

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa

mgr inż. Patryk Ratomski

ROZPRAWA DOKTORSKA

stanowiąca zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych

**Technologia produkcji biopaliwa zaawansowanego z mikroglonów
z oceną jego wybranych właściwości użytkowych**

Technology for the production of advanced biofuel from microalgae
with an evaluation of its selected functional properties

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Inżynierii Odnawialnych Źródeł Energii

Promotor:
dr hab. Małgorzata Hawrot-Paw, prof. ZUT

Szczecin 2025

Serdecznie dziękuję Pani Promotor
dr hab. Małgorzacie Hawrot – Paw, prof. ZUT
za opiekę naukową, merytoryczne wskazówki
oraz motywację na każdym etapie mojej pracy.
Zaangażowanie i życzliwość Pani Promotor były
dla mnie źródłem siły i naukowej pasji.

STRESZCZENIE

Paliwa konwencjonalne są głównym źródłem energii zużywanej w transporcie, jednak ich spalanie w silnikach powoduje emisję szkodliwych związków do atmosfery. Ze względu na konieczność ochrony środowiska, malejące zasoby ropy naftowej oraz niestabilność jej cen na rynkach światowych, coraz więcej uwagi poświęca się paliwom alternatywnym. W tym kontekście, dobrym substytutem dla stosowanego w silnikach wysokoprężnych oleju napędowego jest biodiesel. Obecnie do jego produkcji wykorzystywane są surowce, które są też składnikami żywnościowymi lub paszowymi. Może to prowadzić do wzrostu cen żywności oraz nieuzasadnionej i niekorzystnej dla środowiska zmiany przeznaczenia gruntów rolnych. Rozwiązaniem problemu konkurencji paliwo-żywność może być produkcja biodiesla, m. in. z olejów lub tłuszczów odpadowych, odpadów leśnych czy roślin, które nie są przeznaczone na żywność, są niejadalne. Coraz częściej zwraca się jednak uwagę, że wykorzystywanie takich surowców może ograniczyć ich dostępność dla innych sektorów gospodarki. Na tym tle, obiecującym kierunkiem jest wykorzystanie potencjału biomasy mikroglonów. Uprawa mikroglonów nie konkuruje z uprawami przeznaczonymi na cele spożywcze, a przy zapewnieniu odpowiednich warunków ich wzrost, a także zawartość lipidów w biomasie jako prekursorów do wytwarzania biodiesla, mogą być znacznie wyższe w porównaniu z roślinami lądowymi.

Celem pracy było przedstawienie technologii wytwarzania biodiesla z oleju pozyskanego z mikroglonów, z uwzględnieniem warunków produkcji biomasy i jej przetwarzania. Określono optymalne parametry środowiska dla wzrostu i rozwoju mikroglonów oraz poziom akumulacji lipidów w biomasie. Oznaczono zawartość popiołu, węgla oraz stopień wiązania ditlenku węgla w biomasie alg, co ma wpływ na ślad węglowy produkowanego biopaliwa. Produkcję biomasy na cele paliwowe prowadzono w powiększonej skali, odpowiadającej warunkom przemysłowym. Na bazie biopaliwa z oleju mikroalg przygotowano mieszankę paliwową z konwencjonalnym olejem napędowym, zawierającą odpowiednio 7-procentowy dodatek biodiesla z mikroalg (B7/AME) oraz porównawczo, 7-procentowy dodatek estrów metylowych kwasów tłuszczowych wytworzonych z oleju rzepakowego (B7/RME). Analizę właściwości użytkowych oraz ekologicznych przygotowanych mieszanek paliwowych wykonano przy użyciu stanowiska dynamometrycznego. Badania dotyczące parametrów użytkowych wykonano na stanowisku testowym wyposażonym w czterosuwowy silnik wysokoprężny, natomiast ocenę ekologiczną wykonano przy użyciu analizatora spalin.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dla szczepu *Chlorella vulgaris*, wykorzystywanego jako podstawowy materiał badawczy, najkorzystniejsze warunki dla wzrostu i rozwoju to obojętny odczyn podłoża hodowlanego i oświetlanie hodowli przez 18/6 h w cyklu światło/ciemność. Indukowany stres pokarmowy sprzyjał akumulacji lipidów w biomasie. Wprowadzenie do podłoża wodorowęglanu sodu wpłynęło korzystnie na wzrost biomasy oraz zawartość lipidów, a otrzymane wyniki świadczą o potencjale *C. vulgaris* w zakresie sekwestracji ditlenku węgla. Zwiększona skala hodowli mikroglonów, w odniesieniu do hodowli w skali laboratoryjnej, prowadziła do obniżenia produktywności biomasy oraz poziomu akumulacji lipidów. Najkorzystniejszą metodą odwodnienia i separacji biomasy była metoda wirowania. Najwyższą skuteczność ekstrakcji lipidów z biomasy uzyskano wykorzystując metodę wg Bligha i Dyera. Stres pokarmowy wpływał korzystnie na zawartość lipidów oraz profil kwasów tłuszczowych. Analiza parametrów energetycznych badanych mieszanek paliwowych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy paliwem B7/AME, a B7/RME. W przypadku parametrów ekologicznych, dla paliwa z dodatkiem biodiesla z mikroalg, odnotowano wzrost emisji tlenu węgla, tlenków azotu oraz węglowodorów, natomiast emisja ditlenku węgla była niższa.

Słowa kluczowe:

biopaliwa zaawansowane, mikroalgi, biomasa, biodiesel

ABSTRACT

The main source of energy used in transport are conventional fuels, but their combustion in engines causes the emission of harmful compounds into the atmosphere. Due to the need to protect the environment, decreasing oil resources and the instability of its prices on world markets, more and more attention is being paid to alternative fuels. In this context, biodiesel is a good substitute for diesel oil used in compression-ignition engines. Nowadays, raw materials that are also food or feed ingredients are used in its production. This can lead to an increase in food prices and an unjustified and environmentally unfavorable change in the agricultural land use. The fuel-food competition problem may be solved by the production of biodiesel, among others, from waste oils or fats, forest waste or plants that are not intended for food, as they are inedible. However, the attention is more and more focused on the fact that the use of such raw materials may limit their availability for other sectors of the economy. Against this background, the use of the potential of microalgal biomass is a promising direction. Microalgae cultivation does not compete with food crops, and when appropriate conditions are provided, their growth and lipid content in biomass, as precursors for biodiesel production, can be much higher in comparison to terrestrial plants.

The purpose of this thesis was to present the technology of producing biodiesel from oil obtained from microalgae, taking into account the conditions of biomass production and its processing. The optimal environmental parameters for the growth and development of microalgae and the level of lipid accumulation in biomass were determined. The content of ash, carbon and the degree of carbon dioxide fixing in algal biomass were determined, which affects the carbon footprint of the produced biofuel. The production of biomass for fuel purposes was carried out on an enlarged scale, corresponding to industrial conditions. Based on biofuel from microalgae oil, a fuel mixture was prepared with conventional diesel oil, containing a 7% addition of biodiesel from microalgae (B7/AME) and, comparatively, a 7% addition of methyl esters of fatty acids produced from rapeseed oil (B7/RME). The analysis of the functional and ecological properties of the prepared fuel mixtures was performed using a dynamometric stand. The tests concerning the functional parameters of the engine were performed on a test stand equipped with a four-stroke diesel engine, whereas the ecological assessment was performed using an exhaust gas analyzer.

Basing on the obtained results, it was found that the most favorable conditions for growth and development for the *Chlorella vulgaris* strain, used as the basic research material, were a neutral pH of the culture medium and lighting of the culture for 18/6 h in the light/dark cycle. The induced nutritional stress favoured the accumulation of lipids in the biomass. The introduction of sodium bicarbonate to the substrate had a positive effect on the growth of biomass and lipid content, and the obtained results indicate the potential of *C. vulgaris* in the process of carbon dioxide sequestration. The increased scale of microalgae cultivation, in relation to laboratory-scale cultivation, led to a decrease in biomass productivity and the level of lipid accumulation. The most advantageous method of dehydration and separation of biomass was the centrifugation method. The highest efficiency of lipid extraction from biomass was obtained using the Bligh and Dyer method. Nutritional stress had a positive effect on lipid content and fatty acid profile. The analysis of energy parameters of the tested fuel blends did not show any significant differences between the B7/AME and B7/RME fuels. In the case of ecological parameters, for the fuel with the addition of biodiesel from microalgae, an increase in carbon monoxide, nitrogen oxides and hydrocarbon emissions were observed, while carbon dioxide emission was lower.

Keywords:

advanced biofuels, microalgae, biomass, biodiesel

DOROBEK NAUKOWY STANOWIĄCY ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Technologia produkcji biopaliwa zaawansowanego z mikroglonów z oceną jego wybranych właściwości użytkowych

L.p.	Tytuły publikacji	Pkt*	IF**
P1	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of <i>Chlorella vulgaris</i> Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions. Appl. Sci. 2021, 11, 3106.	100	2,5
P2	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Influence of Nutrient-Stress Conditions on <i>Chlorella vulgaris</i> Biomass Production and Lipid Content. Catalysts 2021, 11, 573.	100	3,8
P3	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A. Utilisation of CO ₂ from Sodium Bicarbonate to Produce <i>Chlorella vulgaris</i> Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes. Sustainability 2021, 13, 9118.	100	3,3
P4	Hawrot-Paw, M.; Ratomski, P. Efficient Production of Microalgal Biomass – Step by Step to Industrial Scale. Energies 2024, 17, 944.	140	3,0
P5	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Ocena efektywności metod odwadniania biomasy mikroglonów. W: Doskonalenie technologii produkcji rolnej, w tym energii odnawialnej, z uwzględnieniem wymagań zrównoważonego rozwoju. Wydawnictwo ITP, Tom XXVII, Warszawa – Falenty, 2021.	20	-
P6	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Porównanie efektywności metod ekstrakcji lipidów z biomasy mikroglonów <i>Chlorella vulgaris</i> . W: Innowacyjne Technologie Pozyskania Energii Odnawialnej. Wydawnictwo ITP, Tom XXVI, Warszawa – Falenty, 2020.	20	-
P7	Hawrot-Paw, M.; Ratomski, P.; Koniuszy, A.; Gólimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. Energies 2021, 14, 7334.	140	3,0
P8	Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gólimowski, W.; Kwaśnica, A.; Marcinkowski, D. Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend Produced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport. Energies 2023, 16, 5376.	140	3,0
Suma		760	18,6

* Liczba punktów według listy MNiSW, zgodna z rokiem ukazania się pracy.

** Sumaryczny Impact Factor (IF) według bazy Journal Citation Reports (JCR) z roku wydania pracy.

WYKAZ SKRÓTÓW

AME	estry metylowe kwasów tłuszczowych oleju z mikroglonów (z ang. <i>Algae Methyl Esters</i>)
ATP	adenozynotrifosforan adenozy-5'-trifosforan (z ang. <i>Adenosine Triphosphate</i>)
AWW	ścieki z akwakultury (z ang. <i>Aquaculture Wastewater</i>)
FA	kwasy tłuszczowe (z ang. <i>Fatty Acids</i>)
LED	dioda elektroluminescencyjna (z ang. <i>Light Emitting Diode</i>)
MUFA	jednonienasycone kwasy tłuszczowe (z ang. <i>Monounsaturated Fatty Acids</i>)
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (z ang. <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (z ang. <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)
RME	estry metylowe kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (z ang. <i>Rapeseed Methyl Esters</i>)
rpm	obroty na minutę (z ang. <i>revolutions per minute</i>)
SFA	kwasy tłuszczowe nasycone (z ang. <i>Saturated Fatty Acids</i>)

Spis treści

STRESZCZENIE	3
ABSTRACT	5
1. WSTĘP	11
2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE.....	15
3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ	16
3.1. Szczepy mikroglonów wykorzystane w badaniach	16
3.2. Metodyka badań	17
3.2.1. Pomiar zawartości biomasy	17
3.2.1.1. Pomiar grawimetryczny.....	17
3.2.1.2. Pomiar spektrofotometryczny – gęstość optyczna.....	17
3.2.1.3. Pomiar spektrofotometryczny – zawartość chlorofilu	17
3.2.1.4. Pomiar liczby komórek.....	18
3.2.2. Metody ekstrakcji lipidów	18
3.2.2.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta	18
3.2.2.2. Ekstrakcja wg metody Bligha i Dyera	18
3.2.2.3. Ekstrakcja wg metody Folcha.....	19
3.2.3. Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych.....	19
3.2.4. Pomiar zawartości węgla i analiza szybkości wiązania ditlenku węgla	20
3.2.5. Pomiar zawartości azotu w podłożu hodowlanym	20
3.2.7. Produkcja biodiesla	21
3.2.8. Parametry pracy silnika zasilanego paliwem z dodatkiem biodiesla z mikroglonów	22
3.3. Analiza statystyczna wyników	22
4. BADANIA LABORATORYJNE PRZEPROWADZONE W RAMACH PRACY DOKTORSKIEJ	23
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ.....	28
5.1. Optymalne warunki produkcji biomasy mikroglonów	28
5.2. Wpływ stresu pokarmowego na przyrost biomasy i poziom akumulacji lipidów	32
5.3. Wpływ suplementacji podłoża hodowlanego wodorowęglanem sodu na plon biomasy oraz zmiany jej składu biochemicznego	35
5.4. Hodowla mikroglonów w skali przemysłowej	37
5.5. Efektywność metod odwadniania biomasy	40
5.6. Ekstrakcja lipidów z biomasy mikroglonów	41
5.7. Analiza profilu kwasów tłuszczowych	42

5.8. Ocena wybranych wskaźników pracy silnika zasilanego paliwem z dodatkiem biodiesla wyprodukowanego z oleju mikrogłonów	47
6. WNIOSKI	53
7. BIBLIOGRAFIA	55
KOPIE ARTUKUŁÓW STANOWIĄCYCH JEDNOTEMATYCZNY CYKL PUBLIKACJI	69
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	164

1. WSTĘP

Powszechny dostęp do ropy naftowej zapoczątkował intensywny rozwój przemysłu motoryzacyjnego. W wyniku spalania pochodnych ropy naftowej, która do dzisiaj pozostaje podstawowym surowcem wykorzystywanym do produkcji paliw (Mandley i in. 2020), do atmosfery trafia m. in. ditlenek węgla, tlenek węgla, cząstki stałe (Bessagnet i in. 2022) oraz węglowodory (Bhatia i in. 2021). Zrównoważoną alternatywą dla tych paliw mogą być produkowane z odnawialnych surowców biopaliwa, w tym bioetanol, i stosowany w silnikach wysokoprężnych biodiesel (Aransiola i in. 2012). Biodiesel pod względem chemicznym stanowi estry metylowe (FAME) lub etylowe (FAEE) wyższych kwasów tłuszczowych, otrzymywane przede wszystkim w procesie transestryfikacji olejów roślinnych lub tłuszczów zwierzęcych z alkoholem, w obecności odpowiedniego katalizatora zasadowego, kwasowego lub enzymatycznego (Miyuranga i in. 2021). W porównaniu do konwencjonalnego oleju napędowego biodiesel charakteryzuje się niższą emisją niektórych składników spalin (Maawa i in. 2020), ma wyższą temperaturę zapłonu (Álvarez i in. 2019), a także wykazuje lepsze właściwości smarne (Li i in. 2019). Z uwagi na stosunkowo wysoką zawartość tlenu w cząsteczce paliwa, jego spalanie skutkuje wyższą emisją tlenków azotu (Palani i in. 2022). Biodiesel może być stosowany jako czyste paliwo (B100), jednak najczęściej stanowi domieszkę do oleju napędowego.

W zależności od rodzaju surowca oraz technologii produkcji wyróżnia się cztery generacje biopaliw. Biopaliwa pierwszej generacji (1G) są wytwarzane z surowców wykorzystywanych w przemyśle spożywczym, a więc mogą stanowić konkurencję dla produkcji żywności (Deora i in. 2022). Uprawa roślin na cele paliwowe wymaga znacznych ilości wody oraz nawozów i środków ochrony roślin (Jeswani i in. 2020). Surowce do produkcji biopaliw drugiej generacji (2G) to przede wszystkim odpadowa biomasa lignocelulozowa (Mat Aron i in. 2020), odpadowe oleje i tłuszcze (Corsini i in. 2015), pozostałości z sektora leśnego i powiązanych z nim gałęzi przemysłu (Mariana i in. 2015). Trzecią generację biopaliw (3G) stanowią paliwa otrzymywane z biomasy alg (Karlsson i in. 2017, Levasseur i in. 2020). Biopaliwa czwartej generacji (4G) mają charakter raczej koncepcyjny i obejmują paliwa, które w celu optymalizacji i zwiększenia wydajności produkcji (Abdullah i in. 2019), mają być produkowane z użyciem inżynierii genetycznej (Arpia i in. 2021). Surowcami wykorzystywanymi do produkcji biopaliwa 4G mogą być mikroglony, makroglony oraz cyjanobakterie (Neupane 2023).

Biopaliwa 2G oraz 3G należą do tzw. biopaliw zaawansowanych, których produkcja sprzyja redukcji emisji gazów cieplarnianych (Dey i in. 2021). W tym zakresie szczególną rolę mogą odegrać biopaliwa produkowane z biomasy mikroglonów (Fot. 1). Produkcja takiej biomasy nie konkuruje z produkcją roślinną przeznaczoną na cele spożywcze (Syahirah i in. 2020) i może być prowadzona przy wykorzystaniu wody słodkiej, słonej jak również bogatych w azot wód pochodowlanych (Tu i in. 2015, Hawrot-Paw i in. 2020). Mikroglony, w porównaniu do roślin lądowych, charakteryzują się znacznie szybszym tempem wzrostu (Chen i in. 2018). W ich komórkach gromadzą się cenne składniki, które można wykorzystać do produkcji biopaliw. Takim składnikiem jest m. in. olej, a jego zawartość w biomacie mikroglonów może kilkukrotnie przewyższać poziom dostępny w tradycyjnych roślinach oleistych (Sharma i in. 2018). Zawartość oleju w komórkach zależy od szczepu mikroglonów i może być modyfikowana zmiennymi parametrami hodowli, w tym czasem oświetlania hodowli (fotoperiod), natężeniem światła, temperaturą hodowli, dostępnością składników pokarmowych oraz zawartością ditlenku węgla w podłożu (Sun i in. 2018, Alishah i in. 2019).



Fot. 1. Biomasa mikroglonów

Biomasę mikroglonów pozyskuje się z hodowli prowadzonych w systemach otwartych (stawy hodowlane) lub też systemach zamkniętych, czyli w fotobioreaktorach (Fot. 2), które pozwalają na pełną kontrolę i sterowanie procesem produkcji (Patyna i Witczak 2016, Al.-Dailami i in. 2022). Istotne znaczenie dla przemysłowej produkcji biomasy mikroglonów mają procesy odwodnienia biomasy mikroglonów i stanowią one jedno z głównych wyzwań technologicznych (Udom i in. 2013, Tiwari i in. 2019).

Związane jest to z mikroskopijnymi rozmiarami komórek mikroglonów, niskim ciężarem właściwym oraz dużym rozcieńczeniem w hodowli (Lal i in. 2018). Do separacji i odwadniania biomasy można stosować metodę wirowania, filtracji, sedymentacji, flotacji lub flokulacji (Chu i in. 2021). Nie ma jednej uniwersalnej technologii zbioru dla wszystkich szczepów, a jest to etap produkcji, który ma wpływ na ekonomię całego procesu pozyskiwania biomasy (Behera i Ray 2016, Tiron i in. 2017).



Fot. 2. Fotobioreaktor poziomy w laboratorium OZE Katedry Inżynierii Odnawialnych Źródeł Energii ZUT w Szczecinie

Potencjał energetyczny mikroglonów jest bardzo szeroki. Biomase tych organizmów, lub zawarte w niej składniki, można wykorzystać m. in. do produkcji biogazu, bioetanolu, biowodoru, bio-oleju, a także biodiesla (Behera i in. 2014). Technologia pozyskiwania oleju z biomasy mikroglonów, niezbędnego do wytwarzania biodiesla, powinna charakteryzować się wysoką skutecznością oraz niskim kosztem (Jungmin i in. 2013). Do klasycznych metod zalicza się proces tłoczenia (Yang i in. 2021), ale olej pozyskuje się również w procesie ekstrakcji, który może być wspomagany promieniowaniem mikrofalowym czy ultradźwiękami (Medina-Medrano i in. 2019, Patrice Didion i in. 2023). Klasyczna chemiczna metoda ekstrakcji wykorzystuje aparat Soxhleta i rozpuszczalniki organiczne, m. in. n-Heksan (Yang i in. 2021). Ekstrakcja lipidów z komórek mikroglonów jest procesem energochłonnym i kosztownym, również z uwagi na użycie dodatkowej energii do odzyskania wykorzystanych rozpuszczalników (Sun i in.

2019). Istotne jest, aby zastosowana metoda ekstrakcji nie uszkadzała lipidów (Iqbal i Theegala 2013).

Lipidy pozyskane z biomasy mikroglonów przekształca się w estry metylowe kwasów tłuszczowych w procesie transestryfikacji (Zhu i in. 2016). Profil kwasów tłuszczowych oleju zależy od warunków hodowli (Morales i in. 2021, Teh i in. 2021), natomiast podczas transestryfikacji nie ulega on zmianie (Jogarao i in. 2019). Paliwo wyprodukowane na bazie oleju z biomasy mikroglonów nie wykazuje istotnych różnic w odniesieniu do konwencjonalnego oleju napędowego, zarówno w parametrach energetycznych, jak i środowiskowych (Imtenan i in. 2015, Severo i in. 2019).

Biopaliwa produkowane na bazie biomasy mikroglonów wpisują się w cel redukcji emisji spalin, a także pozwalają na spełnienie limitów dotyczących ogólnego udziału biokomponentów przy produkcji biopaliw jakie zostały zawarte m. in. w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej nr 2018/2001 z dnia 11 grudnia 2018 roku (tzw. Dyrektywa RED II) i nr 2023/2413 z dnia 31 października 2023 roku (tzw. Dyrektywa RED III) oraz w przepisach krajowych, w Ustawie z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych z późniejszymi zmianami. W krajach Unii Europejskiej biomasę mikroglonów produkuje się głównie jako składnik odżywczy, suplement diety, składnik bionawozów czy pasz. Technologie związane z wykorzystaniem biomasy mikroalg na cele paliwowe wymagają inwestycji w rozwój i nadal są w fazie badań, stąd pojawiła się przesłanka do przygotowania kompleksowej analizy produkcji dla biopaliwa pochodzącego z oleju pozyskanego z komórek mikroglonów. W badaniach uwzględniono procesy związane z produkcją biomasy, metody jej separacji i odwadniania oraz przetwarzania, a także ocenę parametrów energetycznych i ekologicznych otrzymanego paliwa na podstawie testów przeprowadzonym na stanowisku silnikowym.

2. CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Celem rozprawy było przedstawienie technologii produkcji paliwa z biomasy mikrogłonów, z uwzględnieniem jego wybranych właściwości użytkowych. Cel główny zrealizowano poprzez realizację celów szczegółowych:

- 1) określenie optymalnych warunków produkcji biomasy mikrogłonów przeznaczonej na cele paliwowe obejmujące procesy wzrostu mikrogłonów oraz akumulacji lipidów w ich komórkach, z analizą wpływu powiększenia skali fotobioreaktorów na efektywną produkcję biomasy;
- 2) ocena skuteczności metod zbioru i odwodnienia biomasy oraz ekstrakcji lipidów;
- 3) ocena wpływu zasilania silnika wysokoprężnego mieszanką paliwa konwencjonalnego i biopaliwa z mikrogłonów na jego wybrane parametry pracy oraz efektywność energetyczną i ekologiczną silnika.

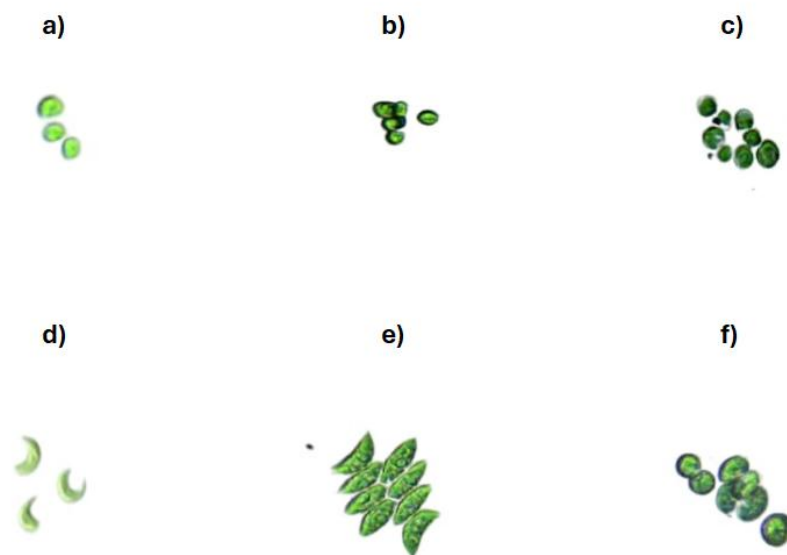
W niniejszej pracy sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Odpowiednio dobrane warunki środowiska, w tym skład podłoża hodowlanego, wpłyną pozytywnie na wzrost i rozwój mikrogłonów wyrażony ilością i produktywnością biomasy oraz na skład biochemiczny ich komórek.
2. Biodiesel wyprodukowany na bazie oleju z mikrogłonów będzie wykazywał właściwości porównywalne lub korzystniejsze niż biodiesel konwencjonalny, co wpłynie pozytywnie na parametry energetyczne silnika wysokoprężnego zasilanego mieszanką oleju napędowego i biopaliwa oraz obniży emisję toksycznych związków w spalinach.

3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

3.1. Szczepy mikroglonów wykorzystane w badaniach

Badania przeprowadzono w laboratorium Katedry Inżynierii Odnawialnych Źródeł Energii (KIOŹE) Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie w latach 2017-23. Podstawowym materiałem badawczym był gatunek jednokomórkowych zielenic *Chlorella vulgaris*. W wybranych badaniach, w celach porównawczych, wykorzystano również szczepy innych mikroglonów: *Chlorella fusca*, *Oocystis submarina*, *Monoraphidium*, *Scenedesmus* oraz *Chlorella minutissima*. Mikroalgi pochodziły z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (CCBA – Culture Collection of Baltic Algae) oraz ze zbiorów własnych KIOŹE. Materiał do badań przechowywano w płynnym podłożu hodowlanym F/2 wg Guillard i Ryther (1962), w temperaturze 4°C, przy oświetleniu za pomocą diod elektroluminescencyjnych (LED) przez 12/12 h w cyklu światło/ciemność. Szczepy mikroglonów wykorzystane w badaniach przedstawiono na Fot. 3.



Fot. 3. Komórki mikroglonów w obrazie mikroskopu optycznego: a) *C. vulgaris*, b) *C. fusca*, c) *O. submarina*, d) *Monoraphidium*, e) *Scenedesmus*, f) *C. minutissima*

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Pomiar zawartości biomasy

3.2.1.1. Pomiar grawimetryczny

Z zawiesiny mikroglonów w fotobioreaktorach do probówek typu Falcon pobierano próbki o objętości 50 ml. Zawartość probówek wirowano przez 15 minut przy prędkości 4000 rpm. Po odwirowaniu i oddzieleniu supernatantu, biomasę mikroglonów przenoszono na zważone uprzednio szalki aluminiowe i suszono w wagosuszarce (AXIS ATS) w temperaturze 105 °C do stałej masy. Wszystkie pomiary przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Suchą masę mikroglonów wyznaczono z podanego niżej wzoru (1) i w pracy podano w $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$:

$$B = (B_f - B_0) \quad (1)$$

gdzie:

B = zawartość biomasy ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

B_f = masa szalki + biomasa (mg);

B_0 = masa szalki pustej (mg)

3.2.1.2. Pomiar spektrofotometryczny – gęstość optyczna

Gęstość optyczną zawiesiny mikroglonów oceniono przy wykorzystaniu spektrofotometru (EMCO). Do analiz z fotobioreaktorów pobierano próbki zawiesiny mikroglonów o objętości 2,5 ml. Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda=680$. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach.

3.2.1.3. Pomiar spektrofotometryczny – zawartość chlorofilu

Zawartość chlorofilu w komórkach mikroglonów oznaczono zgodnie z normą PN-86 C-05560/02. Próbki zawiesiny mikroglonów pobranych z fotobioreaktorów przesączono przez filtr z włókna szklanego wykorzystując przy tym metodę filtracji próżniowej. Sączone z biomasą umieszczono w probówkach typu Falcon, uprzednio napełnionych 90-procentowym wodnym roztworem acetonu, i mechanicznie rozdrobniono. Tak przygotowane próbki inkubowano w ciemności w temperaturze 4 °C przez 24 godziny. Po inkubacji próbki odwirowano przez 10 minut przy prędkości 4000 rpm. Do oznaczania

zawartości chlorofilu wykorzystano supernatant oddzielony od osadu. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda=665$ nm. Pomiary wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przeliczono i podano w pracy w $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$.

3.2.1.4. Pomiar liczby komórek

Liczbę komórek mikroglonów wyznaczono za pomocą hemacytometru Thoma pod mikroskopem optycznym przy powiększeniu $40\times$. W komorze Thoma umieszczano próbkę o objętości $1\mu\text{l}$. Wyniki po przeliczeniu przedstawiono w pracy jako liczbę komórek w 1 ml hodowli.

3.2.2. Metody ekstrakcji lipidów

3.2.2.1. Ekstrakcja w aparacie Soxhleta

Ekstrakcję lipidów z biomasy mikroglonów przeprowadzono w aparacie Soxhleta. Jako rozpuszczalnika użyto n-Heksanu. Do gilzy ekstrakcyjnej wprowadzono wysuszoną i rozdrobnioną za pomocą porcelanowego moździerza biomasę mikroglonów. Proces ekstrakcji prowadzono przez 4 godziny z szybkością 20 cykli/h. Po przeprowadzeniu ekstrakcji rozpuszczalnik oddestylowano, natomiast pozostałość zważono z dokładnością do $0,001$ g. W badaniach dotyczących efektywności metod pozyskiwania lipidów (P6) ekstrakcję wspomagano ultradźwiękami o częstotliwości 50 kHz przez 30 minut lub promieniowaniem mikrofalowym o mocy 1000 W przez 5 minut. Zawartość lipidów w biomasie określono na podstawie podanego niżej wzoru:

$$LC = \left(\frac{mL}{m_{DAB}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

gdzie:

LC = zawartość lipidów (%);

mL = masa lipidów (g);

m_{DAB} = sucha biomasa mikroglonów (g).

3.2.2.2. Ekstrakcja wg metody Bligha i Dyer

Do ekstrakcji wykorzystano mieszaninę chloroformu z metanolem w stosunku 3:1 (v/v), którą dodano do wysuszonej i roztartej w moździerzu biomasy, umieszczonej

w probówce typu Falcon o pojemności 50 ml. Zawiesinę poddano działaniu fal ultradźwiękowych o częstotliwości 50 kHz przez 30 minut. Następnie do próbki dodano 1-procentowy roztwór NaCl, sprzyjający separacji faz. Po oddzieleniu górnej fazy wodnej, fazę dolną zawierającą wyekstrahowane lipidy przefiltrowano przy wykorzystaniu pompy próżniowej, przepłukując roztworem rozpuszczalnika. Masę lipidów, po wcześniejszym oddestylowaniu rozpuszczalnika za pomocą wyparki rotacyjnej, określono metodą grawimetryczną. Zawartość lipidów w biomasie mikroglonów określono na podstawie podanego wyżej wzoru (2):

3.2.2.3. Ekstrakcja wg metody Folcha

W analizie profilu kwasów tłuszczowych (P7) do ekstrakcji oleju wykorzystano jako rozpuszczalnik mieszaninę chloroformu z metanolem w stosunku 2:1 (v/v). Rozdrobnioną w moździerzu wysuszoną biomasę mikroglonów przesypało do próbki typu Falcon i dodano przygotowany wcześniej rozpuszczalnik. Modyfikacją klasycznej metody było zastosowanie w kolejnym kroku ultradźwięków o częstotliwości 50 kHz. Po 30 minutach zawartość próbki odwirowano w czasie 5 minut przy 4000 rpm. Supernatant przeniesiono do nowej próbki. W celu uzyskania separacji fazowej do roztworu dodano wodę destylowaną, po czym całość energicznie wstrząsano. Następnie próbkę ponownie odwirowano (5 minut, 4000 rpm), a wyekstrahowane lipidy odzyskano po odparowaniu rozpuszczalnika przy użyciu wyparki rotacyjnej. Pozostałą w probówce biomasę mikroglonów poddano ponownie ekstrakcji, powtarzając całą opisaną powyżej procedurę.

3.2.3. Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych

W celu oznaczenia kwasów tłuszczowych lipidy wyekstrahowane z biomasy mikroglonów zostały przekształcone w estry metylowe kwasów tłuszczowych zgodnie z metodą AOCS Ce 2-66 (AOCS 1997). Skład kwasów tłuszczowych w próbkach oznaczono za pomocą systemu chromatografii gazowej wyposażonego w kolumnę kapilarną i detektor płomieniowo-jonizacyjny. Temperaturę kolumny utrzymywano w 160 °C przez 1 min, następnie temperaturę zwiększono do 220 °C przy wzroście 6 °C na minutę. Po osiągnięciu zadanej temperatury utrzymywano ją przez 30 minut. Temperaturę portu wstrzykiwania i detektora ustawiono na 240 °C. Jako gaz nośny zastosowano wodór przy

szybkości przepływu $1,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Wyniki wyrażono jako procent całkowitej powierzchni pików wszystkich kwasów tłuszczowych w próbce ekstraktu lipidowego z mikroglonów.

3.2.4. Pomiar zawartości węgla i analiza szybkości wiązania ditlenku węgla

Do wysuszonej sproszkowanej biomasy mikroglonów dodano 1 N roztwór dichromianu potasu, kwas siarkowy, wodę destylowaną oraz kwas fosforowy i difenyloaminę. Całość mieszano delikatnie obracając kolbę przez 1 minutę, zapewniając kontakt próbki z odczynnikami. Mieszaninę reakcyjną miareczkowano 4 N roztworem siarczanu amonu żelaza III do uzyskania jaskrawo zielonego koloru. Zawartość węgla określono na podstawie podanego niżej wzoru (3):

$$C_C = \frac{3.951}{g} \left(1 - \frac{T}{S} \right) \quad (3)$$

gdzie:

C_C = zawartość węgla (g);

g = sucha masa mikroglonów (g);

T = ilość odczynnika zużytego do miareczkowania w próbie zerowej (ml);

S = ilość odczynnika zużytego do miareczkowania w próbie testowej (ml).

Szybkość wiązania ditlenku węgla obliczono według podanego niżej równania (4):

$$R_{CO_2} = C_C \cdot P_{max} \left(\frac{M_{CO_2}}{M_C} \right) \quad (4)$$

gdzie:

R_{CO_2} = szybkość wiązania ditlenku węgla ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);

C_C = zawartość węgla w biomacie mikroglonów (g);

P_{max} = maksymalna produktywność ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);

M_{CO_2} = masa cząsteczkowa ditlenku węgla (g);

M_C = masa cząsteczkowa węgla (g).

3.2.5. Pomiar zawartości azotu w podłożu hodowlanym

Azot całkowity w podłożu hodowlanym oznaczano metodą spektrofotometryczną zgodnie z Polską normą PN-EN ISO 11905-1:2001. Próbkę gotowano w środowisku

alkalicznym z nadtlenu dwusiarczaniem w buforowanym środowisku w szczelnie zamkniętym pojemniku. Pod wpływem podwyższonego ciśnienia, amoniak, azotyny i związki organiczne zawierające azot ulegają utlenieniu do azotanów. Następnie roztwór przepuszczono przez mieszaninę zawierającą miedziowy kadm w celu redukcji azotanów do azotynów. Powstające azotyny reagują z 4-aminobenzenosulfonamidem i dichlorowodorkiem N-(1-naftylo)-1,2-diaminoetanu tworząc różowe zabarwienie. Pomiar fotometryczny wykonano przy długości fali 540 nm. Stężenie azotu odczytano z wykresu kalibracyjnego, a wyniki przedstawiono w pracy w $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

3.2.6. Pomiar zawartości popiołu w biomasie mikroglonów

Zawartość popiołu w biomasie oznaczono według normy PN-EN ISO 18122:2016-01. Do porcelanowych tygli odważono biomasę mikroglonów wysuszoną w 105 °C, a następnie całość umieszczono w piecu muflowym w temperaturze 550 °C na okres 6 godzin. Wyniki przeliczono według podanego niżej wzoru (5):

$$AC = \left(\frac{mP}{mDAB} \right) \cdot 100 \quad (5)$$

gdzie:

AC = zawartość popiołu (%);

mP = masa popiołu (g);

$mDAB$ = sucha masa mikroglonów (g).

3.2.7. Produkcja biodiesla

Biodiesel do badań przygotowano w procesie transestryfikacji, wykorzystując metanol w stosunku molowym 6:1 względem oleju. Jako katalizator wykorzystano wodorotlenek potasu (KOH) w stężeniu 1,5% wag. Proces prowadzono w temp. 55 °C przez 30 min, przy 650 rpm. W celu usunięcia chlorofilu biodiesel z oleju z mikroglonów, po rozdzieleniu faz oraz oczyszczeniu i odwodnieniu, przepuszczono przez filtr z ziemi okrzemkowej.

3.2.8. Parametry pracy silnika zasilanego paliwem z dodatkiem biodiesla z mikroglonów

Badania przeprowadzono na stanowisku dynamometrycznym, w skład którego wchodziły: czterosuwowy silnik wysokoprężny, wolumetryczny wskaźnik poziomu paliwa, moduły wyświetlaczy, analizator cyklu pracy silnika, kalorymetr oraz analizator emisji spalin.

W ramach badań wykonano pomiary prędkości obrotowej i momentu obrotowego silnika określając użyteczną moc silnika, godzinowe i jednostkowe zużycie paliwa, moc indykowaną oraz sprawność silnika. Pomiary wykonano i przeliczono zgodnie z normami PN-ISO 15550 2009, PN-ISO 3046-1 2009, PN-ISO 3046-3 2009, PN-ISO 3046-5 2009. Dodatkowo zgodnie z normami PN-ISO 8178-1 1999 i PN-ISO 8178-6 2000 przeprowadzono analizę składu spalin emitowanych podczas pracy silnika.

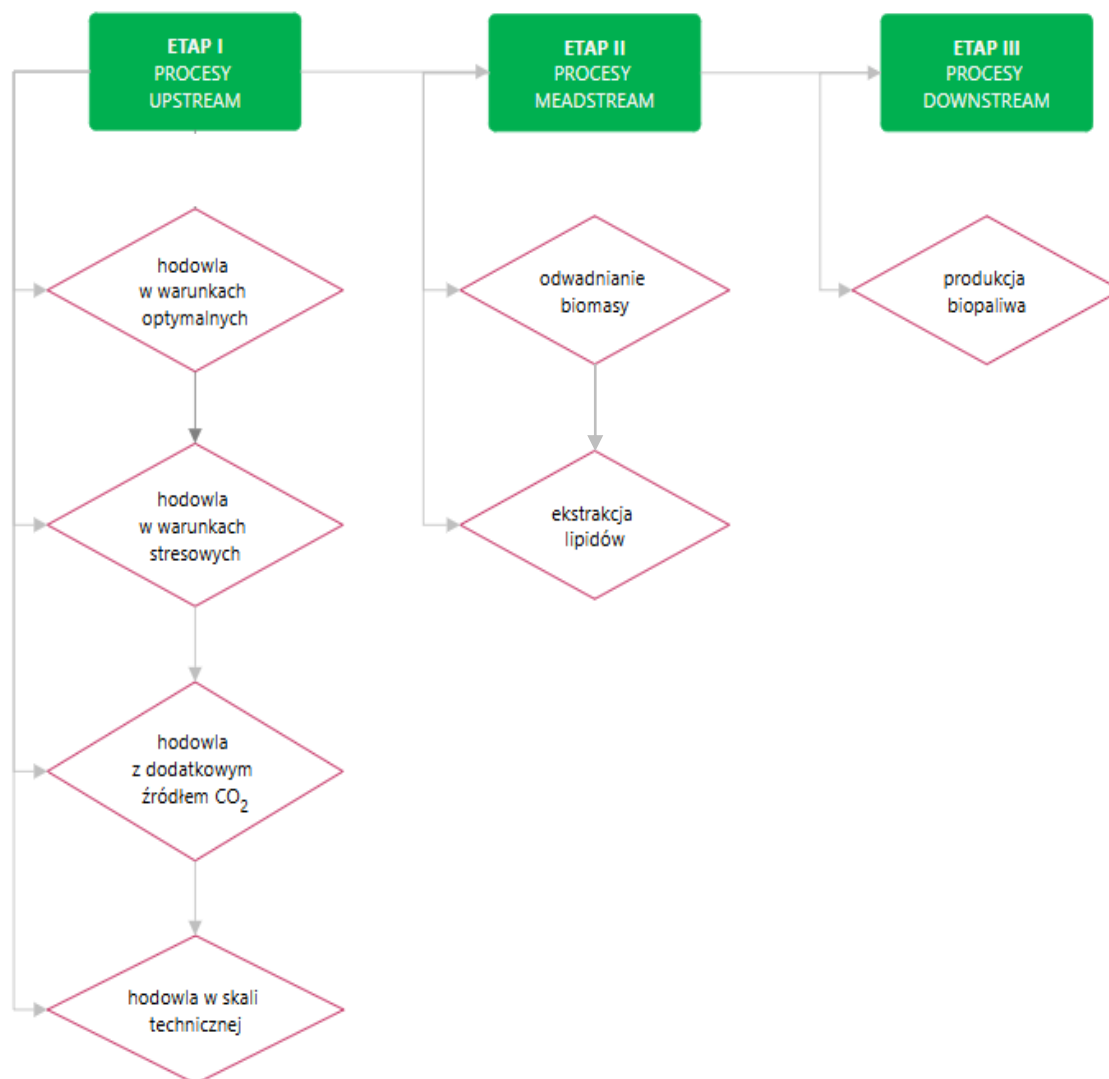
3.3. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu oprogramowania statystycznego dla Windows (Statistica wersja 13.3; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Wyznaczono również odchylenia standardowe (SD). Analizę wariancji i testy post hoc wg Tukeya (w publikacji P1 zastosowano test Duncana) przeprowadzono na poziomie istotności statystycznej $\alpha \leq 0.05$. Zależności między zmiennymi (w publikacjach P2 oraz P3) analizowano również wykorzystując współczynnik korelacji liniowej Pearsona.

4. BADANIA LABORATORYJNE PRZEPROWADZONE W RAMACH PRACY DOKTORSKIEJ

Zakres badań obejmował III etapy, odpowiadające realizacji założonych celów szczegółowych, zgodnie z przedstawionym poniżej schematem (Ryc. 1), uzupełnione oceną profilu kwasów tłuszczowych (w etapie II) oraz analizą wybranych wskaźników pracy silnika zasilanego mieszanką konwencjonalnego oleju napędowego i biodiesla z mikroglonów (w etapie III).

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań przygotowano osiem prac naukowych.



Ryc. 1. Schemat badań

ETAP I - procesy wstępne (hodowla mikroglonów)

Doświadczenie 1 (P1) – Określenie optymalnych warunków produkcji biomasy

Warunki uprawy mają kluczowe znaczenie dla efektywnej produkcji biomasy mikroglonów. Parametry uwzględnione w badaniach to: odczyn podłoża hodowlanego (pH 6, 7, 8, 9), rodzaj oświetlenia (lampy LED, lampy sodowe SonT Agro), fotoperiod (12/12 h, 18/6 h i 24/0 h w cyklu światło/ciemność). Przyrost biomasy określano przy wykorzystaniu metod bezpośrednich (pomiar grawimetryczny, pomiar liczby komórek) i pośrednich (pomiar chlorofilu *a*). Doświadczenie prowadzono w fotobioreaktorach pionowych o pojemności 2,5 L jako hodowla okresowa przez 15 dni.

Doświadczenie 2 (P2) – Określenie wpływu stresu pokarmowego na produkcję

biomasy i zawartość lipidów w komórkach mikroglonów

W doświadczeniu oceniono wpływ stresu pokarmowego na produkcję biomasy i zawartość lipidów w komórkach alg. W uprawie mikroglonów można wykorzystać metody, które bezpośrednio wpływają na akumulację oleju w komórkach mikroglonów. Zastosowanie stresu środowiskowego, w tym niedoboru składników pokarmowych, może skutkować wzrostem zawartości lipidów w biomacie. W badaniu źródłami składników pokarmowych były ścieki z akwakultury (AWW), które zastosowano w pięciu dawkach: 20%, 40%, 60%, 80% i 100%, natomiast obiektem kontrolnym było syntetyczne podłoże F/2. Przyrost biomasy mikroglonów określono przy wykorzystaniu metody grawimetrycznej określając zawartość suchej masy. Za pomocą metody spektrofotometrycznej wykonano pomiar gęstości optycznej hodowli oraz ilość chlorofilu *a* w komórkach mikroglonów. Zawartość lipidów oznaczono metodą ekstrakcji przy wykorzystaniu aparatu Soxhleta. W doświadczeniu wykorzystano fotobioreaktory o pojemności 2,5 L. Doświadczenie prowadzono stosując optymalne warunki określone w poprzednim doświadczeniu przez 15 dni jako hodowlę okresową.

Doświadczenie 3 (P3) – Ocena możliwości wykorzystania wodorowęglanu sodu jako dodatkowego źródła ditlenku węgla stymulującego produkcję biomasy

W doświadczeniu analizowano możliwość wykorzystania wodorowęglanu sodu (NaHCO_3) jako źródła ditlenku węgla. Zastosowano pięć dawek: 0.025, 0.5, 1.0, 1.5 i 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Obiektem kontrolnym było podłoże syntetyczne F/2 bez dodatku wodorowęglanu sodu. Zawartość biomasy oceniano przy wykorzystaniu pomiaru grawimetrycznego oznaczając suchą masę oraz spektrofotometrycznego przy wykorzystaniu pomiaru gęstości optycznej. Zawartość lipidów w biomacie oznaczono metodą wg Bligha i Dyera (1959) przy użyciu chloroformu i metanolu. Metodą wg Walkleya i Blacka (1934) określono również zawartość węgla i szybkość wiązania ditlenku węgla. Doświadczenie przeprowadzono w fotobioreaktorach o pojemności 100 L. Doświadczenie prowadzono jako hodowlę okresową przez 20 dni w ustalonych optymalnych warunkach środowiskowych.

Doświadczenie 4 (P5) – Ocena wpływu powiększenia skali hodowli na wzrost i rozwój mikroglonów

Celem tej części badań było określenie wpływu skali produkcji biomasy na wzrost i rozwój mikroglonów. Zmiana warunków hodowli może wpływać negatywnie zarówno na wzrost biomasy, jak i na metabolizm mikroglonów. W badaniach wykorzystano sześć szczepów: *C. vulgaris*, *C. fusca*, *C. minutissima*, *O. submarina*, *Monoraphidium* oraz *Scenedesmus*. Zawartość biomasy w zawiesinie mikroglonów oznaczono przy wykorzystaniu metody grawimetrycznej, natomiast zawartość lipidów przy użyciu metody Bligha i Dyera. Procentową zawartość popiołu w biomacie oszacowano według normy PN-EN ISO 18122:2016-01. Doświadczenie przeprowadzono w fotobioreaktorach tubularnych pionowych o trzech różnych pojemnościach roboczych 2,5 L, 14 L, 100 L. Doświadczenie prowadzono przez 15 dni jako hodowlę okresową w ustalonych optymalnych warunkach.

ETAP II – procesy pośrednie (zbiór i przygotowanie biomasy)

Doświadczenie 5 (P5) – Ocena skuteczności metod odwodnienia biomasy

Celem badań było określenie najkorzystniejszej metody odwodnienia biomasy mikroglonów. Proces ten należy do jednych z głównych wyzwań związanych z wykorzystaniem biomasy. W pracy analizowano skuteczność metody wirowania, filtracji, flokulacji przy użyciu flokulantu nieorganicznego i organicznego, sedymentacji. Biomase mikroglonów wirowano przy dwóch prędkościach: 2000 oraz 4000 rpm, w czasie 5, 30 oraz 60 minut. Proces filtracji przeprowadzono przy użyciu siatki fitoplanktonowej o średnicy

oczek 1 mikrona. Efektywność metody oceniono po upływie 24 godzin. W procesie flokulacji biomasy wykorzystano siarczan cynku (ZnSO_4) oraz chitosan w trzech dawkach: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ i $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Efektywność metody sedimentacji po umieszczeniu zawiesiny mikroglonów w leju Imhoffa oceniano po upływie 12 i 24 godzin. Skuteczność każdej z metod oceniano na podstawie pomiaru grawimetrycznego.

Doświadczenie 6 (P6) – Ocena efektywności metod ekstrakcji lipidów z biomasy

W tej części wykonano analizę porównawczą metod ekstrakcji lipidów z biomasy mikroglonów. Pozyskiwanie oleju to jeden z ważniejszych etapów produkcji biopaliwa z mikroglonów, stąd też konieczność poszukiwania metod skutecznych oraz ekonomicznych. Wykorzystane w badaniach mikroglony produkowano w fotobioreaktorze rurowym o układzie wertykalnym o pojemności 850 L. Biomase po zakończeniu hodowli odwodniono przy wykorzystaniu wirówki (8000 rpm), a następnie suszono w temperaturze 70°C przez okres 24 godzin. Do oceny skuteczności ekstrakcji wykorzystano najbardziej popularną metodę ekstrahowania heksanem, którą modyfikowano zastosowaniem ultradźwięków o częstotliwości 50 kHz (30 minut) oraz promieniowaniem mikrofalowym o mocy 1000 W (5 minut). Biomase mikroglonów ekstrahowano przez 4 godziny z częstotliwością 20 cykli na godzinę. Kolejną metodą była ekstrakcja wg Bligha i Dyer'a z użyciem chloroformu i metanolu. Po zakończonej ekstrakcji rozpuszczalnik oddestylowano a zawartość lipidów oznaczono metodą grawimetryczną.

Doświadczenie 7 (P7) – Ocena jakości oleju pozyskanego z mikroglonów jako surowca do produkcji biodiesla

Przy ocenie potencjału mikroglonów do wytwarzania biodiesla ważna jest nie tylko ilość lipidów, ale również obecność odpowiednich kwasów tłuszczowych (FA). Zmianę składu FA można uzyskać poprzez modyfikację warunków uprawy, w tym ograniczenie dawki składników pokarmowych. Mikroglony hodowano w podłożu płynnym F/2 (Guillard i Ryther 1962) o pełnym składzie (100%) oraz z dawką ograniczoną o połowę (50%). Analizowano ograniczenia dawki składników pokarmowych na wzrost biomasy mikroglonów, akumulację lipidów, zawartość popiołu, profil kwasów tłuszczowych oraz wybrane parametry fizyko-chemiczne biodiesla z alg. Zawartość biomasy, lipidów oraz popiołu oceniono przy wykorzystaniu pomiaru grawimetrycznego. Ekstrakcję

lipidów przeprowadzono przy użyciu metody Bligh i Dyera. Ilość popiołu w biomacie oznaczono według normy PN-EN ISO 18122:2016-01. Biomase mikroglonów spopielono w temperaturze 550°C i w czasie 6 godzin. Skład kwasów tłuszczowych oszacowano metodą chromatografii gazowej. Analizę wybranych właściwości użytkowych biopaliw wykonano przy wykorzystaniu programu komputerowego Biodiesel Analyzer© Version 2.2. Program ten szacuje właściwości użytkowe paliwa na podstawie profilu kwasów tłuszczowych.

Etap III – procesy końcowe (produkcja biopaliwa)

Doświadczenie 8 (P8) – Produkcja biodiesla i ocena wybranych wskaźników pracy silnika zasilanego biopaliwem wyprodukowanym z oleju mikroglonów

Celem badań była ocena wskaźników pracy silnika dla dwóch rodzajów paliwa: oleju napędowego z dodatkiem 7% biodiesla z mikroglonów (B/AME) oraz 7% biodiesla z rzepaku (B/RME). Biodiesel z mikroglonów przygotowano w procesie transestryfikacji oleju pozyskanego z biomasy tych organizmów o składzie *Scenedesmus* : *Chlorella vulgaris* (udział procentowy szczepów w hodowli wynosił odpowiednio 70 : 30). Mieszane kultury mogą osiągać wyższą gęstość niż pojedyncze gatunki, co powinno sprzyjać większej produkcji oleju, a hodowle są bardziej stabilne. Na podstawie wstępnych testów potwierdzono, że oba szczepy wykazywały synergię w zakresie wzrostu i rozwoju.

Najważniejszymi cechami decydującymi o przydatności danego surowca energetycznego do produkcji biopaliw są jego parametry energetyczne oraz parametry świadczące o jakości spalania w silniku. W ramach badań wykonano analizy dotyczące jednostkowego i godzinowego zużycia paliwa, momentu obrotowego silnika, mocy użytecznej oraz pomiaru składników spalin. Badania wykonano na stanowisku dynamometrycznym wyposażonym w silnik wysokoprężny.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Rozprawa doktorska składa się z cyklu ośmiu prac spójnych tematycznie, opublikowanych w czasopismach naukowych z listy MNiSW. Opracowanie zawiera opis i wyniki badań dotyczących ustalenia optymalnych warunków hodowli biomasy w zakresie rodzaju i czasu oświetlania (fotoperiodu), odczynu podłoża hodowlanego, modyfikacji składu podłoża hodowlanego w odniesieniu do zawartości składników odżywczych, a także wprowadzania do podłoża dodatków stymulujących wzrost i rozwój mikroglonów. Przedstawiono zależność między skalą hodowli a wydajnością produkcji biomasy. Przedstawiono również wyniki dotyczące efektywności metod zbioru i odwadniania biomasy mikroglonów oraz metod ekstrakcji lipidów z biomasy. Wykonano analizę składu kwasów tłuszczowych lipidów jako istotnego parametru jakości produkowanego z nich biopaliwa. Przeprowadzono również ocenę wybranych wskaźników pracy silnika zasilanego mieszanką oleju napędowego i biopaliwa z oleju mikroglonów, wraz z analizą emisji spalin.

5.1. Optymalne warunki produkcji biomasy mikroglonów

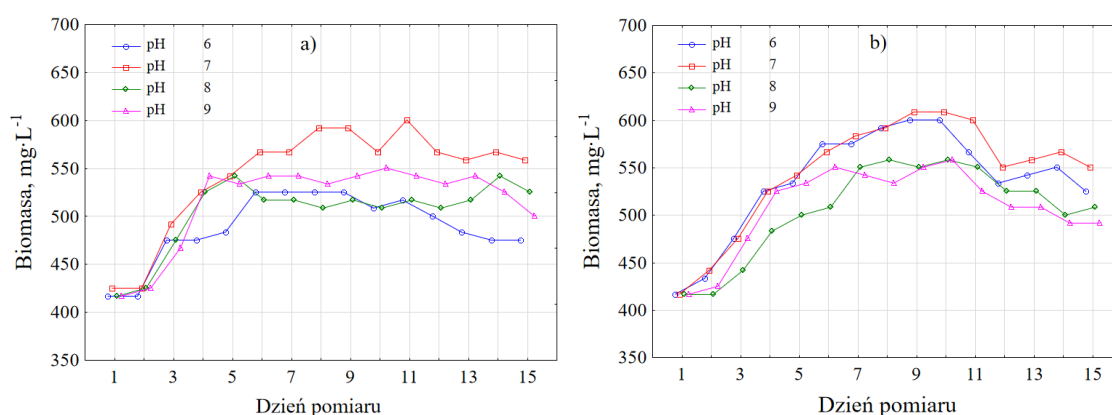
P1. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions. Appl. Sci. 2021, 11, 3106. <https://doi.org/10.3390/app11073106>.

Na podstawie analizy statystycznej wyników badań stwierdzono, że zarówno rodzaj oświetlenia, fotoperiod, jak i pH podłoża hodowlanego miały istotny wpływ na przyrost biomasy *C. vulgaris*, zawartość chlorofilu *a* oraz gęstość optyczną w zawiesinie mikroglonów, nie odnotowano natomiast istotnej zależności w odniesieniu do liczby komórek.

Długość fazy logarytmicznego wzrostu była uzależniona od pH podłoża hodowlanego oraz fotoperiodu i mieściła się w przedziale między siódmym a dziewiątym dniem hodowli (Ryc. 2). Podobne wyniki dla analizowanych parametrów uzyskali również Kim i in. (2012), którzy analizowali optymalne warunki hodowli mikroglonów *Chlorella sp.*, *Dunaliella salina* oraz *Dunaliella sp.* i stwierdzili, że biomasa mikroglonów zwiększała się do ósmego dnia hodowli. W badaniach przeprowadzonych przez Hawrot-Paw i in. (2019) stacjonarną fazę wzrostu w hodowli *C. vulgaris* odnotowano po 10 dniach

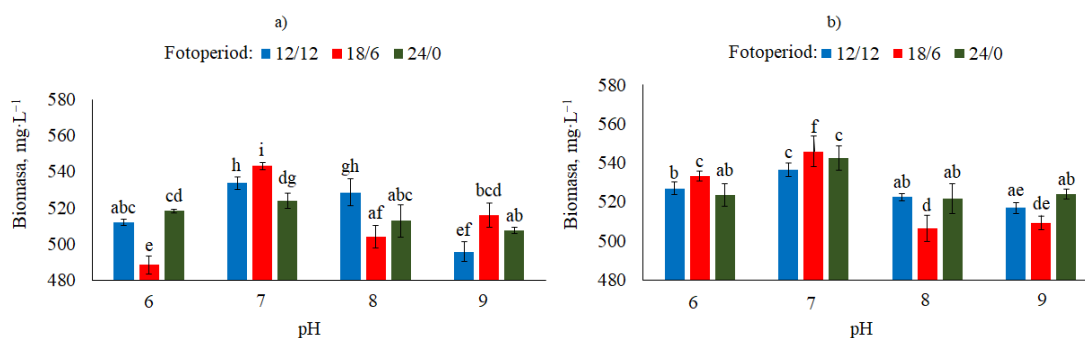
hodowli. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że długość poszczególnych faz wzrostu oraz osiągnięcie fazy stacjonarnej w hodowli zależało od rodzaju oświetlenia. W warunkach oświetlania hodowli lampami LED fazę stacjonarną osiągnięto wcześniej niż w fotobioreaktorach oświetlanych lampą SonT Agro.

Podczas doświadczenia najwyższe wartości dla biomasy odnotowano przy fotoperiodzie 18/6 h oraz przy obojętnym odczynie podłoża, odpowiednio $634 \pm 14,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m. przy zastosowaniu oświetlenia SonT-Agro oraz $600 \pm 14,4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m. przy zastosowaniu oświetlenia LED.



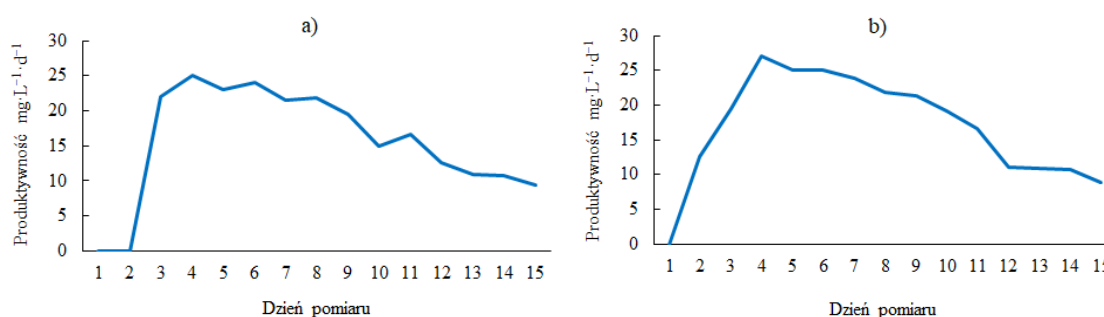
Ryc. 2. Dynamika wzrostu biomasy mikroglonów dla fotoperiodu 18/6 h (w cyklu światło/ciemność) i oświetlenia LED (a) oraz SonT Agro (b)

Średnią ilość biomasy mikroglonów w hodowli przedstawiono na Ryc. 3. Przy zastosowaniu oświetlenia sodowego SonT Agro uzyskano maksymalnie $546 \pm 7,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m., natomiast przy oświetlaniu hodowli światłem LED maksymalnie $543 \pm 1,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m. Na podstawie wyników stwierdzono, że niezależnie od rodzaju oświetlenia, optymalne warunki dla produkcji biomasy *C. vulgaris* to fotoperiod 18/6 h w cyklu światło/ciemność oraz pH 7 dla podłoża hodowlanego. Obojętny odczyn podłoża wpływa korzystnie na zdolność pochłaniania ditlenku węgla, absorpcję jonów oraz składników odżywczych, a także efektywność procesu fotosyntezy (Juneja i in. 2013, Rokicka i in. 2014), a to oznacza wyższą produkcję biomasy. Pozytywny wpływ wydłużenia czasu oświetlania hodowli na przyrost biomasy potwierdzili Amini i in. (2012), natomiast Atta i in. (2013) odnotowali, że ciągłe naświetlanie hodowli *C. vulgaris* wpłynęło niekorzystnie na wzrost mikroglonów.



Ryc. 3. Średnia zawartość biomasy przy zastosowaniu światła LED (a) oraz SonT Agro (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

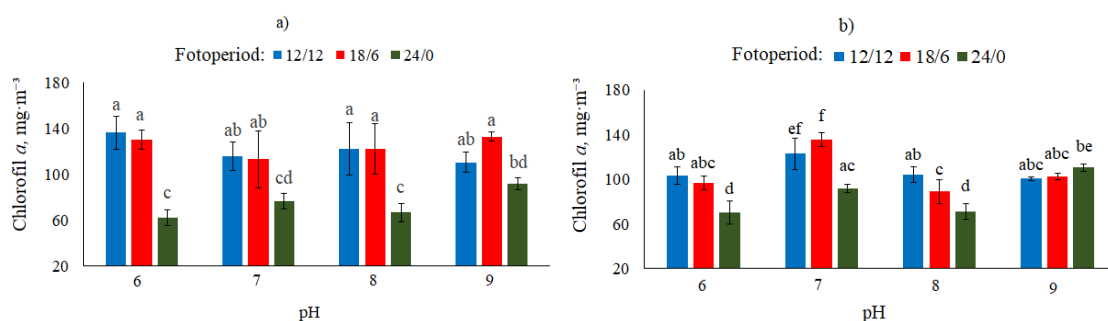
Rodzaj zastosowanego oświetlenia wpływał na produktywność biomasy mikroglonów *C. vulgaris*. Najwyższą produktywność odnotowano podczas analiz wykonanych w czwartym dniu doświadczenia (Ryc. 4). W optymalnych warunkach hodowli przy zastosowaniu oświetlenia LED uzyskano $25,00 \pm 5,10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ oraz $27,08 \pm 7,80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ przy użyciu oświetlenia SonT Agro. Podobne wyniki dla produktywności biomasy tego szczepu mikroglonów, na poziomie $0,04 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, uzyskali Machado i in. (2020).



Ryc. 4. Dynamika produktywności biomasy mikroglonów dla fotoperiodu 18/6 h w cyklu światło/ciemność dla oświetlenia LED (a) oraz SonT Agro (b)

Początkowa zawartość chlorofilu *a* w zawieszynie mikroglonów wynosiła $46 \pm 6,17 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Najwyższą zawartość barwnika asymilacyjnego odnotowano piątego dnia doświadczenia. Dla hodowli oświetlanej światłem LED, przy pH 6 oraz przy fotoperiodzie 18/6 h w cyklu światło/ciemność, zawartość chlorofilu *a* wynosiła $285 \pm 37,51 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$, natomiast dla światła SonT-Agro, przy pH 7 i przy fotoperiodzie 18/6 h w cyklu światło/ciemność, $274 \pm 30,83 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$. W kolejnych terminach pomiarowych obserwowano istotną redukcję zawartości tego barwnika. Zbieżne wyniki dotyczące *C. vulgaris*, tj. wzrost zawartości chlorofilu *a* tylko do piątego dnia doświadczenia, a następnie redukcję

niemal do zera, odnotowali również Lakaniemi i in. (2011). Według tych autorów, tak znaczący spadek zawartości barwnika asymilacyjnego w komórkach mikroalg związany był ze zmniejszaniem się zawartości składników odżywczych w podłożu hodowlanym. Analizując produkcję biomasy mikroglonów w niniejszym badaniu, fazę stacjonarną wzrostu, która jest powiązana z wyczerpywaniem się składników pokarmowych w podłożu, zaobserwowano między siódmym a dziewiątym dnia hodowli. Średnio najwyższą zawartość barwnika asymilacyjnego oznaczono dla fotoperiodu 18/6 h w cyklu światło/ciemność i przy pH 7 ($136 \pm 14,1 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) dla światła LED oraz dla fotoperiodu 12/12 h i przy pH 6 dla oświetlenia SonT (Ryc. 5).

