

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra Ekologie a životního prostředí



**Produkcia lipidov zelenými riasami rodu *Scenedesmus***

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Bc. Henrich Dian**

Študijný program: Biológia

Študijný odbor: Hydrobiológia

Forma štúdia: Prezenčné štúdium

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu spracoval sám s pomocou môjho vedúceho pána doc. RNDr. Petra Hašlera, PhD. a citovanej literatúry.

V Olomouci dňa .....

.....

## **POĎAKOVANIE**

Rad by som poďakoval pánu doc. RNDr. Petrovi Hašlerovi, PhD. za vedenie mojej diplomovej práce, pomoc v laboratóriu, poskytnutie odbornej literatúry cenné rady a hlavne za uvedenie do tejto problematiky aplikovanej algológie. Vďaka doc. RNDr. Petrovi Hašlerovi, PhD., ktorý mi ukázala možnosť využitia rias ako palivo, som sa rozhodol venovať kultivácií rias aj po skončení štúdia.

Ďalej by som chcel poďakovať pracovníkom Univerzity v Gdansku A konkrétne pánu Filipovi Pniewskemu PhD. a Mgr. Marekovi Klinovi za možnosť pokračovať v experimentoch v laboratóriách Kolekcií Kultúr Baltických rias na Oceánografickom Inštitúte v Gdynii, ako aj za odbornú pomoc a konzultácie pri vykonávaní experimentov. Špeciálne chcem poďakovať Mgr. Marekovi Klinovi za pomoc pri konštrukcii bioreaktora a tvorbe biodiesla z biomasy rias.

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA**

**Meno a Priezvisko autora:** Henrich Dian

**Názov práce:** Produkcia lipidov zelenými riasami rodu *Scenedesmus*

**Typ práce:** Diplomová

**Pracovisko:** Katedra botaniky PŘF UP, Kolekcia Kultúr Baltických rias Inštitút Oceánografe v Gdyni

**Vedúci práce:** doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

**Rok obhajoby:** 2023

## **ABSTRAKT**

Vysoká produkcia emisií, ako aj mýňanie zásob fosílnych palív, nás núti hľadať nový zdroj obnoviteľnej energie, ktorá má minimálny negatívny vplyv na životné prostredie. Ako potenciálna náhrada fosílnych palív by mohli byť biopalivá tretej generácie, ktoré ako zdroj energie využívajú lipidy z mikro alebo makrorias. Veľmi významným zdrojom lipidov na výrobu biopalív, konkrétne biodiesla je zelená riasa rodu *Scenedesmus*. Cieľom mojej práce bolo testovať viaceré kmene zelenej riasy rodu *Scenedesmus* a vybrať najefektívnejšie kmene. Najefektívnejšie kmene som podrobil ďalším testom z cieľom zvýšiť produkciu lipidov pomocou stresového faktoru salinity. Ďalším cieľom mojej práce bolo získanie praktických znalosti v oblasti kultivácie rias v laboratórnych fotobioreaktoroch, ako aj ich samotnej konštrukcií. Biomasu z rias vypestovanú vo fotobioreaktoroch som následne použil na výrobu svojou vlastného biodiesla.

**Kľúčové slová:** *Scenedesmus*, biopalivo, biodiesel, lipidy, transesterifikacia, fotobioreaktor

**Počet strán:** 100

**Počet príloh:** 7

**Jazyk:** slovenčina

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

**First name and surname:** Henrich Dian

**Title:** Lipid production by green algae genus *Scenedesmus*

**Type of thesis:** Master

**Workplace:** Department of botany of Faculty of Science in Olomouc, Culture Collection of Baltic Algae in Institute of Oceanography in Gdynia

**Supervisor:** doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

**Year of defence:** 2023

## **ABSTRACT**

High production of emission, as well as the depletion of fossil fuel reserves force us to find new source of alternative energy with minimal negative impact on environment. Third generation of biofuels which are made from algal lipids seems to be one of the best choices of alternative energy sources. Potential producer of algal lipids for biodiesel production is green algae *Scenedesmus*. In my master thesis I will tested several strains of green algae *Scenedesmus* and then I will choose the best potential producers from my strains. After choosing of most effective strain, I will try to enhance lipid production by stress condition of salinity. Another goal of my thesis is getting of practical knowledge in field of construction small laboratory scale photobioreactor. The final part of my thesis is making a biodiesel from biomass cultivated in photobioreactors.

**Keywords:** *Scenedesmus*, biofuels, biodiesel, lipids, transesterification, photobioreactor

**Number of pages:** 100

**Number of appendices:** 7

**Language:** Slovak

# OBSAH

<b>CIELE PRÁCE</b>	9
<b>UVOD</b>	10
1.1. Čo je to biopalivo	10
1.2. Typy biopalív	10
1.2.1. Bioetanol	10
1.2.2. Biodiesel	11
1.3. Generácie biopalív	12
1.3.1. Biopalivá prvej generácie	12
1.3.2. Biopalivá druhej generácie	13
1.3.3. Biopalivá tretej generácie	14
1.4. Zloženie lipidov v biomase rias	16
1.5. Kultivácia rias	16
1.5.1. Otvorené nádrže alebo race-way pondy	17
1.5.2. Uzavreté systémy alebo fotobioreaktory	19
1.5.3. Typy kultivačných režimov	20
1.6. Zelená riasa <i>Scenedesmus</i> ako zdroj lipidov	21
1.7. Ovplyvňovanie produkcie lipidov	22
1.7.1. Koncentrácia a formy dusíku	22
1.7.1.1. Dusíkový deficit	22
1.7.1.2. Limitácia dusíkom	23
1.7.1.3. Formy dusíku	24
1.7.2. Salinita	25
1.7.3. Odpadová voda	26
1.7.4. Mixotrofná kultivácia	27
1.7.4.1. Glycerol	28
1.7.4.2. Xylóza	28
1.8. Zber biomasy	29
1.8.1. Centrifugácia	29
1.8.2. Sedimentácia	30
1.8.3. Flotácia	31
1.8.4. Flokulácia a koagulácia	31
1.8.5. Filtrácia	32
1.9. Extrakcia lipidov	32
1.9.1. Mechanické rozrušovanie bunkovej steny	33
1.9.2. Chemické rozrušovanie bunkovej steny	33

1.9.3. Vysušenie biomasy	34
1.9.4. Extrakcia lipidov	34
1.9.4.1. Extrakcia pomocou organického rozpúšťadla	35
1.9.4.2. Soxhlet extraktor	36
1.9.4.3. Supercritical fluid extration (SPE)	36
1.9.4.4. Liquid CO <sub>2</sub> (lCO <sub>2</sub> )	37
1.9.4.5. Subcritical organic solvent extraction	37
1.9.5. Odstraňovanie kontaminantov a purifikácia lipidov	38
1.10. Transesterifikácia	38
1.10.1. Katalýza kyselinou	39
1.10.2. Katalýza zásadou	39
<b>METODIKA PRÁCE</b>	42
2.1. Zásobné kultúry	42
2.2. Nastavenia experimentov	42
2.2.1. Testovanie všetkých vyizolovaných kmeňov	42
2.2.2. Kultivácia rias vo vode z ČOV	42
2.2.3. Experimenty s cieľom zvýšiť produktivitu lipidov	43
2.2.4. Kultivácia rias v semikontinuálna režime vo fotobioreaktoroch	43
2.3. Analýzy	44
2.3.1. Analýza lipidov	44
2.3.2. Kalibračná krivka	44
2.3.3. Produktivita biomasy	45
2.3.4. Denzita buniek	46
2.3.5. Fluorescencia Fv/Fm	46
2.3.6. Biologická desalinizácia	46
2.4. Vyhodnocovanie dát	47
2.5. Tvorba biodiesla	47
2.5.1. Sušenie biomasy a rozrúšanie bunkových stien	47
2.5.2. Extrakcia lipidov	47
2.5.3. Transesterifikácia	47
<b>VÝSLEDKY</b>	48
3.1. Testovanie všetkých vyizolovaných kmeňov	48
3.2. Kultivácia rias vo vode z ČOV	55
3.3. Efekt zvýšenej koncentrácie NaCl na produktivitu lipidov	59
3.3.1. Jednostupňový režim (JS)	59

3.3.2. Dvojstupňový režim (DS)	64
3.3.3. Porovnanie jednostupňového a dvojestupňového režimu	64
3.3.4. Fluorescencia chlorofylu	66
3.3.5. Biologická desalinizácia	68
3.4. Kultivácie rias v semikontinuálnom režime vo fotobioreaktoroch	69
3.5. Extrakcia lipidov a produkcia biodiesla	75
<b>DISKUSIA</b>	80
4.1. Koncentrácia NaCl	80
4.2. Denná produktivita lipidov	82
4.3. Obsah lipidov	83
4.4. Najefektívnejšie kmene ako zdroj lipidov	84
4.5. Kultivácia vo fotobioreaktore	84
4.6. Zber biomasy	85
<b>ZÁVER</b>	87
<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY</b>	88
<b>PRÍLOHY</b>	98



## CIELE PRÁCE

V diplomovej práci sa budem venovať produkcii lipidov zelenými riasami a ich následným použitím na výrobu biopalív. Ďalej sa budem venovať experimentálnemu zvyšovaniu produkcie lipidov kmeňov zelenej riasy *Scenedesmus* z mojej kolekcie vyizolované v rámci bakalárskej práce. V práci som si vytvoril nasledujúce ciele:

1. Analýza produkcie lipidov v rámci celej kolekcie kmeňov riasy *Scenedesmus*.
2. Kultivácia vybraných kmeňov vo výstupnej vode z ČOV a schopnosť odstraňovania N a P.
3. Experimentálne zvyšovanie produkcie lipidov vybraného kmeňa pomocou stresového faktoru salinity
4. Konštrukcia fotobioreaktora a vyprodukovanie dostatočnej biomasy rias na výrobu vlastného biodiesla.

# ÚVOD

Ľudstvo v 21. storočí stojí pred dôležitou úlohou, a to nájsť spoľahlivú náhradu za fosílna palivá. Zvyšujúca sa globalizácia spôsobuje nárast industrializácie a motorizmu, čo má za následok zvyšovanie dennej spotreby fosílnych palív. Priemerná denná spotreba ropy na celom svete v roku 2020 je približne 98 tisíc barelov ropy. Zásoba ropy na konci roka 2019 bola približne 1800 miliónov barelov, čo by mohli pravdepodobne vystačiť do roku 2067 (Statistical Review of World Energy 2020). Najvhodnejší alternatívny zdroj energie predstavujú biopalivá, ktoré sú vyrábané z obnoviteľnej biomasy (Nigam & Singh 2011), ale nie však všetky typy biopalív sú perspektívne do budúcnosti.

## 1.1. Čo je to biopalivo

Biopalivá na rozdiel od fosílnych palív sa produkujú z biomasy, ktorá vznikla pomocou biologického procesu za veľmi krátku dobu v podobe niekoľkých mesiacov alebo rokov. Na výrobu fosílnych palív sa využíva biomasa, ktorá vzniká veľmi pomalým geologickým procesom formácie (Datta, Hossain & Roy 2019). Veľkou výhodou biopalív proti bežným fosílnym palivám je ten, že biopalivá sú obnoviteľné a ich produkcia je prakticky neobmedzená. Ďalšou veľkou výhodou biopalív je nízky negatívny dopad na životné prostredie ([Biofuel Definition \(investopedia.com\)](https://www.investopedia.com/terms/b/biofuel-definition/)). Nie však všetky biopalivá majú rovnaký pozitívny dopad na životné prostredie a rovnaký potenciál. Existuje množstvo typov biopalív, najjednoduchšie rozdelenie biopalív je na primárne a sekundárne (pozri obr. 1).

Ako primárny typ biopalív využívame biomasu, ktorú môžeme využívať ihneď po zbere v jej prirodzenej forme bez zložitej úpravy ako sú palivové drevo, pelety alebo triesky (FAO 2008, Nigam & Singh 2011)..

Pri sekundárnom type biopalív je už potrebné biomasu upraviť a extrahovať z nej energetické látky, ktoré sú ďalej využívané ako biopalivo. Medzi sekundárne typy biopalív patrí napríklad bioetanol, biodiesel alebo bioplyn (FAO 2008, Nigam & Singh 2011). Sekundárne typy biopalív sa následne ďalej rozdeľujú podľa typu použitej biomasy do doposiaľ troch známych generácií (pozri obr. 1).

## **1.2. Typy biopalív**

### **1.2.1. Bioetanol**

Bioetanol sa z biomasy tvorí pomocou fermentácie šesť-uhľikátých sacharidov, ako je najčastejšie glukóza. Najčastejšími zdrojmi biomasy sú cukrová repa, kukurica alebo iné konzumné obilniny. Biomasa však väčšinou neobsahuje len glukózu, ale veľké množstvo zložitých látok. Tieto látky je potrebné biologickou alebo chemickou cestou rozložiť na glukózu, ktorá podlieha fermentácií a pretvára sa na bioetanol. Bioetanol je možné primiešať do benzína a používať ako palivo do zážihových motorov. Oproti benzínu a má bioetanol asi len 66% z celkovej energie, ale na druhej strane dokáže znížiť množstvo emisií oxidu uhoľnatého a síry. Jedna z menších nevýhod používania bioetanolu je jeho reakcia s dusíkom v atmosfére, čo má za následok vznik oxidov dusíka (FAO 2008, The Royal Society 2008).

### **1.2.2. Biodiesel**

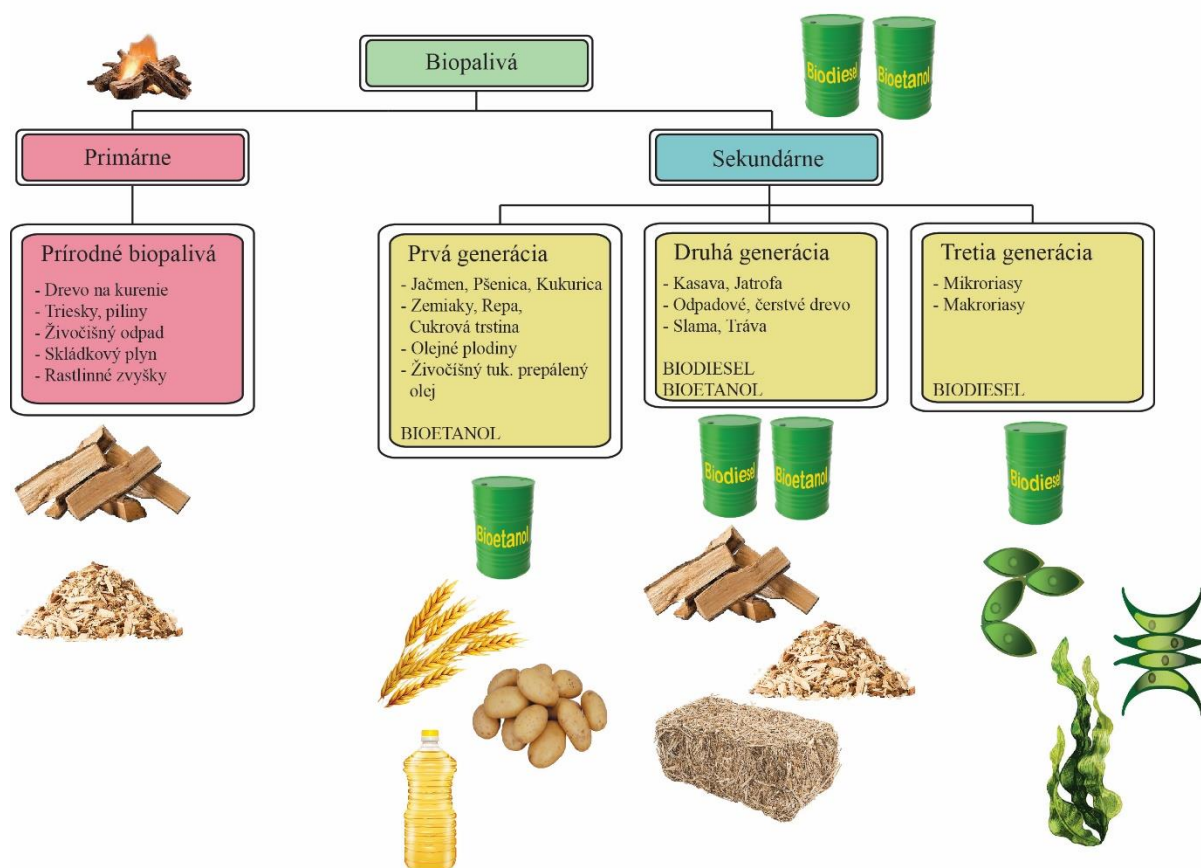
Biodiesel je na rozdiel od bioetanolu produkovaný z biomasy, ktorá je bohatá na oleje. Sú to hlavne olejnaté plodiny, ako repka olejná, sója, palmové a kokosové plody, ale medzi olejnú biomasu taktiež patrí aj živočíšny tuk. Výsledná kvalita a využitie biodiesla závisí na kvalite a type použitej biomasy. Olejnaté plodiny aj živočíšny tuk majú rôzne zloženie mastných kyselín a od toho závisí aj výsledná viskozita. (FAO 2008, The Royal Society 2008).

Biodiesel sa z biomasy vytvára pomocou chemického procesu transesterifikácie. Transesterifikácia sa od bežnej esterifikácie podstatne líši. Pri esterifikácií reaguje mastná kyselina s alkoholom za vzniku vody a esteru. Pri transesterifikácií do reakcie ester vstupuje už ako reaktant a nie len ako produkt. Pri transesterifikácií reaguje ester mastnej kyseliny s alkoholom za vzniku iného esteru (Otera 1993.). (Podrobnejší popis v kapitole 1.9)

Biodiesel sa môže využívať rovnako ako bežný diesel do vznetrových motorov. Môže sa používať čistý alebo zmiešaný s bežným dieselom. Podobne ako bioetanol, má biodiesel výrazne nižšiu produkciu sírnych emisií (FAO 2008).

Kvalita biodiesla závisí na kvalite a type biomasy, z ktorej je vyrobený. Množstvo už užívaných biodieselov, ako napríklad biodiesel vytvorený z repky olejnej, sa na začiatku zdal veľmi potenciálny a po dlhšom čase používania sa ukázal ako neefektívny pre dlhodobú investíciu. Hlavným dôvodom bolo znižovanie životnosti motorov. Ide hlavne o menšie typy motorov, ktoré sa nachádzajú v osobných automobiloch. Vo väčších motoroch, akú napríklad poľnohospodárske stroje, je používanie biodiesla z dlhodobého hľadiska dobrá investícia (Nigam & Singh 2011).

