

Izolacija i selekcija mikroalgi za proizvodnju ulja

Bojana R. Danilović¹, Jelena M. Cvetković-Rakić¹, Jovan Ćirić¹, Jelica B. Simeunović², Vlada B. Veljković¹, Dragiša S. Savić¹

¹Tehnološki fakultet u Leskovcu, Univerzitet u Nišu, Niš

²Prirodno–matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad

Izvod

Proizvodnja biodizela privlači sve veću pažnju istraživača poslednjih godina. Trenutna komercijalna proizvodnja biodizela uključuje transesterifikaciju ulja dobijenog iz uljarica. Kako imaju veliku brzinu rasta, visok sadržaj ulja, a mogu se gajiti u sredinama nepovoljnim za rast biljnih vrsta, mikroalge predstavljaju dobru alternativu za proizvodnju ulja. Pored toga, gajenje mikroalgi doprinosi i zaštiti životne sredine u smislu smanjenja sadržaja ugljen-dioksida u atmosferi. U cilju proučavanja mogućnosti gajenja mikroalgi za proizvodnju ulja, izvršena je izolacija i identifikacija 6 sojeva slatkodvodnih mikroalgi iz stajaćih voda u okolini Leskovca. Utvrđeno je da mikroalge pripadaju rodovima *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus*. Izolati su, zatim gajeni u laboratorijskim, kontrolisanim uslovima uz određivanje brzine rasta, produktivnosti biomase i sadržaja ulja. Najveći sadržaj suve biomase utvrđen je kod sojeva *Chlorococcum* sp. i *Desmodesmus* sp.1 (1,5 g/dm³), dok se sadržaj ulja kretao u opsegu od 15,8% (*Chlorococcum* sp.) do 33% (*Chlorella* sp.). Kako je najveća produktivnost ulja utvrđena kod mikroalgi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp., ova dva izolata su najpogodnija za dalja proučavanja u cilju poboljšanja prinosa ulja i mogućnosti upotrebe u procesu proizvodnje biodizela.

Ključne reči: mikroalge, biomasa, brzina rasta, produktivnost ulja.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Rezerve fosilnih goriva nisu beskonačne, pri čemu njihovo sagorevanje dovodi do emisije štetnih gasova (CO₂) čija akumulacija vodi kontaminaciji životne sredine i globalnom zagrevanju [1]. Poslednjih godina sve veći značaj dobija upotreba alternativnih izvora energije, kao što je biodizel. Trenutna komercijalna proizvodnja biodizela podrazumeva transesterifikaciju triglicerida iz ulja dobijenog pretežno iz uljarica (uljana repica, suncokret, soja, palma i dr.). Upotreba poljoprivrednih kultura kao sirovina za proizvodnju biogoriva utiče i na rast cena hrane, pa ova proizvodnja nije održiva [2]. Zbog toga, mikroalge se mogu smatrati jednim od obećavajućih izvora ulja za proizvodnju biodizela [3]. Prednosti njihove primene ogledaju se u visokom sadržaju ulja, sposobnosti brzog rasta, mogućnosti gajenja u različitim sredinama, posebno onim nepogodnim za gajenje biljnih vrsta, kao i sposobnosti da koriste CO₂ kao izvor ugljenika [4]. Mikroalge pružaju mogućnost proizvodnje do 100 puta više biodizela po jedinici površine gajenja u odnosu na suncokret i uljanu repicu [3].

Alge sadrže pretežno zasićene i monozasićene masne kiseline, dok su trigliceridi najčešći konstituenti masti do 80% ukupne frakcije lipida. Ostali značajniji lipidi koji mogu biti prisutni u algama su: sulfokvinozitol, digliceridi, mono i digalakoil digliceridi, lecitin i

inozitol [5]. Lipidi iz algi se obično sastoje od masnih kiselina koje imaju ukupan broj ugljenika u opsegu C₁₂–C₂₂ [5]. Smatra se da profil masnih kiselina utiče na kvalitet biodizela. Mikroalge sadrže masne kiseline koje se mogu koristiti za proizvodnju biodizela, npr. zasićene masne kiseline, koje obezbeđuju dobru oksidacionu stabilnost [6]. Ostala fizička i hemijska svojstva, kao što su gustina, viskoznost, kiselinska vrednost i toplotna vrednost biodizela dobijenog iz ulja mikroalgi i dizela iz nafte su vema slična [7].