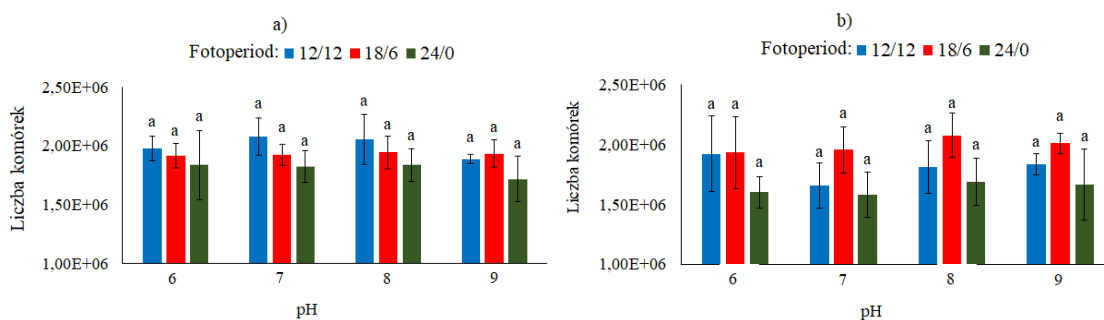


Ryc. 5. Średnia zawartość chlorofilu *a* przy zastosowaniu światła LED (a) oraz SonT Agro (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Wyznaczenie optymalnego czasu oświetlania hodowli jest ważne ze względu na powiązane z nim procesy fotochemiczne. Wytworzone w fazie jasnej fotosyntezy ATP oraz NADPH, podczas fazy ciemnej wykorzystywane są do przekształcenia ditlenku węgla w cukry, w tym m. in. w glukozę (Rai i in. 2015). Określenie optymalnego pH podłoża hodowlanego będzie miało wpływ na wydajność wchłanianie składników odżywczych. Niewłaściwie dobrany odczyn może powodować wytrącanie się wapnia w hodowli mikroglonów (Sirisansaneeyakul i in. 2011, Morais i in. 2015). Badania przeprowadzone przez Del Campo i in. (2000) wskazują, że dla niektórych szczepów mikroglonów pH optymalne dla fotosyntezy może być niższe w porównaniu do pH optymalnego dla produkcji biomasy.

Liczba komórek w zawiesinie mikroglonów na początku doświadczenia wynosiła $9,3 \cdot 10^5$ komórek/ml. Maksymalną liczbę komórek ($2,1 \cdot 10^6$ komórek/ml) odnotowano przy pH 7 i przy fotoperiodzie 18/6 h lub 12/12 h w cyklu światło/ciemność, odpowiednio przy zastosowaniu oświetlania hodowli lampą SON-T Agro lub oraz lampą LED. Na podstawie analizy statystycznej średniej liczby komórek mikroalg stwierdzono, że czas oświetlenia i pH nie miały istotnego wpływu na uzyskane wyniki (Ryc. 6). W

doświadczeniu najwyższą wartość ($20,8 \cdot 10^5$ komórek/ml) dla oświetlenia SON-T Agro i oświetlenia LED uzyskano odpowiednio przy fotoperiodzie 18/6 h w cyklu światło ciemność oraz przy fotoperiodzie 12/12 h.



Ryc. 6. Średnia liczba komórek w 1 ml zawiesiny mikroglonów przy zastosowaniu światła LED (a) oraz SonT Agro (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

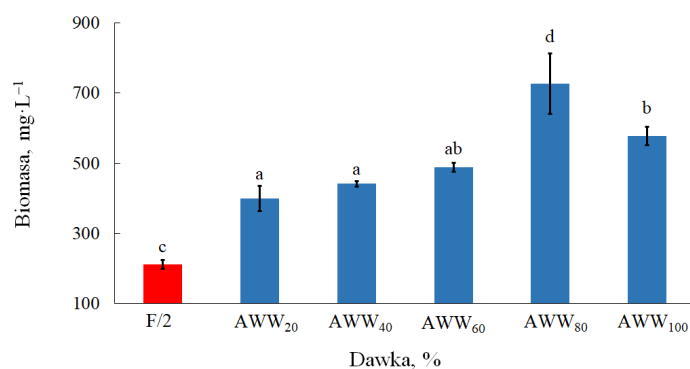
W kontekście wykorzystywania biomasy mikroglonów jako substratu do produkcji biopaliwa, wybór metody jej oznaczania odgrywa ważną rolę dla oceny efektywności całego procesu. Uzyskane wyniki wskazują, że metody te nie powinny być wykorzystywane zamiennie, a raczej powinny wynikać ze specyfiki badań. Taką zależność potwierdzają również badania przeprowadzone przez Griffithsa i in. (2011), którzy wykazali zależność m. in. pomiędzy etapem wzrostu a wielkością komórek. Zmienna może być również zawartość chlorofilu w komórkach (Reynolds 2006). Pomiar grawimetryczny pozwala na bezpośrednie określenie ilości surowca dostępnego do przetwarzania.

5.2. Wpływ stresu pokarmowego na przyrost biomasy i poziom akumulacji lipidów

P2. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Influence of Nutrient-Stress Conditions on *Chlorella vulgaris* Biomass Production and Lipid Content. Catalysts 2021, 11, 573. <https://doi.org/10.3390/catal11050573>.

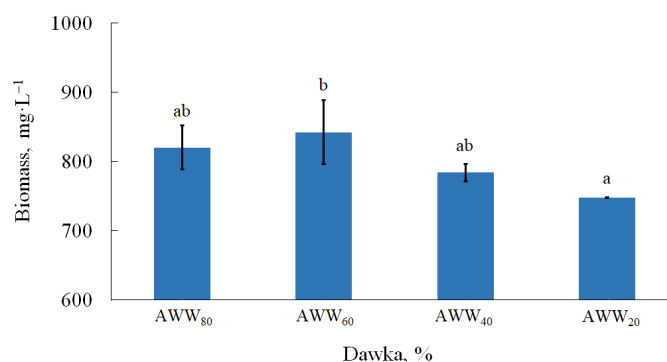
Wykorzystanie odpadów w hodowli mikroglonów przeznaczonej na cele energetyczne pozwala na efektywną produkcję biomasy przy obniżonych kosztach. Istotne jest, aby w składzie takich substratów odpadowych znajdowały się niezbędne dla tych organizmów składniki odżywcze. W przeprowadzonych badaniach do tego celu wykorzystano ścieki z akwakultury. Podstawowym składnikiem pokarmowym w podłożu

hodowlanym, niezbędnym dla wzrostu i rozwoju mikrogolonów, jest azot (Rendón i in. 2015). W ściekach z akwakultury zawartość tego pierwiastka wynosiła $31,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Już przy zastosowaniu AWW w najniższej, 20-procentowej dawce, co odpowiadało zawartości N w podłożu hodowlanym na poziomie $6,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, odnotowano wzrost ilości biomasy o niemal 90% w porównaniu do kontrolnego podłoża syntetycznego (Ryc. 7). Na podstawie pomiaru suchej masy oraz gęstości optycznej ustalono, że optymalną dawką AWW dla produkcji biomasy mikrogolonów *C. vulgaris* jest ich 80-procentowa zawartość w podłożu hodowlanym.



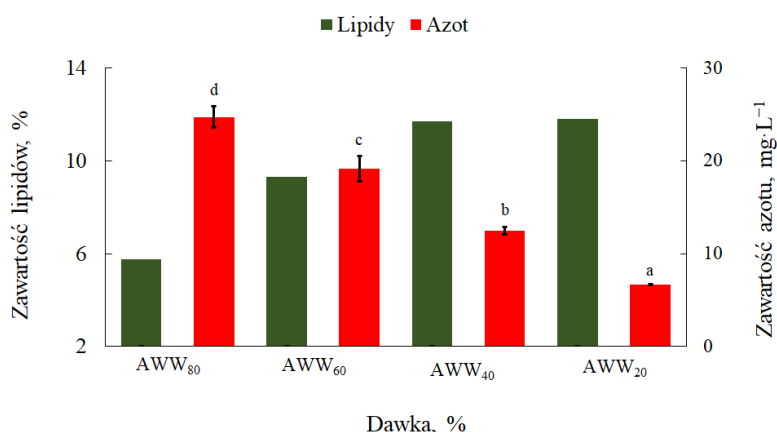
Ryc. 7. Średnia ilość biomasy w hodowli mikrogolonów *C. vulgaris* w podłożu zawierającym AWW oraz w obiekcie kontrolnym; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Zmniejszenie dawki N, w stosunku do wartości ustalonych jako optymalne, może zmniejszyć produkcję biomasy (Tang i in. 2011), ale jednocześnie spowodować wzrost zawartości lipidów w komórkach mikrogolonów (Sharma i in. 2012, Piligaev i in. 2019), co jest korzystne dla wytwarzania biopaliw. W badaniach własnych stwierdzono, że ograniczenie dostępności składników pokarmowych, w tym ilości dostępnego dla mikrogolonów azotu, miało istotny wpływ na oba analizowane parametry. Zawartość biomasy, począwszy od dawki AWW₆₀, zmniejszała się w zakresie od $842 \pm 45,90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ do $748 \pm 0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dla dawki AWW₂₀ (Ryc. 8). Zależność między ilością składników pokarmowych w ściekach a ilością biomasy mikrogolonów potwierdzili w swoich badaniach Gao i in. (2016) oraz Hawrot-Paw i in. (2019). W badaniach własnych, w warunkach stresu pokarmowego, odnotowano wzrost zawartości chlorofilu *a*. Przy niższej koncentracji komórek w podłożu hodowlanym dostępność światła do komórek i ich aktywność fotosyntetyczna może wzrastać.



Ryc. 8. Średnia ilość biomasy w hodowli mikroglonów *C. vulgaris* w podłożu zawierającym AWW; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Wraz ze zmniejszeniem dawki AWW w podłożu obserwowano wzrost zawartości lipidów w biomasie (Ryc. 9), która w warunkach deficytu pokarmowego mieściła się w zakresie od 5,75% (AWW₈₀) do 11,81% (AWW₂₀). Przy najniższej analizowanej dawce ścieków z akwakultury (AWW₂₀, dawka $6,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ N}$) ilość lipidów w komórkach mikroglonów wzrosła o 100% w porównaniu do dawki najwyższej (AWW₈₀, dawka $24,7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ N}$). Podobne zależności między ograniczeniem dawki azotu w podłożu hodowlanym a wzrostem zawartości lipidów odnotowali również inni autorzy (Mutlu i in. 2011, Pribyl i in. 2012, Adenan i in. 2016). Indukowany stres pokarmowy prowadzi do zmian w metabolizmie komórkowym mikroglonów, sprzyjając akumulacji lipidów i skrobi w ich biomasie (Geider i in. 2002).



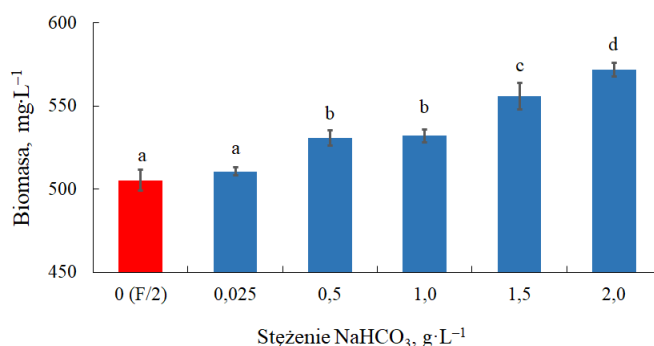
Ryc. 9. Zawartość azotu w podłożu hodowlanym oraz zawartość lipidów w biomasie mikroglonów; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

5.3. Wpływ suplementacji podłoża hodowlanego wodorowęglanem sodu na plon biomasy oraz zmiany jej składu biochemicznego

P3. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A. Utilisation of CO₂ from Sodium Bicarbonate to Produce *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes. Sustainability 2021, 13, 9118.
<https://doi.org/10.3390/su13169118>.

Zwiększenie wydajności produkcji biomasy można uzyskać zwiększając dostępność węgla dla procesu fotosyntezy. W hodowli okresowej już niewielki dodatek wodorowęglanu sodu do podłoża hodowlanego (0,025 g·L⁻¹) wpływał korzystnie na wzrost mikroglonów. Dawka NaHCO₃ miała istotny wpływ zarówno na ilość biomasy, zawartość lipidów, zawartość węgla w biomacie, jak i na szybkość wiązania ditlenku węgla przez mikroglony.

Średnia zawartość biomasy w hodowli mieściła się w przedziale od 511 ± 2,31 mg·L⁻¹ w dawce 0,025 g·L⁻¹ NaHCO₃ do 572 ± 4,00 mg·L⁻¹ w dawce 2,0 g·L⁻¹. W syntetycznym podłożu kontrolnym F/2, bez dodatku NaHCO₃, oznaczono 505 mg s.m.·L⁻¹ (Ryc. 10). Średnia wartość OD₆₈₀ mieściła się w zakresie od 0,107 ± 0,00 w obecności najniższej dawki wodorowęglanu sodu do 0,181 ± 0,00 dla dawki 2,0 g·L⁻¹. W obiekcie kontrolnym wartość OD₆₈₀ była najniższa i wynosiła 0,101 ± 0,00.

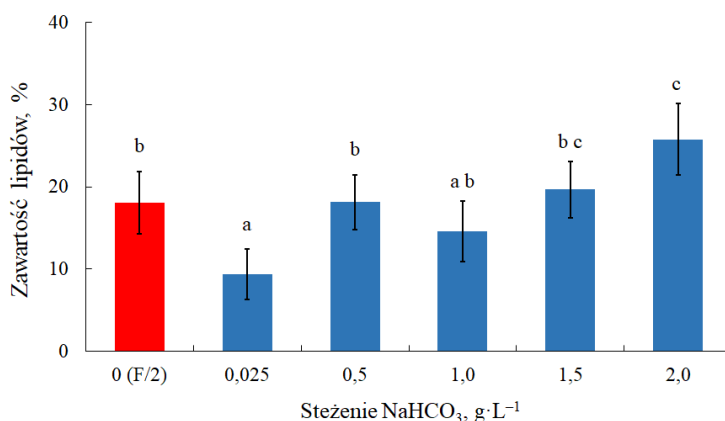


Ryc. 10. Średnia zawartość biomasy w hodowli mikroglonów w zależności od zastosowanej dawki NaHCO₃; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość wykorzystywania wodorowęglanu sodu jako dodatkowego źródła węgla w hodowli mikroglonów *C. vulgaris*. W dawce 2,0 g·L⁻¹ odnotowano ponad 20-procentowy wzrost biomasy w odniesieniu do obiektu kontrolnego (F/2). Zależność między dawką wodorowęglanu sodu a ilością biomasy

w hodowli potwierdzają również wyniki badań przeprowadzonych przez innych autorów (Yeh i in. 2010, Mokashi i in. 2016). Pozytywny wpływ NaHCO_3 jako źródła nieorganicznego węgla może wynikać z jego wysokiej rozpuszczalności i przyswajalności (Aishvarya i in. 2012).

Zastosowanie wodorowęglanu sodu zmniejsza ewentualny koszt dostarczania niezbędnego w hodowli węgla, ale może też zwiększać akumulację cennych składników (Zhu i in. 2022). Potwierdzają to wyniki badań własnych (Ryc. 11), jednak kluczowe znaczenie miała tutaj dawka wodorowęglanu. Zawartość lipidów mieściła się w zakresie od $9 \pm 3,75\%$ dla dawki $0,025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ do $26 \pm 4,39\%$ dla dawki $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$. Istotne różnice w zawartości lipidów w biomasie *C. vulgaris*, w porównaniu do wartości kontrolnych, odnotowano po wprowadzeniu do hodowli $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ (zawartość lipidów wzrosła o 8% w odniesieniu do obiektu kontrolnego F/2). Zależność między dawką wodorowęglanu sodu a wzrostem poziomu akumulacji lipidów odnotowali też Bywaters i in. (2015) oraz Li i in. (2018). Zależność ta nie jest jednoznaczna. W badaniach przeprowadzonych przez Pimolrata i in. (2010) oraz Sampathkumara i Gothandama (2019) podwyższenie dawki powyżej 200 mM NaHCO_3 zmniejszyło zawartość lipidów.



Ryc. 11. Średnia zawartość lipidów w biomasie w hodowlach z różnymi dawkami NaHCO_3 ; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Dostępność dodatkowego źródła węgla w podłożu hodowlanym wpływała pozytywnie na stopień wiązania CO_2 w biomasie. W zależności od dawki wodorowęglanu, stopień wiązania CO_2 mieścił się w przedziale od $0,155 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ do $0,925 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, odpowiednio przy najniższej i najwyższej dawce NaHCO_3 w podłożu hodowlanym. W obiekcie kontrolnym, bez dodatku wodorowęglanu sodu, współczynnik wiązania

ditlenku węgla był najniższy i wyniósł $0,139 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Zależność pomiędzy wzrostem dawki wodorowęglanu sodu a wzrostem zawartości węgla w biomase potwierdzili również Klinthong i in. (2015). Wskazuje to na wysoki potencjał asymilacji ditlenku węgla przez komórki mikroglonów i biologicznej sekwestracji CO_2 w ich biomase.

5.4. Hodowla mikroglonów w skali przemysłowej

P4. Hawrot-Paw, M.; **Ratomski, P.** Efficient Production of Microalgal Biomass - Step by Step to Industrial Scale. *Energies* 2024, *17*, 944.
<https://doi.org/10.3390/en17040944>.

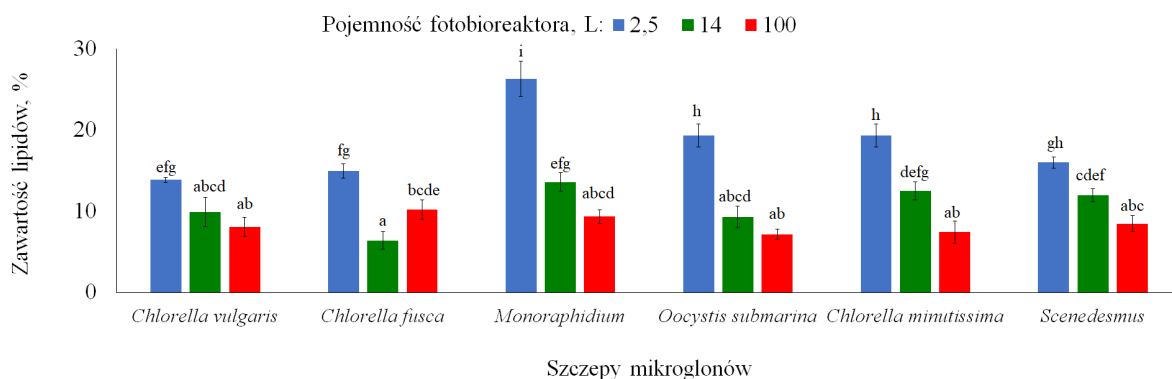
Produkcja biomasy z mikroalg na skalę komercyjną jest nadal istotnym wyzwaniem. Efektywność uzyskana w skali laboratoryjnej jest trudna do odtworzenia w fotobioreaktorach przemysłowych. Największą produktywność biomasy, niezależnie od skali hodowli, odnotowano w ciągu pierwszych pięciu dni doświadczenia (Tab. 1).

Tab. 1. Produktywność biomasy mikroglonów w zależności od pojemności fotobioreaktora

Pojemność fotobioreaktora, L	Mikroglony	Produktywność biomasy, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$		
		Dzień 5	Dzień 10	Dzień 15
2.5	<i>Chlorella vulgaris</i>	86.1 ± 0.2	60.0 ± 1.9	49.6 ± 1.0
	<i>Chlorella fusca</i>	100.8 ± 2.2	62.0 ± 3.9	57.4 ± 0.5
	<i>Monoraphidium</i>	85.6 ± 0.7	53.7 ± 2.9	54.6 ± 1.0
	<i>Oocystis submarina</i>	94.8 ± 1.2	53.6 ± 0.5	49.6 ± 2.1
	<i>Chlorella minutissima</i>	89.1 ± 1.6	69.8 ± 2.4	57.2 ± 1.0
	<i>Scenedesmus</i>	113.5 ± 4.1	74.6 ± 3.4	57.4 ± 0.5
14	<i>Chlorella vulgaris</i>	54.0 ± 1.1	46.5 ± 0.9	41.3 ± 1.6
	<i>Chlorella fusca</i>	48.7 ± 1.4	34.6 ± 0.9	29.6 ± 1.0
	<i>Monoraphidium</i>	60.5 ± 1.0	40.7 ± 0.8	44.2 ± 0.6
	<i>Oocystis submarina</i>	79.1 ± 2.7	88.1 ± 1.2	53.4 ± 0.4
	<i>Chlorella minutissima</i>	55.7 ± 1.0	49.5 ± 1.8	37.4 ± 2.8
	<i>Scenedesmus</i>	60.1 ± 0.8	54.6 ± 0.9	29.6 ± 1.0
100	<i>Chlorella vulgaris</i>	14.0 ± 0.8	7.1 ± 0.6	6.2 ± 0.9
	<i>Chlorella fusca</i>	18.9 ± 1.6	11.9 ± 0.8	5.3 ± 0.9
	<i>Monoraphidium</i>	20.0 ± 2.8	16.6 ± 1.5	14.2 ± 0.5
	<i>Oocystis submarina</i>	20.7 ± 3.2	14.9 ± 2.1	12.3 ± 0.5
	<i>Chlorella minutissima</i>	16.9 ± 1.4	6.8 ± 1.1	4.3 ± 0.4
	<i>Scenedesmus</i>	25.9 ± 2.2	21.3 ± 0.5	21.4 ± 0.9

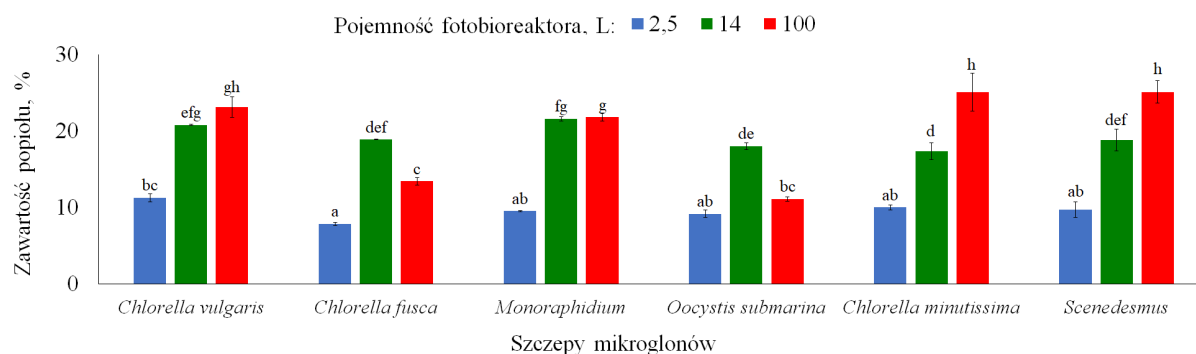
W badaniach własnych odnotowano spadek ilości biomasy w hodowli wraz ze wzrostem pojemności fotobioreaktorów, niezależnie od rodzaju szczepu wykorzystywanego w hodowli. W fotobioreaktorach o pojemności 100 L, spadek produktywności biomasy już w pierwszym terminie pomiarowym, w porównaniu do wartości odnotowanych w próbkach pobranych z fotobioreaktorów o pojemności 2,5 L, mieścił się w zakresie od 77% do 88. Niższa produktywność biomasy w fotobioreaktorach o większej pojemności związana może być z ograniczeniem dostępności światła (Min i in 2011). Tak wysoka redukcja wzrostu mogła być również powodowana uszkodzeniem komórek poprzez intensywne mieszanie hodowli, które w fotobioreaktorach przemysłowych jest szczególnie istotne aby zapobiegać sedymentacji komórek (Camacho i in. 2000).

Niewielka skala produkcji sprzyjała akumulacji lipidów w biomasie (Ryc. 12), natomiast w fotobioreaktorach o większej pojemności odnotowano redukcję ich zawartości. W próbkach pobranych z fotobioreaktorów o pojemności 14 L, w zależności od szczepu, spadek wynosił od 25% do 57%, w tym 29% dla mikroglonów *C. vulgaris*. Jeszcze niższe wartości odnotowano w hodowlach prowadzonych w fotobioreaktorach przemysłowych o pojemności 100 L, gdzie spadek w odniesieniu do skali 2,5 L, mieścił się w przedziale od 32% do 64%, w tym 42% dla mikroglonów *C. vulgaris*. Tak istotne różnice pomiędzy zawartością lipidów mogą wynikać z różnic w wymianie gazowej w fotobioreaktorach o zmiennej geometrii czy z intensywności mieszania hodowli (Xu i in. 2009, Amaro i in. 2011, Pham i in. 2017). W fotobioreaktorach przemysłowych mogły panować stresowe warunki, co odzwierciedlałyby wyniki dotyczące produktywności biomasy, natomiast nie tłumaczy to odnotowanego spadku zawartości lipidów w komórkach. Ten etap produkcji biomasy mikroglonów, istotny dla skali przemysłowej, wymaga przeprowadzenia dodatkowych, bardziej złożonych badań.



Ryc. 12. Zawartość lipidów w biomacie mikroglonów; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

W zależności od skali produkcji zwiększała się też zawartość popiołu w biomacie (Ryc. 13). W biomacie mikroglonów hodowanych w fotobioreaktorach o pojemności 2,5 L zawartość popiołu mieściła się w zakresie od 8 % dla *C. fusca* do 11 % dla szczepu *C. vulgaris*. W fotobioreaktorach o pojemności 14 L, zawartość popiołu w biomacie zwiększyła się w porównaniu do wyników uzyskanych w hodowli prowadzonej w fotobioreaktorach o pojemności 2,5 L, i mieściła się w zakresie od 17 % dla szczepu *C. minutissima* do 22 % dla *Monoraphidium*, w tym 21% dla *C. vulgaris*. W fotobioreaktorach o pojemności 100 L najniższą zawartość popiołu odnotowano dla mikroglonów *O. submarina* (11 %). W przypadku szczepów *C. minutissima* oraz *Scenedesmus* popiół stanowił 25 % biomasy, natomiast dla mikroglonów *C. vulgaris* 23%. Zawartość popiołu jest istotnym parametrem jakości biomasy mikroglonów wykorzystywanej na cele energetyczne i wpływa niekorzystnie na właściwości produkowanego z niej biopaliwa (Vassilev i in. 2015). Prace wielu autorów wykazują na zależność pomiędzy sposobem hodowli a zawartością popiołu w biomacie (Adams i in. 2011, Laurens i in. 2012, Liu 2017). Zwiększona akumulacja związków mineralnych w biomacie mikroglonów hodowanych w skali przemysłowej może mieć związek z mniej efektywnym mieszaniem. Niewykorzystane składniki podłoża hodowlanego mogą być separowane razem z biomasą i podnosić ogólną zawartość popiołu.



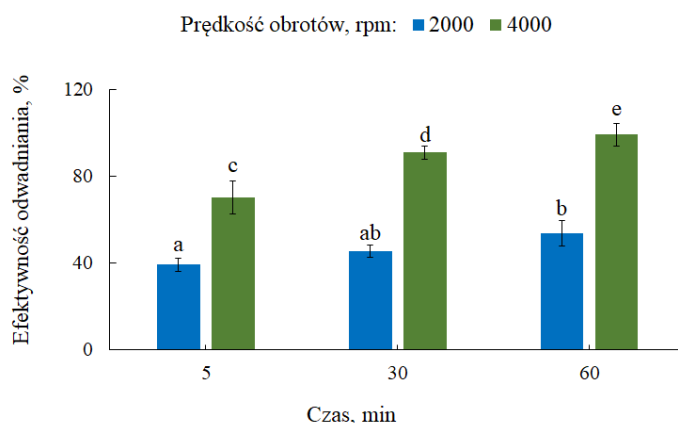
Ryc. 13. Zawartość popiołu w biomacie mikroglonów; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

5.5. Efektywność metod odwadniania biomasy

P5. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Ocena efektywności metod odwadniania biomasy mikroglonów. W: Doskonalenie technologii produkcji rolnej, w tym energii odnawialnej, z uwzględnieniem wymagań zrównoważonego rozwoju. Wydawnictwo ITP, Tom XXVII, Warszawa – Falenty, 2021.

Przy niewielkim stopniu zagęszczenia komórek mikroglonów w hodowli ważne jest dobranie odpowiedniej i efektywnej metody separacji biomasy i jej odwodnienia, ułatwiającej dalsze jej przetwarzanie. Wysokowydajna i opłacalna metoda zbioru jest szczególnie ważna przy wykorzystywaniu biomasy mikroglonów na skalę przemysłową. W badaniach własnych, w których testowano metodę separacji odśrodkowej (wirowanie), flokulację, sedymentację oraz filtrację, najkorzystniejsze wyniki odnotowano stosując metodę wirowania. Zwiększenie prędkości wirowania z 2000 rpm do 4000 rpm zwiększyło efektywność separacji z 54% do 70% (Ryc. 14), a wydłużenie czasu wirowania - do 99%. Zależność pomiędzy wzrostem prędkości obrotowej a skutecznością metody wirowania potwierdzają badania przeprowadzone przez Japara i in. (2017).

Skuteczność metody flokulacji była zależna od dawki flokulantu i wynosiła maksymalnie 97% dla chitosanu oraz 99 % dla siarczanu cynku. Wysoką skuteczność wykorzystania $ZnSO_4$ potwierdzili w swoich badaniach również Surendhirian i Vijay (2013), którzy stosując dawkę $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ osiągnęli 92-procentową skuteczność flokulacji. Działanie chitosanu nie jest tak jednoznaczne. Godos i in. (2011) oraz Cheng i in. (2011) wskazują na jego niewielką skuteczność, jednak podatność na flokulację może wiązać się z rodzajem hodowanego szczepu (Şirin i in. 2011). Według Rashida i in. (2013), w odpowiednich warunkach, skuteczność zastosowania chitosanu do separacji biomasy mikroglonów *C. vulgaris* może osiągnąć nawet 99%. W badaniach własnych zdecydowanie mniej efektywną metodą była sedymentacja. Po 24 godzinach jej skuteczność była na poziomie 58%. Niska efektywność tej metody może wynikać z małej gęstości i mikroskopijnych rozmiarów komórek alg (Mariam i in. 2015, Japar i in. 2017). Przyjęta w badaniach objętość próbki zawiesiny mikroglonów okazała się być niewystarczająca do oceny efektywności filtracji. Nie udało się zebrać wysuszonej biomasy z siatki fitoplanktonowej i określić skuteczności tej metody.



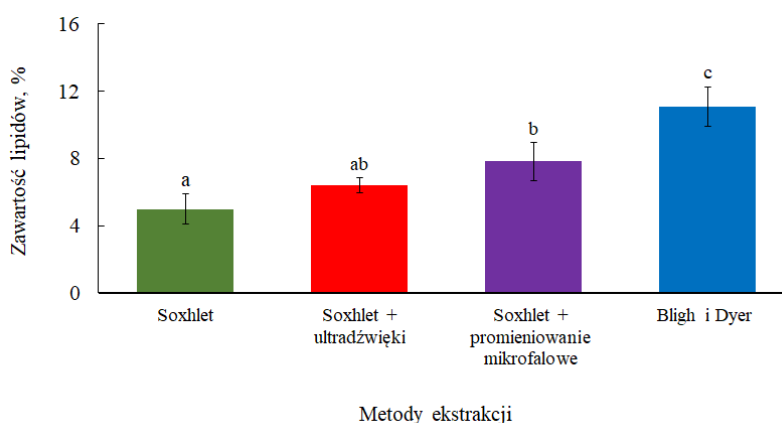
Ryc. 14. Efektywność odwadniania biomasy metodą wirowania); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

5.6. Ekstrakcja lipidów z biomasy mikroglonów

P6. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Porównanie efektywności metod ekstrakcji lipidów z biomasy mikroglonów *Chlorella vulgaris*. W: Innowacyjne Technologie Pozyskania Energii Odnawialnej. Wydawnictwo ITP, Tom XXVI, Warszawa – Falenty, 2020.

Jednym z kluczowych etapów technologii produkcji biodiesla z oleju mikroglonów jest sposób jego pozyskiwania. W przeprowadzonych badaniach wykorzystano dwie podstawowe metody ekstrakcji z modyfikacjami. Najniższą skuteczność (4,99%) uzyskano wykorzystując klasyczną metodę z aparatem Soxhleta i z heksanem jako rozpuszczalnikiem (Ryc. 15). Zastosowanie ultradźwięków przed ekstrakcją biomasy spowodowało wzrost ilości pozyskiwanych lipidów o niemal 30% w odniesieniu do podstawowej metody. Fale ultradźwiękowe generują zjawisko kawitacji, czyli powstawania pęcherzyków, których pękanie powoduje niszczenie struktury komórkowej mikroalg i uwalnianie znajdującego się w nich oleju (Dae Yoon i in. 1998). Jeszcze wyższą skuteczność uzyskano po zastosowaniu promieniowania mikrofalowego. Efektywność ekstrakcji wzrosła o 57% w porównaniu do klasycznej ekstrakcji heksanem. Zastosowanie promieniowania mikrofalowego może wpływać korzystnie również na czas pozyskiwania oleju z komórek mikroalg (Suali i Sarbatly 2012). Wysoka skuteczność tej metody spowodowana jest powstawaniem mikropęknięć w ścianach komórkowych (Sostraciu i in. 2012). W przeprowadzonych badaniach najkorzystniejsze wyniki uzyskano wykorzystując metodę

ekstrakcji lipidów wg Bligha i Dyera, poprzedzoną użyciem ultradźwięków. Oznaczona zawartość lipidów w biomacie była ponad 2-krotnie wyższa w odniesieniu do wartości uzyskanych metodą klasyczną w aparacie Soxhleta. Według Araujo i in. (2012) związane jest to nie tylko ze zjawiskiem kawitacji, które wpływa korzystnie na uwalnianie lipidów do roztworu, ale także z wysoką selektywnością lipidów w stosunku do układu chloroform, metanol i woda. Chloroform działa jako rozpuszczalnik lipidów, etanol skutecznie pomaga rozbić błonę komórkową umożliwiając dostęp do lipidów, natomiast obecność wody powoduje łączenie się zanieczyszczeń i łatwe ich usunięcie (Ramos-Bueno i in. 2016).



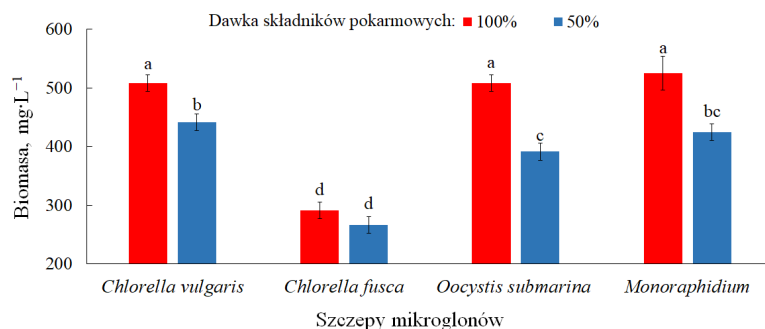
Ryc. 15. Zawartość lipidów w biomacie w zależności od metody ekstrakcji; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

5.7. Analiza profilu kwasów tłuszczowych

P7. Hawrot-Paw, M.; **Ratomski, P.**; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. *Energies* 2021, 14, 7334. <https://doi.org/10.3390/en14217334>.

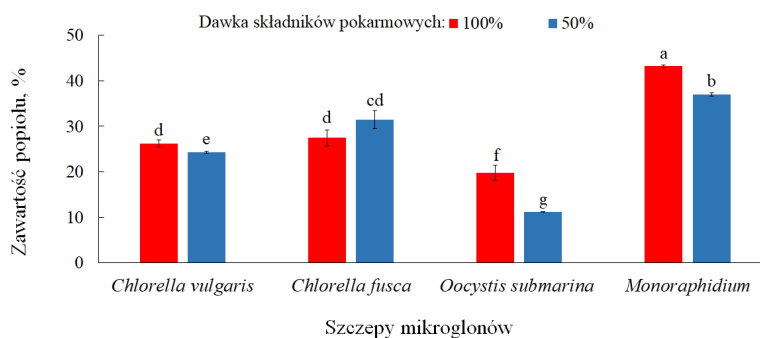
W obecności pełnej dawki składników pokarmowych w podłożu hodowlanym ilość biomasy w poszczególnych fotobioreaktorach mieściła się zakresie od $292 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m. do $525 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m., w tym dla mikrogłonów *C. vulgaris* wynosiła $508 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ s.m. (Ryc. 16). Ograniczenie dawki składników odżywczych o 50% spowodowało redukcję ilości biomasy o 9% - 23%, w tym 13% dla *C. vulgaris*. Kim i in. (2012) oraz Gigova i Ivanova (2015) prowadzili badania dotyczące wpływu ograniczenia składników

pokarmowych na wzrost i rozwój *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* *Dunaliella salina* i dla wszystkich szczepów hodowanych w niepełnej dawce składników pokarmowych odnotowali spadek zawartości biomasy.



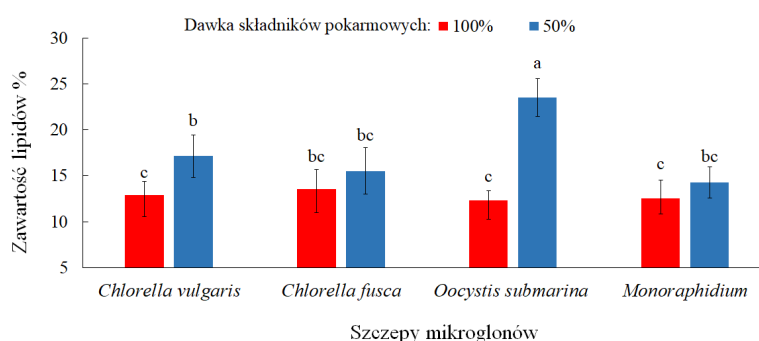
Ryc. 16. Średnia zawartość biomasy w zawiesinie mikroglonów; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Wysoka zawartość składników nieorganicznych w biomacie mikroglonów wpływa na jakość pozyskiwanego oleju i produkowanego na jego bazie biodiesla (Vardon i in. 2011, Gai i in. 2014). Badania własne wykazały, że średnia zawartość popiołu mieściła się w przedziale od $19,74 \pm 1,70\%$ do $43,19 \pm 0,24\%$, w tym $26,23 \pm 1,90\%$ dla mikroglonów *C. vulgaris* (Ryc. 17). W warunkach stresu pokarmowego dla szczepu *C. vulgaris* ilość popiołu zmniejszyła się do poziomu 24,3%, natomiast dla pozostałych szczepów mieściła się w zakresie od 11,2% do 37,0%. Zależność między dostępnością składników odżywczych a zawartością popiołu w biomacie mikroglonów przedstawili w swojej pracy również Roostaei i in. (2018). Autorzy hodowali mikroglony *Scenedesmus dimorphus* w warunkach autotroficznym oraz dla porównania w warunkach mikso-troficznym, w których uzyskali blisko 45-procentową redukcję zawartości popiołu.



Ryc. 17. Średnia zawartość popiołu w biomacie; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

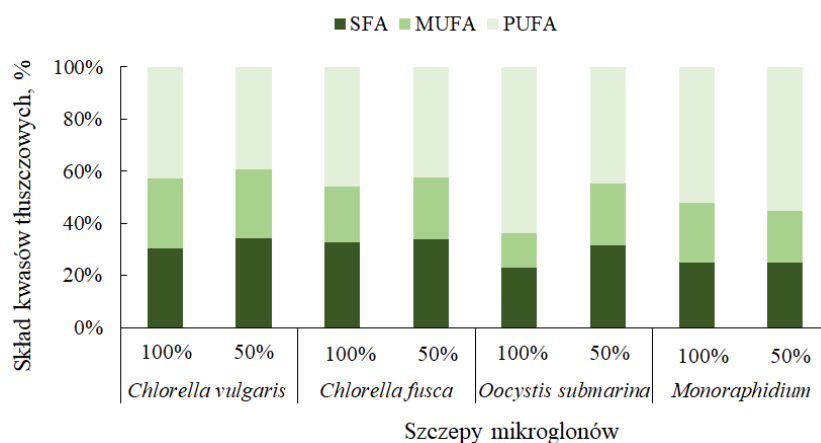
Przy 100-procentowej dawce składników pokarmowych w podłożu hodowlanym zawartość lipidów w biomacie mieściła się w przedziale od 12% do 14%, w tym dla mikrogolonów *C. vulgaris* było to 13% (Ryc. 18). Zawartość lipidów w komórkach mikrogolonów determinuje potencjał do produkcji biopaliw (Griffiths i Harrison 2009), a ograniczenie dawki składników pokarmowych (dawka 50%) sprzyjało akumulacji lipidów w biomacie. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla szczepu *O. submarina* (wzrost o 91% w odniesieniu do 100-procentowej dawki składników pokarmowych), natomiast dla *C. vulgaris* było to 17%. Wyższą zawartość lipidów w warunkach stresu pokarmowego odnotowali również Klin i in. (2018), którzy prowadzili badania wybranych szczepów zielenic bałtyckich, w tym dla *Chlorella sp.* Zawartość lipidów w komórkach *C. vulgaris*, zarówno podczas hodowli w pełnej, jak i w ograniczonej dawce składników pokarmowych, mieściła się w przedziale danych prezentowanych w literaturze (Mata i in. 2010). W wielu pracach badawczych akumulację lipidów stymuluje się głównie poprzez zmniejszenie dawki azotu w podłożu hodowlanym (Converti i in. 2009, Procházková i in. 2014, Singh i in. 2016). Dla technologii przemysłowych ważne jest maksymalne zmniejszenie kosztów operacyjnych, stąd w prezentowanych badaniach stres wywołano ograniczając dostępność wszystkich składników podłoża hodowlanego.



Ryc. 18. Średnia zawartość lipidów w biomacie; średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

W ocenie potencjału mikrogolonów do wytwarzania biodiesla ważna jest nie tylko ilość lipidów w ich komórkach, ale również obecność odpowiednich kwasów tłuszczowych (FA), które są bezpośrednimi prekursorami do produkcji biodiesla 3G (Chisti

2007). Wysoka zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (SFA) wpływa m. in. na stabilność oksydacyjną paliwa (Mostafa i El-Gendy 2017). W prezentowanych badaniach najwyższą zawartość SFA odnotowano dla biomasy szczepu *C. fusca* oraz *C. vulgaris*, odpowiednio 28,64% i 27,32% (Ryc. 19). Kolejnym ważnym parametrem brany pod uwagę w ocenie właściwości tego biopaliwa jest jego lepkość w niskich temperaturach. Za ten parametr odpowiadają jednonienasycone kwasy tłuszczowe, tzw. MUFA (Cao i in. 2014). Najwyższą zawartość tych kwasów (24,18%) odnotowano w biomacie mikrogłonów *C. vulgaris*. Stres pokarmowy na ogół zwiększał ilość nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym MUFA, a oznaczone różnice zależały od rodzaju szczepu. Zależność tą w swoich badaniach potwierdzili również Arora i Philippidis (2021).



Ryc. 19. Sumaryczny skład kwasów tłuszczowych w biomacie mikrogłonów

Analizę wybranych właściwości użytkowych biodiesla z mikrogłonów, na podstawie profilu kwasów tłuszczowych, przygotowano za pomocą programu komputerowego Biodiesel Analyzer© Version 2.2. (Tab. 2). Wartość poszczególnych parametrów zmieniała się w zależności od dawki składników pokarmowych oraz rodzaju szczepu wykorzystanego w badaniach. Dla mikrogłonów *C. vulgaris* pozytywne zmiany w warunkach stresu pokarmowego odnotowano w odniesieniu do liczby cetanowej (CN), temperatury blokowania zimnego filtru (CFPP), stabilności oksydacyjnej (OS) oraz liczby jodowej (IV). Pod względem energetycznym, na podstawie wartości opałowej (HHV), najlepszym surowcem do produkcji biodiesla był olej z biomasy gatunku *C. vulgaris* hodowanego na podłożu z pełną dawką składników pokarmowych ($35,483 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$). Wysoki potencjał energetyczny tych mikrogłonów potwierdziły też badania Sakarika i in. (2019), w których autorzy analizowali wydajność energetyczną biodiesla, biometanu oraz

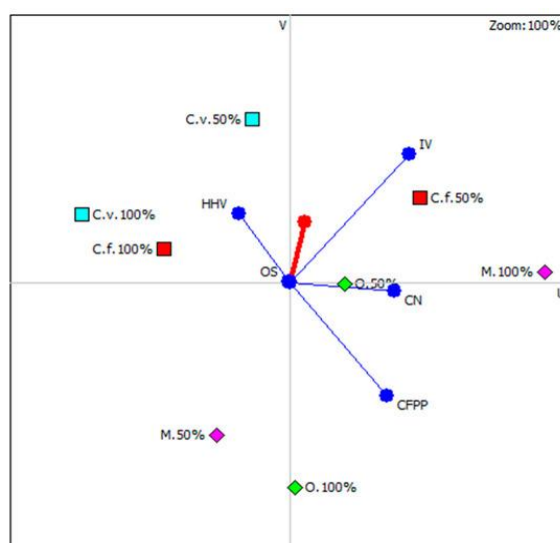
biopaliwa stałego wytworzonych z biomasy tego gatunku. W badaniach własnych również inne parametry reologiczne biopaliwa, takie jak gęstość (D) i lepkość kinematyczna (KV), były najkorzystniejsze dla biodiesla z oleju mikroglonów *C. vulgaris* hodowanych przy 100-procentowej dawce składników pokarmowych. Wynosiły one odpowiednio $D = 0.795 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ oraz $KV = 3.076 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ i były najbardziej zbliżone do parametrów konwencjonalnego oleju napędowego, dla którego $D = 0.82 - 0.85 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ natomiast $KV = 2 - 4,5 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (PN-EN ISO 12156-1:2004; PN-EN ISO 3675:2018-03).

Tab. 2. Właściwości biodiesla wyznaczone na podstawie profilu kwasów tłuszczowych

Para- metr	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Chlorella fusca</i>		<i>Oocystis subma- rina</i>		<i>Monoraphidium</i>	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%
HHV*	35,483	34,495	34,353	33,328	29,467	32,979	30,157	31,831
CN	48,401	52,013	49,704	53,83	53,361	52,507	57,601	50,651
D	0,795	0,772	0,771	0,747	0,665	0,74	0,676	0,717
KV	3,076	3,008	2,93	2,876	2,422	2,808	2,593	2,636
CFPP	0,388	-0,278	-3,571	-7,482	-11,083	-8,199	-10,505	-9,201
OS	5,975	6,408	5,82	5,872	5,212	5,994	5,536	5,799
IV	122,302	109,386	120,04	105,354	126,696	112,896	104,603	126,491

*HHV: górna wartość opałowa ($\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$), CN: liczba cetanowa, D: gęstość ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), KV: lepkość kinematyczna ($\text{mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$), CFPP: temperatura zablokowania zimnego filtra ($^{\circ}\text{C}$), OS stabilność oksydacyjna (h), IV: liczba jodowa

Wytypowanie najlepszego surowca do produkcji biodiesla jest trudne, ponieważ istnieje szereg kryteriów oceny jego parametrów. W podjęciu decyzji pomocne mogą być modele programowania matematycznego. W prezentowanych badaniach wykorzystano metodę PROMETHEE, a jej wyniki przedstawiono na Ryc. 20. Położenie najbliższe tzw. osi decyzyjnej wskazuje, że z wyjątkiem szczepu *Monoraphidium*, stres pokarmowy miał korzystny wpływ na właściwości biopaliwa.



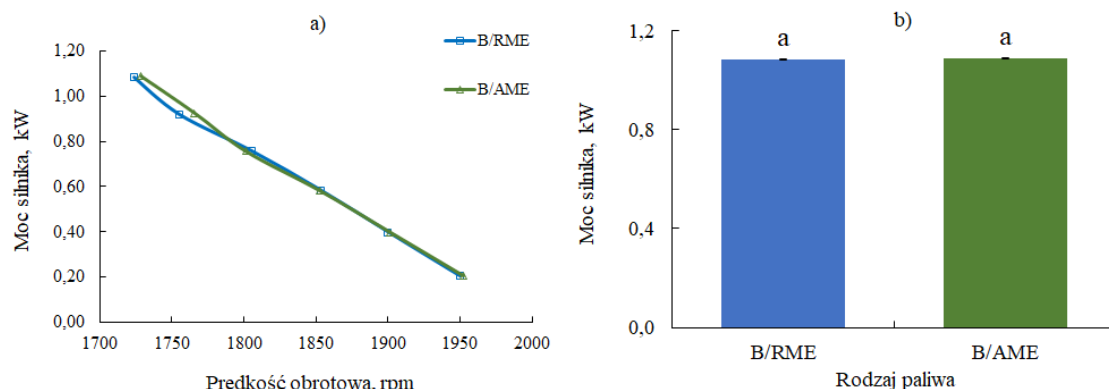
Ryc. 20. Analiza wielokryterialna PROMETHEE GAIA (C.v – *C. vulgaris*, C.f. – *C. fusca*, O. – *O. submarina*, M. – *Monoraphidium*)

5.8. Ocena wybranych wskaźników pracy silnika zasilanego paliwem z dodatkiem biodiesla wyprodukowanego z oleju mikroglonów

P8. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Kwaśnica, A.; Marcinkowski, D. Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend Produced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport. *Energies* 2023, 16, 5376. <https://doi.org/10.3390/en16145376>.

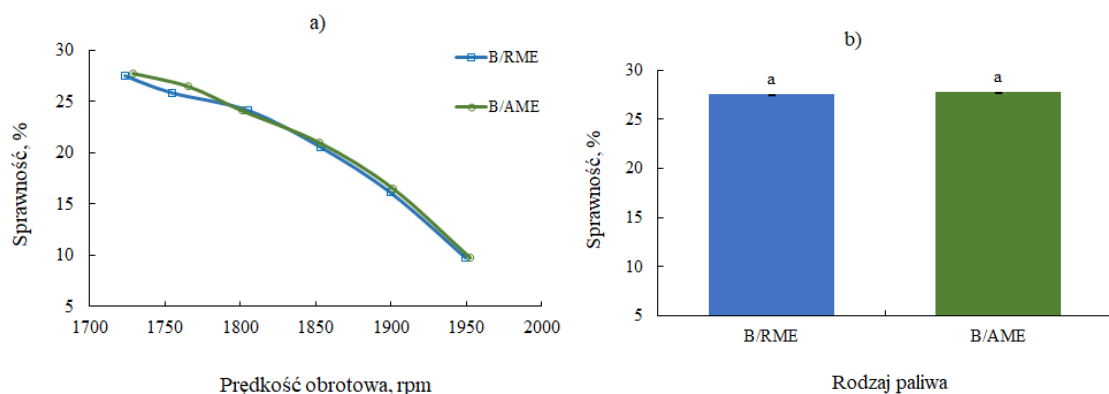
Badania prowadzone w warunkach rzeczywistych, oceniające wskaźniki pracy silnika zasilanego biodieslem z mikroglonów, są kluczowe dla kompleksowej oceny technologii produkcji tego biopaliwa. W badaniach własnych analizowano wybrane parametry silnika zasilanego paliwem konwencjonalnym z dodatkiem biodiesla z oleju z mikroglonów oraz z rzepaku. Nie stwierdzono istotnych różnic w odniesieniu do momentu obrotowego, mocy silnika, zużycia paliwa, sprawności indykowanej, efektywności cieplnej.

Przy maksymalnym obciążeniu 6 Nm, najwyższą prędkość obrotową silnika odnotowano dla mieszanki paliwowej z dodatkiem biodiesla z mikroglonów (Ryc. 21). Była to wartość o 6 rpm wyższa w odniesieniu do mieszanki paliwowej B7/RME, jednak różnica między wartościami średnimi była nieistotna statystycznie. Zmiany w prędkości obrotowej mogą wynikać ze zmiany liczby cetanowej mieszanki (Zhang i in. 2022).



Ryc. 21. Zależność między mocą silnika a prędkością obrotową (a) oraz moc silnika przy momencie obrotowym 6 Nm (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Najwyższą moc użyteczną silnika, podobnie jak w przypadku prędkości obrotowej, odnotowano dla mieszanki B7/AME. W zależności od obciążenia oznaczone wartości mieściły się w przedziale od 0,250 kW do 1,087 kW. Dla mieszanki paliwowej B7/RME moc użytkowa była niższa o ok. 0,5%. Generalnie dodatek biokomponentów, które charakteryzują się niższą wartością opałową, wpływa na spadek mocy silnika (Serrano i in. 2023), natomiast wzrost lepkości paliwa przekłada się na jego moc użyteczną, zwiększa więc moc silnika (Adaileh i AlQdah 2012, Tüccar i Aydın 2013). Przy najwyższym momencie obrotowym korzystniejsze wyniki pod względem godzinowego zużycia uzyskano dla mieszanki paliwowej B7/AME (Ryc. 22). Różnice pomiędzy godzinowym zużyciem dla różnych paliw związane są z ich wartością opałową (Reis i in 2013), jednak w badaniach własnych różnica między średnimi dla obu mieszanek paliwowych, podobnie jak dla mocy użytecznej silnika, nie była istotna statystycznie.



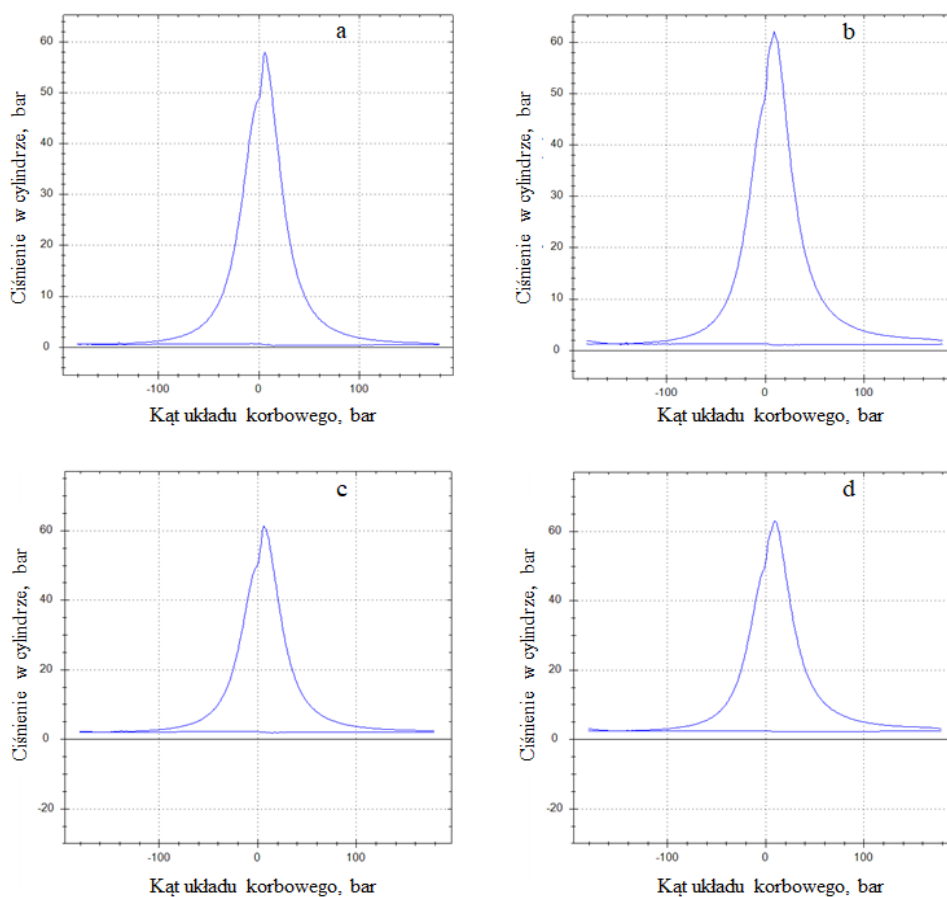
Ryc. 22. Zależność między sprawnością ogólną silnika a prędkością obrotową (a) oraz sprawność ogólna przy momencie obrotowym 6 Nm (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Najwyższe jednostkowe zużycie paliwa zaobserwowano przy najmniejszych obciążeniach silnika, co jest zgodne z wynikami prezentowanymi przez innych autorów (Siqueira i in. 2013, Paula i in. 2016). Spośród analizowanych mieszanek paliwowych, korzystniejsze wartości dla tego parametru uzyskano dla B7/AME. Przy obciążeniu 6 Nm jednostkowe zużycie paliwa było o 0,95% niższe w porównaniu do paliwa B7/RME. Murad i Al-Dawody (2022) stwierdzili, że stosowanie mieszanek biodiesla z alg i oleju napędowego zwiększa zużycie paliwa podczas hamowania, natomiast według Khiari i in. (2016), przy niewielkim udziale biokomponentu nie odnotowuje się wzrostu jednostkowego zużycia paliwa.

Sprawność indykowana silnika zasilanego mieszanką B7/AME była wyższa w porównaniu do B7/RME w zakresie od 43,8 do 46,2%, jednak na podstawie analizy wartości średnich stwierdzono, że rodzaj zastosowanego paliwa nie wpływał istotnie na wartość tego parametru. Lebedevas i in. (2021) różnice w sprawności indykowanej dla analizowanych biopaliw określili na poziomie maksymalnie 2,0%.

Sprawność ogólna silnika zasilanego mieszanką B7/AME mieściła się w zakresie od 10% (1 Nm) do 28% (6 Nm), natomiast dla mieszanki B7/RME była niższa średnio o 1,26%. Na sprawność pracy silnika wpływa m. in. lepkość paliwa. Wyższa lepkość paliwa wpływa na jego gorsze rozpylenie, a to skutkuje niższą wydajnością spalania (Ahmed i in. 2017). Wyliczona w niniejszych badaniach lepkość kinematyczna dla biodiesla wyprodukowanego z oleju mikrogłonów jest niższa w porównaniu do biopaliwa RME, która mieści się w granicach $3,5 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ - $5,0 \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (PN-EN 14214:2012).

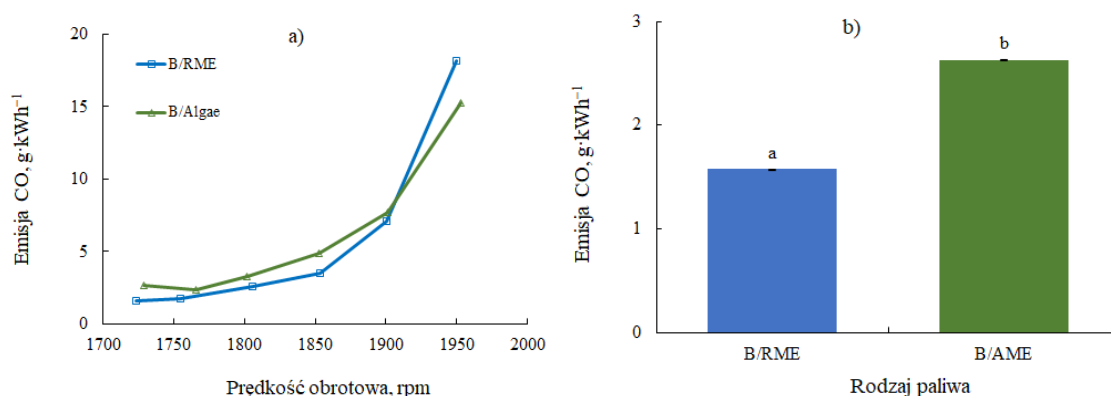
Rodzaj mieszanki paliwowej nie miał istotnego wpływu na przebieg ciśnienia w cylindrze silnika w funkcji kąta obrotu wału korbowego (Ryc. 23). Nieznacznie wyższe ciśnienie dla obu mieszanek paliwowych obserwowano dla wyższego momentu obrotowego.



Ryc. 23. Ciśnienie w cylindrze silnika dla B/RME/1 Nm (a), B/RME/6 Nm (b), B/AME/1 Nm (c), B/AME/6Nm (d)

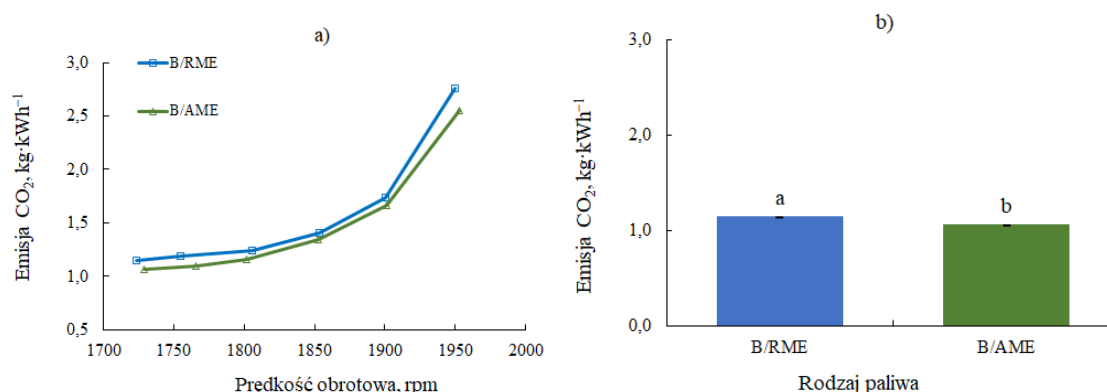
Wszystkie emisje toksycznych składników dla silnika pracującego w zakresie największych ustawień momentu obrotowego mieściły się w granicach dopuszczalnej normy dla urządzenia zastosowanego w badaniach.

Emisja tlenków węgla w spalinach zmieniała się wraz ze wzrostem obciążenia. Przy niższych obciążeniach silnika emisja CO dla mieszanki paliwowej B7/AME była o 67% niższa w porównaniu do mieszanki do B7/RME. Wraz ze wzrostem obciążenia i zmniejszaniem prędkości obrotowej wartości emisji tlenku węgla dla B7/RME były niższe w porównaniu do B7/AME. Przy największym obciążeniu różnica ta wynosiła maksymalnie $1.05 \text{ g} \cdot \text{kWh}^{-1}$ (Ryc. 24).



Ryc. 24. Emisja tlenku węgla w zależności od prędkości obrotowej (a) oraz emisja tlenku węgla przy momencie obrotowym 6 Nm (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

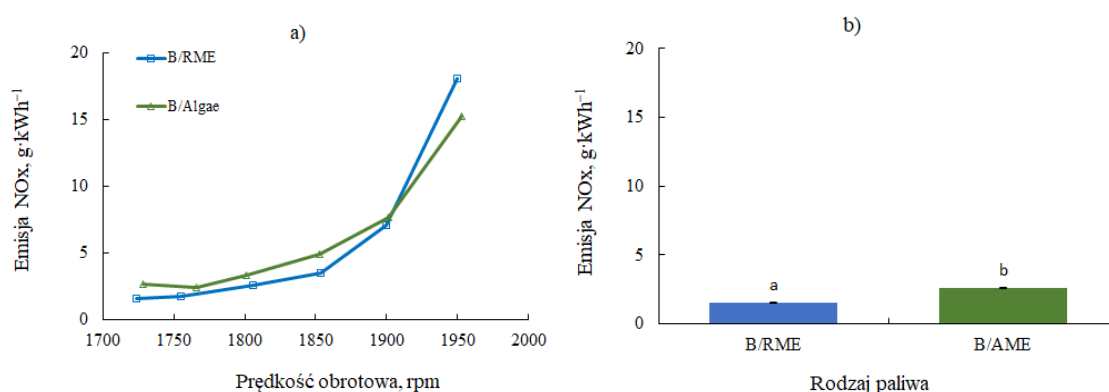
Istotnym parametrem w ekologicznej ocenie biopaliw jest poziom emisji ditlenku węgla. Dla analizowanych punktów charakterystyki silnika oznaczone poziomy emisji mieściły się w zakresie od 1,0 do 2,0 kg·kWh⁻¹ (Ryc. 25). Emisja ditlenku węgla dla paliwa B7/RME była wyższa średnio o 6,7%, natomiast przy obciążeniu 6 Nm różnica między mieszankami paliwowymi wyniosła 8,1% na korzyść B7/AME. El-Baz i in. (2016) podczas spalania mieszanki zawierającej 20% biopaliw z oleju alg odnotowali redukcję emisji CO₂ maksymalnie o 8% w porównaniu do oleju napędowego, co zdaniem autorów wynika z niższego w porównaniu do konwencjonalnego paliwa stosunku atomów węgla do wodoru. Ogólny bilans emisji CO₂, związany z produkcją i użytkowaniem biodiesla wytworzonego z mikroglonów (AME), jest zdecydowanie niższy w porównaniu do biodiesla konwencjonalnego (RME). Wynika to z dużo wyższej skuteczności pochłaniania CO₂ z atmosfery w odniesieniu do roślin, w tym do rzepaku. Całkowita sekwestracja węgla w biomase mikroglonów może wynieść nawet 513 MG CO₂·ha⁻¹, w porównaniu do 15,6 MG CO₂·ha⁻¹ dla rzepaku ozimego (Bilanovic i in. 2009, Kwiatkowski i in. 2023).



Ryc. 25. Emisja dwutlenku węgla w zależności od prędkości obrotowej (a) oraz emisja dwutlenku węgla przy momencie obrotowym 6 Nm (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

Niższą emisję węglowodorów odnotowano przy najmniejszej prędkości obrotowej silnika. Tylko w tym punkcie pomiarowym wartość emisji była niższa dla mieszanki paliwowej B7/RME była niższa w porównaniu do B7/AME. Średnie wartości dla HC nie różniły się statystycznie, w przeciwieństwie do poziomu emisji tlenków azotu.

Emisja NO_x była niższa w przypadku B7/RME i mieściła się w zakresie od 0,74 do 3,02 g·kWh⁻¹ (Ryc. 26). Wzrost emisji NO_x podczas spalania mieszanki paliwowej zawierającej biodiesel z mikroglonów odnotowali również Sharif i in. (2020), co może wynikać m. in. z większej zawartości tlenu w biomase (Dębowski i in. 2021). Wysoka temperatura w komorze spalania i ilość tlenu to główne przyczyny powstawania tlenków azotu (Allasi i in. 2025).