Kvalita biodiesla závisí na type mastných kyselín, ktorých sú zložené lipidy v danej biomase. Na výrobu kvalitného biodiesla je potrebné aby biomasa obsahovala väčšie množstvo nenasýtených mastných kyselín (Sajjadi et al. 2018) s dlhšími reťazcami, ako napríklad C:18 až C:22 (Knohte 2009, Halim, Danquah & Webley 2012). Nenasýtené mastné kyseliny s dlhšími reťazcami dokážu znížiť bod tuhnutia a zakalenia biodiesla (Sajjadi et al. 2018). Zakalenie biodiesla je samovoľné tvorenie tuhých kryštálikov pri určitej teplote. Nenasýtené mastné kyseliny obsahujú dvojité väzby, ktoré ohýbajú molekulárnu štruktúru lipidov a zabraňuje sa tak tvorbe agregátov alebo kryštálikov (Halim, Danquah & Webley 2012). Bod zakalenia alebo teplota, pri ktorej sa začnú tvoriť kryštáliky, sa u surového biodiesla pohybuje od 0 približne do 20 °C. (Mittelbach and Remschmidt 2005; Moser 2008). Používanie takéhoto typu biodiesla by bolo v našich stredoeurópskych podmienkach neprijateľné, pretože kryštáliky by po dlhšom užívaní upchávali filtre v motore.



Obr. 1: Delenie biopalív (Modifikované podľa Firoz et al. 2012).

Spôsob ako znížiť bod tuhnutia a zakalenia je proces odstránenia zvyškových nasýtených mastných kyselín zvaný „winterization“. Daný proces dokáže znížiť bod tuhnutia a zakalenia pri kvalitných biodiesloch až na -40°C (pri menej kvalitných na -7 °C). Na druhej strane nenasýtené mastné kyseliny majú nízku oxidatívnu stabilitu a môžu podliehať autooxidácii nenasýtených väzieb. To môže mať za následok tvorbu sedimentov v motore a jeho následného poškodenia (Sajjadi et al. 2018).

Metoda ako predísť autooxidácií biodiesla je prídanie antioxidantov. Rovnaký proces sa používa aj na ošetrovanie bežných jedlých olejov a dnešný výskum ukazuje, že rovnaký proces je možné použiť aj na biopalivá (Dunn 2008).

### **1.3. Generácie biopalív**

#### **1.3.1. Biopalivá prvej generácie**

Na výrobu biopalív sa využíva biomasa, ktorá je bežne využívaná na konzumáciu, tzv. „edible biomass“. Medzi tieto patrí hlavne cukrová trstina, cukrová repa, kukurica, pšenica alebo zemiaky (Nigam & Singh 2011, Lee & Lavoive 2013, Datta, Hossain & Roy 2019). Všetky tieto plodiny sú energeticky bohaté, cenovo výhodné a celkový proces zušľachtenia biomasy na finálne biopalivo je pomerne jednoduchý. Veľmi často používanými zdrojmi biomasy na výrobu bioetanolu sú hlavne kukurica a cukrová trstina. Cukrová trstina má oproti iným výhodu, že obsahuje jednoduché sacharidy, ako je príklad glukóza, ktoré môžu byť spracované pomocou fermentácie na etanol. Na druhej strane kukurica je energeticky viac bohatšia a je to dobrý zdroj uhlíkov a škrobu. Škrob je ale potrebné hydrolyzovať na jednoduché sacharidy, a až tie môžu podliehať fermentácii. Ako enzým, ktorý sa využíva na hydrolyzu škrobu je alfa-amylóza. Výhodou však je, že enzým alfa-amylóza je dobre dostupný a pomerne lacný. Výsledkom je, že produkcia bioetanolu z kukurice je ekonomicky rentabilná výhodná. Podobne je to s výrobou biodiesla. Biodiesel sa vyrába z biomasy bohatej na tuky a oleje a do výsledného stavu sa pretvára pomocou chemického procesu transesterifikácie. Do procesu transesterifikácie je však potrebné pridávať alkohol. Nečastejšie sa využíva metanol, pretože je veľmi lacný oproti iným alkoholom. (Lee & Lavoive 2013; Datta, Hossain & Roy 2019).

Veľkou nevýhodou biopalív prvej generácie, je ich negatívny vplyv na životné prostredie a na potravinársky priemysel. Plodiny, z ktorých sa biomasa vytvára, slúžia bežne ako potravina a pri ich masovej výrobe, by sa výrazne obmedzil zdroj potravín pre človeka. To by malo za následok konflikt potravinárskeho a energetického sektoru o pôdu alebo by sa začali zúrodňovať ďalšie plochy, čo by malo za následok odlesňovanie alebo vysušovanie mokradov a lužných oblastí. Ďalšou nevýhodou je veľká spotreba vody, pretože polia s plodinami je potrebné neustále zavlažovať, a tak isto aj používanie hnojív a postrekov (The Royal Society 2008). Ďalšou nevýhodou je používanie ťažkej mechanizácie na obrábanie a zber biomasy, čo má za následok vyššiu uhlíkovú stopu. Producenti danej energetickej biomasy využívajú fosílna palivá do poľnohospodárskych strojov, aby znížili produkčné náklady na jednotku biomasy.

### 1.3.2. Biopalivá druhej generácie

Biopalivá druhej generácie využívajú na rozdiel od prechádzajúcej generácie biomasu, ktorá sa nevyužíva ako potravina tzv. „non-edible biomass“, pretože často obsahuje veľké množstvo lignínu. Medzi biomasu druhej generácie alebo inak ligninocelulozovú biomasu patrí hlavne odpadová biomasa z lesníckeho alebo poľnohospodárskeho priemyslu, a to odpadové drevo, slama alebo tráva. (Datta, Hossain & Roy 2019). Táto biomasa obsahuje veľké množstvo celulózy, čo je hlavný komponent bunkovej steny a je energeticky veľmi bohatý. Celulóza je polysacharid tvorený rôzne dlhými reťazcami glukózy (100 až 1000 jednotiek) a je potrebné ju hydrolyzovať na jednotlivé jednotky glukózy. V tom nám však bráni spomínaný lignín. Z biomasy je preto nutné pred hydrolyzou celulózy, chemicky lignín odstrániť. Väčšinou sa na úpravu alebo aj na celkový proces výroby biopalív druhej generácie využívajú termochemické reakcie, ktoré sú viac nákladné na energiu aj financie než chemické reakcie využívané na zušľachtenie biomasy prvej generácie. (FAO 2008; The Royal Society 2008; Datta, Hossain & Roy 2019).

Na druhej strane cena biomasy je výrazne nižšia ako pri biopalivách prvej generácie. Biomasa je väčšinou klasifikovaná ako odpad alebo vedľajší produkt. Tým pádom sa znížia náklady na produkciu biomasy. Ďalšou výhodou je nízky vplyv na životné prostredie, pretože biomasu dostávame väčšinou ako vedľajší produkt, napríklad pri potravinárskom priemysle ako je slama alebo odpadové drevo (FAO 2008; The Royal Society 2008; Lee & Lavoive 2013; Datta, Hossain & Roy 2019). Na druhej strane, niektoré rýchlorastúce rastliny obsahujúce ligninocelulózu, ako je napríklad topoľ, sa môžu kultivovať primárne pre účel výroby biopalív. Pri tomto prípade je vplyv na prostredie podobný biopalivám prvej generácie a takisto aj záťaž na prostredie, hoci na hektár pôdy môžeme vyprodukovať viac použitej biomasy než pri biopalivách prvej generácií (FAO 2008). Väčšinou sa však ale používa odpadová biomasa, pretože náklady na zušľachtenie sú veľmi vysoké a priama kultivácia biomasy by bola ekonomicky nevýhodná (The Royal Society 2008).

Medzi biopalivá druhej generácie môžu patriť aj prepálený rastlinný olej, ktorý zložením je podobný skôr biopalivám prvej generácie. Pretože neobsahuje lignín ani celulózu je taktiež braný ako odpad a jeho výroba nezaťažuje životné prostredie. Cena za produkciu biomasy je nízka až nulová, čo je veľkou výhodou (Datta, Hossain & Roy 2019).

### 1.3.3. Biopalivá tretej generácií

Biopalivá tretej generácií využívajú ako zdroj biomasy makro a mikroriasy. Zloženie biomasy je podobné ako pri prvej generácií. Obsahujú hlavne jednoduché oleje, ktoré nie sú rezistentné voči rozkladu a dajú sa tak extrahovať bez zložitých termochemických reakcií, ako pri biopalivách druhej generácie. Na druhej strane, pomer využiteľných častí biomasy voči nevyužitelným je podobný ako

pri biopalivách druhej generácie, pretože väčšina biomasy rias môže byť zušľachtená na biopalivá (Datta, Hossain & Roy 2019). Kultivovanie biomasy rias pre energetické účely má oproti ostatným dvom generáciám množstvo výhod. Kultivovanie rias je nenáročné na prostredie, pôdu a vodu. Približne 92% vody, v ktorej sa riasy pestujú, môže byť využitá na ďalšiu kultiváciu. Straty vody sú len pri sušení biomasy a popri prípade odparovaní, ak používame otvorené nádrže (vysvetlené v ďalšej kapitole). Riasy možno kultivovať v sladkej, brakickej či morskej vode aj s veľmi vysokou salinitou. Kultivácia rias má oproti pestovaniu inej biomasy veľkú výhodu, a to nesezónny zber a rýchly rast.

Tab. 1: Porovnanie výťažnosti produkcie lipidov na jednotku plochy a obsah lipidov (obsah lipidov pri vyšších rastlinách sa vzťahuje len na plody a semená, pri riasach sa vzťahuje na váhu celej suchej biomasy, prevzaté z Chisti 2007; Lam & Lee 2012; Sajjadi et al. 2018).

<b>Plodina</b>	<b>m<sup>3</sup> / hektár</b>	<b>Obsah lipidov %</b>
Oil Palm ( <i>Elaeis guineensis</i> )	5,7	35,3
Kokosový orech ( <i>Cocos nucifera</i> )	2,6	35,3
Avokádo ( <i>Persea americana</i> )	2,5	8 – 32
Jatrofa ( <i>Jatropha curcas</i> )	1,8	28
Jojoba ( <i>Simmndsia chinensis</i> )	1,7	48 – 56
Olivovník ( <i>Olea europaea</i> )	1,15	20
Repka olejná ( <i>Brassica napus</i> )	1,14	30
Snečnica ( <i>Helianthus annuus</i> )	0,92	47,3
Ryža ( <i>Oriza sativa</i> )	0,9	10
Horčica ( <i>Brassica alba</i> )	0,55	36 – 46
Káva ( <i>Coffe arabica</i> )	0,44	10 - 20
Sója ( <i>Glycine arabica</i> )	0,44	17,7
Ovos ( <i>Avena sativa</i> )	0,2	3,1 – 11,6
Kukurica ( <i>Zea mays</i> )	0,17	4
<b>Mikroriasy (nizky obsah lipidov)</b>	<b>58,7</b>	<b>30</b>
<i>Chlorella sp.</i>		8 – 32
<i>Dunaliella sp.</i>		23
<i>Scenedesmus sp.</i>		10 – 30
<i>Chlamydomonas sp.</i>		22,7
<i>Spirullina sp.</i>		7,72
<b>Mikroriasy (stredný obsah lipidov)</b>	<b>97,8</b>	<b>50</b>
<i>Nannochloropsis sp.</i>		35 – 68
<i>Scenedesmus obliquus</i>		30 – 56
<i>Phaeodactylum sp.</i>		18 – 57
<i>Microcystis sp.</i>		40,1
<b>Mikroriasy (vysoký obsah lipidov)</b>	<b>136,9</b>	<b>70</b>
<i>Schizochytrium sp.</i>		50 – 77
<i>Botryococcus braunii</i>		25 – 75

Biomasu rias možno kontinuálne alebo semikontinuálne odberať tak často, ako tu umožní rýchlosť rastu, kdežto iné plodiny vyšších rastlín je možné odberať len raz ročne (Leite, Abdelaziz & Hallenbeck 2013; Lee & Lavoive 2013; Alam, Mobin & Chowdhury 2015).

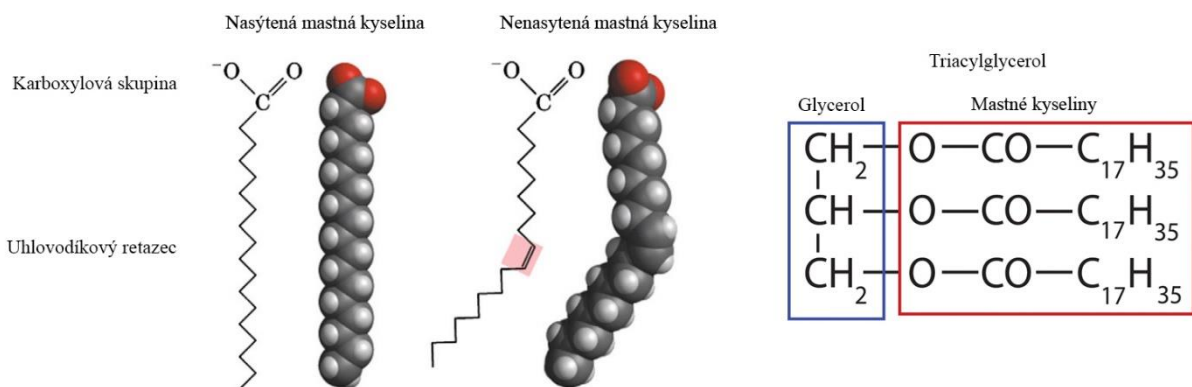
Nevýhodou kultivácie riasovej biomasy je však vysoká počiatočná investícia do kultivačných zariadení a cena energií pri zbere a spracovaní biomasy na finálny produkt. Riasy na rast taktiež potrebujú špecifické podmienky, ako je napríklad teplota, preto je problematické kultivovať riasy v severných krajinách, kde teplota vzduchu v zimných mesiacoch je nižšia než 0°C (Chisti 2007). Počas chladných zimných období by však bolo možné teplomilné riasy nahradiť chladnomilnými, ako je napríklad *Chlamydomonas reithadii* alebo *Skeletonema costatum*, ktoré má tak isto vysoký obsah lipidov, ako teplomilné druhy rias. Nebolo by preto potrebné kultivačné zariadenia zahrievať, čím by bolo možné znížiť výrobné náklady (Ras & Steyer 2013; Sajjadi et al. 2018; Peng, Liu & Huang 2021).

Nevýhody ako vysoké počiatočné náklady a nízku produkciu počas zimných mesiacov, však možno dorovnať vysokou produkciou lipidov na hektár oproti biopalivám prvej ale aj druhej generácie. Riasy môžu mať 10 až 100 násobne vyššiu produkciu lipidov, než bežné poľnohospodárske plodiny (Tab. 1). Tým pádom riasy predstavujú ďaleko lepší zdroj biomasy na výrobu biopalív (Lam & Lee 2012; Sajjadi et al. 2018).

#### 1.4. Zloženie lipidov

Lipidy sú estery mastných kyselín, ktoré sa skladajú z hydrofilnej hlavičky a hydrofóbneho reťazca mastnej kyseliny. Dĺžka reťazca mastných kyselín je rôzna, a však pre výrobu biodiesla sú najvhodnejšie 16 až 18 uhľikaté mastné kyseliny (Chisty 2007). Ak sa v reťazci nachádzajú medzi uhlíkmi len jednoduché väzby, ide o nasýtené mastne kyseliny (Obr. 2). Ak ma reťazce aspoň jednu násobnú väzbu, ide o nenasýtené mastne kyseliny. Samotné lipidy ďalej delíme podľa polarít. Ak je karboxylová skupina na konci reťazca mastných kyselín napojená na neutrálne nabitú molekulu, najčastejšie glycerol, ide o neutrálne lipidy. Najčastejšou formou neutrálnych lipidov sú triacylglyceroly (glycerol s tromi naviazanými mastnými kyselinami). Ak sú však reťazce napojené na polárne molekuly, ako je komplex glycerolu a fosfátu, ide o lipidy polárne. Komplex glycerolu, fosfátu a mastných kyselín nazývame inak aj fosfolipidy (Kates 1986a). Neutrálne lipidy sú hlavnou energetickou zložkou rias, a takisto najcennejšia forma lipidov na výrobu biodiesla. Polárne lipidy sú súčasťou dvojitej vrstvy bunkových stien rias a rastlín. Aj polárne lipidy je taktiež možné využiť na výrobu biopalív, ale ich extrakcia je zložitejšia než pri neutrálnych lipidov, preto je dôležité vybrať druhy riasy s vysokou produkciou neutrálnych lipidov (Halim, Danquah & Webley 2012).





Obr. 2: Zloženie lipidov.

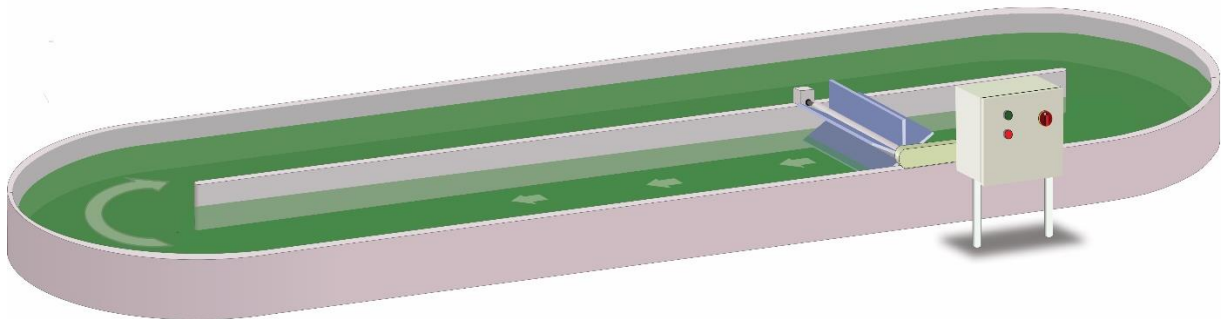
## 1.5. Kultivácia rias

Na výrobu biopalív sa najčastejšie požívajú mikroriasy prirodzene žijúce vo vode, preto aj ich veľkokultivácia musí byť vo vodnom prostredí. Voda v tom prípade, oproti bežnému poľnohospodárskemu priemyslu, nahrádza pôdu ale takisto aj zdroj živým. Môžeme využiť vodu s akoukoľvek salinitou od nízkej ako v sladkých vodách alebo s vysokou salinitou ako v mŕtvom mory. Záleží však na druhu riasy, ktorú chceme kultivovať, hoci viacero druhov rias dokáže prežiť v širokej škále salinity. Ďalším potrebným zariadením je kultivačná nádrž, kde bude voda cirkulovať. Kultivačné nádrže alebo zariadenia sa delia na dve hlavné skupiny, a to otvorené a zatvorené (Wijffels & Barbosa 2010; Leite, Abdelaziz & Hallenbeck 2013; Ruiz et al. 2016;).