Određivanje sadržaja ulja u mikroalgama je bilo predmet brojnih istraživanja [3,8–12]. Pri tome je utvrđeno da je najveći sadržaj ulja određen kod slatkodvodnih vrsta rodova *Botryococcus* [9], *Chlorella* [9,10,13,14], *Desmodesmus* [12] i *Clamydomonas* [10]. Pri proučavanju sastava masnih kiselina kod šest sojeva algi [6], utvrđeno je da *Botryococcus braunii* i *Scenedesmus obliquus* imaju visok sadržaj triglicerida koji se sastoje od oleinske kiseline (18:1), za koju se smatra da je povoljna za proizvodnju biodizela.

Kako postoji preko 50000 vrsta mikroalgi (do sada proučeno oko 30000 vrsta [3]) sa različitim fizičkim, hemijskim i biološkim svojstvima koja mogu različito uticati na proces proizvodnje ulja, veoma je važno izvršiti pravilnu selekciju. Pri tome treba uzeti u obzir kriterijume, kao što su: brzina rasta, sadržaj ulja, profil masnih kiselina i jednostavnost izdvajanja mikroalgi iz fermentacione tečnosti [15]. U ovom radu izvršena je izolacija mikroalgi iz stajaćih voda, kao i njihova identifikacija i karakterizacija (određivanje brzine rasta, pro-

NAUČNI RAD

UDK 662.756.3:582.26:66

Hem. Ind. 71 (1) 69–74 (2017)

doi: 10.2298/HEMIND151127019D

Prepiska: D.S. Savić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac.

E-pošta: savic@tf.ni.ac.rs

Rad primljen: 27. novembar, 2015

Rad prihvaćen: 28. april, 2016

duktivnosti biomase i sadržaja ulja), a u cilju proučavanja mogućnosti upotrebe mikroalgi za proizvodnju biodizela.

EKSPERIMENTALNI DEO

Izolacija i identifikacija mikroalgi

Za izolaciju mikroalgi korišćeni su uzorci stajaćih voda iz okoline Leskovca. Izolacija je izvršena primenom dve metode: metoda serijskog razblaženja i metoda izolacije na agarizovanim podlogama. Nezavisno od primenjene metode, za izolaciju je korišćena BBM podloga sledećeg sastava (g/dm^3): NaNO_3 0,249; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0250; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075; K_2HPO_4 0,072; KH_2PO_4 0,175; NaCl 0,025; EDTA 0,16; KOH 0,077; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,012; H_3BO_3 0,028; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,019; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,004; MoO_3 0,002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001. Čvrsta podloga dobijena je dodatkom 1, 5% agara. Podloge su sterilisane u autoklavu na temperaturi od 121°C u trajanju od 15 min.

Metoda serijskog razblaženja sastoji se u pravljenju serije razblaženja i inkubacije na 27°C tokom 14 dana. Nakon inkubacije pravljen je nova serija razblaženja sve do dobijanja unialgalne kulture. Metoda izolacije na agarizovanim podlogama sastoji se u direktnom nanošenju uzorka na čvstu BBM podlogu. Nakon inkubacije na 27°C tokom 14 dana, pojedinačne kolonije su dalje prečišćene striklovanjem na ploče sa BBM podlogom do dobijanja čiste kulture. Izolovane i prečišćene vrste mikroalgi identifikovane su na osnovu morfoloških karakteristika [16,17]. Čiste kulture su prenete na kosi agar BBM i čuvane na 4°C do izvođenja eksperimenta.

Gajenje mikroalgi

Inokulum mikroalgi pripremljen je zasejavanjem čiste kulture mikroalgi sa kosog agara u 200 cm^3 BBM podloge i gajenjem na rotacionoj mučkalici (150 min^{-1}), na temperaturi od 27°C pri konstantnom veštačkom osvetljenju tokom 28 dana. Inokulum je zatim zasejan u 400 cm^3 BBM podloge tako da je vrednost apsorbance merene na 680 nm iznosila 0,05. Alge su gajene pri istim uslovima kao i inokulum, a njihov rast je praćen spektrofotometrijski, merenjem optičke gustine na spektrofotometru (Pye unicam, Engleska) na 680 nm u vremenskom razmaku od 2 dana. Specifična brzina rasta mikroalgi izračunata je po formuli [18]:

$$\text{Brzina rasta} = (\ln OD_t - \ln OD_0) / t$$

gde OD_t predstavlja optičku gustinu nakon vremena t , a OD_0 početnu optičku gustinu.