Ryc. 26. Emisja tlenków azotu w zależności od prędkości obrotowej (a) oraz emisja tlenków azotu przy momencie obrotowym 6 Nm (b); średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie od siebie ($P \leq 0.05$)

6. WNIOSKI

Uzyskane wyniki są zgodne z założonymi celami badawczymi i pozwoliły na weryfikację postawionych hipotez. Wyniki te stanowią podstawę do sformułowania następujących wniosków:

1. Parametry hodowli, w tym rodzaj oświetlenia, fotoperiod oraz pH podłoża, są kluczowe dla wzrostu i rozwoju mikroglonów. Optymalne warunki produkcji biomasy dla gatunku *Chlorella vulgaris* to oświetlenie przez 18/6 h w cyklu światło/ciemność i obojętny odczyn podłoża hodowlanego. Z uwagi na spodziewane koszty operacyjne związane z oświetleniem hodowli sugerowane jest stosowanie światła LED.
2. Składniki zawarte w ściekach z akwakultury mogą być wykorzystywane przez mikroglony jako źródło biogenów. Zastosowanie odpadów w hodowli oznacza możliwość efektywnej produkcji przy obniżonych kosztach. Średnia ilość biomasy w hodowli przy 80-procentowej dawce AWW była wyższa o niemal 250% w porównaniu do wartości uzyskanych na kontrolnym podłożu syntetycznym. Ograniczenie ilości składników pokarmowych w podłożu hodowlanym do poziomu 20% zwiększyło akumulację lipidów w komórkach o ponad 100% w stosunku do AWW₈₀, zwiększając potencjał wykorzystania biomasy w produkcji biopaliw.
3. Wprowadzenie dodatkowego nieorganicznego źródła węgla do uprawy mikroglonów zwiększa stopień wiązania ditlenku węgla i poziom sekwestracji CO₂ w biomacie, co wpływa pozytywnie na produkcję biomasy oraz zawartość lipidów w komórkach mikroglonów.
4. Zwiększenie skali hodowli mikroglonów prowadzi do obniżenia ilości pozyskiwanej biomasy, produktywności oraz zawartości lipidów w komórkach, co wskazuje na istnienie ograniczeń związanych z warunkami uprawy w systemach wielkoskalowych. Optymalizacja parametrów hodowlanych w fotobioreaktorach przemysłowych będzie kluczowa dla poprawy wydajności procesu.

5. Wybór metody separacji i odwodnienia ma istotny wpływ na odzysk biomasy oraz późniejsze jej wykorzystanie. W badaniach najwyższą skuteczność (99%) używano dla metody wirowania.
6. Metoda ekstrakcji wpływa na ilość lipidów pozyskiwanych z biomasy mikroglonów. Wspomaganie ekstrakcji ultradźwiękami lub promieniowaniem mikrofalowym ma pozytywny wpływ na efektywność procesu.
7. Warunki produkcji biomasy przeznaczonej na cele paliwowe wpływają na właściwości pozyskiwanego z niej oleju, a w konsekwencji na jakość produkowanego biopaliwa. W profilu kwasów tłuszczowych odnotowano wzrost nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych.
8. Pod względem energetycznym nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy badanymi mieszankami paliwowymi, co potwierdza potencjał biodiesla produkowanego z oleju mikroalg jako alternatywnego paliwa do zastosowania w silnikach o zapłonie samoczynnym. Różnice w mocy użytecznej między paliwami nie przekraczały 0,7%. Dla jednostkowego zużycia paliwa maksymalna odnotowana różnica wyniosła 2,3% na korzyść mieszanki z dodatkiem biopaliwa z mikroalg, a w przypadku ogólnej i indykowanej sprawności silnika około 2,5%.
9. Paliwo zawierające dodatek biodiesla z mikroalg charakteryzowało się wyższą emisją tlenku węgla (CO), tlenków azotu (NO_x) oraz węglowodorów (HC), natomiast istotnie niższa emisja dwutlenku węgla (CO₂) może świadczyć o potencjale wykorzystywania paliwa B/AME w dekarbonizacji sektora transportowego.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abdullah, B.; Muhammad, S.A.F.a.S.; Shokravi, Z.; Ismail, S.; Kassim, K.A.; Mahmood, A.N.; Aziz, M.M.A. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2019, 107, 37–50.
2. Adaileh, W.M.; AlQdah, K.S. Performance of Diesel Engine Fuelled by a Biodiesel Extracted from A Waste Cooking Oil. *Energy Procedia* 2012, 18, 1317–1334.
3. Adams, C.; Godfrey, V.; Wahlen, B.; Seefeldt, L.; Bugbee, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresour. Technol.* 2013, 131, 188–194.
4. Adenan, N.S.; Yusoff, F.M.; Medipally, S.R.; Shariff, M. Enhancement of lipid production in two marine microalgae under different levels of nitrogen and phosphorus deficiency. *J. Environ. Biol.* 2016, 37, 669–676.
5. Ahmed, A.; Campion, B.B.; Gasparatos, A. Biofuel development in Ghana: Policies of expansion and drivers of failure in the jatropha sector. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017, 70, 133–149.
6. Aishvarya, V.; Pradhan, N.; Nayak, R.R.; Sukla, L.B.; Mishra, B.K. Enhanced inorganic carbon uptake by *Chlorella* sp. IMMTCC-2 under autotrophic conditions for lipid production and CO₂ sequestration. *J. Appl. Phycol.* 2012, 24, 1455–1463.
7. Al-Dailami, A.; Koji, I.; Ahmad, I.; Goto, M. Potential of photobioreactors (PBRs) in cultivation of microalgae. *J. Adv. Res. Appl. Sci. Eng. Technol.* 2022, 27, 32–44.
8. Alishah Aratboni, H.; Rafiei, N.; Garcia-Granados, R.; Alemzadeh, A.; Morones-Ramirez, J.R. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microb. Cell Factories* 2019, 18, 178.
9. Allasi, H.L.; Muragan, S.; Ananda, H.K.; Variravel, D. Enhancing diesel engine performance and emissions with N-Butanol enhanced biodiesel derived from *Scenedesmus obliquus* algae. *Sci. Rep.* 2025, 15, 12924.
10. Álvarez, A.; Lapuerta, M.n.; Agudelo, J.R. Prediction of flash-point temperature of alcohol/biodiesel/diesel fuel blends. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2019, 58, 6860–6869.

11. Amaro, H.M.; Guedes, A.C.; Malcata, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl. Energy* 2011, 88, 3402–3410.
12. Amini, K.Z.; Seyfadabi, J.; Ramezanpur, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquac. Int.* 2012, 20, 41–49.
13. AOCS. Official method for the determination of free fatty acids in oils and fats.. American Oil Chemists' Society 1997.
14. Aransiola, E.F.; Betiku, E.; Ikhuomogbe, D.; Ojumu, T.V. Production of Biodiesel from Crude Neem Oil Feedstock and Its Emissions from Internal Combustion Engines. *Afr. J. Biotechnol.* 2012, 11, 6178–6186.
15. Araujo, G.S.; Matos, L.J.B.L.; Fernandes, S J.O.; Cartaxo, S.J.M.; Gonçalves, L.R.B.; Fernandes, F.A.N.; Farias, W.R.L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrason. Sonochem.* 2012, 20/1, 95–98.
16. Arora, N.; Philippidis, G.P. Insights into the physiology of *Chlorella vulgaris* cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Sci. Rep.* 2021, 11, 6779.
17. Arpia, A.A.; Chen, W. H.; Lam, S.S. Rousset, P.; de Luna, M.D.G. Sustainable biofuel and bioenergy production from biomass waste residues using microwave-assisted heating: A comprehensive review. *Chem. Eng. J.* 2021, 403, 126233.
18. Atta, M.; Idris, A.; Bukhari, A.; Wahidin, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 2013, 148, 373–378.
19. Behera, B. C.; Mishra, R. R.; Dutta, S. K.; Thatoi, H. N. Sulphur oxidising bacteria in mangrove ecosystem: a review. *Afr. J. Biotechnol.* 2014, 13(29), 2897–2907.
20. Behera, S.S.; Ray, R.C. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases: Recent Advances and Improvement Strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 86, 656–669.
21. Bessagnet, B.; Allemand, N.; Putaud, J.P.; Couvidat, F.; André, J.M.; Simpson, D.; Pisoni, E.; Murphy, B.N.; Thunis, P. Emissions of Carbonaceous Particulate Matter and Ultrafine Particles from Vehicles - A Scientific Review in a Cross-Cutting Context of Air Pollution and Climate Change. *Appl. Sci.* 2022, 12, 3623.

22. Bhatia, S.; More Than Just No Conflict: Examining the Two Sides of the Coexistence Coin. *Front. Conserv. Sci.* 2021, 2, 688307.
23. Bilanovic, D.; Andargatchew, A.; Kroeger, T.; Shelef, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations - Response surface methodology analysis. *Energy Convers. Manag.* 2009, 50, 262–267.
24. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959, 37, 911–917.
25. Bywaters, K.F.; Fritsen, C.H. Biomass and neutral lipid production in geothermal microalgal consortia. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015, 2, 1–11.
26. Camacho Rubio, F.; García Camacho, F.; Fernández Sevilla, J.M.; Chisti, Y.; Molina – Grima, J.M. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 81, 459–73.
27. Cao, Y.; Liu, W.; Xu, X.; Zhang, H.; Wang, J.; Xian, M. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Biofuels* 2014, 7, 1–11.
28. Chen, J.; Li, J.; Dong, W.; Zhang, X.; Tyagi, R.D.; Drogui, P.; Surampalli, R.Y. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2018, 90, 336–346.
29. Cheng, Y.S.; Zheng, Y.; Labavitch, J.M.; Gheynst, J.S.V. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. *Proc. Biochem.* 2011, 46(10), 1927–1933.
30. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25, 294–306.
31. Chu, R.; Li, S.; Zhu, L.; Yin, Z.; Hu, D.; Liu, C.; Mo, F. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2021, 139, 110689.
32. Converti, A.; Casazza, A.A.; Ortiz, E.Y.; Perego, P.; Del Borghi, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* 2009, 48, 1146–1151.
33. Corsini, A.; Marchegiani, A.; Rispoli, F.; Sciulli, F.; Venturini, P. Vegetable Oils as Fuels in Diesel Engine. *Engine Performance and Emissions. Energy Procedia* 2015, 81, 942–949.

34. Dae Yoon, B.; Moke Oh, H.; June Lee, S. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnol. Techniq.* 1998, 12 (7), 553–556.
35. De Godos, I.; Guzman, H.O.; Soto, R.; García-Encina, P.A.; Becares, E.; Muñoz, R.; Vargas V.A. Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial bio-mass from piggery wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(2), 923–927.
36. Dębowski, M.; Michalski, R.; Zieliński, M.; Kazimierowicz, J. A Comparative Analysis of Emissions from a Compression–Ignition Engine Powered by Diesel, Rapeseed Biodiesel, and Biodiesel from *Chlorella protothecoides* Biomass Cultured under Different Conditions. *Atmosphere*. 2021, 12, 1099.
37. Del Campo, J.A.; Moreno, J.; Rodríguez, H.; Vargas, M.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Carotenoid content of *chlorophycean* microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (*Chlorophyta*). *J. Biotechnol.* 2000, 76, 51–59.
38. Deora, P.S.; Verma, Y.; Muhal, R.A.; Goswami, C.; Singh, T. Biofuels: An alternative to conventional fuel and energy source. *Mater. Today Proc.* 2022, 48, 1178–1184.
39. Dey, S.; Reang, N.M.; Das, P.K.; Deb, M. A comprehensive study on prospects of economy, environment, and efficiency of palm oil biodiesel as a renewable fuel. *J. Clean. Prod.* 2021, 286, 124981.
40. dos Reis, E.F.; Cunha, J.P.B.; Mateus, D.L.S.; Delmond, J.G.; Couto, R.F. Performance and emissions of a diesel engine-generator cycle under different concentrations of soybean biodiesel. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient* 2013, 17, 565–571.
41. El-Baz, F.K.; Gadb, M.; Abdou, S.M.; Abedd, K.; Mattere, I.A. Performance and exhaust emissions of a diesel engine burning algal biodiesel blends. *Int. J. Mech. Mechatron. Eng.* 2016, 16, 151–158.
42. Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G.H.A. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. boil. Chem.* 226, 1, 497–509.
43. Gai, C.; Zhang, Y.; Chen, W.T.; Zhang, P.; Dong, Y. Energy and nutrient recovery efficiencies in biocrude oil produced via hydrothermal liquefaction of *Chlorella pyrenoidosa*. *RSC Adv.* 2014, 4, 16958–16967.

44. Gao, F.; Li, C.; Yang, Z.H.; Zeng, G.M.; Feng, L.J.; Liu, J.Z.; Liu, M.; Cai, H.W. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecol. Eng.* 2016, 92, 55–61.
45. Geider, R.; La Roche, J. Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* 2002, 37, 1–17.
46. Gigova, L.; Ivanova, N.J. Microalgae respond differently to nitrogen availability during culturing. *J. Biosci.* 2015, 40, 365–374.
47. Griffiths, M.J.; Garcin, C.; van Hille, R.P.; Harrison, S.T. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* 2011, 85, 119–123.
48. Griffiths, M.J.; Harrison, S.T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 2009, 21, 493–507.
49. Guillard, R.R.L.; Ryther, J.J. Studies of marine planktonic diatoms in *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea*. Cleve. *Can. J. Microbiol.* 1962, 8, 229–239.
50. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M. Sustainable Production of *Monoraphidium* Microalgae Biomass as a Source of Bioenergy. *Energies* 2020, 13, 5975.
51. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M.; Zając, G.; Szyszlak-Bargłowicz, J. Production of Microalgal Biomass Using Aquaculture Wastewater as Growth Medium. *Water* 2019, 12, 106.
52. Imtenan, S.; Masjuki, H.H.; Varman, M.; Rizwanul Fattah, I.M.; Sajjad, H.; Arbab, M.I. Effect of n-butanol and diethyl ether as oxygenated additives on combustion–emission–performance characteristics of a multiple cylinder diesel engine fuelled with diesel–jatropha biodiesel blend. *Energy Convers. Manag.* 2015, 94, 84–94.
53. Iqbal, J.; Theegala, C. Microwave-assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. *Algal Res.* 2013, 2(1), 34–42.
54. Japar, A.S.; Azis, N.M.; Takriff, M.S. Application of different techniques to harvest microalgae. *T. Sci. Technol.* 2017, 4, 98–108.
55. Jeswani, H.K.; Chilvers, A.; Azapagic, A. Environmental sustainability of biofuels: A review. *Proc. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 2020, 476, 20200351.

56. Jogarao, B.; Kumari, A.S. Biodiesel Production Using Second-Generation Feedstocks: A Review. In: Recent Advances in Material Sciences, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2019, 693–709.
57. Juneja, R.M.; Ceballos, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: a review. *Energies* 2013, 6, 4607–4638.
58. Jungmin, K.G.Y.; LEE, H.; Lim, J.; Kim, K.; Woong, K.C.; Park, M.S.; Yang, J.W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 862–876.
59. Karlsson, H.; Ahlgren, S.; Sandgren, M.; Passoth, V.; Wallberg, O.; Hansson, P.-A. Greenhouse Gas Performance of Biochemical Biodiesel Production from Straw: Soil Organic Carbon Changes and Time-Dependent Climate Impact. *Biotechnol. Biofuels* 2017, 10, 217.
60. Khiari, K.; Awad, S.; Loubar, K.; Tarabet, L.; Mahmoud, R.; Tazerout, M. Experimental investigation of pistacia lentiscus biodiesel as a fuel for direct injection diesel engine. *Energy Convers. Manag.* 2016, 108, 392–399.
61. Kim, W.; Park, J.M.; Gim, G.H.; Jeong, S.H.; Kang, C.M.; Kim, D.-J.; Kim, S.W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2012, 35, 19–27.
62. Klin, M.; Pniewski, F.; Latała, A. Characteristics of the growth rate and lipid production in fourteen strains of Baltic green microalgae. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* 2018, 47, 10–18.
63. Klinthong, W.; Yang, Y.-H.; Huang, C.-H.; Tan, C.-S. A review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol Air Qual. Res.* 2015, 15, 712–742.
64. Kwiatkowski, C.A.; Pawłowska, M.; Harasim, E.; Pawłowski, L. Strategies of Climate Change Mitigation in Agriculture Plant Production—A Critical Review. *Energies* 2023, 16, 4225.
65. Lakaniemi, A.M.; Intihar, V.M.; Tuovinen, O.H.; Puhakka, J.A. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microb. Biotechnol.* 2011, 5, 69–78.

66. Lal, R.; Smith, P.; Jungkunst, H. F.; Mitsch, W. J.; Lehmann, J.; Nair, P. K. R.; Ravindranath, N. H. The carbon sequestration potential of terrestrial ecosystems. *J. Soil Water Conserv.* 2018, 73(6), 145–152.
67. Laurens, L.M.L.; Dempster, T.A.; Jones, H.D.T.; Wolfrum, E.J.; Van Wychen, S.; McAllister, J.S.P.; Rencenberger, M.; Parchert, K.J.; Gloe, L.M. Algal biomass constituent analysis: Method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1879–1887.
68. Levasseur, W.; Perré, P.; Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnol. Adv.* 2020, 41, 107545.
69. Li, F.; Liu, Z.; Ni, Z.; Wang, H. Effect of Biodiesel Components on Its Lubrication Performance. *J. Mater. Res. Technol.* 2019, 8, 3681–3687.
70. Li, J.; Li, C.; Lan, C.G.; Liao, D. Effects of sodium bicarbonate on cell growth, lipid accumulation, and morphology of *Chlorella vulgaris*. *Microb. Cell Factories.* 2018, 17, 111.
71. Liu, K. Characterization of ash in algae and other materials by determination of wet acid indigestible ash and microscopic examination. *Algal Res.* 2017, 25, 307–321.
72. Maawa, W.N.; Mamat, R.; Najafi, G.; De Goey, L.P.H. Performance, Combustion, and Emission Characteristics of a CI Engine Fueled with Emulsified Diesel-Biodiesel Blends at Different Water Contents. *Fuel* 2020, 267, 117265.
73. Machado, A.; Pereira, H.; Costa, M.; Carvalho, B.; Soares, M.; Quelhas, P.; Silva, J.T.; Trovão, M.; Barros, A.; Varela, J. Development of an Organic Culture Medium for Autotrophic Production of *Chlorella vulgaris* Biomass. *Appl. Sci.* 2020, 10, 2156.
74. Mandley, S.J.; Daioglou, V.; Junginger, H.M.; van Vuuren, D.P.; Wicke, B. EU bioenergy development to 2050. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2020, 127.
75. Mariam, A.H.; Ghaly, A.; Amal, H. Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: critical review and comparative analysis. *J. Fundam. Renewable Energy Appl.* 2015, 5(2), 1–26.
76. Mat Aron, N.S.; Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Chen, W.H.; Nguyen, T.H.P. Sustainability of the four generations of biofuels—a review. *Int. J. Energy Res.* 2020, 44, 9266–9282.

77. Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2010, 14, 217–232.
78. Medina-Medrano, J.R.; Torres-Contreras, J.E.; Valiente-Banuet, J.I.; Mares-Quiñones, M.D.; Vázquez-Sánchez, M.; Álvarez-Bernal, D. Effect of the solid–liquid extraction solvent on the phenolic content and antioxidant activity of three species of *Stevia* leaves. *Sep. Sci. Technol.* 2019, 54, 2283–2293.
79. Min, M.; Wang, L.; Li, Y.; Mohr, M.J.; Hu, B.; Zhou, W.; Chen, P.; Ruan, R. Cultivating *Chlorella* sp. in a Pilot-Scale Photobioreactor Using Centrate Wastewater for Microalgae Biomass Production and Wastewater Nutrient Removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011, 165, 123–137.
80. Miyuranga, K.A.V.; Thilakarathne, D.; Arachchige, U.S.P.R.; Jayasinghe, R.A.; Weerasekara, N.A. Catalysts for Biodiesel Production: A Review. *Asian J. Chem.* 2021, 33, 1985–1999.
81. Mokashi, K.; Shetty, V.; George, S.; Sibi, G. Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*. *Achiev. Life Sci.* 2016, 10, 111–117.
82. Morais, M.G.; Vas, B.S.; Morais, E.G.; Costa, J.A.V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed. Res. Int.* 2015, 2015: 835761.
83. Morales, M.; Aflalo, C.; Bernard, O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass Bioenerg.* 2021, 150, 106108.
84. Moriana, R.; Vilaplana, F.; Ek, M. Forest Residues as Renewable Resources for Bio-Based Polymeric Materials and Bioenergy: Chemical Composition, Structure and Thermal Properties. *Cellulose* 2015, 22, 3409–3423.
85. Mostafa, S.S.M.; El-Gendy, N.S. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* biodiesel and its blends with Egyptian petro-diesel. *Arab. J. Chem.* 2017, 10, 2040–2050.
86. Murad, M.E.; Al-Dawody, M.F. Effect of microalgae biodiesel blending on diesel engine characteristics. *Heat Transf.* 2022, 51, 6616–6640.
87. Mutlu, Y.B.; Isik, O.; Uslu, L.; Koc, K.; Durmaz, Y. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyceae*). *Afr. J. Biotechnol.* 2011, 10, 453–456.

88. Neupane, D. Biofuels from Renewable Sources, a Potential Option for Biodiesel Production. *Bioeng.* 2023, 10, 29.
89. Palani, Y.; Devarajan, C.; Manickam, D.; Thanikodi, S. Performance and Emission Characteristics of Biodiesel-Blend in Diesel Engine: A Review. *Environ. Eng. Res.* 2022, 27, 200338.
90. Patrice Didion, Y.; Gijsbert Tjalsma, T.; Su, Z.; Malankowska, M.; Pinelo, M. What is next? the greener future of solid liquid extraction of biobased compounds: Novel techniques and solvents overpower traditional ones. *Sep. Purif. Technol.* 2023, 320, 124147.
91. Patyna, A.; Witczak, S. Przegląd fotobioreaktorów do produkcji biodiesla. *Chemik* 2016, 70(10), 634–643.
92. Paula, V.R.D.; Barbosa, J.A.; Romanelli, T.L.; Volpato, C.E.S.; Salvador, N. Curvas de desempenho motor de um trator agrícola utilizando diferentes proporções de biodiesel de soja. *Rev. Agrogeoambiental* 2016, 8, 119–127.
93. Pham, H.-M.; Kwak, H.S.; Hong, M.-E.; Lee, J.; Chang, W.S.; Sim, S.J. Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 2017, 239, 211–218.
94. Piligaev, A.V.; Sorokina, K.N.; Samoylova, Y.V.; Parmon, V.N. Production of Microalgal Biomass with High Lipid Content and Their Catalytic Processing Into Biodiesel: A Review. *Catal. Ind.* 2019, 11, 349–359.
95. Pimolrat, P.; Direkbusarakom, S.; Chinajariyawong, C.; Powtongsook, S. The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull.* 2010, 34, 40–47.
96. Pribyl, P.; Cepak, V.; Zachleder, V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 94, 549–561.
97. Procházková, G.; Brányiková, I.; Zachleder, V.; Brányik, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 2014, 26, 1359–1377.
98. Rai, M.P.; Gautam, T.; Sharma, N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *Int. J. Biol. Sci.* 2015, 15, 260–267.

99. Ramos-Bueno, R.P.; González-Fernández, M.J.; Sánchez-Muros-Lozano, M.J.; García-Barroso, F.; Guil-Guerrero, J.L. Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *Eur. Food Res. Technol.* 2016, 242, 1471–1477.
100. Rashid, N.; Rehman, S.U.; Han, J.I. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochem.* 2013, 48(7), 1107–1110.
101. Rendón, L.; Ramírez, M.; Vélez, Y. *Microalgas para la Industria Alimenticia*; Universidad Pontificia Bolivariana: Medellín, Colombia, 2015.
102. Reynolds, C.S. *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press; 2006.
103. Rokicka, M.; Zieliński, M.; Dębowski, M. Optymalizacja hodowli alg w kierunku zwiększenia efektywności konwersji CO₂ w biomasę - przegląd metod sekwestracji. Wydawnictwo UWM w Olsztynie, 2014, 688–698.
104. Roostaei, J.; Zhang, Y.; Gopalakrishnan, K.; Ochocki, A.J. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. *Sci. Rep.* 2018, 8, 12528.
105. Sakarika, M.; Kornaros, M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. *Biore-sour. Technol.* 2019, 273, 237–243.
106. Sampathkumar, S.J.; Gothandam, K.M. Sodium bicarbonate augmentation enhances lutein biosynthesis in green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2019, 22, 101406.
107. Serrano, L.; Carvalho, P.; Bastos, D.; Pires, N. Effects on Performance, Efficiency, Emissions, Cylinder Pressure, and Injection of a Common-Rail Diesel Engine When Using a Blend of 15% Biodiesel (B15) or 15% Hydrotreated Vegetable Oil (HVO15) (No. 2023-01-0266); SAE Technical Paper; SAE International: Warrendale, PA, USA, 2023.
108. Severo, I.A.; Siqueira, S.F.; Deprá, M.C.; Maroneze, M.M.; Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes, E.J.R.; Reviews, S.E. Biodiesel facilities: What can we address to make biorefineries commercially competitive? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2019, 112, 686–705.

109. Sharif, S.K.; Rao, B.N.; Jagadish, D. Comparative performance and emission studies of the CI engine with *Nodularia Spumigena* microalgae biodiesel versus different vegetable oil derived biodiesel. *Appl. Sci.* 2020, 2, 858.
110. Sharma, J.; Kumar, S.S.; Bishnoi, N.R.; Pugazhendhi, A. Enhancement of lipid production from algal biomass through various growth parameters. *J. Mol. Liq.* 2018, 269, 712–720.
111. Sharma, K.K.; Schuhmann, H.; Schenk, P.M. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* 2012, 5, 1532–1553.
112. Singh, P.; Kumari, S.; Guldhe, A.; Misra, R.; Rawat, I.; Bux, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2016, 55, 1–16.
113. Siqueira, W.C.; Fernandes, H.C.; Teixeira, M.M.; Santos, N.T.S.; Abrahão, S.A. Desempenho na barra de tração de um trator agrícola de pneus, alimentado com misturas de óleo diesel e óleo de soja reutilizado. *Rev. Ceres* 2013, 60, 793–801.
114. Şirin, S.; Trobajo, R.; Ibanez, C.; Salvadó, J. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *J. Appl. Phycol.* 2011, 24(5), 1067–1080.
115. Sirisansaneeyakul, S.; Singhasuwan, S.; Choorit, W.; Phoopat, N.; Garcia, J.L. Photoautotrophic production of lipids by some *Chlorella* strains. *Mar. Biotechnol.* 2011, 13, 928–941.
116. Sostaric, M.; Klinar, D.; Bricelj, M.; Golob, J.; Berovic, M.; Likozar, B. Growth, lipid extraction and thermal degradation of the microalga *Chlorella vulgaris*. *New Biotechnol.* 2012, 29, 325–331.
117. Suali, E.; Sarbatly, R. Conversion of microalgae to biofuel. *Renew. Sust. Ener. Rev.* 2012, 16, 4316–4342.
118. Sun, J.; Xiong, X.; Wang, M.; Du, H.; Li, J.; Zhou, D.; Zuo, J. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2019, 104, 296–306.
119. Surendhirian, D.; Vijay, M. Study on Flocculation Efficiency for Harvesting *Nannochloropsis oculata* for Biodiesel Production. *Int. J. Chemtech Res.* 2013, 4, 1761–1769.

120. Syahirah, N.; Aron, M.; Kuan, S.K.; Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Chen, W.-H.; Nguyen, T.H.P. Sustainability of the four generations of biofuels - A review. *Int. J. Energy Res.* 2020, 44, 9266–9282.
121. Tang, D.; Han, W.; Li, P.; Miao, X.; Zhong, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 3071–3076.
122. Teh, K.Y.; Loh, S.H.; Aziz, A.; Takahashi, K.; Effendy, A.W.M.; Cha, T.S. Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris*. *Sci. Rep.* 2021, 11, 438.
123. Tiron, O.; Bumbac, C.; Manea, E.; Stefanescu, M.; Lazar, M.N. Overcoming Microalgae Harvesting Barrier by Activated Algae Granules. *Sci Rep.* 2017, 7, 4646.
124. Tiwari, A.; Kiran, T.; Pandey, A. Chapter 14-Algal cultivation for biofuel production. In *Second and Third Generation of Feedstocks*; Basile, A., Dalena, F., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019, 383–403.
125. Tu, X.; Delgado-Calle, J.; Condon, K.W.; Maycas, M.; Zhang, H.; Carlesso, N.; Taketo, M.M.; Burr, D.B.; Plotkin, L.I.; Bellido, T. *Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, 112, 5.
126. Tüccar, G.; Aydın, K. Evaluation of methyl ester of microalgae oil as fuel in a diesel engine. *Fuel* 2013, 112, 203–207.
127. Udom, I.; Ram, M.K.; Stefanakos, E.K.; Hepp, A.F. Goswami, D.Y. One Dimensional-ZnO Nanostructures: Synthesis, Properties and Environmental Applications. *Mat. Sci. Semicon. Proc.* 2013, 16, 2070–2083.
128. Vardon, D.R.; Sharma, B.K.; Scott, J.; Yu, G.; Wang, Z.; Schideman, L.; Zhang, Y.; Strathmann, T.J. Chemical properties of biocrude oil from the hydrothermal liquefaction of *Spirulina* algae, swine manure, and digested anaerobic sludge. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 8295–8303.
129. Vassilev, S.V.; Vassileva, C.G.; Vassilev, V.S. Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. *Fuel* 2015, 158, 330–350.
130. Walkley, A.; Black, I.A. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 1934, 37, 29–37.

131. Xu, L.; Weathers, P.J.; Xiong, X.-R.; Liu, C.-Z. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.* 2009, 9, 178–189.
132. Yang, J.; Wen, C.; Duan, Y.; Deng, Q.; Peng, D.; Zhang, H.; Ma, H. The composition, extraction, analysis, bioactivities, bioavailability and applications in food system of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2021, 118, 252–260.
133. Yeh, K.L.; Chang, J.S.; Chen, W.M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.* 2010, 10, 201–208.
134. Zhang, X. Microalgae removal of CO₂ from flue gas; IEA Clean Coal Centre: London, UK, 2015.
135. Zhu, C.; Chen, S.; Ji, Y.; Schwaneberg, U.; Chi, Z. Progress toward a bicarbonate-based microalgae production system. *Trends Biotechnol.* 2022, 40(2), 180–193.
136. Zhu, L.D.; Li, Z.H.; Hiltunen, E. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Res. Int.* 2016, 8792548.
137. Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych, Dz.U. 2006 nr 169 poz. 1199 z późn. zm. (dostęp: 20.03.2025).
138. PN-EN ISO 11905-1:2001. Jakość wody – Oznaczanie azotu – Część 1: Metoda mineralizacji nadtlenu dwusiarczaniem. 2001. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
139. PN-86 C-05560/02, Woda i ścieki. Badania chlorofilu w wodach powierzchniowych, oznaczanie chlorofilu *a* w planktonowych algach metodą spektrofotometryczną monochromatyczną z poprawką na feopigmenty. Polski Komitet Normalizacyjny, Miary i Jakości. 1986. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
140. PN-EN ISO 18122:2016-01. Biopaliwa Stałe - Oznaczanie zawartości Popiołu. 2016. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
141. PN-EN ISO 12156-1:2004. Paliwa silnikowe – Ocena smarności przy użyciu urządzenia o wysokiej częstotliwości ruchu posuwisto-zwrotnego (HFRR) – Część 1. 2004. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
142. PN-EN ISO 3675:2018-03. Paliwa płynne - Oznaczanie gęstości - Metoda piknometryczna. 2018. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).

143. PN-EN 14214:2012. Paliwa odnawialne - Biodiesel - Wymagania jakościowe i metody badań. 2012. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
144. PN-ISO 15550:2009. Silniki spalinowe tłokowe - Określanie i metoda pomiaru mocy silnika - Wymagania ogólne. 2009. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
145. PN-ISO 3046-1:2009. Silniki spalinowe tłokowe - Własności eksploatacyjne - Część 1: Deklarowanie mocy, zużycia paliwa i oleju smarowego oraz metody badań - Dodatkowe wymagania dla silników ogólnego przeznaczenia. 2009. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
146. PN-ISO 3046-5:2009. Silniki spalinowe tłokowe - Własności eksploatacyjne - Część 5: Drgania skrętne. 2009. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
147. PN-ISO 8178-1:1999. Silniki spalinowe tłokowe - Pomiar emisji zanieczyszczeń gazowych i cząstek stałych - Część 1: Pomiar emisji składników gazowych i cząstek stałych na stanowisku badawczym. 1999. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
148. PN-ISO 8178-6:2000. Silniki spalinowe tłokowe - Pomiar emisji zanieczyszczeń - Część 6: Sprawozdanie z wyników pomiarów i badań. 2000. Polski Komitet Normalizacyjny. Warszawa, Polska (dostęp: 20.03.2025).
149. Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady UE 2018/2001 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych (wersja przekształcona). Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L 328, 82–209 (dostęp: 20.03.2025)
150. Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady UE 2023/2413 z dnia 31 października 2023 r. zmieniająca dyrektywę UE 2018/2001 w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych, dyrektywę 2010/31/UE oraz rozporządzenia UE 2018/841 i UE 2018/1999. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, L, 2023/2413 (dostęp: 20.03.2025)

**KOPIE ARTUKUŁÓW STANOWIĄCYCH JEDNOTEMATYCZNY
CYKL PUBLIKACJI**

Article

Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions

Patryk Ratowski  and Małgorzata Hawrot-Paw * 

Department of Renewable Energy Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland; patryk.ratowski@zut.edu.pl

* Correspondence: Malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl

Abstract: Biomass of microalgae and the components contained in their cells can be used for the production of heat, electricity, and biofuels. The aim of the presented study was to determine the optimal conditions that will be the most favorable for the production of large amounts of microalgae biomass intended for energy purposes. The study analyzed the effect of the type of lighting, the time of lighting culture, and the pH of the culture medium on the growth of *Chlorella vulgaris* biomass. The experiment was carried out in vertical tube photobioreactors in three photoperiods: 12/12, 18/6, and 24/0 h (light/dark). Two types of lighting were used in the work: high-pressure sodium light and light-emitting diode. The increase in biomass was determined by the gravimetric method, by the spectrophotometric method on the basis of chlorophyll a contained in the microalgae cells. The number of microalgae cells was also determined with the use of a hemocytometer. The optimal conditions for the production of biomass were recorded at a neutral pH, illuminating the cultures for 18 h a day. The obtained results were $546 \pm 7.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dry weight under sodium lighting and $543 \pm 1.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dry weight under light-emitting diode, with maximum biomass productivity of 27.08 ± 7.80 and $25.00 \pm 5.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. The maximum content of chlorophyll a in cells was determined in the 12/12 h cycle and pH 6 ($136 \pm 14.13 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) under light-emitting diode and 18/6 h, pH 7 ($135 \pm 6.17 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) under sodium light, with maximum productivity of $26.34 \pm 2.01 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (light-emitting diode) and $24.21 \pm 8.89 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ (sodium light). The largest number of microalgae cells (2.1×10^6) was obtained at pH 7 and photoperiod of 18/6 h under sodium light, and 12/12 h under light-emitting diode. Based on the results, it can be concluded that the determination of the optimal parameters for the growth and development of microalgae determines the production of their biomass, and such research should be carried out before starting the large-scale production process. In quantifying the biomass during cultivation, it is advantageous to use direct measurement methods.

Keywords: photobioreactor; microalgal biomass; algae cultivation conditions; optimization



Citation: Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3106. <https://doi.org/10.3390/app11073106>

Academic Editors: Birthe Vejby Nielsen and George Aggelis

Received: 23 January 2021

Accepted: 25 March 2021

Published: 31 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Microalgae are among the most widespread organisms. According to Guiry [1], it is estimated that there are up to 1 million species of algae on Earth. We meet them in the entire biosphere, but above all in fresh, salt, and saline waters. A characteristic feature of algae is the presence of chlorophyll [2,3], which enables photosynthesis to be carried out in each individual cell [4]. The efficiency of this process and the related biomass production is much higher compared to land plants [5].

Microalgae biomass has been widely used in various industries: pharmaceutical, food, animal feed, water purification, and biofuel production [6–8]. Under suitable conditions, microalgae convert solar energy into chemical energy of compounds accumulated in their cells, including not only in carbohydrates and proteins but also in lipids, which are used in the production of biodiesel [9,10]. The biomass yield and the biochemical composition of microalgae depend on environmental and physiological factors such as culture temperature, pH, lighting intensity and type, availability of nutrients, and carbon dioxide [11].

Lighting directly influences the growth of microalgae through photosynthesis. Algae cells, like most organisms, require not only access to light but also the dark phase, where photochemical processes occur and both ATP and NADPH are formed in algae cells [12]. Research on determining the optimal photoperiod in microalgae cultivation indicates that the efficiency of algal biomass production increases with the lengthening of the light to dark ratio [12,13]. When selecting the optimal light, the quality of the spectrum and the light intensity must be taken into account. The quality of the spectrum is defined by the absorption spectrum of chlorophyll and other components present in algae cells, which include phycobilins and carotenoids. The energy consumption of algae cells depends on the chemical conditions of the constitutive pigments [14]. The assimilation pigments have two main bands of blue-green light absorption with a wavelength of 450–475 nm and red light, 630–675 nm [15]. Lighting should be evenly distributed throughout the reactor allowing the photons to reach the cells. Excessive light intensity can lead to photooxidation and photoinhibition, while low light levels will reduce the growth of microalgae [16].

The pH of a culture medium not only affects the composition and lifetime of microalgae cells but also determines the availability of nutrients, the proper course of the photosynthesis process, and the uptake of carbon dioxide by cells [17]. The acidic conditions adversely affect the absorption of nutrients and disrupt the functioning of microalgae cells, while alkaline conditions reduce the ability to assimilate carbon dioxide. Research indicates that for most microalgae, the optimal pH range is between 6 and 10 [18]. Optimization of cultivation conditions is crucial for industrial productivity of microalgae. The objective aim of this work was to analyze some of the parameters important for algal biomass production and methods suitable for estimating *Chlorella vulgaris* growth. In this study, we hypothesized that optimization of basic culture conditions leads to higher biomass concentration in the photobioreactors.

2. Materials and Methods

2.1. Material

Chlorella vulgaris microalgae (BA 002) were used in this research. The material was obtained from Culture Collection of Baltic Algae (CCBA) (University of Gdansk, Gdańsk, Poland).

2.2. Experimental Setup

The experiment was carried out in vertical tubular photobioreactors (Aqua Medic, Bissendorf, Germany) with a capacity of 2.5 dm³ (Figure 1), supplemented with 2 dm³ of the F/2 culture medium [19] with the composition (g/L): NaNO₃—0.075 g; NaH₂PO₄·2H₂O —0.00565 g; stock solution of trace elements—1 mL/L (Na₂EDTA 4.16 g, FeCl₃ 6H₂O 3.15 g, CuSO₄ 5H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.022 g, CoCl₂ 6H₂O 0.01 g, MnCl₂ 4H₂O 0.18 g, and NaMoO₄ 2H₂O 0.18 g) and stock solution of vitamin mix—1 mL/L (cyanocobalamin (vitamin B12) 0.0005 g, thiamine HCl (vitamin B1) 0.1 g, biotin 0.0005 g). After sterilization of the medium with UV light, 200 cm³ of *C. vulgaris* microalgae inoculum was introduced into the photobioreactors.

In the study, we analyzed the effect of two types of lighting: high-pressure sodium light (HPS-Son-T-Agro, 400 watt, light intensity of 660 µmol·s⁻¹/56,000 lux; PHILIPS, Amsterdam, Netherlands) and light-emitting diode (LED light with white diodes, red diodes (wavelength 600–700 nm, light intensity of 9.45 µmol·s⁻¹) and blue diodes (wavelength 400–500 nm, light intensity of 2.25 µmol·s⁻¹). Total LED light intensity was 13.5 µmol·s⁻¹ (HOLDBOX, Zabia Wola, Poland). Three times of lighting culture were used: 12/12, 18/6, and 24/0 h in the light/dark cycle and four pH levels were used: 6, 7, 8, and 9.

Algae cells were kept suspended by mixing with gas using a 25 W pump (Aqua Medic, Bissendorf, Germany) with a capacity of 0.9 m⁻³·h⁻¹. At the same time, the aeration made it possible to introduce carbon dioxide into the culture. The experiment was carried out as a batch culture. To establish an adequately fast and accurate method for the quantification of microalgae biomass, three comparative methods were used: biomass dry

weight, measuring the content of chlorophyll a, and counting the number of cells using a hemocytometer.



Figure 1. Vertical tubular photobioreactors used in the research.

The dry weight of microalgae has been determined by the gravimetric method described by Ratha et al. [20] with modification. Biomass estimation was carried out using a moisture analyzer (AXIS ATS, Gdańsk, Poland). Aliquots of 40 cm³ were centrifuged (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 4000× *g* for 15 min. The biomass after centrifugation was transferred to aluminum plates, dried at 105 °C to constant weight, cooled, and weighed. The results were calculated and presented in mg·L⁻¹. The amount of biomass was determined on the day the culture was established and at 24-h intervals for the next 15 days. The biomass productivity was calculated by the following equation

$$BP = \frac{B_f - B_0}{d},$$

where BP is the biomass productivity (mg·L⁻¹·d⁻¹) *B_f* and *B₀* are final and initial biomass concentration (mg), respectively, and *d* is the cultivation time (day).

Chlorophyll concentration was determined according to the PN-86 C-05560/02 standard [21]. The pigment was extracted from biomass concentrated by filtration on a glass fiber filter using 90% (*v/v*) acetone. The absorbance of acetone extract was measured at wavelength of 665 nm, with a spectrophotometer (EMCO, Warszawa, Poland). The results are given in mg m⁻³. The chlorophyll productivity was calculated using following equation:

$$ChP = \frac{Ch_f - Ch_0}{d},$$

where ChP is chlorophyll productivity ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}^{-1}$), Ch_f and Ch_0 are final and initial content of chlorophyll (mg), respectively, and d is the cultivation time (day).

Microalgal cells were counted using Thoma hemacytometer [22]. Two chambers of the hemacytometer were filled up with culture samples. Cells were counted under a light microscope (Delta Optical Genetic Pro Bino, Warszawa, Poland). The average cell count was multiplied by 10,000 to calculate the number of cells per milliliter of the microalgal culture.

The chlorophyll concentration and cell counting analyzes were performed on the first day of the experiment and then after 5, 10, and 15 days.

2.3. Statistical Analysis

All determinations were performed in triplicate. The results were statistically analyzed using the statistical software package for Windows (Statistica version 13.3; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Two-way analysis of variance was used. The significance of differences between the means was assessed using post hoc Duncan test at statistical significance of $p \leq 0.05$. The standard deviation was also determined.

3. Results and Discussion

Various methods are used to assess the efficiency of biomass production. The most popular of them are the determination of dry matter [23], measurement of optical density, determination of chlorophyll content using a spectrophotometer, and a method based on counting cells using a counting chamber [24]. In the presented work, differences between the optimal process conditions determined with the use of individual methods were noted. Based on the statistical analysis of the test results, it was found that the photoperiod used, and the pH of the culture medium had a significant effect on the amount of biomass and the content of chlorophyll a in microalgae cells of the *C. vulgaris* species. However, the factors analyzed in the study did not have a significant effect on the number of microalgae cells.

The amount of biomass in individual photobioreactors at the beginning of the experiment was on average $417 \pm 14.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Under LED lighting conditions, the time of the culture entering the stationary growth phase occurred slightly earlier than under SON-T Agro lighting (Figure 2). Depending on other factors, it was generally between the 7th and 9th day of breeding. Similar dependencies in their research were presented by Kim et al. [25], who assessed the optimal conditions for the production of microalgae *Chlorella* sp., *Dunaliella salina*, and *Dunaliella* sp. biomass and found that the biomass content increased by the 8th measurement day. Similar results were obtained by Hawrot et al. [26] in a study on the production of *Chlorella minutissima* biomass using aquaculture wastewater. After 10 days, the breeding entered the stationary phase. The inhibition of the growth and development of microalgae between 8 and 10 days may be related to the depletion of nutrients in the culture medium [27].

In optimal culture conditions, higher biomass productivity was obtained on day 4 – $27.08 \pm 7.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ under SON-T Agro lighting and $25.00 \pm 5.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ under LED lighting (Figure 3). Similar results for *C. vulgaris* biomass productivity ($0.04 \pm 0.03 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were obtained by Machado et al. [28].

The average amount of biomass in the culture with SON-T Agro illumination ranged from 506 ± 6.74 to $546 \pm 7.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 4). The concentration of biomass in the culture depends on the initial inoculum density, but the amount of biomass obtained in the presented studies on the F/2 substrate was within the range of the results obtained by other authors. Matos et al. [29] in the modified BBM medium obtained $0.59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of biomass. Similar results were presented by Travieso et al. [30], who cultivated microalgae biomass in diluted nitrogen-rich waste and obtained a maximum of $510 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The highest amount was determined in a photobioreactor illuminated for 18 h and at pH 7. Similar results were obtained by Wahidin et al. [31], who investigated the effect of the irradiation cycle on the growth of biomass of *Nannochloropsis* sp. In addition, the highest values were recorded in 18/6 h cycle. In studies conducted by Amini et al. [32], the highest increase

in the biomass of microalgae *Chlorella vulgaris* was recorded in the 16/8 h (light/dark) photoperiod. Different results are presented by Atta et al. [33], who found in their research that the optimal culture conditions for the microalgae *C. vulgaris* occurred in the 12/12 h photoperiod (light/dark), while the lowest biomass increases with continuous lighting of the culture.

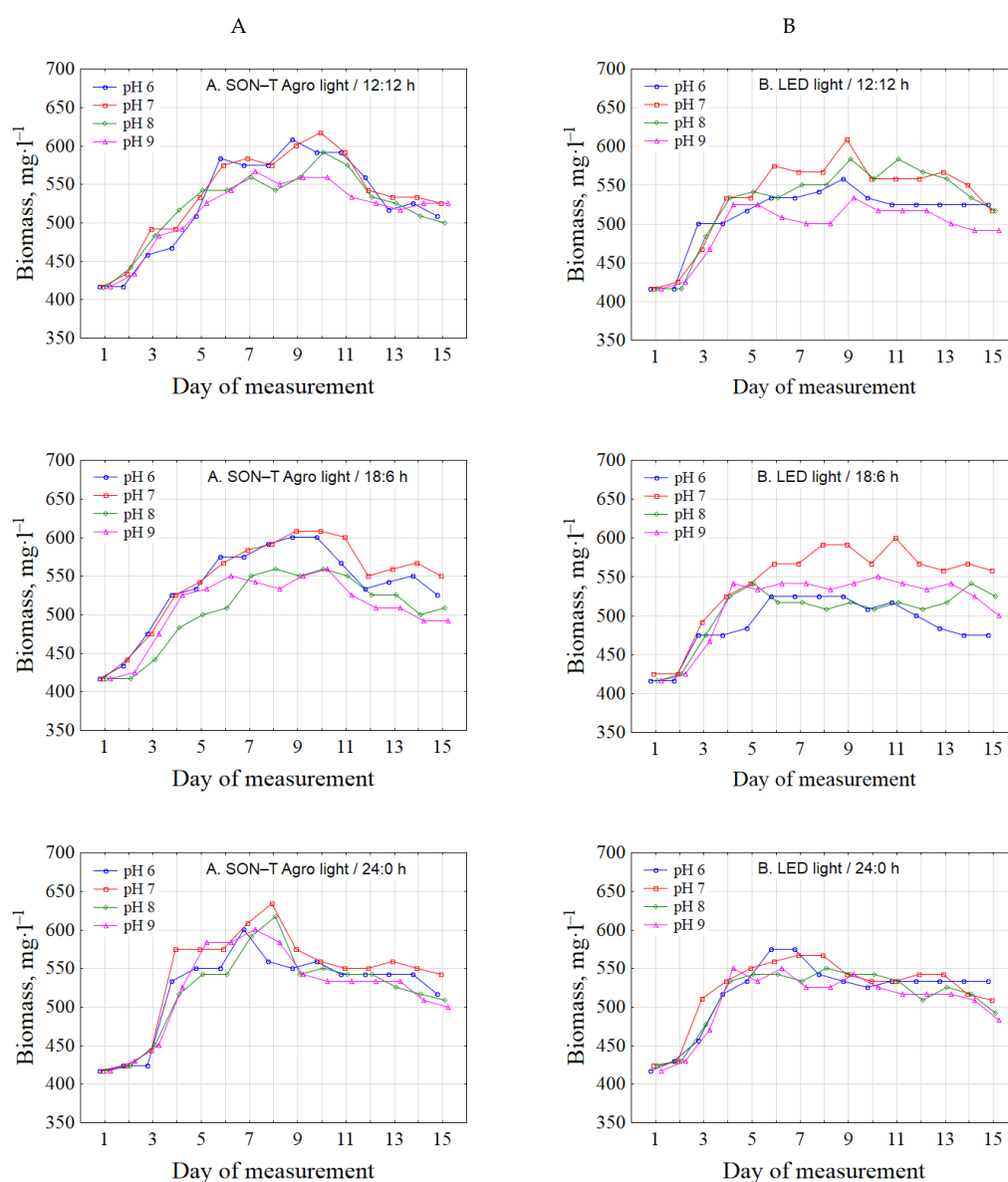


Figure 2. Dynamics of the growth of microalgae biomass in SON-T Agro light (A) and light-emitting diode (LED) light (B) during different light:dark cycle.

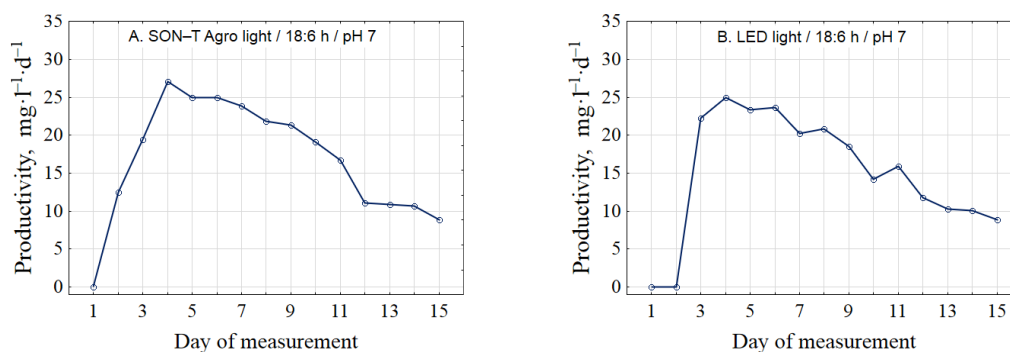


Figure 3. Biomass productivity under optimal culture conditions in SON-T Agro light (A) and LED light (B).

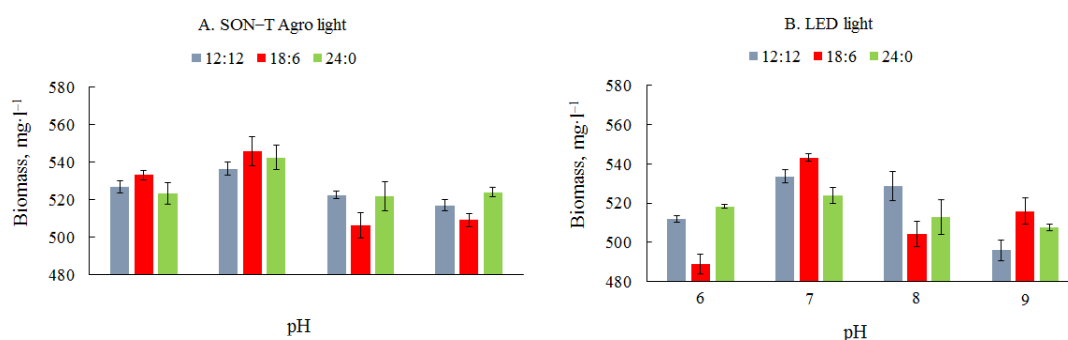


Figure 4. The average amount of microalgae biomass in SON-T Agro light (A) and LED light (B) during different light:dark cycle.

Under LED light conditions, the average amount of biomass ranged from 489 ± 5.00 to 543 ± 1.92 mg·L⁻¹. As in the case of sodium lighting, the highest values were recorded in the 18/6 h cycle and pH 7. The amount of biomass obtained in a culture medium with a neutral pH, regardless of the type of lighting and the time of lighting culture, was generally significantly different from the other values. Khalil et al. [34] investigated the effect of pH on the growth of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea* and found that although these microalgae could grow over a wide pH range from 4 to 9/10, the greatest dry matter gain for *D. bardawil* was at pH 7.5, and for *C. ellipsoidea*, at alkaline pH (9–10). In a study by Qiu et al. [35], the highest increase in *Chlorella sorokiniana* biomass was obtained at pH 6. These results indicate the need to conduct research on the optimization of biomass production conditions, which change significantly depending on the type of microalgae.

According to Gong et al. [36], it is very important to keep the pH constant during cultivation. Methods with control of optimal pH value increased the growth of microalgae by over 56%.

Chlorophyll content at the beginning of the experiment in all objects was 46 ± 6.17 mg·m⁻³ (Figure 5). In the photobioreactors illuminated by SON-T Agro light, the highest values were determined on the fifth day of the experiment and a significant decrease in the content of chlorophyll and in microalgae cells in subsequent dates. Similar relationships were presented by Lakaniemi et al. [37] who, while examining the growth of *C. vulgaris* in tubular photobioreactors, found that in the initial phase of growth, the content of chlorophyll increased, and then, after the 5th day of the experiment, the amount of assimilation pigment decreased almost to zero. Such a significant decrease in chlorophyll

content, according to these authors, was related to the reduction of nutrients in the culture medium. In the presented research, a similar situation was observed in the conditions of cultivating with LED light. A significant increase in the content of chlorophyll was observed already with the second measuring time. The highest content of assimilated pigment was determined in the photobioreactor at 18/6 h cycle and pH 7. Similar results were obtained by Eriksen et al. [38] while breeding *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* sp. in a gas-tight photobioreactor, and Perner-Nochta et al. [39] conducted a photoautotrophic culture of *C. vulgaris*. According to Lakaniemi et al. [37], determining the content of chlorophyll a is not a useful measure of biomass concentration due to the lack of correlation between the content of chlorophyll and the optical density of the culture. The content of chlorophyll a may also be misleading due to the differences in the size of the analyzed cells [40].

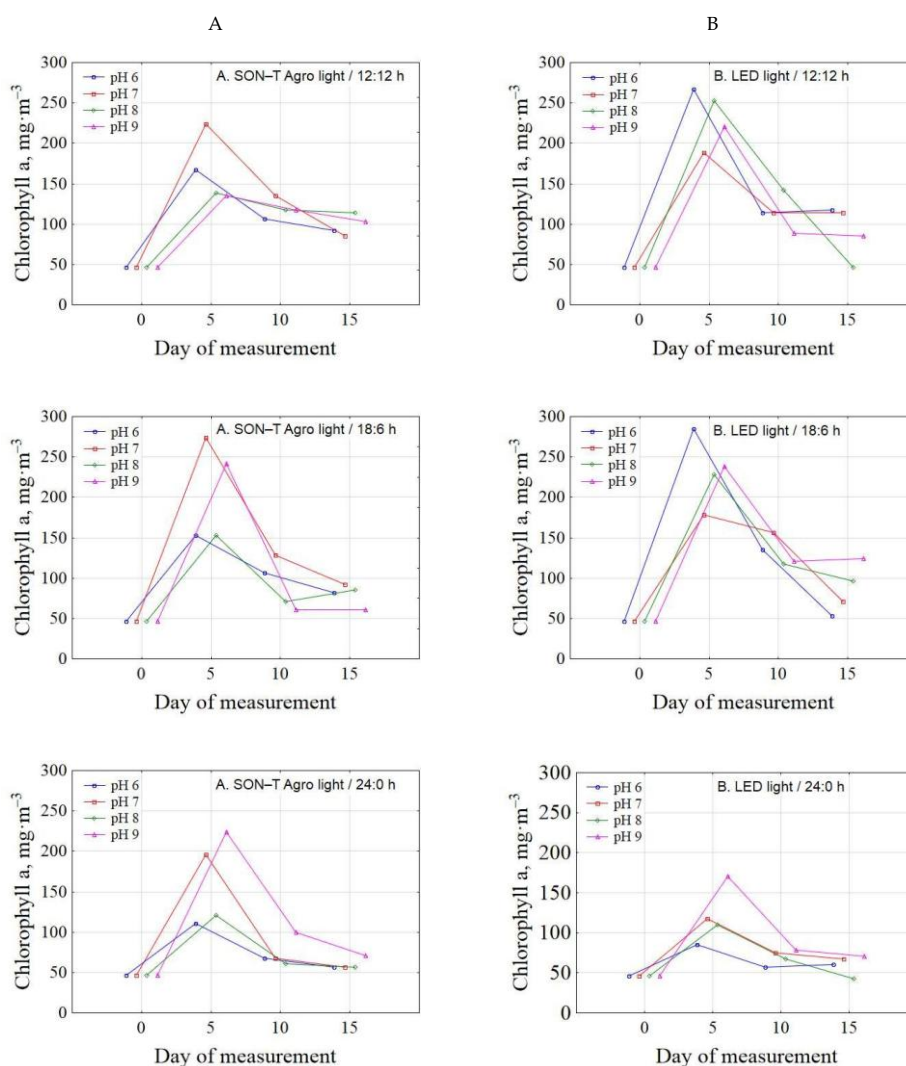


Figure 5. Dynamics of chlorophyll a content in microalgal in SON-T Agro light (A) and LED light (B) during different light:dark cycle.

The highest chlorophyll productivity was on day 5 (Figure 6). Content of microalgal chlorophyll in optimal condition was 24.21 ± 8.89 and $26.34 \pm 2.01 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, under HPS and LED lightening, respectively.

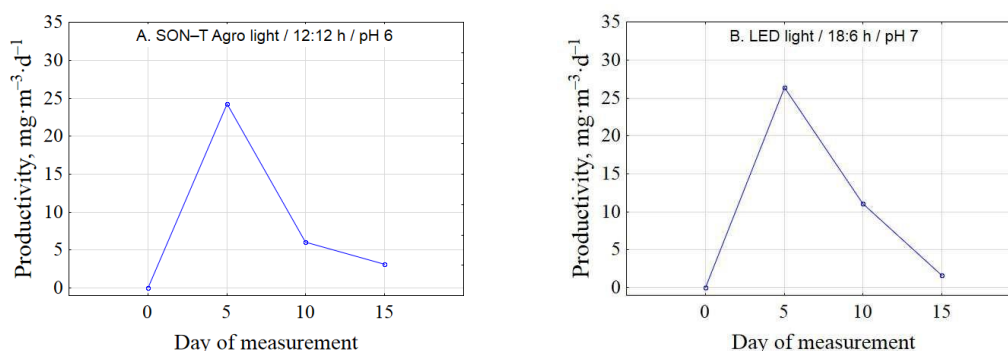


Figure 6. Chlorophyll productivity of *C. vulgaris* in SON-T Agro light (A) and LED light (B).

The mean content of chlorophyll a with SON-T Agro illumination ranged from 70 ± 10.11 to $135 \pm 6.17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 7). The highest content of assimilated pigment for this type of light was determined in a photobioreactor illuminated for 18 h and at pH 7. In the study by Khalil et al. [33], two strains of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea* at different pH variants showed that the neutral pH of the culture medium favored the accumulation of chlorophyll a and other assimilation pigments. The pH of the culture medium affects the entire process of microalgae cultivation. Unfavorable pH values influence the efficiency of nutrient absorption and metabolite production [41]. Additionally, pH conditions can cause calcium precipitation in some microalgae cultures [42]. Del Campo [43] found that the optimal pH for photosynthesis is generally lower than the requirements for growth and showed that pH values ranging from 6 to 9 stimulate carotogenesis for *Muriellopsis* sp. Under LED lighting, the mean amount of chlorophyll ranged from 62 ± 6.72 to $136 \pm 14.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Contrary to sodium lighting, the highest values were obtained at the photoperiod 12/12 and pH 6. No significant differences were found between the content of chlorophyll in microalgae cells at the highest values of chlorophyll a. The study of Yan et al. [44] on the effect of different wavelengths of LED light on the cultivation of *C. vulgaris* confirmed the effectiveness of this type of lighting in the production of biomass from algae; the use of red light has a positive effect on the content of chlorophyll a. Mohsenpour et al. [45] confirmed the dependence of red light on the increase in chlorophyll content and in *C. vulgaris* cells and the decrease in biomass content.

The initial number of microalgae cells in the culture was 9.3×10^5 (Figure 8). A significant increase in the number was recorded between the first and second measurement dates for SON-T Agro and LED light-illuminated photobioreactors. After this measurement date, the culture entered the stationary growth phase. With LED illumination at the end of the experiment in the two photoperiods, the culture had already reached the death phase. Many authors have shown a similar relationship. La et al. [46], examining the effect of glucose on the growth of *C. vulgaris*, showed that on the fifth day of the experiment, cell growth entered the stationary phase (20×10^6 of microalgal cells). The studies of Pagnanelli et al. [47] on the effect of the addition of nitrate and glucose to the culture medium on the growth of *C. vulgaris* and *Nannochloropsis oculata* cells showed, as in the presented work, a large increase in the initial phase of the experiment. The number of *C. vulgaris* cells ranged from 9.4×10^9 to 12×10^9 . This was due to the addition of nutrients to the medium, which stimulates the growth and development of microalgae [48]. On the other hand, studies by Glacio et al. [49], concerning the effect of nutrients on the growth of

C. vulgaris biomass, showed the growth of algae cells only up to the 8th day of measurement, after which the culture entered the death phase.

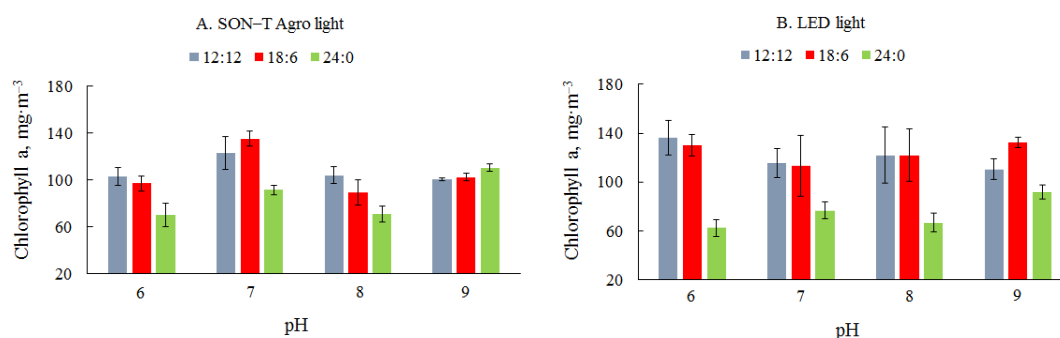


Figure 7. The average amount of chlorophyll a in microalgal biomass in (A) SON-T Agro light and (B) LED light during different light:dark cycle.

The mean values of the number of microalgae cells indicate that the time of lighting culture, and the pH had no significant effect on the obtained values (Figure 9). Under SON-T Agro lighting, the highest values were recorded at the 18/6 h photoperiod (19.3×10^5 – 20.8×10^5), and under LED lighting, the highest average number of microalgae cells was recorded at 12/12 h (18.9×10^5 – 20.8×10^5), however, as shown in Figure 5, they did not differ significantly from other lighting conditions. There was also no significant influence of medium pH on the analyzed parameters. On the other hand, the research by Vaiciulyte et al. [50] were carried out under constant lighting conditions and results showed significant differences in the number of *C. vulgaris* cells depending on cultivation conditions (batch growth or semi-continuous culture) and types of culture media. The analysis of the number of cells used to quantify the biomass does not define the stage of development of the culture and the size of the cells [51].

A positive correlation was found between the results of different methods of biomass determination in culture, however, a high R-factor was obtained mainly between the gravimetric measurement and the determination of the number of microalgae cells in the Thoma chamber, regardless of the type of lighting ($r = 0.76$ for sodium light and $r = 0.83$ for LED light). Based on the results of own research and the results of other authors [52], it can be concluded that the chlorophyll measurement method is not the best indicator of the estimation of biomass. Chlorophyll is a nitrogen-rich compound [53]. During cultivation, under N depletion in culture medium, chlorophyll is degraded to utilize nitrogen [54]. The chlorophyll content will decrease, while the amount of biomass may increase. The direct methods are more reliable. According to Rath et al. [20], such a method is a gravimetric measurement performed with a moisture analyzer, similarly to the presented work. This method is not only accurate but also much faster compared to the analyzes performed by traditional biomass drying in the oven.

