultata dobivenih u sklopu ovog doktorskog rada i rezultata drugih studija može se zaključiti da je pri istim testiranim koncentracijama selenita u različitim mikroalgalnim vrstama razina oksidativnog stresa različita, što upućuje na činjenicu da razina lipidne peroksidacije u mikroalgalnoj stanici ponajprije ovisi o osjetljivosti mikroalgalne vrste na selen. Dokazano je također da se razina lipidne peroksidacije može razlikovati čak između mikroalgalnih vrsta istog roda (Morales i sur., 2021). Nadalje, iz dobivenih rezultata također se može zaključiti da je maksimalna koncentracija TBARS-a zabilježena tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita 1,52 puta veća u odnosu na vrijednost koja je dobivena tijekom jednostupanjskog uzgoja. Takva razlika u koncentraciji TBARS-a između navedena dva načina kultivacije (šaržni uzgoj i dvostupanjski način uzgoja) ukazuju na činjenicu da se naknadnim dodavanjem selenita tijekom dvostupanjskog mikroalgalnog uzgoja postižu više razine oksidativnog stresa. Više razine oksidativnog stresa tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalgi, u odnosu na jednostupanjski, mogu se objasniti činjenicom da se tijekom dvostupanjskog mikroalgalnog uzgoja različite koncentracije selenita u hranjivi medij dodaju 9. dan uzgoja, odnosno zadnji dan prve faze dvostupanjskog uzgoja, kada su mikroalgalne stanice na kraju svoje eksponencijalne faze rasta. Suprotno dvostupanjskom načinu uzgoja, tijekom jednostupanjske mikroalgalne kultivacije dodavanje selenita, kao induktora stresa i sinteze lipida, odvija se na početku kultivacije kada su mikroalgalne stanice u lag fazi rasta pa je stoga njihova adaptacija na stres prolongirana. Više vrijednosti koncentracije TBARS-a tijekom dvostupanjskog načina uzgoja također odgovaraju povišenju koncentracije karotenoida, kao već spomenuti rezultat zaštitne uloge staničnih sustava (slika 20).

#### **5.6. Utjecaj selena na sintezu neutralnih lipida u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije**

Tijekom izrade ovog doktorskog rada Nile Red metoda je uspješno korištena za razlikovanje polarnih i nepolarnih ili neutralnih lipida te njihovu kvantifikaciju u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom provođenja različitih načina uzgoja (šaržni uzgoj, dvostupanjski način uzgoja) u različitim mjerilima (Erlenmeyer tikvice od 100 ml i 2 L; laboratorijski

fotobioreaktor). Jedno od svojstava Nile Red boje je mogućnost pomaka u emisiji fluorescencije od crvene do žute boje u ovisnosti s razinom hidrofobnosti lipida (Rumin i sur., 2015). Značajno povećanje udjela neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom izlaganja višim koncentracijama selenita ( $5.00\text{--}40.00\text{ mg L}^{-1}$ ) unutar manjeg mjerila (100 mL) može se objasniti činjenicom da tijekom optimalnih kultivacijskih uvjeta mikroalgalne stanice koriste nutritijente za rast biomase. Suprotno tomu, ukoliko se mikroalgalne stanice izlože nekom stresu (u ovom slučaju povišene koncentracije selenita) dolazi do promjene u metabolizmu ugljika i nakupljanju lipida (Rizwan i sur., 2017). Prema literaturi, od svih elemenata u tragovima, željezo (Fe) (Yeesang i Cheirsilp, 2011; Mandal i sur., 2019; Concas i sur., 2021), cink (Zn) (Li i sur., 2006; Yang i sur., 2015), mangan (Mn) (Yang i sur., 2015; Shaker i sur., 2017) i molibden (Mo) (Mandal i sur., 2019; Aslam i sur., 2021) pripadaju skupini najčešće korištenih elemenata u tragovima u svrhu sinteze i nakupljanja lipida u različitim vrstama mikroalgi. Prema rezultatima nekoliko studija dodatak željeza u hranjivu podlogu povećava brzinu rasta i udjel lipida u nekoliko mikroalgalnih vrsta (*Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus obliquus*, *Monoarphidium* sp.) (Dou i sur., 2013; Che i sur., 2015; Han i sur., 2019). Iako navedeni elementi u tragovima učinkovito potiču sintezu lipida, u većini slučajeva lipidna produktivnosti ponajviše ovisi koncentraciji navedenog elementa koji se koristi tijekom eksperimenta. Tako su Dou i sur. (2013) primjetili da prilikom izlaganja mikroalge *Nannochloropsis oculata* visokim koncentracijama cinka ( $\text{Zn}^{2+}$ ), mangana ( $\text{Mn}^{2+}$ ) i molibdena ( $\text{Mo}^{2+}$ ) dolazi do smanjenja udjela lipida. Iz rezultata dobivenih u sklopu ovog doktorskog rada može se zaključiti da izlaganjem mikroalge *D. tertiolecta* koncentracijama selenita višima od  $40,00\text{ mg L}^{-1}$  također dolazi do smanjenja udjela neutralnih lipida. Navedeni učinak može se objasniti činjenicom da metode indukcije sinteze lipida u mikroalgalnim stanicama koje se temelje na uporabi stresa kao induktora sinteze lipida, uobičajno rezultiraju smanjenjem prinosa biomase i oksidativnim oštećenjem stanica, što u konačnici rezultira i smanjenjem prinosa lipida (Sun i sur., 2018). Može se zaključiti da je u svrhu postizanja ekonomski održivog procesa proizvodnje lipida iz biomase mikroalgi od velike važnosti izbor odgovarajuće metode indukcije mikroalgalnih lipida. Nadalje, iz rezultata je evidentno da je udio neutralnih lipida dobiven tijekom dvostupanjskog uzgoja u manjem mjerilu (100 mL) 5,40 puta veći u odnosu na jednostupanjski uzgoj. Veći udio neutralnih lipida dobiven tijekom dvostupanjskog uzgoja može se objasniti načinom uzgoja mikroalgi. Naime, za dvostupanjski mikroalgalni način kultivacije karakteristično je da je u prvoj fazi uzgoja naglasak na proizvodnji biomase, dok je za drugu fazu dvostupanjskog uzgoja karakteristična primjena stresa s ciljem nakupljanja lipida. Slično, u studiji Ra i suradnika tijekom druge faze dvostupanjskog uzgoja (uvjeti niskog

saliniteta) 4 vrste mikroalgi (*I. galbana*, *N. oculata*, *D. salina* i *D. tertiolecta*) tijekom svih dana uzorkovanja i provedbe analiza zabilježeno je značajno povećanje udjela lipida (Ra i sur. 2015).

U odnosu na dvostupanjski uzgoj u manjem mjerilu (100 mL) tijekom kojeg je značajno povećanje udjela neutralnih lipida zabilježeno već 10. i 11. dan uzgoja, značajno povećanje udjela neutralnih lipida tijekom provođenja dvostupanjskog uzgoja *D. tertiolecta* u velikom mjerilu (2 L) zabilježeno je 12. dan uzgoja. Zakašnjelo povećanje udjela neutralnih lipida u stanici mikroalge *D. tertiolecta* tijekom uzgoja u većem mjerilu može se objasniti činjenicom da su tijekom provođenja uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u velikom mjerilu različite testirane koncentracije selenita u hranjivu podlogu dodane tek 11. dan uzgoja. Naime, preliminarnim pokusima utvrđeno je da tek tijekom 11. dana dvostupanjskog uzgoja mikroalga *D. tertiolecta* ulazi u stacionarnu fazu rasta, dok je tijekom uzgoja u manjem mjerilu ulazak u stacionarnu fazu rasta detektiran 9. dan uzgoja. Nadalje, usporedbom rezultata udjela neutralnih lipida dobivenih tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u manjem i većem mjerilu može se vidjeti da su za mikroalgalnu kulturu koja je sadržavala 40,00 mg L<sup>-1</sup> selenita dobiveni rezultati slični, odnosno tijekom uzgoja i u manjem mjerilu i u većem mjerilu 12. dan uzgoja zabilježeno je značajno povećanje udjela neutralnih lipida. Najveće povećanje udjela neutralnih lipida tijekom mikroalgalnog uzgoja i u manjem mjerilu (100 mL) i u većem mjerilu (2 L) postignuto je 14. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Tijekom uzgoja *D. tertiolecta* u manjem mjerilu povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu iznosilo je 81,59 %, dok je tijekom uzgoja u većem mjerilu povećanje udjela neutralnih lipida u odnosu na kontrolnu grupu iznosilo 82,54 %. Najveći udio neutralnih lipida dobiven tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru zabilježen je tijekom 11. dana uzgoja te je bio 27,67 puta veći u odnosu najveći udio lipida dobiven tijekom mikroalgalnog uzgoja u manjem mjerilu (100 mL). Postoji nekoliko faktora koji doprinose razlikama u udjelu neutralnih lipida u mikroalgama uzgajanima u različitim mjerlima. Neki od najvažnijih faktora su: intenzitet osvjetljenja, dostupnost nutrijenata, gustoća kulture, koncentracija CO<sub>2</sub> i temperatura (Sajjadi i sur., 2018). Intenzitet osvjetljenja predstavlja ključan faktor koji utječe na mikroalgalni rast i udio neutralnih lipida u mikroalgalnoj stanici. Intenzitet osvjetljenja i distribucija osvjetljenja razlikuju se s obzirom na veličinu sustava u kojem se mikroalgalni rast provodi što utječe na razliku u tome kako mikroalgalne stanice reagiraju na osvjetljenje, što u konačnici može rezultirati promjenama u ukupnom udjelu neutralnih lipida (He i sur., 2015). Nadalje, dostupnost nutrijenata kao npr. dušika, fosfora i sumpora, esencijalni su za rast i sintezu lipida

mikroalgi. Dostupnost navedenih nutritijenata može varirati ovisno o mjerilu u kojem se uzgoj mikroalgi provodi (sustavi većih mjerila obično zahtijevaju veći unos hranjivih tvari) što također ima utjecaj na mikroalgalni rast i udio lipida u stanicama (Yaakob i sur., 2021). Gustoća mikroalgalne kulture također ima značajan utjecaj na udio neutralnih lipida u mikroalgama. Ovisnost gustoće stanica i udjela neutralnih lipida u mikroalgama nije jednostavna i strogo definirana, odnosno ovisi o nekoliko faktora kao npr. vrsti mikroalge koja se koristi, uvjetima uzgoja, itd. Tako je npr. prilikom uzgoja nekih mikroalgalnih kultura, a uslijed visoke gustoće stanica, zabilježeno značajno smanjenje udjela neutralnih lipida. Smanjenje udjela lipida može se objasniti činjenicom da u kulturama koje karakterizira visoka gustoća stanica dolazi do limitacije kulture hranjivim tvarima te do smanjenja dostupne svjetlosne energije (Han i sur., 2015). Koncentracija ugljičnog dioksida također predstavlja važan faktor koji može utjecati na rast i udio lipida u mikroalgama. U sustavima s većim volumenima povećana koncentracija CO<sub>2</sub> može pozitivno utjecati na rast mikroalgi i povećati udio neutralnih lipida u stanicama, što je očekivano s obzirom na veću količinu dostupnog CO<sub>2</sub> u tim sustavima. (S. P. Singh i Singh, 2014). Temperatura je također važan faktor koji može utjecati na rast i udio lipida u mikroalgama. Naime, u sustavima većih mjerila kontrola temperature je otežana pa stoga može varirati više u odnosu na vrijednosti temperature u bioreaktoru manjeg volumena (Converti i sur., 2009). Osim nabrojanih, postoji još niz drugih faktora koji mogu imati utjecaj i doprinijeti razlikama u udjelu neutralnih lipida u mikroalgama tijekom uzgoja u različitim mjerilima. Razumijevanje navedenih faktora je od velike važnosti u području optimizacije uvjeta i načina uzgoja pojedinih mikroalgalnih vrsta, a sve s ciljem postizanja maksimalne sinteze visoko vrijednih proizvoda, kao npr. lipida. Iz dobivenih rezultata utjecaja selenita na sintezu neutralnih lipida u kulturi mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije može se zaključiti da dodavanje selenita u hranjivu podlogu morske mikroalge *D. tertiolecta* može rezultirati značajnim povećanjem udjela neutralnih lipida u mikroalgalnoj stanici. Također, rezultati upućuju na ovisnost udjela neutralnih lipida u mikroalgalnoj stanici o dodanoj koncentraciji selenita. S obzirom da činjenicu da mikroalgalni neutralni lipidi predstavljaju potencijalnu sirovinu za proizvodnju biodizela dobiveni rezultati su od velikog značaja. Naime, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da dodavanje selenita u hranjivu podlogu za uzgoj mikroalge *D. tertiolecta* predstavlja potencijalnu strategiju povećanja prinosa neutralnih lipida i time poboljšani potencijal uporabe lipida mikroalge *D. tertiolecta* za proizvodnju biodizela.