Određivanje suve biomase

Za određivanje suve biomase, 10 cm^3 uzorka kulture je sipano u prethodno izmerenu praznu petri ploču i sušeno do konstantne mase na 105°C . Suva biomasa je izračunata iz razlike pune i prazne petri ploče. Sadržaj

suve biomase izražen je po jedinici zapremine kulture. Eksperimenti su vršeni u triplikatu, a podaci su izraženi kao srednja vrednost.

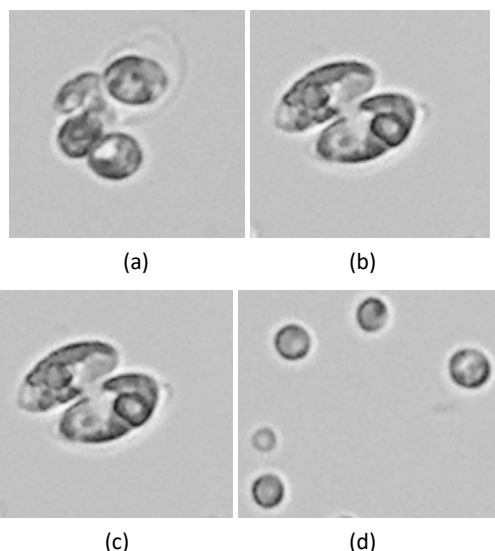
Ekstrakcija ulja

Za ekstrakciju ulja, izolovane mikroalge su gajene u 2 dm^3 BBM podloge pri pomenutim uslovima tokom 28 dana. Biomasa je odvojena centrifugiranjem tokom 15 min na 6000 rpm i osušena na 105°C . Ekstrakcija ulja izvršena je izmenjenom Bligh–Dayer metodom [10], pri čemu su kao ekstrakciono sredstvo korišćeni hloroform i metanol (u zapreminskom odnosu 2:1). Nakon mešanja na vorteksu, dodata je voda i metanol, tako da je konačni odnos hloroform:metanol:voda iznosio 1:1:0,9. Centrifugiranjem su izdvojena dva sloja: hloroformski i vodeno-metanolni. Hloroformski sloj je ispran sa 25 cm^3 5% rastvora NaCl i uparen do suva. Nakon toga, sadržaj lipida je određen gravimetrijski. Produktivnost ulja izražena je kao masa ulja po jedinici zapremine fermentacione tecnosti, a sadržaj ulja kao procentni sadržaj ulja u suvoj biomasi mikroalgi.

REZULTATI I DISKUSIJA

Izolacija i identifikacija mikroalgi

Iz uzoraka vode izolovano je ukupno 6 izolata mikroalgi. Na osnovu morfologije, alge su identifikovane kao pripadnici rodova zelenih algi: *Chlorococcum*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus* i *Chlorella* (slika 1).



Slika 1. Mikroskopski izgled ćelija mikroalgi (uvećanje $40\times$) izolovanih iz stajaćih voda u okolini Leskovca: a) *Chlorococcum* sp., b) *Desmodesmus* sp.2, c) *Scenedesmus* sp., d) *Chlorella* sp.

Figure 1. Cells of microalgae (magnification $40\times$) isolated from fresh water around Leskovac: a) *Chlorococcum* sp., b) *Desmodesmus* sp.2, c) *Scenedesmus* sp., d) *Chlorella* sp.

Hlorokokalne mikroalge su široko rasprostranjene, a naročito su brojne u planktonskim zajednicama slatkih voda, i to kao pasivni planktoneri [19]. Vrste rodova *Scenedesmus* i *Chlorella* se često razvijaju u jezerima, barama i sporotekućim vodama. Ove alge su jedan od uzročnika "cvetanja vode". Najrasprostranjenija vrsta iz roda *Chlorococcum* na našim prostorima je *Chlorococcum humicolum* [19].