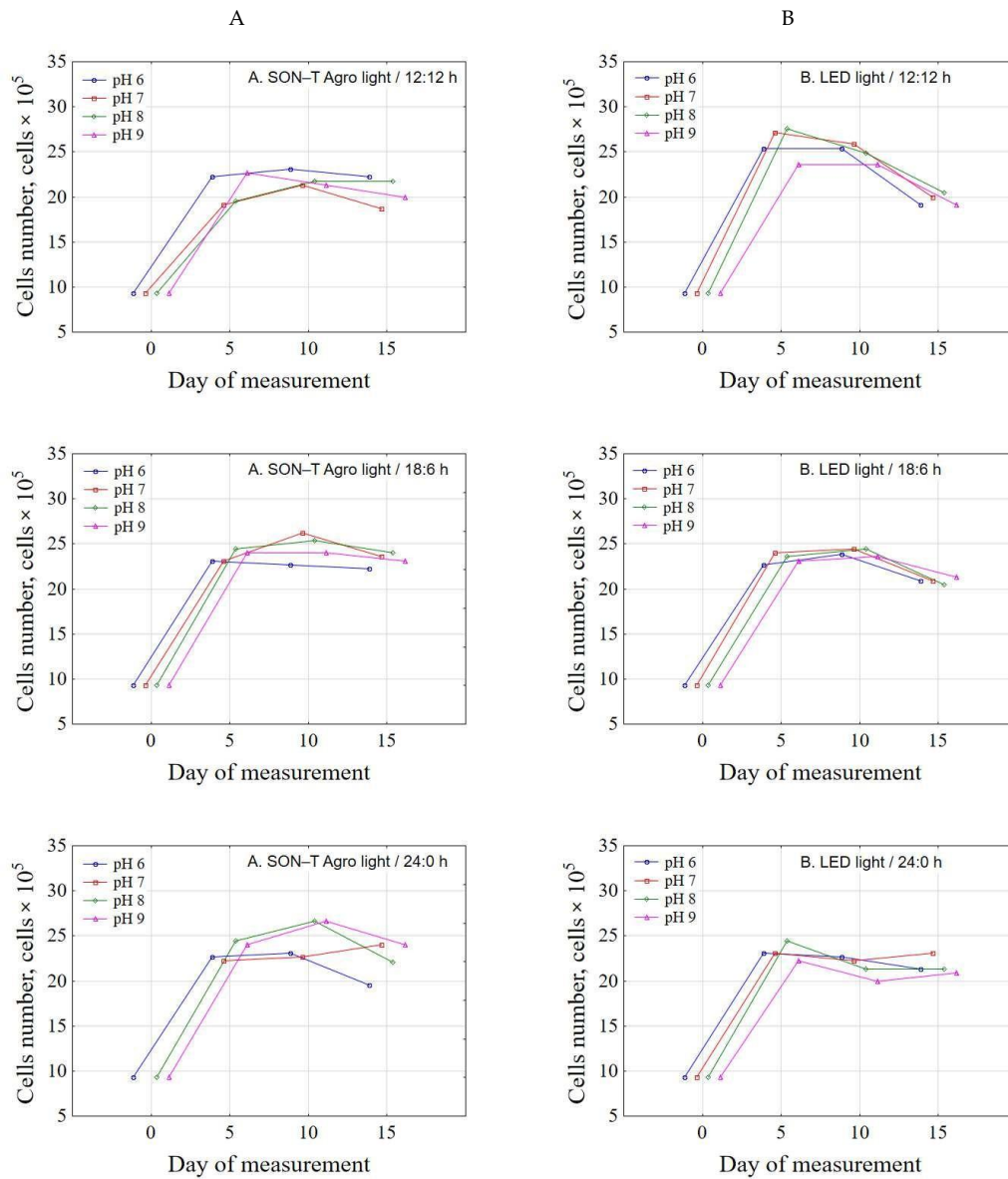


Figure 8. Dynamics of algae cell changes in culture in SON-T Agro light (A) and LED light (B) during different light:dark cycle.

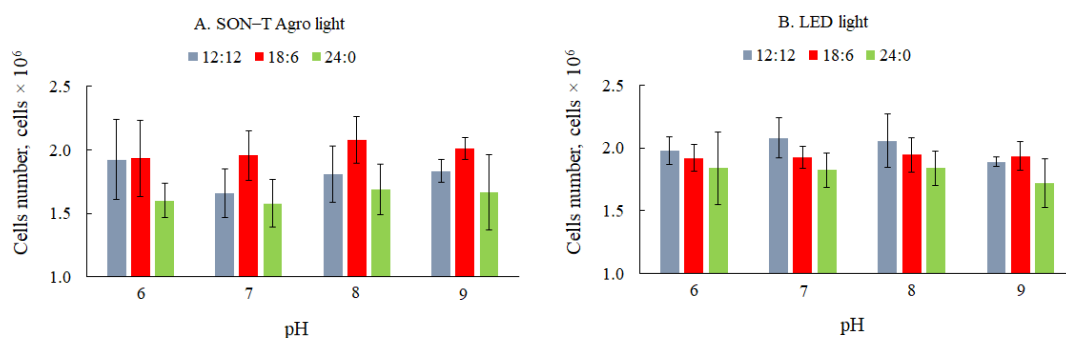


Figure 9. The average number of algae cells in culture in SON-T Agro light (A) and LED light (B) during different light:dark cycle.

4. Conclusions

The production of microalgae biomass requires the selection of optimal cultivation conditions. The most important parameters are the type and the time of lighting, which will also be important for the economy of the process. All factors used in the research had a significant impact on the amount of biomass. Depending on the method used (direct, indirect), different results were obtained. For dry mass measurement, the optimal culture conditions were recorded using 18/6 h light/dark cycle and pH of 7— $546 \pm 7.88 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for high-pressure sodium light and $543 \pm 1.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for light-emitting diode. The maximum content of chlorophyll a was determined in the 12/12 h light/dark cycle, pH 6, under light-emitting diode ($136 \pm 14.13 \text{ mg m}^{-3}$) and 18/6 h, pH 7, under sodium light ($135 \pm 6.17 \text{ mg m}^{-3}$). The biomass and chlorophyll productivity in optimal conditions under HPS and LED light was 27.08 ± 7.80 and $24.21 \pm 8.89 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$ and 25.00 ± 5.1 and $26.34 \pm 2.01 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. The highest number of microalgae cells (2.1×10^6) was obtained at pH 7 and photoperiod 18/6 h under sodium light, and 12/12 h under light-emitting diode. The results for all measurements suggest that particular methods can be used alternately during the determination of biomass content. However, if other indicators (cell number and chlorophyll a content) are used for biomass validation, the optimal culture parameters may change with different types of light. Considering the results, the most accurate method for biomass evaluation is gravimetric dry weight assessment > cell counting > chlorophyll content.

Author Contributions: Conceptualization, P.R. and M.H.-P.; methodology, M.H.-P.; validation, P.R. and M.H.-P.; formal analysis, P.R. and M.H.-P.; investigation, P.R.; writing—original draft preparation, P.R. and M.H.-P.; writing—review and editing, P.R. and M.H.-P.; visualization, P.R. and M.H.-P.; supervision, M.H.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

LED light light-emitting diode
HPS light high-pressure sodium light

References

- Guiry, M.D. How many species of algae are there? *J. Phycol.* **2012**, *48*, 1057–1063. [CrossRef]
- Singh, R.N.; Sharma, S. Development of suitable photobioreactor for algae production—A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2012**, *16*, 2347–2353. [CrossRef]
- Patyna, A.; Bilos, L.; Placzek, M.; Witczak, S. Productivity of microalgae *Chlorella vulgaris* in laboratory condition. *Inżynieria Ekol.* **2017**, *18*, 99–105. [CrossRef]
- Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 217–232. [CrossRef]
- Miao, X.; Wu, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 841–846. [CrossRef]
- Lorenz, R.T.; Cysewski, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalga as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* **2003**, *18*, 160–167. [CrossRef]
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96. [CrossRef]
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, C.Y.; Yeh, K.L.; Aisyah, R.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 17–81. [CrossRef] [PubMed]
- Mohsenpour, S.F.; Willoughby, N. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 147–153. [CrossRef] [PubMed]
- Chen, C.Y.; Zhao, X.Q.; Yen, H.W.; Ho, S.H.; Cheng, C.L.; Lee, D.J.; Bai, F.W.; Chang, J.S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *78*, 1–10. [CrossRef]
- Rai, M.P.; Gautam, T.; Sharma, N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, *15*, 260–267. [CrossRef]
- Meseck, S.L.; Alix, J.H.; Wikfors, G.H. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture* **2005**, *246*, 393–404. [CrossRef]
- Carvalho, A.P.; Silva, S.O.; Baptista, J.M.; Malcata, F.X. Light requirements in micro-algal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1275–1288. [CrossRef] [PubMed]
- Korbee, N.; Figueroa, F.; Aguilera, J. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Photochem. Photobiol.* **2005**, *80*, 71–78. [CrossRef]
- Loera-Quezada, M.M.; Angeles, G.; Olguín, E.J. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. *Rev. Latinoam. Biotechnol. Ambient. Algal* **2011**, *2*, 81–92.
- Juneja, A.; Ceballos, R.M.; Murthy, G.S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* **2013**, *6*, 4607–4638. [CrossRef]
- Rai, S.V.; Rajashekhar, M. Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of marine phytoplankton. *J. Algal Biomass Util.* **2014**, *5*, 55–59.
- Guillard, R.R.L.; Ryther, J.J. Studies of marine planktonic diatoms in *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229–239. [CrossRef]
- Ratha, S.K.; Rao, P.H.; Govindaswamy, K.; Jaswin, R.S.; Lakshmi Devi, R.; Bhaskar, S.; Chinnasamy, S. A rapid and reliable method for estimating microalgal biomass using a moisture analyser. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 1725–1734. [CrossRef]
- Polish Standards PN-86 C-05560/02. Water and Waste Water. Tests for Chlorophyll in Surface Water, Determination of Chlorophyll a in Planktonic Algae by Spectrophotometric Monochromatic Method with Correction for Pheopigments Alpha; 1986. Polish Committee for Standardisation. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-c-05560-02-1986p.html> (accessed on 9 November 2020). (In Polish).
- Dökümcüoğlu, V.E.; Yılmaz, M. Assessment of Cell Counting Method Based on Image Processing for a Microalga Culture. *Mediterr. Fish. Aquac. Res.* **2020**, *3*, 75–81.
- Yoo, C.; Jun, S.Y.; Lee, J.Y.; Ahn, C.Y.; Oh, H.M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 71–74. [CrossRef]
- Salim, S.; Bosma, R.; Vermuë, M.H.; Wijffels, R.H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phys.* **2011**, *23*, 849–855. [CrossRef] [PubMed]
- Kim, W.; Park, J.M.; Gim, G.H.; Jeong, S.H.; Kang, S.H.; Kang, C.M.; Kim, D.J.; Kim, S.W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 19–27. [CrossRef]
- Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M.; Zając, G.; Szyszlak-Bargłowicz, J. Production of Microalgal Biomass Using Aquaculture Wastewater as Growth Medium. *Water* **2019**, *12*, 106. [CrossRef]
- Sacristán de Alva, M.; Luna-Pabello, V.M.; Cadena, E.; Ortiz, E. Green microalgae *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 744–748. [CrossRef] [PubMed]
- Machado, A.; Pereira, H.; Costa, M.; Carvalho, B.; Soares, M.; Quelhas, P.; Silva, J.T.; Trovão, M.; Barros, A.; Varela, J.; et al. Development of an Organic Culture Medium for Autotrophic Production of *Chlorella vulgaris* Biomass. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 2156. [CrossRef]

29. Matos, Â.P.; Ferreira, W.B.; de Oliveira Torres, R.C.; Ito Morioka, L.R.; Machado Canella, M.H.; Rotta, J.; da Silva, T.; Siegel Moecke, E.H.; Sant'Anna, E.S. Optimization of biomass production of *Chlorella vulgaris* grown in desalination concentrate. *J. Appl. Phycol.* **2015**, *27*, 1473–1483. [\[CrossRef\]](#)
30. Travieso, L.; Benítez, F.; Sánchez, E.; Borja, R.; Martín, A.; Colmenarejo, M.F. Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecol. Eng.* **2006**, *28*, 158–165. [\[CrossRef\]](#)
31. Wahidin, S.; Idris, A.; Shaleh, S.R. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 7–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Amini, K.Z.; Seyfadi, J.; Ramezani, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquac. Int.* **2012**, *20*, 41–49. [\[CrossRef\]](#)
33. Atta, M.; Idris, A.; Bukhari, A.; Wahidin, S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 373–378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Khalil, Z.I.; Asker, M.M.; El-Sayed, S.; Kobbia, I.A. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1225–1231. [\[CrossRef\]](#)
35. Qiu, R.; Gao, S.; Lopez, P.A.; Ogden, K.L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res.* **2017**, *28*, 192–199. [\[CrossRef\]](#)
36. Gong, Q.; Feng, Y.; Kang, L.; Luo, M.; Yang, J. Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia* **2014**, *61*, 2012–2015. [\[CrossRef\]](#)
37. Lakaniemi, A.M.; Intihar, V.M.; Tuovinen, O.H.; Puhakka, J.A. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microb. Biotechnol.* **2011**, *5*, 69–78. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Eriksen, N.T.; Riisgård, F.K.; Gunther, W.S.; Iversen, J.J.L. On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 161–174. [\[CrossRef\]](#)
39. Perner-Nochta, I.; Lucumi, A.; Posten, C. Photoautotrophic cell tissue culture in a tubular photobioreactor. *Eng. Life Sci.* **2007**, *7*, 127–135. [\[CrossRef\]](#)
40. Griffiths, M.J.; Garcin, C.; van Hille, R.P.; Harrison, S.T. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* **2011**, *85*, 119–123. [\[CrossRef\]](#)
41. Morais, M.G.; Vas, B.S.; Morais, E.G.; Costa, J.A.V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 835761. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Sirisansaneeayakul, S.; Singhasuwan, S.; Choorit, W.; Phoopat, N.; Garcia, J.L. Photoautotrophic production of lipids by some *Chlorella* strains. *Mar. Biotechnol.* **2011**, *13*, 928–941. [\[CrossRef\]](#)
43. Del Campo, J.A.; Moreno, J.; Rodríguez, H.; Vargas, M.A.; Rivas, J.; Guerrero, M.G. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J. Biotechnol.* **2000**, *76*, 51–59. [\[CrossRef\]](#)
44. Yan, C.; Zhao, Y.; Zheng, Z.; Xingzhang, L. Effects of various LED light wavelengths and light intensity supply strategies on synthetic high-strength wastewater purification by *Chlorella vulgaris*. *Biodegradation* **2013**, *24*, 721–732. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Mohsenpour, S.F.; Richards, B.; Willoughby, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour. Technol.* **2012**, *125*, 75–81. [\[CrossRef\]](#)
46. La, A.; Perré, P.; Taidi, B. Process for symbiotic culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlorella vulgaris* for in situ CO₂ mitigation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 731–745. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Pagnanelli, F.; Altamari, P.; Trabucco, F.; Toro, L. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: Interaction between glucose and nitrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2014**, *89*, 652–661. [\[CrossRef\]](#)
48. Daliry, S.; Hallajisani, A.; Roshandeh, J.M.; Nouri, H.; Golzary, A. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *GJESM* **2017**, *3*, 217–230. [\[CrossRef\]](#)
49. Glácio, A.; Dilliani, L.; Clarice, S.; José Narciso, S.; André, A. Influence of nutrients on biomass and oil yield from microalgae *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Rev. Ciência Agronômica* **2020**, *51*, e20165285. [\[CrossRef\]](#)
50. Vaic̃iulyte, S.; Padovani, G.; Kostkevičienė, J.; Carozzi, P. Batch Growth of *Chlorella Vulgaris* CICALA 896 versus Semi-Continuous Regimen for Enhancing Oil-Rich Biomass Productivity. *Energies* **2014**, *7*, 3840–3857. [\[CrossRef\]](#)
51. Guillard, R.R.; Sieracki, M.S. Counting cells in cultures with the light microscope. In *Algal Culturing Techniques*; Andersen, R.A., Ed.; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2005; pp. 239–252.
52. Ramaraj, R.; Tsai, D.D.W.; Chen, P.H. Chlorophyll is not accurate measurement for algal biomass. *Chiang Mai J. Sci.* **2013**, *40*, 547–555. [\[CrossRef\]](#)
53. Li, Y.; Horsman, M.; Wang, B.; Wu, N.; Lan, C.Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 629–636. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Ördög, V.; Stirk, W.A.; Bálint, P.; Staden, J.; Lovász, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 907–914. [\[CrossRef\]](#)

Article

Influence of Nutrient-Stress Conditions on *Chlorella vulgaris* Biomass Production and Lipid Content

Patryk Ratowski  and Małgorzata Hawrot-Paw * 

Department of Renewable Energy Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland; patryk.ratowski@zut.edu.pl

* Correspondence: malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl

Abstract: Microalgal biomass and its cellular components are used as substrates for the production of fuels. A valuable group among the components of microalgal biomass is lipids, which act as a precursor for the production of biodiesel in the transesterification process. Some methods, including the creation of stressful conditions, are applied to increase the accumulation of lipids. This study aimed to determine the effect of limited nutrient access on the growth and development of the microalga *Chlorella vulgaris* and the amount of lipids stored in its cells. Aquaculture wastewater (AWW) was used in the study as a source of nutrients at doses of 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. The amount of microalgal biomass, optical density, lipid content after extraction of the biomass in Soxhlet apparatus and chlorophyll a content were determined. It was observed that the microalgae efficiently used the nutrients contained in the AWW. The largest amount of biomass was obtained in AWW₈₀ ($727 \pm 19.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The OD₆₈₀ (0.492 ± 0.00) determined under the same conditions was almost five times higher in AWW than in the synthetic medium. Under nutrient-stress conditions, the content of lipids in biomass ranged from 5.75% (AWW₈₀) to 11.81% (AWW₂₀). The highest content of chlorophyll a in microalgal cells was obtained in AWW₂₀ ($206 \pm 11.33 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$).

Keywords: nutrient limitation; stress conditions; microalgal biomass; lipid content; aquaculture wastewater



Citation: Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M. Influence of Nutrient-Stress Conditions on *Chlorella vulgaris* Biomass Production and Lipid Content. *Catalysts* **2021**, *11*, 573. <https://doi.org/10.3390/catal11050573>

Academic Editors:
Consuelo Alvarez-Galvan and Jose M. Campos-Martin

Received: 30 March 2021
Accepted: 28 April 2021
Published: 29 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The use of conventional energy sources leads to a number of problems including global warming, environmental degradation and energy crises [1]. Due to these threats, there is an urgent need to develop sustainable and novel environmentally friendly energy sources. Microalgae seem to be an ideal raw material for the production of biofuels. Compared to the biomass of terrestrial plants used for energy purposes, microalgal biomass is characterized by a lower water footprint, higher photosynthetic efficiency, the ability to grow on marginal soils and the possibility of using waste streams, including carbon dioxide, as a source of nutrients for cell growth and development [2]. Moreover, a lack of competition with edible plants for the cultivation area means improved food safety [3].

Despite many advantages, the use of microalgae for energy purposes is associated with several limitations, including economic competitiveness and the feasibility of large-scale biofuel production, as well as high investment costs which constitute a significant barrier to potential investment [4,5]. Therefore, it is necessary to improve the production of biofuels from algae and increase economic profitability. This can be achieved by developing an appropriate technology through the optimization of growing conditions [6], taking into account the nutrient availability, temperature changes, salinity, supplementation with plant hormones and differentiation of light intensity [7–9].

Under optimal conditions of cultivation, microalgae show high biomass growth but do not accumulate a large amount of reserve materials [10,11] such as carbohydrates or lipids which are useful for biofuel production [12]. The typical abiotic stress factors that significantly affect the biochemical composition of algal cells include lipid production, extreme temperatures, lighting, the amount of carbon dioxide, UV exposure, salt content and

nutrient starvation [13–18]. An unfavorable culture condition may change the metabolism of fatty acids toward the biosynthesis and accumulation of triacylglycerols, which may constitute up to 80% of the total lipid content in the cell. The main factor that influences fatty acid metabolism is the limitation of nitrogen availability [19]. Under limited nitrogen access, many microalgal species produce and accumulate a large amounts of lipids [20–22]. However, the lack of nitrogen, which is responsible for increasing the content of proteins and assimilation pigments in cells, causes a reduction in the productivity of biomass. The chlorophyll content in microalgal cells is an indicator of the intensity of photosynthesis and photochemical processes during which the energy accumulated in ATP is generated [23]. Thus, an important element in the development of a technology for biofuel production using microalgae is determining the appropriate doses of nutrients, which would enable achieving a high production of lipids as well as a high efficiency of biomass growth [24]. Additionally, it is necessary to ensure optimal culture conditions, including temperature, pH, mixing [25,26] and lighting, which should be evenly distributed to allow the photons to reach the entire volume of the photobioreactor [27].

The supply of nutrients for the production of microalgae biomass [28] can be associated with the purification of the aquatic environment [29] and the removal of nutrients, including nitrogen and phosphorus, which cause water eutrophication [30]. Microalgae can be potentially used in the treatment of municipal industrial wastewaters, agricultural wastewaters and post-cultivation waters. Moreover, the use of microalgae in disposal processes has been economically justified [31].

This study assessed the growth and development of the microalga *Chlorella vulgaris* in saline aquaculture wastewater (AWW) used in different doses. It was hypothesized that diluting the wastewater and thus limiting the nitrogen content in the culture medium would have a positive effect on increasing the content of lipids in microalgal cells. Additionally, the content of chlorophyll a was determined in the microalgal biomass.

2. Results and Discussion

2.1. Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Aquaculture Wastewater

The biomass of *C. vulgaris* can serve as a source of valuable chemical components, and as an additive to animal feed and human food. Its production can also be utilized for the treatment of wastewaters [32]. Statistical analysis of the results obtained in this study showed that the AWW doses had a significant effect on biomass production, and also that the amount of biomass produced in the AWW was greater compared to that produced in the F/2 synthetic medium (Figure 1A). This is in line with results of other authors confirming the relationship between the content of nutrients in wastewater and the increase in microalgal biomass [33,34].

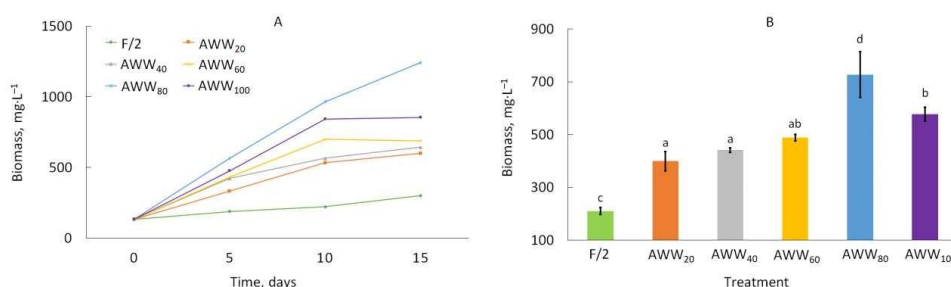


Figure 1. Dynamics of changes in biomass content (A) and the average biomass in culture (B).

The content of microalgal biomass is one of the most important parameters for evaluating the growth of microalgae. From the biomass content, it is possible to determine

the time required to reach the maximum concentration of biomass as well as the growth phase [35]. At the beginning of the experiment, the biomass content was $133 \pm 9.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. In the following days, a linear growth with no growth inhibition phase was observed, which indicates that *C. vulgaris* can adapt and grow well in saline effluent from fish farming. Similar results were obtained in a study by Liu et al. [36], in which *C. vulgaris* was cultivated in AWW from a fishery and an increase in biomass was observed from the first days of measurement. In the present study, the largest amount of biomass after 15 days was determined in AWW₈₀ ($1244 \pm 62.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), which indicates an increase of over 300% compared to the control treatment (F/2). Similar positive results of microalgal cultivation and *C. vulgaris* biomass growth in pre-treated, nutrient-rich municipal sewage were also presented by Li et al. [37].

The average amount of biomass in this study ranged from $211 \pm 10.39 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (F/2) to $727 \pm 19.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (AWW₈₀), which is 345% of the values determined in the control treatment (Figure 1B). Hawrot-Paw et al. [38] cultivated *Monoraphidium* and achieved a significantly higher biomass content in AWW compared to the synthetic substrate F/2. Fernández-Linares et al. [39] cultivated *C. vulgaris* in pre-treated municipal sewage and obtained an amount of biomass of $1575 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Such a high biomass content was achieved due to the ability of the strain to adapt to the cultivation conditions (*C. vulgaris* strain was isolated from the environment of treated municipal wastewater). However, Guldhe et al. [40] presented different results on the use of AWW for the cultivation of *Chlorella minutissima*. The authors observed lower biomass productivity in AWW ($0.35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) than in synthetic BG11 medium ($0.57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Mtaki et al. [41] added NPK fertilizer to AWW at a maximum dose of $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, which resulted in a significantly increased amount of *C. vulgaris* biomass compared to that obtained in synthetic bold basal medium (BBM).

The optical density of microalgal culture varied with the AWW dose (Figure 2A). Tossavainen et al. [42] and Hawrot-Paw et al. [38] observed a decrease in the content of microalgal biomass along with a decrease in nutrient contents in the culture medium. In the present study, the optical density, with the exception of AWW₆₀, increased throughout the experiment. The mean optical density ranged from 0.246 ± 0.00 in AWW₂₀ to 0.492 ± 0.00 in AWW₆₀ (Figure 2B). The correlation coefficient between the OD₆₈₀ values and the amount of biomass was $r = 0.941$, which indicates a strong positive linear relationship.

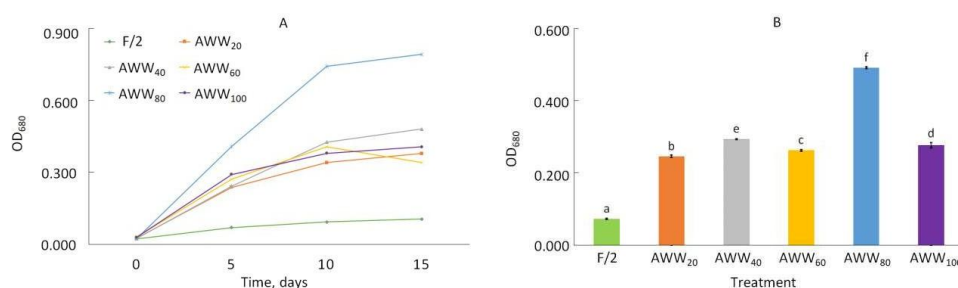


Figure 2. The dynamics of changes in optical density (A) and the average optical density in culture (B).

2.1. Effect of Nitrogen Content on the Biomass and Lipid Content

2.1.1. Production of Biomass under Nutrient-Stress Condition

Culture medium is one of the key factors influencing the production of microalgal biomass [43]. In industrial-scale production, the supply of an appropriate amount of nutrients constitutes an economic problem [44]. Therefore, the present study analyzed the possibility of using AWW rich in basic nutrients for biomass production and the impact of limiting the access to nutrients by AWW. It was observed that there was no phase delay in growth (Figure 3A), which clearly indicated that the strain adapted well to growth

under conditions of limited nutrient access and salinity. In the initial phase of growth, on the fifth day of the experiment, the largest amount of biomass was recorded in AWW₈₀ ($878 \pm 15.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). This could be related to the method of inoculum preparation and the lack of the need to adapt to cultivation conditions. Similar results were obtained by Gao et al. [33] for the cultivation of *C. vulgaris* in photobioreactors using AWW in a batch culture. They obtained the maximum amount of biomass on the sixth day of the experiment ($0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Tang et al. [45] reported that inhibition of microalgal growth could be related to a low content of nitrogen in the medium, which was fully taken up by algal cells in the initial growth phase. In the presented study, the start of the stationary growth phase, except in the case of AWW₈₀, was observed after 10 days of cultivation. This could be related to the higher content of nutrients and their accumulation in algal cells. Algae can absorb excess nutrients and use them for growth in the later stages of cultivation [46]. In this study, the largest amount of biomass ($1045 \pm 31.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was determined in AWW₆₀. The efficiency of microalgal biomass production is influenced by the presence of nitrogen [47]. The average amount of biomass ranged from $748 \pm 0.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (AWW₂₀) to $842 \pm 25.76 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (AWW₆₀) (Figure 3B). Ansari et al. [47] cultivated *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus falcatus* in two media—BG11 and AWW—with lower nutrient content and observed a small amount of biomass in AWW. A similar dependence for *C. minutissima* was presented by Sánchez-García et al. [48], who found that a higher nitrogen dose in synthetic culture medium (BBM) caused an increase in biomass productivity. A higher content of microalgal biomass compared to the present study was observed by Tossavainen et al. [42]. The authors used pike perch AWW with a nitrogen content of $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for the cultivation of *Euglena gracilis* and *Selenastrum* and obtained a maximum amount of algal biomass ($1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). This suggests that the biomass content may depend on the type of microalga, culture conditions, culture medium used and nutrient availability [49,50].

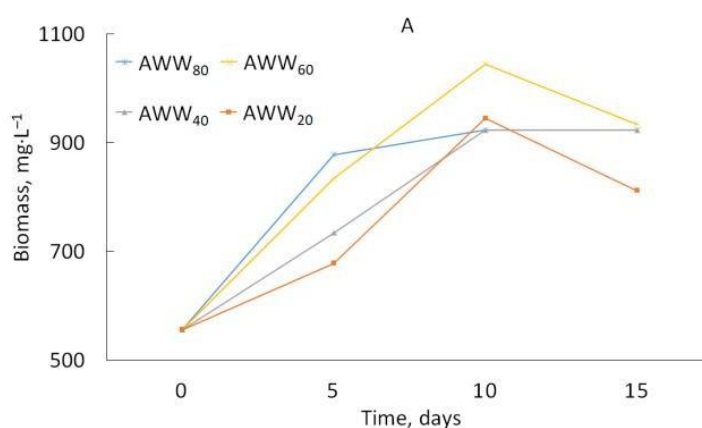


Figure 3. Cont.

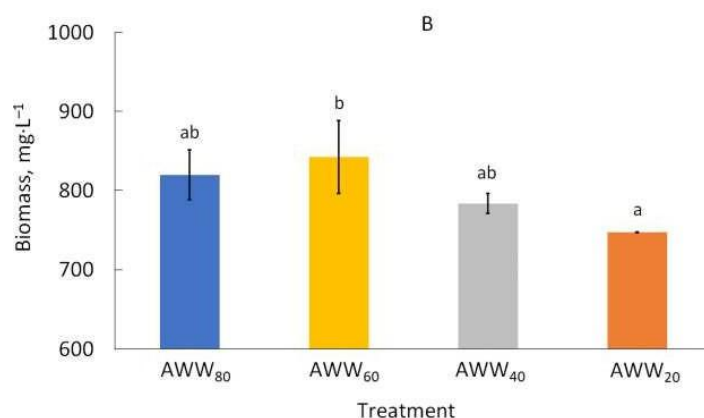


Figure 3. Dynamics of the growth of microalgal biomass (A) and the average amount of microalgal biomass (B).

2.1.1. Optical Density of Microalgal Cultures

In the present study, it was observed that the amount of biomass correlated with the optical density ($r = 0.841$). The largest amount was obtained on the 15th day in AWW₆₀ (0.333 ± 0.01), which is over 550% higher compared to the first day of measurement (Figure 4A). The average optical density ranged from 0.140 ± 0.00 (AWW₄₀) to 0.201 ± 0.00 (AWW₆₀) (Figure 4B). Similar values of optical density (OD 0.304) were obtained by Hawrot-Paw et al. [34] during the cultivation of *C. minutissima* in the same type of salted AWW. This may be a result of different nutritional requirements of microalgae [51,52]. The increase in optical density with higher doses of AWW indicates that the high content of nutrients in the medium promotes the growth and development of algal cells. This was also confirmed by Bhatnagar et al. [53] when they cultivated microalgae in an organic enriched medium. Mtaki et al. [41] cultivated *C. vulgaris* and determined a much higher optical density value (OD 4.872), but in their study, AWW was supplemented with NPK.

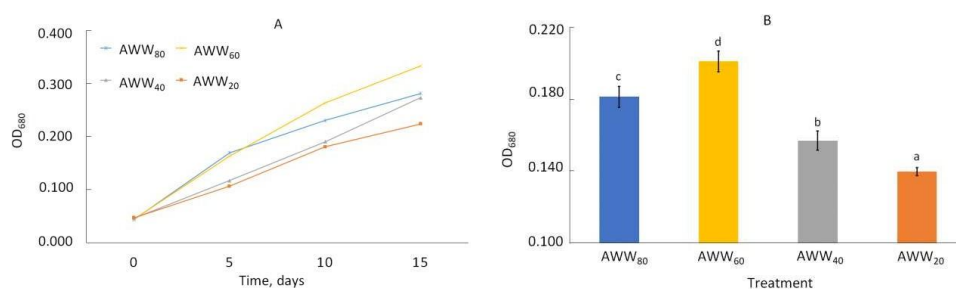


Figure 4. The dynamics of changes in optical density (A) and the average values of OD₆₈₀ in culture (B).

2.1.2. Lipid Accumulation under Nitrogen Limitation

The mean lipid content of *C. vulgaris* strains ranges from 14 to 22% [54,55], however, depending on the environment, it may vary from 5% to 58% [56]. In this study, the lipid content in biomass ranged from 5.75% (AWW₈₀) to 11.81% (AWW₂₀) (Figure 5). The effect on lipid accumulation in microalgal cells depends on the microalga species as well as the composition of the culture medium [57]. Wong et al. [58] analyzed the effect

of the composition of 13 different culture media on the growth of *C. vulgaris* and lipid production. The authors observed that the maximum values for both these parameters were obtained with BBM. Synthetic culture media are expensive and can be replaced by AWW [41], which is not only cost-effective but also environmentally sustainable. The two-fold increase in lipid content achieved in the present study was associated with nutrient stress caused by dilution of AWW. The nitrogen content in the culture medium ranged from $6.67 \pm 0.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (AWW₂₀) to $24.73 \pm 1.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (AWW₈₀). Under nitrogen-deficient conditions, the cellular metabolism of algae changes, resulting in the accumulation of lipids and starch in the biomass [59]. In a study by Pribyl et al. [60], the lipid productivity by *C. vulgaris* was higher at lower nitrate concentrations. Similar results were presented by Mutlu et al. [61] and Adenan et al. [62]. The authors noted that, under the nutritional stress caused by nitrogen limitation, lipid production significantly increased in *C. vulgaris* cells. The relationship between the increase in lipid content and nitrogen limitation was also reported by Ansari et al. [47]. The authors cultivated *S. obliquus*, *C. sorokiniana* and *A. falcatus* in aquaculture effluent with lower nitrogen content compared to the synthetic substrate and recorded increased lipid content for all algal species.

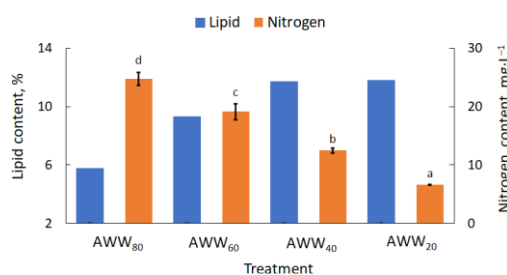


Figure 5. Nitrogen content in AWW and lipid content in microalgal biomass.

The results of this study thus showed a relationship between the nitrogen dose and lipid content in the microalgal biomass. With nitrogen deficiency, the metabolic pathway of carbon fixation changes from protein synthesis to lipid production [63]. It was found that the lower the initial content of nitrogen in the culture medium, the greater the amount of lipids in the biomass. The low lipid content observed in AWW₈₀ could be caused by the intense growth of microalgae. A distinct stationary growth phase was not noted in the study, although it is in this phase that microalgae form lipids as an energy reserve [64]. This has been confirmed by other authors [65,66] for both marine and freshwater strains. A much higher lipid accumulation was determined by Rai et al. [67] during the cultivation of *C. vulgaris* in saline medium. While maintaining the nitrogen content at a level of $<5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, these authors recorded a lipid content of 40%. An additional factor stimulating lipid accumulation in microalgal cells may be the salinity level. This was supported by the results of Mirzadeh et al. [68], who analyzed the effect of introducing NaCl into the culture medium at doses ranging from 5 to $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The authors found an increase in lipid content in the biomass of *C. vulgaris* with increasing concentration of NaCl up to $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (about 1.5-fold higher than without salt). In the study by Hawrot-Paw et al. [34], the lipid content in the biomass of *C. minutissima* cultured on saline salmon AWW decreased while the biomass content increased compared to the synthetic F/2 medium. The differences between the nutrient content of the medium and the amount of lipids in the cells are related to the type of microalga. The division of stress into three categories, from low to high, is conceptually adopted, where the increase in lipids exceeds the decrease in biomass content, the decrease in growth exceeds the increase in lipids, and the increase in lipid content is compensated by the decrease in growth [11].

2.1.1. Changes in PH during Microalga Cultivation

The pH of the culture medium affects the proper cell development, availability of nutrients and ability of algal cells to carry out photosynthesis [69]. In the present study, *C. vulgaris* was cultivated under uncontrolled pH conditions. At the start of the experiment, the pH of the medium ranged from 8.3 (AWW₈₀) to 8.5 (AWW₂₀) (Figure 6). After five days of cultivation, an increase to a value of 9 was recorded, which was related to CO₂ fixation [70] or the passage of air through the microalgal cultures and dissipation of carbon dioxide by agitation [71]. After 15 days, the pH of the medium was in the range of 8.6–8.9. This is considered as the optimal range for algae, which is also supported by Rai and Rajashekhar [67], who indicated that the optimal pH for algae ranges from 6 to 10. Scherholz and Curtis [72] described that the pH of the culture medium may be related to the influence of ammonium on the transport and reduction of nitrates.

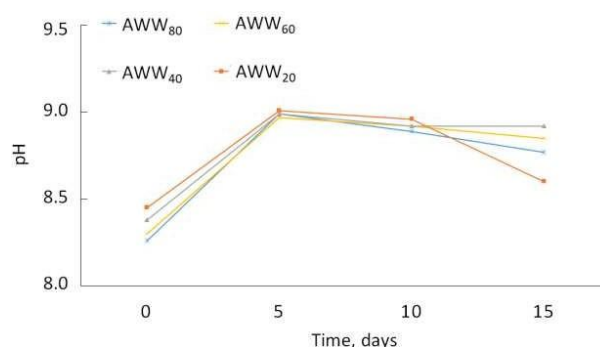


Figure 6. The dynamics of pH changes in culture medium.

2.1.2. Chlorophyll A Content in Microalgal Biomass

The initial content of chlorophyll a in microalgal cells was determined to be $50 \pm 5.03 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ (Figure 7A). The highest content of pigment ($328 \pm 21.95 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$) was observed in AWW₂₀ after 10 days of cultivation. Depending on the dose of AWW, the mean chlorophyll a content ranged from $160 \pm 17.84 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ (AWW₈₀) to $206 \pm 11.33 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ (AWW₂₀) (Figure 7B). The content of chlorophyll a in microalgal cells decreased with an increase in the amount of nitrogen in the medium. Contrasting results were reported by Ördög et al. [73] in their study on *Chlorella minutissima*, in which the content of chlorophyll increased after the addition of nitrogen. Similarly, Li et al. [74] observed a decrease in chlorophyll content in *Neochloris oleoabundans* cells cultivated in medium with lower nitrogen content and suggested that this may be related to the utilization of nitrogen compounds in chlorophyll by microalgae. The availability of nutrients affects the concentration of chlorophyll in microalgal cells, but it varies depending on the species [75]. The increase in pigment content in diluted AWW could be due to a higher intensity of photosynthesis caused by better light penetration into cells with lower biomass. The relationship between the increase in biomass and the decrease in chlorophyll in *C. vulgaris* cells was also presented by Mohsenpour et al. [76].

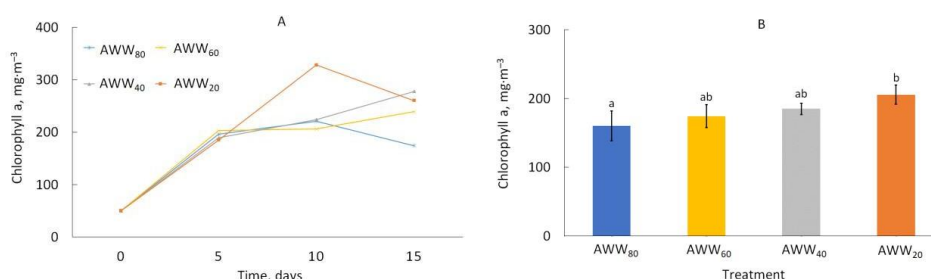


Figure 7. The dynamics of changes in the amount of chlorophyll a (A) and the average values of chlorophyll in culture (B).

3. Materials and Methods

3.1. Microalgal Culture

Green algae (*C. vulgaris* (BA 002)) were obtained from the Culture Collection of Baltic Algae (University of Gdansk, Gdańsk, Poland). The microalgae were cultured in Guillard's (F/2) Marine Enrichment liquid medium [77] at a temperature of 4 °C under lighting with a light-emitting diode (LED; 12/12 h light:dark cycle). The liquid medium had the following composition (g·L⁻¹): NaNO₃—0.075 g; NaH₂PO₄·2H₂O—0.00565 g; stock solution of trace elements—1 mL·L⁻¹ (Na₂EDTA 4.16 g, FeCl₃ 6H₂O 3.15 g, CuSO₄ 5H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.022 g, CoCl₂ 6H₂O 0.01 g, MnCl₂ 4H₂O 0.18 g and NaMoO₄ 2H₂O 0.18 g) and stock solution of vitamin mix—1 mL·L⁻¹ (cyanocobalamin (vitamin B12) 0.0005 g, thiamine HCl (vitamin B1) 0.1 g, biotin 0.0005 g).

3.2. Aquaculture Wastewater

AWW was obtained from Jurassic Salmon (Karnice, Poland), an ecological closed-circuit salmon farm. The average content of nitrogen in the wastewater was 31.8 mg·L⁻¹, while the content of phosphorus was 1.1 mg·L⁻¹ at a salinity level of 10‰. AWW was collected from a storage tank and stored in a refrigerator at a temperature of 4 °C. Before use, the wastewater was filtered twice through membrane filters to remove solid impurities, and then filters with a pore diameter of 1.2 µm. Finally, the wastewater was sterilized with UV-C (13 W waterproof lamp, 15 min).

3.3. Experimental Setup

The experiment was divided into two stages. In the first stage, the influence of the AWW dose on the content of microalgal biomass was determined. Vertical tubular photobioreactors with a capacity of 2.5 dm³ (Aqua Medic, Bissendorf, Germany) were used for the experiment. In these photobioreactors, 2 dm³ of medium and 200 cm³ of a 10-day inoculum of microalgae (*C. vulgaris*) were added. AWW was used at doses of 20%, 40%, 60%, 80% and 100%. Commercial F/2 culture medium was used as a control treatment in the experiment. All the photobioreactors were aerated with a 25 W pump (Aqua Medic, Bissendorf, Germany) at a capacity of 0.9 m³·h⁻¹, which allowed us to introduce carbon dioxide and prevent biomass sedimentation. The pH of the medium was adjusted to 7 by adding 1N NaOH. The cultures were illuminated with LEDs: white, red (wavelength 600–700 nm, light intensity of 9.45 µmol s⁻¹) and blue (wavelength 400–500 nm, light intensity of 2.25 µmol·s⁻¹). Lighting was maintained on an 18/6 h light:dark cycle. The total LED intensity was 13.5 µmol s⁻¹ (HOLDBOX, Z'abia Wola, Poland). The experiment was carried out for 15 days, and then the amount of biomass and optical density of cultures were determined.

In the second stage of the experiment, the influence of nutrient stress on the amount of *C. vulgaris* biomass and on the content of lipids in biomass was assessed. Additionally, optical density and chlorophyll a content were calculated. At this stage, the biological

material that was obtained under optimal growth conditions for algal biomass was used as an inoculum (for the AWW dose). The experiment was carried out in vertical tubular photobioreactors with a capacity of 14 dm³, with 10.8 dm³ of AWW (doses of 20%, 40%, 60% and 80%) and 1.2 dm³ of *C. vulgaris* inoculum. The cultures were illuminated with LED light, and aerated using a pump with a power of 12 W at a capacity of 14 L·min⁻¹. The experiment was carried out as a batch culture for 15 days.

3.1. Analytical Methods

3.1.1. Biomass Quantification

The dry weight of microalgae was determined by a gravimetric method described by Ratha et al. [78] with modification [79]. The amount of biomass was estimated using a moisture analyzer (AXIS ATS, Gdańsk, Poland). The results are presented in mg·L⁻¹.

The optical density of microalgal cultures was measured using a spectrophotometer (EMCO, Warszawa, Poland) at a wavelength of $\lambda = 680$.

3.1.2. Pigment Extraction and Analysis

The content of chlorophyll a in microalgal cells was measured according to PN-86 C-05560/02 standards [80]. Briefly, the algal biomass was concentrated by vacuum filtration on a glass fiber filter, and then the chlorophyll pigment was extracted with a solution of 90% acetone. Absorbance was measured at a wavelength of $\lambda = 665$ nm using a spectrophotometer (EMCO, Warszawa, Poland). The results are presented in mg m⁻³.

3.1.3. Determination of PH

The pH of the culture medium was measured using a CI-316 microcomputer pH-meter (Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany).

3.1.4. Lipids Extraction and Determination

The lipid content of the biomass was determined by Soxhlet extraction with hexane using the modified method of Shin et al. [81]. The analyses were carried out after 15 days of cultivation. Following sedimentation, the biomass was dried in a laboratory dryer (WAMED, Warszawa, Poland) at 70 °C for 24 h. Then, 0.5 g of the dried sample were transferred to a cellulose casing and extracted in a Soxhlet apparatus (Labmed HK, Łódź, Poland) with hexane for 4 h (20 cycles per hour). The lipid content of the sample was determined using the following formula (1):

$$LC = \frac{mL}{mDAB} \cdot 100 \quad (1)$$

where LC is the lipid content, mL is the mass of lipids (g) and mDAB is the mass of dry microalgal biomass (g).

3.1.5. Determination of Total Nitrogen Content

The total nitrogen in the culture medium was determined using the spectrophotometric method according to PN-EN ISO 11905-1: 2001 standards [82]. The obtained results were converted into mg·L⁻¹. Nitrogen analyses were also performed once at the beginning of the study.

3.2. Statistical Analysis

All analyses, except for lipid content, were performed in triplicate. The results were statistically analyzed using a computer program for Windows (Statistica version 13.3, 2016; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). An analysis of variance was performed, followed by Tukey's significance tests at a level of $p \leq 0.05$. In addition, Pearson's linear correlation coefficient (r) and standard deviations were determined.

4. Conclusions

This study confirmed the possibility of using saline wastewater from salmon farming for the production of *C. vulgaris* biomass, which will allow for the simultaneous removal of nutrients from AWW. The content of nutrients in the wastewater originating from fisheries was identified as an important parameter influencing the amount of biomass produced. The largest amount of biomass ($727 \pm 19.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and the highest values of optical density (0.492 ± 0.00) were obtained at the higher doses of AWW (80%). On the other hand, the highest content of chlorophyll was determined in AWW₂₀. Due to the limited access to nitrogen, the lipid content in the biomass increased. The highest lipid content (11.81%) was determined in the most diluted culture medium (AWW₂₀), in which the initial nitrogen content was $6.67 \pm 0.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Considering that algal biomass can be used for energy purposes, the cost of the growth medium, which accounts for a significant part of the total production costs, is important for advanced biofuel production.

Author Contributions: Conceptualization, P.R. and M.H.-P.; methodology, M.H.-P.; validation, P.R. and M.H.-P.; formal analysis, P.R. and M.H.-P.; investigation, P.R.; writing—original draft preparation, P.R. and M.H.-P.; writing—review and editing, P.R. and M.H.-P.; visualization, P.R. and M.H.-P.; supervision, M.H.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, Z. Comparisons of various absorbent effects on carbon dioxide capture in membrane gas absorption (MGA) process. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* **2016**, *31*, 589–595. [\[CrossRef\]](#)
2. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [\[CrossRef\]](#)
3. Arumugam, M.; Agarwal, A.; Arya, M.C.; Ahmed, Z. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 246–249. [\[CrossRef\]](#)
4. John, R.P.; Anisha, G.S.; Nampoothiri, K.M.; Pandey, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 186–193. [\[CrossRef\]](#)
5. Ho, S.H.; Ye, X.; Hasunuma, T.; Chang, J.S.; Kondo, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuels production from microalgae—A critical review. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1448–1459. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Zheng, Y.P.; Huang, Y.; Liao, Q.; Fu, Q.; Xia, A. Effect of wettability on the growth of *Scenedesmus obliquus* biofilm attached on glass surface coated with polytetrafluoroethylene emulsion. *Int. J. Hydrog. Energy* **2016**, *41*, 21728–21735. [\[CrossRef\]](#)
7. Babu, A.; Wu, X.; Kabra, A.N.; Kim, D.P. Cultivation an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitations. *Algal Res.* **2017**, *23*, 178–185. [\[CrossRef\]](#)
8. Singh, P.; Kumari, S.; Guldhe, A.; Misra, R.; Rawat, I.; Bux, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **2016**, *55*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
9. Li, T.; Xu, J.; Gao, B.; Xiang, W.Z.; Zhang, C. Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies. *Algal Res.* **2016**, *16*, 481–491. [\[CrossRef\]](#)
10. Sharma, K.K.; Schuhmann, H.; Schenk, P.M. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production. *Energies* **2012**, *5*, 1532–1553. [\[CrossRef\]](#)
11. Piligaev, A.V.; Sorokina, K.N.; Samoylova, Y.V.; Parmon, V.N. Production of Microalgal Biomass with High Lipid Content and Their Catalytic Processing Into Biodiesel: A Review. *Catal. Ind.* **2019**, *11*, 349–359. [\[CrossRef\]](#)
12. Khan, M.I.; Shin, J.H.; Kim, J.D. The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb. Cell Fact.* **2018**, *17*, 36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Morgan-Kiss, R.M.; Prisco, J.C.; Pocock, T.; Gudynaite-Savitch, L.; Huner, N.P.A. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 222–252. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Metsoviti, M.N.; Papapolymerou, G.; Karapanagiotidis, I.T.; Katsoulas, N. Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants* **2020**, *9*, 31. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Varshney, P.; Beardall, J.; Bhattacharya, S.; Wangikar, P.P. Effect of elevated carbon dioxide and nitric oxide on the physiological responses of two green algae, *Asterarcys quadricellulare* and *Chlorella sorokiniana*. *J. Appl. Phycol.* **2020**, *32*, 189–204. [\[CrossRef\]](#)
16. Mishra, S.; Liu, Y.-J.; Chen, C.-S.; Yao, D.-J. An Easily Accessible Microfluidic Chip for High-Throughput Microalgae Screening for Biofuel Production. *Energies* **2021**, *14*, 1817. [\[CrossRef\]](#)

17. Takagi, M.; Yoshida, T. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* cells. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 223–226. [\[CrossRef\]](#)
18. An, M.; Gao, L.; Zhao, W.; Chen, W.; Li, M. Effects of Nitrogen Forms and Supply Mode on Lipid Production of Microalgae *Scenedesmus Obliquus*. *Energies* **2020**, *13*, 697. [\[CrossRef\]](#)
19. Tang, D.; Han, W.; Li, P.; Miao, X.; Zhong, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3071–3076. [\[CrossRef\]](#)
20. Xu, N.; Zhang, X.; Fan, X.; Han, L.; Zeng, C. Effects of nitrogen source and concentration on growth rate and fatty acid composition of *Ellipsoidium* sp. (Eustigmatophyta). *J. Appl. Phycol.* **2001**, *13*, 463–469. [\[CrossRef\]](#)
21. Yang, L.; Chen, J.; Qin, S.; Zeng, M.; Jiang, Y.; Hu, L.; Xiao, P.; Hao, W.; Hu, Z.; Lei, A.; et al. Growth and lipid accumulation by different nutrients in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. Biofuels* **2008**, *11*, 40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Vooren, G.V.; Grand, F.L.; Legrand, J.; Cuiné, S.; Peltier, G.; Pruvost, J. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* **2012**, *124*, 421–432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Rai, M.P.; Gautam, T.; Sharma, N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *J. Biol. Sci.* **2015**, *15*, 260–267. [\[CrossRef\]](#)
24. Adams, C.; Godfrey, V.; Wahlen, B.; Seefeldt, L.; Bugbee, B. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Biores. Technol.* **2013**, *131*, 188–194. [\[CrossRef\]](#)
25. Koziel, W.; Włodarczyk, T. Glony-produkcja biomasy. *Acta Agroph.* **2011**, *17*, 105–116.
26. Makowska, M.; Dziosa, K. Wytwarzanie biomasy mikroalg w warunkach laboratoryjnych. *Przem. Chem.* **2015**, *94*, 982–985.
27. Loera-Quezada, M.M.; Angeles, G.; Olguín, E.J. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. *Rev. Latinoam. Biotechnol. Amb. Algal.* **2011**, *2*, 81–92.
28. Rendón, L.; Ramírez, M.; Vélez, Y. *Microalgas para la Industria Alimenticia*; Universidad Pontificia Bolivariana: Medellín, Colombia, 2015.
29. Escapa, C.; García, A. Eliminación de nutrientes en aguas residuales y biofijación de CO₂ mediante el cultivo de microalgas. *Sci. Soc. Galicia* **2013**, *2*, 63–76.
30. Abdel-Raouf, N.; Al-Homaidan, A.; Ibraheem, I.B.M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* **2012**, *19*, 257–275. [\[CrossRef\]](#)
31. Markou, G.; Georgakakis, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3389–3401. [\[CrossRef\]](#)
32. Demirbas, A.; Demirbas, M.F. Importance of Algae Oil as a Source of Biodiesel. *Energy Convers. Manag.* **2011**, *52*, 163–170. [\[CrossRef\]](#)
33. Gao, F.; Li, C.; Yang, Z.H.; Zeng, G.M.; Feng, L.J.; Liu, J.Z.; Liu, M.; Cai, H.W. Continuous microalgae cultivation in aquaculture wastewater by a membrane photobioreactor for biomass production and nutrients removal. *Ecol. Eng.* **2016**, *92*, 55–61. [\[CrossRef\]](#)
34. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M.; Zając, G.; Szyszlak-Bargłowicz, J. Production of Microalgal Biomass Using Aquaculture Wastewater as Growth Medium. *Water* **2019**, *12*, 106. [\[CrossRef\]](#)
35. Ruiz, J.; Álvarez-Díaz, P.D.; Arbib, Z.; Garrido-Pérez, C.; Barragán, J.; Perales, J.A. Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: Prediction from a batch experiment. *Bioresour. Technol.* **2013**, *127*, 456–463. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Liu, Y.; Lv, J.; Feng, J.; Liu, Q.; Nan, F.; Xie, S. Treatment of real aquaculture wastewater from a fishery utilizing phytoremediation with microalgae. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2019**, *94*, 900–910. [\[CrossRef\]](#)
37. Li, Y.; Zhou, W.; Hu, B.; Min, M.; Chen, P.; Ruan, R.R. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 10861–10867. [\[CrossRef\]](#)
38. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M. Sustainable Production of *Monoraphidium* Microalgae Biomass as a Source of Bioenergy. *Energies* **2020**, *13*, 5975. [\[CrossRef\]](#)
39. Fernández-Linares, L.C.; Guerrero-Barajas, C.; Durán-Páramo, E.; Badillo Corona, J.A. Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 400–406. [\[CrossRef\]](#)
40. Guldhe, A.; Ansari, F.A.; Singh, P.; Bux, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecol. Eng.* **2017**, *99*, 47–53. [\[CrossRef\]](#)
41. Mtaki, K.; Kyewalyanga, M.S.; Mtolera, M.S.P. Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (*Chlorella vulgaris*). *Ann. Microbiol.* **2021**, *71*. [\[CrossRef\]](#)
42. Tossavainen, M.; Lahti, K.; Edelmann, M.; Eskola, R.; Lampi, A.-M.; Piironen, V.; Korvonen, P.; Ojala, A.; Romantschuk, M. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: Wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1753–1763. [\[CrossRef\]](#)
43. Mahmood, A.K.H.; Mohsin, K.E. Experimental study for commercial fertilizer NPK (20:20:20+TE N: P: K) in microalgae cultivation at different aeration periods. *Iraqi J. Chem. Pet. Eng.* **2017**, *18*, 99–110.
44. Nayak, M.; Karemore, A.; Sen, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. *Algal Res.* **2016**, *16*, 216–223. [\[CrossRef\]](#)
45. Tang, H.; Chen, M.; Simon Ng, K.Y.; Salley, S.O. Continuous microalgae cultivation in a photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2468–2474. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

46. Zhu, S.; Wang, Y.; Xu, J.; Shang, C.; Wang, Z.; Xu, J.; Yuan, Z. Luxury uptake of phosphorus changes the accumulation of starch and lipid in *Chlorella* sp. under nitrogen depletion. *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 165–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Ansari, F.A.; Singh, P.; Guldhe, A.; Bux, F. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal Res.* **2017**, *21*, 169–177. [\[CrossRef\]](#)
48. Sánchez-García, D.; Resendiz-Isidro, A.; Villegas-Garrido, T.L.; Flores-Ortiz, C.M.; Chávez-Gómez, B.; Cristiani-Urbi, E. Effect of nitrate on lipid production by *T. suecica*, *M. contortum*, and *C. minutissima*. *Cent. Eur. J. Biol.* **2013**, *8*, 578–590. [\[CrossRef\]](#)
49. Do, J.M.; Jo, S.W.; Kim, I.S.; Na, H.; Lee, J.H.; Kim, H.S.; Yoon, H.S. A feasibility study of wastewater treatment using domestic microalgae and analysis of biomass for potential applications. *Water* **2019**, *11*, 2294. [\[CrossRef\]](#)
50. Sacristán de Alva, M.; Luna-Pabello, V.M.; Cadena, E.; Ortiz, E. Green microalgae *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 744–748. [\[CrossRef\]](#)
51. Cai, T.; Park, S.Y.; Li, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2013**, *19*, 360–369. [\[CrossRef\]](#)
52. Lu, Q.; Zhou, W.; Min, M.; Ma, X.; Ceria Chandra, Y.T.T.D.; Yiwei, M.; Zheng, H.; Cheng, S.; Griffith, R.; Chen, P.; et al. Growing *Chlorella* sp. on meat processing wastewater for nutrient removal and biomass production. *Bioresour. Technol.* **2015**, *198*, 189–197. [\[CrossRef\]](#)
53. Bhatnagar, A.; Chinnasamy, S.; Singh, M. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3425–3431. [\[CrossRef\]](#)
54. Kim, J.; Lingaraju, B.P.; Rheume, R.; Lee, J.Y.; Siddiqui, K.F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Sci. Technol.* **2010**, *15*, 391–396. [\[CrossRef\]](#)
55. Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 217–232. [\[CrossRef\]](#)
56. Ru, I.T.K.; Sung, Y.Y.; Jusoh, M.; Wahid, M.E.A.; Nagappan, T. *Chlorella vulgaris*: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Appl. Phycol.* **2020**, *1*, 2–11. [\[CrossRef\]](#)
57. Chen, C.Y.; Yeh, K.L.; Aisyah, R.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 71–81. [\[CrossRef\]](#)
58. Wong, Y.K.; Ho, Y.H.; Ho, K.C.; Leung, H.M.; Yung, K.K.L. Growth medium screening for *Chlorella vulgaris* growth and lipid production. *J. Aquac. Mar. Biol.* **2017**, *6*, 00143. [\[CrossRef\]](#)
59. Geider, R.; La Roche, J. Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur. J. Phycol.* **2002**, *37*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
60. Pribyl, P.; Cepak, V.; Zachleder, V. Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 549–561. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Mutlu, Y.B.; Isik, O.; Uslu, L.; Koc, K.; Durmaz, Y. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 453–456.
62. Adenan, N.S.; Yusoff, F.M.; Medipally, S.R.; Shariff, M. Enhancement of lipid production in two marine microalgae under different levels of nitrogen and phosphorus deficiency. *J. Environ. Biol.* **2016**, *37*, 669–676. [\[PubMed\]](#)
63. Chandra, R.; Rohit, M.V.; Swamy, Y.V.; Venkata Mohan, S. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresour. Technol.* **2014**, *165*, 279–287. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Sarat Chandra, T.; Deepak, R.S.; Maneesh Kumar, M.; Mukherji, S.; Chauhan, V.S.; Sarada, R.; Mudliar, S.N. Evaluation of indigenous fresh water microalga *Scenedesmus obtusus* for feed and fuel applications: Effect of carbon dioxide, light and nutrient sources on growth and biochemical characteristics. *Bioresour. Technol.* **2016**, *207*, 430–439. [\[CrossRef\]](#)
65. Gong, Y.; Guo, X.; Wan, X.; Liang, Z.; Jiang, M. Triacylglycerol accumulation and change in fatty acid content of four marine oleaginous microalgae under nutrient limitation and at different culture ages. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53*, 29–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Shen, Q.H.; Gong, Y.P.; Fang, W.Z.; Bi, Z.C.; Cheng, L.H.; Xu, X.H.; Chen, H.L. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. *Bioresour. Technol.* **2015**, *193*, 68–75. [\[CrossRef\]](#)
67. Rai, S.V.; Rajashekhar, M. Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of marine phytoplankton. *J. Algal Biomass Util.* **2014**, *5*, 55–59.
68. Mirizadeh, S.; Nosrati, M.; Shojaosadati, S.A. Synergistic Effect of Nutrient and Salt Stress on Lipid Productivity of *Chlorella vulgaris* Through Two-Stage Cultivation. *Bioenerg. Res.* **2020**, *13*, 507–517. [\[CrossRef\]](#)
69. Juneja, A.; Ceballos, R.M.; Murthy, G.S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* **2013**, *6*, 4607–4638. [\[CrossRef\]](#)
70. Delgadillo-Mirquez, L.; Lopes, F.; Taïdi, B.; Pareau, D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Rep.* **2016**, *11*, 18–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Lugo, L.A.; Thorarinsdottir, R.I.; Björnsson, S.; Pálsson, O.P.; Skúlason, H.; Johannsson, S.; Brynjólfsson, S. Remediation of Aquaculture Wastewater Using the Microalga *Chlorella sorokiniana*. *Water* **2020**, *12*, 3144. [\[CrossRef\]](#)
72. Scherholz, M.L.; Curtis, W.R. Achieving pH control in microalgal cultures through fed-batch addition of stoichiometrically-balanced growth media. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13*, 39. [\[CrossRef\]](#)

73. Ördög, V.; Stirk, W.A.; Bálint, P.; Staden, J.; Lovász, C. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 907–914. [CrossRef]
74. Li, Y.; Horsman, M.; Wang, B.; Wu, N.; Lan, C.Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 629–636. [CrossRef] [PubMed]
75. Da Silva Ferreira, V.; Sant'Anna, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *33*, 20. [CrossRef] [PubMed]
76. Mohsenpour, S.F.; Richards, B.; Willoughby, N. Spectral conversion of light for enhanced microalgae growth rates and photosynthetic pigment production. *Bioresour. Technol.* **2012**, *125*, 75–81. [CrossRef] [PubMed]
77. Guillard, R.R.L.; Ryther, J.J. Studies of marine planktonic diatoms in *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229–239. [CrossRef] [PubMed]
78. Ratha, S.K.; Rao, P.H.; Govindaswamy, K.; Jaswin, R.S.; Lakshmidhevi, R.; Bhaskar, S.; Chinnasamy, S. A rapid and reliable method for estimating microalgal biomass using a moisture analyser. *J. Appl. Phycol.* **2016**, *28*, 1725–1734. [CrossRef]
79. Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* biomass in tubular photobioreactors during different culture conditions. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3106. [CrossRef]
80. Polish Standards PN-86 C-05560/02. Water and Waste Water. Tests for Chlorophyll in Surface Water, Determination of Chlorophyll a in Planktonic Algae by Spectrophotometric Monochromatic Method with Correction for Pheopigments Alpha; Polish Committee for Standardisation. 1986. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-c-05560-02-1986p.html> (accessed on 9 November 2020). (In Polish).
81. Shin, H.Y.; Ryub, J.H.; Baeb, S.Y.; Crofcheck, C.; Crockera, M. Lipid extraction from *Scenedesmus* sp. microalgae for biodiesel production using hot compressed hexane. *Fuel* **2014**, *130*, 66–69. [CrossRef]
82. Polish Standards PN EN ISO 11905-1. Water Quality-Determination of Nitrogen-Part 1: Method Using Oxidative Digestion with Peroxodisulfate; Polish Committee for Standardization. 2001. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-11905-1-2001p.html> (accessed on 15 November 2020). (In Polish).

Article

Utilisation of CO₂ from Sodium Bicarbonate to Produce *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes

Patryk Ratowski , Małgorzata Hawrot-Paw * and Adam Koniuszy 

Department of Renewable Energy Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland; patryk.ratowski@zut.edu.pl (P.R.); adam.koniuszy@zut.edu.pl (A.K.)

* Correspondence: malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl



Citation: Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A. Utilisation of CO₂ from Sodium Bicarbonate to Produce *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes. *Sustainability* **2021**, *13*, 9118. <https://doi.org/10.3390/su13169118>

Academic Editors: Simona Carfagna and Giovanna Salbitani

Received: 21 July 2021

Accepted: 12 August 2021

Published: 14 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Microalgae are one of the most promising sources of renewable substrates used for energy purposes. Biomass and components accumulated in their cells can be used to produce a wide range of biofuels, but the profitability of their production is still not at a sufficient level. Significant costs are generated, i.e., during the cultivation of microalgae, and are connected with providing suitable culture conditions. This study aims to evaluate the possibility of using sodium bicarbonate as an inexpensive alternative CO₂ source in the culture of *Chlorella vulgaris*, promoting not only the increase of microalgae biomass production but also lipid accumulation. The study was carried out at technical scale using 100 L photobioreactors. Gravimetric and spectrophotometric methods were used to evaluate biomass growth. Lipid content was determined using a mixture of chloroform and methanol according to the Blight and Dyer method, while the carbon content and CO₂ fixation rate were measured according to the Walkley and Black method. In batch culture, even a small addition of bicarbonate resulted in a significant ($p \leq 0.05$) increase in the amount of biomass, productivity and optical density compared to non-bicarbonate cultures. At 2.0 g·L⁻¹, biomass content was $572 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the maximum productivity was $7.0 \pm 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and the optical density was 0.181 ± 0.00 . There was also an increase in the lipid content ($26 \pm 4\%$) and the carbon content in the biomass ($1322 \pm 0.062 \text{ g} \cdot \text{dw}^{-1}$), as well as a higher rate of carbon dioxide fixation ($0.925 \pm 0.073 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The cultivation of microalgae in enlarged scale photobioreactors provides a significant technological challenge. The obtained results can be useful to evaluate the efficiency of biomass and valuable cellular components production in closed systems realized at industrial scale.