## 5.7. Fluorescentna mikroskopija neutralnih lipida mikroalge *D. tertiolecta* tijekom izlaganja različitim koncentracijama selenita

Fluorescentna mikroskopija neutralnih lipida je često korištena metoda za vizualizaciju i procjenu intracelularnih lipidnih mješinica (eng. *lipid droplets*) koji sadrže neutralne lipide poput triglicerida. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da su rezultati fluorescentne mikroskopije u korelaciji sa udjelom neutralnih lipida kultura mikroalgi *D. tertiolecta*. Mikroalgalne stanice snimljene tijekom 5. dana jednostupanjskog uzgoja *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (0.31–40.00 mg L<sup>-1</sup>) crveno su obojane, što ukazuje na činjenicu da tijekom 5. dana jednostupanjskog uzgoja lipidna sinteza u mikroalgalnim stanicama još uvijek nije započela. Suprotno tomu, tijekom 9. dana jednostupanjskog uzgoja zabilježen je veliki broj lipidnih mješinica obojanih u žuto, što ukazuje na činjenicu da tijekom 9. dana uzgoja primjenom selenita kao induktora sinteze lipida dolazi do akumulacije mikroalgalnih neutralnih lipida. Najveći broj i najveća veličina lipidnih mješinica tijekom jednostupanjskog mikroalgalnog uzgoja na različitim koncentracijama selenita zabilježena je 9. dana uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Zabilježeni rezultati fluorescentne mikroskopije u korelaciji su s prethodnim rezultatima razine oksidativnog stresa i udjela neutralnih lipida mikroalge *D. tertiolecta* dobivenih tijekom jednostupanjskog uzgoja na različitim koncentracijama selenita. Zabilježeno smanjenje broja i veličine lipidnih mješinica tijekom 15. dana, u odnosu na 9. dan jednostupanjskog uzgoja, potvrđuje činjenicu da ukoliko se mikroalgalne stanice izlažu nekom stresu kroz duži period dolazi do smanjenja brzine rasta i brzine sinteze molekula triacilglicerola. Tijekom odvijanja dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) najveća količina lipidnih mješinica obojanih u žutu boju detektirana je 15. dan uzgoja u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Uzimajući u obzir snažnu korelaciju između rezultata dobivenih kvantifikacijom neutralnih lipida Nile Red metodom (slika 14) i vizualizacijom lipidnih mješinica metodom fluorescentne mikroskopije može se zaključiti da selenit ima potencijalnu primjenu kao induktor sinteze mikroalgalnih lipida. Nadalje, uzimajući u obzir činjenicu da je smanjenje gustoće stanica 14. dan dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u kulturi mikroalgi koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita bila 1,63 puta manja u odnosu na istu kulturu mikroalgi tijekom 9. dana jednostupanjskog uzgoja može se zaključiti da, u odnosu na jednostupanjski uzgoj, dvostupanjski način uzgoja mikroalgi, uz dodatak selenita u hranjivi medij kao induktor sinteze lipida, predstavlja održiv način proizvodnje mikroalgalnih lipida.

## 5.8. Utjecaj selena na sastav masnih kiselina kulture mikroalge *D. tertiolecta* tijekom različitih načina kultivacije

Sastav masnih kiselina različitih mikroalgalnih vrsta prikazan je u velikom broju studija (Patil i sur., 2007; Yaakob i sur., 2014; Nagappan i sur., 2021). Navedene studije uglavnom se, na temelju dobivenog sastava masnih kiselina, bave procjenom mogućnosti upotrebe biomase različitih mikroalgalnih vrsta za stočnu hranu, hranu za akvakulturu, kao dodatak prehrani ljudi ili kao izvor višestruko nezasićenih i esencijalnih masnih kiselina. Suprotno tomu, broj studija koji se bave procjenom mogućnosti upotrebe mikroalgalne biomase kao sirovine za proizvodnju biogoriva, prvenstveno biodizela, prisutan je u manjoj mjeri. U sklopu izrade ovog doktorskog rada nakon završenog dvostupanjskog uzgoja mikrolage *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) u većim volumenima (Erlenmeyer tikvice od 2 L), te nakon završenog dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u laboratorijskom fotobioreaktoru, uz pomoć metode plinske kromatografije, određen je sastav masnih kiselina (tablica 12 i stablica 14). Prema rezultatima sastava masnih kiselina lipida kontrolne grupe mikrolagi *D. tertiolecta* uzgajane u velikim volumenima (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) detektirane su sljedeće masne kiseline: miristinska kiselina (C14:0), miristoleinska kiselina (C14:1 cis 9), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1 cis 9), heptadekanska kiselina (C17:0), stearinska kiselina (C18:0), oleinska kiselina (C18:1 cis 9), elaidinska kiselina (C18:1 trans 9), linoelaidatna kiselina (C18:2 trans 9, 12), linolna kiselina (C18:2 cis 9, 12),  $\gamma$ -linolenska kiselina (C18:3 cis 6, 9, 12) i urinska masna kiselina (C22:1 cis 13). Nadalje, prema rezultatima sastava masnih kiselina lipida mikroalgalnih kultura uzgajanih na različitim koncentracijama selenita, u odnosu na kontrolnu grupu, zabilježeno je značajno povećanje udjela palmitinske (C16:0) i oleinske masne kiseline (C18:1 cis 9). Najveće povećanje palmitinske masne kiseline zabilježeno je u kulturama mikrolagi koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita, dok je u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita zabilježeno najveće povećanje udjela oleinske masne kiseline. Iz rezultata se također može vidjeti da je, u odnosu na kontrolnu grupu, u kulturama mikrolagi koje su sadržavale različite testirane koncentracije selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) zabilježeno značajno smanjenje koncentracije  $\gamma$ -linolenske masne kiseline. Nadalje, može se zaključiti da je u uzorcima lipida, na svim testiranim koncentracijama selenita, najveći udio u ukupnom sastavu masnih kiselina ima palmitinska kiselina (C16:0). Nadalje, osim palmitinske kiseline, najveći udio u ukupnom sastavu masnih kiselina također imaju oleinska (C18:1 cis 9) i  $\gamma$ -linolenska (C18:3 cis 6, 9, 12) masna kiselina.

Nadalje, može se zaključiti da je dobiveni sastav masnih kiselina lipida kontrolne grupe mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru sličan sastavu masnih kiselina lipida kontrolnih grupa mikroalge *D. tertiolecta* uzgajanih u Erlenmeyer tikvicama većih volumenima (2 L). Naime, kontrolne grupe mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru karakterizira sastav masnih kiselina od miristinske kiseline (C14:0), miristoleinske kiseline (C14:1 cis 9), palmitinske kiseline (C16:0), palmitoleinske kiseline (C16:1 cis 9), heptadekanske kiseline (C17:0), stearinske kiseline (C18:0), elaidinske kiseline (C18:1 trans 9), oleinske kiseline (C18:1 cis 9), linolne kiseline (C18:2 cis 9, 12), linoelaidne kiseline (C18:2 trans 9, 12) i  $\gamma$ -linolenske kiseline (C18:3 cis 6, 9, 12). Nadalje, analizom sastava masnih kiselina lipida mikroalgalne biomase dobivene dvostupanjskim uzgojem u f/2 hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru zabilježeno je povećanje udjela miristoleinske kiseline (C14:1 cis 9), linoelaidne kiseline (C18:2 trans 9, 12) i  $\gamma$ -linolenske kiseline (C18:3 cis 6, 9, 12). Osim navedenih masnih kiselina, u uzorcima lipida također su detektirane i miristinska kiselina (C14:0), palmitinska kiselina (C16:0), palmitoleinska kiselina (C16:1, cis 9), heptadekanska kiselina (C17:0), stearinska kiselina (C18:0) i linolna kiselina (C18:2, cis 9, 12). Usporedbom sastava masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane u velikim volumenima (Erlenmeyer tikvice volumena 2 L) i laboratorijskom fotobioreaktoru može se zaključiti da je u lipidima mikroalgalne biomase dobivene uzgojem u laboratorijskom fotobioreaktoru detektirana 1,51 puta manja vrijednosti  $\gamma$ -linolenske (C18:3 cis 6, 9, 12), odnosno 2,33 puta veća vrijednost oleinske i elaidinske masne kiseline (C18:1 cis 9 trans 9). Nadalje, usporedbom sastava masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na 20.00 mg L<sup>-1</sup> selenita u različitim mjerilima (Erlenmeyerove tikvice volumena 2 L i laboratorijski fotobioreaktor) može se zaključiti da je u lipidima biomase mikroalgi uzgajane u laboratorijskom fotobioreaktoru zabilježen 1,57 puta veći udio palmitinske kiseline (C16:0) i 2.60 puta veći udio  $\gamma$ -linolenske kiseline (C18:3 cis 6, 9, 12), dok je u lipidima biomase mikroalgi uzgojane u Erlenmeyerovim tikvicama volumena 2 L zabilježen 7,76 puta veći udio oleinske (C18:1 cis 9) i elaidinske kiselina (C18:1 trans 9). Razlika u sastavu masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* dobivenih dvostupanjskim uzgojem mikroalge u različitim mjerilima mogu se objasniti činjenicom da mikroalgalni sastav masnih kiselina unutar iste mikroalgalne vrste uvelike ovisi o primjenjenim uvjetima uzgoja (Udayan i sur., 2022). Naime, postoje brojni faktori koji imaju utjecaj na sastav masnih kiselina lipida mikroalgi, uključujući i različite načine i uvjete uzgoja. U laboratorijskom fotobioreaktoru uzgoj mikroalgi se provodi u kontroliranim uvjetima intenziteta osvjetljenja, temperature, pH i koncentracije nutritijenata te navedeni uvjeti mogu

utjecati na metabolizam mikroalgi i sastav masnih kiselina u lipidima. U odnosu na mikroalgalni uzgoj u laboratorijskom fotobioreaktoru, tijekom uzgoja u Erlenmeyer tikvicama kontrola nad prethodno navedenim uvjetima uzgoja je puno manja što može rezultirati razlikom u sastavu masnih kiselina mikroalgalnih lipida. Povećani udio oleinske i elaidinske masne kiseline u lipidima biomase mikroalgi dobivene uzgojem u Erlenmeyer tikvicama može biti povezan sa većom količinom stresa uzrokovanom manjom kontrolom uvjeta uzgoja u tikvicama (Xiong i sur., 2015). Udio i sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta* također je ispitan od strane Tang i sur. (2011), Qv i sur. (2014), Lee i sur. (2014), Chen i sur. (2011), Gorgônio i sur. (2013). Tang i sur. 2011 ispitali su utjecaj izvora i intenziteta osvjetljenja na udio i sastav masnih kiselina mikroalge *D. tertiolecta*. Prema rezultatima Tang i sur. (2011) nije zabilježena značajna razlika u sastavu masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane pri različitim izvorima i intenzitetima osvjetljenja. Glavni udio u sastavu masnih kiselina imale su linolenska kiselina (C18:3 cis 6, 9, 12) u udjelu od 44,00 % i palmitinska kiselina (C16:0) u udjelu od 25,00 %. Osim palmitinske i linolenske kiseline, u lipida mikroalge *D. tertiolecta* detektirane su još oleinska kiselina (C18:1 cis 9) i linolna kiselina (C18:2 cis 9, 12) u udjelima od 11 % te male količine palmitoleinske (C16:1 cis 9) i stearinske masne kiseline (C18:0). Usporedbom rezultata dobivenih u ovom doktorskom radu i rezultata Tang i sur., (2011) može se zaključiti da je sastav masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita u različitim mjerilima sličan sastavu dobivenom u sklopu studije Tang i sur. (2011). Nadalje, rezultati dobiveni u ovom doktorskom radu također su slični rezultatima Gouveia i Oliveira (2009) prema kojima su u ekstraktima lipida mikroalge *D. tertiolecta* u većem udjelu zabilježene C18:3 (30, 2 %), C16:0 (17,7 %), C18:2 (12,4 %), C16:4 (10,6 %) dok su u manjem udjelu zabilježene C14:0 i C16:1–C16:3. U studiji Zhong i Cheng (2017) također je istraživana utjecaj različitih koncentracija selenita na sastav masnih kiselina mikroalge *C. pyrenoidosa*. Prema rezultatima dobivenima u toj studiji, osim na udio oleinske (C18:1) i linolenske kiseline (C18:3), različite koncentracije selenita nisu imale značajan utjecaj na sastav masnih kiselina. Slično kao i u rezultatima dobivenima u sklopu ovog doktorskog rada, tako su i prema rezultatima studije Zhong i Cheng (2017) najveći udio u ukupnom sastavu masnih kiselina imale palmitinska kiselina (C16:0, 11,1–11,9 %), linolna kiselina (C18:2, 19,2%) i linolenska kiselina (C18:3 cis 6, 9, 12; 26,7–30,5 %). S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da lipidi mikroalge *D. tertiolecta*, uzgajane u podlogama obogaćenima različitim koncentracijama selenita, mogu imati primjenu u području proizvodnje hrane za životinje i području akvakulture, kao i u području proizvodnje biogoriva, odnosno biodizela. Naime, prema dobivenim rezultatima lipidi mikroalge *D. tertiolecta* predstavljaju izvor višestruko

nezasićenih i esencijalnih masnih kiselina te kao takvi imaju potencijalnu primjenu kao hrana za životinje i akvakulturu. Nadalje, prema dobivenim rezultatima, upotreba biomase mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na određenim koncentracijama selenita također ima potencijal u području proizvodnje specifičnih vrsta masnih kiselina, posebno palmitinske i oleinske kiseline. Nadalje, s obzirom da se prema rezultatima sastava masnih kiselina lipidi mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita uglavnom sastoje od zasićenih i nezasićenih masnih kiselina duljine ugljikovog lanca od C16 do C18 može se zaključiti da se lipidi mikroalge *D. tertiolecta* također mogu smatrati i potencijalnom sirovinom za proizvodnju biodizela (Griffiths i Harrison, 2009).