### 1.5.1. Otvorené nádrže alebo race-way pondy

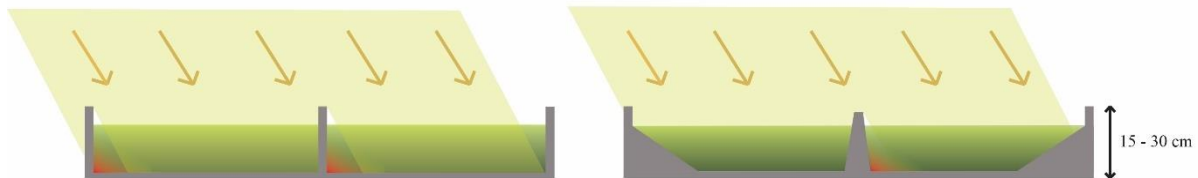
Otvorené nádrže, alebo medzinárodne známe pod názvom race-way pondy, sa na kultiváciu rias používajú približne od 50tých rokov minulého storočia (Milledge 2010). Stále sú najobľúbenejšou voľbou zariadenia na kultiváciu rias vo veľkom (Jerney & Spilling 2018). Nádrže môžu mať rôzne tvary a veľkosti, záleží na tom koľko biomasy chceme kultivovať. Najčastejší tvar je však podlhovastý, na konci zaoblený a v strede rozdelený bariérou na dve časti (Obr. 3 a 5). Voda v nádrži musí neustále cirkulovať, aby riasy nezačali sedimentovať na dno, a aby sa potrebné živiny rovnomerne rozložili pozdĺž celej nádrže. Nádrže by mali mať poháňacie zariadenie, ktoré udržuje neustály prúd vody. Väčšinou je to lopatkové koleso so 5 až 8 lopatkami (Sompech, Chisty & Srinophakur 2012). Priemerná rýchlosť prúdu v nádrži by mala byť približne 25 až 30 cm/s. Minimálna rýchlosť prúdu, pri ktorej riasy ešte nezačínajú sedimentovať je približne 10 cm/s (Chisty & Srinophakur 2012; Eustance et al. 2015; Satpati & Pal 2018). Hĺbka vodného stĺpca v nádrži by mala byť veľmi nízka od 10 do 30 cm (Sundararaghavan & Suraishkumar 2021), aby sa zabránilo javu

zvaný „self-shading“ (Obr. 4). Tento jav nastáva vtedy, keď sa kvôli veľkej hustote rias v nádrži alebo médiu nedostáva dostatok svetla k bunkám v spodnej časti nádrže.



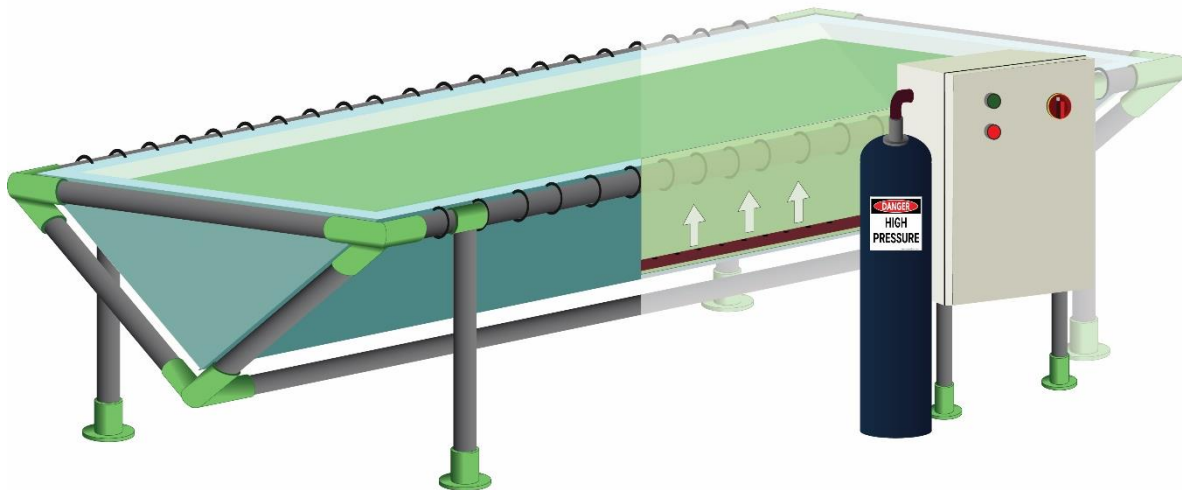
Obr. 3: Race-way pond, pohyb média zabezpečuje listová vrtuľa alebo koleso.

Tým sa tak znižuje celková efektivita produkcie (Eustance et al. 2015). Objemová produkcia biomasy v otvorených systémoch môže byť od 0,021 g /l/deň do 0,117 g/l/deň (Hase et al. 2000; Chisty 2007, Zou et al. 2020).



Obr. 4: Prierez race-way pondom, vľavo race-way pond s kolmými stenami s väčšou zatienenou plochou; vpravo so zaoblenými stenami s menšou zatienenou plochou; červené plocha znázorňuje zatienenie.

Veľkou výhodou používania race-way pondov je ich nenáročnosť a nízke investičné náklady oproti uzavretým systémom. Do nádrži nie je potrebné pridávať CO<sub>2</sub> (ale môže sa ak chceme zvýšiť produkciu), či ochladzovať vodu počas horúcich období. Podmienky v nádrži sú podobné v tím v prirodzených tŕňach či malých jazerách. Voda sa ochladzuje pomocou evaporácie a CO<sub>2</sub> si riasy sťahujú z atmosféry (Chisty 2007).



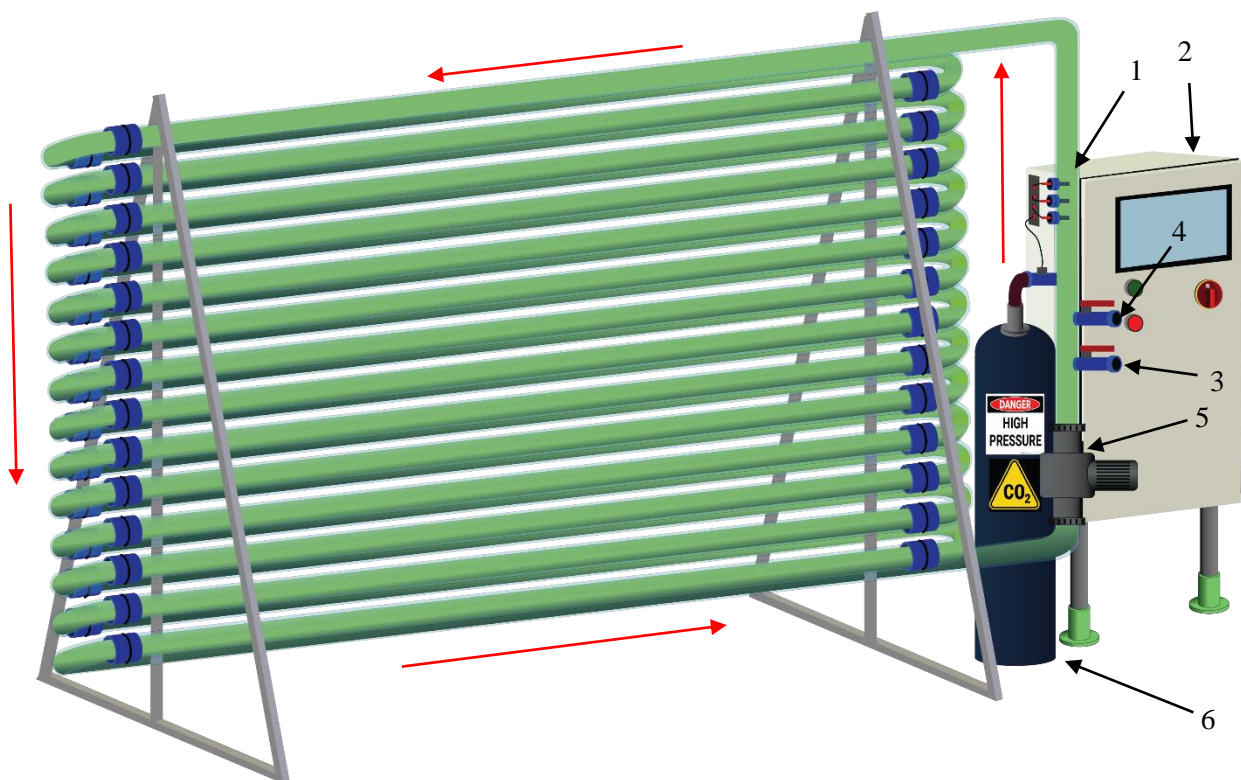
Obr. 5: Moderný race-way pond, pohyb média zabezpečuje aerácie pomocou hadičku umiestnenej na dne nádrže, nadrž sa aeruje pomocou neupraveného vzduchu alebo obohateného o  $\text{CO}_2$ , modifikované podľa Zuckermann et al. 2015.

Race-way pondy majú však množstvo nevýhod, s ktorými musíme počítať, ak si vyberieme race-way pondy ako lacnejšiu variantu. Nadrž je otvorený systém, takže je zložité zabrániť vnikaniu iných organizmov do kultivačnej nádrže, ako napríklad iné riasy alebo planktón požírajúci riasy. Kontaminácia môže byť problémom, ak biomasu rias využívame ako potravinu (Chisti 2007). Ďalšími nevýhoda je napríklad silná evaporácia počas horúcich dní (Satpati & Pal 2018), zložitá kontrola a ovplyvňovanie vnútorných dejov ako pH, svetelná dostupnosť do všetkých miest. Veľmi veľkou nevýhodou je však slabá schopnosť obohatovať nadrž o  $\text{CO}_2$ , pretože množstvo plynu sa z vody odparí bez toho aby ho riasy boli schopné asimilovať. Nízka asimilácia  $\text{CO}_2$  má za následok omnoho nižšiu produktivitu biomasy než v uzavretých systémoch (Sundararaghavan & Suraiškumar 2021).

### 1.5.2. Uzavreté systémy alebo fotobioreaktory

Fotobioreaktory predstavujú modernejší a efektívnejší systém kultivácie rias. Na rozdiel od race-way pondov je kultivačné médium oddelené od vonkajšieho prostredia a  $\text{CO}_2$  sa tak neuvolňuje preč zo systému do atmosféry (Obr. 6). To má za následok lepšiu asimiláciu  $\text{CO}_2$  a tým aj efektívnejšiu produkciu biomasy (Satpati & Pal 2018). Uzavreté fotobioreaktory majú veľmi nízku pravdepodobnosť kontaminácie biomasy inou riasou alebo algifúgným zooplanktónom (Narala et al. 2016; Jerney & Spilling 2018; Satpati & Pal 2018). Fotobioreaktor predstavuje systém priehľadných potrubí alebo panelov, cez ktoré preteká živné médium s riasovou kultúrou. Rovnako ako v race-way pondoch, je potrebné udržať neustálu cirkuláciu média pomocou čerpadiel. Dobrá voľba pre fotobioreaktor je peristaltické membránové čerpadlo, ktoré bunky vystavuje výrazne menšiemu stresu než bežné vrtuľové (Masojidek & Torzillo 2008). Hrúbka fotobioreaktora je oveľa nižšia než hĺbka race-way pondu, a to od 3 do 6 cm (Masojidek & Torzillo 2008; Rodolfi et al. 2009; Narala et al.

2016) Ako materiál na výrobu reaktorov sa využíva najmä plexisklo, plast, akrylové sklo alebo bežné sklo (Masojidek & Torzillo 2008; Narala et al. 2016).



Obr. 6: Tubulárny fotobioreaktor, 1 – Sensory na teplotu, pH a prietok; 2 – počítač; 3 – výpustný ventil; 4 – napúšťací ventil; 5 – čerpadlo; 6 – zdroj CO<sub>2</sub>; červené šípky znázorňujú smer prúdenia média.

Fotobioreaktory sa delia do dvoch kategórií, a to do podľa tvaru systému a podľa umiestnenia. Podľa tvaru systému sa delia na tubulárne a laminárne, podľa umiestnenia na vertikálne a horizontálne. Tubulárne fotobioreaktory sú tvorené systémom potrubí a laminárne sú tvorené z tenkých panelov s veľkým povrchom. Podľa umiestnenia sa fotobioreaktory delia na vertikálne a horizontálne (, Chisti 2007; Jerney & Spilling 2018; Satpati & Pal 2018).

Nevýhodou fotobioreaktorov je vysoká počiatočná investícia, ktorá môže byť niekoľko násobne vyššia oproti race-way pondom (Masojidek & Torzillo 2008). Ďalšou nevýhodou uzavretého systému je manuálne sýtenie média s CO<sub>2</sub>, čo navyšuje prevádzkové náklady (Jerney & Spilling 2018; Satpati & Pal 2018). Potrubie je oproti otvoreným nádržiam náročnejšie na čistiacu údržbu, pretože biomasa rias sa často prichycuje na potrubí, čo znižuje intenzitu svetla (Masojidek & Torzillo 2008). Je preto lepšie skonštruovať systém fotobioreaktoru tak, aby sa dal po dlhšom období podľa potreby rozobrať a vyčistiť.

Výhodou fotobioreaktoru je obrovská objemová produkcia od 0,25 do 0,6 g/l/deň (Rodolfi et al. 2009; Satpati & Pal 2018), Chisty (2007) dokonca zaznamenal až 1,5 g/l/deň.

### 1.5.3. Typy kultivačných režimov

Riasy sa dajú kultivovať vo viacerých kultivačných režimoch, ktoré si výrobcovia môžu vybrať podľa potreby. Riasy možno kultivovať v troch doposiaľ známych režimoch, a to v jednostupňovom, dvojstupňovom a semikontinuálnom režime.

Pri jednostupňovom režime sa riasy pestujú až do momentu, kedy dosiahnu stacionárnu fázu rastu, kedy sa rast spomalí až zastaví z dôvodu limitácie živiny.

Dvojstupňovom režime je kultivácia rozdelená na dve fázy. V prvej fáze sa riasy pestujú taktiež do začiatku stacionárnej fázy aby sa vytvorilo dostatok biomasy. V druhej fáze sa musia manuálne zmeniť podmienky v kultivačnom systéme, tak aby boli pre riasy stresujúce. Tie následne začnú tvoriť zásobné látky, ako sú napríklad lipidy a biomasa je tak viac hodnotnejšia (stresovým faktormi sa budem venovať v ďalšej kapitole). Pri oboch režimoch sa po skončení kultivácie odoberá celá biomasa a kultivácia sa začína na novo.

Tretí typ je semikontinuálny režim, pri ktorom sa odoberá biomasa postupne a nikdy nie celá na raz. Biomasa sa odoberá tak, aby efektivita produkcie biomasy bola čo najvyššia. Frekvencia zberu biomasy by mala byť nastavená tak, aby v kultivačnom systéme nebola vysoká denzita buniek a zabránilo sa tak fotoinhibícií. Odoberaný objem biomasy by mal byť taký, aby sa zvyšná biomasa v systéme rýchlo obnovila. Do systému je takže pravidelne pridávané čerstvé médium, aby sa zachovala neustála produkcia biomasy (Rocha et al. 2019).

### 1.6. Zelená riasa *Scenedesmus* ako zdroj biopalív

Riasy, ako zdroj lipidov, majú veľký potenciál oproti bežným hospodárskym plodínám, ktoré sa momentálne využívajú ako zdroj biopalív. No však nie všetky druhy riasy sú dostatočne efektívne, aby sa finančne vyplatila ich kultivácia. Pri výbere druhu rias na veľkokultiváciu je nutné zvažovať medzi rýchlosťou rastu, obsahom lipidov, náročnosti kultivácie a kultivačného média. Rýchlosť rastu biomasy a obsah lipidov v bunke sú parametre, ktoré spolu často negatívne korelujú. Preto je nutné zvážiť, čo je pre nás v daných podmienkach viac rentabilné, či rýchlo dopestované veľké množstvo biomasy s nízkym obsahom lipidov alebo biomasa s vysokým obsahom lipidov, ale veľmi dlhým časom produkcie (Benemann 2013). Náročnosť kultivácie a kultivačného média z finančného alebo technologického hľadiska sa hodnotí podľa typu kultivovanej riasy a polohy kultivačného zariadenia. Niektoré typy rias sú veľmi špecifické na podmienky kultivácie, ako je napríklad koncentrácia živín, salinita, pH a hlavne teplota. Ak aby sa podmienky v kultivačnom systéme dostali do stavu, ktoré daným riasam nevyhovujú, môže to spôsobiť zníženie efektivity alebo ireverzibilnú stratu biomasy (Masojidek & Torzillo 2008). Pri výbere rias je nutné dbať aj na lokalitu, kde je kultivačné zariadenie

umiestnené a na dostupné zdroje kultivačného média. Napríklad kultivácia teplomilných rias v chladnom prostredí alebo kultivácia morských rias vo vnútrozemí, by nebolo finančne efektívne.

Druh riasy, ktorý má veľké predpoklady byť efektívnym zdrojom lipidov na tvorbu biopalív, je riasa *Scenedesmus* sp. (Feng et al. 2014). *Scenedesmus* má vysokú rýchlosť produkcie biomasy, a to približne 0,26 až 0,48 g/l/deň, oproti ostatným sladkovodným riasam, ktoré dosahujú rýchlosť rastu menšiu ako 0,1 g/l/deň (Rodolfi et al. 2009; Feng et al. 2014; Bagchi & Mallick 2016). Daná produkcia biomasy je dosiahnutá za autotrofných podmienok, kedy riasa využíva ako zdroj uhlíku rozpustený atmosférický CO<sub>2</sub>. No *Scenedesmus* sa dokáže vyživovať aj mixotrofné, kedy okrem CO<sub>2</sub> dokáže prijímať uhlík aj z organických látok. Produkcia za mixotrofných podmienok môže byť v uzavretom fotobioreaktore až 0,6 g/L/deň (Bagchi & Mallick 2016). Obsah lipidov v bunke v porovnaní s inými sladkovodnými riasami nemajú veľmi vysoký, a to v priemere okolo 20% (Griffiths & Harrison 2009). Rýchlou produkciou biomasy sa však radia medzi najlepších producentov lipidov z pomedzi sladkovodných rias. Najvyšší obsah lipidov dosahuje zelená riasa *Botryococcus*, ktorý môže dosahovať až 70%, ale jeho veľkou nevýhodou je pomalá produkcia biomasy (Banerjee et al. 2002). Na druhej strane *Chlorella* sp. má vysokú rýchlosť rastu ale nízky obsah lipidov. (Spolaore et al. 2006). Ďalšia výhoda riasy *Scenedesmus* je jej nenáročná kultivácia vo vonkajších podmienkach aj v nízko nákladových médiach, ako je napríklad odpadová voda z chovu hospodárskych zvierat s obsahom močoviny alebo vyčistenej vode z ČOV s vyšším obsahom dusíku a fosforu (Esakkimuthu et al. 2016; Leite, Paranjape & Hallenbeck 2016; Xia et al. 2019). V odpadovej vode tvorí *Scenedesmus* kvalitnejšie zloženie lipidov (pozri nižšie) než v štandardom chemickom médiu (Peng et al. 2017)

Ďalšou veľmi podstatnou výhodou riasy *Scenedesmus* je lipidové zloženie. Lipidy riasy *Scenedesmus* obsahujú z viac ako 70% C:16 a C:18 mastné kyseliny (Viner, Champagne & Jessop 2013; Peng et al. 2017; Qu et al. 2019; Xia et al. 2019). Mastné kyseliny s dĺžkou reťazcu C:16 až C:18 sú vhodné na výrobu biodiesla, pretože znižujú bod tuhnutia a zakalenia (Knohte 2009).

Na čo si však treba pri kultivácii riasy *Scenedesmus* dávať pozor je kyslé pH. Optimálne pH na vysokú produkciu biomasy a lipidov je 7 až 9, v tomto rozmedzí sa produkcia biomasy výrazne nemení. Ale pri poklese pod 6 až 5 sa produkcia biomasy prudko zníži približne o 5 násobok. Je preto nutné pri kultivácii neustále sledovať hladinu pH a zabrániť okysleniu média (Difusa et al. 2015).