Keywords: sodium bicarbonate; carbon dioxide; biofixation; microalgal biomass; lipids content

1. Introduction

The main source of energy in the world, also used for fuel production, is still crude oil [1]. Limited fossil fuel resources and adverse environmental impact due to greenhouse gas emissions increased interest in advanced fuel production technologies [2]. The primary feedstocks used for their production are obtained from energy crops or lignocellulosic wastes. Less conventional sources include the biomass of macroalgae and microalgae [3,4].

Microalgae are unicellular or multicellular simple organisms that are metabolically diverse, but most of them are photoautotrophs [5]. A valuable property of theirs is that their fast biomass growth, which per hectare is several times higher compared to terrestrial plants [6], but just like plants, microalgae require nutrients, light and carbon dioxide to grow [7]. Under appropriate conditions, microalgae convert solar energy into chemical energy stored as starch or lipids [5,8,9], which are precursors for bioethanol and biodiesel production [10]. Given the higher photosynthetic efficiency, higher biomass production per unit area and faster growth rate compared to energy crops, microalgae are good alternative as feedstock for biofuel production [8]. An additional advantage of microalgae is the lack of competition for nutrients with food crops [11]. Furthermore, biomass production can

be located on marginal lands [6]. The negative environmental impact associated with the cultivation of microalgae for energy purposes is described as potentially negligible [12,13].

The main problems of algal biofuel production are related to cultivation costs and biomass dehydration processes [14,15]. To increase the cost-effectiveness of biomass production, nutrients contained in municipal wastewater [16,17] or in aquaculture wastewater [18], are used in cultivation. Microalgae have a high ability to remove nitrogen and phosphorus compounds, thus biomass production can be more sustainable and can be used in the bioremediation of the aquatic environment [19].

Commercial cultivation of microalgae requires the supply of significant amounts of inorganic carbon for photosynthesis [20]. This is mainly provided by carbon dioxide from the air and eventually from industrial emissions [21]. This may be a method for its biological sequestration [22], especially considering that some microalgae are capable of assimilating up to 1.83 Mg of CO₂ during the production of 1 Mg of their biomass [23]. Higher CO₂ concentration promotes lipid accumulation in the cells [24]. Atmospheric carbon dioxide concentration depends on anthropogenic activities [25] and industrial development stage [26] and may increase above 400 PPM [27]. Concentrations of CO₂ may be an important factor to limit growth and development of some microalgal species [28], however, minimum and maximum concentrations CO₂ dissolved in the culture medium for microalgae cultivation vary from one species to another [29]. Some microalgae can grow under atmospheric air [30], others in extremely high CO₂ concentrations ranging from 40 to 100 vol% [31]. Compressed CO₂ can also be used in cultivation [32], but this increases the costs, which are related to the capture, compression, transport or storage of this gas [33]. The cost of using compressed carbon dioxide in microalgae culture can account for up to half of the total cost of biomass production [34]. An alternative option may be using of bicarbonate salts [35]. These compounds have much higher solubility in water than CO₂ and higher efficiency in biomass production compared to compressed carbon dioxide [28]. A review of the recent progress in bicarbonate-based microalgae cultivation suggested potential to significantly reduce production cost. The use of sodium bicarbonate reduces the cost of carbon supply, increases the accumulation of valuable components, and is energetically efficient [36]. New technologies make it possible to produce sodium bicarbonate from carbon dioxide, including from industrial CO₂ emissions, which are responsible for the negative effects of climate change [37].

The aim of this study was to evaluate the ability of *Chlorella vulgaris* microalga to utilize bicarbonate as a carbon source and find out the sodium bicarbonate concentration to produce higher biomass and higher lipid contents in microalgae. Its effectiveness was assessed by the amount of biomass, optical density of the culture, lipid accumulation rate, carbon content in the biomass and CO₂ fixation rate. Most of the available literature presents the results of studies carried out at small-scale, so it is important to know the mechanism of microalgae growth at the industrial scale, which changes as the capacity of the photobioreactor increases. The potential benefits of using NaHCO₃ were assessed on a technical not laboratory scale. It is crucial for industrial application of microalgae, especially for biofuel production, and to the best of our knowledge, this is the first such study.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae

The strain of *C. vulgaris* (BA 002) green microalga was obtained from the Culture Collection of Baltic Algae. The material was stored in F/2 liquid medium [38] with the following composition [g·L⁻¹]: NaNO₃—0.075 g; NaH₂PO₄·2H₂O—0.00565 g; stock solution of trace elements: 1 mL·L⁻¹ (Na₂EDTA 4.16 g, FeCl₃ 6H₂O 3.15 g, CuSO₄ 5H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.022 g, CoCl₂ 6H₂O 0.01 g, MnCl₂ 4H₂O 0.18 g and NaMoO₄ 2H₂O 0.18 g) and stock solution of vitamin mix: 1 mL·L⁻¹ (cyanocobalamin (vitamin B12) 0.0005 g, thiamine HCl (vitamin B1) 0.1 g, biotin 0.0005 g). Microalga were stored at 4 °C, with a photoperiod of 12 h under light-emitting diode (LED).

2.1. Experimental Setup

C. vulgaris strain was grown in synthetic medium F/2. In the study, vertical tubular photobioreactors with a total volume of 100 L were used, which were supplemented with 80 L of culture medium F/2 and an appropriate dose of sodium bicarbonate (NaHCO_3): 0.025, 0.5, 1.0, 1.5 i 2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. After sterilization of the medium with UV-C light, 8 L of microalgae inoculate were introduced into the photobioreactors. The control object in the experiment was a commercial culture medium without bicarbonate –0 (F/2). The pH of the medium was set at 7 using 1 N NaOH.

LED lighting with red and blue LEDs (5:1 ratio), with a photoperiod of 18/6 h (light/dark cycle) was used. The microalgae cells were kept in suspension by mixing with gas using a membrane pump (HAILEA ACO-300A, Guangdong, China) with a power of 160 W and a capacity of 240 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The experiment was carried out as batch cultures and ran for 20 d.

Biomass growth was estimated by gravimetric method [39], using a moisture analyzer (AXIS ATS60, Gdańsk, Poland). The optical density of the microalgae suspension was determined by spectrophotometry at wavelength $\lambda = 680$ using a spectrophotometer (SPEKOL 11, Jena, Germany). Measurements were made at the beginning and on the 5th, 10th, 15th and 20th day of the experiment.

The lipid content of the biomass was determined using a solvent mixture (chloroform-methanol) according to the method of Blight and Dyer [40]. The lipid content was calculated using following equation:

$$LC = \frac{mL}{mDAB} \cdot 100, \quad (1)$$

where LC is the lipid content, mL is the mass of lipids (g) and $mDAB$ is the mass of dry microalgal biomass (g).

The carbon content and CO_2 fixation rate of microalgae cells were determined according to the method of Walkley and Black [41], with some modification [42]. The carbon content was calculated using following equation:

$$a = \frac{3.951}{g} \left(1 - \frac{T}{S} \right), \quad (2)$$

where a is the carbon content, g is the mass of the microalgae sample (g) and T and S are the blank and test sample iron-ammonium sulfate, respectively (mL).

The rate of CO_2 fixation was calculated from the following equation:

$$R_{\text{CO}_2} = C_C \cdot P_{\text{max}} \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C}, \quad (3)$$

where R_{CO_2} is the rate of CO_2 fixation ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), C_C is the carbon content of microalgae cells (%), P_{max} is the maximum biomass productivity ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) and M_{CO_2} and M_C are the molecular weight of CO_2 and C, respectively.

During cultivation, the pH was controlled by a pH-meter CI-316 (Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany).

2.2. Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate. Results were statistically analyzed using Statistica software (version 13.3, 2016; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Two-factor analysis of variance was used. The significance of differences between means was assessed using Tukey's test at $p \leq 0.05$. Pearson's linear correlation coefficient (r) and standard deviations (SD) were also determined.

3. Results and Discussion

3.1. Biomass Production with CO₂ from Sodium Bicarbonate

The effect of the NaHCO₃ dose on the growth dynamics of *C. vulgaris* is shown in Figure 1A. The initial amount of biomass was, on average, $480 \pm 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. High bicarbonate doses influenced the cell growth and biomass production and prolonged the logarithmic growth phase. After 20 days, the highest biomass ($620 \pm 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was determined in the photobioreactor with a dose of $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO₃ (over 20% more than in control 0 (F/2) object). Similar results were presented by Yeh et al. [43], who, in the culture of *C. vulgaris*, used NaHCO₃ at a dose ranging from 100 to 1600 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and obtained the maximum biomass at the highest dose. The same results ($0.769 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) were obtained by Mokashi et al. [44], who applied NaHCO₃ in the culture of *C. vulgaris* in a range from 0.025 to $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Molazadeh et al. [45] cultivated *C. vulgaris* in wastewater with compressed CO₂ at 16% and obtained $0.790 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. An equally high biomass content ($0.740 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) was obtained by Rodas-Gaitán et al. [46], who cultured *C. vulgaris* in 15-L photobioreactors and used sodium bicarbonate at $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ as a carbon source. The high solubility of bicarbonate in the culture medium [47] promotes the absorption of inorganic carbon and the production of biomass. In the present study, the average biomass concentration ranged from $505 \pm 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in the culture medium without bicarbonate –0 (F/2) object, to $572 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in a medium enriched with NaHCO₃ at a dose of $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figure 1B). An increase in biomass was also observed at lower doses of bicarbonate, which may be due to the beneficial effect of NaHCO₃ on photosynthesis and cellular component accumulation. A study by Salbitani et al. [48] confirmed the positive relationship between bicarbonate, the chlorophyll a content and the photosynthetic activity of *Chlorella sorokiniana*. The use of NaHCO₃ may be an alternative to CO₂, which decreases the pH of culture medium and may reduce the availability of carbon for photosynthesis [49].

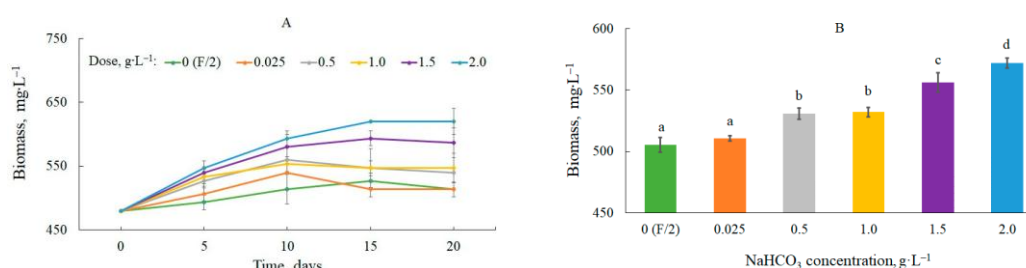


Figure 1. Dynamics of changes in biomass content (A) and average biomass content in the culture (B). Mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

The biomass productivity changed as a function of the bicarbonate dose and time (Table 1). The highest values were observed at the beginning of the study at a dose of $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($13.3 \pm 2.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The productivity decreased with time. The changes could be due to the time-limited availability of nutrients as observed in batch cultures [50] or to the level of carbon dioxide utilisation.

Table 1. Biomass productivity in relation to bicarbonate dose.

Level of Sodium Bicarbonate (g·L ⁻¹)	Biomass Productivity (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)			
	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20
0 (F/2)	2.7 ± 2.3	3.3 ± 2.3	3.1 ± 0.8	1.7 ± 0.6
0.025	5.3 ± 2.3	6.0 ± 0.0	2.2 ± 0.8	1.7 ± 0.6
0.5	9.3 ± 2.3	8.0 ± 2.0	4.4 ± 0.8	3.0 ± 0.0
1.0	10.7 ± 2.3	7.3 ± 1.2	4.4 ± 2.0	3.3 ± 1.2
1.5	12.0 ± 0.0	10.0 ± 2.0	7.6 ± 0.8	5.3 ± 1.2
2.0	13.3 ± 2.3	11.3 ± 1.2	9.3 ± 0.0	7.0 ± 1.0

Optical density in culture, as well as biomass content, changed with bicarbonate dose. Higher values were observed at higher doses of NaHCO_3 . After 20 days, OD_{680} in the culture medium ranged from 0.215 ± 0.00 at a dose $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to 0.239 ± 0.01 at a dose $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, more than 300% in relation to 0.056 ± 0.00 in control 0 (F/2) object (Figure 2A). The amount and the availability of nutrients affects the growth of microalgae [51]. The mean optical density ranged from 0.101 ± 0.0 in control 0 (F/2) object to 0.181 ± 0.0 at a dose $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figure 2B). Similar results were presented by Jegan et al. [52], who obtained the highest optical density (0.477) in *C. vulgaris* cultures at the highest dose of sodium bicarbonate (2 M). Different results were presented by Salbitani et al. [48], who analysed the effect of three doses of NaHCO_3 (1, 2 and $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) on the growth of the microalgae *Chlorella sorokiniana* and found no significant differences between the values obtained at the highest dose and in the control object. The experiment was conducted over 72 h; it represents the short-term effect of bicarbonate addition on algae cultures. According to Chi et al. [53], a high NaHCO_3 content in the culture medium can affect the growth and development of some microalgae, especially freshwater species. The authors studied the effect of NaHCO_3 concentration (from 0.01 to 0.60 M) on the growth of *C. sorokiniana* and observed a significant decrease in optical density with increasing NaHCO_3 concentration (from about 1.3 to 0.1). This may be associated with Na^+ ions, increase with increasing NaHCO_3 dose [54]. This ion can support the growth of some halotolerant algal strains [55], which can also include the *Chlorella* strain tested in the present study.

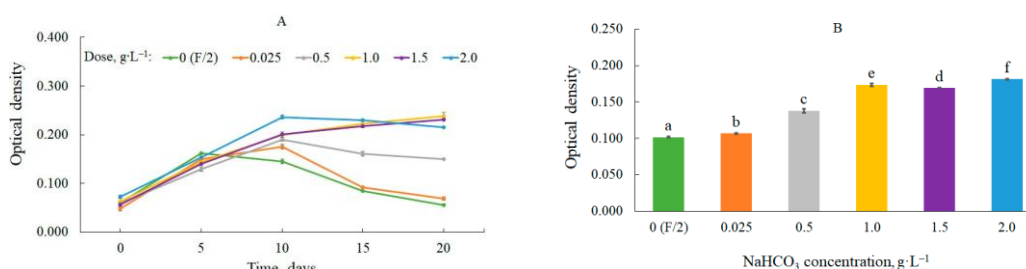


Figure 2. Dynamics of changes in optical density (A) and mean OD_{680} values in the culture (B). Mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

3.1. Effect of Sodium Bicarbonate on Lipid Accumulation in Microalgal Biomass

The presence of bicarbonate in the culture medium, in excess of carbon storage in algal cells, can promote lipid accumulation [56]. According to Figure 3, adding low concentrations of bicarbonate from $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ had no distinct effect on the lipid production of *C. vulgaris*. From own research indicate that lipid synthesis in cells requires a higher dose of inorganic carbon in the medium. In the present study, a significant increase in lipids in the presence of NaHCO_3 , compared to the control 0 (F/2) object, was observed in the culture at a highest dose of $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The lipid content was $26 \pm 4\%$ and this was 8% higher than the values obtained without bicarbonate. Li et al. [57] observed an increase in lipid content in *C. vulgaris* cells with increasing NaHCO_3 dose, but a decrease in the amount of biomass. At a dose of 160 mM the authors obtained approx. $450 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of lipids. A linear dose-dependent increase in lipid content of algal biomass was reported by Bywaters and Fritsen [58]. A too-high concentration of NaHCO_3 may adversely affect lipid accumulation in microalgae cells. Significantly reduced lipid accumulation capacity in *C. pyrenoidosa* biomass, after introduction of 200 mM NaHCO_3 , was observed by Sampathkumar and Gothandam [59]. This is also confirmed by Pimolrat et al. [60], who analyzed the effect of NaHCO_3 at doses ranging from 0.05 to $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ on the stimulation of triacylglycerol production in *Chaetoceros gracilis* cells.

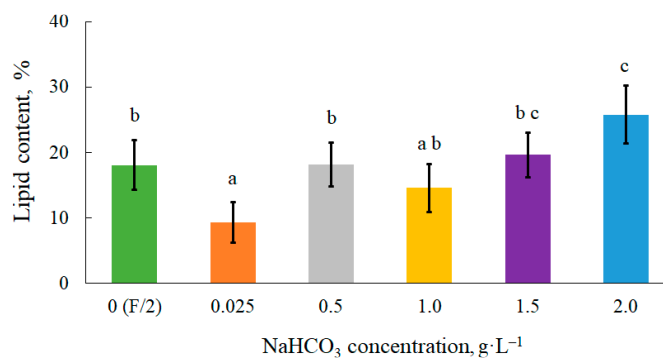


Figure 3. Lipid content in microalgal biomass. Mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

Changes in the pH of the culture medium are shown in Figure 4. Initially, the values ranged from 7.00 (at control 0 (F/2) object) to 8.04 (at 2.0 g·L⁻¹). The study presented here was carried out as a batch culture, without adjusting the pH of the medium. An increase in pH was observed which was associated with microalgae cell growth, carbon dioxide fixation, and dissolution of bicarbonate salts in the culture [61,62], therefore pH regulation can be an important parameter during cultivation [63]. In continuous cultures with recirculation of the culture medium, it would be necessary to evaluate whether the introduction of bicarbonate would lead to a possible accumulation of Na in the medium.

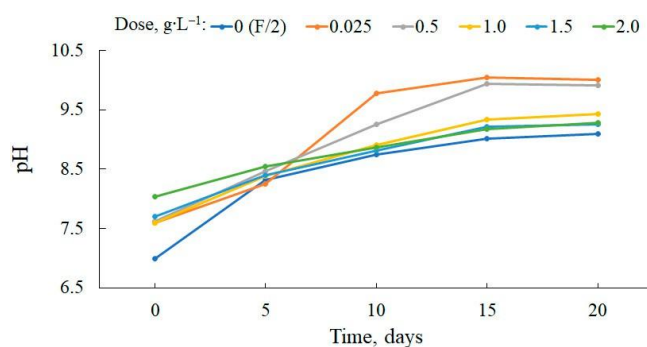


Figure 4. Dynamics of changes in pH during cultivation.

3.1. Carbon Content and CO₂ Fixation Rate in Microalgal Biomass

The carbon content in microalgal biomass ranged from 0.832 ± 0.127 g·dw⁻¹ in control 0 (F/2) object to 1.322 ± 0.062 g·dw⁻¹ at a dose 2.0 g·L⁻¹ NaHCO₃ (Figure 5). With increasing carbon in biomass, there was an increase in CO₂ fixation, which in the study ranged from 0.139 ± 0.047 g·L⁻¹·d⁻¹ to 0.925 ± 0.073 g·L⁻¹·d⁻¹. (Figure 4B). A high carbon content and rate of fixation indicate a high potential for CO₂ sequestration in *C. vulgaris* biomass [64]. Similar results were reported by Prabakaran and Ravindran [65], who cultured three different algae strains (*Chlorella* sp., *Ulothrix* sp. and *Chlorococcum* sp.) and obtained the highest carbon content and CO₂ fixation rate for *Chlorella* sp. at 0.486 g·dw⁻¹ and 0.68 g·mL⁻¹·d⁻¹, respectively. Some authors indicate a linear relationship between NaHCO₃ dose and carbon accumulation in algal biomass [56,57]. Mokashi et al. [44] applied bicarbonate in *C. vulgaris* cultures at dose from 0.25 to 1 g·L⁻¹ and determined the highest carbon content and CO₂ fixation rate of 0.497 g·dw⁻¹ and 0.69 g·mL⁻¹·d⁻¹, respectively, at the highest dose. The level of carbon dioxide fixation varies depending

on the microalgae strain and the carbon source (Table 2). The efficiency of the process carried out at the technical scale was higher compared to the results obtained by other authors, regardless of whether sodium bicarbonate or carbon dioxide was used in the microalgae cultivation.

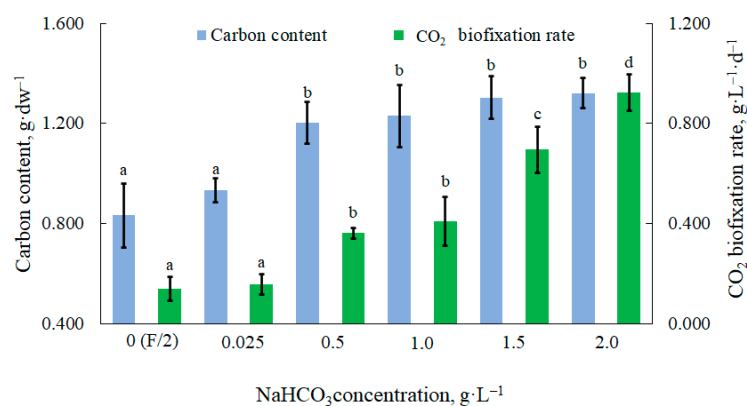


Figure 5. Carbon content and CO₂ fixation rate in *C. vulgaris* biomass. Mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

Table 2. CO₂ fixation of microalgae biomass.

Strain	Carbon Source and Dose	Experimental Scale	CO ₂ Fixation, g·L ⁻¹ ·d ⁻¹	References
<i>Chlorellavulgaris</i>	NaHCO ₃ , 2.0 g·L ⁻¹	100 L	0.93	This study
<i>Chlorella vulgaris</i>	NaHCO ₃ , 1.0 g·L ⁻¹	100 mL	0.69	[44]
<i>Chlorella sp.</i>	NaHCO ₃ , 7.5 g·L ⁻¹	500 mL	0.21	[66]
<i>Scenedesmus abliquus</i>	CO ₂ , 10%	1 L	0.26	[67]
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	CO ₂ , 3%	28.5 L	0.24	[68]

The optical density used to determine biomass growth does not always correlate with actual biomass content [69]; however, in the presented study, there was a significant and positive correlation between these parameters ($r = 0.863$) and moreover between the amount of biomass and the carbon content of microalgae cells ($r = 0.785$), as well as CO₂ fixation rate ($r = 0.806$).

4. Conclusions

The present study confirmed that the addition of NaHCO₃ to culture medium provides effective carbon source and facilitates cell growth and *C. vulgaris* biomass production. The highest biomass content ($572 \pm 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and productivity ($7.0 \pm 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) were obtained with bicarbonate at a dose of $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Under these conditions, the average optical density in culture was also the highest ($\text{OD}_{680} 0.181 \pm 0.00$). An increase in NaHCO₃ dose increased lipid accumulation, carbon content in microalgae cells and carbon dioxide fixation rate. The highest values were observed at the highest dose of NaHCO₃. The average lipid content of the biomass was $26 \pm 4\%$. The carbon content of the biomass increased to $1.322 \pm 0.062 \text{ g} \cdot \text{dw}^{-1}$, while the rate of CO₂ fixation increased to $0.925 \pm 0.073 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. There was a positive correlation between the biomass amount and the optical density and between the biomass, the carbon content and the CO₂ fixation rate.

The study was carried out in photobioreactors used in the industrial production of microalgae biomass and therefore the results obtained showed the real values that are possible to achieve at this scale. The lipid content in the biomass increased with the

increasing dose of sodium bicarbonate. Future research should focus on determining the maximum dose of NaHCO_3 for optimal microalgal growth. It is important for the economic sustainability of microalgae cultivation for fuel purposes. The commercial production of microalgae biomass is carried out as a semi-continuous or continuous culture, so the correlation between the NaHCO_3 dose and the overaccumulation of Na^+ ions and the possibility of limiting microalgal growth should be verified.

Author Contributions: Conceptualization, M.H.-P.; methodology, M.H.-P. and P.R.; formal analysis, P.R.; investigation, P.R. and M.H.-P.; data curation, P.R. and M.H.-P.; writing—original draft preparation, P.R. and M.H.-P.; writing—review and editing, P.R. and M.H.-P.; visualization, P.R. and M.H.-P.; supervision, P.R. and M.H.-P.; project administration, P.R., M.H.-P. and A.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bhatia, S.K.; Bhatia, R.K.; Jeon, J.M.; Pugazhendhi, A.; Awasthi, M.K.; Kumar, D.; Kumar, G.; Yoon, J.J.; Yang, Y.H. An overview on advancements in biobased transesterification methods for biodiesel production: Oil resources, extraction, biocatalysts, and process intensification technologies. *Fuel* **2021**, *285*, 119117. [\[CrossRef\]](#)
- Stephens, E.; Ross, I.L.; Mussnug, J.H.; Wagner, L.D.; Borowitzka, M.A.; Posten, C.; Kruse, O.; Hankamer, B. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Sci.* **2010**, *15*, 554–564. [\[CrossRef\]](#)
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [\[CrossRef\]](#)
- Arumugam, M.; Agarwal, A.; Arya, M.C.; Ahmed, Z. Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Biores. Technol.* **2013**, *131*, 246–249. [\[CrossRef\]](#)
- Ratledge, C.; Cohen, Z. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils? *Lipid Technol.* **2008**, *20*, 155–160. [\[CrossRef\]](#)
- Beer, L.L.; Boyd, E.S.; Peters, J.W.; Posewitz, M.C. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 264–271. [\[CrossRef\]](#)
- Yuan, C.; Wang, S.; Cao, B.; Hu, Y.; Abomohra, A.E.-F.; Wang, Q.; Qian, L.; Liu, L.; Liu, X.; He, Z.; et al. Optimization of hydrothermal co-liquefaction of seaweeds with lignocellulosic biomass: Merging 2nd and 3rd generation feedstocks for enhanced bio-oil production. *Energy* **2019**, *173*, 413–422. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, M.; Tang, H.; Ma, H.; Holland, T.C.; Ng, K.Y.S.; Salley, S.O. Effects of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 1649–1655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mohsenpour, S.F.; Willoughby, N. Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 147–153. [\[CrossRef\]](#)
- Raheem, A.; Prinsen, P.; Vuppalladadiyam, A.K.; Zhao, M.; Luque, R. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *J. Clean. Prod.* **2018**, *181*, 42–59. [\[CrossRef\]](#)
- Tomei, J.; Helliwell, R. Food Versus Fuel? Going Beyond Biofuels. *Land Use Policy* **2016**, *56*, 320–326. [\[CrossRef\]](#)
- Kazamia, E.; Smith, A.G. Assessing the environmental sustainability of biofuels. *Trends Plant Sci.* **2014**, *19*, 615–618. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Collet, P.; Lardon, L.; Hélias, A.; Bricout, S.; Lombaert, I.; Perrier, V.B.; Lépine, O.; Steyer, J.P.; Bernard, O. Biodiesel from microalgae—Life cycle assessment and recommendations for potential improvements. *Renew. Energy* **2014**, *71*, 525–533. [\[CrossRef\]](#)
- Rawat, I.; Kumar, R.; Mutanda, T.; Bux, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Appl. Energy* **2012**, *103*, 444–467. [\[CrossRef\]](#)
- Sahoo, N.K.; Gupta, S.K.; Rawat, I.; Ansari, F.A.; Singh, P.; Naik, S.N.; Bux, F. Sustainable dewatering and drying of self-flocculating microalgae and study of cake properties. *J. Clean. Prod.* **2017**, *159*, 248–256. [\[CrossRef\]](#)
- Mohd Udayappan, A.F.; Abu Hasan, H.; Takriff, M.S.; Sheikh Abdullah, S.R. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *J. Water Process Eng.* **2017**, *20*, 8–21. [\[CrossRef\]](#)
- Shahid, A.; Malik, S.; Zhu, H.; Xu, J.; Nawaz, M.Z.; Nawaz, S.; Asraf Al Alam, M.; Mehmood, M.A. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation: A review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *704*, 135303. [\[CrossRef\]](#)
- Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gálczyńska, M. Sustainable Production of *Monoraphidium* Microalgae Biomass as a Source of Bioenergy. *Energies* **2020**, *13*, 5975. [\[CrossRef\]](#)
- Xiaoning, L.; Guangyao, C.; Yi, T.; Jun, W. Application of effluent from WWTP in cultivation of four microalgae for nutrients removal and lipid production under the supply of CO_2 . *Renew. Energy* **2020**, *149*, 708–715.

20. Umetani, I.; Janka, E.; Sposób, M.; Hulatt, C.J.; Kleiven, S.; Bakke, R. Bicarbonate for microalgae cultivation: A case study in a chlorophyte, *Tetrademus wisconsinensis* isolated from a Norwegian lake. *J. Appl. Phycol.* **2021**, *33*, 1341–1352. [\[CrossRef\]](#)
21. Zhang, X. *Microalgae removal of CO₂ from flue gas*; IEA Clean Coal Centre: London, UK, 2015.
22. Klinthong, W.; Yang, Y.-H.; Huang, C.-H.; Tan, C.-S. A review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. *Aerosol Air Qual. Res.* **2015**, *15*, 712–742. [\[CrossRef\]](#)
23. Ho, S.H.; Chen, C.Y.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems—A review. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 189–198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Rodolfi, L.; Zittelli, G.C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotech. Bioeng.* **2009**, *102*, 100–112. [\[CrossRef\]](#)
25. Hussain, F.; Zahir, S.Z.; Zhou, W.; Iqbal, M. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2017**, *170*, 91–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Ou, J.P.; Liu, X.P.; Li, X.; Chen, Y.M. Quantifying the relationship between urban forms and carbon emissions using panel data analysis. *Landsc. Ecol.* **2013**, *28*, 1889–1907. [\[CrossRef\]](#)
27. Bezyk, Y.; Sówka, I.; Górka, M.; Blachowski, J. GIS-Based Approach to Spatio-Temporal Interpolation of Atmospheric CO₂ Concentrations in Limited Monitoring Dataset. *Atmosphere* **2021**, *12*, 384. [\[CrossRef\]](#)
28. Markou, G.; Vandamme, D.; Muylaert, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res.* **2014**, *65*, 186–202. [\[CrossRef\]](#)
29. Salih, F. Microalgae Tolerance to High Concentrations of Carbon Dioxide: A Review. *J. Environ. Prot.* **2011**, *2*, 648–654. [\[CrossRef\]](#)
30. Pourjamshidian, R.; Abolghasemi, H.; Esmaili, M.; Amrei, H.D.; Parsa, M.; Rezaei, S. Carbon dioxide biofixation by *Chlorella* sp in a bubble column reactor at different flow rates and CO₂ concentrations. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2019**, *36*, 639–645. [\[CrossRef\]](#)
31. Solovchenko, A.; Khozin-Goldberg, I. High-CO₂ tolerance in microalgae: Possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. *Biotechnol. Lett.* **2013**, *35*, 1745–1752. [\[CrossRef\]](#)
32. Fulke, A.B.; Chambhare, K.; Giripunje, M.D.; Sangolkar, L.; Krishnamurthi, K.; Juwarkar, A.A.; Chakrabarti, T. Potential of wastewater grown algae for biodiesel production and CO₂ sequestration. *Afr. J. Biotechnol.* **2013**, *12*, 2939–2948.
33. Chi, Z.; O'Fallon, J.V.; Chen, S. Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 537–541. [\[CrossRef\]](#)
34. De Farias Silva, C.E.; Gris, B.; Sforza, E.; La Rocca, N.; Bertucco, A. Effects of sodium bicarbonate on biomass and carbohydrate production in *Synechococcus pcc 7002*. *Chem. Eng. Trans.* **2016**, *49*, 241–246. [\[CrossRef\]](#)
35. Chisti, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. *J. Biotechnol.* **2013**, *167*, 201–214. [\[CrossRef\]](#)
36. Zhu, C.; Chen, S.; Ji, Y.; Schwaneberg, U.; Chi, Z. Progress toward a bicarbonate-based microalgae production system. *Trends Biotechnol.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
37. Cai, Y.; Wang, W.; Li, L.; Wang, Z.; Wang, S.; Ding, H.; Zhang, Z.; Sun, L.; Wang, W. Effective Capture of Carbon Dioxide Using Hydrated Sodium Carbonate Powders. *Materials* **2018**, *11*, 183. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Guillard, R.R.L.; Ryther, J.J. Studies of marine planktonic diatoms in *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229–239. [\[CrossRef\]](#)
39. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* biomass in tubular photobioreactors during different culture conditions. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3106. [\[CrossRef\]](#)
40. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [\[CrossRef\]](#)
41. Walkley, A.; Black, I.A. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* **1934**, *37*, 29–37. [\[CrossRef\]](#)
42. Anjos, M.; Fernandes, B.D.; Vicente, A.A.; Teixeira, J.A.; Dragone, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella Vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2013**, *139*, 149–154.
43. Yeh, K.L.; Chang, J.S.; Chen, W.M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Eng. Life Sci.* **2010**, *10*, 201–208. [\[CrossRef\]](#)
44. Mokashi, K.; Shetty, V.; George, S.; Sibi, G. Sodium Bicarbonate as Inorganic Carbon Source for Higher Biomass and Lipid Production Integrated Carbon Capture in *Chlorella vulgaris*. *Achiev. Life Sci.* **2016**, *10*, 111–117. [\[CrossRef\]](#)
45. Molazadeh, M.; Danesh, S.; Ahmadzadeh, H.; Pourianfar, H.R. Influence of CO₂ concentration and N:P ratio on *Chlorella vulgaris*-assisted nutrient bioremediation, CO₂ biofixation and biomass production in a lagoon treatment plant. *J. Taiwan Inst Chem Eng.* **2019**, *96*, 114–120. [\[CrossRef\]](#)
46. Rodas-Gaitán, H.A.; Rodríguez-Fuentes, H.; Luna-Maldonado, A.I.; Alcalá Jáuregui, J.; Vidales-Contreras, J.A.; Flores-Breceda, H. Biomass production and quality estimation of *Chlorella vulgaris*(clv2) under large scale production conditions. *JEBAS* **2016**, *4*, 493–498. [\[CrossRef\]](#)
47. Aishvarya, V.; Pradhan, N.; Nayak, R.R.; Sukla, L.B.; Mishra, B.K. Enhanced inorganic carbon uptake by *Chlorella* sp. IMMTCC-2 under autotrophic conditions for lipid production and CO₂ sequestration. *J. Appl. Phycol.* **2012**, *24*, 1455–1463. [\[CrossRef\]](#)
48. Salbitani, G.; Bolinesi, F.; Affuso, M.; Carraturo, F.; Mangoni, O.; Carfagna, S. Rapid and Positive Effect of Bicarbonate Addition on Growth and Photosynthetic Efficiency of the Green Microalgae *Chlorella Sorokiniana* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 4515. [\[CrossRef\]](#)

49. Abinandan, S.; Shanthakumar, S. Evaluation of photosynthetic efficacy and CO₂ removal of microalgae grown in an enriched bicarbonate medium. *3 Biotech* **2016**, *6*, 9. [\[CrossRef\]](#)
50. Patyna, A.; Biłos, Ł.; Placzek, M.; Witczak, S. Productivity of microalgae *Chlorella vulgaris* in laboratory condition. *Ecol. Eng.* **2017**, *18*, 99–105.
51. Tossavainen, M.; Lahti, K.; Edelmann, M.; Eskola, R.; Lampi, A.M.; Piironen, V.; Korvonen, P.; Ojala, A.; Romantschuk, M. Integrated utilization of microalgae cultured in aquaculture wastewater: Wastewater treatment and production of valuable fatty acids and tocopherols. *J. Appl. Phycol.* **2019**, *31*, 1753–1763. [\[CrossRef\]](#)
52. Jegan, G.; Mukund, S.; Senthilkumarand, N.S.; Vallinayagam, R.R. Influence of different concentrations of sodium bicarbonate on growth rate and biochemical composition of microalgae. *J. Algal Biomass Utiln.* **2013**, *4*, 81–87.
53. Chi, Z.; Elloy, F.; Xie, Y.; Hu, Y.; Chen, S. Selection of microalgae and cyanobacteria strains for bicarbonate-based integrated carbon capture and algae production system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 447–457. [\[CrossRef\]](#)
54. Chen, H.; Jiang, J.G. Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity. *J. Cell Physiol.* **2009**, *219*, 251–258. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Ishika, T.; Moheimani, N.R.; Bahri, P.A.; Laird, D.W.; Blair, S.; Parlevliet, D. Halo-adapted microalgae for fucoxanthin production: Effect of incremental increase in salinity. *Algal Res.* **2017**, *28*, 66–73. [\[CrossRef\]](#)
56. White, D.A.; Pagarette, A.; Rooks, P.; Ali, S.T. The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 153–165. [\[CrossRef\]](#)
57. Li, J.; Li, C.; Lan, C.G.; Liao, D. Effects of sodium bicarbonate on cell growth, lipid accumulation, and morphology of *Chlorella vulgaris*. *Microb. Cell Factories* **2018**, *17*, 111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Bywaters, K.F.; Fritsen, C.H. Biomass and neutral lipid production in geothermal microalgal consortia. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *2*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Sampathkumar, S.J.; Gothandam, K.M. Sodium bicarbonate augmentation enhances lutein biosynthesis in green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *22*, 101406. [\[CrossRef\]](#)
60. Pimolrat, P.; Direkbusarakom, S.; Chinajariyawong, C.; Powtongsook, S. The effect of sodium bicarbonate concentrations on growth and biochemical composition of *Chaetoceros gracilis* Schutt. *Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull.* **2010**, *34*, 40–47.
61. Delgadillo-Mirquez, L.; Lopes, F.; Taidi, B.; Pareau, D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Rep.* **2016**, *11*, 18–26. [\[CrossRef\]](#)
62. Salbitani, G.; Barone, C.M.A.; Carfagna, S. Effect of bicarbonate on growth of the oleaginous microalga *Botryococcus braunii*. *Int. J. Plant. Biol.* **2019**, *10*, 8273. [\[CrossRef\]](#)
63. Moheimani, N.R. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* **2013**, *25*, 387–398. [\[CrossRef\]](#)
64. Ryu, H.J.; Oh, K.K.; Kim, Y.S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. *J. Ind. Eng. Chem.* **2009**, *15*, 471–475. [\[CrossRef\]](#)
65. Prabakaran, P.; Ravindran, A.D. Lipid extraction and CO₂ mitigation by microalgae. *J. Biochem. Technol.* **2012**, *4*, 469–472.
66. Nayak, M.; Suh, W.I.; Lee, B.; Chang, K.C. Enhanced carbon utilization efficiency and FAME production of *Chlorella* sp. HS2 through combined supplementation of bicarbonate and carbon dioxide. *Energy Convers. Manag.* **2018**, *156*, 45–52. [\[CrossRef\]](#)
67. Tang, D.; Han, W.; Li, P.; Miao, X.; Zhong, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3071–3076. [\[CrossRef\]](#)
68. Molino, A.; Mehariya, S.; Karatza, D.; Chianese, S.; Iovine, A.; Casella, P.; Marino, T.; Musmarra, D. Bench-Scale Cultivation of Microalgae *Scenedesmus almeriensis* for CO₂ Capture and Lutein Production. *Energies* **2019**, *12*, 2806. [\[CrossRef\]](#)
69. Aussant, J.; Guihéneuf, F.; Stengel, D.B. Impact of temperature on fatty acid composition and nutritional value in eight species of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 5279–5297. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Article

Efficient Production of Microalgal Biomass – Step by Step to Industrial Scale

Małgorzata Hawrot-Paw *  and Patryk Ratowski 

Department of Renewable Energy Engineering, Faculty of Environmental Management and Agriculture,
West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland;
patryk.ratowski@zut.edu.pl

* Correspondence: malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl

Abstract: The production of microalgal biomass on a commercial scale remains a significant challenge. Despite the positive results obtained in the laboratory, there are difficulties in obtaining similar results in industrial photobioreactors. Changing the cultivation conditions can affect not only the growth of microalgae but also their metabolism. This is of particular importance for the use of biomass for bioenergy production, including biofuel production. The aim of this study was to determine the biomass production efficiency of selected microalgal strains, depending on the capacity of the photobioreactor. The lipid and ash content of the biomass were also taken into account. It was found that as the scale of production increased, the amount of biomass decreased, irrespective of the type of strain. The change in scale also affected the lipid content of the biomass. The highest values were found in 2.5 L photobioreactors (ranging from $26.3 \pm 2.2\%$ for *Monoraphidium* to $13.9 \pm 0.3\%$ for *Chlorella vulgaris*). The least favourable conditions were found with industrial photobioreactors, where the lipid content of the microalgal biomass ranged from $7.1 \pm 0.6\%$ for *Oocystis submarina* to $10.2 \pm 1.2\%$ for *Chlorella fusca*. The increase in photobioreactor capacity had a negative effect on the ash content.

Keywords: microalgae; biomass; photobioreactor; laboratory scale; technical scale; productivity; bioenergy; advanced biofuel



Citation: Hawrot-Paw, M.; Ratowski, P. Efficient Production of Microalgal Biomass – Step by Step to Industrial Scale. *Energies* **2024**, *17*, 944. <https://doi.org/10.3390/en17040944>

Academic Editors: Byong-Hun Jeon and José Carlos Magalhães Pires

Received: 7 January 2024

Revised: 12 February 2024

Accepted: 16 February 2024

Published: 18 February 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The use of microalgae for energy purposes depends on the possibility of obtaining sufficient amounts of biomass. An appropriate scale-up strategy is therefore essential for the gradual multiplication of microalgae from the laboratory stage to the industrial production stage. The first step is to create a culture in small-volume shake flasks. Typically, ten percent of the inoculate that is prepared in this way constitutes the input in the next step. In the intermediate stages, photobioreactors with volumes of a few litres and several litres, respectively, are used. Such prepared biological material can be used to inoculate industrial photobioreactors.

The efficiency of biomass production under laboratory conditions is generally high, which is related to the ease of providing suitable conditions for microalgal growth. In large-scale photobioreactors, liquid flow processes and mass exchange may be slower, potentially affecting biomass production efficiency. The average productivity of industrial strains has been found to be lower compared to maximum theoretical estimates [1].

Optimising the culture medium composition prevents the reduction in microalgal growth associated with mineral deprivation [2]. A more significant problem is the abiotic factor. One of the most important cultivation parameters is light, which affects the rate of photosynthesis [3] and biomass production. The optimum irradiance for different algal strains is approximately $26\text{--}400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [4]. To maximise production efficiency, a single microalgal cell should be exposed to a light intensity of approximately $0.2\text{--}0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. At this value, the photosynthetic rate in relation to light intensity

starts to equalise. Due to the self-darkening of the cells, this is difficult, especially at high culture densities [5]. The cells inside the culture receive only part of the radiation, which reduces the light efficiency compared to cells in the outer, light-exposed zone [6]. When cells stay in the illuminated zone for a short time, they are unable to absorb enough photons for photosynthesis, and the rate of volumetric biomass production decreases [7]. Due to the geometry of the different types of photobioreactors, the light pathway and, therefore, the light intensity in the different zones of the photobioreactor will be different. At increasing distances from the exposed side, the light intensity decreases almost exponentially. Both an excess of light, causing photoinhibition, and a deficiency of light, i.e., photolimitation, are disadvantageous for the culture [8]. Light should be distributed throughout the photobioreactor to allow the photons to penetrate the cells [9]. Reducing the light pathway can significantly increase the biomass yield [10]. Microalgae require light for the production of ATP and NADPH and for the synthesis of molecules essential for their growth [11]. Industrial cultures should have a high biomass concentration and the ability to absorb high levels of light, thus limiting losses due to photoinhibition [12]. The efficiency of microalgal biomass production is also determined by the time of illumination. Increasing the light/dark ratio can increase productivity [13,14].

The growth of microalgae depends on the nutrient supply. Elements such as nitrogen and phosphorus are responsible for the metabolic regulation processes. The availability of nutrients is determined by adjusting the pH of a culture medium [15]. The optimum pH range for most microalgae is between six and ten. At acidic conditions, a decrease in nutrient uptake is observed, while high values reduce the ability to assimilate carbon dioxide [16].

It is also possible that, due to modifications in the design of photobioreactors, gas transport may become inefficient [17], so another important parameter in culture is stirring. This process prevents cell sedimentation [18]. Stirring is also important for carbon dioxide transport to photosynthesis [2] and oxygen removal, limiting photorespiration [19]. Culture stirring allows for the efficient use of available light by frequently changing the cell position between zones with appropriate and limited lighting [12]. In photobioreactors, there is a three-phase system: liquid (medium)–gas–solid phase, i.e., microalgae cells [20]. Changing the rate of liquid flow inside the photobioreactor can have a negative effect on the cells related to shear stress. Excessive shear stress can result in reduced cell growth rates and cell viability [21]. The typical linear flow rate in tubular bioreactors is $0.3\text{--}0.5\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ [22]. Increased cell density in culture can affect the culture medium's properties, including gas retention, but the nature of these changes is not clear [23]. In vertical tubular photobioreactors, large gas bubbles rising rapidly can direct smaller bubbles towards the walls. Due to the high shear rate, they can break up [24], which can affect the stability of the flow throughout the volume. As a result of the stirring process in photobioreactors, microalgal cells are also subject to rapid changes in the light–dark cycle [2].

The aim of this study was to determine the biomass yield of selected microalgal strains in relation to the scale of production. Vertical tubular laboratory photobioreactors and those used on an industrial scale were used in the experiments. The capacity of the photobioreactors was selected according to the successive stages of culture on an enlarged scale, ranging from a few to several tens of litres. This study assessed the efficiency of the biomass production at each stage, as well as the content of lipids and ash, the amount of which is important in the energetic use of biomass.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae Strains

A total of six strains of microalgae were used in the study. The genus *Scenedesmus* was from the Department of Renewable Energy Engineering's own collection; the other five strains (*Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Oocystis submarina*, *Chlorella minutissima*, and *Monoraphidium*) were obtained from the Culture Collection of Baltic Algae (CCBA).

2.1. Preincubation

Microalgae cultures were stored in F/2 liquid medium at 4 °C under LED illumination for a 12/12 h cycle (light/dark). The inoculum culture was prepared in 1000 mL culture bottles containing 500 mL of F/2 medium, pH 7, which was inoculated with 50 mL of individual microalgae suspension. Preculture conditions were 23 ± 1 °C, with a light intensity of $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and illumination for 12/12 h cycle (light/dark). SonT Agro sodium lamps (High Pressure Sodium, HPS; PHILIPS, Amsterdam, The Netherlands) were used to illuminate the culture. Carbon dioxide for photosynthesis was supplied with atmospheric air using a $7.2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ membrane pump (HAILEA ACO-9602, Guangdong, China). The cultures were continued for 7 consecutive days.

2.2. Experimental Setup

During the experiment, vertical tubular photobioreactors of various total volumes were used: 2.5 L, 14 L, and 100 L with diameters of 80, 200, and 242 mm. Depending on the total volume, the photobioreactors were filled with 2 L, 12 L, or 80 L of F/2 nutrient solution at pH 7. Next, a 7-day inoculum was introduced in volumes of 0.2 L, 1.2 L, and 8.0 L, respectively. The changes in the culture medium pH were not analysed during the experiment. Mixing in the photobioreactors was provided by $2 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ membrane pumps (Aqua Medic Mistral 2000, Bissendorf, Germany) for the 2.5 L photobioreactor, $14 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (HAILEA ACO-9620, Guangdong, China) for the 14 L photobioreactor, and $240 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ (HAILEA ACO-300A, Guangdong, China) for the 100 L photobioreactor. All cultures were carried out at 23 ± 1 °C. An LED light at $285 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was used for illumination, with an 18/6 h light/dark cycle. The light sources were 1200×50 mm light bars placed above the photobioreactors at a height that provided appropriate illumination. The experiment was carried out as a batch culture for 15 days. The study determined biomass growth dynamics, average biomass content, biomass productivity, and lipid and ash content.

2.3. Analytical Methods

The biomass content of the culture was assessed by the gravimetric method using a moisture analyser (AXIS ATS60, Gdansk, Poland). The methodology was described in an earlier paper [14]. The results were converted and reported in $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The measurement was carried out at the beginning of the experiment and then after 5, 10, and 15 days of culture.

Lipid content was determined by gravimetric analysis after extraction of the biomass with a solvent mixture (chloroform-methanol) using the method according to Bligh and Dyer [25]. The analysis was carried out after the evaporation of the extracting solvents, based on the equation given below:

$$\text{LC} = \frac{\text{mL}}{\text{mDAB}} \cdot 100$$

where LC = lipid content; mL = lipid mass (g); mDAB = dry biomass of microalgae (g).

The ash content of the biomass was determined gravimetrically according to PN-EN ISO 18122:2016-01 [26]. A total of 0.2 grammes of microalgal biomass, dried at 105 °C, was weighed into porcelain crucibles and placed at 550 °C for 6 h. The results were recalculated and given as a percentage.

2.4. Statistical Analysis

The data were presented as mean values $\pm$ standard deviation of the mean. The results were evaluated using an analysis of variance (ANOVA) with Statistica ver. 13.1 by StatSoft. A post hoc Tukey's tests was performed at a statistical significance of $p \leq 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Algal Biomass Concentration

The growth of microalgal biomass in the 2.5 L photobioreactors is shown in Figure 1A. At the beginning of the experiment, the biomass content in particular photobioreactors ranged from $135 \pm 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *C. minutissima* to $212 \pm 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *C. vulgaris* and *C. fusca*. On the first measurement date, after 5 days of cultivation, the highest biomass increase was observed for *Scenedesmus* ($770 \pm 20.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). A slightly lower value was obtained for *C. fusca* ($716 \pm 11.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). During the following days, the biomass gradually increased in all photobioreactors. After 15 days of culture, the highest values were determined for *C. fusca* ($1072 \pm 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and *Scenedesmus* ($1063 \pm 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). No lag phase was observed in the 2.5 L photobioreactors, indicating favourable environmental conditions after the inoculation of the culture medium. This could have been the result of efficient stirring of the culture medium [27] and appropriate light transmission [28], parameters that characterise cultures cultivated in smaller capacity photobioreactors [29]. Nguyen et al. [30] achieved a stationary growth phase for *C. vulgaris* as late as day 18 of culture. In contrast, Han et al. [31], in a 3 dm^3 photobioreactor, observed biomass growth for *S. quadricauda* up to day 13 of the experiment. In an earlier study [14] in a *C. vulgaris* culture, the stationary phase was determined as early as day 10 of culture, with cultures illuminated with a SON-T Agro sodium light.

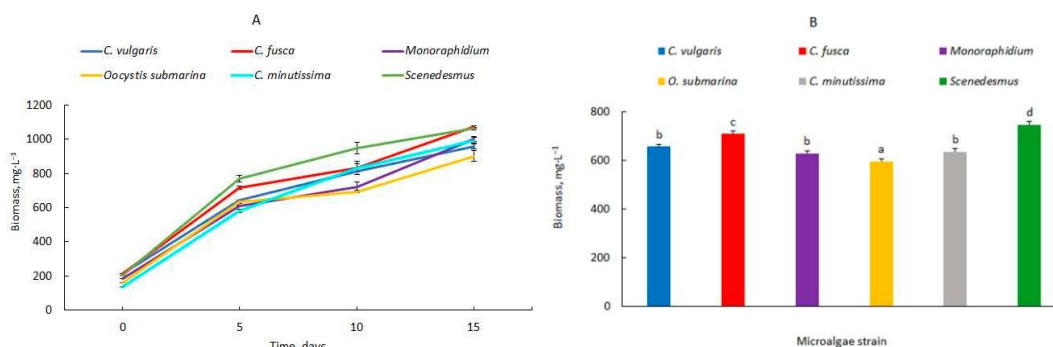


Figure 1. Dynamics of changes in biomass content (A) and average biomass content in the culture, (B) fotobioreaktor 2.5 L; mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$).

The mean microalgal biomass content, shown in Figure 1B, ranged from $596 \pm 10.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (*O. submarina*) to $747 \pm 15.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (*Scenedesmus*).

The dynamics of microalgal biomass changes in 14 L photobioreactors are shown in Figure 2A. Although the parameters of the culture medium pH, temperature, and light intensity were the same, differences in the growth of the individual microalgal strains were observed. The highest biomass was found after 10 days for *O. submarina* ($1039 \pm 12.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). In the other photobioreactors, the values were lower and ranged from $558 \pm 9.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *C. fusca* to $749 \pm 9.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *Scenedesmus*. After 15 days, biomass growth was observed for *C. vulgaris*, *C. fusca*, *C. minutissima*, and *Monoraphidium*. For *O. submarina* and *Scenedesmus* strains, the amount of biomass decreased from the 10th day of incubation onwards. These differences are a result of the nutritional requirements of the individual algal species [32]. The main variable parameters in this stage were the volume of the photobioreactor and the related requirements for a higher flow rate pump. The biomass production can therefore be increased by selecting a suitable culture medium composition. Another way to achieve high growth rates is to optimise the environmental conditions [33]. In the present study, culture-relevant parameters such as pH and temperature were in ranges that are considered suitable for most microalgae.

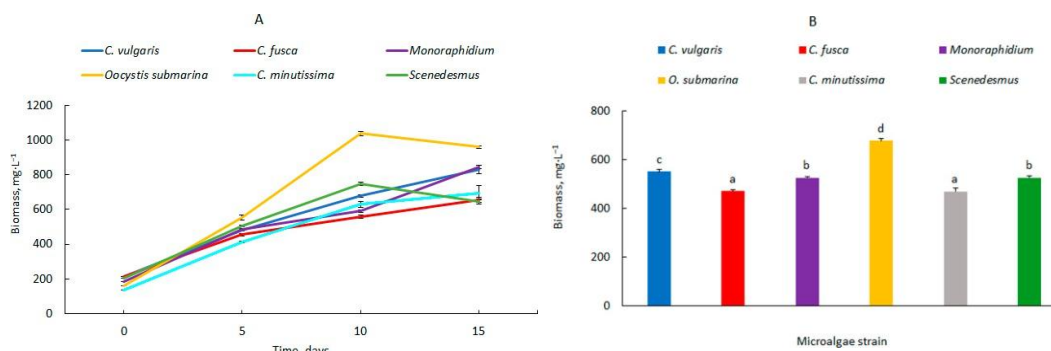


Figure 2. Dynamics of changes in biomass content (A) and average biomass content in the culture, (B) fotobioreaktor 14 L; mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

The average amount of microalgal biomass in the 14-litre photobioreactors is shown in Figure 2B. It ranges from $469 \pm 16.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *C. minutissima* to $677 \pm 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *O. submarina*.

In the 100 L photobioreactors, the growth rate was lower compared to the smaller photobioreactor volumes presented in this study (Figure 3A). The highest growth was observed for the genus *Scenedesmus*, from $203 \pm 0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (day 0) to $524 \pm 13.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (day 15). Significantly lower values were recorded for *C. vulgaris*, *Monoraphidium*, and *O. submarina*. The biomass content on the last day of culture was 305 ± 14.0 , 396 ± 8.1 , and $343 \pm 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. For *C. fusca* and *C. minutissima*, the stationary phase of growth started between days 5 and 10 of cultivation. A similar relation was also presented by Kim et al. [34], who analysed the optimal conditions for *Chlorella* sp., *Dunaliella salina*, and *Dunaliella* sp. and observed growth up to day 8 of culture. According to Min et al. [35], a much larger culture volume complicates light availability, but theoretically, in barbotage-based columns, as in the study presented here, the cross-shading of cells with constant stirring of the photobioreactor should not affect the results so much. Gas exchange, including carbon dioxide fixation in the culture medium, may be more important. Oxygen accumulation in photobioreactors also has a negative impact on microalgal growth [36,37]. In industrial photobioreactors, higher efficiency pumps are used to prevent cell sedimentation and ensure proper CO₂ and O₂ transfer. The hydrodynamic stresses under such conditions may also be responsible for the reduced growth rate of microalgae. The cell damage due to intensive stirring is confirmed by Camacho et al. [38]. In the case of animal cells, damage occurred during the bursting of gas bubbles [39]. A similar mechanism cannot be excluded for microalgae grown in photobioreactors.

The average biomass content in the individual photobioreactors over the entire experimental period is shown in Figure 3B. Biomass amounts ranged from $189 \pm 5.9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (*C. minutissima*) to $369 \pm 7.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (*Scenedesmus*). There are many possibilities to increase the production of microalgal biomass, including by increasing the amount of nutrients in the culture medium or increasing the light intensity of the culture [32,40]. In the present study, the composition of the culture medium and the same environmental parameters for cultivation were maintained at each stage, but the microalgal biomass decreased.

The highest productivity of microalgal biomass (Table 1), irrespective of the scale of culture, was observed during the first 5 days of the experiment. The values range from $85.6 \pm 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (*Monoraphidium*) to $113.5 \pm 4.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (*Scenedesmus*). These values decreased on subsequent days, and after 15 days, a maximum value of $57.4 \pm 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was determined for *Scenedesmus* and *C. fusca*. An increase in photobioreactor volume up to 14 L generally reduced productivity. A similar situation was

observed in 100 L photobioreactors. The results obtained were below the data available in the literature [41].

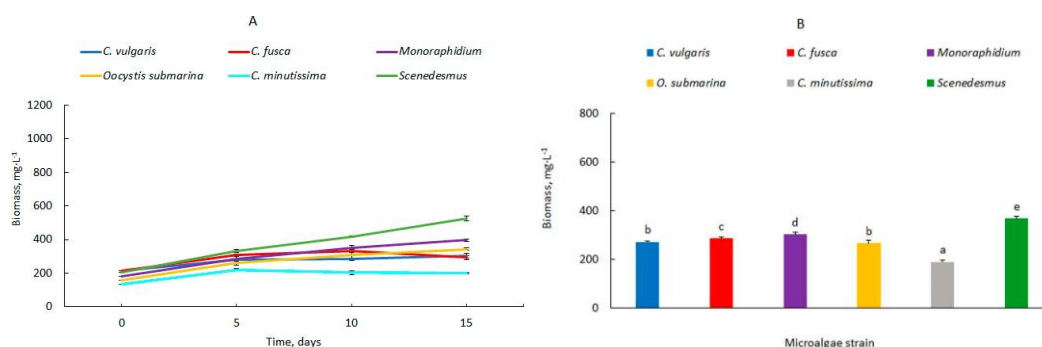


Figure 3. Dynamics of changes in biomass content (A) and average biomass content in the culture (B) 100 L; mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

Table 1. Comparison of biomass productivity obtained with different microalgal strains.

Photobioreactor Capacity, L	Microalgae	Biomass Productivity (mg·L ⁻¹ ·d ⁻¹)		
		Day 5	Day 10	Day 15
25	<i>Chlorella vulgaris</i>	86.1 ± 0.2 ^{ex}	60.0 ± 1.9 ^{bc}	49.6 ± 1.0 ^a
	<i>Chlorella fusca</i>	100.8 ± 2.2 ^g	62.0 ± 3.9 ^c	57.4 ± 0.5 ^{bc}
	<i>Monoraphidium</i>	85.6 ± 0.7 ^e	53.7 ± 2.9 ^{ab}	54.6 ± 1.0 ^{ab}
	<i>Oocystis submarina</i>	94.8 ± 1.2 ^{fg}	53.6 ± 0.5 ^{ab}	49.6 ± 2.1 ^a
	<i>Chlorella minutissima</i>	89.1 ± 1.6 ^{ef}	69.8 ± 2.4 ^d	57.2 ± 1.0 ^{bc}
	<i>Scenedesmus</i>	113.5 ± 4.1 ^h	74.6 ± 3.4 ^d	57.4 ± 0.5 ^{bc}
14	<i>Chlorella vulgaris</i>	54.0 ± 1.1 ^h	46.5 ± 0.9 ^{ef}	41.3 ± 1.6 ^{cd}
	<i>Chlorella fusca</i>	48.7 ± 1.4 ^f	34.6 ± 0.9 ^b	29.6 ± 1.0 ^a
	<i>Monoraphidium</i>	60.5 ± 1.0 ⁱ	40.7 ± 0.8 ^{cd}	44.2 ± 0.6 ^{de}
	<i>Oocystis submarina</i>	79.1 ± 2.7 ^j	88.1 ± 1.2 ^j	53.4 ± 0.4 ^{gh}
	<i>Chlorella minutissima</i>	55.7 ± 1.0 ^h	49.5 ± 1.8 ^{fg}	37.4 ± 2.8 ^{bc}
	<i>Scenedesmus</i>	60.1 ± 0.8 ⁱ	54.6 ± 0.9 ^h	29.6 ± 1.0 ^a
100	<i>Chlorella vulgaris</i>	14.0 ± 0.8 ^{bcd}	7.1 ± 0.6 ^a	6.2 ± 0.9 ^a
	<i>Chlorella fusca</i>	18.9 ± 1.6 ^{efg}	11.9 ± 0.8 ^b	5.3 ± 0.9 ^a
	<i>Monoraphidium</i>	20.0 ± 2.8 ^{fg}	16.6 ± 1.5 ^{cdef}	14.2 ± 0.5 ^{bcd}
	<i>Oocystis submarina</i>	20.7 ± 3.2 ^{fg}	14.9 ± 2.1 ^{bcd}	12.3 ± 0.5 ^{bc}
	<i>Chlorella minutissima</i>	16.9 ± 1.4 ^{defg}	6.8 ± 1.1 ^a	4.3 ± 0.4 ^a
	<i>Scenedesmus</i>	25.9 ± 2.2 ^h	21.3 ± 0.5 ^g	21.4 ± 0.9 ^{gh}

* Means marked with the same letters in each column do not differ significantly at $p < 0.05$, according to Tukey's test. Data are presented as mean ± SD.

3.1. Lipid Content

The lipid content of the biomass is shown in Figure 4. The high lipid content of the microalgal biomass determines its potential utilisation in biodiesel production [42]. The highest values were found for cultures cultivated in photobioreactors of 2.5 L capacity. In general, increasing the volume of the photobioreactor decreased the lipid content of the biomass. There was one exception for the *C. fusca* strain, where the lipid content in the 100 L volume photobioreactor was higher compared to the 14 L capacity, $10.2 \pm 1.2\%$ versus $6.4 \pm 1.1\%$, respectively. The decrease in lipids in the biomass of microalgae grown in the 14 L photobioreactor ranged from 25% (*Scenedesmus*) to 57% (*C. fusca*). In 100 L photobioreactors, lipid reduction ranged from 32% (*C. fusca*) to 64% (*Monoraphidium*). The

lower lipid content in higher capacity photobioreactors may be related to the differential transmission of light in the culture medium. According to Amaro et al. [43], the appropriate kind of lighting and light intensity can potentially increase lipid content between 25 and 42%. Also, the shape of the photobioreactor and the method of culture stirring could have a strong influence on the lipid accumulation potential [44,45]. In the present study, the highest lipid accumulation rate for the highest photobioreactor capacity was observed for *Monoraphidium* ($10 \pm 1.2\%$). The average amount of lipids for this strain ranged from 5 to 58% [46].

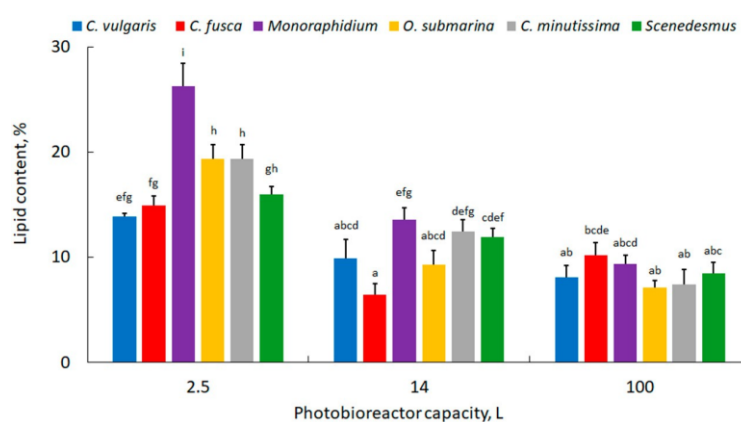


Figure 4. Lipid content in microalgal biomass; mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

In different capacity photobioreactors, the optimal conditions for the growth of the same microalgal strains may be significantly different (Table 2); thus, Rodolfi et al. [47] indicate that a more important property than the high lipid content of the cells may be the lipid yield per unit area.

Table 2. Comparison of microalgal biomass production and lipid yield during different cultivation conditions.

Microalgal strain	Cultivation system and capacity; L	Max dry biomass, mg L ⁻¹	Max lipid content, %	References
<i>C. vulgaris</i>	conical flask; 0.2	-	56.6	[48]
	tubular; 2.0	1700	42	[49]
	conical flask; 2.0	1420	17.6	[50]
	tubular; 2.5	656 ± 8.7	13.9 ± 0.3	this study
	tubular; 14	551 ± 9.7	9.9 ± 1.8	this study
	flat-plate; 25	1200	-	[51]
	tubular; 100	271 ± 6.0	8.1 ± 1.1	this study
	tubular; 100	572	26	[52]
<i>C. fusca</i>	Erlenmeyer flasks; 0.25	6500	31	[53]
	cylindrical reactors; 1.5	-	16.7	[54]
	tubular vertical; 2.0	1940	13.2	[55]
	tubular; 2.5	708 ± 14.3	14.9 ± 0.9	this study
	tubular; 14	470 ± 7.8	6.4 ± 1.1	this study
	tubular; 100	286 ± 7.3	10.2 ± 1.2	this study
	tubular; 100	292	14	[56]

Table 2. Cont.