Na temelju sastava masnih kiselina dobivenih tijekom izrade doktorskog rada također je izračunat i udio zasićenih (eng. *Saturated fatty acids*, SFA), jednostruko nezasićenih (eng. *Monounsaturated fatty acids*, MUFA) te višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. *Polyunsaturated fatty acids*, PUFA) (slika 24 i slika 28). Mikroalge pripadaju skupini brzorastućih organizama koji imaju sposobnost sinteze velikog broja komponenata koji imaju mnogobrojne komercijalne primjene (Ratha i sur., 2013; Koller i sur., 2014). Jedan od primjera komercijalne primjene produkata biomase mikroalgi su primjena zasićenih, jednostruko nezasićenih masnih kiselina te višestruko nezasićenih masnih kiselina. Višestruko nezasićene masne kiseline imaju primjenu u uzgoju riba i kao dodatak prehrani ljudi (De Jesus Raposo i sur., 2013). Suprotno višestruko nezasićenim masnim kiselinama, zasićene i mononezasićene masne kiseline predstavljaju sirovinu za proizvodnju biodizela (Stillwell i Wassall, 2003; Hoffmann i sur., 2010). Na temelju sastava masnih kiselina lipida mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na višim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) u većim volumenima (Erlenmeyer tikvice od 2 L) može se zaključiti da izlaganjem mikroalge različitim koncentracijama selenita rezultira povećanjem udjela zasićenih masnih kiselina. Naime, u kontrolnoj grupi mikroalge *D. tertiolecta*, odnosno u mikroalgalnoj kulturi koja nije bila izložena selenitu, najveći udio u ukupnom udjelu masnih kiselina zauzimale su višestruko nezasićene masne kiseline (56,74 %). U manjem udjelu zabilježene su zasićene (32,20 %) i jednostruko nezasićene masne kiseline (11,16 %). Dodatkom različitih koncentracija selenita u hranjivu podlogu mikroalge *D. tertiolecta* zabilježen je porast udjela zasićenih masnih kiselina za otprilike 1,50 puta pri čemu je najveći udio zasićenih masnih kiselina (49,83 ± 7,06 %) zabilježen u kulturi mikroalge koja je sadržavala 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Nadalje, suprotno kontrolnoj grupi u kojoj su najveći udio zauzimale višestruko nezasićene masne kiseline, izlaganjem kultura mikroalgi različitim koncentracijama selenita zabilježen je pad udjela

višestruko nezasićenih masnih kiselina. Povećanje udjela zasićenih, odnosno smanjenje udjela višestruko nezasićenih masnih kiselina tijekom izlaganja mikroalge *D. tertiolecta* različitim koncentracijama selenita može se objasniti činjenicom da mikroalgalne stanice kada su izložene selenitu mogu aktivirati različite metaboličke puteve u svrhu prilagodbe mikroalgalne stanice stresu izazvanog toksinom. Jedan od tih metaboličkih puteva je povećanje sinteze zasićenih masnih kiselina. Naime, zasićene masne kiseline su stabilnije od nezasićenih kiselina i kao takve manje osjetljive na oksidaciju, što ih čini otpornijima na oksidacijski stres uzrokovan povišenim koncentracijama selenita (Sun i sur., 2018). Osim toga, izlaganje mikroalge selenitu može rezultirati smanjenjem fotosintetske aktivnosti mikroalgi. Budući da je proces fotosinteze ključan za sintezu nezasićenih masnih kiselina, smanjenje fotosintetske aktivnosti rezultira povećanjem udjela zasićenih masnih kiselina u staničnoj membrani mikroalgi (Zhong i Cheng, 2017). Povećanje udjela zasićenih masnih kiselina tijekom izlaganja mikroalge *D. tertiolecta* različitim koncentracijama selenita može predstavljati jedan od načina prilagodbe mikroalgi stresu i osiguravanja stabilnosti stanične membrane.

## 5.9. Svojstva biodizela

Unatoč sve većem broju istraživanja usmjerenih prema optimizaciji procesa proizvodnje mikroalgalnih lipida u smislu povećanja lipidne produktivnosti, još uvijek je vrlo malo istraživanja koja se bave procjenom kvalitete mikroalgalnog biodizela, što predstavlja važan izazov u području razvoja ove tehnologije (Stansell i sur., 2012). Kako se proces proizvodnje biodizela komercijalizira, postaje sve važnije uspostaviti standarde za svojstva biodizela kako bi se osigurala njegova kvaliteta i pouzdanost na tržištu. Europa, SAD, Brazil, Južnoafrička Republika i Australija su među zemljama koje imaju uspostavljene standarde za proizvedeni biodizel (Knothe, 2006; Meher i sur., 2006). Budući da mjerenje većine svojstava biodizela zahtijeva specijaliziranu opremu koja je skupa, osobito u pilot postrojenjima, postoje brojna istraživanja koja se fokusiraju na razvoj empirijskih modela za predviđanje svojstava biodizela na temelju sastava masnih kiselina koji se nalaze u lipidima mikroalgi (Allen i sur., 1999; Dunn, 2008.; Imahara i sur., 2006; Lapuerta i sur., 2009; Lopes i sur., 2008; Tong i sur., 2011). Navedeni modeli su korisni jer omogućavaju preliminarnu procjenu potencijala uporabe određenih sirovina (u ovom slučaju mikroalgalne biomase) za proizvodnju biodizela. Korištenjem empirijskih jednadžbi (navedenih u poglavlju 3.5.13.) i temeljem sastava masnih kiselina (tablice 12 i 14) izračunata su četiri fizikalna svojstva biodizela, odnosno cetanski broj ( $\Phi_b$ ), kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ;  $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ), gustoća ( $\rho_b$ ;  $\text{g cm}^{-3}$ ) i viša ogrijevna vrijednost ( $\delta_b$ ;  $\text{MJ kg}^{-1}$ ). Izračunate vrijednosti fizičkih svojstava biodizela su uspoređene s vrijednostima

propisanim standardima ASTM D6751 i EN 14214. Na temelju podataka prikazanih u tablici 13, može se zaključiti da izračunate vrijednosti fizičkih svojstava biodizela, uključujući cetanski broj ( $\Phi_b$ ), kinematičku viskoznost ( $\eta_b$ ;  $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ), gustoću ( $\rho_b$ ;  $\text{g cm}^{-3}$ ) i kalorijsku vrijednost ( $\delta_b$ ;  $\text{MJ kg}^{-1}$ ), dobivenog transesterifikacijom lipida biomase mikroalgi uzgajane na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00  $\text{mg L}^{-1}$ ) u većim volumenima (Erlenmeyerove tikvice od 2 L), zadovoljavaju vrijednosti propisane američkim (ASTM 6751-12) i europskim (EN 14214) standardima za kvalitetu biodizela. Osim toga, iz rezultata se također može zaključiti da se transesterifikacijom lipida dobivenih iz mikroalgalne biomase uzgajane u laboratorijskom fotobioreктору korištenjem dvostupanjskog načina uzgoja također može dobiti biodizel koji prema izračunatim svojstvima zadovoljava sve propisane standarde. Postoji nekoliko studija u kojima su se koristile empirijske jednadžbe za procjenu svojstava biodizela kako bi se izvršila selekcija mikroalglnih vrsta ili metoda indukcije triacilglicerola prikladnih za proizvodnju biodizela (Nascimento i sur., 2013; Chaisutyakorn i sur., 2018; Shanmugam i sur., 2020; Maltsev i Maltseva, 2021). U istraživanju Nascimento i sur. (2013) analizirano je devet različitih mikroalglnih vrsta s ciljem procjene njihovog potencijala za proizvodnju biodizela. Međutim, na temelju sastava masnih kiselina lipida, ni jedna ispitivana vrsta mikroalgi nije ispunila standarde za proizvodnju biodizela definirane u ASTM D6751 ili EN 14214. Iz spomenute studije proizlazi da se miješanjem biodizela dobivenog transesterifikacijom lipida iz različitih vrsta mikroalgi može dobiti biodizel koji ispunjava sve standarde propisane za taj proizvod što sugerira da se uzgojem različitih vrsta mikroalgi može postići željena kvaliteta biodizela.

#### **5.10. Promjena koncentracije selenita u vremenu tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* na višim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 $\text{mg L}^{-1}$ )**

Tijekom trećeg dijela doktorata, koji se bavi dvostupanjskim uzgojem mikroalge *D. tertiolecta* u većim volumenima (Erlenmeyerove tikvica od 2 L) na višim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00  $\text{mg L}^{-1}$ ), korištena je metoda spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) za praćenje promjena u koncentraciji selenita tijekom vremena. Na temelju prikazanih rezultata na slici 25 može se zaključiti da je u svim testiranim mikroalglnim kulturama došlo do potrošnje selenita od strane mikroalglnih stanica što ukazuje na sposobnost mikroalge *D. tertiolecta* za apsorbciju selenita i njegovu uporabu u biološkim procesima. Izračunavanjem brzine potrošnje selenita od strane mikroalglnih stanica utvrđeno je da je

brzina potrošnje selenita nešto veća u kulturama mikroalge koje su sadržavale 40,00 mg L<sup>-1</sup> (1,14 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>), u odnosu na brzinu potrošnje selenita u mikroalgalnim kulturama koje su sadržavale 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita (0,87 mg L<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju značajni su jer ukazuju na potencijal primjene mikroalge *D. tertiolecta* u procesima uklanjanja selenita iz vodenih otopina te otvaraju mogućnost korištenja mikroalge *D. tertiolecta* u biotehnološkim procesima. Također, prema dobivenih rezultatima može se zaključiti da se mikroalga *D. tertiolecta* može koristiti za razvoj novih strategija za uklanjanje selenita iz okoliša.

### **5.11. Određivanje mutagenog/genotoksičnog potencijala uzoraka Ames bakterijskim testom**

Iz rezultata Ames testa za testirane frakcije, odnosno metanolne (F3 frakcija) i diklormetanske (F4 frakcija), mikroalge *D. tertiolecta* nakon tretiranja različitim koncentracijama selenita (tablica 16), može se zaključiti da testirane mikroalgalne frakcije nisu pokazale mutageni ili premutageni učinak. Također, iz rezultata prikazanih u tablici 16 može se zaključiti da je laboratorijski postupak proveden korektno. Na kontrolnim pločama nije uočena pojava spontanih revertanata, sugerirajući odsustvo kontaminacije. Broj spontanih revertanata za sojeve TA 98 i TA 100 bio je u granicama očekivanih vrijednosti. Nadalje, primijećeno je da su izravni i neizravni mutageni spojevi rezultirali očekivano visokim brojem revertanata, što je usklađeno s predviđanjima i očekivanjima istraživanja. Ispitivanja provedena u poglavlju 4.3.6. pokazala su da lipidi dobiveni iz mikroalge *D. tertiolecta* uzgajane na različitim koncentracijama selenita predstavljaju bogat izvor višestruko nezasićenih i esencijalnih masnih kiselina. Navedeni lipidi mikroalgu *D. tertiolecta* čine izuzetno vrijednim resursom za upotrebu u proizvodnji hrane za životinje i u akvakulturi. Da bi se osiguralo da ekstrakti mikroalge *D. tertiolecta*, koji se potencijalno mogu koristiti u prehrambenoj industriji i akvakulturi, ne uzrokuju mutacije u DNA organizama, od velike je važnosti bilo provesti Ames test. Provedba Ames testa ima ključnu ulogu u potvrđivanju sigurnosti upotrebe ovih ekstrakata u prehrambenoj industriji i akvakulturi. To je od iznimne važnosti s obzirom na rastući interes za održive izvore hrane i biogoriva, gdje je nužno osigurati da proizvodi ne predstavljaju rizik za genetsku stabilnost organizama u okolišu. Slični rezultati zabilježeni su u studiji (Guedes i sur., 2013) u kojoj je određivan antioksidativni potencijal 18 vrsta cijanobakterija i 23 vrste mikrolagi. Prema rezultatima ekstrakti testiranih mikroalgalnih vrsta i cijanobakterija nisu



pokazali mutageni, odnosno premutageni učinak s obzirom da je broj revertanata statistički bio jednak broju spontanih revertanata.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na temelju rezultata ovog doktorskog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Rast mikroalge *D. tertiolecta* u mikrotitarskim pločama inhibiran je selenitom u čitavom području testiranih koncentracija selenita (0,31–120,00 mg L<sup>-1</sup>), pri čemu je najveći inhibicijski učinak utvrđen pri najvišim testiranim koncentracijama (80,00, 100,00 i 120,00 mg L<sup>-1</sup>).
2. Kod jednostupanjskog i dvostupanjskog uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama (100 mL i 2 L) i laboratorijskom fotobioreaktoru mikroalga *D. tertiolecta* pokazala je veću otpornost na selen, u odnosu na uzgoj u mikrotitarskim pločama. Inhibicija rasta selenom zabilježena je pri koncentracijama selenita većim od 10,00 mg L<sup>-1</sup>. Maksimalna gustoća stanica ( $43,11 \times 10^5$  stanice mL<sup>-1</sup>) postignuta je tijekom dvostupanjskog uzgoja u laboratorijskom fotobioreaktoru u hranjivoj podlozi obogaćenoj 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Stimulativni efekt selenita na mikroalgalni rast zabilježen je tijekom dvostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 0,31 mg L<sup>-1</sup> selenita.
3. Značajno povećanja koncentracije oba fotosintetska pigmenta (klorofila a i klorofila b) zabilježeno je tijekom provođenja i jednostupanjskog (10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup>) i dvostupanjskog uzgoja (0,31–40,00 mg L<sup>-1</sup>) mikroalge *D. tertiolecta* u manjem mjerlu.
4. Stimulativni učinak selenita na sintezu ukupnih karotenoida zabilježen je tijekom 10. dana dvostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 0,31–10,00 mg L<sup>-1</sup> selenita te 5., 10. i 15. dana jednostupanjskog uzgoja u kulturama mikroalgi koje su sadržavale 10,00 i 20,00 mg L<sup>-1</sup> selenita. Tijekom dvostupanjskog uzgoja mikroalgi u većim volumenima (2 L) statistički značajan rast ukupnih karotenoida zabilježen je tijekom 9. i 12. dana uzgoja u svim kulturama mikroalgi (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita). Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti u mikroalgalnim kulturama obogaćenima s 20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup> selenita detektirani su sljedeći karotenoidi: lutein, zeaksantin, β-karoten.
6. Koncentracije selenita u rasponu od 2,50 do 20,00 mg L<sup>-1</sup> uzrokuju značajan porast koncentracije MDA i TBARS-a u stanicama mikroalge *D. tertiolecta*, sugerirajući prisutnost lipidne peroksidacije u tim stanicama.
7. Izlaganje stanica mikroalge *D. tertiolecta* višim koncentracijama selenita (5,00–40,00 mg L<sup>-1</sup>) tijekom uzgoja u Erlenmeyerovim tikvicama rezultirano je povećanjem udjela neutralnih lipida. Najveći udjel neutralnih lipida zabilježen je 14. dan jednostupanjskog i dvostupanjskog šaržnog uzgoja uz 20,00 mg L<sup>-1</sup> dodanog selenita. Najveći udio neutralnih lipida dobiven tijekom uzgoja mikroalge *D. tertiolecta* u hranjivoj podlozi obogaćenoj sa 20,00

mg L<sup>-1</sup> selenita u laboratorijskom fotobioreaktoru zabilježen je tijekom 11. dana uzgoja te je bio 27,67 puta veći u odnosu na najveći udio lipida dobiven tijekom mikroalgalnog uzgoja u manjem mjerilu (100 mL). Rezultati fluorescentne mikroskopije u korelaciji su sa udjelom neutralnih lipida kultura mikroalgi *D. tertiolecta*.