## 1.7. Ovplyvnenie produkcie lipidov

Množstvo a zloženie lipidov môžeme ovplyvňovať a zvyšovať, ak zvolíme správny postup kultivácie a správne načasovanie jednotlivých krokov. Znásobenie produkcie lipidov môžeme doceliť vystavením riasy stresovým podmienkam (Anand et al. 2021). Stresové faktory sú napríklad deficit alebo určitá forma N alebo P, silná svetelná intenzita, pH, salinita a mnoho iných (Wu, Yu & Hu

2014; Cheng et al. 2017; Gour, Garlapati & Kant 2019). Stresové faktory sa však môžu líšiť pre jednotlivé druhy či taxóny. Podmienky, ktoré môžu byť pre jeden druh priaznivé, pre iné druh môžu predstavovať stres (Leite, Paranjape & Hallenbeck 2016). Správny postup a načasovanie je veľmi dôležité, pretože produkcia lipidov a biomasy spolu veľmi často negatívne korelujú (Peng et al. 2017). Preto sa na kultiváciu rias, určených pre produkciu biopalív, často používa dvojstupňový režim. Cieľom prvého stupňa kultivácie je dosiahnuť, čo najväčšiu produkciu biomasy. Následne v druhom stupni kultivácie je riasová kultúra vystavená stresu, aby produkovala viac lipidov (Peng et al. 2017).

### **1.7.1. Koncentrácia a formy dusíku**

Dusík patri medzi biogénne prvky, ktoré riasy a vyššie rastliny potrebujú pre život a rast. Dusík je veľmi potrebný pri produkcii proteínov, bunkovom delení a raste biomasy (Miller et al. 2010). Deficit, nadbytok alebo určité forma dusíku v kultivačnom médiu môže výrazne ovplyvniť produkciu biomasy a lipidov.

#### **1.7.1.1. Dusíkový deficit**

Dusíkový deficit negatívne ovplyvňuje produkciu proteínov, čo má za následok zníženie intenzity fotosyntézy a metabolické dráhy sa tak presmerujú na produkciu lipidov (Ho et al. 2014). Pomocou dusíkového deficitu je možné až 3 násobne zvýšiť koncentráciu lipidov v médiu a obsah lipidov v bunkách. (Xia, Song & Hu 2015; Anand et al. 2021).

Pri neprítomnosti dusíku začnú bunky rias rozkladať látky bohaté na dusík (Kudahettige, Pickova & Gentili 2018;). Jedny s najbohatších látok na dusík sú chlorofyl, DNA a proteíny. Postupný rozklad týchto látok v bunkách výrazne negatívne ovplyvní rast biomasy. Na druhej strane získaný dusík bunky využívajú na tvorbu energeticky bohatých látok, ako sú lipidy. (Cervantes et al. 2013; Pancha 2014). Pri rozklade chlorofylu sa farba riasových kultúr postupne mení zo zelenej cez žltú až na hnedú farbu. Postupnou zmenou farby je možné predpokladať nárast obsahu lipidov v bunkách (Okcu 2019)

Ako stresový faktor môžeme použiť aj limitáciu dusíkom, kedy je dusík v médiu prítomný, ale v pomere s ostatnými biogénnymi prvkami, ako je napríklad fosfor, je vo veľmi nízkej koncentrácii (Sterner & Elser 2003). Pri týchto podmienkach fotosyntéza pokračuje, na rozdiel od dusíkového deficitu, kedy sa fotosyntéza zastavuje. Hoci fotosyntéza pokračuje, získaná energia sa už však nevyužíva na produkciu látok bohatých na dusík ale produkuje viac energeticky bohaté látky ako sú lipidy (Okcu 2019).

Deficit dusíku spôsobuje veľmi nízky rast biomasy (Anand et al. 2021), a preto je dôležité použiť dvojfázovú kultiváciu. V prvej fáze je potrebné vyprodukovať čo najväčšie množstvo biomasy



v médiu s normálnou koncentráciou dusíku a následne biomasy presunúť do média s deficitom dusíku. (Cheng 2018; Okcu 2019).

### 1.7.1.2. Limitácia dusíku

Pri limitácií dusíkom by bolo možné použiť aj jednofázovú kultiváciu s takou koncentráciou dusíka, ktorú by riasy mohli po vyprodukovaní dostatočného množstva biomasy úplne spotrebovať. Po úplnom spotrebovaní by si riasy sami vytvorili podmienky deficitu dusíku a začali vo veľkom akumulovať lipidy (Liu, Chen, Wang & Liu 2019). Tento proces by bol ale časovo náročný a jeho zvolenie by záviselo na tom, či by bol v určitých podmienkach finančne efektívnejší než dvojfázový. (Okcu 2019).

### 1.7.1.3. Formy dusíku

Nie len deficitom alebo limitáciou dusíku je navýšiť produkciu lipidov, ale takisto aj jeho prítomnosťou. Záleží však na tom akú formu dusíku použijeme. Pri tejto stratégii kultiváciu nie je potrebná dvojfázová kultivácia, ale úplne postačí jednofázová alebo najčastejšie využívaná semikontinuálna kultivácia (Han, 2013). Je však taktiež veľmi dôležité vybrať taký zdroj dusíku, ktorý je dobre dostupný a finančne výhodný. V najčastejšie užívaným zdrojom dusíku v laboratórnych kultivačných mediách je forma  $\text{NO}_3^-$ , napríklad  $\text{NaNO}_3^-$ , v médiu BG-11 (Andersen 2004). Mnohé riasy však nemajú enzým nitrát reduktázu, pomocou ktorého by mohli spracovať  $\text{NO}_3^-$  a preferujú skôr formu  $\text{NH}_4^+$ , ktorá je pre nich ľahšie prijateľná. Ako náhradu dusíkatých živín je možné použiť látky s obsahom amoniaku alebo močoviny. To môže byť pre pestovateľov rias veľkou výhodou, pretože močovina je veľmi lacným zdrojom dusíku (Covell et al. 2020). Okrem nízkej ceny má močovina veľký potenciál ako zdroj uhlíku, pretože pozitívne vplyva na rast biomasy a taktiež aj obsah lipidov v bunkách a produkciu lipidov (Cheng et al. 2018, An et al. 2019; Covell et al. 2020). Rast biomasy môže byť v prítomnosti močoviny približne rovnako vysoký ako v prítomnosti  $\text{NO}_3^-$  a približne dvojnásobne vyšší než v prítomnosti  $\text{NH}_4^+$ . Koncentrácia močoviny pozitívne koreluje s produkciou biomasy (Cheng et al. 2018; An et al. 2019). Niektoré publikácie však uvádzajú, že vplyv  $\text{NH}_4^+$  na rast biomasy môže byť približne rovnako dobrý ako pri močovine (Covell et al. 2020). Rozdiel vo výsledkoch je pravdepodobne spôsobený rozdielnymi látkami obsahujúcimi  $\text{NH}_4^+$ . Autori článku Covell et al. (2020) uvádzajú, že  $\text{NH}_4$  má rovnako pozitívne vlastnosti ako močovina. Ako zdroj amoniaku autori použili  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_3$ . Iní autori ďalej použili aj  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Pozitívnejšie výsledky autorov Covell et al. (2020) pravdepodobne spôsobila prítomnosť fosforu.



Močovina má tak isto pozitívny vplyv na produkciu lipidov. Obsah lipidov v bunkách zelených rias *Scenedesmus* sp., kultivovaných v prítomnosti močoviny, je približne 25 až 30%, čo je približne rovnako ako pri ostatných formách N (Cheng et al. 2018; An et al. 2019; Covell et al. 2020;). Močovina nijak výrazne nezvyšuje produkciu lipidov a obsah lipidov v bunkách riasy *Scenedesmus* oproti  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$ , ale vďaka jej nízkej cene a vysokej dostupnosti je dobrou náhradou zdroju N (Cheng et al. 2018; Covell et al. 2020).

### 1.7.2. Salinita

Salinita ako stresový faktor je ekonomicky výhodný najmä prímorských krajinách, kde majú neobmedzený prístup k morskej alebo brakickej vode. Vystavením sladkovodných rias vysokej koncentrácií NaCl môžeme doceliť veľmi vysokú kumuláciu lipidov v bunkách a niekoľko násobne zvýšiť produkciu lipidov. Nevýhodou použitia salinity je vysoký negatívny vplyv na produkciu biomasy, ktorý pozitívne koreluje s koncentráciou NaCl (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Kudahettige, Pickova & Gentili 2018; Gour, Garlapati & Kant 2019; Rocha et al. 2019; Anand et al. 2021; Liu et al. 2022). Bunky sladkovodných rias sú vystavené osmotickému stresu, ktorý znižuje aktivitu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportov, čo môže negatívne vplývať na priebeh fotosyntézy a tvorbu kyslíku (Srivastava & Goud 2017). Nízkej produkcií biomasy sa dá však zabrániť pomocou dobre nastaveného režimu kultivácie. Veľmi dobrou voľbou je dvojfázová kultivácia, kedy v druhej fáze je biomasa rias vystavená vysokej salinite. Prekvapivo účinné oproti ostatným režimom kultivácie je režim semikontinuálny (Rocha et al. 2019). V danom režime kultivácie sú riasy permanentne vystavované salinite, ale biomasa je pravidelne odoberaná nahradzovaná čerstvým médiom. Daný režim vykazuje vyššiu efektivitu v produkcií biomasy aj lipidov. Oproti ostatným režimom je však v bunkách nižší obsah lipidov (Rocha et al. 2019).

Vhodná koncentrácia NaCl je veľmi špecifická pre každý druh rias. *Scenedesmus* má vysokú toleranciu voči salinite a dokáže prežiť v médiu so salinitou podobnou morskej. Maximálna pozorovaná koncentrácia salinity uvádzaná v literatúre, v ktorej riasa *Scenedesmus* dokáže rásť približne je 20 g/l. (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Kudahettige, Pickova & Gentili 2018; Gour, Garlapati & Kant 2019; Rocha et al. 2019; Anand et al. 2021; Liu et al. 2022). Vplyv NaCl nie je však veľmi jednoznačný, podľa niektorých publikácií je rast obsahu lipid priamo úmerný s rastom koncentrácie NaCl (Gan et al. 2016; Rocha et al. 2019). Iné publikácie sa však svojimi výsledkami líšia a uvádzajú, že vplyv koncentrácie NaCl na obsah lipidov má skôr tvar gausovej krivky, ktorej maximum je približne okolo 5 až 10 g/L, (Anand et al. 2021) a pri 18 g/L je obsah lipidov nižší než v kontrolnej vzorke (Liu et al. 2022).

Salinita ako stresový faktor zlepšuje kvalitu vyprodukovaných lipidov, tým že zvyšuje množstvo neutrálnych lipidov, ktoré sú vhodné na výrobu biopalív, a to lipidy s mastnými kyselinami C16 až C18.

### 1.7.3. Odpadová voda

Ďalšou možnosťou, ako efektívne produkovať biomasu a lipidy, je použitie odpadovej vody z čističky odpadových vôd alebo chovov rýb, či iných vodných živočíchov. Odpadová voda neslúži úplne ako stresový faktor, pretože riasy sa v nej bez problémov množia a rastú. (Eida, Darwesh & Matter 2018).

Odpadová voda sa dá využiť ako lacné kultivačné médium a nezávislé na prídavných nutrientoch. To znamená, že riasy sú schopné rásť v odpadovej vode bez toho, aby sme ju nejak upravovali alebo pridávali nutrienty na podporu rastu. Jediný typ úpravy je sterilizácia alebo filtrácia, a však aj bez toho je riasa *Scenedesmus* schopná rásť bez výrazne zníženej produktivity (Pandey, Srivastava & Kumar 2022). V odpadových vodách z čističky odpadových vôd sa nachádza aj po vyčistení veľké množstvo dusíku a fosforu, ktoré bežné čističky pomocou aktivovaného kalu nedokážu úplne vyčistiť. To je v našom prípade veľmi výhodné, lebo vďaka tomu majú riasy ideálne prostredie na rast a dostatočný zdroj živín (Adámek et al. 2010).

Ďalšou veľkou výhodou využívania odpadovej vody na kultiváciu rias je jej očistenie od spomínaných prvkov a zlepšenie kvality vody, ktorá môže byť po kultivácii rias vrátená do vodného recipientu. Riasy dokážu znížiť hladinu koncentrácie N a P takmer o 98% za 4 až 10 dní. (Shen et al. 2015; Eida, Darwesh & Matter 2018; Pandey, Srivastava & Kumar 2022). V bode, kedy riasy vyčerpali väčšinu živín môžeme pozorovať zníženie až zastavenie rastu biomasy. Vtedy je nutné riasy preniesť do iného média alebo časť vody odobrať a pridať novú čerstvú odpadovú vodu (Eida, Darwesh & Matter 2018). Riasy dokážu očistiť vodu aj od látok ovplyvňujúcich CHSK (chemická spotreba kyslíku), čo sú organické látky, ktoré je nie možné rozložiť alebo odstrániť pomocou biologickej oxidácie ako látky BSK (biologická spotreba kyslíku) (Adámek et al. 2010). CHSK preto nie je možné znížiť biologickou formou na čističke odpadných vôd. Odstraňovanie látok CHSK pomocou kultivácie rias sa ukazuje ako veľmi efektívna pomoc. (Eida, Darwesh & Matter 2018; Gao et al. 2019; Pandey, Srivastava & Kumar 2022). Kultiváciu rias je tak možné zapojiť ako terciárny stupeň očisťovania odpadných vôd v mestských čističkách, celkovo tak zlepšiť kvalitu povrchových vôd a zabrániť tak nadmernej kumulácii eutrofných látok a živín.

Kvalita odpadovej vody je však rôzna a závisí od obdobia alebo vytťažnosti čističky. Od toho sa odvíja množstvo živín ako dusík a fosfor, takisto aj salinita a ďalšie látky, ako napríklad liečivá a antibiotiká. (Adámek et al. 2010; Nordio et al. 2023). Kvalita odpadovej vody silno ovplyvňuje produkciu biomasy a lipidov. Preto je dôležité poznať zloženie odpadovej vody pred začatím

kultivácie a podľa toho vodu zriediť s čistou vodou. Podľa mnohých štúdií je efektívne používať len extrakty a riediť odpadovú vodu čistou vodou alebo kultivačným médiom (Eida, Darwesh & Matter 2018). Odpadová voda nesluší úplne ako stresový faktor, ale skôr napomáha k zlepšeniu produkcie biomasy, tým že obsahuje veľké množstvo živín. Na druhej strane, voda s príliš veľkým množstvom živým môže produkciu biomasy skôr inhibovať ako podporovať. Vtedy už môžeme považovať odpadovú vodu za stres, ktorý ale môže zvýšiť akumuláciu lipidov. Množstvo štúdií, ktoré sledovali rast biomasy a lipidov v odpadovej vode používali však len simulovanú odpadovú vodu, ktorá obsahovala rovnaké koncentrácie N,P a CHSK ako bežná odpadová voda. Ich výsledky ukazovali pozitívnu koreláciu koncentrácie nutrientov a rastom biomasy (Shen et al. 2015; Eida, Darwesh & Matter 2018; Pandey, Srivastava & Kumar 2022). Pri skutočnej odpadovej vode s čističiek alebo chovných nadrží pre ryby sa však pri vysokých koncentráciách rast biomasy zastavuje a zvyšuje sa koncentrácia lipidov ako pri strese (Wong et al. 2015; Apandi et al. 2017; Pandey, Srivastava & Kumar 2022). To znamená, že živiny nie sú jediný faktor, ktorý ovplyvňuje produkciu biomasy a lipidov, ale aj prítomnosť iných látok, salinity alebo organizmov (Nordio et al. 2023). Po zriedení odpadovej vody a vytvorení 25 až 50% extraktu riasa *Scenedesmus*, nemá problém efektívne produkovať biomasu s dostatočným množstvom lipidov (Eida, Darwesh & Matter 2018).

Ak chceme kultivovať riasy v odpadovej vode o niečo efektívnejšie, môžeme to doceliť pridaním stopových prvkov kovu, ako je napríklad železo. Odpadové vody z čističky väčšinou neobsahujú žiadne kovy. Kovy pravdepodobne boli odstránené v sekundárnom čistení a akumulované v aktivovanom kale. (Adámek et al. 2010). Tieto prvky sú však pre produkciu biomasy a lipidov veľmi dôležité a ich nízka koncentrácia alebo neprítomnosť produkciu inhibujú (Ren et al. 2014). Napríklad železo ovplyvňuje elektrón-transportný reťazec, fixáciu dusíku a uhlíku a pri jeho nedostatku sa rast biomasy zastavuje (Chen et al. 2011). Pridaním týchto stopových prvkov kovov, je možné zvýšiť efektivitu kultivácie rias v odpadovej vode. Nie je potrebné pridávať do média veľké množstvo, keďže ide o stopové prvky. Z toho hľadiska sa nijak výrazne nezvýšia náklady na kultiváciu, ale zvýši sa jej efektivita (Han et al. 2019).

#### **1.7.4. Mixotrofná kultivácia**

Väčšina rias sa vyživuje fotoautotrofne, čo znamená, že ako zdroj energie využívajú slnečné žiarenie a ako zdroj uhlíka využívajú atmosférický CO<sub>2</sub>. Tým sa líšia od väčšiny baktérií, ktoré sa vyživujú chemoheterotrofne, čo je pravý opak fototrofie. Chemoheterotrofné organizmy ako zdroj energie využívajú oxidáciu organickej hmoty a ako zdroj uhlíku využívajú uhlík viazaný v organických látkach (Rulík et al. 2013). Niektoré druhy rias sú však schopné prijímať okrem atmosférického aj organický uhlík, čo môže výrazne zvýšiť produkciu biomasy. Schopnosť využívať oba zdroje uhlíku sa nazýva mixotrofia (Rulík et al. 2013). V mixotrofných podmienkach je možné

kultivovať aj riasu *Scenedesmus* a zefektívniť tak jeho produkciu. Ako zdroj organického uhlíku sa využíva napríklad glukóza, acetát, glycerol alebo aj vyššie spomínaná odpadová voda (Leite, Abdelaziz & Hallenbeck 2013; Rai & Gupta 2016; Mansouri & Nezhad 2020; Liu et al. 2022).

#### 1.7.4.1. Glycerol

Ak chceme kultivovať riasy v mixotrofných podmienkach veľmi dobrou voľbou je glycerol. Glycerol je veľmi účinný pri nízkej koncentrácii približne 1% extrakte. Pri danej koncentrácii dokáže zdvojnásobiť produkciu biomasy aj akumuláciu lipidov. Pri vyššej koncentrácii už môže pôsobiť ako inhibítor produkcie biomasy. Ako pri každom stresovom faktore, aj pri prítomnosti vysokej koncentrácie glycerolu môžeme pozorovať vyšší obsah lipidov. Glycerol by sa tak dal využiť pri dobrom načasovaní aj ako stresový faktor, ktorý znásobí percentuálny obsah lipidov v bunkách, ale už však nie samotnú biomasu.