Microalgal strain	Cultivation system and capacity; L	Max dry biomass, mg L ⁻¹	Max lipid content, %	References
<i>Monoraphidium</i>	Erlenmeyer flasks; 0.5	1518	52.8	[57]
	bottles PET; 0.5	481	17.8	[58]
	tubular; 2.5	629 ± 11.8	26.3 ± 2.2	this study
	vertical glass bottles; 3	-	23.4	[59]
	tubular; 14	526 ± 5.2	13.6 ± 1.1	this study
	tubular; 14	3790	18.5	[60]
	tubular; 100	303 ± 9.3	9.3 ± 0.8	this study
<i>Oocystis submarina</i>	tubular; 100	525	14	[56]
	Erlenmeyer flasks; 0.1	2.80·10 ⁶ [cells mL ⁻¹]	43.47 [mg·L ⁻¹]	[61]
	tubular; 2.5	596 ± 10.6	19.3 ± 1.4	this study
	tubular; 14	677 ± 8.0	9.3 ± 1.3	this study
	tubular; 100	267 ± 11.0	7.1 ± 0.6	this study
<i>C. minutissima</i>	tubular; 100	508	12	[56]
	conical flask; 0.65	1240	50.0	[62]
	vertical tubular; 2.0	1550	-	[63]
	tubular; 2.5	636 ± 11.8	19.3 ± 1.4	this study
	tubular; 14	469 ± 16.3	12.5 ± 1.1	this study
	ILIPBR; 20	443	21.4	[64]
<i>Scenedesmus</i>	tubular; 100	369 ± 7.3	7.4 ± 1.4	this study
	bottles PET; 0.5	1264	10.3	[58]
	bottles; 1	560	32	[65]
	tubular; 2.5	747 ± 15.4	16 ± 0.7	this study
	tubular; 14	526 ± 7.1	12 ± 0.8	this study
	column air-lift; 80	900	25	[66]
	tubular; 100	369 ± 7.3	8.5 ± 1.0	this study

3.1. Ash Content

The microalgal biomass ash content is shown in Figure 5. This parameter is important when the biomass is intended as feedstock for biofuel production. An excessive ash content has a negative impact on biofuel properties [67]. In the presented study, the lowest values were recorded for strains grown in 2.5 L photobioreactors and ranged from 7.8 ± 0.2% for *C. fusca* to 11.3 ± 0.5% for *C. vulgaris*. When the culture scale was increased to 14 L, there was an increase in ash biomass, with values ranging from 17.3 ± 1.1% for *C. minutissima* to 21.6 ± 0.3% for *Monoraphidium*. Metsoviti et al. [68] cultivated *C. vulgaris* in a 25 L photobioreactor and determined an ash content of approximately 12%. In this study, compared to the 14 litre capacity, the ash content for *C. vulgaris*, *Monoraphidium*, *C. minutissima*, and *Scenedesmus* increased by 11, 1, 45, and 33%. In the biomass of *C. fusca* and *O. submarina*, the ash content decreased slightly to 11.1 ± 0.3 and 13.4 ± 0.4%, respectively. The ash content of the biomass varied depending on the microalgae species and the culture methods and growing conditions [69–71]. In our previous studies, the decrease in ash content was associated with a limited nutrient availability [56]. In the present study, the culture medium was used in complete composition at all steps, and a reduction in ash content was noted at the industrial stage for only two microalgae species. However, at the same time, the increase in lipid content that is reported under stress conditions was not observed.

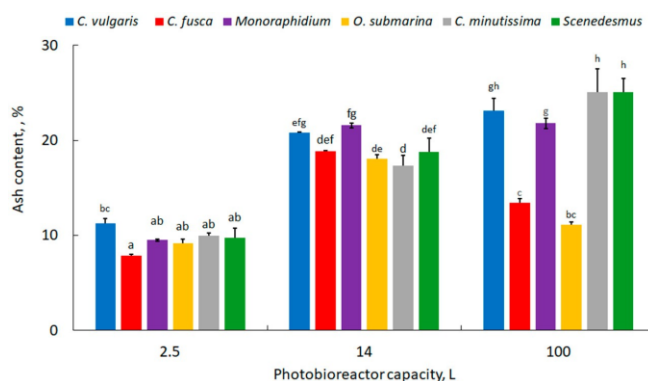


Figure 5. Ash content in microalgal biomass; mean over each column not marked with the same letter is significantly different at $p \leq 0.05$.

4. Conclusions

In this study, the relation between the photobioreactor capacity and microalgae growth was analysed according to the amount of biomass. As the scale of cultivation increased, there was a decrease in biomass production and cellular lipid content with an increase in ash content. In the case of the *Scenedesmus* strain, the large increase in biomass did not result in significant differences in lipid and ash content. The highest lipid content and lower ash content of the biomass in the highest capacity 100 L photobioreactor were recorded for *C. fusca*. The data presented here represent the real amounts of biomass that can be obtained during biomass cultivation on an industrial scale compared to yields obtained under laboratory conditions. According to the authors, they can be useful in assessing the potential for commercial-scale biomass production.

Author Contributions: Conceptualisation, M.H.-P., methodology, M.H.-P.; validation, M.H.-P. and P.R.; formal analysis, P.R.; investigation, M.H.-P. and P.R.; writing—original draft preparation, M.H.-P. and P.R.; writing—review and editing, M.H.-P. and P.R.; visualisation, M.H.-P. and P.R.; supervision, M.H.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Benedetti, M.; Vecchi, V.; Barera, S.; Dall'Osto, L. Biomass from microalgae: The potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb. Cell Factories* **2018**, *17*, 173. [\[CrossRef\]](#)
- Pruvost, J.; Le Borgne, F.; Artu, A.; Cornet, J.F.; Legrand, J. Chapter Five – Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts. In *Advances in Chemical Engineering*; Legrand, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; Volume 48, pp. 257–310. [\[CrossRef\]](#)
- Mulders, K.J.M.; Lamers, P.P.; Martens, D.E.; Wijffels, R.H. Phototrophic pigment production with microalgae: Biological constraints and opportunities. *J. Phycol.* **2014**, *50*, 229–242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Maltsev, Y.; Maltseva, K.; Kulikovskiy, M.; Maltseva, S. Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology* **2021**, *10*, 1060. [\[CrossRef\]](#)
- Masojidek, J.; Kopecký, J.; Giannelli, L.; Torzillo, G. Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 307–317. [\[CrossRef\]](#)
- Sforza, E.; Simionato, D.; Giacometti, G.M.; Bertucco, A.; Morosinotto, T. Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zarmi, Y.; Bel, G.; Aflalo, C. Theoretical Analysis of Culture Growth in Flat-Plate Bioreactors: The Essential Role of Timescales. In *Handbook of Microalgal Culture*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013. [\[CrossRef\]](#)
- Huang, Q.; Jiang, F.; Wang, L.; Yang, C. Design of Photobioreactors for Mass Cultivation of Photosynthetic Organisms. *Engineering* **2017**, *3*, 318–329. [\[CrossRef\]](#)

9. Loera-Quezada, M.M.; Angeles, G.; Olguín, E.J. Effect of irradiance on the cell density, size and lipid accumulation of *Neochloris oleoabundans*. *Rev. Latinoam. Biotechnol. Ambient. Algal* **2011**, *2*, 81–92.
10. González-Camejo, J.; Aparicio, S.; Jiménez-Benítez, A.; Pachés, M.; Ruano, M.V.; Borrás, L.; Barat, R.; Seco, A. Improving membrane photobioreactor performance by reducing light path: Operating conditions and key performance indicators. *Water Res.* **2020**, *172*, 115518. [\[CrossRef\]](#)
11. Li, Y.; Zhou, W.; Hu, B.; Min, M.; Chen, P.; Ruan, R.R. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoides* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2222–2229. [\[CrossRef\]](#)
12. Fernández del Olmo, P.; Acien, F.G.; Fernández-Sevilla, J.M. Analysis of productivity in raceway photobioreactor using computational fluid dynamics particle tracking coupled to a dynamic photosynthesis model. *Bioresour. Technol.* **2021**, *334*, 125226. [\[CrossRef\]](#)
13. Rai, M.P.; Gautam, T.; Sharma, N. Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *Online J. Biol. Sci.* **2015**, *15*, 260–267. [\[CrossRef\]](#)
14. Ratonski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* biomass in tubular photobioreactors during different culture conditions. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3106. [\[CrossRef\]](#)
15. Juneja, A.; Ceballos, R.M.; Murthy, G.S. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* **2013**, *6*, 4607–4638. [\[CrossRef\]](#)
16. Rai, S.V.; Rajashekhar, M. Effect of pH, salinity and temperature on the growth of six species of marine phytoplankton. *J. Algal Biomass Util.* **2014**, *5*, 55–59.
17. Carvalho, A.P.; Silva, S.O.; Baptista, J.M.; Malcata, F.X. Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1275–1288. [\[CrossRef\]](#)
18. Legrand, J.; Artu, A.; Pruvost, J. A review on photobioreactor design and modelling for microalgae production. *React. Chem. Eng.* **2021**, *6*, 1134–1151. [\[CrossRef\]](#)
19. Schediwy, K.; Trautmann, A.; Steinweg, C.; Posten, C. Microalgal kinetics—A guideline for photobioreactor design and process development. *Eng. Life Sci.* **2019**, *19*, 830–843. [\[CrossRef\]](#)
20. Posten, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 165–177. [\[CrossRef\]](#)
21. Wang, C.; Lan, C.Q. Effects of shear stress on microalgae—A review. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 986–1002. [\[CrossRef\]](#)
22. Chisti, Y. Fermentation (industrial) Basic Considerations. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd ed.; Batt, C.A., Tortorello, M.L., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 751–761.
23. Luzi, G.; McHardy, C. Modeling and Simulation of Photobioreactors with Computational Fluid Dynamics—A Comprehensive Review. *Energies* **2022**, *15*, 3966. [\[CrossRef\]](#)
24. Lucas, D.; Tomiyama, A. On the role of the lateral lift force in poly-dispersed bubbly flows. *Int. J. Multiph. Flow.* **2011**, *37*, 1178–1190. [\[CrossRef\]](#)
25. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. PN-EN ISO 18122:2016-01; Biopaliwa Stałe—Oznaczenie zawartości Popiołu. Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 2016. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-18122-2016-01p.html> (accessed on 26 April 2021). (In Polish)
27. Borowitzka, M.A.; Vonshak, A. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *Eur. J. Phycol.* **2017**, *52*, 407–418. [\[CrossRef\]](#)
28. Yun, Y.S.; Park, J.M. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 765–770. [\[CrossRef\]](#)
29. Hadiyanto, H.; Elmore, S.; Van Gerven, T.; Stankiewicz, A. Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. *Chem. Eng. J.* **2013**, *217*, 231–239. [\[CrossRef\]](#)
30. Nguyen, L.; Nguyen, D.K.; Nguyen, T.; Nguyen, B.; Nghiem, T.X. Analysis of Microalgal Density Estimation by Using LASSO and Image Texture Features. *Sensors* **2023**, *23*, 2543. [\[CrossRef\]](#)
31. Han, F.; Pei, H.; Hu, W.; Song, M.; Ma, G.; Pei, R. Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. *Energy Convers. Manag.* **2015**, *90*, 315–322. [\[CrossRef\]](#)
32. de Alva, M.S.; Luna-Pabello, V.M.; Cadena, E.; Ortiz, E. Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 744–748. [\[CrossRef\]](#)
33. Hawrot-Paw, M.; Saładek, M. Optimization of Microalgal Biomass Production in Vertical Tubular Photobioreactors. *Energies* **2023**, *16*, 2429. [\[CrossRef\]](#)
34. Kim, W.; Park, J.M.; Gim, G.H.; Jeong, S.-H.; Kang, C.M.; Kim, D.-J.; Kim, S.W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 19–27. [\[CrossRef\]](#)
35. Min, M.; Wang, L.; Li, Y.; Mohr, M.J.; Hu, B.; Zhou, W.; Chen, P.; Ruan, R. Cultivating *Chlorella* sp. in a Pilot-Scale Photobioreactor Using Centrate Wastewater for Microalgae Biomass Production and Wastewater Nutrient Removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *165*, 123–137. [\[CrossRef\]](#)
36. Kazbar, A.; Cogne, G.; Urbain, B.; Marec, H.; Le-Gouic, B.; Tallec, J.; Takache, H.; Ismail, A.; Pruvost, J. Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Res.* **2019**, *39*, 101432. [\[CrossRef\]](#)
37. Kishi, M.; Tanaka, K.; Tagawa, M.; Akizuki, S.; Toda, T. Energy-efficient algal culture through aeration-less oxygen removal in a gas-permeable bag photobioreactor. *Algal Res.* **2023**, *69*, 102959. [\[CrossRef\]](#)

38. Camacho, F.G.; Gómez, A.C.; Sobczuk, T.M.; Molina-Grima, E. Effects of mechanical and hydrodynamic stress in agitated, sparged cultures of *Porphyridium cruentum*. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 1045–1050. [\[CrossRef\]](#)
39. Wu, J. Mechanisms of animal cell damage associated with gas bubbles and cell protection by medium additives. *J. Biotechnol.* **1995**, *43*, 81–94. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Dhup, S.; Dhawan, V. Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium* sp. *Bioresour. Technol.* **2014**, *152*, 572–575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Silva, M.; Kamberovic, F.; Uota, S.T.; Kovan, I.-M.; Viegas, C.S.B.; Simes, D.C.; Gangadhar, K.N.; Varela, J.; Barreira, L. Microalgae as Potential Sources of Bioactive Compounds for Functional Foods and Pharmaceuticals. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 5877. [\[CrossRef\]](#)
42. Griffiths, M.J.; Harrison, S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* **2009**, *21*, 493–507. [\[CrossRef\]](#)
43. Amaro, H.M.; Guedes, A.C.; Malcata, F.X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl. Energy* **2011**, *88*, 3402–3410. [\[CrossRef\]](#)
44. Xu, L.; Weathers, P.J.; Xiong, X.-R.; Liu, C.-Z. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 178–189. [\[CrossRef\]](#)
45. Pham, H.-M.; Kwak, H.S.; Hong, M.-E.; Lee, J.; Chang, W.S.; Sim, S.J. Development of an X-Shape airlift photobioreactor for increasing algal biomass and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2017**, *239*, 211–218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ru, I.T.K.; Sung, Y.Y.; Jusoh, M.; Wahid, M.E.A.; Nagappan, T. *Chlorella vulgaris*: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Appl. Phycol.* **2020**, *1*, 2–11. [\[CrossRef\]](#)
47. Rodolfi, L.; Zittelli, G.C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 100–112. [\[CrossRef\]](#)
48. Liu, Z.Y.; Wang, G.C.; Zhou, B.C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 4717–4722. [\[CrossRef\]](#)
49. Feng, Y.; Li, C.; Zhang, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 101–105. [\[CrossRef\]](#)
50. Wong, Y.K.; Ho, Y.H.; Ho, K.C.; Leung, H.M.; Yung, K.K.L. Growth medium screening for *Chlorella vulgaris* growth and lipid production. *J. Aquac. Mar. Biol.* **2017**, *6*, 00143. [\[CrossRef\]](#)
51. Papapolymerou, G.; Karayannis, V.; Besios, A.; Riga, A.; Gougoulas, N.; Spiliotis, X. Scaling-up sustainable *Chlorella vulgaris* microalgal biomass cultivation from laboratory to pilot-plant photobioreactor, towards biofuel. *Glob. Nest J.* **2018**, *21*, 37–42. [\[CrossRef\]](#)
52. Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A. Utilisation of CO₂ from Sodium Bicarbonate to Produce *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes. *Sustainability* **2021**, *13*, 9118. [\[CrossRef\]](#)
53. Jerez, C.G.; Malapascua, J.R.; Sergejevojová, M.; Figueroa, F.L.; Masojedek, J. Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). *Mar. Biotechnol.* **2016**, *18*, 24–36. [\[CrossRef\]](#)
54. Arrojo, M.A.; Regalado, L.; Orquín, J.C.; Figueroa, F.L.; Díaz, R.T.A. Potential of the microalgae *Chlorella fusca* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) for biomass production and urban wastewater phycoremediation. *AMB Express* **2022**, *12*, 43. [\[CrossRef\]](#)
55. Deamici, K.M.; Cardias, B.B.; Costa, J.A.V.; Santos, L.O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. *Process Biochem.* **2016**, *51*, 912–916. [\[CrossRef\]](#)
56. Hawrot-Paw, M.; Ratowski, P.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. *Energies* **2021**, *14*, 7334. [\[CrossRef\]](#)
57. Zhao, Y.; Li, D.; Ding, K.; Che, R.; Xu, J.-W.; Zhao, P.; Li, T.; Ma, H.; Yu, X. Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Bioresour. Technol.* **2016**, *211*, 669–676. [\[CrossRef\]](#)
58. Guerrero-Cabrera, L.; Rueda, J.A.; García-Lozano, H.; Navarro, A.K. Cultivation of *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. algae in batch culture using Nile tilapia effluent. *Bioresour. Technol.* **2014**, *161*, 455–460. [\[CrossRef\]](#)
59. Bogen, C.; Klassen, V.; Wichmann, J.; La Russa, M.; Doebe, A.; Grundmann, M.; Uronen, P.; Kruse, O.; Mussnug, J.H. Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 622–626. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Gałczyńska, M. Sustainable Production of *Monoraphidium* Microalgal Biomass as a Source of Bioenergy. *Energies* **2020**, *13*, 5975. [\[CrossRef\]](#)
61. Klin, M.; Pniewski, F.; Latała, A. Characteristics of the growth rate and lipid production in fourteen strains of Baltic green microalgae. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* **2018**, *47*, 10–18. [\[CrossRef\]](#)
62. Tang, H.; Chen, M.; Garcia, M.E.D.; Abunasser, N.; Ng, K.Y.S.; Salley, S.O. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 2280–2287. [\[CrossRef\]](#)
63. Freitas, B.C.B.; Cassuriaga, A.P.A.; Morais, M.G.; Costa, J.A.V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. *Bioresour. Technol.* **2017**, *238*, 248–253. [\[CrossRef\]](#)
64. Amaral, M.S.; Loures, C.C.A.; Naves, F.L.; Baeta, B.E.L.; Silva, M.B.; Prata, A.M.R. Evaluation of cell growth performance of microalgae *Chlorella minutissima* using an internal light integrated photobioreactor. *J. Environ. Chem. Eng.* **2020**, *8*, 104200. [\[CrossRef\]](#)

65. Di Caprio, F.; Altimari, P.; Toro, L.; Pagnanelli, F. Effect of Lipids and Carbohydrates Extraction on Astaxanthin Stability in *Scenedesmus* sp. *Chem. Eng. Trans.* **2015**, *43*, 205–210. [[CrossRef](#)]
66. Wu, Y.H.; Yu, Y.; Li, X.; Hu, H.Y.; Su, Z.F. Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition. *Bioresour. Technol.* **2012**, *112*, 193–198. [[CrossRef](#)]
67. Vassilev, S.V.; Vassileva, C.G.; Vassilev, V.S. Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. *Fuel* **2015**, *158*, 330–350. [[CrossRef](#)]
68. Metsoviti, M.N.; Papapolymerou, G.; Karapanagiotidis, I.T.; Katsoulas, N. Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants* **2019**, *9*, 31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Adams, J.M.M.; Ross, A.B.; Anastasakis, K.; Hodgson, E.M.; Gallagher, J.A.; Jones, J.M.; Donnison, I.S. Seasonal variation in the chemical composition of the bioenergy feedstock *Laminaria digitata* for thermochemical conversion. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 226–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Laurens, L.M.L.; Dempster, T.A.; Jones, H.D.T.; Wolfrum, E.J.; Van Wychen, S.; McAllister, J.S.P.; Rencenberger, M.; Parchert, K.J.; Gloe, L.M. Algal biomass constituent analysis: Method uncertainties and investigation of the underlying measuring chemistries. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1879–1887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Liu, K. Characterization of ash in algae and other materials by determination of wet acid indigestible ash and microscopic examination. *Algal Res.* **2017**, *25*, 307–321. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Patryk Ratomski, Małgorzata Hawrot-Paw

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Inżynierii Odnawialnych Źródeł Energii

OCENA EFEKTYWNOŚCI METOD ODWADNIANIA BIOMASY MIKROGLONÓW

Streszczenie

Ze względu na rosnące zainteresowanie biomasą mikroglonów, konieczne jest doskonalenie technologii jej produkcji na dużą skalę. Istotnym problemem jest stosunkowo niewielkie zagęszczenie komórek mikroglonów w hodowli. Koszty związane z odwodnieniem i zagęszczeniem biomasy mogą stanowić do 60% kosztów otrzymanego z niej produktu. Celem przeprowadzonych badań było określenie skuteczności separacji komórek mikroglonów z medium hodowlanego metodą wirowania, flokulacji, sedymentacji oraz filtracji. Najwyższą efektywność, rzędu 99%, uzyskano przy zastosowaniu metody wirowania, a nieco niższe wartości (97%) w procesie flokulacji, po wprowadzeniu do hodowli mikroglonów siarczanu cynku oraz chitosanu w dawce $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Słowa kluczowe: mikroalgi, wirowanie, flokulacja, sedymentacja, filtracja

WPROWADZENIE

Biomasa mikroglonów zyskuje na znaczeniu ze względu na możliwość zastosowania jej jako paszy dla zwierząt, suplementu diety, jako źródło nutraceutyków oraz farmaceutyków [EIDA I IN. 2018, CHEM I IN. 2019]. Nie są to jedyne kierunki jej wykorzystania. Rosnące z roku na rok zapotrzebowanie na paliwa oraz wzrost emisji CO_2 związany z ich spalaniem, przyczyniły się do poszukiwania alternatywnych odnawialnych źródeł energii, do których zaliczyć można również biomasę mikroglonów [OH I IN. 2018]. W procesie transformacji biochemicznej oraz termochemicznej z biomasy tej wytworzyć można m.in. biodiesel, bioetanol, butanol, biowodór oraz biometan [ENAMALA I IN. 2018]. Istotną zaletą mikroglonów przeznaczonych na cele energetyczne jest ich znacznie szybszy przyrost w odniesieniu do roślin lądowych i w przeliczeniu na hektar [BEER I IN. 2009]. Komórki mikroglonów do wzrostu wymagają jedynie dostępu do podstawowych składników pokarmowych, światła oraz ditlenku węgla. Istnieje możliwość powiązania hodowli z biologicznym oczyszczaniem środowiska wodnego poprzez usuwanie składników biogennych, które w znacznej mierze odpowiedzialne są proces eutrofizacji wód, [ABDEL-RAOUF I IN. 2012], a dla mikroglonów są cennym źródłem azotu i fosforu [CHISTI 2013]. Wykorzystując jako pokarm składniki obecne w ściekach przemysłowych, rolniczych czy wodach pochodzących nie stanowią konkurencji dla roślin uprawianych na cele spożywcze [MARKOU I IN. 2011, TOMEI, HELLIWELL 2016]. Pozwala to nie tylko na efektywne oczyszczanie ścieków, ale również ograniczenie kosztów produkcji biomasy [WHITTON I IN. 2015]. Ponadto uprawy mikroglonów mogą być zlokalizowane na gruntach marginalnych [BEER I IN. 2009].

Hodowle prowadzi się w systemach otwartych oraz zamkniętych, tj. w fotobioreaktorach [PATYNA, WITCZAK 2016], które pozwalają na kontrolę i sterowanie procesem produkcji i uzyskiwanie znacznie wyższego plonu biomasy [COGNE I IN. 2005]. Zbiór biomasy stanowi jedno z głównych wyzwań związanych z jej wykorzystywaniem. Głównie ma ono charakter ekonomiczny. Etap związany z odwodnieniem biomasy alg może pochłonąć 30% całkowitych kosztów produkcji biopaliw [BRENNAN, OWENDE 2010], a nawet 60%, w zależności od gatunku alg i zastosowanej technologii uprawy [UDOM I IN. 2013]. Komórki mikroglonów charakteryzują się mikroskopijnym rozmiarem, od jednego do dziesięciu mikrometrów, i niskim ciężarem właściwym, od 1,0 do 1,1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ [LAL I IN. 2018]. Produkcja na skalę przemysłową

w fotobioreaktorach czy otwartych stawach hodowlanych charakteryzuje się więc dużą objętością przy znacznym rozcieńczeniu, od 1,0 do 2,0 g·L⁻¹ [XIONG I IN. 2015, UMMALYMA I IN. 2016]. Opracowanie wysokowydajnej i opłacalnej metody zbioru jest kluczem do zwiększenia stopnia wykorzystania biomasy mikroglonów na skalę komercyjną. Podczas zbioru biomasy uwzględnienia się metody m.in. wirowania, filtracji, sedymentacji, flotacji oraz flokulacji. Nie ma jednak jednej uniwersalnej technologii zbioru dla wszystkich gatunków, a jest to etap, który ma wpływ na ekonomię produkcji biomasy [BEHERA, VARMA 2016; TIRON I IN. 2017].

Wirowanie należy do fizycznych metod odwadniania biomasy mikroglonów i polega na wytworzeniu siły odśrodkowej działającej promieniowo, co powoduje rozdzielanie cząstek na podstawie różnicy gęstości między komórkami a otaczającym je medium hodowlanym [PAHL I IN. 2013]. Wirowanie jest niezawodne w oddzielaniu silnie rozcieńczonych roztworów przy użyciu odpowiedniej prędkości obrotowych. Metoda ta charakteryzuje się krótkim czasem, w którym osiąga się zwiększoną koncentrację biomasy. Wydajność procesu uzależniona jest od charakterystyki osadzania komórek, czasu retencji zawiesiny w wirówce oraz głębokości osadzania, która związana jest z konstrukcją wirówki [SHOW I IN. 2017]. Wirowanie może osiągnąć skuteczność na poziomie nawet 80–90% przy czasie wirowania 2–5 minut [JAVED I IN. 2019]. Dodatkową zaletą wykorzystania wirowania do odwadniania biomasy jest brak konieczności stosowania odczynników chemicznych, nie wpływa więc na jakość pozyskanej biomasy oraz wydłuża czas jej przechowywania [RADIN I IN. 2019]. Początkowo metoda ta ze względu na duże koszty była stosowana przede wszystkim przy pozyskiwaniu wysokowartościowych produktów, głównie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, natomiast obecnie również do pozyskiwania biomasy na cele energetyczne [KIM I IN. 2013].

Inną metodą separacji biomasy mikroglonów jest filtracja. Komórki mikroglonów zatrzymują się i zagęszczają na filtrze. Do zalet tej metody należy m. in. możliwość zbioru komórek mikroglonów o bardzo małej gęstości oraz brak stosowania odczynników chemicznych [MILLEDGE I IN. 2013]. Główne problemy związane ze stosowaniem filtracji polegają na tym, że przepływ medium hodowlanego jest ograniczony do małych objętości i na zatykaniu/zanieczyszczaniu filtrów przez osadzone komórki. Jednym ze sposobów na zmniejszenie tych ograniczeń jest zastosowanie próżni z przepływem wstecznym, lub też wykorzystanie podciśnienia nad filtrem [UDUMAN I IN. 2010]. Technika ta charakteryzuje się skutecznością odwodnienia biomasy alg na poziomie 70–89% [DANQUAH I IN. 2009].

Najprostszym sposobem odwadniania biomasy mikroglonów jest sedymentacja komórek pod wpływem siły grawitacji [SALIM I IN. 2011]. Szybkość tego procesu uzależniona jest głównie od gęstości hodowli i wielkości komórek alg [MILLEDGE I IN. 2013]. Oddzielenie się biomasy może odbywać się przy wykorzystaniu separatora lamelowego lub osadnika.

W procesie flotacji wykorzystuje się przepływ pęcherzyków powietrza, które wprowadzone do hodowli powodują wypływanie komórek mikroglonów na powierzchnię co znacznie ułatwia ich zbiór [SINGH I IN. 2011]. Skuteczność tej metody uzależniona jest od stopnia rozdrobnienia fazy gazowej, trwałości i gęstości pęcherzyków oraz wielkości komórek [BARROS I IN. 2015]. W zależności od sposobu wytwarzania pęcherzyków powietrza wyróżnia się flotację rozproszonego powietrza, flotację rozpuszczonego powietrza, generowanie mikropęcherzyków oraz flotację elektrolityczną [JEEVANANDAM I IN. 2020]. Wielkość cząstek jest bardzo istotna w tej technice, gdzie mniejszy rozmiar cząstek ułatwi podnoszenie pęcherzyków na powierzchnię [AL-HATTAB I IN. 2015].

Celem flokulacji jest tworzenie w roztworze agregatów cząstek stałych, co będzie sprzyjało ich sedymentacji. Metoda ta charakteryzujących się wysoką skutecznością przy stosunkowo niskim koszcie jej przeprowadzenia. Zastosowanie flokulacji pozwala zagęścić zawiesinę biomasy mikroglonów zawierającą od 2 do 7% materiału stałego [BRENNAN, OWENDE 2010]. Substancje chemiczne wykorzystywane w tym procesie nazywane są flokulantami. Jest to

grupa związków polimerowych pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego. Do najczęściej stosowanych flokulantów zaliczamy wielowartościowe sole metali w tym siarczan glinu, chlorek żelazowy oraz siarczan glinu [BARROS I IN. 2015]. O możliwości zastosowania flokulantów na dużą skalę poza skutecznością, powinny decydować kwestie związane z kosztem stosowania i brakiem toksyczności [GRIMA I IN. 2003].

W prezentowanej pracy oceniono skuteczność czterech metod odwadniania biomasy mikroglonów, w tym wirowania, flokulacji, sedymentacji, filtracji. Efektywność każdej z metod oceniono na podstawie ilości uzyskanej biomasy przy wykorzystaniu pomiaru grawimetrycznego.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Do oceny skuteczności metod odwadniania biomasy mikroglonów wykorzystano szczep mikroglonów słodko-słonowodnych z gatunku *Chlorella vulgaris* o średniej zawartości biomasy w hodowli na poziomie $808 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Wstępny pomiar biomasy przeprowadzono przy wykorzystaniu wagosuszarki (AXIS ATS60, Gdańsk, Poland). Do aluminiowej szalki wprowadzono 30 mL zawiesiny mikroglonów, którą suszono do stałej wagi w temperaturze 105°C . Materiał do badań pochodził z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (CCBA – Culture Collection of Baltic Algae). Doświadczenie prowadzono w stożkowych cylindrach miarowych o pojemności 100 mL.

Biomasę mikroglonów wirowano przy 2000 oraz $4000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, w czasie 5, 30 oraz 60 minut. W procesie flokulacji zastosowano dwa rodzaje flokulantów: siarczan cynku (ZnSO_4) oraz chitosan. Każdy z nich wprowadzono do hodowli w trzech dawkach: $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ i $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Dawki chitosanu wprowadzono po ich uprzednim rozpuszczeniu w 1 mL 1% roztworu kwasu octowego, po 60 minutach, po uzyskaniu jednolitego roztworu. Dawki siarczanu cynku rozpuszczono w 1 mL wody destylowanej. Do kolb stożkowych o pojemności 250 mL wprowadzono 100 mL hodowli, a następnie odpowiednią dawkę flokulanta. Całość umieszczono w wytrząsarce na okres 3 min., mieszano z częstotliwością $300 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, a następnie zawartość przelano do pojemników sedymentacyjnych. Skuteczność flokulacji analizowano po upływie 15, 30 oraz 60 minut. Efektywność metody sedymentacji oceniano po upływie 12 i 24 godzin. Proces filtracji prowadzono przy użyciu siatki fitoplanktonowej o średnicy oczek wielkości 1 mikrona po upływie 24 godzin.

Skuteczność każdej z metod oceniano na podstawie pomiaru grawimetrycznego z wykorzystaniem wagosuszarki. Po przeprowadzeniu wstępnego etapu odwodnienia biomasy usuwano nadmiar płynu, a pozostałą biomasę suszono w temperaturze 105°C do stałej wagi. Wyniki przeliczono i podano w pracy w procentach.

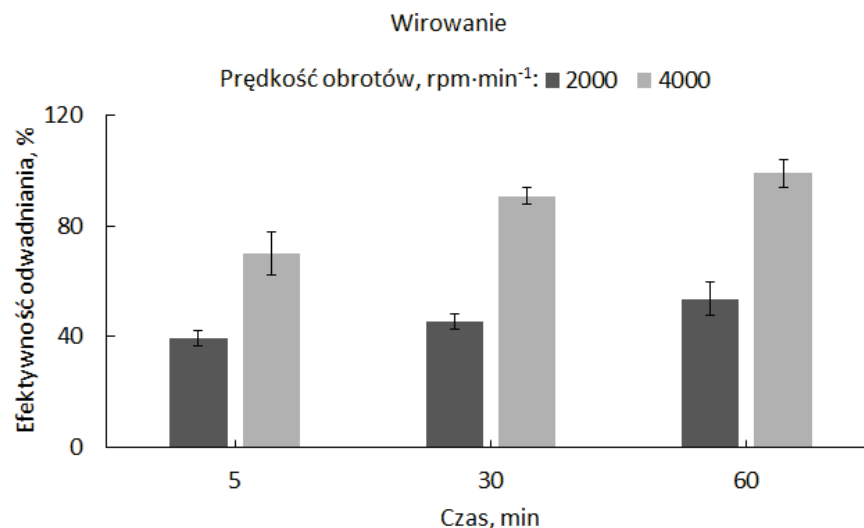
Wszystkie analizy przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu oprogramowania Statistica (wersja 13.3, 2016; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic między średnimi oceniano testem Tukeya przy $P \leq 0,05$. Wyznaczono również odchylenia standardowe (SD).

WYNIKI I DYSKUSJA

Zastosowana metoda odwadniania miała statystycznie istotny wpływ na skuteczność odwodnienia biomasy mikroglonów *C. vulgaris*. Wyniki dotyczące efektywności poszczególnych metod przedstawiono na rysunkach 1–4.

Proces wirowania charakteryzuje się wysoką skutecznością oddzielania komórek mikroglonów z medium hodowlanego [JAVED I IN. 2019], co potwierdzają również wyniki uzyskane w niniejszej pracy. Zagęszczeniu biomasy sprzyjało zwiększenie prędkości wirowania. W zależności od czasu wirowania, przy obrotach na poziomie $2000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, efektywność odwadniania mieściła się w zakresie od 39% (po 5 minutach) do 54% (po 60 minutach) (rys. 1). Dwukrotne zwiększenie prędkości wirowania zwiększyło efektywność odwadniania

w zakresie od 70% do 99%, odpowiednio po 5 minutach i po 60 minutach. Podobną zależność w swojej pracy przedstawili UDUMAN I IN. [2010], którzy wydajność zbioru biomasy zwiększyli wraz ze wzrostem liczby obrotów wirówki osiągając skuteczność odwadniania powyżej 95%. Również JAPAR I IN. [2017], którzy badali efektywność wirowania w zakresie od 1000 do 7000 rpm·min⁻¹, najwyższą skuteczność (98% odzysku biomasy *C. vulgaris*) odnotowali przy 7000 rpm·min⁻¹.

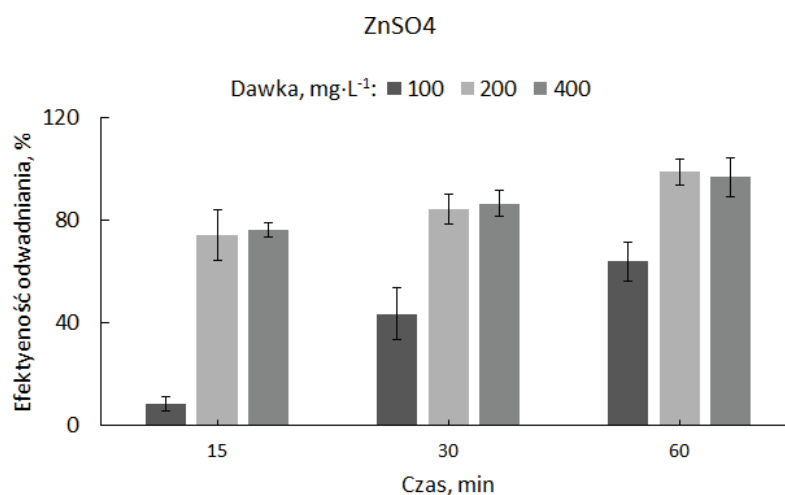


Rys. 1. Efektywność odwadniania biomasy *C. vulgaris* metodą wirowania

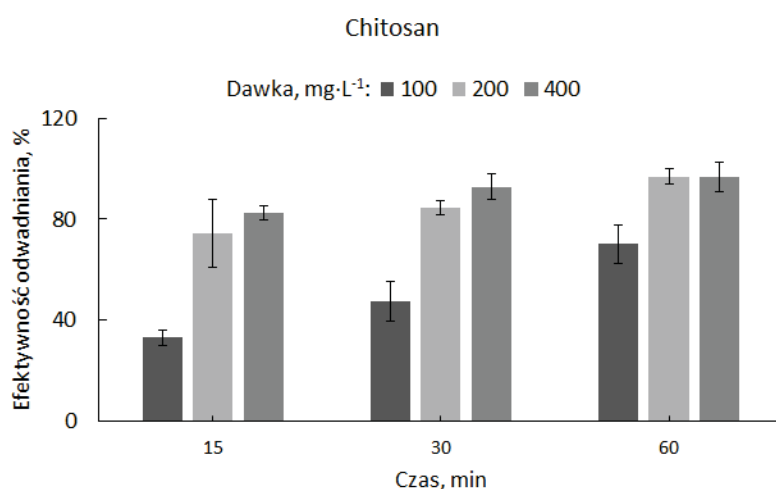
Dodanie chemicznego flokulantu zmienia ładunek powierzchniowy i indukuje agregację komórek mikroglonów powodując ich gromadzenie poprzez flokulację [OH I IN. 2001]. W niniejszej pracy efektywność procesu flokulacji zmieniała się w zależności od rodzaju flokulantu, dawki i czasu. Skuteczność odwadniania biomasy *C. vulgaris* z wykorzystaniem siarczynu cynku mieściła się w przedziale od 8% (100 mg·L⁻¹, po 5 minutach) do 97% (400 mg·L⁻¹, po 60 minutach) (rys. 2). Wysoką skuteczność ZnSO₄ w procesie flokulacji potwierdzają również badania SURENDHIRIAN I VIJAY [2013], którzy maksymalną wydajność flokulacji uzyskali przy dawce 0,6 g·L⁻¹ (skuteczność na poziomie 92%). Chemiczne koagulatory wykorzystywane są do flokulacji wielu rodzajów gatunków mikroglonów [LEE I IN. 1998]. PAPAZI I IN. [2010] przy siarczaniu glinu uzyskali 85-procentową efektywność odwadniania biomasy gatunku *Chlorella minutissima*. Wysoką skuteczność odwodnienia dla rodzaju *Chlorella* (powyżej 90%) po zastosowaniu FeCl₂ osiągnęli również WYATT I IN. [2012]. Równie wysoki poziom, powyżej 90%, potwierdziły badania XUAN [2009], w których w procesie flokulacji zamiast siarczynu cynku wykorzystano chlorek żelaza.

Coraz większe zainteresowanie budzi chitosan, który jest naturalnym flokulantem. Istotne znaczenie ma również jego niski koszt oraz nietoksyczny charakter [LERSUTTHIWONG I IN. 2009]. W niniejszych badaniach chitosan charakteryzował się nieznacznie wyższą skutecznością odwadniania niż flokulant chemiczny. W zależności od dawki oraz czasu prowadzenia procesu efektywność odwadniania biomasy mikroglonów mieściła się w granicach od 33% (100 mg·L⁻¹, po 5 minutach) do 97% (400 mg·L⁻¹, po 60 minutach) (rys. 3). GODOS I IN. [2011] przy zastosowaniu chitosanu osiągnęli znacznie niższą skuteczność odwadniania biomasy w odniesieniu do flokulantów chemicznych mikroglonów (nawet do 58%). Małą skuteczność odwodnienia dla niskich dawek chitosanu obserwowali również CHENG I IN. [2011]. Dla mikroglonów z rodzaju *Chlorella* sp., przy dawce 69,6 mg·L⁻¹, autorzy ci odnotowali wydajność flokulacji w przedziale od 42,4 do 68,8%. RASHID I IN. [2013] dla chitosanu zasto-

sowanego w dawce $120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ uzyskali skuteczność flokulacji na poziomie 99% dla *C. vulgaris*, natomiast GRANADOS I IN. [2012] dla dawki $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zaledwie 20% dla *Chlorella* sp. Niskie wartości dla procesów flokulacji przy wykorzystaniu chitosanu związane mogą być z odczynem podłoża. Według ŞIRIN I IN. [2011] optymalną wydajność separacji uzyskuje się przy pH alkalicznym, jednak uzależnione może to być od rodzaju uprawianego szczepu.

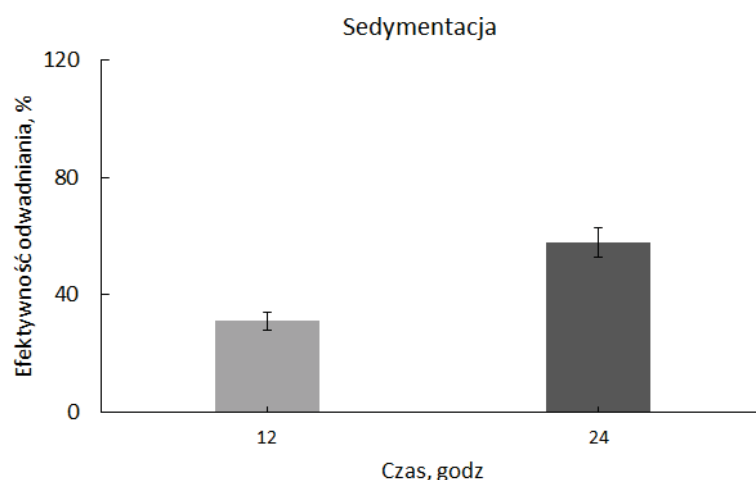


Rys. 2. Efektywność odwadniania biomasy *C. vulgaris* metodą flokulacji przy użyciu ZnSO_4



Rys. 3. Efektywność odwadniania biomasy *C. vulgaris* metodą flokulacji przy użyciu chitosanu

W procesie sedymentacji biomasa mikrogolonów osadza się pod wpływem siły grawitacji [SALIM I IN. 2013], a jej skuteczność uzależniona jest m.in. od gęstości i wielkości komórek w hodowli, temperatury, natężenia światła, oraz czasu [MARIAM i in. 2015]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki świadczą o niskiej skuteczności tej metody w odniesieniu do biomasy *C. vulgaris*. Po 12 godzinach prowadzenia procesu uzyskano efektywność odwadniania na poziomie 31%, natomiast po 24 godzinach niespełna 58%. Niską efektywność sedymentacji dla komórek mikrogolonów (27%) odnotowali również JAPAR I IN. [2017]. Efektywność tej metody można zwiększyć poprzez zastosowanie flokulantu [GRIMA I IN. 2003], co obserwowano również w niniejszych badaniach.



Rys. 4. Efektywność odwadniania biomasy *C. vulgaris* metodą sedymentacji

PODSUMOWANIE

Dobór odpowiedniej metody odwadniania biomasy jest ważnym elementem technologii produkcji biopaliw z mikroglonów. Istotne jest opracowanie metody o wysokiej skuteczności, charakteryzującej się stosunkowo niskim kosztem. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najbardziej efektywną metodą odwodnienia biomasy mikroglonów *C. vulgaris* było wirowanie. Przy prędkości $4000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$, po 60 minutach, skuteczność tej metody to 99%. Nieco niższe wartości (97%) uzyskano metodą flokulacji, dla obu badanych flokulantów zastosowanych w dawce $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, po 60 minutach od ich wprowadzenia do hodowli *C. vulgaris*.

LITERATURA

- ABDEL-RAOUF N., AL-HOMAIDAN A., IBRAHEEM I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, 19, 257–275.
- AL-HATTAB M., GHALY A., HAMMOUDA A. 2015. Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: Critical review and comparative analysis. Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications, 5(5).
- BARROS A.I., GONÇALVES A.L., SIMÕES M., PIRES J.C.M. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 41, 1489–1500.
- BEER L.L., BOYD E.S., PETERS J.W., POSEWITZ M.C. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. Current Opinion in Biotechnology, 20(3), 264–271.
- BEHERA B., VARMA A. 2016. Microbial Resources for Sustainable Energy. Environmental Science.
- BRENNAN L., OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae –a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable Sustainable Energy Reviews, 14, 557–577.
- CHEN M.F., ZHANG Y.Y., DI HE M., LI C.Y., ZHOU C.X., HONG P.Z., QIAN Z.J. 2019. Antioxidant peptide purified from enzymatic hydrolysates of *Isochrysis zhanjiangensis* and its protective effect against ethanol induced oxidative stress of HepG₂ cells. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 24, 308–317.
- CHENG Y.S., ZHENG Y., LABAVITCH J.M., GHEYNST J.S.V. 2011. The impact of cell wall carbohydrate composition on the chitosan flocculation of *Chlorella*. Process Biochemistry, 46(10) 1927–1933.
- CHISTI Y. 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. Journal of Biotechnology, 167 (3), 201–214.
- COGNE G., CORNET J.F., GROSS J.B. 2005. Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in space conditions. Biotechnology Progress, 21, 741–750.
- DANQUAH M.K., ANG L., UDUMAN N., MOHEIMANI N., FORDE G.M. 2009. Dewatering of microalgal culture for biodiesel production: Exploring polymer flocculation and tangential flow filtration. Journal of the Society of Chemical Industry, 84, 1078–1083.
- DE GODOS I., GUZMAN H.O., SOTO R., GARCÍA-ENCINA P.A., BECARES E., MUÑOZ R., VARGAS V.A. 2011. Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggery wastewater treatment. Bioresource Technology, 102(2), 923–927.

- EIDA M.F. MATTER I.A. DARWESH O.M. 2018. Cultivation of oleaginous microalgae *Scenedesmus obliquus* on secondary treated municipal wastewater as growth medium for biodiesel production. *Ecological Engineering*, 19, 38–50.
- ENAMALA M.K. ENAMALA S. CHAVALI M. DONEPUDI J. YADAVALLI R. KOLAPALLI B. ARADHYULA T.V. VELPURI J. KUPPAM C. 2018. Production of biofuels from microalgae-a review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 49–68.
- GRANADOS M.R. ACIEN F.G. GOMEZ C. FERNANDEZ-SEVILLA J.M. MOLINA G.E. 2012. Evaluation of flocculants for the recovery of freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 118, 102–110.
- GRIMA E.M. ACIE F.G. MEDINA A.R. CHISTI Y. 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances*, 20, 491–515.
- JAPAR A.S. AZIS N.M. TAKRIFF M.S. 2017. Application of different techniques to harvest microalgae. *Transactions on Science and Technology*, 4, 98–108.
- JAVED F. ASLAM M. RASHID N. SHAMAIR Z. KHAN A.L. YASIN M. FAZAL T. HAFEEZ A. REHMAN F. REHMAN M.S.U. KHAN Z. IQBAL J. BAZMI A.A. 2019. Microalgae-based biofuels, resource recovery and wastewater treatment: a pathway towards sustainable biorefinery. *Fuel*, 255.
- JEEVANANDAM J. HARUN M.R. LAU S.Y. SEWU D.D. DANQUAH M.K. 2020. Microalgal Biomass Generation via Electroflotation: A Cost-Effective Dewatering Technology. *Applied Sciences*, 10.
- KIM J. YOO G. LEE H. LIM J. KIM K. WOONG C. PARK M.S. YANG J. 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae *Biotechnology Advances*, 31, 862–876.
- LAL A. GHOSH S. DAS D. 2018. Improvement in electrically induced biomass harvesting of *Chlorella* sp. MJ 11/11 for bulk biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 30, 979–993.
- LEE S.J. KIM S.B. KIM J.E. KWON G.S. YOON B.D. OH H.M. 1998. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology*, 27(1), 14–18.
- LERSUTTHIWONG P. SUTTIKARN S. POWTONGSOOK S. 2009. Optimization of chitosan flocculation for removal of phytoplankton in shrimp ponds. *Aquacultural Engineering*, 41, 188–193.
- MARIAM A.H. GHALY A. AMAL H. 2015. Microalgae harvesting methods for industrial production of biodiesel: critical review and comparative analysis. *Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 5(2), 1–26.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. *Applied Energy*, 88, 3389–3401.
- MILLEDGE J.J. HEAVEN S. 2013. A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 165–178.
- OH H.M. LEE S.J. PARK M.H. KIM H.S. KIM H.C. YOON J.H. KWON G.S. YOON B.D. 2001. Harvesting of *Chlorella vulgaris* using a bioflocculant from *Paenibacillus* sp. AM49. *Biotechnology Letters*, 23(15), 1229–1234.
- OH Y.K. HWANG K.R. KIM C. KIM J.R. LEE J.S. 2018. Recent developments and key barriers to advanced biofuels: A short review. *Bioresource Technology*, 257, 320–333.
- PAHL S.L. LEE A.K. KALAITZIDIS T. ASHMAN P.J. SATHE S. LEWIS D.M. 2013. Harvesting, thickening and dewatering microalgae biomass. *Algae for Biofuels and Energy*, 173.
- PAPAZI A. MAKRIDIS P. DIVANACH P. 2010. Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology*, 22, 349–355.
- PATYNA A. WITCZAK S. 2016. Przegląd fotobioreaktorów do produkcji biodiesla. *Chemik*, 70(10), 634–643.
- RADIN M. RADIN M.S. ADEL AL-GHEETHI A.S. MOHD K. AMIR H. 2019. Management of Greywater in Developing Countries Alternative Practices, Treatment and Potential for Reuse and Recycling, *Water Science and Technology Library*, 87.
- RASHID N. REHMAN S.U. HAN J.I. 2013. Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan, *Process Biochemistry*, 48(7), 1107–1110.
- SALIM S. BOSMA R. VERMUE M.H. WIJFFELS R.H. 2011 Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 23, 849–855.
- SALIM S. GILISSEN L. RINZEMA A. VERMUE M.H. WIJFFELS R.H. 2013. Modeling microalgal flocculation and sedimentation. *Bioresource Technology*, 144, 602–607.
- SHOW P.L. TANG M.S.Y. NAGARAJAN D. LING T.C. OOI C. 2017. A holistic approach to managing microalgae for biofuel applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 215.
- SINGH A. NIGAM P.S. MURPHY J.D. 2011. Mechanism and challenges in commercialization of algal biofuels. *Bioresource Technology*, 102, 26–34.
- ŞIRIN S. TROBAJO R. IBANEZ C. SALVADÓ J. 2011. Harvesting the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with polyaluminum chloride, aluminium sulphate, chitosan and alkalinity-induced flocculation. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1067–1080.

- SURENDRIRIAN D. VIJAY M. 2013. Study on Flocculation Efficiency for *Harvesting Nannochloropsis oculata* for Biodiesel Production. International Journal of ChemTech Research, 4, s. 1761-1769.
- TIRON O. BUMBAC C. MANEA E. STEFANESCU M. LAZAR M.N. 2017. Overcoming microalgae harvesting barrier by activated algae granules. Scientific Report, 7, 4646–4656.
- TOMEI J. HELLIWELL R. 2016. Food Versus Fuel? Going Beyond Biofuels. Land Use Policy, 56, 320–326.
- UDOM I. ZARIBAF B.H. HALFHIDE T. GILLIE B. DALRYMPLE O. ZHANG Q. ERGAS S.J. 2013. Harvesting microalgae grown on wastewater. Bioresource Technology, 139, 101–106.
- UDUMAN N. QI Y. DANQUAH M.K. FORDE G.M. HOADLEY A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to microalgae-based fuels. Journal of Renewable and Sustainable Energy, 2(1), 12701–12715.
- UMMALYMA S.B. MATHEW A.K. PANDEY A. SUKUMARAN R.K. 2016. Harvesting of microalgal biomass: Efficient method for flocculation through pH modulation. Bioresource Technology 213, 216–221.
- WHITTON R. OMETTO F. PIDOU M. JARVIS P. VILLA R. JEFFERSON B. 2015. Microalgae for municipal wastewater nutrient remediation: mechanisms, reactors and outlook for tertiary treatment Environmental Technology Reviews, 4(1), 133–148.
- WYATT N.B. GLOE L.M. BRADY P.V. HEWSON J.C. GRILLET A.M. HANKINS M.G. POHL P.I. 2012 Critical conditions for ferric chloride-induced flocculation of freshwater algae. Biotechnology and Bioengineering, 109, 493–501.
- 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, 326–330.
- XUAN D.T.T. 2009. Harvesting marine algae for biodiesel feedstock. Department of Environmental Engineering, National University of Singapore.

EFFECTIVENESS ASSESSMENT OF MICROALGAE BIOMASS DEWATERING METHODS

Patryk Ratomski, Małgorzata Hawrot-Paw

Summary

Due to the increasing attention to microalgae biomass, it is necessary to improve the technology for its large-scale production. A significant problem is the relatively low density of microalgae cells in culture. Costs related to dewatering and concentration of biomass may constitute up to 60% of the cost of the product obtained from it. The aim of the study was to determine the efficiency of separation of microalgae cells from the culture medium by centrifugation, flocculation, sedimentation and filtration. The highest efficiency (99%) was obtained by centrifugation, while a slightly lower value (97%) was obtained by flocculation, after the introduction of zinc sulphate and chitosan at a dose of 400 mg·L⁻¹.

Key words: microalgae, centrifugation, flocculation, sedimentation, filtration

Patryk Ratomski, Małgorzata Hawrot-Paw

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Inżynierii Odnawialnych Źródeł Energii

PORÓWNANIE EFEKTYWNOŚCI METOD EKSTRAKCJI LIPIDÓW Z BIOMASY MIKROGLONÓW *Chlorella vulgaris*

Streszczenie

Biopaliwa zyskują coraz większą popularność i mają stosunkowo wysoki udział w ogólnej produkcji paliw na świecie. Olej sojowy, rzepakowy, palmowy oraz kukurydziany należą do podstawowych surowców wykorzystywanych przy produkcji biodiesla. W związku z ograniczoną dostępnością gruntów ornych, zmiennym klimatem, a także problemami środowiskowymi i społecznymi związanymi z wykorzystywaniem roślin spożywczych i paszowych na cele energetyczne, produkcja biodiesla przy ich udziale będzie ograniczana. Alternatywą niewątpliwie są mikroorganizmy oleiste (bakterie, drożdże, grzyby) a także mikroalgi, które mogą być produkowane z wysoką zawartością lipidów a w konsekwencji wykorzystane jako obiecujący surowiec do wytwarzania biodiesla. Jednym z ważniejszych etapów w technologii produkcji tego paliwa z organizmów jest pozyskiwanie oleju, stąd też konieczność poszukiwania skutecznych oraz ekonomicznych metod jego ekstrakcji będzie miała kluczowe znaczenie.

Celem prezentowanej pracy była analiza efektywności metod pozyskiwania lipidów z komórek mikroglonów jako prekursorów do produkcji biodiesla. Zastosowano najbardziej popularną metodę ekstrahowania heksanem, którą modyfikowano zastosowaniem ultradźwięków i mikrofalowaniem oraz metodę Bligh-Dyer'a z użyciem mieszaniny chloroformu i metanolu. Skuteczność każdej z metod oceniano na podstawie pomiaru ilości uzyskanych lipidów.

W zależności od zastosowanej metody ekstrakcji uzyskano od 4,99 do 11,07% lipidów w odniesieniu do suchej masy mikroglonów *Chlorella vulgaris*. Spośród przebadanych metod metoda Bligh-Dyer'a została zidentyfikowana jako najbardziej skuteczna w ekstrakcji lipidów z mikroalg.

Słowa kluczowe: mikroalgi, biomasa, lipidy, biodiesel, ekstrakcja

WPROWADZENIE

Zmniejszające się zasoby paliw kopalnych, niestabilne ceny, a także niekorzystny wpływ na środowisko podczas użytkowania paliw konwencjonalnych, sprzyjały poszukiwaniom paliw alternatywnych [DEMIRBAS, DEMIRBAS 2011]. Dobrym ich źródłem jest biomasa, z której uzyskuje się nie tylko biopaliwa stałe, gazowe, ale również ciekłe, w tym biodiesel.

Biopaliwa ciekłe, w zależności od rodzaju surowca wykorzystywanego do ich produkcji, dzieli się na cztery podstawowe generacje. Paliwa pierwszej generacji są wytwarzane z surowców jadalnych (kukurydza, soja, trzcina cukrowa, rzepak), natomiast drugiej generacji przede wszystkim z odpadów lignocelulozowych lub też roślin uprawianych na nieużytkach, niewykorzystywanych do celów spożywczych czy też paszowych (wierzba energetyczna, miskant). Biopaliwa trzeciej generacji produkowane są z biomasy mikro i makroalg. W założeniu paliwa czwartej generacji będą wytwarzane przy udziale organizmów fotosyntetyzujących, poddanych odpowiednim modyfikacjom metabolicznym [DAROCH I IN. 2013].

Mikroglony należą do mikroskopijnych organizmów, w komórkach których zachodzi proces fotosyntezy. Występują one w środowisku wodnym, morskim i słodkowodnym. Niektóre z nich podczas wzrostu i produkcji 1 Mg swojej biomasy mogą wiązać nawet do 1,8 Mg ditlenku węgla z atmosfery [BRENNAN, OWENDE 2010]. Mikroglony należą do jednokomórkowych.

kowych organizmów autotroficznych, miksotroficznych lub heterotroficznych o zróżnicowanych cechach pod względem metabolizmu. W sprzyjających warunkach hodowli ich biomasa może podwoić się zaledwie w ciągu kilkunastu godzin. Biomasa mikroglonów wykorzystywana jest jako dodatek do żywności oraz pasz, w przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym. Ze względu na wyższą wydajność fotosyntezy, produkcji biomasy i szybsze tempo wzrostu w odniesieniu do pozostałych roślin energetycznych, mikroglony stanowią dobrą alternatywę jako surowiec do produkcji biopaliw [CHEN I IN. 2011]. Kolejną ich zaletą jest możliwość wykorzystywania w uprawie różnego rodzaju ścieków i wód pochodowlanych, a także możliwość lokalizacji upraw na terenach nieodpowiednich dla rolnictwa [MATA I IN. 2010].

Niektóre szczepy mikroglonów posiadają wysoką zdolność do akumulacji lipidów na poziomie od 25 do 75% suchej masy, która uzależniona jest głównie od warunków hodowli [MALCATA 2011]. Zawartość lipidów w biomacie można zwiększyć poprzez zastosowanie stresu środowiskowego związanego m.in. z ograniczeniem dostępności składników pokarmowych, rodzajem i czasem oświetlania hodowli, a także temperaturą hodowli [FENG I IN. 2011; FUENTES-GRÜNEWALD I IN. 2012].

Proces technologiczny związany z produkcją biodiesla przy udziale mikroalg obejmuje pięć kluczowych etapów:

- uprawa;
- zbiór;
- przetwarzanie biomasy (odwodnienie);
- ekstrakcja lipidów;
- transestryfikacja otrzymanego oleju.

Ekonomiczna produkcja biodiesla z mikroglonów zależy głównie od energii wykorzystywanej do przetwarzania biomasy i rodzaju zastosowanego procesu ekstrakcji lipidów [JUNGMIN I IN. 2013], których skład oraz profil kwasów tłuszczowych uwarunkowany jest takim czynnikiem jak skład podłoża hodowlanego, temperatura hodowli, intensywność i rodzaj oświetlenia, a także cykl świetlny [HALIM I IN. 2012].

Wyróżnia się dwie podstawowe metody ekstrakcji lipidów:

- chemiczne;
- mechaniczne [HALIM I IN. 2012].

Do metod chemicznych należy ekstrakcja za pomocą aparatu Soxhleta, która wykorzystuje rozpuszczalniki organiczne takie jak np. n-heksan oraz destylację próżniową. Przy ekstrakcji tej możliwa jest też eliminacja użycia toksycznych związków i stosowanie płynów nadkrytycznych. Z powodzeniem można wykorzystać ditlenek węgla. Do ekstrakcji stosuje się zarówno rozpuszczalniki polarne, jak i niepolarne, a ich wybór zależy od polarności docelowego związku, ponieważ dyktuje on wzajemną rozpuszczalność. Związki polarne są lepiej ekstrahowane przy użyciu rozpuszczalników polarnych i odwrotnie [BALASUBRAMANIAN I IN. 2011]. Ekstrakcja lipidów z komórek mikroglonów jest procesem energochłonnym i kosztownym również z uwagi na użycie dodatkowej energii do odzyskania zastosowanych rozpuszczalników. Zastosowana metoda ekstrakcji nie powinna uszkadzać wyekstrahowanych lipidów [IQBAL, THEEGALA 2013].

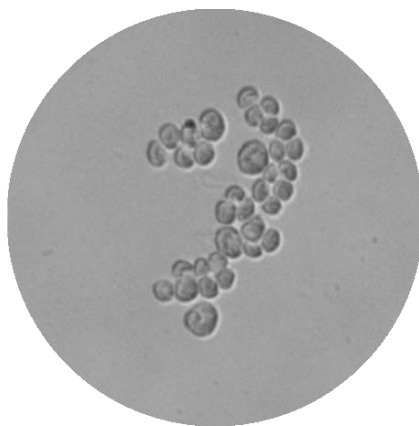
Do mechanicznych metod pozyskiwania oleju zalicza się tłoczenie, a także ekstrakcję wspomaganą mikrofalami oraz ekstrakcję ultradźwiękową [KHOO I IN. 2011]. Ekstrakcja wspomaganą mikrofalami znana jest już od lat osiemdziesiątych XX wieku. Stosowano ją jako metodę odzyskiwania lipidów z nasion, żywności, pasz oraz gleby. Z powodzeniem metoda ta znalazła swoje zastosowanie również przy ekstrakcji lipidów z komórek mikroglonów. Pracę nad jej wdrożeniem wykazały, że nie tylko jest ona stosunkowo bezpieczna, szybka i ekonomiczna [LEE I IN. 2010]. Na skutek kontaktu między materiałem polarnym a szybko oscylującym polem elektrycznym wytwarza się ciepło w wyniku siły tarcia powstającego

z ruchów między i wewnątrzcząsteczkowych. Gdy wytwarzane jest ciepło, w komórce zaczyna tworzyć się para wodna, która ją rozrywa i następuje uwalnianie zawartości komórki [AMARNI, KADI 2010]. Obecnie ekstrakcję wspomaganą mikrofalami ocenia się jako skuteczną i opłacalną metodę w oparciu o krótkie czasy reakcji.

Podczas ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami generowane są fale dźwiękowe, które rozprzestrzeniają się w ciekłych mediach i skutkują naprzemiennymi cyklami wysokiego i niskiego ciśnienia. Podczas niskiego ciśnienia, ultradźwiękowe fale o dużej intensywności wytwarzają małe pęcherzyki próżniowe lub puste przestrzenie w cieczy. Kiedy pęcherzyki osiągają objętość przy której nie mogą już absorbować energii, podczas cyklu wysokiego ciśnienia, siły ścinające wokół komórek mikroglonów mechanicznie niszczą ich strukturę i wspomagają ekstrakcję lipidów [SUALI, SARBATLY 2012].

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

W badaniach wykorzystano glony słodkowodne z gatunku *Chlorella vulgaris* BA 002 (fot. 1). Materiał pochodził z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (CCBA – Culture Collection of Baltic Algae).



Fot. 1. *Chlorella vulgaris* BA 002 culture [P. Ratomski]

Mikroglony hodowano w podłożu syntetycznym F/2 (tab. 1) o pH $7,3 \pm 0,2$. Zastosowano oświetlenie LED z diodami białymi, czerwonymi o długości fali od 600 do 700 nm ($9,45 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) i niebieskimi, gdzie długość fali mieściła się w przedziale od 400 do 500 nm ($2,25 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$) oraz fotoperiod 18/6 h (światło/ciemność).

Biomasę mikroglonów produkowano w skali ułamkowo technicznej, w fotobioreaktorze rurowym o układzie wertykalnym i pojemności 850 dm^3 (Fot. 2), z automatyczną kontrolą procesu w odniesieniu do oświetlenia, odczynu podłoża hodowlanego, dozowania ditlenku węgla.

Biomasę mikroglonów po zakończeniu hodowli odwadniano za pomocą wirówki a następnie suszono w temperaturze 70°C przez 24 h.

Ekstrakcję oleju z biomasy przeprowadzono czterema metodami:

1. przy użyciu aparatu Soxhleta za pomocą n-Heksanu; do gilzy ekstrakcyjnej odważono 15 g suchej masy mikroglonów i ekstrahowano przez okres 4 godzin z zachowaniem 20 cykli na godzinę; po zakończonej ekstrakcji rozpuszczalnik oddestylowano;
2. przy użyciu aparatu Soxhleta za pomocą n-Heksanu i wspomaganej ultradźwiękami; przed ekstrakcją biomasę mikroglonów poddano na mokro działaniu ultradźwięków o częstotliwości 50 kHz przez okres 30 minut;

Tabela 1. Skład pożywki F/2 [GUILLARD, RYTHER 1962]

Składnik	Roztwór	Ilość
NaNO ₃	75 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
NaSiO ₃ ·9H ₂ O	30 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
roztwór mikroelementów	wartość podana niżej	1 cm ³
roztwór witamin	wartość podana niżej	1 cm ³
FeCl ₃ ·6H ₂ O	–	3,15 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	–	4,36 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,3 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,0 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
biotyna (witamina H)	–	200 mg
cyjanokobalamina (witamina B ₁₂)	1,0 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³
tiamina (witamina B ₁)	1,0 g·l ⁻¹ dH ₂ O	1 cm ³



Fot. 2. Fotobioreaktor rurowy [P. Ratomski]

1. przy użyciu aparatu Soxhleta za pomocą n-Heksanu i wspomaganej mikrofalami; przed ekstrakcją biomasę mikroglonów poddano na mokro działaniu mikrofal o mocy 1000W w czasie 5 min.;
2. przy użyciu mieszaniny rozpuszczalników (chloroformu-metanolu) według BLIGHTA i DYER'A [1959]; odważono 0,5 g suchej masy, dodano 30 ml chloroformu, 10 ml metanolu i całość poddano działaniom ultradźwięków częstotliwości 50 kHz przez okres 30 minut; dodano 12 ml 1% NaCl, wymieszano i po oddzieleniu się fazy lipidowej (dolna faza), prze-filtrowano ją, a następnie oddestylowano rozpuszczalnik.