8. Analizom sastava masnih kiselina lipida mikroalgalne biomase dobivene uzgojem mikroalge *D. tertiolecta* na različitim koncentracijama selenita (20,00, 40,00 i 80,00 mg L<sup>-1</sup>) u Erlenmeyerovim tikvicama i u laboratorijskom fotobioreaktoru identificirane su sljedeće masne kiseline: lauratna (C12:0), miristinska (C14:0), miristoleatna (C14:1 cis 9), palmitinska (C16:0), palmitoleatna (C16:1 cis 9), stearinska (C18:0), elaidatna+oleatna (C18:1 cis 9 trans 9), linoelaidatna (C18:2 trans 9,12), linolna (C18:2 cis 9,12),  $\gamma$ -linolenska (C18:3 cis 6,9,12) i eikosadienoatna kiselina (C20:2 cis 11,14). Značajno povećanje udjela palmitinske kiseline (C16:0) zabilježeno je pri koncentraciji selenita od 20,00 mg L<sup>-1</sup>, dok je značajan porast udjela oleinske masne kiseline (C18:1 cis 9) zabilježen pri koncentraciji selenita od 80,00 mg L<sup>-1</sup>.

Dodavanje različitih koncentracija selenita u hranjivu podlogu mikroalge *D. tertiolecta* rezultiralo je povećanjem udjela zasićenih masnih kiselina za približno 1,50 puta.

9. Korištenjem empirijskih jednadžbi i temeljem sastava masnih kiselina izračunata su četiri fizikalna svojstva biodizela, odnosno cetanski broj ( $\Phi_b$ ), kinematička viskoznost ( $\eta_b$ ; mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), gustoća ( $\rho_b$ ; g cm<sup>-3</sup>) i veća ogrijevna vrijednost ( $\delta_b$ ; MJ kg<sup>-1</sup>). Usporedbom izračunatih svojstava biodizela vrijednostima propisanih standarda (ASTM D6751 i EN 14214) može se zaključiti da izračunate vrijednosti fizikalnih svojstava biodizela zadovoljavaju vrijednosti propisane američkim i europskim standardima.

10. Smanjenje potrošnje selenita u hranjivoj podlozi u svim istraženim uvjetima ukazuje na sposobnost mikroalge *D. tertiolecta* da asimilira selenit i njegovo korištenje u biološkim procesima.

11. Metanolne frakcije biomase *D. tertiolecta* F3 i F4 nemaju mutageni i premutageni učinak na rast bakterije *Salmonella typhimurium* soja TA 98 i TA 10

## **7. POPIS LITERATURE**

1. Achour, H. Y., Doumandji, A., Bouras, N., Sabaou, N., Assunção, P. (2019). Isolation, molecular identification and the carotenogenesis process of the microalgae *Dunaliella salina* strain DunaDZ1 isolated from an Algerian Salt Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(5). [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19\\_5\\_05](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19_5_05)
2. Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., Molina Grima, E. (2013a). Photobioreactors for the production of microalgae. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2). <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9307-6>
3. Adenle, A. A., Haslam, G. E., Lee, L. (2013). Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries. *Energy Policy*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.05.088>
4. Alías, C. B., García-Malea López, M. C., Acién Fernández, F. G., Fernández Sevilla, J. M., García Sánchez, J. L., & Molina Grima, E. (2004). Influence of power supply in the feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6). <https://doi.org/10.1002/bit.20179>
5. Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Garcia-Granados, R., Alemzadeh, A., Morones-Ramírez, J. R. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>
6. Alishah Aratboni, H., Rafiei, N., Mehdizadeh Allaf, M., Abedini, S., Naseema Rasheed, R., Seif, A., Barati, B., Wang, S., Morones-Ramírez, J. R. (2023). Nanotechnology: An outstanding tool for increasing and better exploitation of microalgae valuable compounds. *Algal Research*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103019>
7. Allen, C. A. W., Watts, K. C., Ackman, R. G., Pegg, M. J. (1999). Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. *Fuel*, 78(11). [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(99\)00059-9](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(99)00059-9)
8. Allen, J. F., Santabarbara, S., Allen, C. A., Puthiyaveetil, S. (2011). Discrete redox signaling pathways regulate photosynthetic light-harvesting and chloroplast gene transcription. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026372>
9. Alonso, D. L., Belarbi, E. H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J., Grima, E. M. (2000). Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 54(5). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00084-4)

10. Alscher, R. G., Donahue, J. L., Cramer, C. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100(2). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000203.x>
11. Amaral, M. S., Loures, C. C. A., Pedro, G. A., Reis, C. E. R., De Castro, H. F., Naves, F. L., Silva, M. B., Prata, A. M. R. (2020). An unconventional two-stage cultivation strategy to increase the lipid content and enhance the fatty acid profile on *Chlorella minutissima* biomass cultivated in a novel internal light integrated photobioreactor aiming at biodiesel production. *Renewable Energy*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.04.084>
12. Andersen, R. A., Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae Isolation Techniques. In *Algal Culturing Techniques*. <https://doi.org/10.1016/b978-012088426-1/50007-x>
13. Araie, H., Sakamoto, K., Suzuki, I., Shiraiwa, Y. (2011). Characterization of the selenite uptake mechanism in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* (haptophyta). *Plant and Cell Physiology*, 52(7). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr070>
14. Araie, H., Shiraiwa, Y. (2009). Selenium utilization strategy by microalgae. In *Molecules* (Vol. 14, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/molecules14124880>
15. Armenta, R. E., Valentine, M. C. (2013). Single-cell oils as a source of omega-3 fatty acids: An overview of recent advances. In *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* (Vol. 90, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11746-012-2154-3>
16. Aslam, A., Rasul, S., Bahadar, A., Hossain, N., Saleem, M., Hussain, S., Rasool, L., Manzoor, H. (2021). Effect of micronutrient and hormone on microalgae growth assessment for biofuel feedstock. *Sustainability (Switzerland)*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/su13095035>
17. Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Lieu, H. Y., Zaini, N., Tan, L. S., Islam, S., Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 119). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109621>
18. Babaei, A., Ranglová, K., Malapascua, J. R., Masojídek, J. (2017). The synergistic effect of Selenium (selenite,  $-\text{SeO}_3^{2-}$ ) dose and irradiance intensity in *Chlorella* cultures. *AMB Express*, 7(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0348-7>
19. Bai, M. Der, Cheng, C. H., Wan, H. M., Lin, Y. H. (2011). Microalgal pigments potential as byproducts in lipid production. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(5). <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2011.02.003>

20. Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. In *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 331, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>
21. Bannenberg, G., Mallon, C., Edwards, H., Yeadon, D., Yan, K., Johnson, H., Ismail, A. (2017). Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Content and Oxidation State of Fish Oil Supplements in New Zealand. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01470-4>
22. Barbosa, M. J., Wijffels, R. H. (n.d.). *29 Biofuels from Microalgae*.
23. Barta, D. G., Coman, V., Vodnar, D. C. (2021). Microalgae as sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids: Biotechnological aspects. *Algal Research*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102410>
24. Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., Schaub, T. (2014). pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, 26(3). <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>
25. Basova, M. M. (2005). Fatty acid composition of lipids in microalgae. *International Journal on Algae*, 7(1). <https://doi.org/10.1615/interjalgae.v7.i1.30>
26. Becerra-Dórame, M. J., López-Elías, J. A., Enríquez-Ocaña, F., Huerta-Aldaz, N., Voltolina, D., Osuna-López, I., Izaguirre-Fierro, G. (2010). The effect of initial cell and nutrient concentrations on the growth and biomass production of outdoor cultures of *Dunaliella* sp. *Annales Botanici Fennici*, 47(2). <https://doi.org/10.5735/085.047.0203>
27. Bellou, S., Baeshen, M. N., Elazzazy, A. M., Aggeli, D., Sayegh, F., Aggelis, G. (2014). Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>
28. Benemann, J. (2013). Microalgae for biofuels and animal feeds. In *Energies* (Vol. 6, Issue 11, pp. 5869–5886). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/en6115869>
29. Bhujade, R., Chidambaram, M., Kumar, A., Sapre, A. (2017). Algae to economically viable low-carbon-footprint oil. In *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101630>
30. Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A., Cohen, Z. (2002). Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant



source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60(5). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00100-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00100-0)

31. Borowitzka, M. A., Reza Moheimani, N. (2013). Open pond culture systems. In *Algae for Biofuels and Energy*. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5479-9_8)

32. Bosma, R., Van Zessen, E., Reith, J. H., Tramper, J., Wijffels, R. H. (2007). Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5). <https://doi.org/10.1002/bit.21319>

33. Bowler, C., Van Montagu, M., Inzé, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.000503>

34. Brennan, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

35. Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B., Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.105>

36. Buchanan, B. B. (2016). The carbon (formerly dark) reactions of photosynthesis. In *Photosynthesis Research* (Vol. 128, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0212-z>

37. Carvalho, A. P., Meireles, L. A., Malcata, F. X. (2006). Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnology Progress*, 22(6). <https://doi.org/10.1002/bp060065r>

38. Carvalho, J. C. M., Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Ferreira-Camargo, L. S., Sato, S. (2014). Microalgae bioreactors. In *Algal Biorefineries: Volume 1: Cultivation of Cells and Products* (pp. 83–126). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_4)

39. Cezare-Gomes, E. A., Lousada, M. E. G., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Ishii, M., Singh, A. K., Carvalho, J. C. M. (2022). Two-stage semi-continuous cultivation of *Dunaliella salina* for  $\beta$ -carotene production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s43153-022-00246-2>

40. Chaisutyakorn, P., Praiboon, J., Kaewsuralikhit, C. (2018). The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 30(1). <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1186-3>

41. Charioui, I., Chikhaoui, M., Filali, F. El, Abbassi, M., Banaoui, A., Kaaya, A. (2015). Effect of the medium culture on cells growth and accumulation of carotenoids in microalgae hypersaline *Dunaliella* sp. isolated from salt ponds of the region of Essaouira in Morocco. *Appl. J. Envir. En. Sci.*, 1(2).
42. Cha, S.-H., Kim, M.-J., Yang, H.-Y., Jin, C.-B., Jeon, Y.-J., Oda, T., Kim, D.-K. (2010). ACE,  $\alpha$ -Glucosidase and Cancer Cell Growth Inhibitory Activities of Extracts and Fractions from Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43(5). <https://doi.org/10.5657/kfas.2010.43.5.437>
43. Chen, H. H., Xue, L. L., Liang, M. H., Jiang, J. G. (2019). Sodium azide intervention, salinity stress and two-step cultivation of *Dunaliella tertiolecta* for lipid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.04.008>
44. Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T. C., Ng, K. Y. S., Salley, S. O. (2011). Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102(2). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>
45. Chen, T. F., Zheng, W. J., Wong, Y. S., Yang, F. (2008). Selenium-induced changes in activities of antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments in *Spirulina platensis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1). <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00600.x>
46. Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1). <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.001>
47. Chen, Z., Wang, L., Qiu, S., Ge, S. (2018). Determination of Microalgal Lipid Content and Fatty Acid for Biofuel Production. In *BioMed Research International* (Vol. 2018). <https://doi.org/10.1155/2018/1503126>
48. Che, R., Ding, K., Huang, L., Zhao, P., Xu, J. W., Li, T., Ma, H., Yu, X. (2016). Enhancing biomass and oil accumulation of *Monoraphidium* sp. FXY-10 by combined fulvic acid and two-step cultivation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.06.035>
49. Che, R., Huang, L., Yu, X. (2015). Enhanced biomass production, lipid yield and sedimentation efficiency by iron ion. *Bioresource Technology*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.009>
50. Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae

cultivation: A review. In *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* (Vol. 91). <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.05.039>

51. Chisti, Y. (2006a). Environmental Pollution and Monitoring microalgae as sustainable cell factories. *Journal of Environmental Engineering and Management*, 5(3).