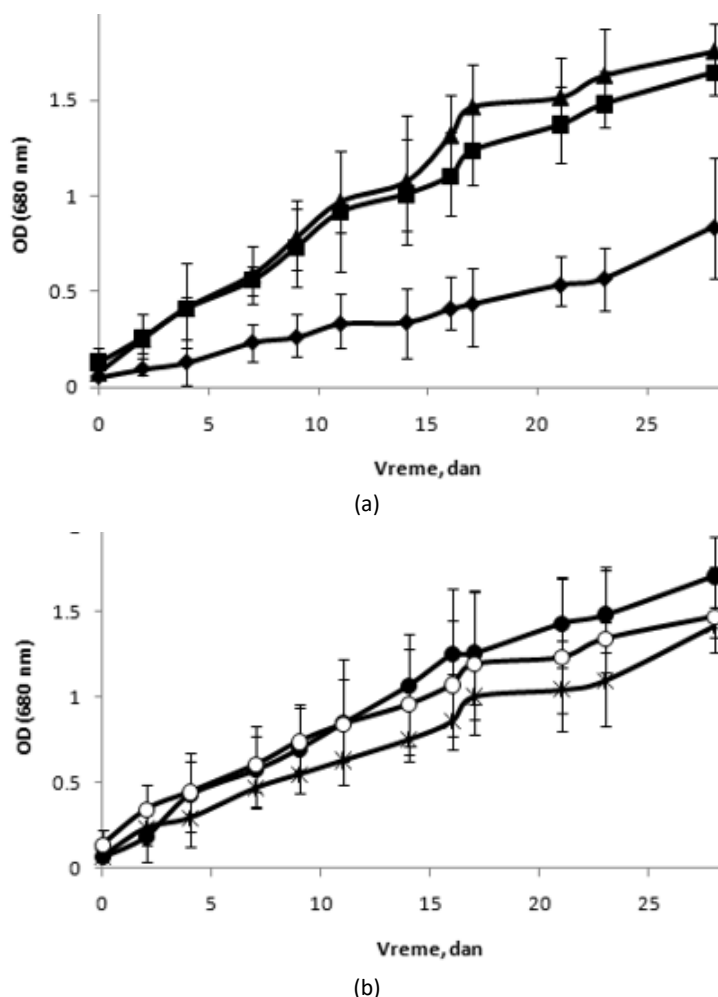
Kinetika rasta

Brzina rasta izolovanih mikroalgi pod istim uslovima gajenja se značajno razlikovala među testiranim sojevima (slika 2).

Maksimalne srednje vrednost optičke gustine (OD) za pripadnike roda *Chlorella*, *Chlorococcum* i *Scenedesmus* su iznosile: 1,8; 0,8 i 1,7, redom (slika 2a). Pri gajenju tri soja iz roda *Desmodesmus* dobijene su sledeće maksimalne srednje vrednosti OD: *Desmodesmus*

sp.1 – 1,7, *Desmodesmus* sp.2 – 1,4 i *Desmodesmus* sp.3 – 1,5 (Slika 2b). U početnoj fazi promena OD za pripadnike rodova *Chlorella* i *Scenedesmus* je slična i iznosi oko 0,8 tokom prvih 10 dana izvođenja eksperimenta, dok su vrednosti za rod *Chlorococcum* bile značajno manje. Promena OD za sva tri pripadnika *Desmodesmus* roda pokazuje sličan trend rasta, pri čemu su vrednosti OD nešto niže od vrednosti izmerenih tokom rasta *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp. Pri gajenju mikroalgi *C. vulgaris* i *S. obliquus* pod sličnim uslovima, maksimalna vrednost OD nakon 21 dan za *C. vulgaris* iznosila je 1,8 a za *S. obliquus* 1,2 i 1,1 [10].

Izračunavanje specifične brzine rasta pokazalo je da pripadnici rodova *Chlorella* i *Scenedesmus* imaju najveću specifičnu brzinu rasta, dok soj roda *Desmodesmus* sp.3 ima najmanju specifičnu brzinu rasta (tabela 1). Mikroalgalni sojevi *Desmodesmus* sp. 2 i *Chlorococcum* sp. imaju iste specifične brzine rasta.



Slika 2. Promena optičke gustine izolata mikroalgi tokom gajenja u BBM podlozi pri konstantnom osvetljenju (linije standardne greške od srednje vrednosti). a) *Chlorella* (▲), *Chlorococcum* (◆) i *Scenedesmus* (■); b) *Desmodesmus*: *Desmodesmus* sp. 1 (●), *Desmodesmus* sp. 2 (*), i *Desmodesmus* sp.3 (○).