Glycerol je veľmi dobrá voľba, ak produkujeme biomasu za účelom výroby biopalív, pretože glycerol vzniká ako vedľajší produkt pri transesterifikácii mastných kyselín na biodiesel (kapitola 1.10). Tým pádom znížime náklady na produkciu biomasy a využijeme odpadový medzi-produkt po transesterifikácii (Gupta & Rai 2016).

#### 1.7.4.2. Xylóza

Xylóza je jeden z hlavných komponentov, ktorý sa nachádza v bunkových stenách vyšších rastlín. Je taktiež vo vysokej koncentrácii obsiahnutá v čiernom luhu, čo je odpadová látka vznikajúca v papierenskom priemysle pri odstraňovaní lignínu a hemicelulózy (Stenius et al. 2000). Xylóza je stavbou podobná glukóze, ale je pre mnohé riasy toxická. Iné riasy ju naopak dokážu absorbovať a využiť ako zdroj C. Toxicita pravdepodobne spočíva v inaktivácii hexokinázy a následnú inhibíciu glykolýzy.

Pri niektorých fylogeneticky veľmi príbuzných riasach je možno sledovať radikálne rozdiely v životaschopnosti za prítomnosti xylózy. Autori článku Leite, Paranjape & Hallenbeck (2016) kultivovali *Chlorella* a *Scenedesmus* v médiu s prítomnosťou xylózy. Zatiaľ, čo u riasy *Scenedesmus* neboli vidieť žiadne rozdiely v produkcii biomasy po celú dobu experimentu, u *Chlorelly* bolo vidieť degradáciu chlorofylu už po prvých 48 hodinách. Pri kultivácii *Chlorelly* nie je možné používať xylózu ako zdroj C, ale je možné ju použiť ako stresový faktor na akumuláciu lipidov. Prítomnosť xylózy zvýšila obsah lipidov o 2,5 až 4 násobok. Riasu *Scenedesmus* však možno kultivovať v prítomnosti xylózu a ten ju bude vedieť využívať ako zdroj C. Autori článku však spomínajú, že je nutné riasu aklimatizovať v médiu s prítomnosťou xylózy, než ju začneme vo veľkom kultivovať.

Aklimatizácia je dôležitá pre navýšenie tvorby enzýmov pento-fosfátovej dráhy, pomocou ktorej môžu riasy premeniť xylózu na xylosu-5-fosfat, čo je forma nutná pre asimiláciu. Autori iného článku využívajúci taktiež xylózu ale spoločne so salinitou. Autori kultivovali riasu *Scenedesmus* v prítomnosti xylózy a po istom čase zaznamenali prudký nárast produkcie biomasy (Fernandez, Herrero & Moreno 1985).

Použitím xylózy získame veľmi lacný organický zdroj uhlíka a môžeme tak riasu *Scenedesmus* kultivovať v mixotrofných podmienkach. Alebo môžeme xylózu využiť ako stresový faktor na zvýšenie produkcie lipidov pri kultivácii *Chlorelly*. Ďalšou veľmi veľkou výhodou je remediácia odpadovej vody z papierenského priemyslu od xylózy a zabránenie jej vypúšťaniu do povrchových vôd.

## **1.8. Zber biomasy**

Zber biomasy je jednou z najzložitejších častí kultivácie riasovej biomasy. Obtiažnosť spočíva v tom, že mikroriasy sú veľmi malé a oddeliť ich od živného média je veľmi náročné na energiu a financie. Existuje množstvo spôsobov na zber biomasy, ktoré sa môžu navzájom kombinovať tak, aby spotrebovaná energia na jednotku biomasy bola čo najnižšia. Spotrebovaná energia na oddelenie biomasy z média sa môže vyšplhať až na približne 90% z celkovej energie spotrebovanej od začiatku kultivácie až po výsledný biodiesel a približne 30% z celkových nákladov na kultiváciu (Singh & Patidar 2018; Kumar et al. 2022).

Zber biomasy pozostáva z dvoch po sebe nasledujúcich krokov. Hustota média s riasami počas kultivácie je približne 0,05% (Uduman et al. 2010; Muylaert et al. 2017). Zberom biomasy dosiahneme zahustenie zmesi na 1 až 5%. Následný krok sa nazýva „dewatering“, zahustí výslednú biomasu na kontrakciu 15 až 25% (Singh & Patidar 2018; Kumar et al. 2022). Obidva kroky je možno vykonať pomocou rovnakej metódy, ale efektívnejšie je však metódy striedať. (Muylaert et al. 2017; Kumar et al. 2022). Všetky typy zberu biomasy majú približne rovnaké množstvo výhod ako aj nevýhod, preto doteraz neexistuje jednoznačná zhoda, ktorá z nižšie uvedených metód je najefektívnejšie. Výber metódy opäť závisí na pestovateľovi a či je biomasa určená na konzumáciu alebo biopaliva. Pri niektorých metódach je nutné použiť chemické látky, ktoré zostávajú v biomase a tá následne prestáva byť nevhodná pre konzumáciu.

### **1.8.1. Centrifugácia**

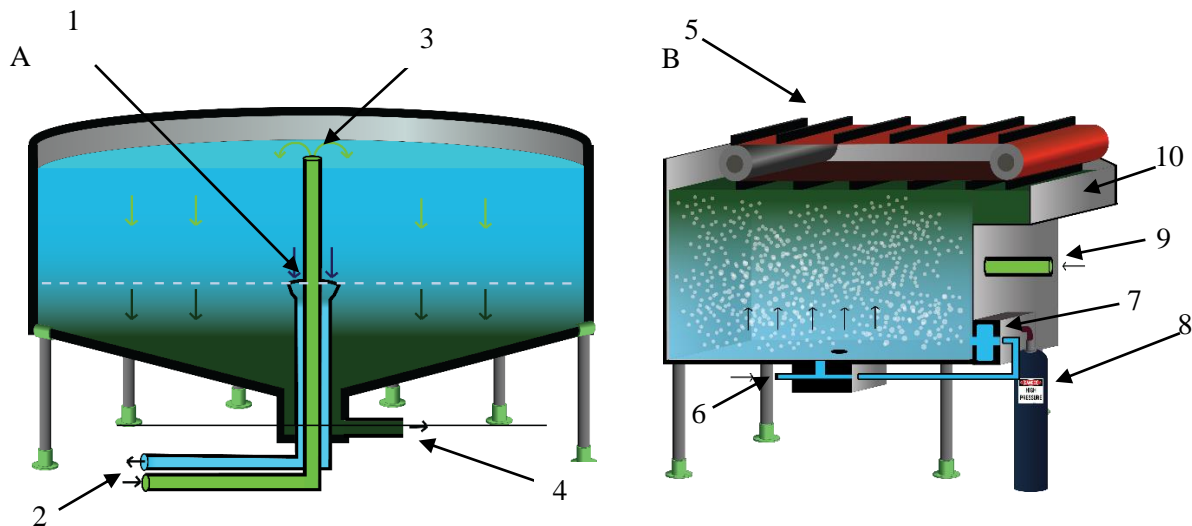
Jednou s najpoužívanejších metód hlavne v laboratóriách na zber biomasy je centrifugácia. Tato metóda zberu je dobrá na zber veľmi cennej a kvalitnej biomasy. Jej výhody pozostávajú v tom, že

dokáže veľmi dobre oddeliť médium od biomasy. Centrifugáciou môžeme dosiahnuť zahustenie až 20% (biomasa/médium) (Jerney & Spilling 2018; Singh & Patidar 2018). Efektivita centrifugácie však nie je vždy úplne jednoznačná pri každom použití. Ovpływujú ju najmä počiatočná koncentrácia biomasy, schopnosť buniek usadzovať sa a doba zotrvania usadeniny po centrifugácii (Grima, Fernández & Medina 2013).

Nevýhody tejto metódy sú však vysoké počiatočné náklady a spotreba energie. Pre kultivácie veľkých objemov je táto metóda veľmi finančne nákladná (Satpati & Pal 2018; Kumar et al. 2022).

### 1.8.2. Sedimentácia

Podobná gravimetrická metóda ako centrifugácia, a však o mnoho lacnejšia, je sedimentácia. Sedimentácia je dej, ktorý využíva len gravitačnú energiu a nie je preto potrebné do deja energiu dodávať, čím sa podstatne časť náklady na jednotku biomasy. Nie je potrebné pridávať nijaké chemické látky, ktoré by mohli ovplyvniť výslednú kvalitu biomasy (Muylaert et al. 2017; Kumar et al. 2022). Pri dodaní chemických koagulantov už nehovoríme o sedimentácii, ale flokulácii alebo koagulácii. Sedimentácia je dobrá voľba ako prvý krok pri zbere biomasy, kedy sa biomasa viac zahustí



Obr. 6: Prístroje na zber biomasy; A – Sedimentačná nádrž; B – Flotačné zariadenie; 1 – výpustný ventil; 2 – potrubie na odvádzanie čistého média a privádzanie biomasy; 3 – napúšťací ventil čerstvej biomasy; 4 – vypúšťanie zahustenej biomasy; 5 – zhrabavacie zariadenie na biomasu; 6 – odvádzanie čistej biomasy; 7 – pretlaková komora na obohatenie média kyslíkom; 8 – fľaška so stlačeným vzduchom; 9 – prívod biomasy; 10 – zberná nádoba na zahustenú biomasu.

a následne môže byť použitá iná metóda ako je napríklad spomínaná centrifugácia. Výsledná spotreba energie a náklady na jednotku biomasy sa tak výrazne znížia (Muylaert et al. 2017).

Danú metódu je možné použiť aj pre riasu *Scenedesmus*, ktorá vďaka cenóbiám je schopná sedimentácie. Efektivita sedimentácie riasy *Scenedesmus*, čo je rozdiel absorbancie pri OD<sub>630</sub> za hodinu, je približne 50 až 80% (Xia et al. 2019).

### 1.8.3. Flotácia

Flotácia je proces opačný ako sedimentácia, pretože biomasa sa zhromažďuje na hladine zbernej nádrže. Biomasa na hladine sa následne zberá pomocou „skimmeru“, čo je nádoba určená na zber nečistôt alebo predmetov z hladiny. Lepšie zhlukovanie buniek na hladine dosiahnuť pomocou prevzdušňovania kultivačného média. Bublinky vzduchu interagujú s bunkami rias a vynesú ich na hladinu. Tento proces je oproti sedimentácii veľmi rýchly. Je veľmi efektívnou voľbou aj pre kultiváciu rias vo veľkom. Je vhodný pre sladkovodné ako aj pre morské riasy (Muylaert et al. 2017; Kumar et al. 2022)

Pri flotácií sa však odporúča používať koagulanty a flokulanty, aby sa zvýšila pravdepodobnosť interakcie bublín s biomasou a zber bol efektívnejší. Tým sa však zníži kvalita biomasy a nie je ju spotrebovať ako potravinu, pretože dané chemikálie môžu obsahovať väčšie množstvo hliníku (Kumar et al. 2022).

Existujú však rôzne typy flotácie, kde nie je potrebné pridávať žiadne chemické látky. Je to napríklad elektrolytická flotácie, pomocou ktorej sa na bunkách vytvárajú bublinky vodíku. Ďalšou dobrou metódou je napríklad ozonizačná flotácie, pri ktorej biomasa stúpa na hladinu pomocou ozónových bubliniek, ktoré sú do kultivačného média pridávané. Ozón rozruša bunky rias a uvoľňuje polyméry z buniek, ktoré uvoľňujú biopolyméry a tie slúžia ako koagulant (Muylaert et al. 2017; Jerney & Spilling 2018; Kumar et al. 2022).

### 1.8.4. Flokulácia a koagulácia

Koagulácia je proces zhlukovania častíc, ktoré urýchľuje sedimentáciu alebo zefektívňuje filtráciu. Koaguláciu biomasy je najčastejšie možné dosiahnuť pomocou chemických koagulantov. Tieto chemické koagulanty obsahujú ťažké kovy, čo môže znehodnotiť biomasu. Existujú samozrejme aj iné metódy než chemické, a to autoflokulácia a bioflokulácia.

Autoflokulácia je proces, kedy sa zhlukovanie biomasy dosiahne vplyvom environmentálneho stresu, ako je napríklad zmena pH, dusíkový deficit alebo vyššia koncentrácia kyslíka (Satpati & Pal 2018; Singh & Patidar 2018;). Zmena pH môže byť vyvolaná pridaním solí vápnika alebo magnézia, ktoré nie sú toxické ani po zrazení. Hodnoty pH môžu narásť aj bez prídania chemických látok, a to

pomocou fotosyntézy. Mikroriasy dokážu absorbovať veľké množstvo CO<sub>2</sub> a tým zvýšiť pH na hodnoty 9 až 10 (Muylaert et al. 2017; Liu et al. 2022).

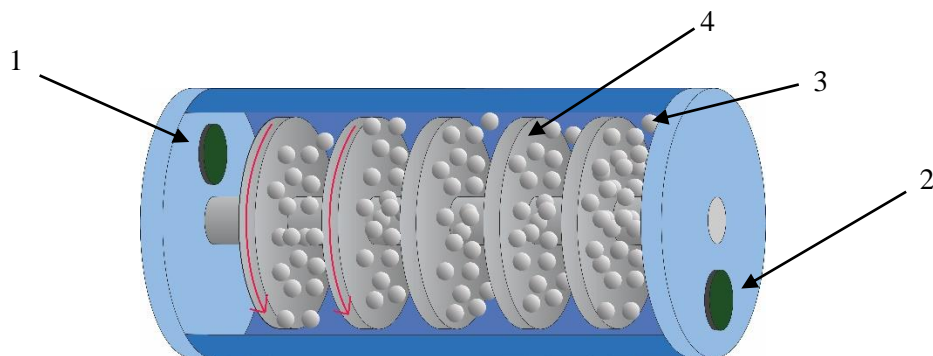
Bioflokulácia je proces, kedy biomasa mikrorias vločkuje v prítomnosti baktérii alebo iných mikroorganizmov. Dôvod prečo riasy začnú tvoriť vločky nie je presne známy (Muylaert et al. 2017; Satpati & Pal 2018).

### 1.8.5. Filtrácia

Filtrácia je jeden z neznámejších metódy oddeľovania pevných látok od kvapalných a dá sa použiť aj na zber rias. Pri tejto metóde sa bunky nijak nepoškodia a ani nie je potrebné pridávať žiadne chemické látky. Nevýhodou však je využitie len pre väčšie druhy rias (viac ako 50µm). V laboratórnych podmienkach je filtrácia veľmi účinná metóda a však pri komerčnej kultivácii je veľmi neefektívna a drahá najmä kvôli neustálemu čistenie filtračných membrán (Muylaert et al. 2017; Jerney & Spilling 2018).

### 1.9. Extrakcia lipidov

Extrakcia lipidov je predposledná, ale najzložitejšia fáza produkcie biodiesla. Poznanie jednotlivých techník a krokov extrakcie je veľmi dôležité v laboratórnych ako aj veľkovýrobných podmienkach k docieleniu čo najefektívnejšej produkcií biopalív. Oproti kultivácii rias je samotná extrakcia veľmi rýchla a trvá iba niekoľko hodín, kdežto kultivácia je meraná v rámci dní až týždňov. Od efektivity extrakcie sa odvíja objem a množstvo kultivačných zariadení a výber kultivovanej riasy. Pri nízkej efektivite je potrebné vypestovať väčšie množstvo biomasy, aby sme vykompenzovali nízky výsledný objem biodiesla.



Obr. 7: Bead-mill homogenizátor 1 – prívod biomasy; 2 – vypúšťanie biomasy; 3 – mlecie guľôčky; 4 – rotor; otáčaním rotora sa guľičky rozpohybujú a ako na seba narážajú tak melu biomasu medzi nimi (modifikované podľa [www.iqsdirectory.com](http://www.iqsdirectory.com) a Ashizawa Finetech Ltd 2019).

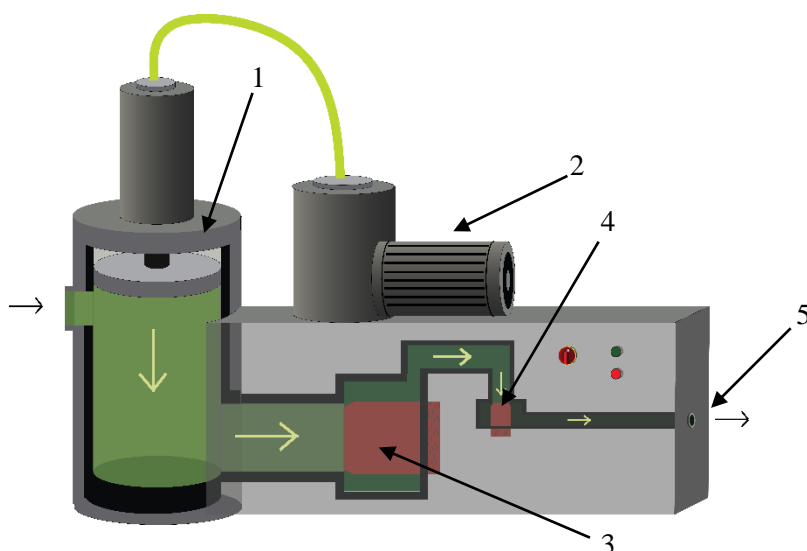


Proces extrakcie sa skladá z troch krokov: pred-úpravy biomasy (rozbitia buniek), samotnej extrakcie a post-extrakčnej purifikácií.

Aby bola extrakcia účinnejšia je potrebné biomasu pred-upraviť, medzi to patrí rozbitie alebo rozrušenie bunkovej steny a vysušenie (nemusí byť 100%). Bunková stena znižuje pravdepodobnosť kontaktu lipidov s chemickým rozpúšťadlom, ktoré je použité v procese samotnej extrakcie, ako je napríklad metanol alebo chloroform. Rozrušenie bunkovej steny môže zvýšiť účinnosť extrakcie o 50% (Halim, Danquah & Webley 2012; Concas, Pisu & Cao 2015). Rozrušenie bunkovej steny môžeme dosiahnuť mechanicky alebo chemicky.

### 1.9.1. Mechanické rozrušovanie bunkovej steny

Mechanickou formou môžeme bunkovú stenu rozrušiť pomocou lisovania, pomletia, homogenizácií vysokým tlakom, ultrasonifikáciou, autoklávovaním alebo pomocou mikrovln. Väčšina týchto techník je energeticky veľmi náročná a je efektívna len pre laboratórne a výskumné účely. A však ako veľmi výhodou mechanickou technikou pre veľko-kultivačné účely sa ukazuje byť pomletie tzv. „bead-mill“ (Obr. 7). Ide o guľôčkový mlyn, ktorý sa používa na zjemnenie materiálu (Ashizawa Finetech Ltd 2019). Táto technika veľmi efektívne rozrúša bunkovú stenu, ale nepoškodzuje lipidy, enzýmy a proteíny vo vnútri buniek (Lee et al. 2010). Ďalšou efektívnou technikou na veľkovýrobu je tlakový homogenizátor (Obr. 8), ktorý rozrúša steny lisovaním (Concas, Pisu & Cao 2015).



Obr. 8: Vysokotlakový lis na rozrúšanie buniek v biomase 1 – piest; 2 – hydraulický motor; 3 – primárny nastavovateľný lisovací zub; 4 – sekundárny zub; 5 – zlisovaná biomasa (modifikované z [www.homogenizers.net](http://www.homogenizers.net)).