52. Chisti, Y. (2006b). Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering and Management Journal*, 5(3). <https://doi.org/10.30638/eemj.2006.018>

53. Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. (2017). Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*, 244. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003>

54. Chu, F. F., Chu, P. N., Shen, X. F., Lam, P. K. S., Zeng, R. J. (2014). Effect of phosphorus on biodiesel production from *Scenedesmus obliquus* under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.013>

55. Cikoš, A. M., Flanjak, I., Bojanić, K., Babić, S., Čižmek, L., Čož-Rakovac, R., Jokić, S., Jerković, I. (2021). Bioprospecting of coralline red alga *Amphiroa rigida* j.V. lamouroux: Volatiles, fatty acids and pigments. *Molecules*, 26(3). <https://doi.org/10.3390/molecules26030520>

56. Cirulis, J. T., Scott, J. A., Ross, G. M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae. In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 91, Issue 1). <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0249>

57. Colusse, G. A., Mendes, C. R. B., Duarte, M. E. R., Carvalho, J. C. de, Nosedá, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508>

58. Concas, A., Steriti, A., Pisu, M., Cao, G. (2021). Experimental and theoretical investigation of the effects of iron on growth and lipid synthesis of microalgae in view of their use to produce biofuels. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105349>

59. Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(6). <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>

60. Converti, A., Lodi, A., Del Borghi, A., Solisio, C. (2006). Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 32(1). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.08.013>
61. Costache, T. A., Gabriel Acien Fernandez, F., Morales, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., Stamatini, I., Molina, E. (2013). Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5035-2>
62. Coulombier, N., Jauffrais, T., Lebouvier, N. (2021). Antioxidant compounds from microalgae: A review. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/md19100549>
63. Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Barthelemy, V., Schreiber, N., Brun, P., Lebouvier, N., Jauffrais, T. (2020). Effects of nitrogen availability on the antioxidant activity and carotenoid content of the microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine Drugs*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/md18090453>
64. D'Alessandro, E. B., Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 58). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.162>
65. Dazhi, W., Zhaodi, C., Shaojing, L., Yahui, G. (2003). Toxicity and accumulation of selenite in four microalgae. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 21(3). <https://doi.org/10.1007/bf02842844>
66. de Carvalho Silvello, M. A., Severo Gonçalves, I., Patrícia Held Azambuja, S., Silva Costa, S., Garcia Pereira Silva, P., Oliveira Santos, L., Goldbeck, R. (2022). Microalgae-based carbohydrates: A green innovative source of bioenergy. In *Bioresource Technology* (Vol. 344). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126304>
67. De Jesus Raposo, M. F., De Moraes, R. M. S. C., De Moraes, A. M. M. B. (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. In *Life Sciences* (Vol. 93, Issue 15). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>
68. Del Campo, J. A., García-González, M., Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 74, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
69. Demirbas, A. (2010). Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*, 51(12). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>

70. Demirbas, A., Fatih Demirbas, M. (2011). Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52(1). <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
71. de Oliveira, C. Y. B., Viegas, T. L., da Silva, M. F. O., Fracalossi, D. M., Lopes, R. G., Derner, R. B. (2020). Effect of trace metals on growth performance and accumulation of lipids, proteins, and carbohydrates on the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Aquaculture International*, 28(4). <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00533-0>
72. Deprá, M. C., Mérida, L. G. R., de Menezes, C. R., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. (2019). A new hybrid photobioreactor design for microalgae culture. *Chemical Engineering Research and Design*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.01.023>
73. Deshmukh, S., Kumar, R., & Bala, K. (2019). Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. In *Fuel Processing Technology* (Vol. 191). <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.03.013>
74. Dias, R. R., Deprá, M. C., Severo, I. A., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. (2022). Smart override of the energy matrix in commercial microalgae facilities: A transition path to a low-carbon bioeconomy. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2022.102073>
75. Doblin, M. A., Blackburn, S. I., Hallegraef, G. M. (1999). Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(1). [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00193-2)
76. Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., Patyukov, N., Sukhikh, S. (2020a). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
77. Doucha, J., Lívanský, K. (2006). Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology*, 18(6). <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>
78. Dou, X., Lu, X.-H., Lu, M.-Z., Yu, L.-S., Xue, R., Ji, J.-B. (2013). The Effects of Trace Elements on the Lipid Productivity and Fatty Acid Composition of *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Renewable Energy*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/671545>

79. Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A., Barbosa, M. J. (2013). Food commodities from microalgae. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>
80. Dunn, R. O. (2008). Antioxidants for improving storage stability of biodiesel. In *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/bbb.83>
81. Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum*, 100(2). <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000204.x>
82. Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Otero, A. (2004). The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013288.67536.ed>
83. Fernández, I., Acien, F. G., Berenguel, M., Guzmán, J. L. (2014). First principles model of a tubular photobioreactor for microalgal production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(27). <https://doi.org/10.1021/ie501438r>
84. Fiket, Ž., Roje, V., Mikac, N., Kniewald, G. (2007). Determination of arsenic and other trace elements in bottled waters by high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Croatica Chemica Acta*, 80(1).
85. Fox, J. M., Zimba, P. V. (2018). Minerals and trace elements in microalgae. In *Microalgae in Health and Disease Prevention*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00008-6>
86. Foyer, C. H. (1997). Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*.
87. Frahm, B., Brod, H., Langer, U. (2009). Improving bioreactor cultivation conditions for sensitive cell lines by dynamic membrane aeration. *Cytotechnology*, 59(1). <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9189-9>
88. Francke, L., Löhn, S., Weiderer, P., Kosheleva, A., Wieczorek, N., Kuchta, K. (2022). A novel tubular photobioreactor immersed in open waters for passive temperature control and operated with the microalga *Tetrademus obliquus*. *Algal Research*, 67. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102832>

89. Garrido-Cardenas, J. A., Manzano-Agugliaro, F., Acien-Fernandez, F. G., Molina-Grima, E. (2018). Microalgae research worldwide. In *Algal Research* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.005>
90. Gavrilescu, M., Chisti, Y. (2005). Biotechnology - A sustainable alternative for chemical industry. In *Biotechnology Advances* (Vol. 23, Issues 7–8). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.03.004>
91. Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., Garnier-Laplace, J. (2007). Effect of selenate on growth and photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 83(2). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.04.001>
92. Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. In *Plant Physiology and Biochemistry* (Vol. 48, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
93. Gojkovic, Ž., Garbayo, I., Ariza, J. L. G., Márová, I., Vílchez, C. (2015). Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. In *Algal Research* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.008>
94. Gorgônio, C. M. da S., Aranda, D. A. G., Couri, S. (2013). Morphological and chemical aspects of *Chlorella pyrenoidosa*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis gracilis* microalgae. *Natural Science*, 05(07). <https://doi.org/10.4236/ns.2013.57094>
95. Gouveia, L., Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2). <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>
96. Govender, T., Ramanna, L., Rawat, I., Bux, F. (2012). BODIPY staining, an alternative to the Nile Red fluorescence method for the evaluation of intracellular lipids in microalgae. *Bioresource Technology*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.024>
97. Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. In *Functional Plant Biology* (Vol. 32, Issue 6). <https://doi.org/10.1071/FP05016>
98. Griffiths, M. J., Harrison, S. T. L. (2009). Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5). <https://doi.org/10.1007/s10811-008-9392-7>

99. Guedes, A. C., Gião, M. S., Seabra, R., Ferreira, A. C. S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., Malcata, F. X. (2013). Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/md11041256>
100. Guedes, A. C., Meireles, L. A., Amaro, H. M., Malcata, F. X. (2010). Changes in lipid class and fatty acid composition of cultures of *Pavlova lutheri*, in response to light intensity. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*(7). <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1559-0>
101. Guillard, Ryther. (2005). f/2 Medium for growing diatoms : 2L Recipe. *Techniques*.
102. Guillin, O. M., Vindry, C., Ohlmann, T., Chavatte, L. (2019). Selenium, selenoproteins and viral infection. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/nu11092101>
103. Guimarães, B. O., Van der Graaf, Y., Kunert, I., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., D'Adamo, S. (2023). Effect of phosphorus limitation on Se uptake efficiency in the microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresource Technology*, *367*, 128239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128239>
104. Guimarães, B. O., Villarreal-Toribio, B., García-Barrera, T., Arias-Borrego, A., Gremmen, P., Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., D'Adamo, S. (2022). Effect of sulphur on selenium accumulation and speciation in *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of Functional Foods*, *96*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105215>
105. Guschina, I. A., Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 45, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
106. Halim, R., Webley, P. A. (2015). Nile Red Staining for Oil Determination in Microalgal Cells: A New Insight through Statistical Modelling. *International Journal of Chemical Engineering*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/695061>
107. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. In *Plant Physiology* (Vol. 141, Issue 2). <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
108. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1985). Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, *1*(4). [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90140-0)
109. Hamed, I. (2016). The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*(6). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12227>



110. Hamed, S. M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H. (2017). Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.048>
111. Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A., Sayanova, O. (2014). Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.12.003>
112. Hamouda, R. A. E., Abou-El-Souod, G. W. (2018). Influence of various concentrations of phosphorus on the antibacterial, antioxidant and bioactive components of green microalgae *scenedesmus obliquus*. *International Journal of Pharmacology*, 14(1). <https://doi.org/10.3923/ijp.2018.99.107>
113. Han, S. F., Jin, W., Abomohra, A. E. F., Tu, R., Zhou, X., He, Z., Chen, C., Xie, G. jun. (2019). Municipal Wastewater Enriched with Trace Metals for Enhanced Lipid Production of the Biodiesel-Promising Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioenergy Research*, 12(4). <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10042-5>
114. Han, S. F., Jin, W. B., Tu, R. J., Wu, W. M. (2015). Biofuel production from microalgae as feedstock: Current status and potential. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 35, Issue 2). <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.835301>
115. Hatfield, D. L., Tsuji, P. A., Carlson, B. A., Gladyshev, V. N. (2014). Selenium and selenocysteine: Roles in cancer, health, and development. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 39, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.007>
116. Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J., Gimpel, J. (2016). Carotenoids in microalgae. *Sub-Cellular Biochemistry*, 79. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_8)
117. He, Q., Yang, H., Wu, L., Hu, C. (2015). Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. *Bioresource Technology*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.021>
118. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae - A review. *Food Chemistry*, 98(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
119. Hiroya Araie, Yoshihiro Shiraiwa. (2016). Selenium in Algae. In *The Physiology of Microalgae*.

120. Hoffmann, M., Marxen, K., Schulz, R., Vanselow, K. H. (2010). TFA and EPA productivities of *Nannochloropsis salina* influenced by temperature and nitrate stimuli in turbidostatic controlled experiments. *Marine Drugs*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/md8092526>
121. Ho, S. H., Chen, C. Y., Chang, J. S. (2012). Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology*, 113, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.133>
122. Ho, S. H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J. S., Kondo, A. (2014). Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae - A critical review. In *Biotechnology Advances* (Vol. 32, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.09.002>
123. Huesemann, M. H., Van Wagenen, J., Miller, T., Chavis, A., Hobbs, S., Crowe, B. (2013). A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(6). <https://doi.org/10.1002/bit.24814>
124. Humphrey, A. M. (2004). Chlorophyll as a color and functional ingredient. *Journal of Food Science*, 69(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x>
125. Hu, Q., Kurano, N., Kawachi, M., Iwasaki, I., Miyachi, S. (1998). Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6). <https://doi.org/10.1007/s002530051228>
126. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. In *Plant Journal* (Vol. 54, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
127. Imahara, H., Minami, E., Saka, S. (2006). Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. *Fuel*, 85(12–13). <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.03.003>
128. Janssen, M., Tramper, J., Mur, L. R., Wijffels, R. H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2). <https://doi.org/10.1002/bit.10468>
129. Jiang, X., Yang, L., Wang, Y., Jiang, F., Lai, J., Pan, K. (2023). Proteomics Provide Insight into the Interaction between Selenite and the Microalgae *Dunaliella salina*. *Processes*, 11(2), 563. <https://doi.org/10.3390/pr11020563>

130. Jiří Masojídek, Giuseppe Torzillo, Michal Koblížek. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition*.
131. Jiří Masojídek, Jiří Kopecký, Luca Giannelli, Giuseppe Torzillo. (2011). Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.
132. J., Y., J., C., G., X., H., Y. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. In *Bioresource Technology* (Vol. 175).
133. Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A., Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>
134. 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. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
135. Khoo, K. S., Ahmad, I., Chew, K. W., Iwamoto, K., Bhatnagar, A., Show, P. L. (2023). Enhanced microalgal lipid production for biofuel using different strategies including genetic modification of microalgae: A review. In *Progress in Energy and Combustion Science* (Vol. 96). <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2023.101071>
136. Knothe, G. (2006). Analyzing biodiesel: Standards and other methods. In *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* (Vol. 83, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s11746-006-5033-y>
137. Koley, S., Prasad, S., Bagchi, S. K., Mallick, N. (2017). Development of a harvesting technique for large-scale microalgal harvesting for biodiesel production. *RSC Advances*, 7(12). <https://doi.org/10.1039/c6ra27286j>
138. Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. (2014). Microalgae as versatile cellular factories for valued products. In *Algal Research* (Vol. 6, Issue PA). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
139. Kumar, M., Kulshreshtha, J., Singh, G. P. (2011). Growth and biopigment accumulation of cyanobacterium *Spirulina platensis* at different light intensities and temperature. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000300034>