Figure 2. Changes of optical density of microalgae during cultivating in BBM medium on constant light (error bars represent standard deviation). a) *Chlorella* (▲), *Chlorococcum* (◆), *Scenedesmus* (■); b) *Desmodesmus*: *Desmodesmus* sp. 1 (●), *Desmodesmus* sp. 2 (*), *Desmodesmus* sp.3 (○).

Pod odgovarajućim uslovima i uz dovoljno hranljivih materija, mikroalge rastu veoma brzo. Njihova biomasa se udvostručuje u roku od 3,5–24 h tokom eksponencijalne faze rasta [10]. Generacijsko vreme na temperaturi od 25 °C za mikroalgu *Chlorella pyrenoidosa* iznosi 465 min, za *Scenedesmus quadricauda* 354 min [20]. Na brzinu rasta mikroalgi utiče količina hranljivih materija, svetlost, pH, temperatura i početni inokulum [10], kao i sastav podloge u kome se gaji (*Chlorella* najbrže raste u BG-11 medijumu a najsporije u Chu-13 medijumu [21]). Velika prednost upotrebe mikroalgi iz rodova *Chlorella* i *Chlorococcum* ogleda se i u njihovoj mogućnosti da rastu na veoma nepovoljnim supstratima, kao što su otpadne vode iz procesa bušenja nafte [22].

Tabela 1. Specifična brzina rasta izolata mikroalgi
Table 1. Specific growth rate of isolated microalgae

| Mikroalga | Specifična brzina rasta, d ⁻¹ | R ² |
|-------------------------|--|----------------|
| <i>Chlorococcum</i> sp. | 0,086 | 0,901 |
| <i>Chlorella</i> sp. | 0,096 | 0,761 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 0,093 | 0,765 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.1 | 0,081 | 0,833 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.2 | 0,086 | 0,804 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.3 | 0,070 | 0,799 |

Određivanje suve biomase i produktivnosti ulja

U cilju selekcije odgovarajućih izolata za proizvodnju ulja, analizirano je šest izolovanih mikroalgi na sadržaj suve biomase, produktivnost i sadržaj ulja. Rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Srednje vrednosti sadržaja suve biomase, produktivnosti i sadržaja ulja u analiziranim mikroalgama
Table 2. Average values of dry weight, productivity and oil content in analyzed microalgae

| Mikroalga | Sadržaj suve biomase, g/l | Produktivnost ulja, g/l | Sadržaj ulja, % |
|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------|
| <i>Chlorococcum</i> sp. | 1,5 | 0,2 | 15,8 |
| <i>Chlorella</i> sp. | 1,2 | 0,4 | 33,0 |
| <i>Scenedesmus</i> sp. | 1,0 | 0,3 | 29,4 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.1 | 1,5 | 0,4 | 23,2 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.2 | 1,1 | 0,2 | 18,2 |
| <i>Desmodesmus</i> sp.3 | 0,6 | 0,2 | 25,3 |

Sadržaj suve biomase za pripadnike rodova *Chlorococcum*, *Chlorella* i *Scenedesmus* iznosi: 1,5; 1,2 i 1 g/l, redom (Tabela 2). Analiziran je i sadržaj suve biomase pri gajenju tri predstavnika roda *Desmodesmus*, pri čemu su dobijene vrednosti 1,5; 1,1 i 0,6 g/l. Najveći sadržaj suve biomase imaju predstavnici roda *Chlorococcum* i *Desmodesmus* sp.1, a najmanji rod *Desmodesmus* sp.3.

Najveća produktivnost ulja od 0,4 g/l zabeležena je kod sojeva *Chlorella* sp. i *Desmodesmus* sp.1, dok je naj-

manja produktivnost ulja (0,2 g/l) konstatovana kod sojeva *Desmodesmus* sp.2, *Desmodesmus* sp.3 i *Chlorococcum* sp. (tabela 2). Istraživanja pri sličnim uslovima gajenja, su pokazala da *C. vulgaris* ostvaruje produktivnost ulja od 0,4 g/l, *S. obliquus* 0,5 g/l [10], *Chlorococcum* sp. 0,1 g/l [23], dok najnižu produkciju od 0,2 g/l ostvaruje *Desmodesmus* sp. [24]. Ovi literaturni podaci za sojeve *Chlorella* sp., *Chlorococcum* sp. i *Desmodesmus* sp. su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u našim istraživanjima, dok su dobijene vrednosti za *Scenedesmus* niže za naš testiran soj. Naime, u toku gajenja mikroalgi *Chlorococcum* sp., *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp. u BBM medijumu tokom 9 dana, produktivnost ulja je iznosila 0,1; 0,1 i 0,2 g/l, redom [23].