### 1.9.2. Chemické rozrušovanie bunkovej steny

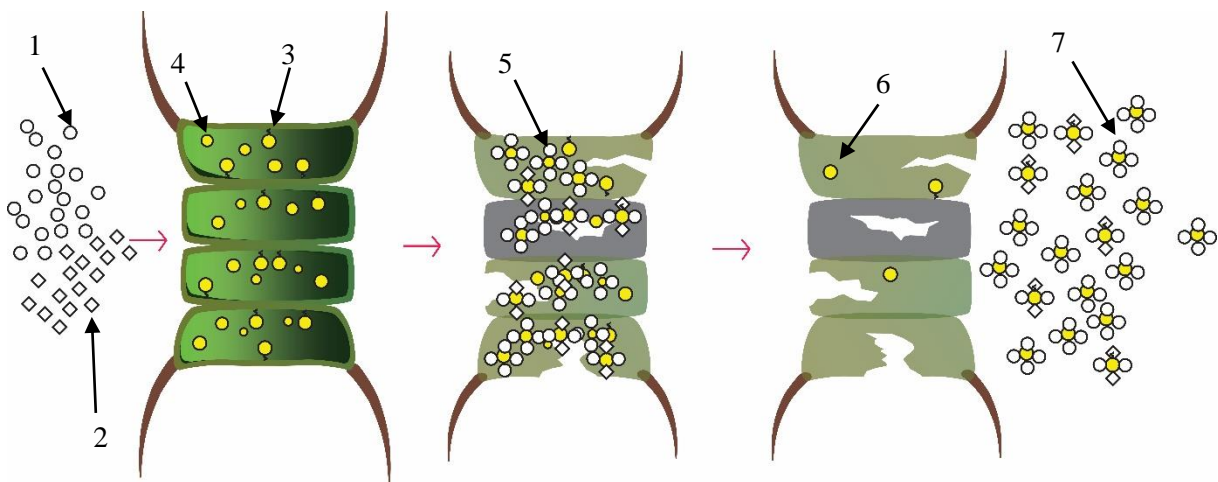
Chemické postupy rozrušovania bunkových stien nie sú také variabilné ako mechanické. Medzi chemické postupy patria miešanie biomasy s kyselinami alebo zásadami, osmotickým šokom alebo pomocou enzýmov. Vo veľkokultivácii rias sú tieto postupy kvôli vysokým cenám chemických látok, nie veľmi užívané. Ďalšou nevýhodou býva kontaminácia alebo znehodnotenie intracelulárnych látok ako sú proteíny a lipidy. Sľubnou metódou sa však ukazuje byť rozrušovanie buniek pomocou enzýmov, pretože sú na rozdiel od kyselín viac selektívne a nepoškodzujú lipidy a proteíny. Ďalšou výhodou je že ich cena postupne klesá, čo znižuje náklady na jednotku objemu vyrobených biopalív.

### 1.9.3. Vysušenie biomasy

Medzi pred-úpravu biomasy sa zaraduje aj úplné vysušenie biomasy, pretože zostatková voda môže pri niektorých metódach extrakcie prekážať a znížiť výťažnosť extrakcie. Úplné vysušenie biomasy je však veľmi nákladné a pre veľkovýrobu veľmi neefektívny postup. Na šťastie nie všetky metódy extrakcie potrebujú suchú biomasu, a preto hlavným bodom záujmu komerčných pestovateľov rias je zefektívňovať a využívať hlavne metódy využívajúcej vlhkú zahustenú biomasu.

### 1.9.4. Extrakcia

Po pred-úprave biomasy nasleduje samotná extrakcia, ktorá vykoná len chemickou cestou a nie aj fyzikálnou ako pri pred-úprave.

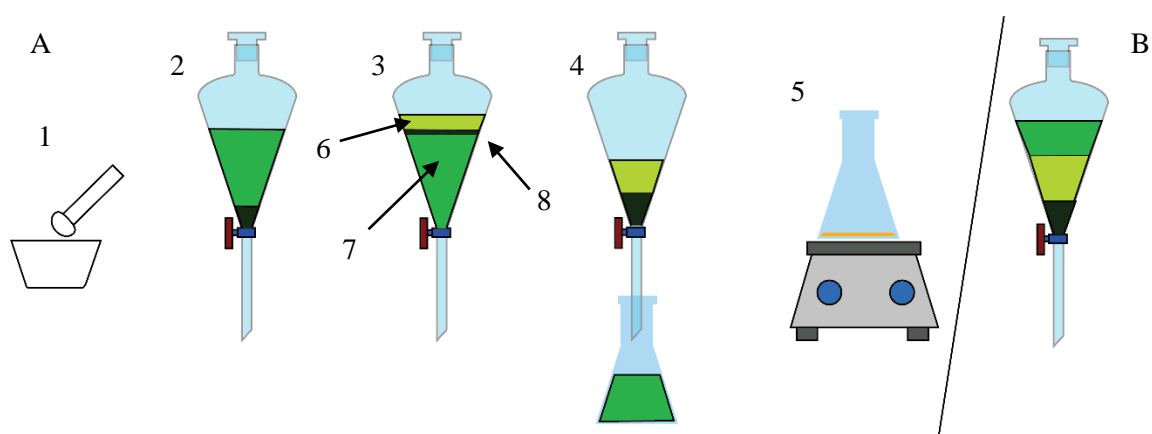


Obr. 9: Schéma extrakcia lipidov organickým rozpúšťadlom; 1 - Nepolárne rozpúšťadlo; 2 – Polárne rozpúšťadlo; 3 – polárne fosfolipidy naviazané na bunkovú stenu; 4 – neutrálne lipidy; 5 – naviazanie rozpúšťadla na lipidy; 6 – nevyextrahované lipidy; 7 – vyextrahované lipidy v rozpúšťadle.

### 1.9.4.1. Extrakcia pomocou organického rozpúšťadla

Cieľom extrakcie je previesť cieľový produkt alebo látku, čo sú v našom príklade lipidy, do kompatibilného rozpúšťadla. Neutrálne lipidy sú nepolárne látky a rozpustné len v nepolárnych rozpúšťadlách, ako je napríklad hexán alebo chloroform (Bligh & Dyer 1959; Kates 1986a; Kates 1986b; Medina et al. 1998). Neutrálne lipidy interagujú s rozpúšťadlom pomocou slabých van der Waalových väzieb a vytvoria s rozpúšťadlom komplex. Rozpúšťadlo s lipidmi dokáže difundovať aj cez bunkovú stenu, čo je veľmi výhodné, ak by pri úprave biomasy neboli dokonale rozrušené bunkové steny na všetkých bunkách. Lipidy však nemajú vždy charakteristický nepolárny charakter. Preto sa najčastejšie na extrakciu lipidov využíva zmes polárnych a nepolárnych rozpúšťadiel ako je napríklad chloroform : metanol (Folsch et al. 1951; Bligh & Dyer 1959). Nepolárny chloroform sa naviaže na lipidy pomocou van der Waalových väzieb, a však tie nedokážu odtrhnúť lipidy od proteínov. Na to je tu však polárne rozpúšťadlo ako je metanol alebo izopropanol, ktorý sa naviaže na polárne lipidy pomocou vodíkových väzieb, ktoré sú také silné že dokážu odtrhnúť lipidy od proteínov (Obr. 9).

Tým, že v danej extrakcii využívame naraz polárne a nepolárne rozpúšťadlá, ktoré sa vzájomne nemiešajú, vzniknú nám tak dve fázy (Obr. 10). Horná fáza je organická, v ktorej sa nachádza nepolárne rozpúšťadlo (chloroform alebo hexán) s lipidmi, a dolná vodná fáza obsahuje polárne rozpúšťadlo (metanol alebo izopropanol) s proteínmi a inými kontaminantami a reziduálnou vodou z biomasy. Vďaka tejto bifázickej separácii, sme oddelili pre nás dôležité lipidy od kontaminantov a zvyškovej vody (Lee et al. 2010; Halim, Danquah & Webley 2012).



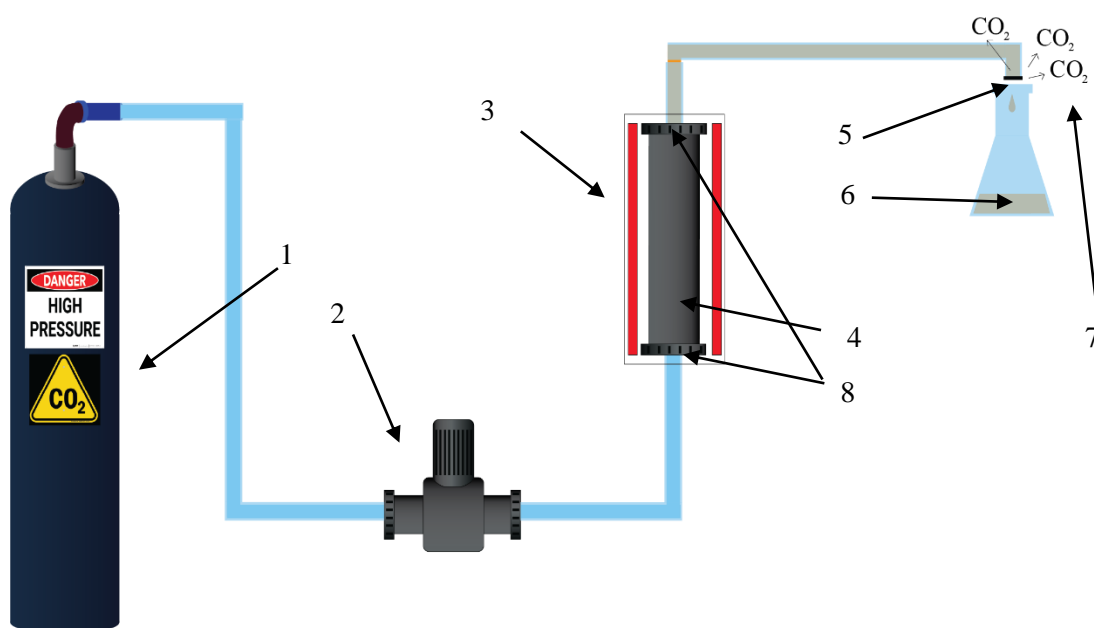
Obr. 10: Extrakcia lipidov pomocou organických rozpúšťadiel A – metóda extrakcie pomocou chloroform: metanolu; 1 – homogenizácia suchej biomasy; 2 – pridanie zmesi chloroform: metanolu 3:1 ; 3 – pridanie 0,9 % NaCl a vytvorenie bifázickej separácie; 4 – odobranie spodnej vrstvy s chloroformom a lipidmi; 5 – odparovanie chloroformu; 6 – horná vrstva s vodou a inými polárnymi látkami; 7 – dolná vrstva s chloroformom a lipidmi; 8 – odpad z bunkových stien; B – metóda extrakcie pomocou hexán: izopropanol.

### 1.9.4.2. Soxhlet extraktor

Najčastejšie používaný laboratórny separačný prístroj, ktorý využíva chemický princíp bifázickej alebo aj jednofázovej extrakcie je Soxhlet extraktor. Je to veľmi jednoduchý sklenený prístroj, ktorý neustále omýva biomasu čerstvým rozpúšťadlom, pokiaľ lipidy nie sú úplne vyextrahované. Rozpúšťadlo je neustále zahrievané, čo spôsobuje jeho odparovanie do chladiča, kde kondenzuje a steká do biomasy. Rozpúšťadlo na seba naviaže lipidy a vzniknutý komplex, ktorý preteká do zásobnej komory. Po naplnení komory sa vyleje do druhého zásobníka k čerstvému rozpúšťadlu, kde sa lipidy oddelia a rozpúšťadlo sa znovu odparuje. Celý cyklus sa niekoľko krát zopakuje. Daný typ extrakcie patrí medzi jedni z najlepších a najprecíznejších techník, a možno pomocou neho vyextrahovať veľké množstvo lipidov (Lee et al. 2010). Na druhej strane je energeticky veľmi náročný, pretože je nutné rozpúšťadlo neustále zahrievať a je využívaný zatiaľ len pre laboratórne účely.

### 1.9.4.3. Supercritical fluid extraction (SFE)

SFE je ekologická technológia extrakcie, ktorá využíva superkritickú formu  $\text{CO}_2$  a mohla by tak nahradiť organické rozpúšťadlá. Superkritická forma  $\text{CO}_2$  vzniká pri určitom tlaku a teplote (20-30 MPa a 31.1°C). Tato technológia má oproti predchádzajúcej množstvo výhod. Hlavná výhoda je tá že nie je potrebné používať toxické chemikálie ako je napríklad chloroform, a že nie je potrebná energia na oddelenie lipidov od rozpúšťadla.



Obr. 11: Aparát na  $\text{SCCO}_2$  extrakciu lipidov; 1 – fľaška s  $\text{CO}_2$ ; 2 – čerpadlo; 3- ohrievač; 4 – extrakčná nádoba; 5 – mikrometrický ventil; 6 – surové lipidy; 7 – uvoľnený  $\text{CO}_2$ ; 8 – filter; (modifikované podľa Halim, Danquah & Webley 2012)

Stlačený CO<sub>2</sub> je do špeciálne nádoby s biomasou rias, kde je pomocou špecifického tlaku a teploty premieňaný na superkritickú formu SCCO<sub>2</sub>, ktorý obklopuje biomasu (Obr. 11). Okolo biomasy sa tak vytvorí statická oblasť SCCO<sub>2</sub>, do ktorej pomaly desorbujú lipidy z biomasy. Desorbované lipidy sú naviazané na SCCO<sub>2</sub> a tvoria s ním komplex, ktorý prechádza do dynamickej oblasti, kde SCCO<sub>2</sub> prúdi. Na oboch koncoch nádoby sa nachádzajú filtre, ktoré zabraňujú prechodu zvyškov buniek a ktoré by spôsobili kontamináciu. Filtre prepúšťajú len komplex SCCO<sub>2</sub>, samotný SCCO<sub>2</sub> bez naviazaných lipidov a reziduálnu vodu. Na konci zariadenia je mikrometrický prepúšťací ventil a zberná nádoba na lipidy. Ventil znižuje tlak v koncovnej časti zariadenia, SCCO<sub>2</sub> sa mení na obyčajný plynný CO<sub>2</sub> a komplex s lipidmi sa rozpadne. Surové lipidy sa zachytávajú v zbernej nádobe. Spolu s CO<sub>2</sub> sa odparuje aj reziduálna voda. SCCO<sub>2</sub> má nepolárny charakter, čo je veľmi výhodné ak chceme extrahovať práve nepolárne lipidy. Problém však nastáva u polárnych lipidov, ale dá sa jednoducho vyriešiť pridaním metanolu alebo vody. Táto technológia umožňuje purifikáciu zmesi lipidov od zvyškových častí buniek a vody bez prídania energie, čo pri extrakcii pomocou organických rozpúšťadiel nie je možné. Táto technológia si však žiada vysoké inštalčné náklady a je potrebné dodávať väčšie množstvo energie na udržanie SCCO<sub>2</sub> formy. Ďalšou nevýhodou oproti organickým rozpúšťadlám je nižšia efektívnosť pri vysokom obsahu vody v biomase. Je preto nutné biomasu viac zakonzentrovávať. Tak isto je potrebné rozrušenie bunkovej steny, aby bola extrakcia účinná. Aj napriek uvedeným nevýhodám má SFE potenciál v komerčnej výrobe biopalív (Halim, Danquah & Webley 2012).

#### 1.9.4.4. Liquid CO<sub>2</sub> (LCO<sub>2</sub>)

LCO<sub>2</sub> je novšia a efektívnejšia technológia podobná ako SCCO<sub>2</sub>, ale pracuje pri nižšom tlaku (15MPa) a nižšej teplote (25°C) než SCCO<sub>2</sub>. Podobne ako SCCO<sub>2</sub> má LCO<sub>2</sub> tiež nepolárny charakter a je nutné pridať metanol. Používanie metanolu má dvojité využitie. Jedným je práve polárny charakter a schopnosť extrahovať polárne lipidy, a druhým že zmes lipidov nijak nekontaminuje, pretože jeho prítomnosť je potrebná v nasledujúcom kroku transesterifikácií (Fukuda, Kondo & Noda 2001). Efektívnosť LCO<sub>2</sub> extrakcie výrazne ovplyvňuje metóda rozrušenia buniek. Zlá voľba techniky môže znížiť celkovú výťažnosť extrakcie aj o 50%. Podľa výskumu Lee et al. (2010) je efektívnejšie rozrušiť bunkovú stenu pomocou mikrovln a ako polárne rozpúšťadlo použiť vodu. Pri použití metanolu ako rozpúšťadla bola výťažnosť extrakcie o 55% nižšia.

#### 1.9.4.5. Subcritical organic solvent extraction

Pre komerčnú kultiváciu rias je veľmi výhodné používať extrakciu organických rozpúšťadiel v subkritickom stave. Daná technológia má veľa podobných vlastností ako SCCO<sub>2</sub> stave, ale energetické nároky na vyvolanie subkritickéj formy sú oveľa nižšie. Chen et al. (2011) extrahovali lipidy zo zahustenej biomasy riasy *Nannochloropsis* sp. (65% obsah vody) vo forme pasty a zistili, že daný typ extrakcie je veľmi efektívny a dokáže vyextrahovať až 90% z celkových lipidov. Ako rozpúšťadlo použili hexán s etanolom v pomere 3:2. Extrakcia prebieha pri teplote 90 °C ale pri oveľa nižšom tlaku než pri predchádzajúcich technikách len 1,4 MPa. Aj napriek vyššej teplote potrebnej na priebeh extrakcie je danú techniku možno využívať aj komerčnej výrobe biopalív (Halim, Danquah & Webley 2012).

#### 1.9.5. Odstraňovanie kontaminantov a purifikácia lipidov

Po samotnej extrakcii dostaneme zmes neutrálnych, polárnych, neutrálnych lipidov neacylglycerolového charakteru (non-acylglycerol neutral lipids), odpadu z bunkových stien a látok nelipidového charakteru. V nasledujúcom kroku sa extrakt musí purifikovať, pretože na výrobu biopalív môžeme využiť iba neutrálne lipidy. Výhodou je, že lipidy sa s nelipidovými látkami nemiešajú a po odstáti extraktu ich možno jednoducho oddeliť. Pre nás je dôležitá vrchná nepolárna fáza, kde sa nachádzajú neutrálne lipidy (ak používame chloroform s metanolom, tak sú fázy opačne orientované, pozri obr. 9). Spodnú časť tvorí reziduálna voda a nelipidové látky, ako proteíny a iné uhľovodíky. Odpad z bunkových stien môžeme odfiltrovať alebo nechať sedimentovať. Rozpúšťadlo možno odstrániť pomocou destilácie alebo ho možno nechať odpariť. Pri SCCO<sub>2</sub> extrakcií dostávame čistú zmes lipidov, a preto purifikácia nie potrebná (Lee et al. 2010; Halim, Danquah & Webley 2012).