140. Kunjapur, A. M., Eldridge, R. B. (2010). Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(8). <https://doi.org/10.1021/ie901459u>
141. Lam, M. K., Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>
142. Lananan, F., Jusoh, A., Ali, N., Lam, S. S., Endut, A. (2013). Effect of Conway Medium and f/2 Medium on the growth of six genera of South China Sea marine microalgae. *Bioresource Technology*, 141, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.006>
143. Lapuerta, M., Rodríguez-Fernández, J., de Mora, E. F. (2009). Correlation for the estimation of the cetane number of biodiesel fuels and implications on the iodine number. *Energy Policy*, 37(11). <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.05.049>
144. Lee, D.-M., Min, K.-I., Yim, E.-S., Ha, J.-H., Lee, C.-G., Lee, B.-H. (2014). Study of FAME components and total contents on Micro-algal Biodiesel derived from *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of the Korean Oil Chemists' Society*, 31(2), 320–328. <https://doi.org/10.12925/jkocs.2014.31.2.320>
145. Lee, E., Jalalizadeh, M., Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. In *Algal Research* (Vol. 12). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
146. Lee, S. J., Yoon, B. D., Oh, H. M. (1998). Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, 12(7). <https://doi.org/10.1023/A:1008811716448>
147. Lee, Y. K. (2016). Microalgae Cultivation Fundamentals. In *Green Energy and Technology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-12334-9_1)
148. Legrand, J., Artu, A., Pruvost, J. (2021). A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. In *Reaction Chemistry and Engineering* (Vol. 6, Issue 7). <https://doi.org/10.1039/d0re00450b>
149. Lepetit, B., Goss, R., Jakob, T., Wilhelm, C. (2012). Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. In *Photosynthesis Research* (Vol. 111, Issues 1–2). <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9633-5>
150. Liang, M. H., Xue, L. L., Jiang, J. G. (2019). Two-stage cultivation of *Dunaliella tertiolecta* with glycerol and triethylamine for lipid accumulation: A viable way to alleviate the

inhibitory effect of triethylamine on biomass. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(4).  
<https://doi.org/10.1128/AEM.02614-18>

151. Liang, Y., Beardall, J., Heraud, P. (2006). Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 82(3). <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.11.002>

152. Li, M., Hu, C., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z., Liu, Z. (2006). Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). *Chemosphere*, 62(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.029>

153. Liu, Y., Guan, Y., Gao, B., Yue, Q. (2012). Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.004>

154. Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., Malik, A. (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. In *Algal Research* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102353>

155. Li, Y., Fei, X., Deng, X. (2012). Novel molecular insights into nitrogen starvation-induced triacylglycerols accumulation revealed by differential gene expression analysis in green algae *Micractinium pusillum*. *Biomass and Bioenergy*, 42, 199–211.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.03.010>

156. Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C. Q., Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology Progress*, 24(4). <https://doi.org/10.1021/bp.070371k>

157. Li, Z. Y., Guo, S. Y., Li, L. (2003). Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*, 89(2).  
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00041-5)

158. Lopes, J. C. A., Boros, L., Kráhenbühl, M. A., Meirelles, A. J. A., Daridon, J. L., Pauly, J., Marrucho, I. M., Coutinho, J. A. P. (2008). Prediction of cloud points of biodiesel. *Energy and Fuels*, 22(2). <https://doi.org/10.1021/ef700436d>

159. Lopes, R. G., Cella, H., Mattos, J. J., Marques, M. R. F., Soares, A. T., Antoniosi Filho, N. R., Derner, R. B., Rörig, L. R. (2019). Effect of phosphorus and growth phases on the transcription levels of EPA biosynthesis genes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Revista Brasileira de Botanica*, 42(1). <https://doi.org/10.1007/s40415-019-00515-4>

160. Loubière, K., Olivo, E., Bougaran, G., Pruvost, J., Robert, R., Legrand, J. (2009). A new photobioreactor for continuous microalgal production in hatcheries based on external-loop airlift and swirling flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1). <https://doi.org/10.1002/bit.22035>
161. Luo, H. P., Al-Dahhan, M. H. (2012). Airlift column photobioreactors for *Porphyridium* sp. culturing: Part II. verification of dynamic growth rate model for reactor performance evaluation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4). <https://doi.org/10.1002/bit.24362>
162. Macías-Sánchez, M. D., Serrano, C. M., Rodríguez, M. R., Martínez de la Ossa, E. (2009). Kinetics of the supercritical fluid extraction of carotenoids from microalgae with CO<sub>2</sub> and ethanol as cosolvent. *Chemical Engineering Journal*, 150(1), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.12.006>
163. Maltsev, Y., Maltseva, K. (2021). Fatty acids of microalgae: diversity and applications. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 20, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09571-3>
164. Mandal, M. K., Saikia, P., Chanu, N. K., Chaurasia, N. (2019). Modulation of lipid content and lipid profile by supplementation of iron, zinc, and molybdenum in indigenous microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(20), 20815–20828. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05065-6>
165. Mansour, M. P., Volkman, J. K., Blackburn, S. I. (2003). The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. in batch culture. *Phytochemistry*, 63(2). [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00052-9)
166. Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U. P. (2005). A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(6). <https://doi.org/10.1007/s10811-005-9004-8>
167. Masojídek, J., Ranglová, K., Lakatos, G. E., Benavides, A. M. S., Torzillo, G. (2021). Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures. In *Processes* (Vol. 9, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/pr9050820>
168. Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>

169. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I. N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. In *Clinical Biochemistry* (Vol. 32, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
170. Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J. C. M. (2011). CO<sub>2</sub> from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. *Biotechnology Progress*, 27(3). <https://doi.org/10.1002/btpr.581>
171. McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 108(8). [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00412-5)
172. Meher, L. C., Vidya Sagar, D., Naik, S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification - A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2004.09.002>
173. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
174. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. In *Trends in Plant Science* (Vol. 7, Issue 9). [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
175. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. In *Trends in Plant Science* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
176. Mizuno, Y., Sato, A., Watanabe, K., Hirata, A., Takeshita, T., Ota, S., Sato, N., Zachleder, V., Tsuzuki, M., Kawano, S. (2013). Sequential accumulation of starch and lipid induced by sulfur deficiency in *Chlorella* and *Parachlorella* species. *Bioresource Technology*, 129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.030>
177. Molina Grima, E., Ación Fernández, F. G., García Camacho, F., Camacho Rubio, F., Chisti, Y. (2000). Scale-up of tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5).
178. Morales, M., Aflalo, C., Bernard, O. (2021). Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 150). <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>

179. Morlon, H., Fortin, C., Adam, C., Garnier-Laplace, J. (2006). Selenite transport and its inhibition in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(5). <https://doi.org/10.1897/2512039.1>
180. Morlon, H., Fortin, C., Floriani, M., Adam, C., Garnier-Laplace, J., Boudou, A. (2005). Toxicity of selenite in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Comparison between effects at the population and sub-cellular level. *Aquatic Toxicology*, 73(1). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.02.007>
181. Murata, N., Siegenthaler, P.-A. (2006). Lipids in Photosynthesis: An Overview. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. [https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5\\_1](https://doi.org/10.1007/0-306-48087-5_1)
182. Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri, H., Vatland, A. K., Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 341. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>
183. Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P. C., Dahms, H. U., Ponnusamy, V. K. (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.138>
184. Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, 4(AUG). <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>
185. Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D. V., de Carvalho, G. C., Nascimento, M. A. (2013). Screening Microalgae Strains for Biodiesel Production: Lipid Productivity and Estimation of Fuel Quality Based on Fatty Acids Profiles as Selective Criteria. *Bioenergy Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2>
186. Norsker, N. H., Barbosa, M. J., Vermuë, M. H., Wijffels, R. H. (2011). Microalgal production - A close look at the economics. In *Biotechnology Advances* (Vol. 29, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>
187. OECD. (2011). Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. Test Guideline 201. *Oecd Guidelines for the Testing of Chemicals, March*.



188. Okada, K., Fujiwara, S., Tsuzuki, M. (2020). Energy conservation in photosynthetic microorganisms. In *Journal of General and Applied Microbiology* (Vol. 66, Issue 2, pp. 59–65). Microbiology Research Foundation. <https://doi.org/10.2323/jgam.2020.02.002>
189. Okamoto, O. K., Asano, C. S., Aidar, E. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology*, 32(1). <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00074.x>
190. Osundeko, O., Davies, H., Pittman, J. K. (2013). Oxidative stress-tolerant microalgae strains are highly efficient for biofuel feedstock production on wastewater. *Biomass and Bioenergy*, 56. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.027>
191. Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., Guedes, A. C. (2020). Chapter 18 - Pigments from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products*.
192. Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Boussiba, S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3170-1>
193. Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S. K., Ghosh, A., Mishra, S. (2015). Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>
194. Park, K. H., Lee, C. G. (2001). Effectiveness of flashing light for increasing photosynthetic efficiency of microalgal cultures over a critical cell density. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 6(3). <https://doi.org/10.1007/BF02932549>
195. Pastierová, J., Kramarová, Z., Molnárová, M., Fargašová, A. (2009). Comparison of the sensitivity of four freshwater microalgae to selenate and selenite. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(11).
196. Patil, V., Källqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Gislerød, H. R. (2007). Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquaculture International*, 15(1). <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>
197. Peccia, J., Haznedaroglu, B., Gutierrez, J., Zimmerman, J. B. (2013). Nitrogen supply is an important driver of sustainable microalgae biofuel production. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 31, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.010>
198. Pelah, D., & Cohen, E. (2005). Cellular response of *Chlorella zofingiensis* to exogenous selenium. *Plant Growth Regulation*, 45(3). <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3230-6>

199. Perl-Treves, R., Galun, E. (1991). The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology*, 17(4). <https://doi.org/10.1007/BF00037058>
200. Pikula, K. S., Zakharenko, A. M., Aruoja, V., Golokhvast, K. S., Tsatsakis, A. M. (2019). Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology. In *Current Opinion in Toxicology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.12.006>
201. P. J. Harrison, P. W. Yu, P. A. T., N. M. Price, D. J. Phillips. (1988). Survey of selenium requirements in marine phytoplankton. *Marine Ecology*, 47(1), 89–96.
202. Posten, C. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/elsc.200900003>
203. Prathima Devi, M., Venkata Subhash, G., Venkata Mohan, S. (2012). Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.11.021>
204. Price, N. M., Thompson, P. A., Harrison, P. J. (1987). Selenium:an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 23(1). <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1987.00001.x>
205. Pulz, O. (2001). Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 57, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
206. Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 65, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
207. Pulz, O., Scheibenbogen, K. (2007). Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. In *Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis*. <https://doi.org/10.1007/bfb0102298>
208. Qv, X. Y., Zhou, Q. F., Jiang, J. G. (2014). Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. *Journal of Separation Science*, 37(20). <https://doi.org/10.1002/jssc.201400458>
209. Ra, C. H., Kang, C. H., Kim, N. K., Lee, C. G., Kim, S. K. (2015). Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. *Renewable Energy*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.02.002>

210. Rao, A. R., Sarada, R., Baskaran, V., Ravishankar, G. A. (2006). Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13). <https://doi.org/10.1021/jf060799j>
211. Rashid, N., Rehman, M. S. U., Han, J. I. (2015). Enhanced growth rate and lipid production of freshwater microalgae by adopting two-stage cultivation system under diverse light and nutrients conditions. *Water and Environment Journal*, 29(4). <https://doi.org/10.1111/wej.12110>
212. Ratha, S. K., Babu, S., Renuka, N., Prasanna, R., Prasad, R. B. N., Saxena, A. K. (2013). Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipid accumulation in microalgae. *Journal of Basic Microbiology*, 53(5). <https://doi.org/10.1002/jobm.201200001>
213. Rayman, M. P. (2008). Food-chain selenium and human health: Emphasis on intake. In *British Journal of Nutrition* (Vol. 100, Issue 2). <https://doi.org/10.1017/S0007114508939830>
214. Ren, H., Li, X., Guo, L., Wang, L., Hao, X., Zeng, J. (2022). Integrative Transcriptome and Proteome Analysis Reveals the Absorption and Metabolism of Selenium in Tea Plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.848349>
215. Reunova, Y. A., Aizdaicher, N. A., Khristoforova, N. K., Reunov, A. A. (2007). Effects of selenium on growth and ultrastructure of the marine unicellular alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Russian Journal of Marine Biology*, 33(2). <https://doi.org/10.1134/S1063074007020071>
216. Rezayian, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. In *Toxicology Reports* (Vol. 6). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>
217. Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B. (n.d.). Mikroalge-potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela Microalgae-a potential source of lipids for biodiesel production. In *CROATIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY*.
218. Ribani, M., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G. (2007). Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, 1156(1-2 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.080>

219. Richmond, A. (2013). Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch11>
220. Rizwan, M., Mujtaba, G., Lee, K. (2017). Effects of iron sources on the growth and lipid/carbohydrate production of marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(1). <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0628-0>
221. Roessler, P. G. (1988). Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 267(2). [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(88\)90059-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(88)90059-8)
222. Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J. P., Bougaran, G. (2015). The use of fluorescent Nile red and BODIPY for lipid measurement in microalgae. In *Biotechnology for Biofuels* (Vol. 8, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0220-4>
223. Ryu, K. H., Kim, B., Lee, J. H. (2019). A model-based optimization of microalgal cultivation strategies for lipid production under photoautotrophic condition. *Computers and Chemical Engineering*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.10.004>
224. Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 97). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.050>
225. Sánchez Mirón, A., Cerón García, M. C., García Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y. (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7). [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00229-6)
226. Santhosh, S., Dhandapani, R., Hemalatha, N. (2016). Bioactive compounds from Microalgae and its different applications-a review. *Pelagia Research Library Advances in Applied Science Research*, 7(4).
227. Sathasivam, R., Juntawong, N. (2013). Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int J Curr Sci*, 5(January).