Sadržaj ulja analiziranih mikroalgi se kretao od 15,8 do 33,0% (tabela 2). Sadržaj ulja kod predstavnika roda *Chlorella* bio je 33,0%, što je skoro dva puta više nego kod predstavnika roda *Chlorococcum*. U drugim istraživanjima je pokazano da mikroalge *Chlorococcum* sp., *C. vulgaris*, *S. obliquus* i *Desmodesmus* gajene pod istim uslovima imaju sledeći sadržaj ulja: 19,3 [3]; 26,0; 29,0 i 28,0 [10] i 19,7% [24], redom, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima za sojeve testirane u našim istraživanjima. U predhodnim studijama [23], praćena je stopa rasta kod rodova *Chlorococcum*, *Chlorella* i *Scenedesmus*, pri čemu su sve tri mikroalge pokazale skoro slične brzine rasta, dok je *Scenedesmus* sp. pokazao najveći sadržaj ulja (24%) u stacionarnoj fazi rasta posle 9 dana gajenja. Takođe, utvrđeno je da *Scenedesmus* sp. poseduje najadekvatniji masno-kiselinski sastav za proizvodnju biodizela [23].

ZAKLJUČAK

Iz različitih uzoraka stajaćih voda iz okoline Leskovca izolovano je ukupno 6 sojeva mikroalgi koje su identifikovane kao pripadnici rodova zelenih algi *Chlorococcum*, *Chlorella*, *Desmodesmus* i *Scenedesmus*. Analizirajući brzinu rasta, sadržaj biomase i sadržaj i produktivnost ulja kod izolovanih mikroalgi, utvrđeno je da su sojevi *Chlorella* sp. i *Scenedesmus* sp. najpogodniji za dalja proučavanja optimizacije rasta u cilju povećanja sinteze ulja i moguće primene u proizvodnji biodizela.

ZAHVALNICA

Ovaj rad je urađen u okviru projekta III 45001 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] S.A. Markov, Potential of using microalgae for biofuel production and CO₂ removal from atmosphere, ISJAE 2 (2009) 83–90.
- [2] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and

- extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14** (2010) 557–577.
- [3] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications. A review, *Renew. Sust. Energy Rev.* **14** (2010) 217–232.
- [4] A. Tabernero, E. Martín del Valle, M. Galán, Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture, *Biochem. Eng. J.* **63** (2012) 104–115.
- [5] W. Becker, in: *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, A. Richmond (Ed.), Blackwell Science, Oxford, 2004, pp. 317–319.
- [6] K.M. MacDougall, J. McNichol, P.J. McGinn, S.J.B. O’Leary, J.E. Melanson, Triacylglycerol profiling of microalgae strains for biofuel feedstock by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **40** (2011) 2609–2616.
- [7] N.M. Verma, S. Mehrotra, A. Shukla, B.N. Mishra, Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion, *Afr. J. Biotechnol.* **9** (2009) 1402–1411.
- [8] M.R. Tredici, in: *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, A. Richmond (Ed.), Blackwell Science, Oxford, 2004, pp. 178–184.
- [9] H.M. Amaro, A.C. Guedes, F.X. Malcata, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *J. Appl. Energy* **88** (2011) 3402–3410.
- [10] R.A.I. Abou-Shanab, I.A. Matter, S.N. Kim, J. Oh, J. Choi, B.H. Jeon, Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a fresh-water lake, *Biomass. Bioenergy* **35** (2011) 3079–3085.
- [11] B.H. Um, Y.S. Kim, Review: A chance for Korea to advance algal-biodiesel technology, *J. Ind. Eng. Chem.* **15** (2009) 1–7.
- [12] Y.Y. Pan, S.T. Wang, L.T. Chuang, Y.W. Chang, C.N.N. Chen, Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*, *Biores. Technol.* **102** (2011) 10510–10517.
- [13] Y. Cheng, W. Zhou, C. Gao, K. Lan, Y. Gao, Q. Wu, Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 777–781.
- [14] W. Xiong, X. Li, J. Xiang, Q. Wu, High-density fermentation of microalgae *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78** (2008) 29–36.
- [15] E. Nwokoagbara, A.K. Olaleye, M. Wang, Biodiesel from microalgae: The use of multi-criteria decision analysis for strain selection, *Fuel* **159** (2015) 241–249.
- [16] L.A. Whitford, G.J. Shumacher, *A manual of fresh-water algae*, Spark Press, Raleigh, NC, 1973.
- [17] J. Komarek, B. Fott, *Das Phytoplankton des Süß wassers –Systemath und Biologie*, Band XVI, 7 teil, 1 hälfte, Stuttgart, 1983.
- [18] S. Kim, J.E. Park, Y.B. Cho, S.J. Hwang, Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions, *Biores. Technol.* **144** (2013) 8–13.
- [19] J. Blaženčić, *Sistematika algi*, NNK Internacional, Beograd, 2000.
- [20] M. Jarak, M. Govedarica, *Opšta mikrobiologija*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, 1995.
- [21] M.M. Phukan, R.S. Chutia, B.K. Konwar, R. Katak, Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, *Appl. Energy* **88** (2011) 3307–3312.
- [22] V. Sivasubramanian, M. Muthukumaran, Large scale phycoremediation of oil drilling effluent, *J. Algal. Biomass.* **3** (2012) 5–17.
- [23] J. Jena, M. Nayak, H.S. Pamda, N. Pradhan, C.H. Sarika, P.K. Panda, B.V.S.K. Rao, R.B.N. Prasad, L.N. Sukla, Microalgae of Odisha Coast as a potential source for biodiesel production, *World Environ.* **2** (2012) 11–16.
- [24] L.F. Wu, P.C. Chen, A.P. Huang, C.M. Lee, The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater, *Biores. Technol.* **113** (2012) 14–18.

SUMMARY

THE ISOLATION AND SCREENING OF MICROALGAE FOR THE PRODUCTION OF OIL

Bojana R. Danilović¹, Jelena M. Cvetković-Rakić¹, Jovan Ćirić¹, Jelica B. Simeunović², Vlada B. Veljković¹, Dragiša S. Savić¹

¹University of Nis, Faculty of Technology in Leskovac, Serbia

²University of Novi Sad, Faculty of Science, Serbia

(Scientific paper)

The biodiesel production has gained increasing attention of the researches in recent years. Current commercial biodiesel production involves transesterification of oil derived from oil crops. Since this production is no more sustainable, the use of microalgae represents a good alternative. Microalgae have high growth rate, high oil content and can be cultured in the environment which are not suitable for agriculture. Additionally, microalgae cultivation improves the reduction of carbon dioxide in the atmosphere. Selection of microalgae for oil production must take into consider certain criteria which include growth rate, oil content, fatty acids profile and ease of separation. In order to analyze the possibility of the use of microalgae for the production of oil, isolation of freshwater microalgae was performed. The isolation was done by the use of traditional techniques from freshwaters near Leskovac. A total number of 6 microalgae strains were isolated and identified as the representatives of the genera *Chlorococcum* (1 isolate), *Chlorella* (1 isolate), *Scenedesmus* (1 isolate) and *Desmodesmus* (3 isolates). Isolates of microalgae were screened for the growth rate, biomass and oil productivity and oil content. The highest content of biomass was 1.5 g/l and it was observed in the strains *Chlorococcum* sp. and *Desmodesmus* sp. 1. The highest value of specific growth rate was calculated during the growth of microalgae *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. and *Desmodesmus* sp.1, while the lowest value was observed for *Chlorococcum* sp. Oil productivity was the highest for *Chlorella* sp. and *Desmodesmus* sp.1 (0.4 g/l) and the lowest for *Desmodesmus* sp.2, *Desmodesmus* sp.3 and *Chlorococcum* sp. (0.2 g/l). The oil content was in the range from 15.8% (*Chlorococcum* sp.) to 33% (*Chlorella* sp). Since the microalgae isolates *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. had the highest oil productivity, high growth rate and high oil content, these strains are the most suitable for further investigation in order to improve the oil yield and analyse the possibility of the use in the production of biodiesel.

Keywords: Microalgae • Biomass • Growth rate • Oil productivity