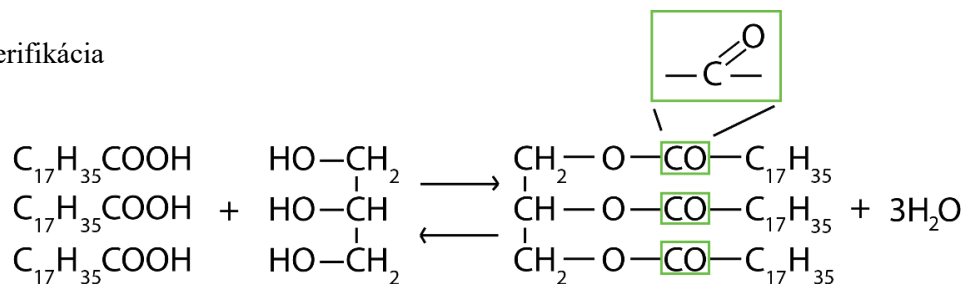
Pred transesterifikáciou je však veľmi dôležité ešte purifikovať samotnú zmes lipidov a odstrániť polárne lipidy a neacylglyceroli. Nežiaduce lipidy môžeme odstrániť pomocou kyselín alebo močoviny, ktoré zreagujú s kontaminantami za vzniku tuhých látok (Halim, Danquah & Webley 2012).

#### 1.10. Transesterifikácia

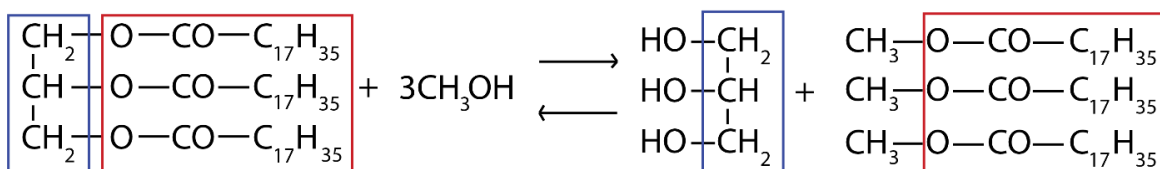
Transesterifikácia je reakcia esteru s alkoholom za vzniku iného esteru a glycerolu. Ako alkohol sa využíva najčastejšie metanol hlavne kvôli nízkej cene oproti ostatným komerčným alkoholom (Knothe 2009). Lipidy extrahované z biomasy majú hydrofóbny charakter a sú zložené z glycerolu a 3

masných kyselín (dĺžka reťazca masných kyselín závisí na type biomasy) (Fukuda, Kondo & Noda 2001; Chisty 2007; Nigam & Singh 2011). Chemickou reakciou sa masné kyseliny odtrhnú od glycerolu a reagujú s pridaným alkoholom za vzniku nového esteru masných kyselín. Výsledný produkt je metyl ester masnej kyseliny (fatty acid methyl ester, ďalej len FAME), čo možno považovať za prvú fázu biodiesla (Obr. 12) (Fukuda, Kondo & Noda 2001).

#### A.) Esterifikácia



#### B.) Transesterifikácia



Obr. 12: Schéma esterifikácie a transesterifikácie.

Na uskutočnenie reakcie je potrebné aby bol prítomný katalyzátor. Podľa typu katalyzátora sa transesterifikačné reakcie delia na katalyzované kyselinou alebo zásadou (Fukuda, Kondo & Noda 2001).

#### 1.10.1. Katalýza kyselinou

Na kyslú katalyzáciu sa využívajú kyselina chlorovodíková, sírová alebo fosforečná. Kyslá transesterifikácia je však veľmi pomalá oproti zásaditej, a preto sa vo veľkovýrobe biopalív často nepoužíva (Fukuda, Kondo & Noda 2001).

#### 1.10.2. Katalýza zásadou

Pri alkalicknej katalyzovanej transesterifikácii sa používa najčastejšie hydroxid draselný. Alkalická transesterifikácia je približne 4000 krát rýchlejšia než kyslá (Fukuda, Kondo & Noda 2001). Pri

použití zásady je však nutné dbať na to, aby zmes lipidov, ktorá vstupuje do transesterifikácie, bola dehydratovaná. Ak by monoacylglycerol zreagoval s vodou na miesto metanolu, vznikli by voľné mastné kyseliny (Free Fatty Acid, ďalej FFA). Vzniknuté FFA následne reagujú s katalyzátorom transesterifikácie KOH za vzniku mydla. Táto reakcia sa nazýva zmydelňovanie. Pre transesterifikáciu je táto reakcia veľmi nepriaznivá, pretože ireverzibilne využíva katalyzátor reakcie a môže zvyšovaním viskozity znehodnocovať finálny produkt biodiesel. Zmydelňovanie spomaľuje reakciu tým, že reaguje s katalyzátorom, preto ho je nutné pridávať do reakcie väčšie množstvo aby sa vykompenzovala jeho strata (Fukuda, Kondo & Noda 2001). Transesterifikácia trvá približne 90 minút pri teplote približne 60 °C za atmosférického tlaku (Chisti 2007). Poskočení reakcie nám vzniká zmes biodiesla, netransesterifikovaných lipidov, glycerolu, alkalického katalyzátora a metanolu. Najjednoduchšou metódou purifikácie je nechať zmes odstáť kým nevznikne bifázické rozdelenie. V hornej fáze sa nachádza biodiesel a katalyzátor, v dolnej fáze glycerol s produktami zmydelňovania. Horná fáza s biodieslom sa následne niekoľko krát omýva s vodou, aby sa odstránil alkalický katalyzátor (Fukuda, Kondo & Noda 2001; Halim, Danquah & Webley 2012).

Transesterifikáciu je možné katalyzovať aj enzymaticky. Oproti najčastejšie používanej zásaditej transesterifikácii má enzymatická katalýza množstvo výhod. Je energeticky menej náročnejšia, pretože reakcia si vyžaduje len 30-40 °C. FFA nepodliehajú zmydelňovaniu, ale dokážu konvertovať na FAME a voda tým pádom nemá na reakciu žiadny vplyv. Ďalšou výhodou je to, že výsledný produkt FAME s nemusí purifikovať vôbec, a vedľajší produkt glycerol je možné purifikovať veľmi jednoducho. Nevýhodou však je vysoká cena enzýmov, ako je napríklad lipáza, ktorá sa používa najčastejšie. Ďalšou nevýhodou je pomalší priebeh reakcie v ráde 20 až 80 hodín. Na druhej strane alkalická voda, ktorá vzniká po purifikácii FAME pri zásaditej transesterifikácii, je vedená ako odpad a jej likvidácia môže byť tiež nákladná. Preto využitie enzymatickej transesterifikácie v komerčnej výrobe biopalív by určite stálo za zváženie.

Transesterifikácia je posledný krok celého procesu výroby biopalív z biomasy rias, a to konkrétne biodiesla. Celý proces od kultivácie rias je veľmi náročný hlavne čo sa týka znalosti, energie a financií. Na druhej strane biopalivá tretej generácie (z biomasy rias) majú množstvo výhod oproti predchádzajúcim generáciám (pozri vyššie). Preto je nutné aby sa výskum alternatívnych zdrojov energie upieral hlavne na biopalivá vytvorené z rias. Výskum by sa mal zameriavať hlavne na zlepšenie efektivity, zníženie nákladov za kultiváciu rias, extrakciu lipidov z buniek a hľadanie ekologických rozpúšťadiel a katalyzátorov z obnoviteľných zdrojov, používaných pri extrakcii (Viner, Champagne & Jessop 2013). V neposlednom rade by sa mal výskum uprieť na dvojúčelové kultivácie tzv. Win-Win, kedy okrem získania biomasy, môžeme využívať riasy na očisťovanie vody od polutantov.

V mojej diplomovej práci som sa venoval biotechnologickému využitiu zelenej riasy *Scenedesmus* sp. a konkrétne výberom najefektívnejšieho kmeňa, ako zdroj lipidov na biopalivá. Hlavný stresový faktor, ktorým som riasy vystavoval bola salinita. Salinitu som vybral hlavne kvôli



jednoduchej aplikácii a nízkej cene chloridu sodného pre laboratórne účely. Moja práca sa skladá s niekoľkých častí. Prvej a časovo najnáročnejšej časti som sa venoval testovaniu 22 rôznych kmeňov riasy *Scenedesmus*. Cieľom bolo zistiť či je medzi jednotlivými kmeni rozdiel v rýchlosti rastu a množstvu lipidov v bunkách. V ďalšej časti mojej práce som kultivoval riasy vo výstupnej vode z čističky odpadových vôd s cieľom testovať efektivitu dvojúčelovej kultivácie tzv.: Win – Win (pozri vyššie). V tretej finálnej časti som sa vybral jeden kmeň *S. obliquus*, ktorý som podrobil dôkladnejším testom s cieľom experimentálne zvýšiť produkciu a obsah lipidov. V rámci mojej diplomovej práce som experimenty vykonával väčšinou na Katedre Botaniky na Univerzite Palackého v Olomouci a finálne experimenty som uskutočnil na Oceánografickom inštitúte v Gdynii na Univerzite v Gdansku.

# METODIKA PRÁCE

## 2.1. Zásobné kultúry

Na experimenty som používal vyizolované kmene riasy rodu *Scenedesmus*, ktoré som vyizoloval v rámci mojej bakalárskej práce. Dohromady som testoval 22 kmeňov riasy rodu *Scenedesmus*. Zásobné riasové kmene som kultivoval v médiu BBM (Bold's Basal Medium) v 100 ml Erlemayerových bankách a uložené vo fytotrone na katedre botaniky Univerzity Palackého. Následne zo zásobných kmeňov som odoberal biomasu na jednotlivé experimenty.

## 2.2. Nastavenia experimentov

### 2.2.1. Testovanie všetkých vyizolovaných kmeňov

Na experiment s rastúcim gradientom salinity som použil rôznych 5 koncentrácií salinity. Ako živné médium som použil médium BBM, v ktorom sa nachádza 0,4 mM/l NaCl. Koncentračná rada pozostávala z 2 (0,08 mM/l), 5 (0,2 mM/l), 10 (0,4 mM/l) a 30 (1,2 mM/l) násobkom NaCl. Ako kontrolu som použil nepozmenene médium BBM s koncentráciou 0,4 mM/l NaCl.

Riasy som kultivoval v 100 ml Erlemayerových bankách a v každej banke bolo 75 ml média s pokusným kmeňom. Banky boli počas celého experimentu uložené vo fytotrone (teplota = 22 °C, svetelný režim = 16h/8h svetlo/tma, intenzita svetelného žiarenia = 20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

Počas vyhodnocovaní dát som z každej banky odobral 2 ml biomasy rias a vložil do 2ml plastových skúmaviek EPPENDORF®. Banky som pred odobraním biomasy premiešal, aby bola biomasa homogénne rozložená v médiu. Súčasťou vyhodnocovania dát bola spektrofotometrická analýza optickej denzity pri vlnovej dĺžke 750 nm a 664 nm. Ďalej som vyhodnocoval denzitu buniek pomocou Burker komôrky. Dáta som vyhodnotil pred štartom a následne raz za týždeň počas celého experimentu, ktorý trval 35 dní. Po skončení experimentu som vyhodnocoval koncentráciu lipidov v jednotlivých kmeňoch.

### 2.2.2. Kultivácia rias vo vode z ČOV

Počas tohto experimentu som kultivoval riasy vo výstupnej vode z ČOV Nové Sady v Olomouci, odobranej 2.11.2021. Riasy som kultivoval v dvoch typoch média, v sterilizovanej nepozmenenej vode z ČOV bez NaCl a s pridaním 20 mM/l. Experiment pozostával z rovnakých krokov ako pri predchádzajúcom experimente so salinitou. Z laboratória z ČOV som dostal analýzu koncentrácie anorganických látok, ako N, P, C. Pred začatím experimentu a po skončení experimentu som z média

odstránil biomasu a čisté médium som zanesol do laboratória ČOV na opätovnú analýzu. Na konci experimentu som analyzoval množstvo vyprodukovaných lipidov.

### **2.2.3. Experimenty s cieľom zvýšiť produktivitu lipidov**

Experimenty som vykonával na fakulte Oceánografie a Geografie na Univerzite v Gdansku. Na rozdiel od ostatných experimentov som ako živné médium používal BG-11. Pri experimente som vytvoril 5 stupňový koncentračný gradient (kontrola 0 mM/l, 85,5 mM/l, 171 mM/l, 256,5 mM/l a 342 mmol/l NaCl) so 4 opakovaniami. Riasy som kultivoval v 150ml erlenmeyerových bankách, do ktorých som pridal 75 ml živného média BG-11. Experiment som vykonával v dvoch rôznych režimoch kultivácie, a to jednostupňovom a dvojstupňovom. Pri jednostupňovom režime som NaCl pridal do baniek na začiatku experimentu a pri dvojstupňovom až na 14 deň experimentu. Celková doba kultivácie pri oboch režimoch bola 18 dní. Do každej banky som pridal  $8 \times 10^6$  buniek kmeňa zelenej riasy *Scenedesmus obliquus* KN05 (dohromady 40 baniek = 2 režimy  $\times$  5 stupňový gradient  $\times$  4 opakovania). Každý druhý deň experimentu som vyhodnocoval absorbanciu biomasy pri 664 a 750 nm a denzitu buniek v ml. Hmotnosť lipidov som analyzoval pred začatím experimentu na 14 deň a po skončení experimentu a pri oboch režimoch rovnako. Po skončení experimentu som ďalej vyhodnocoval hodnoty stresu buniek pomocou fluorescencie chlorofylu (Fv/Fm). Ďalej som po skončení experimentu sledoval aj schopnosť biologickej desalinizácie živného média.

### **2.2.4. Kultivovanie rias v semikontinuálnom režime vo fotobioreaktoroch**

Na konštrukciu fotobioreaktorov som použil dve 10l akvária. Prevádzkový objem živného média som však zvolil iba 8l, aby sa pri aerácii médium nedotýkalo vrchného krytu, nekontaminovalo sa a nevytekalo von z reaktora. Na výrobu krytu reaktora ako aj na rozdeľovacie steny som použil duté polykarbonátové dosky. Ventilačný systém bol vytvorený z 5 1ml plastových špičiek z automatických pipet. Manipulačný otvor som vytvoril z vrchnáku od PET fľaše a tesnenia na kryt, otvor a steny som vyrobil z odpadových duší z bicyklov. Aeračný systém bol tvorený z akvaristických gumených hadičiek. Spočiatku boli reaktory arované len obyčajným vzduchom a CO<sub>2</sub> som dodával zvlášť v 100% nezriedenom stave 2 krát denne podľa potreby, dokým pH nekleslo na hodnotu 6,5. Po čase som vytvoril automatický systém dodávania CO<sub>2</sub>, ktorý bol napojený na aeračný systém. Vzduchová pumpa mala výkon 50l za minútu, a zásobnú vysokotlakovú nádobu s CO<sub>2</sub> som uvoľnil na rýchlosť prúdu 2l za minútu. Tým som dosiahol zriedenie CO<sub>2</sub> približne na 4%. Presnú intenzitu zriedenia som však ešte upravoval podľa potreby reaktorov, aby sa pH udržala približne na rovnakej hladine.

Riasy v fotobioreaktoroch som kultivoval v semikontinuálnom režime a každých 7 dni som odobral 4l média s biomasou, čo je polovica objemu média v reaktore, a prilial som čerstvé médiu. Ako živné médium som používal vysterilizovanú vodu s jazera Morské Oko v meste Sopot a médium BG-11 v pomere 1:1. Pomer, ako aj obsah nutričov, som však postupom času ešte upravoval, aby som dosiahol čo najväčšiu produkciu biomasy (pozri výsledky 4. časť).

## **2.3. Analýzy:**

### **2.3.1. Analýza lipidov**

Analýzu lipidov som robil podľa metodiky v článku Park et al. (2016). Na analýzu som odobral 9 ml média z biomasou do sklenených centrifugačných skúmaviek. Následne som biomasu centrifugoval na 2500 otáčiek za minútu na 15 minút a supernatant odstránil. Odstrednú biomasu som zmrazil tekutým dusíkom. Následne zmrazenú biomasu som nechal 5 až 10 minút odstáť. Do skúmavky s biomasou som následne pridal 2 ml chloroform-metanolu (2:1) a 1,5 ml NaCl. Zmes som približne 1 minútu miešal pokým sa biomasa zhomogenizovala. Zmes som centrifugoval pri 3500 otáčkach na 15s. Supernatant (zmes metanolu a NaCl) som opatrne odstránil a zvyšnú zmes (chloroform s biomasou) som premiestnil do 4ml vialiek a následne zahrieval na približne 90 °C na 15 až 20 minút, pokým sa chloroform úplne neodparil. Po odparení som do vialiek pridal 0,1 ml kyseliny sirovej a znovu zahrieval na 90 °C na 10 až 15 minút, pokým sa zmes nezafarbila do tmavohnedej farby. Po sfarbení som vialky nechal chladiť 5 minút v lade a následne pridal do vialiek 2,4 ml fosfovanilínu a zamiešal. Zmes sa následne sfarbila do ružova. Sýtosť sfarbenia závisela priamo úmerne na koncentrácii lipidov vo vialke. Zmes som následne analyzoval pomocou spektrofotometra pri vlnovej dĺžke 530 nm. Zo získaných hodnôt zo spektrofotometra som následne pomocou kalibračnej rovnice vypočítal reálnu hmotnosť vyprodukovaných lipidov.

### **2.3.2. Kalibračná krivka**

Kalibračnú krivku som vytvoril pomocou kuchynského oleja. Olej som rozpustil v chloroforme ,aby som dosiahol koncentráciu 1 mg repkového oleja v 1 ml chloroformu. Takže do 100 ml chloroformu som pridal 0,1 g repkového oleja. Následne som vytvoril koncentračnú radu zloženú z 8 vialiek, do ktorých som vložil od 1 µg po 60 µg (1 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg) zmesi oleja s chloroformom(obr. 13, príloha 2 a 3).

Dennú produktivitu lipidov počas experimentu som vypočítal pomocou vzorca:

$$\frac{m(l)2 - m(l)1}{t}$$

$m(l)1$  je hmotnosť suchej biomasy pred začiatkom experimentu,  $m(l)2$  je hmotnosť suchej biomasy po skončení experimentu,  $t$  je počas dní experimentu.



Obr. 13: Kalibračná zriaďovacia rada.

### 2.3.3. Produktivita biomasy

Hmotnosť biomasy som vyhodnocoval prepočtom z absorbancie pomocou kalibračnej krivky (príloha 1). Na filtračný papier som pomocou podtlakovej pumpy prefiltraval 20 ml média s biomasou. Filtračný papier som vysušil a hmotnosť čistého papierika som odpočítal od aktuálnej hmotnosti papierika so suchou biomasou. Následne som vytvoril koncentračný gradient s objemom 20 ml, kde som médium s biomasou zriedil na 20, 40, 60, 80 a 100%. Zmeral som hodnoty absorbancie pri dĺžke 664 a 750 nm, každého stupňa gradientu. Pri nezriedenom médiu 100% som poznal hmotnosť aj absorbanciu. Hmotnosť zriedených médií som dopočítal podľa stupňa zriedenia.

Dennú produktivitu biomasy počas experimentu som vypočítal pomocou vzorca:

$$\frac{m(B)2 - m(B)1}{t}$$

$m(B)1$  je hmotnosť suchej biomasy pred začiatkom experimentu,  $m(B)2$  je hmotnosť suchej biomasy po skončení experimentu,  $t$  je počas dní experimentu.