228. Scheer, H. (2007). An Overview of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications. In Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6\\_1](https://doi.org/10.1007/1-4020-4516-6_1)
229. Schiavon, M., Ertani, A., Parrasia, S., Vecchia, F. D. (2017). Selenium accumulation and metabolism in algae. In *Aquatic Toxicology* (Vol. 189). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.011>
230. Schiavon, M., Moro, I., Pilon-Smits, E. A. H., Matozzo, V., Malagoli, M., Dalla Vecchia, F. (2012). Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquatic Toxicology*, 122–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.06.014>
231. Schiavon, M., Pilon-Smits, E. A. H., Citta, A., Folda, A., Rigobello, M. P., Dalla Vecchia, F. (2016). Comparative effects of selenate and selenite on selenium accumulation, morphophysiology, and glutathione synthesis in *Ulva australis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6649-6>
232. Scott D. Doughman, Srirama Krupanidhi, Carani B. Sanjeevi. (2007). Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. *Current Diabetes Reviews*, 3(3). <https://doi.org/10.2174/157339907781368968>
233. Shaker, S., Morowvat, M. H., Ghasemi, Y. (2017). Effects of sulfur, iron and manganese starvation on growth, carotene production and lipid profile of *Dunaliella salina*. *Journal of Young Pharmacists*, 9(1). <https://doi.org/10.5530/jyp.2017.9.9>
234. Shanmugam, S., Mathimani, T., Anto, S., Sudhakar, M. P., Kumar, S. S., Pugazhendhi, A. (2020). Cell density, Lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123061>
235. Shi, T. Q., Wang, L. R., Zhang, Z. X., Sun, X. M., Huang, H. (2020). Stresses as First-Line Tools for Enhancing Lipid and Carotenoid Production in Microalgae. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00610>
236. Shokravi, Z., Shokravi, H., Chyuan, O. H., Lau, W. J., Koloor, S. S. R., Petru, M., Ismail, A. F. (2020). Improving ‘lipid productivity’ in microalgae by bilateral enhancement of biomass and lipid contents: A review. *Sustainability (Switzerland)*, 12(21). <https://doi.org/10.3390/su12219083>

237. Silva, B. F., Wendt, E. V., Castro, J. C., de Oliveira, A. E., Carrim, A. J. I., Vieira, J. D. G., Sassi, R., Sassi, C. F. da C., da Silva, A. L. V., Barboza, G. F. de O., Antoniosi Filho, N. R. (2015). Analysis of some chemical elements in marine microalgae for biodiesel production and other uses. *Algal Research*, 9, 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.010>
238. Singh, B., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F. (2014). Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.067>
239. Singh, S. P., Singh, P. (2014). Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 38). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
240. Sirohi, R., Kumar Pandey, A., Ranganathan, P., Singh, S., Udayan, A., Kumar Awasthi, M., Hoang, A. T., Chilakamarry, C. R., Kim, S. H., Sim, S. J. (2022). Design and applications of photobioreactors- a review. In *Bioresource Technology* (Vol. 349). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126858>
241. Solovchenko, A. E. (2012). Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses. In *Russian Journal of Plant Physiology* (Vol. 59, Issue 2). <https://doi.org/10.1134/S1021443712020161>
242. Song, X., Liu, B. F., Kong, F., Ren, N. Q., & Ren, H. Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. In *Resources, Conservation and Recycling* (Vol. 183). <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106355>
243. Stansell, G. R., Gray, V. M., Sym, S. D. (2012). Microalgal fatty acid composition: Implications for biodiesel quality. *Journal of Applied Phycology*, 24(4). <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9696-x>
244. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (n.d.). Lipidna peroksidacija-uzorci i posljedice.
245. Stillwell, W., Wassall, S. R. (2003). Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 126, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4)
246. Sun, X., Cao, Y., Xu, H., Liu, Y., Sun, J., Qiao, D., Cao, Y. (2014). Effect of nitrogen-starvation, light intensity and iron on triacylglyceride/carbohydrate production and fatty acid

- profile of *Neochloris oleoabundans* HK-129 by a two-stage process. *Bioresource Technology*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.109>
247. Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. In *Biotechnology for Biofuels* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
248. Taiz, L., Zeiger, E. (2010). Plant Physiology 5th ed, Annals of Botany. In *Annals of Botany*.
249. Tang, H., Abunasser, N., Garcia, M. E. D., Chen, M., Simon Ng, K. Y., Salley, S. O. (2011). Potential of microalgae oil from *Dunaliella tertiolecta* as a feedstock for biodiesel. *Applied Energy*, 88(10). <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.09.013>
250. Telfer, A. (2005). Too much light? How  $\beta$ -carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 4(12). <https://doi.org/10.1039/b507888c>
251. Thompson, G. A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. In *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* (Vol. 1302, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8)
252. Tong, D., Hu, C., Jiang, K., Li, Y. (2011). Cetane number prediction of biodiesel from the composition of the fatty acid methyl esters. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3). <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1672-0>
253. Torzillo, G., Chini Zittelli, G. (2015). Tubular photobioreactors. In *Algal Biorefineries: Volume 2: Products and Refinery Design* (pp. 187–212). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_5)
254. Tredici, M. R. (2007). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In *Handbook of Microalgal Culture*. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch9>
255. Tredici, M. R. (2010). Photobiology of microalgae mass cultures: Understanding the tools for the next green revolution. In *Biofuels* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.4155/bfs.09.10>
256. Tredici, M. R., Carlozzi, P., Chini Zittelli, G., Materassi, R. (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 38(2–3). [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90147-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90147-C)
257. Tredici, M. R., Zittelli, G. C. (1998). Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(2). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J)

258. Trivedi, J., Atray, N., Agrawal, D., Ray, A. (2022). Enhanced lipid production in *Scenedesmus obliquus* via nitrogen starvation in a two-stage cultivation process and evaluation for biodiesel production. *Fuel*, 316. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123418>
259. Turanov, A. A., Xu, X. M., Carlson, B. A., Yoo, M. H., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2011). Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Advances in Nutrition*, 2(2). <https://doi.org/10.3945/an.110.000265>
260. Ugwu, C. U., Aoyagi, H., Uchiyama, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. In *Bioresource Technology* (Vol. 99, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
261. Umysová, D., Biová, K., Hlavová, M., Íková, M., MacHát, J., Doucha, J., Zachleder, V. (2009). Bioaccumulation and toxicity of selenium compounds in the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *BMC Plant Biology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-58>
262. Van Wychen, S., Ramirez, K., Laurens, L. M. L. (2013). Determination of Total Lipids as Fatty Acid Methyl Esters (FAME) by in situ Transesterification. *Contract*, 303(December).
263. Vasumathi, K. K., Premalatha, M., Subramanian, P. (2012). Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 16, Issue 7). <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.06.013>
264. Vindry, C., Ohlmann, T., Chavatte, L. (2018). Translation regulation of mammalian selenoproteins. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1862, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.05.010>
265. Wahidin, S., Idris, A., Shaleh, S. R. M. (2013). The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource Technology*, 129, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.032>
266. Wang, B., Lan, C. Q., Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. In *Biotechnology Advances* (Vol. 30, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>
267. Watsuji, T. o., Naka, A., Morita, Y., Kurahashi, M. (2021). Effect of temperature and dissolved oxygen on gravity sedimentation of the unicellular alga *Dunaliella salina*. *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/s13213-021-01636-6>

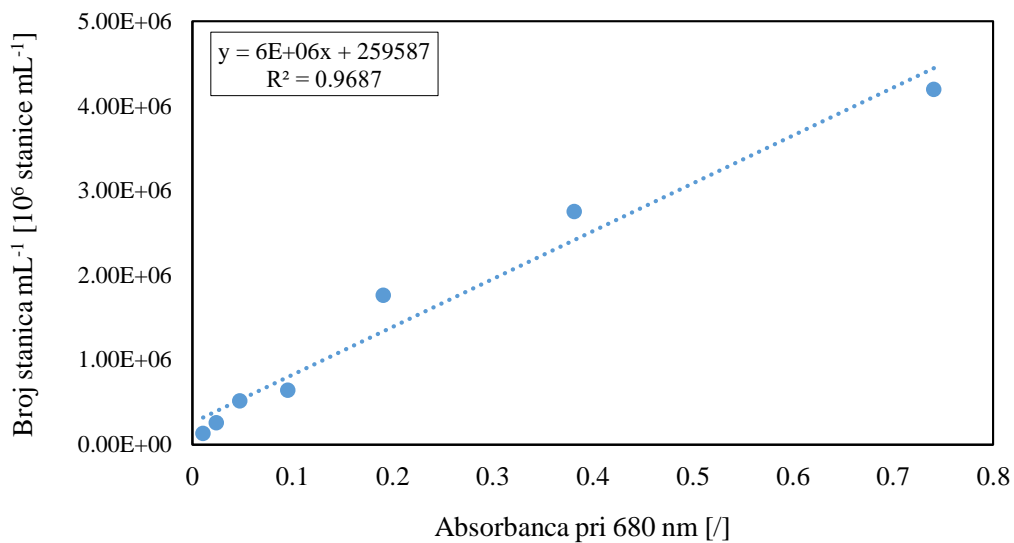


268. Wijffels, R. H., Kruse, O., Hellingwerf, K. J. (2013). Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 24, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.004>
269. Woodside, J. V., McCall, D., McGartland, C., Young, I. S. (2005). Micronutrients: dietary intake v. supplement use. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(4), 543–553. <https://doi.org/10.1079/pns2005464>
270. Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(14). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016>
271. Xiong, Q., Pang, Q., Pan, X., Chika, A. O., Wang, L., Shi, J., Jia, L., Chen, C., Gao, Y. (2015). Facile sand enhanced electro-flocculation for cost-efficient harvesting of *Dunaliella salina*. *Bioresource Technology*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.135>
272. Xu, L., Weathers, P. J., Xiong, X. R., Liu, C. Z. (2009). Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1002/elsc.200800111>
273. Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Ravishankar, G. A., Ambati, R. R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. In *Cells* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells10020393>
274. Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M., Takriff, M. S. (2014). An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. In *Journal of Biological Research (Greece)* (Vol. 21, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/2241-5793-21-6>
275. Yang, J. S., Cao, J., Xing, G. L., Yuan, H. L. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*, 175, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.124>
276. Yeesang, C., Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresource Technology*, 102(3), 3034–3040. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.013>

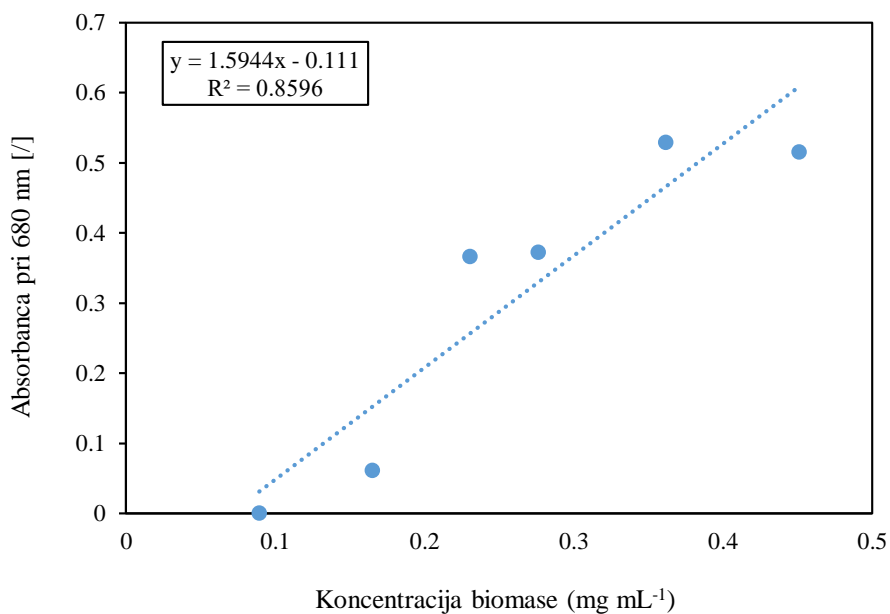
277. Yilancioglu, K., Cokol, M., Pastirmaci, I., Erman, B., Cetiner, S. (2014). Oxidative stress is a mediator for increased lipid accumulation in a newly isolated *Dunaliella salina* strain. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091957>
278. Yoo, C., Jun, S. Y., Lee, J. Y., Ahn, C. Y., Oh, H. M. (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, 101(1 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.030>
279. Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of Trace Elements by Wetland Plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27(3). <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700030032x>
280. Zhang, S., He, Y., Sen, B., Wang, G. (2020). Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms. In *Bioresource Technology* (Vol. 307). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123234>
281. Zhao, Y., Song, X., Cao, X., Wang, Y., Si, Z., Chen, Y. (2019). Toxic effect and bioaccumulation of selenium in green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Applied Phycology*, 31(3). <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1711-z>
282. Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Li, J., Hu, Z. (2017). Effects of selenite on green microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of selenium and enhancement of astaxanthin production. *Aquatic Toxicology*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.12.008>
283. Zhong, Y., Cheng, J. J. (2017). Effects of Selenite on Unicellular Green Microalga *Chlorella pyrenoidosa*: Bioaccumulation of Selenium, Enhancement of Photosynthetic Pigments, and Amino Acid Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04246>
284. Zittelli, G. C., Biondi, N., Rodolfi, L., Tredici, M. R. (2013). Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch13>