Zawartość lipidów określono na podstawie podanego niżej wzoru:

$$LC = \left(\frac{m \cdot L}{m_{DAB}} \right) \cdot 100$$

gdzie:

LC = zawartość lipidów;

mL = masa lipidów (g);

mDAB = sucha biomasa mikroalg (g).

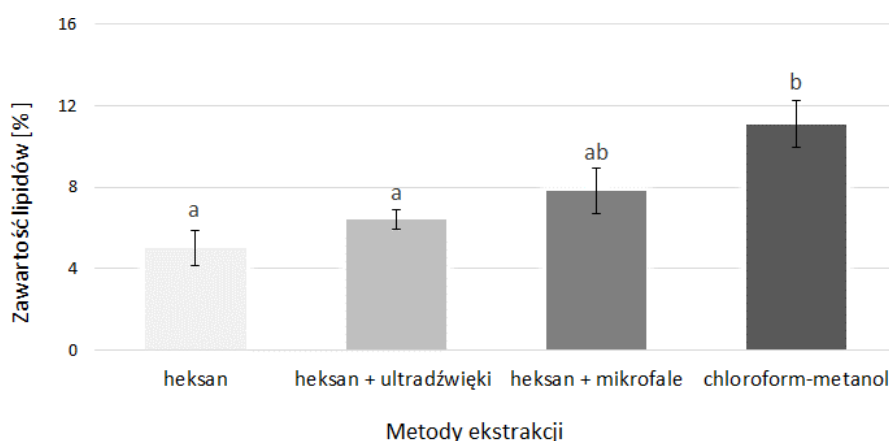
Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Wyniki badań poddano analizie statystycznej przy wykorzystaniu programu komputerowego Statistica ver. 13.3. firmy StatSoft Polska. Przeprowadzono analizę wariancji, a następnie testy istotności wg Tukeya na poziomie $\alpha = 0,05$. Określono również odchylenia standardowe.

DYSKUSJA WYNIKÓW

Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że zastosowane metody ekstrakcji miały istotny wpływ na ilość lipidów pozyskanych z komórek mikroglonów. Najniższą zawartość lipidów oznaczono w przypadku podstawowej metody ekstrakcji heksanem w aparacie Soxhleta, bez poddawania biomasy wstępnej obróbce (ryc. 1). Dzięki częstotliwości wyższej od 20 kHz w cieczy powstają małe pęcherzyki próżniowe powodujące rozrywanie struktury komórkowej [DAE YOON I IN. 1998]. Zastosowanie tej metody skutkuje zwiększeniem efektywności procesu ekstrakcji [SUALI, SARBATLY 2012], co potwierdzono w przeprowadzonych badaniach. Zastosowaniu ultradźwięków zwiększyło ilość pozyskanych lipidów o niemal 30% w porównaniu do metody podstawowej. Odmienne wyniki uzyskali WIDJAJA I IN. [2009]. Autorzy nie odnotowali poprawy wydajności uzyskiwania lipidów przy wykorzystaniu ultradźwięków, jednak stosowali je nie w mokrej, ale wysuszonej, sproszkowanej biomase.

Przy zastosowaniu mikrofal efektywność ekstrakcji wzrosła o 57%. Według LEE I IN. [2010] wspomaganie ekstrakcji przez wprowadzenie mikrofalowania jest jedną z najprostszych i najszybszych metod. Jej wysoka skuteczność polega na lepszym dostępie do lipidów zawartych pod błoną komórkową. SOSTARIC I IN. [2012] potwierdzili, że komórki mikroglonów poddane obróbce mikrofal mają wyższą wydajność pozyskiwanego oleju. Autorzy ci zaobserwowali mikropęknięcia w ich ścianach komórkowych. Dzięki ultradźwiękom i mikrofalowaniu biomasy mikroalg można też zdecydowanie skrócić czas ekstrakcji [REFAAT I IN. 2008, SUALI, SARBATLY 2012].

Najwyższą zawartość lipidów w komórkach mikroglonów oznaczono stosując metodę Bligh-Dyer'a, ponad 120% więcej niż przy metodzie ekstrakcji heksanem bez modyfikacji. Wysoką skuteczność tej metody przypisuje się połączonemu efektowi mechanizmu kawitacji w związku z zastosowaniem ultradźwięków, który uwalnia lipidy do roztworu, i wysokiej selektywności lipidów z mikroalg w stosunku do układu chloroform-metanol-woda, który ma bardziej polarny charakter [ARAUJO I IN. 2012]. Podobne wyniki uzyskali również [RANJAN I IN. 2010].



Rys. 1. Zawartość lipidów w biomase w zależności od metody ekstrakcji [opracowanie własne]

PODSUMOWANIE

Dobór odpowiedniej metody ekstrakcji jest niewątpliwie ważną kwestią w technologii produkcji biopaliw zaawansowanych z mikroglonów. Znalezienie optymalnej procedury będzie miało wpływ nie tylko na jakość pozyskanego paliwa, ale również na jego ostateczną cenę. Obecnie etap związany z pozyskaniem biomasy z medium hodowlanego oraz lipidów z komórek mikroglonów stanowi znaczny udział w ostatecznym rachunku ekonomicznym pozyskania gotowego produktu.

W pracy przedstawiono analizę efektywności czterech metod ekstrakcji w odniesieniu do ilości pozyskanego oleju. Stwierdzono, że najbardziej efektywną metodą, w odniesieniu do biomasy mikroglonów *Chlorella vulgaris*, była metoda Bligh-Dyer'a. Stosując mieszaninę chloroformu-metanolu oznaczono zawartość lipidów na poziomie 11,07%.

LITERATURA

- AMARNI F., KADI H. 2010. Kinetics study of microwave-assisted solvent extraction of oil from olive cake using hexane: comparison with the conventional extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, s. 322–327.
- ARAUJO G.S., MATOS L.J.B.L., FERNANDES J.O., CARTAXO S.J.M., GONÇALVES L.R.B., FERNANDES F.A.N., FARIAS W.R.L. 2012. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method. *Ultrasonic Sonochemistry*, 20(1), s. 95–98.
- BALASUBRAMANIAN S., ALLEN J.D., KANITKAR A., BOLDOR D. 2011. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system-design, optimization, and quality characterization. *Bioresource Technology*, 102, s. 3396–3403.
- BLIGH E. G., DYER W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), s. 911–917.
- BRENNAN L., OWENDE P. 2010. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14, s. 557–577.
- CHEN M., TANG H., MA H., HOLLAND T.C., NG K.Y.S., SALLEY S.O. 2011. Effects of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, 102, s. 1649–1655.
- DAE Y.B., MOKE OH H., JUNE LEE S. 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques*, 12(7), s. 553–556.
- DAROCH M., GENG S., WANG G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, 102, s. 1371–138.
- DEMIRBAS M., DEMIRBAS F. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 52, s. 163–170.
- FENG D., CHEN Z., XUE S., ZHANG W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, 102, s. 6710–6716.
- FUENTES-GRÜNEWALD C., GARCÉS E., ALACID E., SAMPEDRO N., ROSSI S., CAMP J. 2012. Improvement of lipid production in the marine strains *Alexandrium minutum* and *Heterosigma akashiwo* by utilizing abiotic parameters. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 39, s. 207–216.
- GUILLARD R.R.L., RYTHER J.H., 1962. Studies on Marine Planktonic Diatoms I. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, s. 229–239.
- HALIM R., DANQUAH M.K., WEBLEY P.A. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. *Biotechnology Advances*, 30, s. 709–732.
- IQBAL J., THEEGALA C. 2013. Microwave assisted lipid extraction from microalgae using biodiesel as co-solvent. *Algal Research*, 2, s. 34–42.
- JUNGMIN KIM G.Y., LEE H., LIM J., KIM K., WOONG KIM C., PARK M.S., YANG J.W. 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 31, s. 862–876.
- KHOO H.H., SHARRATT P.N., DAS P., BALASUBRAMANIAN R.K., NARAHARISSETTI P.K., SHAIK S. 2011. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. *Bioresource Technology*, 102, s. 5800–5807.

- LEE J. Y., YOO C., JUN S.Y., AHN C.Y., OH H.M. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101 s. 75–77.
- MALCATA F.X. 2011. Microalgae and biofuels: a promising partnership? *Trends in Biotechnology*, 29, s. 542–549.
- MATA T.M., MARTINS A.A., CAETANO N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 14, s. 217–232.
- RANJAN A., PATIL C., MOHOLKAR V.S. 2010. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Industrial Engineering Chemistry Research*, 49, s. 2979–2985.
- REFAAT A.A., EL SHELTAWY S., SADEK K.U. 2008. Optimum reaction time, performance and exhaust emissions of biodiesel produced by microwave irradiation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 5, s. 315–322.
- SOSTARIC M., KLINAR D., BRICELJ M., GOLOB J., BEROVIC, M., LIKOZAR, B. 2012. Growth, lipid extraction and thermal degradation of the microalga *Chlorella vulgaris*. *New Biotechnology*, 29, s. 325–331.
- SUALI E., SARBATLY R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 16, s. 4316–4342.
- WIDJAJA A., CHIEN C.C., Ju Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(1), s. 13–20.

COMPARISON OF THE LIPID EXTRACTION METHODS EFFICIENCY FROM MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS BIOMASS

Ratomski Patryk, Hawrot-Paw Małgorzata

Summary

Biofuels are becoming more and more popular and have a relatively high share in the total fuel production in the world. Soybean, rapeseed, palm and corn oil are the basic feedstock used in the production of biodiesel. Due to the limited availability of arable land, changing climate, as well as environmental and social problems related to the use of food and fodder plants for energy purposes, the production of biodiesel with their participation will be limited. The alternative are oily microorganisms (bacteria, yeast, fungi) as well as microalgae which can be produced with a high lipid content and consequently used as a promising feedstock for biodiesel production. One of the most important stages in the technology of producing this fuel from organisms is obtaining oil, hence the need to search for effective and economical methods of its extraction will be of key importance.

The aim of the presented study was to analyse the effectiveness of lipids extraction methods from microalgae cells as a precursors for the biodiesel production. The most popular method of extraction with hexane was used, which was modified with ultrasound and microwave, and the Bligh-Dyer method with the use of chloroform and methanol. The effectiveness of each method was assessed by measuring the amount of lipids.

Depending on the extraction method used, the obtained lipids were 4.99 to 11.07% in relation to the dry weight of microalgae *Chlorella vulgaris*. Among the tested procedures, the Bligh-Dyer method was identified as the most effective for lipid extraction from microalgae.

Key words: microalgae, biomass, lipids, biodiesel, extraction

Article

Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production

Małgorzata Hawrot-Paw^{1,*} , Patryk Ratomski¹ , Adam Koniuszy¹ , Wojciech Golimowski² ,
Mirosława Teleszko³ and Anna Grygier⁴ 

¹ Department of Renewable Energy Engineering, Faculty of Environmental Management and Agriculture, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland; patryk.ratomski@zut.edu.pl (P.R.); adam.koniuszy@zut.edu.pl (A.K.)

² Department of Agroengineering and Quality Analysis, Faculty of Engineering and Economics, Wrocław University of Economics and Business, Komandorska 180/120, 53-345 Wrocław, Poland; wojciech.golimowski@ue.wroc.pl

³ Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Production Engineering, Wrocław University of Economics and Business, Komandorska 118/120, 53-345 Wrocław, Poland; mirosława.teleszko@ue.wroc.pl

⁴ Department of Food Technology of Plant Origin, Faculty of Food Science and Nutrition, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań, Poland; anna.grygier@up.poznan.pl

* Correspondence: malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl



Citation: Hawrot-Paw, M.; Ratomski, P.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. *Energies* **2021**, *14*, 7334. <https://doi.org/10.3390/en14217334>

Academic Editor: Rocio Maceiras

Received: 30 September 2021

Accepted: 2 November 2021

Published: 4 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Microalgae are considered to be potentially attractive feedstocks for biodiesel production, mainly due to their fast growth rate and high oil content accumulated in their cells. In this study, the suitability for biofuel production was tested for *Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Oocystis submarina*, and *Monoraphidium* strain. The effect of nutrient limitation on microalgae biomass growth, lipid accumulation, ash content, fatty acid profile, and selected physico-chemical parameters of algal biodiesel were analysed. The study was carried out in vertical tubular photobioreactors of 100 L capacity. The highest biomass content at 100% medium dose was found for *Monoraphidium* $525 \pm 29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. A 50% reduction of nutrients in the culture medium decreased the biomass content by 23% for *O. submarina*, 19% for *Monoraphidium*, 13% for *C. vulgaris* and 9% for *C. fusca* strain. Nutrient limitation increased lipid production and reduced ash content in microalgal cells. The highest values were observed for *Oocystis submarina*, with a 90% increase in lipids and a 45% decrease in ash content in the biomass under stress conditions. The fatty acid profile of particular microalgae strains was dominated by palmitic, oleic, linoleic, and linoleic acids. Nutrient stress increased the amount of saturated and unsaturated fatty acids affecting the quality of biodiesel, but this was determined by the type of strain.

Keywords: microalgae; biomass; lipid; fatty acid profile; biodiesel; nutrient limitation; stress conditions

1. Introduction

In the transport sector, biofuels are an alternative to fossil fuels, which are environmentally harmful [1]. Increasing attention on biofuels and technologies of their production was also caused by the global fuel crisis [2].

According to the type of feedstock used in production, there are three main generations of biofuels [3]. The first and second generations of biofuels use food crops, oil crops, and plant biomass from non-food crops and from forestry as substrates. Therefore, their use is related to high competition of plant production and area of arable land [4]. A feasible alternative are third-generation biofuels derived from algal biomass [5].

Microalgal biomass contains considerable amounts of molecules suitable for biofuel production, but also for food supplements, fertilisers, pigments, etc. [6,7]. The potential for energetic use of microalgae is very high, e.g., for the production of biogas, bioethanol, bio-

hydrogen, bio-oil or biodiesel [8,9] currently produced mainly from soybean oil, rapeseed oil, sunflower oil, palm oil [10].

Microalgae are promising candidates for industrial production. Their cultivation does not compete with food crop production and can be carried out using not only freshwater, but also salt water, saline water and different kinds of wastewater [11,12]. Compared to plants, they are characterised by a high photosynthetic rate [13]. Under suitable conditions, their growth rate and the yield of biomass are higher than those of terrestrial plants [14]. The yield of microalgal oil is several times higher than the best oil producing crop [15].

Although algal biofuels have many advantages, they have still not been commercialised. A significant barrier is the excessively high production costs compared to fossil fuels [16], including the production of biomass, its dewatering and the extraction of valuable cellular components [6]. These components include proteins, carbohydrates and lipids [17]. Microalgal oil is a good feedstock for biodiesel production [18], but its content in biomass is often not sufficient for industrial application [19]. There are species of microalgae that accumulate large amounts of lipids, but their growth rate is generally very slow [20]. The lipid content varies according to species of microalgae and culture conditions [21]. Average values range from 20% to 70% of the cell dry weight [22,23]. There are some strategies to increase the natural lipid content in algal cells. This can be realised by genetic engineering [24] or by modifying growing conditions by changing light intensity [25], carbon dioxide content [26], low temperature [27], high light intensity [28], high salt and iron concentrations in the culture medium [29,30], salinity levels [31] or limiting nutrient availability [32]. Microalgae for biofuel production should be characterised by a high cellular lipid accumulation capacity [33]. The application of suitable species will have a beneficial effect on the cost-effectiveness of biofuel production [34].

When assessing the potential of microalgae for biodiesel production, not only the amount of lipids in their cells is important, but also the content of the relevant fatty acids (FAs) [22] as direct precursors for third-generation biofuel production. The fatty acid profile of biodiesel is identical to the profile of the oil used in their production [35]. The increase in lipid content is determined by changes in biosynthetic pathways leading to the formation and accumulation of lipids mainly as a triacylglycerol (TGA) [36]. Microalgal lipids can be divided into neutral lipids, including saturated (SFA) and monounsaturated fatty acids (MUFA), representing the main fatty acids in triacylglycerols, and polyunsaturated fatty acids (PUFA) enriched in polar lipids [37]. The fatty acid profile (FA) of microalgae may also include *iso*- and *anteiso*-branched FAs, methyl-branched FAs, 3-Hydroxy and amide FAs [38].

Triacylglycerols can be converted to fatty acid methyl esters by a transesterification process [39]. In this process the fatty acid composition of the feedstock is not changed [40]. The content of each FAs group in the oil is significant for the quality of the biofuel [22], therefore knowledge of the FA profile can be useful in the selection of algae species for fuel applications. As well as the lipid content, the fatty acid composition can also be modified by changing the concentration of carbon dioxide [41] or by nitrogen (N) deficiency [42].

The most important features determining the suitability of a feedstock for biofuel production are its energy properties and parameters indicating the quality of engine combustion [43]. For biodiesel, these are the heating value (HHV) and the cetane number (CN). In addition, the rheological parameters of biodiesel such as density (D) and kinematic viscosity (KV) are very important, as they have a direct impact on the injection of the fuel inside combustion chamber of the engine [44,45]. Moreover, these parameters affect the functioning of the diesel engine fuel feed system, especially the fuel filter at low temperatures, resulting in flow blockage, which is characterised by a cold filter plugging point (CFPP) [46]. During storage of biofuels, their stability is also very significant, as expressed by the parameters of oxidation stability (OS) and iodine number (IV) [47].

Our aim was to investigate the effect of stress induced by nutrient deprivation on microalgal biomass and lipid production and fatty acid profile (FA). This study was carried

out at technical scale. In addition, FAs were used to predict biodiesel properties and evaluate the suitability of microalgae for biofuel production.

2. Materials and Methods

2.1. Microalgae Strains

Microalgae strains of *Chlorella vulgaris*, *Chlorella fusca*, *Oocystis submarina* and *Monoraphidium* were obtained from the Culture Collection of Baltic Algae (University of Gdańsk, Gdańsk, Poland). The inocula were stored in liquid medium F/2 [48] containing [g·L⁻¹]: NaNO₃—0.075 g; NaH₂PO₄·2H₂O—0.00565 g; stock solution of trace elements—1 mL·L⁻¹ (Na₂EDTA 4.16 g, FeCl₃ 6H₂O 3.15 g, CuSO₄ 5H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 7H₂O 0.022 g, CoCl₂ 6H₂O 0.01 g, MnCl₂ 4H₂O 0.18 g and NaMoO₄ 2H₂O 0.18 g) and stock solution of vitamin mix—1 mL·L⁻¹ (cyanocobalamin (vitamin B12) 0.0005 g, thiamine HCl (vitamin B1) 0.1 g, biotin 0.0005 g). Microalgae were stored at 4 °C, with lighting (12/12 h light/dark cycle).

2.2. Experimental Setup

Microalgae cultures were carried out in vertical tubular photobioreactors with a total volume of 100 L, with 70 L of growth medium. Microalgae were cultured in F/2 culture medium containing all required components at full dose (100%) or reduced by half (50%). A 20 L of 7-day microalgal inoculum was introduced into particular photobioreactors.

The culture was illuminated by light emitting diode (LED light with white, red and blue diodes) under 18/6 h light/dark cycle. Algae culture was mixed and aerated by 175 W membrane pump (HAILEA ACO-500A, Raoping, China) with a capacity of 275 L·min⁻¹. The experiment was carried out as a batch culture for 10 days.

2.3. Analytical Methods

2.3.1. Biomass Content Determination

Biomass content was determined by thermogravimetric measurement using a weigh-dryer (AXIS ATS60, Gdańsk, Poland) [49]. The results were recalculated and presented in mg·L⁻¹. Measurement was carried out on the last day of the experiment.

2.3.2. Lipid and Ash Content of Biomass

Lipid content in biomass was determined by the gravimetric method. To extract lipids from microalgal cell, a modified Bligh and Dyer method was applied [50]. Total lipids were determined after evaporation of the solvent. The lipid content was determined according to the following formula:

$$LC = \frac{m_L}{m_{DAB}} \cdot 100$$

where: m_L is the mass of lipids (g) and m_{DAB} is the dry microalgal biomass (g).

The ash content in biomass was determined gravimetrically according to the Standard PN-EN ISO 18122:2016-01 [51].

2.4. Fatty Acids Methyl Esters Analysis

Lipid extraction from microalgae biomass was performed using the method of Folch et al. [52]. For the determination of fatty acids, they were converted into fatty acid methyl esters according to the method of AOCS Ce 2-66 [53].

The fatty acid composition of the studied samples was estimated using gas chromatography (GC). Fatty acid methyl esters were separated using a Trace 1300 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gas chromatography system equipped with a SP TM-2560 capillary column (100 m × 0.25 mm × 0.2 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a flame-ionization detector (FID). Column temperature was held at 160 °C for 1 min, then the temperature was increased from 160 °C to 220 °C at 6 °C/min and held at 220 °C for an additional 35 min. The temperature of the injection port and the detector was set at 240 °C. Hydrogen was used as a carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min. The results were expressed as a percentage of the total peak area of all the fatty acids in microalgae lipid extract sample.

The peaks were identified by comparing the retention times with those of a mixture of external standard methyl esters (Supelco 37 FAME Mix C 4–C 24 Component, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.1. Biodiesel Properties According to Fatty Acid Profile

Analysis of selected biofuel properties was carried out using the BiodieselAnalyzer© software (version 2.2, BRTeam, Karaj, Iran), according to the methodology described in the works of Ramírez-Verduzco et al. [54] and Talebi et al. [55]. This software was designed to evaluate (predict) the biodiesel fuel properties based on the fatty acid profile determined by gas chromatography, therefore eliminate long and expensive laboratory tests.

Difficulties to determine the best feedstock for biodiesel production arise from the presence more than one evaluation criteria. Therefore, the multi-criteria decision problem required several mathematical programming models. The PROMETHEE method is one of such tools. According to the references [54–57], seven functional parameters were selected and associated with weight factors. The highest weight was assigned to the calorific value (HHV = 0.5), followed by the cetane number (CN = 0.2). The weighting coefficients for CFPP, D, KV, OS, and IV were the same and equals 0.06.

2.2. Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate. Results were statistically analysed using Statistica software (version 13.3, 2016; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Two-factor analysis of variance was used. The significance of differences between means was assessed using Tukey's test at $p \leq 0.05$. The standard deviation (SD) was also determined.

3. Results and Discussion

3.1. Algal Biomass Concentration

The biomass content in the particular photobioreactors was presented in Figure 1. Higher values were observed at the 100% dose of nutrient solution. The biomass content ranged from $292 \pm 14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *C. fusca* to $525 \pm 29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for *Monoraphidium*. These values correspond with results available in the literature [58]. Biomass production can be increased using nutrient-rich culture media [59] but the results are not always positive. In a study carried out by Sacristán et al. [60], increase in nutrient content in culture medium had a negative impact on the growth and development of *Scenedesmus acutus*. This could be associated with the high pH in the culture medium and the presence of toxins in the wastewater used in the cultivation.

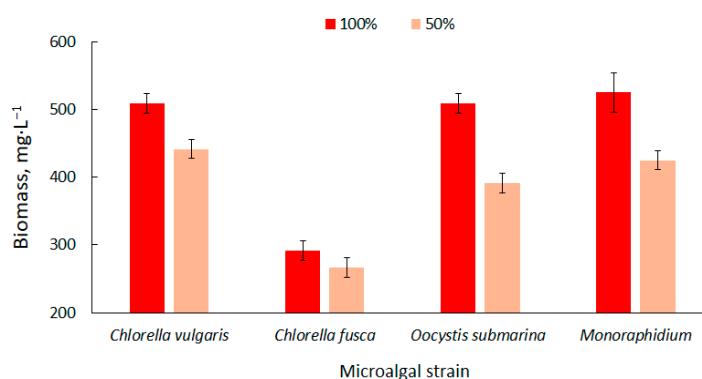


Figure 1. Dynamics of biomass content changes of four strains in relation to nutrient supply in the culture medium.

Nutrient limitation decreases the productivity of biomass [61] which is confirmed by the results of the present study. The amount of biomass decreased by more than 20% for *O. submarina*, 19% for *Monoraphidium*, 13% for *C. vulgaris* and 9% for *C. fusca*. Kim et al. [62] cultivated strains of *Chlorella* sp., *Dunaliella salina* and *Dunaliella* sp. and found that the appropriate amount of nutrients in the medium determines the effective production of algal biomass. They observed a higher increase in biomass in a culture medium with a higher nutrient content.

3.3. Lipid Accumulation under Nutrient Limitation Conditions

High lipid content in microalgae cells is one of the most important criteria that determines their potential use for biofuel production [63]. The lipid content for the tested microalgae strains is shown in Figure 2. The average amount of lipids in relation to dry matter, at the complete nutrient dose (100%), ranged from 12.33 ± 1.0 for *O. submarina* to 13.53 ± 2.1 for *C. fusca*. A higher lipid content for *O. submarina* was reported by Klin et al. [64], but increase in lipid accumulation could be associated with using a different culture medium and a significantly lower photobioreactor capacity.

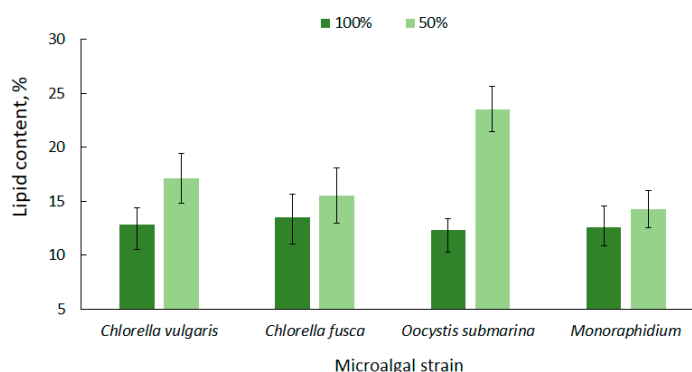


Figure 2. Lipid content in microalgal biomass under nutrient limitation.

Under nutrient stress treatment (50% F/2), there was a 14% increase in lipid accumulation for *Monoraphidium*, 15% for *C. fusca*, 31% for *C. vulgaris*, and over 90% for *O. submarina*; however, only the *C. vulgaris* and *O. submarina* increase was statistically significant. Nutrient limitation to promote lipid accumulation in microalgal cells is a commonly used method [65,66]. Results presented by Converti et al. [67] confirmed the correlation between nitrogen depletion in the culture medium and an increase in lipid accumulation for *Nannochloropsis oculata* and *C. vulgaris*. A 75% nitrogen limitation resulted in a two-fold increase of lipids in the algal cells. In the present study, a slightly lower lipid content was observed for *C. fusca* (from 13.53 ± 2.1 to 15.53 ± 2.5) and for *Monoraphidium* (from 12.53 ± 2.0 to 14.27 ± 1.7), while for *O. submarina* the lipid content under stress conditions was 23.53 ± 2.1 . A similar correlation was observed in a previous study [68] evaluating nutrient stress caused by nitrogen limitation in wastewater from salmon aquaculture on lipid content in *C. vulgaris* biomass. The highest value (11.81%) was determined at the lowest dose of aquaculture wastewater. In the present study, the lipid content in biomass of *C. vulgaris*, regardless of nutrient conditions, was in a range corresponding to values for this species reported by other authors [69,70].

3.4. Ash Content

Microalgal biomass has a high ash content compared to terrestrial plant biomass, and this is one of the major disadvantages in algae conversion to fuel [71]. The ash content in dry matter, depending on the microalgal strain and the culture conditions, is up to 43% [72].

This reduces the total volatile solids content of the feedstock, one of the most important parameters determining the quality of biofuel. A lot of final ash in algal biomass would require fuel purification [73,74].

According to the strain, the average ash content in biomass at 100% dose was in the range from 19.74 ± 1.70 for *O. submarina* to $43.19 \pm 0.24\%$ for *Monoraphidium* (Figure 3). Similar results were presented by Bi and He [75] who found up to 19% ash content for green algae. In this study, the results show that nutrient stress not only promotes lipid accumulation, but generally causes a decrease in ash content in microalgal biomass. In the nutrient-limited medium (50%), ash content ranged from $11.16 \pm 0.07\%$ for *O. submarina* to $37.04 \pm 0.38\%$ for *Monoraphidium*. Increase in ash content was observed only for *C. fusca*, but it was statistically insignificant difference. The correlation between nutrient content and ash content in microalgal biomass was also reported by Roostaei et al. [76]. The limited availability of nutrients in *Chlorella vulgaris* culture significantly decreased ash content.

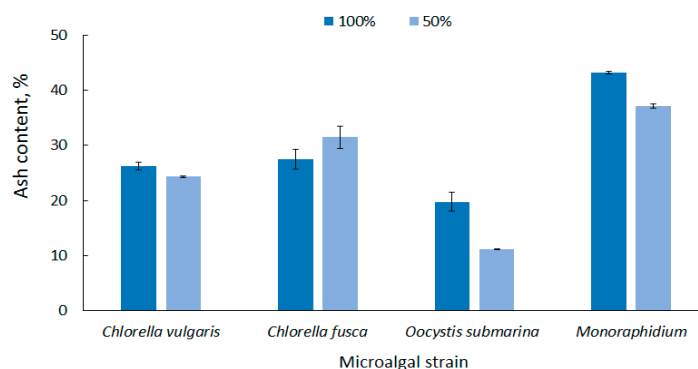


Figure 3. Ash content in microalgal biomass under nutrient limitation.

3.4. Fatty Acid Composition and Content

Microalgal oil is a source of saturated and unsaturated fatty acids [38]. In FAs profiles, groups with chain lengths of C16–C18 are most commonly determined [77], as also confirmed by the results of the presented study (Table 1, Figure 4A–D). The most important FAs that determine the quality of the biofuel are palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) and linolenic acid (C18:3) [78]. In microalgal biomass cultivated in culture medium with complete suggested nutrient rate (100% F/2), palmitic acid (16:0), oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) and linolenic acid (C18:3 n-3) were dominant in the profile, but in different quantities for each strain. Due to environmental stress, fatty acid composition changes [79] which was also observed in this study. A 50% reduction of the dose for all medium components increased palmitic acid content for all strains, oleic acid content for *C. fusca* and *O. submarina*, and linoleic acid for *C. vulgaris* and *C. fusca*. Furthermore, acids that were not present in the 100% F/2 dose were determined, e.g., C16:1, C18:0, C18:3 n-6 and C18:4 for *Monoraphidium*. A higher content of saturated fatty acids (C16:0, C18:0) increases the cetane number (CN) [80]. FAs profiles change not only with species but also intraspecies [81]. Petkov and Garcia [82] analysed the fatty acid composition of three *Chlorella* strains, including freshwater and marine strains, and found that species belonging to the same genus contained the same acids but in different ratios. The presented study does not confirm these results. The C16:1 and C18:3 n-6 fatty acids determined in the FAs profile of *C. vulgaris* were not found in *C. fusca*. The change in FAs composition may also result from different cultivation methods (photoautotrophic, heterotrophic) [83] or from a change in cultivation conditions. In a study carried out by Yusof et al. [41], increasing amount of carbon dioxide in *C. vulgaris* culture medium from 1 to 10% increased concentrations of palmitic, oleic, linoleic, and linolenic acids. In the

present study, cultivations of all strains were carried out at one test site, at the same time, with uniformity of all growing parameters. This means that a biological factor, directly associated with the metabolic activity of particular microalgal strains, is essential for the observed changes. Analysis of FAs profiles in relation to growth stage and adjusting biomass harvesting to the most beneficial stage for optimal fatty acid composition may be important [81]. In a study carried out by da Costa et al. [84], growth phase induced more changes in the fatty acid profile of *Tisochrysis lutea* than stress associated with N limitation in culture medium.

Table 1. Fatty acid profile of microalgae biomass.

Fatty Acid (m:n)	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Chlorella fusca</i>		<i>Oocystis submarina</i>		<i>Monoraphidium</i>	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%
C16:0	20.73	24.61	25.53	28.63	17.17	26.35	19.01	19.56
C16:1	1.46	1.46	ta **	ta **	ta **	ta **	ta **	2.52
C18:0	6.59	5.39	3.11	ta **	ta **	ta **	ta **	0.72
C18:1 cis	22.72	21.68	18.50	20.23	10.15	19.95	17.63	13.62
C18:2 cis	9.90	10.41	11.20	12.10	16.98	11.74	22.51	19.37
C18:3 n-6	1.98	2.37	ta **	ta **	ta **	ta **	ta **	1.09
C18:3 n-3	22.96	18.11	25.32	23.84	28.00	22.91	17.53	16.29
C18:4	3.87	3.68	3.76	ta **	2.77	2.99	ta **	7.91

* m:n ratio in FAs description denotes m carbon atoms and n double bonds between carbon atoms, ** ta – trace amounts.

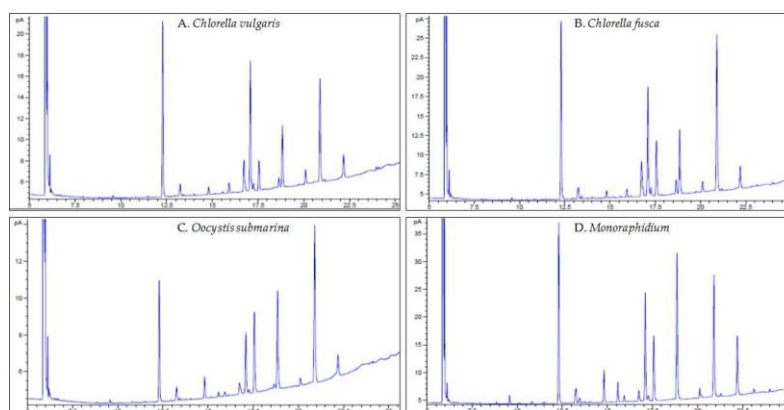


Figure 4. GC-FID chromatograms of fatty acids from particular microalgal strain.

The content of particular fatty acid categories is important for the quality of the biodiesel fuel. High concentration of saturated fatty acids (SFAs) ensures good oxidation resistance for biofuel [85]. In the presented study *C. vulgaris* has a total of 27.32% SFAs, *C. fusca* of 28.64%, *O. submarina* of 17.17%, and *Monoraphidium* of 19.01% (Figure 5). Taking into account not only oxidation stability, but also liquidity at low temperatures, monounsaturated fatty acids (MUFAs) are particularly important for biodiesel production [86]. The MUFAs content in the presented studies ranged from 10.15% to 24.18% of the total lipid composition. The lowest content was found for *O. submarina*, the highest for *C. vulgaris* (100%). Dahmen et al. [87] applied stress conditions (high salinity) to *Picochlorum* culture and observed lipid enrichment in saturated fatty acids. Nutrient stress from nutrient limitation (50% F/2) increased SFAs content to 30% for *C. vulgaris*, 26.35% for *O. submarina*, and slightly for *Monoraphidium* (to 20.28%). Arora and Philippidis [88] reported beneficial for biofuel production biosynthesis of SFAs and MUFAs in *C. vulgaris* culture using sweet sorghum pomace hydrolysate (mixotrophic conditions). Rohit and Mohan [89] under mixotrophic and heterotrophic conditions, found for *Chlorella* strain not only increase in

MUFAs but also PUFAs content. Polyunsaturated fatty acids are not good for biodiesel production. For different microalgae strains, the content of PUFAs ranges very widely from less than 3% to almost 69% [56]. In the present study, the lowest content of PUFAs in the profile was found for *C. vulgaris* (38.71%), the highest for *O. submarina* (47.75%). Under nutrient-limited conditions in the culture, beneficial changes, i.e., decrease in PUFA content, were observed for both species of *Chlorella* and for *O. submarina*. The high content of PUFAs may increase nitrogen oxide emissions [86] from the biofuel although according to a study carried out by Wahlen et al. [90] biodiesel from the microalgae *Chaetoceros gracilis* had lower NOx emissions compared to conventional diesel. Low amount of PUFAs have a positive effect on the biodiesel flow properties, especially at low temperatures [81].

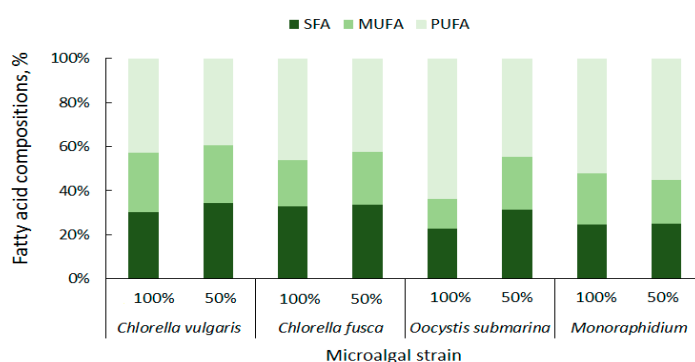


Figure 5. Summary composition of fatty acids in microalgal biomass.

3.5. Biodiesel Properties

Selected results from BiodieselAnalyzer© Version 2.2 are shown in Table 2. In terms of energy, nutrient limitation was found to increase only the HHV values only for *O. submarina* and *Monoraphidium*. Lower nutrient dose decreased HHV for both *Chlorella* species. The best feedstock for biodiesel production was oil from *C. vulgaris* 100%, HHV = 35.483 MJ·kg⁻¹. The high energetic potential of *Chlorella* was also confirmed in a study carried out by Sakarika et al. [91], who compared energy efficiency of biodiesel, biomethane, and solid biofuel produced from the biomass of this microalgae species. Among the high-energy microalgae, *Nannochloropsis* sp. may be interesting, especially in countries with high insolation, as highlighted in the paper of Pradana et al. [92].

Table 2. Biodiesel fuel properties calculated on fatty acid profile.

Parameter	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Chlorella fusca</i>		<i>Oocystis submarina</i>		<i>Monoraphidium</i>	
	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%
HHV	35.483	34.495	34.353	33.328	29.467	32.979	30.157	31.831
CN	48.401	52.013	49.704	53.83	53.361	52.507	57.601	50.651
D	0.795	0.772	0.771	0.747	0.665	0.74	0.676	0.717
KV	3.076	3.008	2.93	2.876	2.422	2.808	2.593	2.636
CFPP	0.388	−0.278	−3.571	−7.482	−11.083	−8.199	−10.505	−9.201
OS	5.975	6.408	5.82	5.872	5.212	5.994	5.536	5.799
IV	122.302	109.386	120.04	105.354	126.696	112.896	104.603	126.491

HHV: Higher Heating Value (MJ·kg⁻¹), CN: Cetane number, D: Density (g·cm⁻³), KV: Kinematic Viscosity (mm²·s⁻¹), CFPP: Cold Filter Plugging Point (°C), OS: Oxidation Stability (h), IV: Iodine Value.

Nutrient stress increased the cetane number for *Chlorella* strains, in contrast to *O. submarina* and *Monoraphidium*. The highest value of this parameter was obtained for *Monoraphidium* 100%, CN = 57.601. The CN value for oil of all tested microalgae species

was high compared to the results presented by Yasar et al. [93] for oils from oil crops cultivated for biodiesel production. The rheological parameters of biodiesel produced from microalgal biomass, such as density and kinematic viscosity, presented in Table 2, suggest that nutrient stress increased their values for *O. submarina* and *Monoraphidium*. The opposite dependence was found for *Chlorella* strains. The highest values were observed for *C. vulgaris* cultivated with full dose of nutrients (C.v.100%). They were respectively $D = 0.795 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and $KV = 3.076 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ and were most similar to the parameters of conventional diesel fuel ($D = 0.82\text{--}0.845 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ and $KV = 2\text{--}4.5 \text{ mm}^2\cdot\text{s}^{-1}$).

A significant parameter of biodiesel is the cold filter plugging point. The lowest and the most beneficial value of this parameter was obtained for *O. submarina* (O.100%), CFPP = -11.08°C . Under nutrient stress conditions beneficial decrease in CFPP was observed only for *Chlorella* strains. The high oil content improves the CFPP index, therefore use of these microalgae is advantageous, especially when their cultivation is not competitive with food crops [94].

Oxidation stability, which indicates the formation of different types of sediments, resins, and acids in the fuel, increased for limited nutrient dose (50%) and had the most beneficial value for *C. vulgaris* (OS = 6.41 h). This is also confirmed by research carried out by Islam et al. [57].

Regarding iodine number IV, characterising the content of unsaturated compounds in biofuel, the 50% lower nutrient dose had a positive effect on this parameter except for *Monoraphidium*, which was characterised by the lowest value $IV = 104.60$ at complete nutrient dose (100%). In a study carried out by Islam et al. [57], the most beneficial value for this parameter was observed for *Calothrix* sp.

This study has shown that biodiesel produced from oil of different types of microalgae has some beneficial and some disadvantages. Other authors concluded the same [57]. The analysed parameters of biofuels produced from the investigated energy feedstocks do not provide their complete evaluation. According to a few studies carried out in this topic [95,96], a complete evaluation of such energy feedstocks can be obtained only during engine tests. In these tests, not only energy parameters determination, but also emission of toxic components of exhaust gases can be evaluated, thus also environmental assessment of such biofuels.

Figure 6 shows results of carried out analysis with highlighting those microalgae species whose position is most close to the so-called decision axis. It is important to note that all highlights were microalgal strains under nutritional stress. It is concluded that nutrient stress in three out of four possible cases (except *Monoraphidium*), had a beneficial effect on the functional properties of the newly produced biodiesel. The ranking of microalgae strains, considering the culture conditions, is shown in Table 3.

Table 3. Ranking list of microalgae according to their suitability for biodiesel production.

Rank	Microalgae Strains		E/2 Component Dose, %	Phi
	Description	Name		
1	C.f.50%	<i>C. fusca</i>	50	0.1586
2	C.v.50%	<i>C. vulgaris</i>	50	0.1097
3	O.50%	<i>O. submarina</i>	50	0.0664
4	M.100%	<i>Monoraphidium</i>	100	0.0294
5	C.v.100%	<i>C. vulgaris</i>	100	0.0150
6	C.f.100%	<i>C. fusca</i>	100	0.0067
7	M.50%	<i>Monoraphidium</i>	50	−0.1379
8	O.100%	<i>O. submarina</i>	100	−0.2479

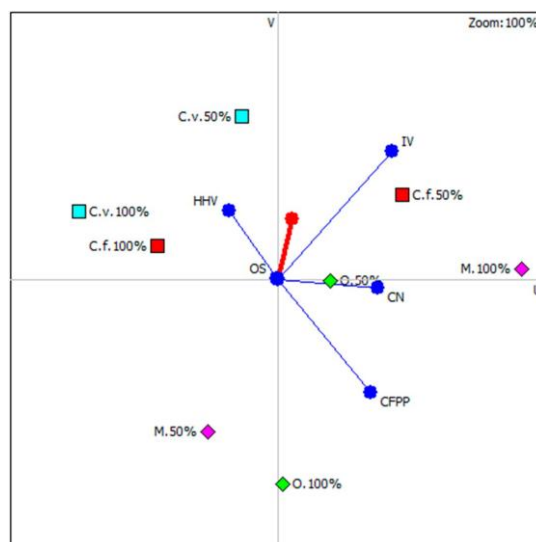


Figure 6. Graphical multi-criteria analysis PROMETHEE-GAIA (C.f. — *C. fusca*, C.v. — *C. vulgaris*, O. — *O. submarina*, M. — *Monoraphidium*).

4. Conclusions

Nutrient limitation (50% F/2) decreased microalgal biomass production, while beneficial changes were observed in ash and lipid content. The fatty acid profile of tested green microalgae strains indicates that these algae can be a source of feedstock for advanced biofuel production. Under nutritional stress conditions lipid enrichment in saturated fatty acids for *C. vulgaris*, *O. submarina* and *Monoraphidium*, and monounsaturated fatty acids for *C. fusca* and *O. submarina* was noted, which improves the biodiesel fuel properties. The fatty acid profile gives some information about the quality of microalgal biomass as an energy feedstock, but without engine tests, this assessment is not sufficient. However, according to carried out analysis, it can be concluded that nutrient limitation has a beneficial effect on the functional properties of biodiesel produced from oil of the tested microalgae. Positive changes were found for *C. fusca*, *O. submarina* and *C. vulgaris*.

Author Contributions: Conceptualization, M.H.-P.; methodology, M.H.-P., A.K., M.T. and A.G.; validation, M.H.-P., P.R., A.K., W.G., M.T. and A.G.; formal analysis, M.H.-P., P.R., A.K., M.T. and A.G.; investigation, M.H.-P., P.R., A.K., W.G., M.T. and A.G.; data curation, M.H.-P.; writing—original draft preparation, M.H.-P., P.R., A.K., M.T., A.G.; writing—review and editing, M.H.-P., P.R. and A.K.; visualization, M.H.-P., P.R. and A.K.; supervision, M.H.-P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Man, K.L.; Lee, K.T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 679–690.
- Goh, B.H.H.; Ong, H.C.; Cheah, M.Y.; Chen, W.H.; Yu, K.L.; Mahlia, T.M.I. Sustainability of direct biodiesel synthesis from microalgae biomass: A critical review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *107*, 59–74. [\[CrossRef\]](#)
- Dragone, G.; Fernandes, B.; Vicente, A.A.; Teixeira, J.A. Third generation biofuels from microalgae. In *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex: Badajoz, Spain, 2010; pp. 1355–1366.
- Ho, S.H.; Ye, X.; Hasunuma, T.; Chang, J.S.; Kondo, A. Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae – A critical review. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 1448–1459. [\[CrossRef\]](#)
- Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 557–577. [\[CrossRef\]](#)
- Demirbas, A.; Demirbas, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers. Manag.* **2011**, *52*, 163–170. [\[CrossRef\]](#)
- Chew, K.W.; Yap, J.Y.; Show, P.L.; Suan, N.H.; Juan, J.C.; Ling, T.C.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour. Technol.* **2017**, *229*, 53–62. [\[CrossRef\]](#)
- Behara, S.; Singh, R.; Arora, R.; Sharma, N.K.; Shukla, M.; Kumar, S. Scope of algae as third generation biofuels. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hossain, N.; Mahlia, T.M.I.; Saidur, R. Latest development in microalgae-biofuel production with nano-additives. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 125. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mizik, T.; Gyarmati, G. Economic and Sustainability of Biodiesel Production—A Systematic Literature Review. *Clean Technol.* **2021**, *3*, 19–36. [\[CrossRef\]](#)
- Wijffels, R.H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 26–31. [\[CrossRef\]](#)
- Tu, R.; Jin, W.; Xi, T.; Yang, Q.; Han, S.; Abomohra, A. Effect of static magnetic field on the oxygen production of *Scenedesmus obliquus* cultivated in municipal wastewater. *Water Res.* **2015**, *86*, 132–138. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, X.M.; Ren, L.J.; Zhao, Q.Y.; Ji, X.J.; Huang, H. Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnol. Biofuels* **2018**, *11*, 272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Demirbas, A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Convers. Manag.* **2010**, *51*, 2738–2749. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, J.; Gu, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 2596–2610. [\[CrossRef\]](#)
- Chu, W.L. Strategies to enhance production of microalgal biomass and lipids for biofuel feedstock. *Eur. J. Phycol.* **2017**, *52*, 419–437. [\[CrossRef\]](#)
- Fabris, M.; Abbriano, R.M.; Pernice, M.; Sutherland, D.L.; Commault, A.S.; Hall, C.C.; Labeeuw, L.; McCauley, J.I.; Kuzhiuparambil, U.; Ray, P.; et al. Emerging technologies in algal biotechnology: Toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Levasseur, W.; Perré, P.; Pozzobon, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *41*, 107545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Najafabadi, H.A.; Pazuki, G.; Vossoughi, M. Experimental study and thermodynamic modeling for purification of extracted algal lipids using an organic/aqueous two-phase system. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 1153–1160. [\[CrossRef\]](#)
- Duong, V.T.; Thomas-Hall, S.R.; Schenk, P.M. Growth and lipid accumulation of microalgae from fluctuating brackish and sea water locations in South East Queensland – Australia. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 359. [\[CrossRef\]](#)
- Huerlimann, R.; de Nys, R.; Heimann, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 245–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- El Arroussi, H.; Benhima, R.; Bennis, I.; El Mernissi, N.; Wahby, I. Improvement of the potential of *Dunaliella tertiolecta* as a source of biodiesel by auxin treatment coupled to salt stress. *Renew. Energy* **2015**, *77*, 15–19. [\[CrossRef\]](#)
- Sharma, P.K.; Saharia, M.; Srivastava, R.; Kumar, S.; Sahoo, L. Tailoring microalgae for efficient biofuel production. *Front. Mar. Sci.* **2018**, *5*, 1–18. [\[CrossRef\]](#)
- Wahidin, S.; Idris, A.; Shaleh, S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 7–11. [\[CrossRef\]](#)
- Rodolfi, L.; Zittelli, G.C.; Bassi, N.; Padovani, G.; Biondi, N.; Bonini, G.; Tredici, M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotech. Bioeng.* **2009**, *102*, 100–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chokshi, K.; Pancha, I.; Trivedi, K.; George, B.; Maurya, R.; Ghosh, A.; Mishra, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. *Bioresour. Technol.* **2015**, *180*, 162–171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jiang, L.; Ji, Y.; Hu, W.; Pei, H.; Nie, C.; Ma, G.; Song, M. Adjusting irradiance to enhance growth and lipid production of *Chlorella vulgaris* cultivated with monosodium glutamate wastewater. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *162*, 619–624. [\[CrossRef\]](#)

29. Hsieh, C.H.; Wu, W.T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3921–3926. [\[CrossRef\]](#)
30. Pancha, I.; Chokshi, K.; Maurya, R.; Trivedi, K. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* **2015**, *189*, 341–348. [\[CrossRef\]](#)
31. Damiani, M.C.; Popovich, C.A.; Constenla, D.; Leonardi, P.I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3389–3396. [\[CrossRef\]](#)
32. He, P.J.; Mao, B.; Shen, C.M.; Shao, L.M.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 177–181. [\[CrossRef\]](#)
33. Su, Y.; Song, K.; Zhang, P.; Su, Y.; Cheng, J.; Chen, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *74*, 402–411. [\[CrossRef\]](#)
34. Sun, J.; Xiong, X.; Wang, M.; Du, H.; Li, J.; Zhou, D.; Zuo, J. Microalgae biodiesel production in China: A preliminary economic analysis. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2019**, *104*, 296–306. [\[CrossRef\]](#)
35. Knothe, G. Designer biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* **2008**, *22*, 1358–1364. [\[CrossRef\]](#)
36. Hu, Q.; Sommerfeld, M.; Jarvis, E.; Ghirardi, M.; Posewitz, M.; Seibert, M.; Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J.* **2008**, *54*, 621–639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Yang, M.; Fan, Y.; Wu, P.C.; Chu, Y.D.; Shen, P.L.; Xue, S.; Chi, Z.Y. An Extended Approach to Quantify Triacylglycerol in Microalgae by Characteristic Fatty Acids. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1949. [\[CrossRef\]](#)
38. Maltsev, Y.; Maltseva, K. Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2021**, *20*, 515–547. [\[CrossRef\]](#)
39. Zhu, L.D.; Li, Z.H.; Hiltunen, E. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 8792548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Ramos, M.J.; Fernández, C.M.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Pérez, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 261–268. [\[CrossRef\]](#)
41. Yusof, Y.A.M.; Basari, J.M.H.; Mukti, N.A.; Sabuddin, R.; Muda, A.R.; Sulaiman, S.; Makpol, S.; Ngah, W.Z.W. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 13536–13542.
42. Wan Afifudeen, C.L.; Loh, S.H.; Aziz, A.; Takahashi, K.; Effendy, A.W.M.; Cha, T.S. Double-high in palmitic and oleic acids accumulation in a non-model green microalga, *Messastrium gracile* SE-MC4 under nitrate-repletion and -starvation cultivations. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 381. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Atadashi, I.M.; Aroua, M.K.; Aziz, A.A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 1999–2008. [\[CrossRef\]](#)
44. Tat, M.E.; Gerpen, J.H.V. The specific gravity of biodiesel and its blends with diesel fuel. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 115–119. [\[CrossRef\]](#)
45. Dzida, M.; Prusakiewicz, P. The effect of temperature and pressure on the physicochemical properties of petroleum diesel oil and biodiesel fuel. *Fuel* **2008**, *87*, 1941–1948. [\[CrossRef\]](#)
46. De Torres, M.; Jiménez-Osés, G.; Mayoral, J.A.; Pires, E. Fatty acid derivatives and their use as CFPP additives in biodiesel. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 2590–2594. [\[CrossRef\]](#)
47. Kralova, I.; Sjoblom, J. Biofuels—renewable energy sources: A review. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2010**, *31*, 409–425. [\[CrossRef\]](#)
48. Guillard, R.R.L.; Ryther, J.J. Studies of marine planktonic diatoms in *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229–239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* biomass in tubular photobioreactors during different culture conditions. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3106. [\[CrossRef\]](#)
50. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Polish Standards PN-EN ISO 18122:2016-01. Biopaliwa Stałe—Oznaczanie Zawartości Popiołu, 2016. Polish Committee for Standardisation. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-18122-2016-01p.html> (accessed on 26 April 2021). (In Polish)
52. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [\[CrossRef\]](#)
53. AOCS. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society*, 2nd ed.; American Oil Chemist's Society, AOCS Press: Champaign, IL, USA, 1997; pp. 1–2.
54. Ramírez-Verduzco, L.F.; Rodríguez-Rodríguez, J.E.; del Rayo Jaramillo-Jacob, A. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel* **2012**, *91*, 102–111. [\[CrossRef\]](#)
55. Talebi, A.F.; Mohtashami, S.K.; Tabatabaei, M.; Tohidfar, M.; Bagheri, A.; Zeinalabedini, M.; Mirzaei, H.M.; Mirzajanzadeh, M.; Shafaroudi, S.M.; Bakhtiari, S. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. *Algal Res.* **2013**, *2*, 258–267. [\[CrossRef\]](#)
56. Islam, M.A.; Magnusson, M.; Brown, R.J.; Ayoko, G.A.; Nabi, M.N.; Heimann, K. Microalgal Species Selection for Biodiesel Production Based on Fuel Properties Derived from Fatty Acid Profiles. *Energies* **2013**, *6*, 5676–5702. [\[CrossRef\]](#)

57. Deshmukh, S.; Bala, K.; Kumar, R. Selection of microalgae species based on their lipid content, fatty acid profile and apparent fuel properties for biodiesel production. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, *26*, 24462–24473. [\[CrossRef\]](#)
58. Zhao, Y.; Li, D.; Ding, K.; Che, R.; Xu, J.W.; Zhao, P.; Li, T.; Ma, H.; Yu, X. Production of biomass and lipids by the oleaginous microalgae *Monoraphidium* sp. QLY-1 through heterotrophic cultivation and photo-chemical modulator induction. *Bioresour. Technol.* **2016**, *211*, 669–676. [\[CrossRef\]](#)
59. Dhup, S.; Dhawan, V. Effect of nitrogen concentration on lipid productivity and fatty acid composition of *Monoraphidium* sp. *Bioresour. Technol.* **2014**, *152*, 572–575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Sacristán de Alva, M.; Luna-Pabello, V.M.; Cadena, E.; Ortiz, E. Green microalgae *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 744–748. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Gigova, L.; Ivanova, N.J. Microalgae respond differently to nitrogen availability during culturing. *J. Biosci.* **2015**, *40*, 365–374. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Kim, W.; Park, J.M.; Gim, G.H.; Jeong, S.H.; Kang, S.H.; Kang, C.M.; Kim, D.J.; Kim, S.W. Optimization of culture conditions and comparison of biomass productivity of three green algae. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2012**, *35*, 19–27. [\[CrossRef\]](#)
63. Griffiths, M.J.; Harrison, S.T. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* **2009**, *21*, 493–507. [\[CrossRef\]](#)
64. Klin, M.; Pniewski, F.; Latała, A. Characteristics of the growth rate and lipid production in fourteen strains of Baltic green microalgae. *Oceanol. Hydrobiol. Stud.* **2018**, *47*, 10–18. [\[CrossRef\]](#)
65. Procházková, G.; Brányiková, I.; Zachleder, V.; Brányik, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* **2014**, *26*, 1359–1377. [\[CrossRef\]](#)
66. Singh, P.; Kumari, S.; Guldhe, A.; Misra, R.; Rawat, I.; Bux, F. Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *55*, 1–16. [\[CrossRef\]](#)
67. Converti, A.; Casazza, A.A.; Ortiz, E.Y.; Perego, P.; Del Borghi, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* **2009**, *48*, 1146–1151. [\[CrossRef\]](#)
68. Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Influence of Nutrient-Stress Conditions on *Chlorella vulgaris* Biomass Production and Lipid Content. *Catalysts* **2021**, *11*, 573. [\[CrossRef\]](#)
69. Kim, J.; Lingaraju, B.P.; Rheume, R.; Lee, J.Y.; Siddiqui, K.F. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Sci. Technol.* **2010**, *15*, 391–396. [\[CrossRef\]](#)
70. Mata, T.M.; Martins, A.A.; Caetano, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 217–232. [\[CrossRef\]](#)
71. Vassilev, S.; Vassileva, C.; Vassilev, V. Advantages and disadvantages of composition and properties of biomass in comparison with coal: An overview. *Fuel* **2015**, *158*, 330–350. [\[CrossRef\]](#)
72. Vassilev, S.; Baxter, D.; Vassileva, C. An overview of the behaviour of biomass during combustion: Part II. Ash fusion and ash formation mechanisms of biomass types. *Fuel* **2014**, *117*, 152–183. [\[CrossRef\]](#)
73. Vardon, D.R.; Sharma, B.K.; Scott, J.; Yu, G.; Wang, Z.; Schideman, L.; Zhang, Y.; Strathmann, T.J. Chemical properties of biocrude oil from the hydrothermal liquefaction of *Spirulina* algae, swine manure, and digested anaerobic sludge. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 8295–8303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Gai, C.; Zhang, Y.; Chen, W.T.; Zhang, P.; Dong, Y. Energy and nutrient recovery efficiencies in biocrude oil produced via hydrothermal liquefaction of *Chlorella pyrenoidosa*. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16958–16967. [\[CrossRef\]](#)
75. Bi, Z.; He, B.B. Characterization of microalgae for the purpose of biofuel production. *Trans. ASABE* **2013**, *56*, 1529–1539.
76. Roostaei, J.; Zhang, Y.; Gopalakrishnan, K.; Ochocki, A.J. Mixotrophic Microalgae Biofilm: A Novel Algae Cultivation Strategy for Improved Productivity and Cost-efficiency of Biofuel Feedstock Production. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Knothe, G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2*, 759–766. [\[CrossRef\]](#)
78. Lee, S.J.; Go, S.; Jeong, G.T.; Kim, S.K. Oil Production from Five Marine Microalgae for the Production of Biodiesel. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **2011**, *16*, 561–566. [\[CrossRef\]](#)
79. Teh, K.Y.; Loh, S.H.; Aziz, A.; Takahashi, K.; Effendy, A.W.M.; Cha, T.S. Lipid accumulation patterns and role of different fatty acid types towards mitigating salinity fluctuations in *Chlorella vulgaris*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
80. Giakoumis, E.G.; Sarakatsanis, C.K.A. Comparative Assessment of Biodiesel Cetane Number Predictive Correlations Based on Fatty Acid Composition. *Energies* **2019**, *12*, 422. [\[CrossRef\]](#)
81. Morales, M.; Aflalo, C.; Bernard, O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass Bioenergy* **2021**, *150*, 106108. [\[CrossRef\]](#)
82. Petkov, G.; Garcia, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 281–285. [\[CrossRef\]](#)
83. Zhang, K.; Sun, B.; She, X.; Zhao, F.; Cao, Y.; Ren, D.; Lu, J. Lipid production and composition of fatty acids in *Chlorella vulgaris* cultured using different methods: Photoautotrophic, heterotrophic, and pure and mixed conditions. *Ann. Microbiol.* **2014**, *64*, 1239–1246. [\[CrossRef\]](#)
84. Da Costa, F.; Le Grand, F.; Quéré, C.; Bougaran, G.; Cadoret, J.P.; Robert, R.; Soudant, P. Effects of growth phase and nitrogen limitation on biochemical composition of two strains of *Tisochrysis lutea*. *Algal Res.* **2017**, *27*, 177–189. [\[CrossRef\]](#)

85. Mostafa, S.S.M.; El-Gendy, N.S. Evaluation of fuel properties for microalgae *Spirulina platensis* biodiesel and its blends with Egyptian petro-diesel. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, 2040–2050. [\[CrossRef\]](#)
86. Cao, Y.; Liu, W.; Xu, X.; Zhang, H.; Wang, J.; Xian, M. Production of free monounsaturated fatty acids by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
87. Dahmen, I.; Chtourou, H.; Jebali, A.; Daassi, D.; Karray, F.; Hassairi, I.; Sayadi, S.; Abdelkafi, S.; Dhoubib, A. Optimisation of the critical medium components for better growth of *Picochlorum* sp. and the role of stressful environments for higher lipid production. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 1628–1638. [\[CrossRef\]](#)
88. Arora, N.; Philippidis, G.P. Insights into the physiology of *Chlorella vulgaris* cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 6779. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Rohit, M.V.; Mohan, S.V. Quantum Yield and Fatty Acid Profile Variations with Nutritional Mode during Microalgae Cultivation. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 111. [\[CrossRef\]](#)
90. Wahlen, B.D.; Morgan, M.R.; McCurdy, A.T.; Willis, R.M.; Morgan, M.D.; Dye, D.J.; Bugbee, B.; Wood, B.D.; Seefeldt, L.C. Biodiesel from Microalgae, Yeast, and Bacteria: Engine Performance and Exhaust Emissions. *Energy Fuel* **2013**, *27*, 220–228. [\[CrossRef\]](#)
91. Sakarika, M.; Kornaros, M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. *Bioresour. Technol.* **2019**, *273*, 237–243. [\[CrossRef\]](#)
92. Pradana, Y.S.; Sudibyo, H.; Suyono, E.A.; Indarto; Budiman, A. Oil Algae Extraction of Selected Microalgae Species Grown in Monoculture and Mixed Cultures for Biodiesel Production. *Energy Procedia* **2017**, *105*, 277–282. [\[CrossRef\]](#)
93. Yas,ar, F. Comparison of fuel properties of biodiesel fuels produced from different oils to determine the most suitable feedstock type. *Fuel* **2020**, *264*, 116817. [\[CrossRef\]](#)
94. Gouveia, L.; Oliveira, A.L. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 269–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
95. Mofijur, M.; Rasul, M.G.; Hassan, N.M.S.; Nabi, M.N. Recent Development in the Production of Third Generation Biodiesel from Microalgae. *Energy Procedia* **2019**, *156*, 53–58. [\[CrossRef\]](#)
96. Tayari, S.; Abedi, R.; Rahi, A. Comparative assessment of engine performance and emissions fueled with three different biodiesel generations. *Renew. Energy* **2020**, *147*, 1058–1069. [\[CrossRef\]](#)

Article

Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend Produced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport

Patryk Ratowski ¹ , Małgorzata Hawrot-Paw ^{1,*} , Adam Koniuszy ¹ , Wojciech Golimowski ² , Andrzej Kwaśnica ³  and Damian Marcinkowski ² 

¹ Department of Renewable Energy Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Pawła VI 1, 71-459 Szczecin, Poland; adam.koniuszy@zut.edu.pl (A.K.)

² Department of Agroengineering and Quality Analysis, Faculty of Production Engineering, Wrocław University of Economics and Business, Komandorska 180/120, 53-345 Wrocław, Poland; damian.marcinkowski@ue.wroc.pl (D.M.)

³ Department of Food Chemistry and Biocatalysis, Wrocław University of Life Sciences, C.K. Norwida Street 25, 50-375 Wrocław, Poland

* Correspondence: malgorzata.hawrot-paw@zut.edu.pl

Abstract: According to the EU Directive, the so-called RED II, there is increasing significance for biofuels produced from biomass with low indirect land use change (ILUC) risk. Such an alternative and sustainable feedstock could be microalgae, among others, used for biodiesel production. This is due to the high lipid content of their cells and their potential ability to accumulate significant amounts of carbon dioxide in their biomass, which has a positive effect on the carbon footprint of the product. The aim of this study was to determine the effect of adding algal biodiesel to conventional diesel fuel on selected performance parameters of a diesel engine, taking into account the composition of the emitted exhaust gas. Energy-related engine performance parameters such as power, hourly and specific fuel consumption, engine thermal efficiency, and indicated efficiency were determined. No significant differences were found in the energy parameters of engine operation with the fuels tested. In terms of carbon monoxide and NOx emissions, at the highest engine torque, more favorable parameters were obtained for fuel with biodiesel produced from rapeseed oil (B/RME). Under the same conditions, carbon dioxide emissions for the fuel with the addition of biodiesel from microalgae (B/Algae) were 8.1% lower.