## **8. PRILOZI**

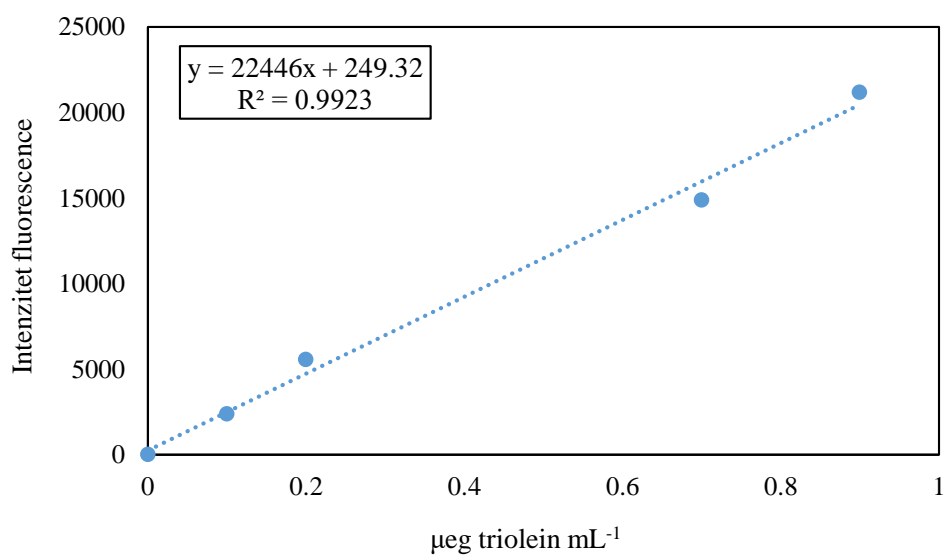
## 8.1. Baždarni dijagrami



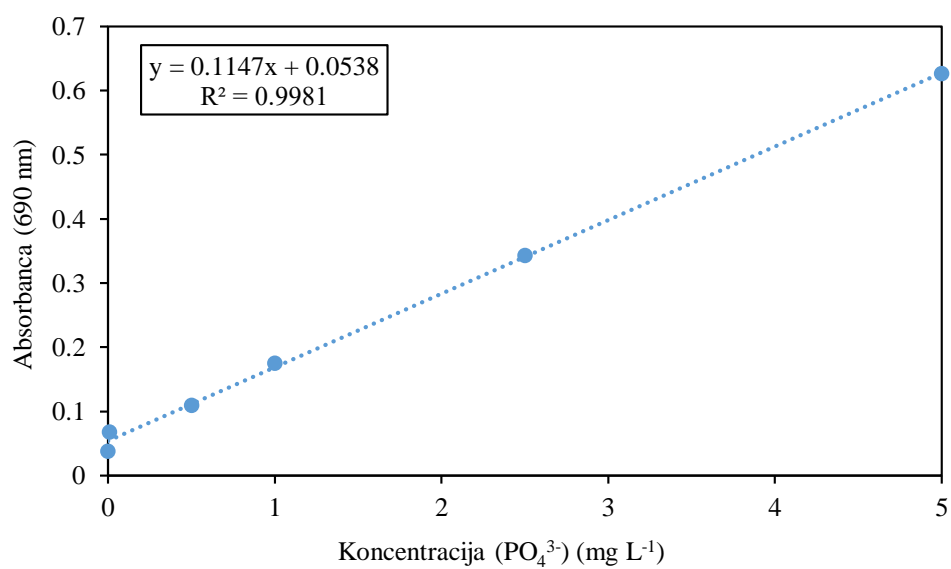
**Prilog 1.** Ovisnost optičke gustoće kulture mikroalge *D. tertiolecta* o koncentraciji stanica



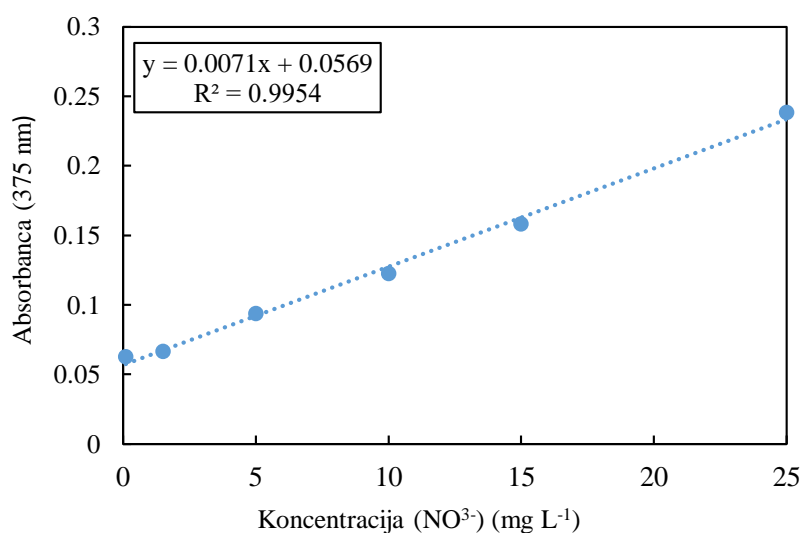
**Prilog 2.** Ovisnost optičke gustoće kulture stanica mikroalge *D. tertiolecta* o koncentraciji biomase



**Prilog 3.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije neutralnih lipida kao ekvivalenata trioleina ( $\mu\text{g triolein mL}^{-1}$ ) Nile Red metodom.



**Prilog 4.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fosfatnih iona



**Prilog 5.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije nitritnih iona

**Prilog 6.** Metil esteri masnih kiselina i pripadajuće jednačbe pravca određene GC metodom

| Standard                            | Jednačba pravca    | R <sup>2</sup> |
|-------------------------------------|--------------------|----------------|
| Metil butirat (C4:0)                | $y=0,468x-0,041$   | 0,99051        |
| Metil heksanoat (C6:0)              | $y=0,577x-0,038$   | 0,99531        |
| Metil oktanoat (C8:0)               | $y=0,6573x-0,040$  | 0,99520        |
| Metil dekanat (C10:0)               | $y=0,710x-0,046$   | 0,99542        |
| Metil undekanoat (C11:0)            | $y=0,742x-0,026$   | 0,99544        |
| Metil laurat (C12:0)                | $y=0,751x-0,058$   | 0,99470        |
| Metil tridekanoat (C13:0)           | $y=0,765x-0,030$   | 0,99439        |
| Metil miristat (C14:0)              | $y=0,7791x-0,0621$ | 0,99439        |
| Metil miristoleat (C14:1, cis 9)    | $y=0,7698x-0,0311$ | 0,99427        |
| Metil pentadekanoat (C15:0)         | $y=0,7959x-0,0316$ | 0,99443        |
| Metil pentadekanoat (C15:0, cis 10) | $y=0,7817x-0,0309$ | 0,99447        |
| Metil palmitat (C16:0)              | $y=0,7955x-0,0974$ | 0,99410        |

|  |                    |         |
|--|--------------------|---------|
| Metil palmitoleat (C16:1, cis 9)                           | $y=0,7919x-0,0321$ | 0,99476 |
| Metil heptadekanoat (C17:0)                                | $y=0,792x-0,031$   | 0,99414 |
| Metil heptadekanoat (C17:1, cis 10)                        | $y=0,775-0,029$    | 0,99511 |
| Metil stearat (C18:0)                                      | $y=0,821x-0,067$   | 0,99395 |
| Metil elaidat + Metil oleat<br>(C18:1, trans 9, cis 9)     | $y=0,817x-0,099$   | 0,99410 |
| Metil linoelaidat) (C18:2, trans 9, 12)                    | $y=0,813x-0,030$   | 0,99411 |
| Metil linoleat (C18:2, cis 9, 12)                          | $y=0,833x-0,023$   | 0,99713 |
| Metil arahidat (C20:0)                                     | $y=0,392x-0,031$   | 0,99433 |
| Metil c-linolenat (C18:3, cis 6, 9, 12)                    | $y=0,802x-0,031$   | 0,99460 |
| Metil eikosenoat (C20:1, cis 11)                           | $y=0,802x-0,031$   | 0,99497 |
| Metil linolenat (C18:3, cis 9, 12, 15)                     | $y=0,826x-0,033$   | 0,99415 |
| Metil heneikosanoat (C21:0)                                | $y=0,980x+0,010$   | 0,97951 |
| Metil eikosadinoat<br>(C20:2, cis 11, 14)                  | $y=0,844x-0,034$   | 0,99382 |
| Metil behenat (C22:0)                                      | $y=0,395x-0,032$   | 0,99414 |
| Metil eikosatrienoat<br>(C20:3, cis 8, 11, 14)             | $y=1,766x-0,082$   | 0,99164 |
| Metil trikozanoat (C23:0)                                  | $y=0,616x-0,022$   | 0,99536 |
| Metil arahidonat (5,8,11,14) (C20:4)                       | $y=0,841x-0,033$   | 0,99410 |
| Metil dokozadienoat<br>(C22:2, cis 13, 16)                 | $y=0,927x-0,056$   | 0,99410 |
| Metil lignocerat (C24:0)                                   | $y=0,415x-0,031$   | 0,99514 |
| Metil eikozapentaenoat<br>(C20:5, cis 5, 8, 11, 14, 17)    | $y=1,721x-0,068$   | 0,99425 |
| Metil nervonat (C24:1, cis 15)                             | $y=0,849x-0,034$   | 0,99348 |
| Metil dokozahexaenoat<br>(C22:6, cis 4, 7, 10, 13, 16, 19) | $y=0,485x-0,016$   | 0,99602 |

---

**Prilog 7.** Karotenoidi i pripadajuće jednačbe pravca određene HPLC metodom

| <b>Standard</b> | <b>Jednažba pravca</b> | <b>R<sup>2</sup></b> |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| astaksantin     | $y=3292,7x+40,125$     | 0,9975               |
| fukoksantin     | $y=7668,2x+92,726$     | 0,9961               |
| kantaksantin    | $y=34372x-79,64$       | 0,9988               |
| neoksantin      | $y=9842,1x-92,8$       | 0,9982               |
| violaksantin    | $y=7544,2x+20,335$     | 0,9941               |
| Beta-karoten    | $y=35718x-112,49$      | 0,9943               |
| zeaksantin      | $y=5847,3x-35,7$       | 0,9993               |
| lutein          | $y=12163x-41,899$      | 0,9954               |



## **9. ŽIVOTOPIS**

Maja Galić Perećinec rođena je 10. ožujka 1993. godine u Zagrebu. Završila je I. opću gimnaziju 2012. godine, nakon čega je upisala smjer Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Svoj završni rad pod naslovom *Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina* izradila je u Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka te time stekla diplomu prvostupnice biotehnologije. Nakon završetka preddiplomskog studija upisala je smjer Bioproceno inženjerstvo te je 2017. godine obranom diplomskog rada pod naslovom *Proizvodnja bioetanola na blago kiselinskom hidrolizatu pšenične slame dobivenom pomoću fosforne kiseline u različitim mjerilima*, izrađenog također pod mentorstvom prof. dr. sc. Božidara Šanteka, diplomirala i stekla stupanj mag. ing. bioproc. Diplomski rad nastao je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada kao dio HRRZ projekta *Održiva proizvodnja bioetanola i biokemikalija iz otpadnih poljoprivrednih lignoceluloznih sirovina*. Osim izrade diplomskog rada, volonterski se pridružila istraživačkom radu na istom projektu.

Nakon završetka diplomskog studija, 2018. godine zaposlila se kao doktorandica na projektu Bioprospecting Jadranskog mora u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković gdje je izrađivala svoj doktorski rad pod mentorstvom dr.sc. Rozelindre Čož-Rakovac i dr.sc. Mirele Ivančić Šantek. Iste godine upisala je poslijediplomski studij Biotehnologije i bioprocenog inženjerstva, prehrambene tehnologije i nutricionizma. Njezino područje istraživačkog rada obuhvaća različite aspekte biotehnologije s posebnim naglaskom na mikroalge. Njezin rad uključuje izolaciju i pročišćavanje mikroalgalnih vrsta, kultivaciju mikroalgi u različitim bioreaktorskim sustavima, optimizaciju uvjeta uzgoja, ispitivanje bioaktivnosti mikroalgalnih vrsta te analizu lipida koristeći analitičke metode poput HPLC-a i GC-a.

Maja je aktivno sudjelovala u izradi i pisanju više znanstvenih istraživanja te se može pohvaliti statusom prvog autora jednog i koautorstva četiriju znanstvenih radova s čimbenikom odjeka iznad medijana područja. Prisustvovala je i prezentirala svoj rad na 7 međunarodnih i 5 domaćih kongresa, gdje je održala dva usmena predavanja. Osim toga, Maja je nagrađena prestižnom stipendijom EMEC22, dodatno ističući svoje akademske postignuća.

### Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisu indeksiranom u CC ili SCI:

1. Grubišić, M., Galić Perečinec, M., Peremin, I., Mihajlovski, K., Beluhan, S., Šantek, B., Ivančić Šantek, M. (2022). Optimization of Pretreatment Conditions and Enzymatic Hydrolysis of Corn Cobs for Production of Microbial Lipids by *Trichosporon oleaginosus*. *Energies*, 15(9), 3208.
2. Ivančić Šantek, M., Grubišić, M., Galić Perečinec, M., Beluhan, S., Šantek, B. (2021). Lipid production by *Mortierella isabellina* from pretreated corn cobs and effect of lignocellulose derived inhibitors on growth and lipid synthesis. *Process Biochemistry*, 109, 46-58.
3. Galić Perečinec, M., Babić, S., Čižmek, L., Selmani, A., Topić Popović, N. Sikirić-Dutour, M., Čož-Rakovac, R. (2021). Selenite as a lipid inducer in marine microalga *Dunaliella tertiolecta*: Comparison of one-stage and two-stage cultivation strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-20.
4. Palčić, A., Babić, S., Maršavelski, A., Galić, M., Topić Popović, N., Strunjak-Perović, I., Čož-Rakovac, L., Bronić, J., Valtchev, V. (2020). Nanosized zeolite beta-Determining the safety of usage by zebrafish *Danio rerio* embryos. *Microporous and Mesoporous Materials*, 299, 110103.
5. Marđetko, N., Novak, M., Trontel, A., Grubišić, M., Galić, M., Šantek, B. (2018). Bioethanol production from dilute-acid pre-treated wheat straw liquor hydrolysate by genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(4), 483-499.