Keywords: microalgal oil; biodiesel; diesel engine; energy parameters; exhaust emissions



Citation: Ratowski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Kwaśnica, A.; Marcinkowski, D. Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend Produced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport. *Energies* **2023**, *16*, 5376. <https://doi.org/10.3390/en16145376>

Academic Editor: Evangelos G. Giakoumis

Received: 20 June 2023

Revised: 3 July 2023

Accepted: 13 July 2023

Published: 14 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

A significant amount of fossil fuels are used as transport fuels [1]. Their combustion in engines emits harmful compounds into the atmosphere, including carbon dioxide, carbon monoxide, and hydrocarbons [2]. For environmental reasons, but also for technological limitations related to oil extraction and the instability of oil prices on world markets, interest in alternative fuels has increased [3]. For the commonly used diesel fuel, biodiesel is a good substitute and can be successfully used in diesel engines [4]. This biofuel, compared to conventional fuel, has better lubricity properties, a higher flash point, and lower exhaust emissions in terms of sulfur and aromatics [5]. Some limitations are related, among others, to the freezing of biodiesel at low temperatures and lower stability during storage [6]. At present, food feedstocks are primarily used to produce this biofuel [7], which implies a fuel-food competition. The European Commission's view, expressed in the Renewable Energy Directive (RED II) of December 2018, is that the use of food and feedstocks should be reduced in favor of non-food feedstocks.

Lignocellulosic wastes and crops grown on uncultivated agricultural land can be used for biofuel production [8], while microalgae are promising candidates for the production

of third-generation advanced biofuels. Their cultivation does not compete with crop production and can be carried out using not only freshwater but also salt water, saline water, and various types of wastewater [9–11]. Compared to plants, they are characterized by a high photosynthetic rate. Under favorable conditions, their growth rate and the yield of biomass obtained are higher compared to terrestrial plants [12]. For biodiesel production, it is important that the oil content of microalgae cells be higher than that of the best oilseed crops [13,14]. The level of lipid accumulation in the biomass and its composition depend, among other things, on the composition of the culture medium and the cultivation parameters, including temperature, type of light, intensity, and time of illumination of the culture [15]. The properties of algal oil are similar to the physicochemical parameters of vegetable oils [16]. The fatty acid profile of microalgae oil indicates that it is a good substrate for biodiesel production [17]. Monounsaturated fatty acids, which constitute the majority in triacylglycerols [18,19], can be converted to fatty acid methyl esters during transesterification [20,21]. The oil content of microalgae cells, as well as their fatty acid composition, varies with cultivation conditions [22].

For the economics of microalgal biodiesel production, the cost of biomass cultivation and transformation as well as the method of lipid extraction will be important [23], while for the evaluation of the energy potential, parameters providing evidence of combustion quality in the engine will be essential [24]. The physical and chemical properties of algal biofuel are similar to those of conventional diesel fuel [25,26]. However, research results on the use of algal biofuel in engines compared to conventional fuel are not consistent. Some indicate that the use of algal biofuel blends results in higher thermal efficiency [27], while others report a decrease in maximum cylinder pressure, an increase in specific fuel consumption [28], a decrease in brake thermal efficiency, and an increase in exhaust gas temperature [29]. In a study carried out by Al-Iwayzy and Yusaf [30], there were no differences between diesel-fueled engine performance and the comparative algal biofuel blend.

One of the most important issues related to the use of fuels is the emissions that enter the environment. Special attention is given to carbon dioxide as the main greenhouse gas of human origin. Naturally, CO₂ emissions and uptake should balance each other over a period of time, but at the present time, the level of emissions caused by human activity and the use of fossil fuels in various sectors of the economy, including transport, is too high. This has a significant impact on climate change [31], hence the need for technologies that promote the reduction of these emissions and increased CO₂ sequestration [32]. Considering life cycle assessment, microalgae fit perfectly into these requirements. The carbon dioxide necessary for microalgae growth can come from the atmosphere or from industrial emissions [33]. The photosynthetic efficiency of microalgae ranges from 10 to 20%, while for most terrestrial plants it is 1 to 2% [34]. It is assumed that more than 1.8 kg of carbon dioxide can be fixed to every 1 kg of biomass, although this value may differ according to the type of microalgae [35]. Microalgae use CO₂ to produce their own biomass, which can be converted to bioenergy [36], including biofuels, potentially promoting the decarbonization of transport. Algal biomass can be converted to biomethane [37], bioethanol [38], or biohydrogen [39]. Another possibility to obtain an alternative fuel is the production of refined bio-crude from hydrothermal liquefaction [40,41]. For algal biodiesel, the concentration of CO, CO₂, hydrocarbons (HC), and NO in emissions from an engine fueled by it depends on the percentage of biofuel in the blend [42], the type of algae used to obtain the oil for biodiesel production [43], and the cultivation method and culture conditions [44].

The aim of the present study was to evaluate selected engine performance indicators operating at different torques, powered by a diesel fuel mixture containing biodiesel produced from microalgal biomass oil. The algal biodiesel was introduced into the diesel at exactly the same dosage as in commercial fuel containing biodiesel made from rapeseed oil as a biocomponent. As part of the study, dynamometer tests were performed on a single-cylinder diesel engine with direct injection. During the measurements, the following engine parameters were determined: effective power, fuel consumption per hour and specific fuel consumption, average indicated pressure, thermal efficiency, indicated efficiency, and

specific exhaust emissions (CO, NO_x, hydrocarbons, and CO₂). The novelty of the paper was to determine how the addition of microalgae biofuel instead of RME would affect the energy and environmental performance of a diesel engine operating under varying torque conditions. The results of the study may be useful in the formulation of new, more environmentally friendly fuel blends.

2. Materials and Methods

2.1. Biodiesel from Algal Oil

The study used diesel fuel obtained from a Polish refinery. A 7% addition of biofuel from microalgae (B/Algae) was introduced into this fuel. The biofuel was prepared in the laboratory by a transesterification process using methanol and a homogeneous alkaline catalyst. The precursor for biofuel production was oil extracted from the biomass of two microalgal strains: *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus*. A commercial diesel containing a 7% addition of biodiesel produced from rapeseed was used as a control (B/RME).

2.2. Experimental Setup

2.2.1. Microalgal Biomass Production

Microalgae of *Scenedesmus* and *C. vulgaris* (ratio 70:30) were cultivated in vertical tube photobioreactors 204 cm high and 24 cm in diameter with a total volume of 100 L (Figure 1). Cultures were grown using commercial F/2 medium. LED lighting with red, blue, and white LEDs in a ratio of 70:20:10 at an intensity of $285 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was used to illuminate the culture. A photoperiod of 18/6 h of light/dark cycles was used. Carbon dioxide was introduced into the culture with atmospheric air using a membrane pump (HAILEA ACO-500A, Guangdong, China) with 175 W and a capacity of $275 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$. The experiment was carried out as a batch culture for 10 days.



Figure 1. Tubular photobioreactors with a 100 L capacity.

After cultivation, the microalgal biomass was dewatered using a centrifuge at 8000 rpm. Oil extraction from the algae was carried out after biomass drying.

2.2.2. Lipid Extraction

The biomass was dried at 55 °C for 48 h. Microalgal cells were extracted with methanol. The biomass was flooded with solvent in a 1:3 ratio (*w/w*). After 24 h, the methanol-oil solution was separated using a vacuum filtration system. The methanol from the solution was removed using a rotary evaporator.

2.2.3. Transesterification

Transesterification of microalgal oil was carried out with methanol. The molar ratio of methanol to oil was 6:1. Potassium hydroxide (KOH) at 1.5% (*w/w*) was used as a catalyst. The oil was adjusted to 50 °C, followed by the addition of the previously prepared potassium methanolate. The temperature was adjusted to 55 °C and stirred intensively (650 rpm) for 30 min. At the end of the process, the mixture was transferred to a separating funnel and allowed to separate the glycerol phase from the biodiesel phase.

2.2.4. Dynamometric Stand

Dynamometer tests were carried out in the combustion engine laboratory. The test system included a four-stroke diesel engine (TD200) (Table 1), a volumetric fuel gauge, display modules, an engine cycle analyzer (ECA 100), an exhaust gas calorimeter (TDX00a), and an exhaust emission diagnostic analyzer (CAP3201). A schematic of the test stand is shown in Figure 2.

Table 1. Technical specifications of the four-stroke diesel engine TD200.

Parameter	Value
dimensions	width 400 mm, height 450 mm, depth 350 mm
net weight	35 kg
fuel	diesel fuel with the following minimum parameters: en590 or bs2869 a1/a2 or astm d975 – 1d/2d
exhaust outlet	nominally 1" (bsp)
maximum power	3.5 kW (4.8 Ps) at 3600 rpm
nominal power	3.1 kW at 3000 rpm
cylinder diameter	69 mm
stroke/crank radius	62 mm/31 mm
crank length	104 mm
engine capacity	232 cm ³
compression ratio	22:1
volume of oil in the lubrication system	0.9 L



Figure 2. Scheme of the test stand: 1 — diesel engine; 2 — fuel tank; 3 — measuring devices; 4 — computer; 5 — calorimeter; 6 — exhaust gas analyzer.

Partial power characteristics were carried out at an initial speed setting of 2000 rpm, followed by an increase in engine torque.

Engine speed and torque were measured each time. From this, the usable power of the engine was determined. The time of consumption of a fixed dose of fuel (8 mL) was also measured. These data were used to determine hourly and specific fuel consumption. The mean cylinder pressure indicated was measured using a piezoelectric sensor. From this, the engine's indicated power and efficiency were calculated. To determine the overall efficiency, the average calorific value was taken according to available literature data: $42.6 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ for B/RME (according to the commercial fuel producer data) and $41 \text{ MJ} \cdot \text{kg}^{-1}$ for B/Algae [25], respectively. In addition, an emissions composition analysis was performed using an exhaust gas analyzer. Measurements were taken and converted according to standards: PN-ISO 15550 2009 [45], PN-ISO 3046-1 2009 [46], PN-ISO 3046-3 2009 [47], and PN-ISO 3046-5 2009 [48]. Exhaust emissions were determined according to standards: PN-ISO 8178-1 1999 [49] and PN-ISO 8178-6 2000 [50].

All analyses were reduced to normal conditions. Normal atmospheric conditions, according to accepted standards, are a temperature of 25°C and a pressure of 100 kPa. Engine performance was monitored using TecQuipment software (Nottingham, UK).

2.3. Statistical Analysis

All analyses were carried out in triplicate. Results were statistically analyzed using Statistica software (version 13.3, 2016; Dell Inc., Tulsa, OK, USA). A one-way analysis of variance was used. The significance of differences between means was assessed using Tukey's test at $p \leq 0.05$. Standard deviations (SD) were also determined.

3. Results and Discussion

3.1. Energy Efficiency of the Engine

Increased engine torque resulted in a reduction in engine speed. These changes were partially compensated by the reaction of a centrifugal mechanical speed controller, but it was clearly found that the engine fueled with microalgae biofuel reacted more favorably (by about 7%) (Figure 3a). When the engine was loaded with 6 Nm of torque, the engine speed was 1731 rpm for B/Algae and 1725 rpm for B/RME (Figure 3b). According to other authors' studies [51], changes in engine speed may also be related to a lower cetane number in the fuel, which is responsible for lowering the combustion performance of the fuel mixture and reducing the energy released per unit volume of fuel, thus reducing the braking power at high torque.

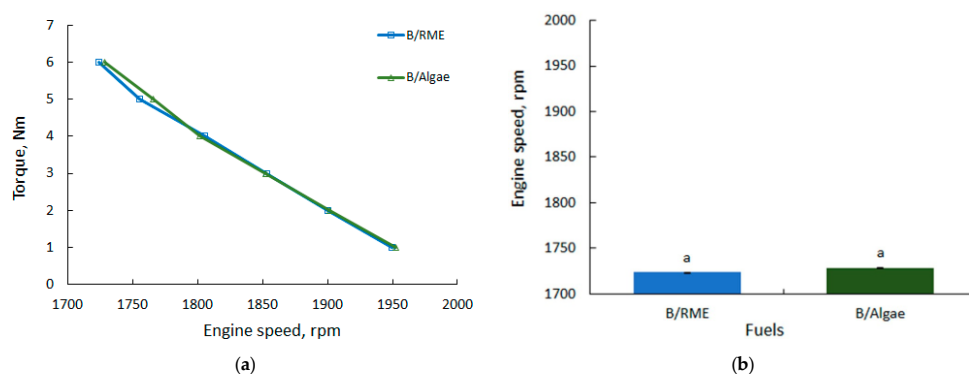


Figure 3. Relationship between speed and engine torque (a); speed at the highest engine torque of 6 Nm (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm \text{SD}$) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

The relation of useful engine power to engine speed is shown in Figure 4a. The higher engine power was obtained for B/Algae fuel, where the torque-dependent value ranged from 0.205 kW to 1.087 kW. For B/RME fuel, the usable power was lower by between 0.3 and 0.5%. The engine's power is influenced by the calorific value of the fuel. In a study carried out by Serrano et al. [52], a decrease in engine power was observed after the use of fuel with lower calorific value biocomponents. The higher useful power may also be related to the higher viscosity of the biofuel. Its increase results in less internal leakage at the fuel pump, which consequently increases engine power [53]. Tüccar and Aydin [54] reported a reduction in engine power after using algal biodiesel.

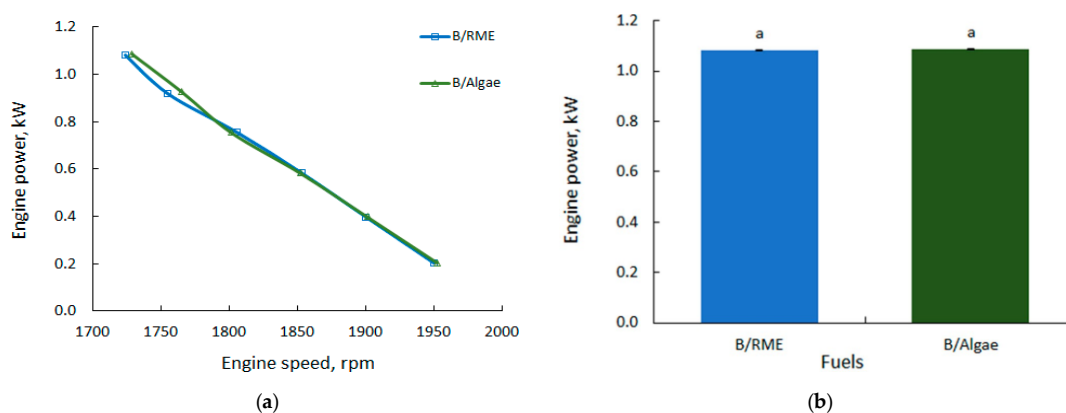


Figure 4. Relationship between engine power and engine speed (a); engine power at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

In the presented study, the lowest hourly fuel consumption was observed for B/Algae fuel. Depending on the engine torque, fuel consumption ranged from $175 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ to $328 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1}$ (Figure 5a). For B/RME fuel, an increase in hourly fuel consumption relative to B/Algae was found in the range of 0.3 to 2.5%. When analyzing the highest engine torque (6 Nm), the hourly fuel consumption for B/Algae was lower by 0.3% (Figure 5b). This parameter is mainly influenced by the calorific value of the fuel, as confirmed by Reis et al. [55] in their study, where, together with the calorific value of the fuel, the fuel consumption increased. In our study, the biocomponent concentration in the fuel blend was at the same level, and the calorific value for both biofuels is also very similar; therefore, the differences between B/Algae and B/RME variants were not significant.

In the study carried out, the highest specific fuel consumption was observed at the lowest engine torque, which confirms studies by other authors [56,57]. The B/Algae fuel proved to be more advantageous in this aspect. At a torque of 6 Nm compared to B/RME fuel, the difference was 0.95% (Figure 6). In addition to calorific value, specific fuel consumption is also influenced by parameters such as viscosity, specific gravity, and engine injection system [58]. A decrease in the calorific value and an increase in the viscosity of the fuel require an increase in the fuel mixture flow rate to maintain the same operating conditions. In a study carried out by Khiari et al. [59], a high proportion of biodiesel with a higher viscosity and lower calorific value resulted in a significant increase in specific fuel consumption. Murad and Al-Dawody [60] found that the use of algal methyl ester (AME) blends with diesel increased brake-specific fuel consumption. Similar results for the amount of fuel consumed per unit of braking power (SFC) were obtained by Subramaniam et al. [27] in a comparative study of diesel and microalgal fuel.

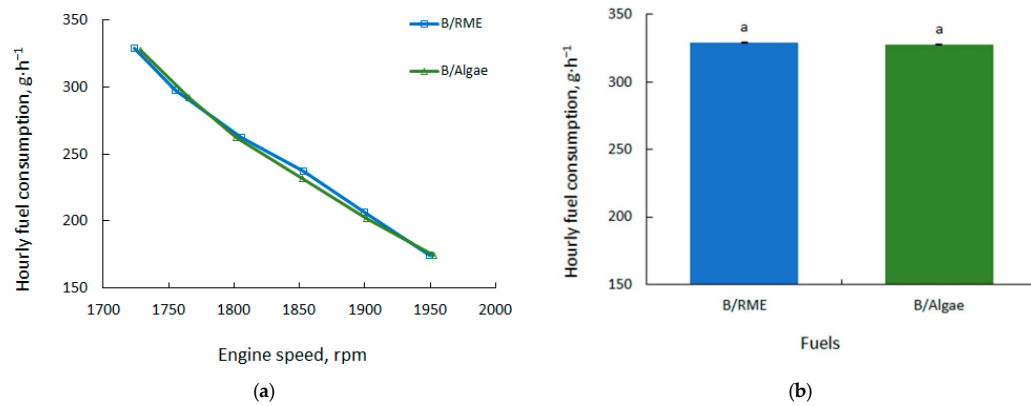


Figure 5. Hourly fuel consumption in relation to engine speed (a); hourly fuel consumption at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

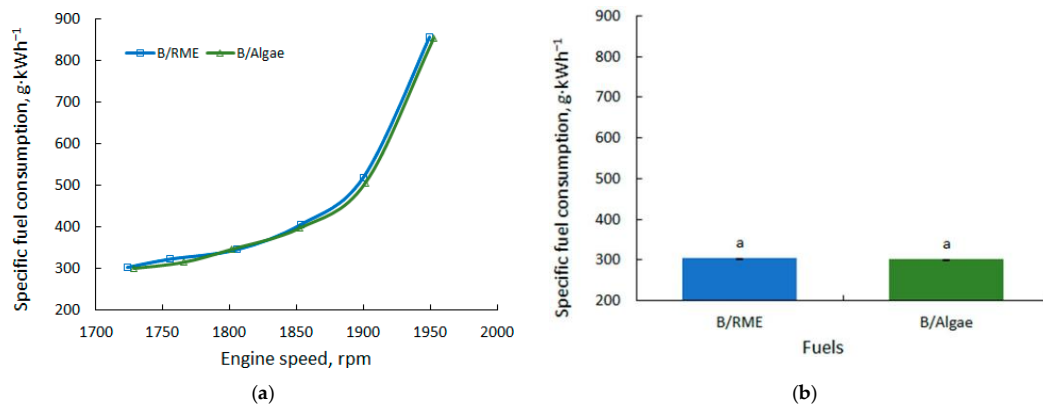


Figure 6. Specific fuel consumption in relation to engine speed (a); specific fuel consumption at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

The indicated efficiency of the engine powered with the microalgae biofuel blend was higher compared to B/RME, from 43.8 to 46.2% (Figure 7a). The highest indicated efficiency at the characteristic points tested was recorded for an engine torque of 4 Nm for B/Algae and 3 Nm for B/RME. The type of fuel had no significant effect on the indicated efficiency in this experiment. Lebedevas et al. [61] found that differences in indicated efficiency for diesel fuel and pure oil from *P. moriformis* did not exceed 2–3% (at moderate dynamics, $m = 0.5$).

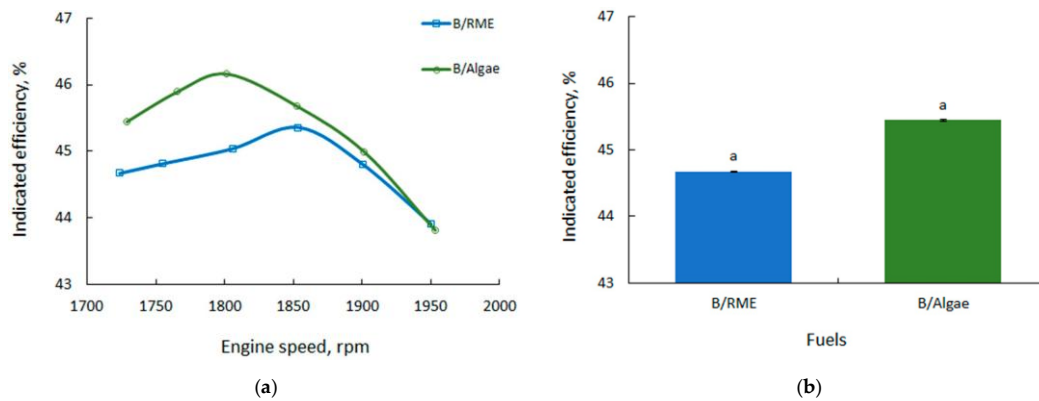


Figure 7. Indicated efficiencies in relation to engine speed (a); indicated efficiencies at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

The engine thermal efficiency is shown in Figure 8a. For the tested fuels, the most beneficial parameters were observed at the highest engine torque and lowest engine speeds. For B/Algae fuel, the efficiency ranged from 10% (1 Nm) to 28% (6 Nm). For B/RME, there was a slight reduction in efficiency (1.26% on average). Fuel parameters that partly affect engine efficiency are mainly fuel viscosity and molecular weight. Higher fuel viscosity results in lower fuel atomization, which consequently increases the amount of fuel combusted in the diffusion mode, resulting in lower combustion efficiency [62]. Less beneficial combustion parameters are related to an increase in carbon monoxide emissions at high engine speeds, as confirmed in the present study.

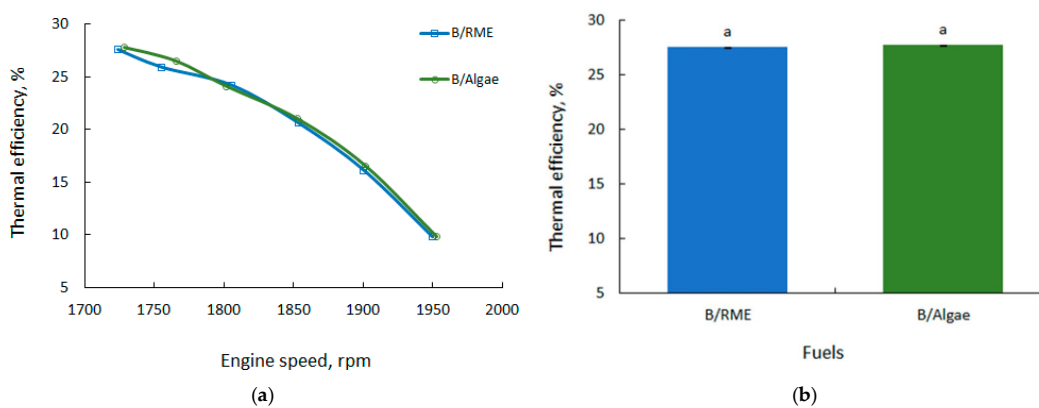


Figure 8. Engine thermal efficiency in relation to engine speed (a); engine thermal efficiency at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

Figure 9 presents the engine cylinder pressure waveforms as a function of crankshaft angle for the combustion of the two fuels. According to the results, for higher torque, slightly higher pressures were observed for the tested fuels. The maximum indicated pressure slightly exceeded 60 bars. No significant differences were observed for the tested

fuels at different torque levels, and it was therefore concluded that the type of fuel has a non-significant effect on this parameter. Similar conclusions were presented by Vadivelu et al. [63] in their study, where the highest cylinder pressure was determined for a fuel with biocomponents.

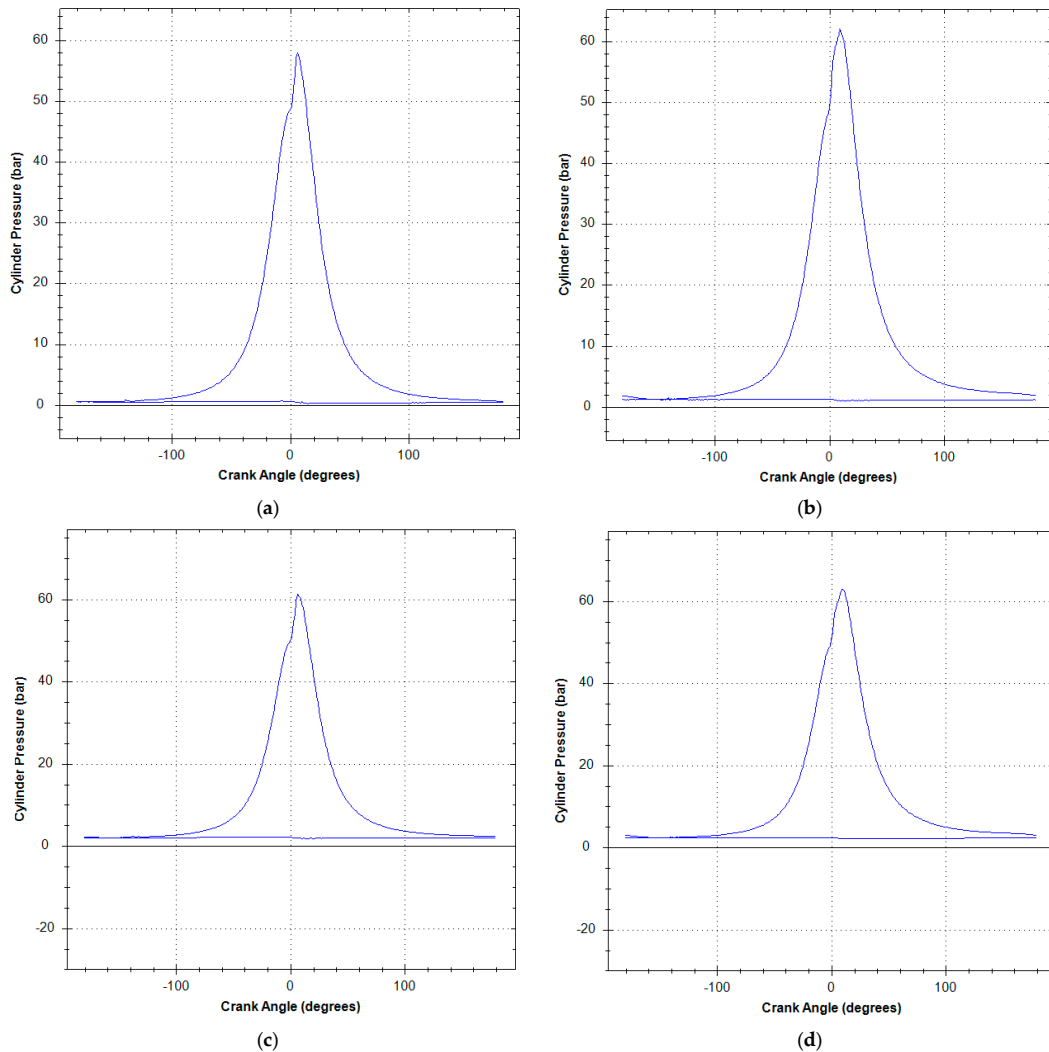


Figure 9. Engine cylinder pressure for B/RME/1 Nm (a), B/RME/6 Nm (b), B/Algae/1 Nm (c), and B/Algae/6 Nm (d).

The average indicated pressure is shown in Figure 10. When analyzing the tested fuels, values similar to each other were observed, where the maximum differences between the fuel mixture variants at the measuring points were 0.1 bar. At the highest torque, a 1% lower effective pressure was observed for the B/RME fuel.

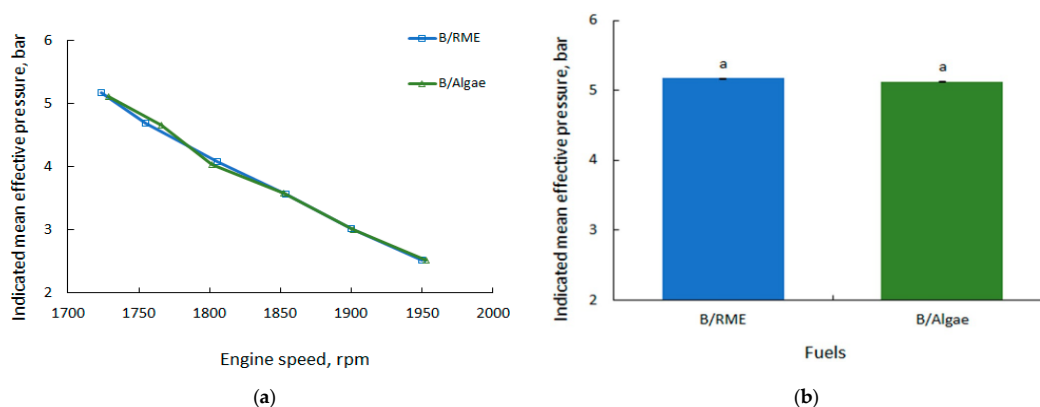


Figure 10. Mean effective indicated pressure in relation to engine speed (a); mean effective pressure at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

3.2. Engine Emissions

Carbon monoxide (CO) emissions in the exhaust gas were determined by the engine torque and fuel type. For the lowest torque (1 Nm), more beneficial results were obtained for the B/Algae variant, where emissions were 67% lower compared to B/RME (Figure 11a). With increasing torque and decreasing speed, emissions already at 2 Nm torque were lower for B/RME than for B/Algae. Analyzing the emissions at the highest torque, for B/RME it was $1.6 \text{ g} \cdot \text{kWh}^{-1}$ (Figure 11b), while for B/Algae it was $1.05 \text{ g} \cdot \text{kWh}^{-1}$ higher. Carbon monoxide is formed as a result of incomplete combustion due to, among other things, a lack of oxygen or short combustion reaction times, so emissions of this compound increase with the biofuel content in the fuel mixture, where the amount of oxygen needed to atomize the carbon is lower [64]. However, as observed in this study, the amount of oxygen for fuel combustion was sufficient, and the Lambda coefficient (air ratio) was above unity at all measurement points (Figure 12a). At the lowest speed, the Lambda coefficient was 2.65 for B/RME and 2.62 for B/Algae. CO emissions are influenced by the calorific value of the fuel, which is related to the amount of energy stored in the fuel that is released during the combustion process. A lower calorific value implies a higher amount of fuel injected to obtain the same amount of energy, which can result in an increase in emissions [52].

Figure 13 shows CO_2 emissions as a function of engine speed. Carbon dioxide is a greenhouse gas largely responsible for global warming, so this parameter is very important in the environmental assessment of fuels. Lower CO_2 emissions were observed for variant B/Algae. Values in the range of 1.06 to $2.55 \text{ kg} \cdot \text{kWh}^{-1}$ were obtained at the analyzed engine performance points. Carbon dioxide emissions for B/RME were higher by an average of 6.7%. At 6 Nm torque, where the most beneficial engine parameters in terms of energy were found, the difference in emissions was 8.1% for the benefit of B/Algae. In a study carried out by El-Baz et al. [65], during combustion of a blend containing 20% biofuel prepared from microalgae oil, a reduction in CO_2 emissions of a maximum of 8% was obtained compared to diesel for the blend. According to these authors, the emission reduction is related to the lower C/H ratio compared to conventional fuel.

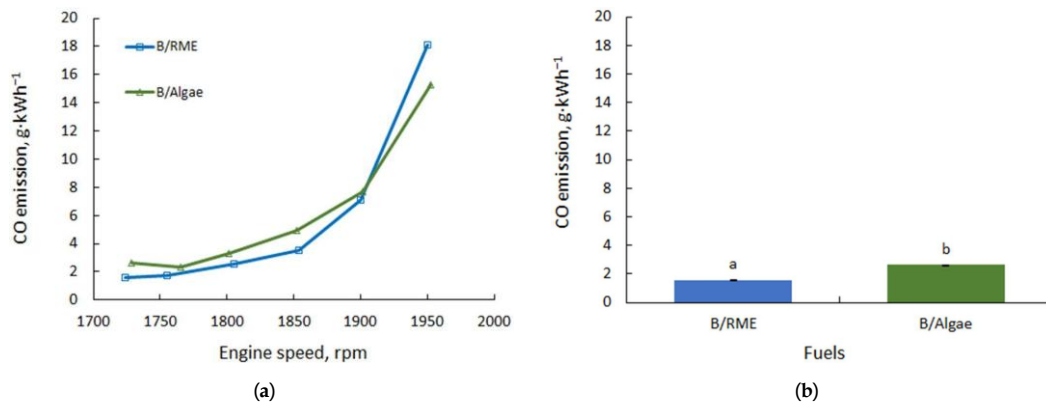


Figure 11. Carbon monoxide emissions in relation to engine speed (a); carbon monoxide emissions at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

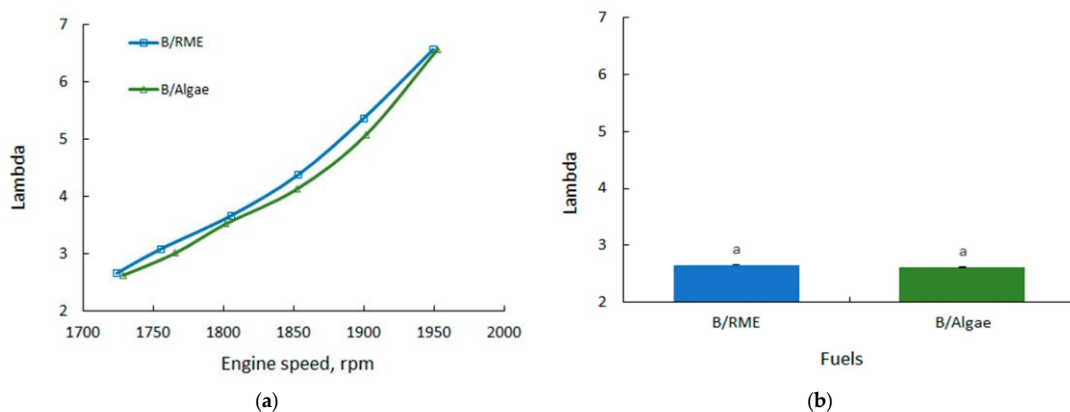


Figure 12. Lambda coefficient in relation to speed (a); Lambda coefficient at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

The total carbon balance for biofuels includes the stages associated with cultivation, transport, biomass conversion, and the amount of CO₂ absorbed from the atmosphere [66,67]. When analyzing the biofuel production cycle in terms of carbon dioxide emissions, algal oil-based fuels have lower carbon dioxide emissions (16.10 g CO₂·MJ⁻¹) with respect to RME (21.60 g CO₂·MJ⁻¹) [68]. For the combustion of biofuels, the aspect of carbon dioxide capture from the atmosphere during the growth of the biomass used to produce the biofuel should also be considered. For example, the total carbon sequestration in winter oilseed rape biomass, including primary, secondary, and root yield (less than 10 t·ha⁻¹), was 15.6 t CO₂ ha⁻¹·yr⁻¹ [69]. Theoretically, using solar energy, 280 tonnes of dry algal biomass can be produced per hectare per year, using around 513 tonnes of CO₂ [70].

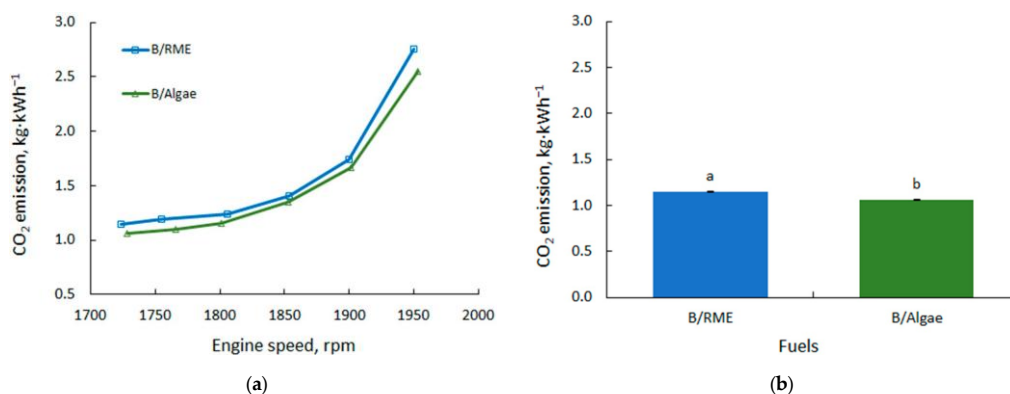


Figure 13. Carbon dioxide emissions in relation to engine speed (a); carbon dioxide emissions at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

The hydrocarbon emissions are shown in Figure 14. The lowest emissions were recorded at the lowest engine speed, where the engine torque achieved its maximum value. For B/RME, only at this measurement point was the emission value lower than for B/Algae, at 0.01 g·kWh⁻¹ and 0.05 g·kWh⁻¹, respectively. Increasing engine speed caused an increase in HC emissions. As the engine torque decreased, hydrocarbon emissions for B/RME were higher than for B/Algae, with an average increase of 53%. Debowski et al. [71] compared emissions for *Chlorella protothecoides* algae biodiesel and rapeseed oil biodiesel and found that at low engine torque, HC emissions determined for the algae biodiesel were significantly lower than those for the RME biodiesel. An increase in HC emissions with speed was also reported by Serrano et al. [72]. The level of HC emissions is determined by the engine's mode of operation. For engine operation characteristic of urban vehicle operation, HC emissions are lower while increasing in the non-urban cycle, as reported by Armas et al. [73]. These results are consistent with the data obtained in this study.

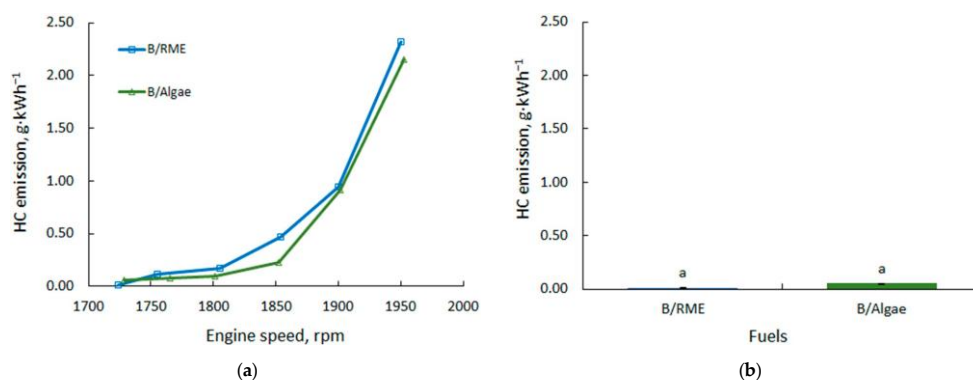


Figure 14. Hydrocarbon emissions in relation to engine speed (a); HC emissions at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

NOx emissions were lower for B/RME and ranged from 0.74 to 3.02 g·kWh⁻¹ (Figure 15). NOx emissions for B/Algae ranged from 0.88 to 3.16 g·kWh⁻¹, respectively. In most studies, an increase in NOx emissions is observed when biodiesel is used. This is attributed to the higher oxygen content of the fuel, which favors complete combustion [74]. An increase in NOx emissions as a result of the addition of methyl esters from microalgae to diesel fuel was also reported by Sharif et al. [75]. In a study by Wahlen et al. [76], biodiesel from the microalgae *Chaetoceros gracilis* had lower NOx emissions than conventional diesel fuel.

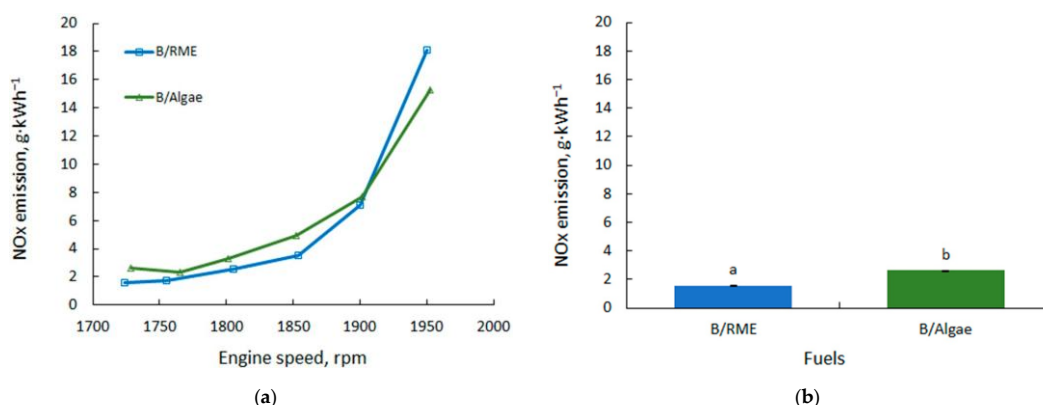


Figure 15. NOx emissions in relation to engine speed (a); NOx emissions at 6 Nm torque (b). Different letters above the error bars (i.e., $\pm$ SD) indicate significant differences ($p < 0.05$) between the means; means followed by the same letter do not statistically differ from each other (Tukey's post-hoc test).

4. Conclusions

This paper presents the results of tests on a diesel engine powered with a mixture of diesel with 7% RME or biofuel obtained from the oil of microalgae (*Scenedesmus* and *C. vulgaris*). The effect of fuel type on the energy and environmental parameters of the tested engine was evaluated.

The lack of significant differences in energy parameters means that the fuel produced from microalgae oil can be used to power a diesel engine. For useful power, the differences for both fuels did not exceed 0.7%. For specific fuel consumption, the maximum differences were 2.3% in favor of the B/Algae blend. Also, the indicated efficiency and overall engine efficiency indicators determined in the study were more favorable for B/Algae (approximately 2.5%). For the applied fuels, no significant differences were recorded for changes in engine indicated pressure as a function of crankshaft rotation angle.

For both fuel blends, all emissions were below the standards applicable to the tested engine. Specific CO emissions for the highest engine torque were 1.05 g·kWh⁻¹ lower for the B/RME fuel than for NOx emissions. HC emissions were also lower, with a reduction rate of only 0.04 g·kWh⁻¹ compared to the B/Algae variant. A significant difference in favor of the microalgae biofuel blend was found for CO₂ emissions. The values determined in the B/Algae variant were more than 8% lower compared to B/RME. Since microalgae have the ability to absorb significant amounts of CO₂ during growth, the overall balance for third-generation fuels is lower, making them competitive with first-generation fuels.

The study demonstrated that the tested fuels are very similar in energy terms. Some emissions of harmful exhaust components from an engine fueled with microalgae biofuel were slightly higher compared to RME but did not exceed the acceptable standard for this type of engine. The use of a B/Algae blend was found to be a better alternative with regard to the use of renewable resources while maintaining increasingly stringent exhaust emission standards. Biofuel from microalgae can successfully represent the fuel of the

future, especially in freight transport, for which electromobility technology will still remain less viable due to its high power requirements.

Author Contributions: Conceptualization, M.H.-P. and A.K. (Adam Koniuszy); methodology, M.H.-P., A.K. (Adam Koniuszy), P.R., W.G., A.K. (Andrzej Kwasnica) and D.M.; validation, M.H.-P., A.K. (Adam Koniuszy) and P.R.; formal analysis, P.R., A.K. (Adam Koniuszy), W.G., A.K. (Andrzej Kwasnica) and D.M.; writing—original draft preparation, P.R., M.H.-P. and A.K. (Adam Koniuszy); writing—review and editing, P.R., M.H.-P. and A.K. (Adam Koniuszy); visualization, P.R., M.H.-P. and A.K. (Adam Koniuszy); supervision, P.R., M.H.-P. and A.K. (Adam Koniuszy). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Mandley, S.; Daioglou, V.; Junginger, H.; van Vuuren, D.; Wicke, B. EU bioenergy development to 2050. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *127*, 109858. [\[CrossRef\]](#)
- Bhatia, S.K.; Bhatia, R.K.; Jeon, J.M.; Pugazhendhi, A.; Awasthi, M.K.; Kumar, D.; Kumar, G.; Yoon, J.J.; Yang, Y.H. An overview on advancements in biobased transesterification methods for biodiesel production: Oil resources, extraction, biocatalysts, and process intensification technologies. *Fuel* **2021**, *285*, 119117. [\[CrossRef\]](#)
- García Martín, J.F. *Recent Developments in Jatropha Research*; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, USA, 2021.
- Singh, D.; Sharma, D.; Soni, S.L.; Inda, C.S.; Sharma, S.; Sharma, P.K.; Jhalani, A. A comprehensive review of physicochemical properties, production process, performance and emissions characteristics of 2nd generation biodiesel feedstock: Jatropha curcas. *Fuel* **2021**, *285*, 119110. [\[CrossRef\]](#)
- Giakoumis, E.G.; Rakopoulos, C.D.; Dimaratos, A.M.; Rakopoulos, D.C. Exhaust emissions of diesel engines operating under transient conditions with biodiesel fuel blends. *Prog. Energy Combust. Sci.* **2012**, *38*, 691–715. [\[CrossRef\]](#)
- Moser, B.R. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **2009**, *45*, 229–266. [\[CrossRef\]](#)
- Sharma, Y.; Singh, B.; Upadhyay, S. Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* **2008**, *87*, 2355–2373. [\[CrossRef\]](#)
- Daroch, M.; Geng, S.; Wang, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy* **2013**, *102*, 1371–1381. [\[CrossRef\]](#)
- He, P.J.; Mao, B.; Shen, C.M.; Shao, L.M.; Lee, D.J.; Chang, J.S. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *129*, 177–181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pancha, I.; Chokshi, K.; Maurya, R.; Trivedi, K. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresour. Technol.* **2015**, *189*, 341–348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Damiani, M.C.; Popovich, C.A.; Constenla, D.; Leonardi, P.I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* **2010**, *99*, 3389–3396. [\[CrossRef\]](#)
- Huerlimann, R.; de Nys, R.; Heimann, K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107*, 245–257. [\[CrossRef\]](#)
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 294–306. [\[CrossRef\]](#)
- Su, Y.; Song, K.; Zhang, P.; Su, Y.; Cheng, J.; Chen, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *74*, 402–411. [\[CrossRef\]](#)
- Halim, R.; Danquah, M.K.; Webley, P.A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 709–732. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, M.; Tang, H.; Ma, H.; Holland, T.C.; Ng, K.Y.S.; Salley, S.O. Effects of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 1649–1655. [\[CrossRef\]](#)
- Hawrot-Paw, M.; Ratomski, P.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. *Energies* **2021**, *14*, 7334. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, M.; Fan, Y.; Wu, P.C.; Chu, Y.D.; Shen, P.L.; Xue, S.; Chi, Z.Y. An Extended Approach to Quantify Triacylglycerol in Microalgae by Characteristic Fatty Acids. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1949. [\[CrossRef\]](#)
- Maltsev, Y.; Maltseva, K. Fatty acids of microalgae: Diversity and applications. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2021**, *20*, 515–547. [\[CrossRef\]](#)
- Ramos, M.J.; Fernández, C.M.; Casas, A.; Rodríguez, L.; Pérez, Á. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 261–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhu, L.D.; Li, Z.H.; Hiltunen, E. Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 8792548. [\[CrossRef\]](#)

22. Yusof, Y.A.M.; Basari, J.M.H.; Mukti, N.A.; Sabuddin, R.; Muda, A.R.; Sulaiman, S.; Makpol, S.; Ngah, W.Z.W. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *Afr. J. Biotechnol.* **2011**, *10*, 13536–13542.
23. Jungmin, K.G.Y.; LEE, H.; Lim, J.; Kim, K.; Woong, K.C.; Park, M.S.; Yang, J.W. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 862–876.
24. Atadashi, I.M.; Aroua, M.K.; Aziz, A.A. High quality biodiesel and its diesel engine application: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 1999–2008. [\[CrossRef\]](#)
25. Brennan, L.; Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 557–577. [\[CrossRef\]](#)
26. Mandal, S.; Mallick, N. Biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus* in a recirculatory aquaculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5929–5934. [\[CrossRef\]](#)
27. Subramaniam, M.; Solomon, J.M.; Nadanakumar, V.; Anaimuthu, S.; Sathyamurthy, R. Experimental investigation on performance, combustion and emission characteristics of DI diesel engine using algae as a biodiesel. *Energy Rep.* **2020**, *6*, 1382–1392. [\[CrossRef\]](#)
28. Rehman, M.; Kesharvani, S.; Dwivedi, G. Numerical Investigation of Performance, Combustion, and Emission Characteristics of Various Microalgae Biodiesel on CI Engine. *Fuels* **2023**, *4*, 132–155. [\[CrossRef\]](#)
29. Joshi, M.P.; Thipse, S.S. Combustion analysis of ci engine fuelled with algae biofuel blends. *Therm. Eng.* **2019**, *5*, 214–220. [\[CrossRef\]](#)
30. Al-Iwayzy, S.H.; Yusaf, T. *Chlorella protothecoides* Microalgae as an Alternative Fuel for Tractor Diesel Engines. *Energies* **2013**, *6*, 766–783. [\[CrossRef\]](#)
31. Jones, M.W.; Peters, G.P.; Gasser, T.; Andrew, R.M.; Schwingshackl, C.; Gütschow, J.; Houghton, R.A.; Friedlingstein, P.; Pongratz, J.; Le Quéré, C. National contributions to climate change due to historical emissions of carbon dioxide, methane, and nitrous oxide since 1850. *Sci. Data* **2023**, *10*, 155. [\[CrossRef\]](#)
32. Ighalo, J.O.; Dulta, K.; Kurniawan, S.B.; Omoarukhe, F.O.; Ewuzie, U.; Eshiemogie, S.O.; Ojo, A.U.; Abdullah, S.R.S. Progress in Microalgae Application for CO₂ Sequestration. *Clean. Chem. Eng.* **2022**, *3*, 100044. [\[CrossRef\]](#)
33. Cheah, W.Y.; Show, P.L.; Chang, J.S.; Ling, T.C.; Juan, J.C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresour. Technol.* **2015**, *184*, 190–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Singh, U.B.; Ahluwalia, A.S. Microalgae: A promising tool for carbon sequestration. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* **2013**, *18*, 73–95. [\[CrossRef\]](#)
35. Iglina, T.; Iglina, P.; Pashchenko, D. Industrial CO₂ Capture by Algae: A Review and Recent Advances. *Sustainability* **2022**, *14*, 3801. [\[CrossRef\]](#)
36. Sarwer, A.; Hamed, S.M.; Osman, A.I.; Jamil, F.; Al-Muhtaseb, A.H.; Alhajeri, N.S.; Rooney, D.W. Algal biomass valorization for biofuel production and carbon sequestration: A review. *Environ. Chem. Lett.* **2022**, *20*, 2797–2851. [\[CrossRef\]](#)
37. Jehlee, A.; Rodjaroen, S.; Waewsak, J.; Reungsang, A.; O-Thong, S. Improvement of biohythane production from *Chlorella* sp. TISTR 8411 biomass by co-digestion with organic wastes in a two-stage fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy* **2019**, *44*, 17238–17247. [\[CrossRef\]](#)
38. Oumer, A.; Hasan, M.; Baheta, A.T.; Mamat, R.; Abdullah, A. Bio-based liquid fuels as a source of renewable energy: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2018**, *88*, 82–98. [\[CrossRef\]](#)
39. Karishma, S.; Saravanan, A.; Kumar, P.S.; Rangasamy, G. Sustainable production of biohydrogen from algae biomass: Critical review on pretreatment methods, mechanism and challenges. *Bioresour. Technol.* **2022**, *366*, 128187. [\[CrossRef\]](#)
40. Bleta, R.; Schiavo, B.; Corsaro, N.; Costa, P.; Giaconia, A.; Interrante, L.; Monflier, E.; Pipitone, G.; Ponchel, A.; Sau, S.; et al. Robust Mesoporous CoMo/γ-Al₂O₃ Catalysts from Cyclodextrin-Based Supramolecular Assemblies for Hydrothermal Processing of Microalgae: Effect of the Preparation Method. *Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 12562–12579. [\[CrossRef\]](#)
41. Arora, P.; Chance, R.R.; Hendrix, H.; Realf, M.J.; Thomas, V.M.; Yuan, Y. Greenhouse Gas Impact of Algal Bio-Crude Production for a Range of CO₂ Supply Scenarios. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 11931. [\[CrossRef\]](#)
42. Mathimani, T.; Senthil, K.T.; Chandrasekar, M.; Uma, L.; Prabakaran, D. Assessment of fuel properties, engine performance and emission characteristics of outdoor grown marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 biodiesel. *Renew. Energy* **2017**, *105*, 637–646. [\[CrossRef\]](#)
43. Hariprakash, S.R.; Prakash, T. A Review on Microalgae Biofuel Production and use in CI Engine Applications. *Nat. Environ. Pollut. Technol.* **2021**, *21*, 1531–1541. [\[CrossRef\]](#)
44. Piloto-Rodríguez, R.; Sánchez-Borroto, Y.; Melo-Espinosa, E.A.; Verhelst, S. Assessment of diesel engine performance when fueled with biodiesel from algae and microalgae: An overview. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *69*, 833–842. [\[CrossRef\]](#)
45. PN-ISO 15550; Reciprocating Internal Combustion Engines – Determination and Method of Measuring Engine Power – General Requirements. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 2009. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-iso-15550-2009p.html> (accessed on 9 March 2023).
46. PN-ISO 3046-1; Reciprocating Internal Combustion Engines – Performance – Part 1: Declaration of Power, Fuel and Lubricating Oil Consumption and Test Methods – Additional Requirements for General Purpose Engines. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 2009. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-iso-3046-1-2009p.html> (accessed on 9 March 2023).

47. PN-ISO 3046-3; Reciprocating Internal Combustion Engines—Performance—Part 3: Test Measurements. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 2009. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-iso-3046-3-2009p.html> (accessed on 9 March 2023).
48. PN-ISO 3046-5; Reciprocating Internal Combustion Engines—Performance—Part 5: Torsional Vibrations. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 2009. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-iso-3046-5-2009p.html> (accessed on 9 March 2023).
49. PN-ISO 8178-1; Reciprocating Internal Combustion Engines—Exhaust Emission Measurement—Measurement of Gaseous Components and Particulate Emissions on a Test Stand. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 1999. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-8178-1-1999p.html> (accessed on 9 March 2023).
50. PN-ISO 8178-6 2000; Reciprocating Internal Combustion Engines—Exhaust Emission Measurement—Part 6: Report of Measuring Results and Test. Polish Committee for Standardisation: Warsaw, Poland, 2000. Available online: <https://sklep.pkn.pl/pn-en-iso-8178-6-2000p.html> (accessed on 9 March 2023).
51. Zhang, Z.; Li, J.; Tian, J.; Dong, R.; Zou, Z.; Gao, S.; Tan, D. Performance, combustion and emission characteristics investigations on a diesel engine fueled with diesel/ethanol/n-butanol blends. *Energy* **2022**, *249*, 123733. [\[CrossRef\]](#)
52. Serrano, L.; Carvalho, P.; Bastos, D.; Pires, N. *Effects on Performance, Efficiency, Emissions, Cylinder Pressure, and Injection of a Common-Rail Diesel Engine When Using a Blend of 15% Biodiesel (B15) or 15% Hydrotreated Vegetable Oil (HVO15)* (No. 2023-01-0266); SAE Technical Paper; SAE International: Warrendale, PA, USA, 2023.
53. Adaileh, W.M.; AlQdah, K.S. Performance of Diesel Engine Fuelled by a Biodiesel Extracted from A Waste Coking Oil. *Energy Procedia* **2012**, *18*, 1317–1334. [\[CrossRef\]](#)
54. Tüccar, G.; Aydın, K. Evaluation of methyl ester of microalgae oil as fuel in a diesel engine. *Fuel* **2013**, *112*, 203–207. [\[CrossRef\]](#)
55. dos Reis, E.F.; Cunha, J.P.B.; Mateus, D.L.S.; Delmond, J.G.; Couto, R.F. Performance and emissions of a diesel engine-generator cycle under different concentrations of soybean biodiesel. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* **2013**, *17*, 565–571.
56. Siqueira, W.C.; Fernandes, H.C.; Teixeira, M.M.; Santos, N.T.S.; Abrahão, S.A. Desempenho na barra de tração de um trator agrícola de pneus, alimentado com misturas de óleo diesel e óleo de soja reutilizado. *Rev. Ceres* **2013**, *60*, 793–801. [\[CrossRef\]](#)
57. Paula, V.R.D.; Barbosa, J.A.; Romanelli, T.L.; Volpato, C.E.S.; Salvador, N. Curvas de desempenho motor de um trator agrícola utilizando diferentes proporções de biodiesel de soja. *Rev. Agrogeambiental* **2016**, *8*, 119–127. [\[CrossRef\]](#)
58. Tarabet, L.; Loubar, K.; Lounici, M.S.; Hanchi, S.; Tazerout, M. Eucalyptus biodiesel as an alternative to diesel fuel: Preparation and tests on DI diesel engine. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *10*, 1155. [\[CrossRef\]](#)
59. Khiari, K.; Awad, S.; Loubar, K.; Tarabet, L.; Mahmoud, R.; Tazerout, M. Experimental investigation of pistacia lentiscus biodiesel as a fuel for direct injection diesel engine. *Energy Convers. Manag.* **2016**, *108*, 392–399. [\[CrossRef\]](#)
60. Murad, M.E.; Al-Dawody, M.F. Effect of microalgae biodiesel blending on diesel engine characteristics. *Heat Transf.* **2022**, *51*, 6616–6640. [\[CrossRef\]](#)
61. Lebedevas, S.; Raslavicius, L. Prognostic Assessment of the Performance Parameters for the Industrial Diesel Engines Operated with Microalgae Oil. *Sustainability* **2021**, *13*, 6482. [\[CrossRef\]](#)
62. Ahmed, A.; Campion, B.B.; Gasparatos, A. Biofuel development in Ghana: Policies of expansion and drivers of failure in the jatropha sector. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *70*, 133–149. [\[CrossRef\]](#)
63. Vadivelu, T.; Ramanujam, L.; Ravi, R.; Vijayalakshmi, S.K.; Ezhilchandran, M. An Exploratory Study of Direct Injection (DI) Diesel Engine Performance Using CNSL—Ethanol Biodiesel Blends with Hydrogen. *Energies* **2023**, *16*, 415. [\[CrossRef\]](#)
64. Kaya, T.; Taskiran, O. Evaluation of the Effects of Biodiesel on Emissions and Performance by Comparing the Result of the New European Drive Cycle and Worldwide Harmonized Light Vehicles Test Cycle. *Energies* **2018**, *11*, 2814. [\[CrossRef\]](#)
65. El-Baz, F.K.; Gadab, M.; Abdou, S.M.; Abedd, K.; Mattere, I.A. Performance and exhaust emissions of a diesel engine burning algal biodiesel blends. *Int. J. Mech. Mechatron. Eng.* **2016**, *16*, 151–158.
66. Rajaeifar, M.A.; Tabatabaei, M.; Aghbashlo, M.; Hemayati, S.S.; Heijungs, R. Biodiesel Production and Consumption: Life Cycle Assessment (LCA) Approach. *Biofuel Biorefin. Technol.* **2018**, *8*, 161–192.
67. Morales, M.; Collet, P.; Lardon, L.; Hélias, A.; Steyer, J.-P.; Bernard, O. Life-cycle assessment of microalgal-based biofuel. In *Biofuels from Algae*, 2nd ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 507–550.
68. Ferreira, A.F.; Baptista, P.; Silva, C. Analysis of Energy Consumption and CO₂ Emissions of the Life Cycle of Biohydrogen Applied to the Portuguese Road Transportation Sector. In Proceedings of the 18th World Hydrogen Energy Conference 2010-WHEC 2010, Essen, Germany, 16–21 May 2010; pp. 42–50.
69. Kwiatkowski, C.A.; Pawłowska, M.; Harasim, E.; Pawłowski, L. Strategies of Climate Change Mitigation in Agriculture Plant Production—A Critical Review. *Energies* **2023**, *16*, 4225. [\[CrossRef\]](#)
70. Bilanovic, D.; Andargatchew, A.; Kroeger, T.; Shelef, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations—Response surface methodology analysis. *Energy Convers. Manag.* **2009**, *50*, 262–267. [\[CrossRef\]](#)
71. Debowski, M.; Michalski, R.; Zieliński, M.; Kazimierowicz, J. A Comparative Analysis of Emissions from a Compression-Ignition Engine Powered by Diesel, Rapeseed Biodiesel, and Biodiesel from *Chlorella protothecoides* Biomass Cultured under Different Conditions. *Atmosphere* **2021**, *12*, 1099. [\[CrossRef\]](#)
72. Serrano, L.M.V. Análise Comparativa do Desempenho de Motores de Combustão Interna Quando Utilizam Biocombustíveis. Ph.D. Thesis, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2012.

73. Armas, O.; García-Contreras, R.; Ramos, Á. Impact of alternative fuels on performance and pollutant emissions of a light duty engine tested under the new European driving cycle. *Appl. Energy* **2013**, *107*, 183–190. [[CrossRef](#)]
74. Chen, H.; Xie, B.; Ma, J.; Chen, Y. NOx emission of biodiesel compared to diesel: Higher or lower? *Appl. Therm. Eng.* **2018**, *137*, 584–593. [[CrossRef](#)]
75. Sharif, S.K.; Rao, B.N.; Jagadish, D. Comparative performance and emission studies of the CI engine with *Nodularia Spumigena* microalgae biodiesel versus different vegetable oil derived biodiesel. *Appl. Sci.* **2020**, *2*, 858. [[CrossRef](#)]
76. Wahlen, B.D.; Morgan, M.R.; McCurdy, A.T.; Willis, R.M.; Morgan, M.D.; Dye, D.J.; Bugbee, B.; Wood, B.D.; Seefeldt, L.C. Biodiesel from microalgae, yeast, and bacteria: Engine performance and exhaust emissions. *Energy Fuels* **2013**, *27*, 220–228. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P1

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions. Appl. Sci. 2021, 11, 3106.

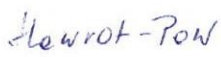
Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współtworzeniu koncepcji, założeniu doświadczenia i współuczestniczeniu w przeprowadzeniu analiz, opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 50%.

Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 50%.

Podpis: 

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P2

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Influence of Nutrient-Stress Conditions on *Chlorella vulgaris* Biomass Production and Lipid Content. Catalysts 2021, 11, 573.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współtworzeniu koncepcji, założeniu doświadczenia i współuczestniczeniu w przeprowadzeniu analiz, opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 50%.

Podpis:

Ratomski

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 50%.

Podpis:

Hawrot-Paw

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P3

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A. Utilisation of CO₂ from Sodium Bicarbonate to Produce *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors for Biofuel Purposes. Sustainability 2021, 13, 9118.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współuczestnictwie w opracowywaniu metodyki badań, założeniu doświadczenia i współuczestniczeniu w przeprowadzeniu analiz, opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 45%.

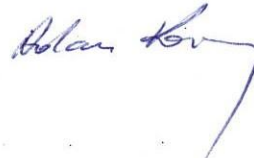
Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 45%.

Podpis: 

Koniuszy Adam – 10%.

Podpis: 

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P4

Hawrot-Paw, M.; **Ratomski, P.** Efficient Production of Microalgal Biomass—Step by Step to Industrial Scale. *Energies* 2024, 17, 944.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz, współuczestnictwie w analizie i opracowywaniu wyników, współuczestnictwie w przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 40%.

Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 60%.

Podpis: 

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P5

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Ocena efektywności metod odwadniania biomasy mikroglonów. W: Doskonalenie technologii produkcji rolnej, w tym energii odnawialnej, z uwzględnieniem wymagań zrównoważonego rozwoju. Wydawnictwo ITP, Warszawa – Falenty, 2021.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współuczestniczeniu w wyborze metodyki badań, założeniu doświadczenia i przeprowadzeniu analiz, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowywaniu wyników, współuczestnictwie w przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 70%.

Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 30%.

Podpis: 

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P6

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M. Porównanie efektywności metod ekstrakcji lipidów z biomasy mikroglonów *Chlorella vulgaris*. W: Innowacyjne Technologie Pozyskania Energii Odnawialnej. Wydawnictwo ITP, Tom XXVI, Falenty – Warszawa, 2020.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współuczestniczeniu w założeniu doświadczenia, przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 55%.

Podpis:

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 45%.

Podpis:

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P7

Hawrot-Paw, M.; **Ratowski, P.**; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Teleszko, M.; Grygier, A. Fatty Acid Profile of Microalgal Oils as a Criterion for Selection of the Best Feedstock for Biodiesel Production. Energies 2021, 14, 7334.

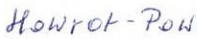
Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współuczestnictwie w doborze metodyki badań, przeprowadzeniu badań, opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 25%.

Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 35%.

Podpis: 

Koniuszy Adam – 25%.

Podpis: 

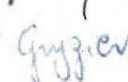
Golimowski Wojciech – 5%.

Podpis: 

Teleszko Mirosława – 5%.

Podpis: 

Grygier Anna – 5%.

Podpis: 

OŚWIADCZENIE
autora o wkładzie w publikację

Publikacja P8

Ratomski, P.; Hawrot-Paw, M.; Koniuszy, A.; Golimowski, W.; Kwaśnica, A.;
Marcinkowski, D. Indicators of Engine Performance Powered by a Biofuel Blend Pro-
duced from Microalgal Biomass: A Step towards the Decarbonization of Transport.
Energies **2023**, *16*, 5376.

Oświadczam, że mój wkład w pracy polegał na współuczestnictwie w doborze meto-
dyki badań, założeniu doświadczenia i współuczestnictwie w przeprowadzeniu analiz,
opracowywaniu wyników, przygotowaniu publikacji.

Wkład mojej pracy w publikację oceniam na 25%.

Podpis: 

Wkład pozostałych współautorów:

Hawrot-Paw Małgorzata – 25%.

Podpis: 

Koniuszy Adam – 25%.

Podpis: 

Golimowski Wojciech – 10%.

Podpis: 

Kwaśnica Andrzej – 10%.

Podpis: 

Marcinkowski Damian – 5%.

Podpis: 