### 2.3.4. Denzita buniek

Denzitu buniek som vypočítal pomocou mriežky Burker Meopta® a následne získaný počet buniek som prepočítal na ml pomocou vzorca:

$$\frac{p(b) * 250000}{p(p)}$$

$p(b)$  je počet spočítaných buniek pomocou mriežky Burker,  $p(p)$  je počet spočítaných políčok na mriežke Burker.

### 2.3.5. Fluorescencia Fv/Fm

Meranie fluorescencie som uskutočnil v posledný deň experimentu pomocou analyzátoru PHYTO – PAM®. Pri každej vzorke som fluorescenciu meral 3 minúty za tmy a následne 3 minúty za svetla ( $170 \mu\text{mol/s/m}^2$ ). Každú vzorku som pred analýzou umiestnil na tmavé miesto po dobu 10 minút. Celkový objem kvety v detektore bol 5 ml a umiestnil som do neho 3 ml nezriedenej vzorky. Súčasťou krytu detektoru je malé plastové miešadlo, ktoré udržuje vzorku homogenizovanú a zabraňuje sedimentácii rias.

### 2.3.6. Biologická desalinizácia

Zmenu koncentrácie soli v médiu som meral pomocou zmeny konduktivity ( $\text{mS/m}^2$ ). Na meranie konduktivity som použil konduktometer značky InoLab®. Konduktivitu v bankách som meral začatím experimentu a pred vložením inokula do baniek a po skončení experimentu. Pri dvojstupňovom režime som konduktivitu meral až na 14 deň po pridaní NaCl. Po skončení experimentu som konduktivitu meral až po centrifugácii, od filtrovaní živného média a odstránení tak biomasy z média. Konduktivitu s prítomnosťou biomasy som meral iba v dvojstupňovom režime v 14 deň experimentu.

Percento desalinizácie som vypočítal pomocou vzorca:

$$\frac{1 - DS2}{DS1} * 100$$

$DS2$  je salinita po skončení experiment,  $DS1$  je salinita pred začatím experimentu.

## 2.4. Vyhodnocovanie dát

Na spracovanie dát do tabuliek som používal program Microsoft Excel. Následne na štatistické operácie som používal program R-studio, kde som dáta analyzoval pomocou štatistickej metódy jednocestného testu ANOVA a Tukeyho testu pri hladine významnosti  $\alpha_{0,05}$ .

## **2.5. Tvorba biodiesla**

### **2.5.1. Sušenie biomasy a rozrúšanie bunkových stien**

Počas sušenia som biomasu varil v mikrovlnnej rúre aby sa bunky rozrušili pomocou mikrovln. Mikrovlnnú rúru som nastavil na 160 až 350 W a čakal kým sa biomasa nezačne variť. Následne som biomasu miešal a nechal pomaly ochladzovať. Tento postup som opakoval 3 až 4 krát. Potom som biomasu úplne vysušil v laboratórnej sušičke na 120 °C po dobu približne 6 až 9 hodín, kým biomasa úplne suchá (Obr.36).

### **2.5.2. Extrakcia**

Na extrakciu lipidov využiteľných pre biodiesel som použil dve rôzne metódy. Prvá metóda bola podľa autorov Folch et al. (1951), ktorí na extrakciu využívajú zmes chloroformu a metanolu v pomere 2:1 a pomer zmesi a vzorky 1:20. Celková zmes organických rozpúšťadiel mala 300 ml z toho 100 ml metanolu a 200 ml chloroformu.

Suchú biomasu umiestnil so separačného lievika, zalial s 100 ml metanolu a nechal stáť približne 15 hodín, aby metanol dobre rozrušil bunkové steny (Obr. 37, 38). Následne som do zmesi prilial 200 ml chloroformu a nechal extrahovať približne 24 hodín. Po skončení extrakcie som do zmesi pridal 50 ml 0,9% roztoku NaCl aby sa zmes bifázicky rozdelila. Spodnú nepolárnu časť s lipidmi a chloroformom som prefiltraval cez sklený filter. Následne som chloroform nechal odparovať pri teplote 60 °C a pri neustálom miešaní. Posledných 20 ml zmesi prelial do malej 50ml kadičky a nechal ešte odparovať na variči. Kadičku so suchými lipidmi som následne zvážil a váhu odčítal od váhy prázdnej kadičky.

### **2.5.3. Transesterifikácia**

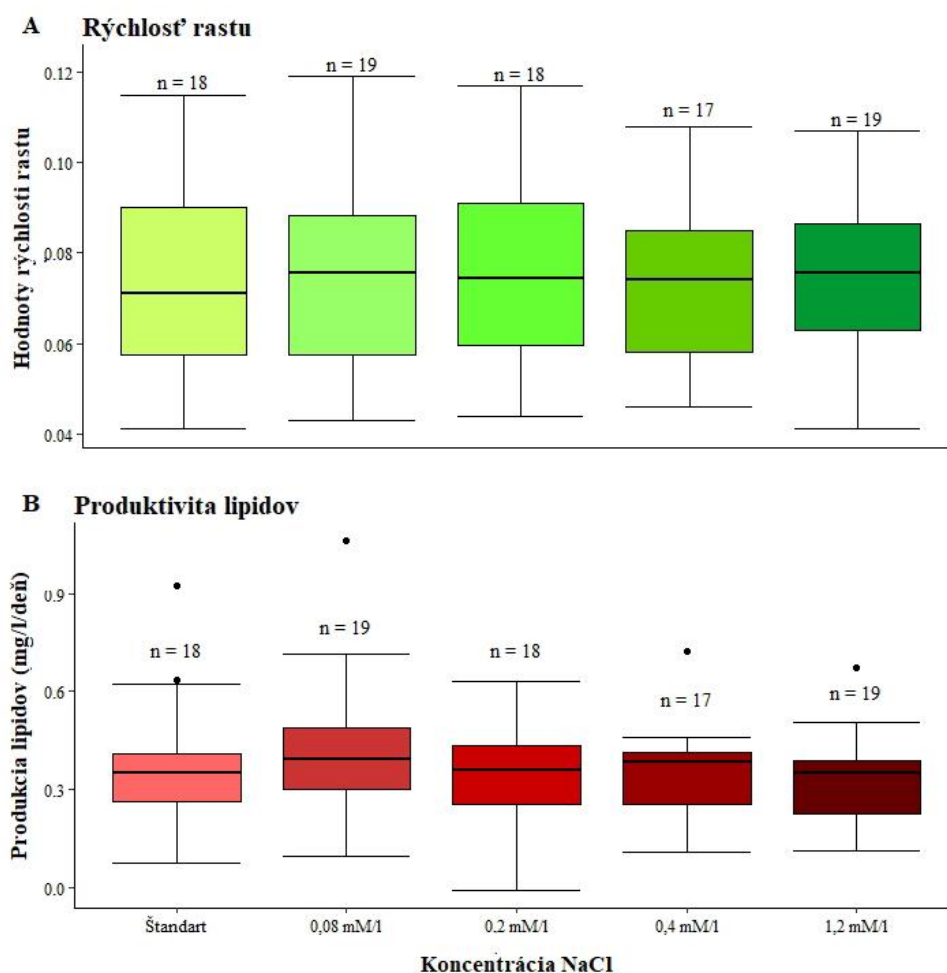
Množstvo vyextrahovaných surových lipidov bolo veľmi malé množstvo a pre lepšiu efektivitu transesterifikácií som lipidy premiešal ešte s 20 ml prepáleného kuchynského oleja a vytvoril som tak zmes 1:5. Zmes olejov som následne umiestnil do varnej banky. Zmes som nechal zahriať na 60°C a po zahriatí a ustálení teploty som do zmesi pridal metanol s NaOH. Množstvo metanolu som prispôbil, tak aby bol na 1 mól triacylglycerolu bolo 6 mólov metanolu (Fukuda, Kondo & Noda 2001; Chisty 2007). K 24,08 ml zmesi olejov som pridal 5 ml metanol. Ako katalyzátor som použil 180 mg NaOH (Chisti 2007), ktorí som nechal rozpustiť v metanole. Po pridaní zmesi metanolu a NaOH, som zmes nechal 2 hodiny reagovať pri teplote 60 °C za neustáleho miešania. Po skončení reakcie som zmes biodiesla a glycerolu centrifugoval, aby som rýchlejšie oddelil glycerol od biodiesla.

# VÝSLEDKY

## 3.1. Testovanie produkcie biomasy a lipidov vyizolovaných kmeňov

V prvej časti mojej diplomovej práce som sa venoval kultivácií všetkých vyizolovaných kmeňov riasy *Scenedesmus*. Pôvodným cieľom tejto práce bolo zistenie, či rôzna salinita ovplyvňuje výslednú efektivitu produkcie lipidov riasy *Scenedesmus* a či je medzi jednotlivými kmeňmi rozdiel. Výsledky jednotlivých pokusov boli však veľmi nejednoznačné a nebol vidieť nijaký spoločný trend, ktorý by ukazoval aká koncentrácia NaCl je najefektívnejšia. Medián väčšiny sledovaných hodnôt sa pohyboval približne na rovnakej úrovni, čo jednoznačne poukazuje na to, že použitá koncentrácia NaCl nemá žiadny vplyv na efektivitu kultivácie. (Obr. 14).

Variabilita špecifickej rýchlosti rastu bola pri všetkých koncentráciách takmer úplne totožná a nebol zaznamenaný žiadny signifikantných rozdiel (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,987$ ).

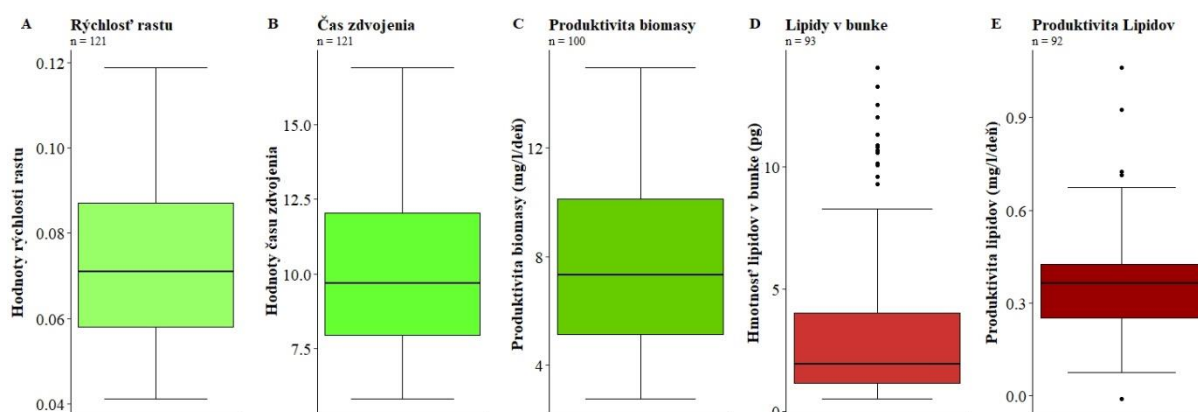


Obr. 14: Vplyv NaCl na rast biomasy a produkciu lipidov všetkých vyizolovaných kmeňov; čiara v boxplote znázorňuje medián, hodnoty nad boxplotmi znázorňujú počet získaných dát v jednotlivých gradientoch, bodky znázorňujú extrémne hodnoty mimo násobku kvartilového rozpätia.



Použitá koncentrácia NaCl nijak výrazne neovplyvnila ani množstvo lipidov v bunkách (Obr. 14B) (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,906$ ), ale oproti špecifickej rýchlosti rastu majú riasy kultivované so zvýšenou salinitou median hodnot mierne vyššie než kontrola.

Počas testovania kmeňov som však zaznamenal veľkú variabilitu medzi kmeňmi rodu *Scenedesmus*. Kmene sa odlišovali vo všetkých parametroch ako je rast biomasy alebo obsah a produkcia lipidov (Obr. 15A-E).

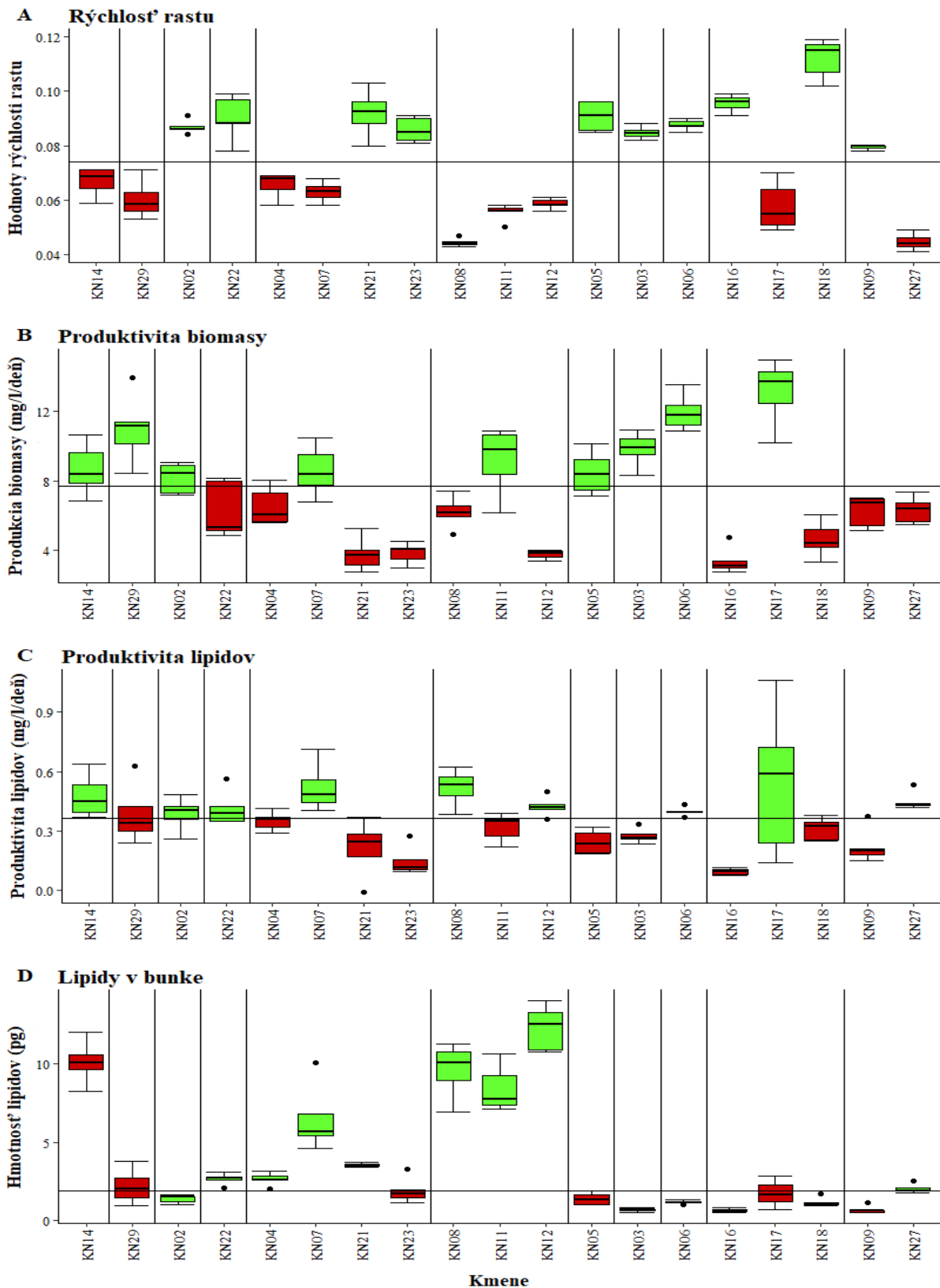


Obr. 15: Prehľad celkovej produkcie a efektivity riasy *Scenedesmus* sp.; písmená A až E znázorňujú jednotlivé parametre, viac informácií pozri nižšie.

**Špecifická rýchlosť rastu** za dobu 30 až 35 dní dosahovala hodnôt od 0,04 po 0,12 a priemernej hodnoty 0,073 (Obr. 15A). Variabilita rýchlosti rastu bola rovnomerne rozložená a nezaznamenal som nijaké výrazne nízke alebo vysoké hodnoty. 10 kmeňov dosahovalo nadpriemerných hodnôt a 9 kmeňov dosahovalo podpriemerných hodnôt. Najvyššiu rýchlosť rastu 0,115 som zaznamenal pri kmeni *S. spinosus* KN18, a najnižšiu rýchlosť pri kmeni *S. maximus* KN08, a to 0,042 (Obr. 15A).

**Čas zdvojenia** je relatívny čas potrebný na zdvojnásobenie populácie a jeho výpočet vychádza s rýchlosti rasti. Tým pádom sú výsledky takmer totožné s rýchlosťou rastu s tým rozdielom, že sú hodnoty obrátené. Priemerná hodnota času zdvojenia bola približne 9,44. Najrýchlejšie rastúci kmeň KN18 dosahoval hodnotu približne 6,2 a najpomalšie rastúci kmeň dosahoval KN08 dosahoval hodnoty 15,6 (Obr. 15B).

**Produktivita biomasy** dosahovala v priemere 7,67 mg/l/deň. Variabilita produkcie biomasy je podobná ako pri predchádzajúcich parametroch (Obr. 15C), ale v tomto prípade počítame aj s množstvom vyprodukovanej biomasy a nie len s rýchlosťou jej produkcie. To znamená, že kmeň ktorý má vysokú rýchlosť rastu, nemusí dosahovať aj vysokú produkciu biomasy. Najvyššiu



Obr. 16: Prehľad produkcie biomasy a lipidov všetkých kmeňov; horizontálne čiary v grafoch znázorňujú celkový priemer, čiary v boxoch znázorňujú medián jednotlivých kmeňov, bodky znázorňujú extrémne hodnoty jednotlivých kmeňov, zelené boxploty znázorňujú skupinu hodnôt vyskytujúce sa nad priemerom, červené boxploty znázorňujú hodnoty vyskytujúce sa pod priemerom; v prípade, že boxplot pretína priemer rozhodovalo umiestnenie mediánu; vertikálne čiary rozdeľujú jednotlivé druhy rias pozri tab. 1 alebo 2.

produktivitu biomasy dosahoval kmeň *S. spinosus* KN17, a to 14,96 mg/l/deň. Najnižšiu priemernú hodnotu produktivity biomasy som zaznamenal pri kmeňoch *S. maximus* KN12 a *S. spinosus* KN16, a to 3,5 mg/l/deň a najnižšiu celkovú hodnotu 2,75 mg/l/deň dosahoval kmeň KN16 (Obr. 16C).

**Produktivita lipidov** dosahovala priemernej hodnoty 0,36 mg/l/deň (Obr. 15E). Variabilita produkcie lipidov bola nižšia ako pri ostatných parametroch, všetky získané hodnoty sa vyskytovali blízko priemeru. A však veľmi vysokú variabilitu v rámci jedného kmeňa som zaznamenal pri kmeňa *S. spinosus* KN17 (Obr. 16C). Tento kmeň som na rozdiel od ostatných kmeňov testoval dvakrát. Druhé testovanie nebolo zámerné, ale daný druh som omylom zamenil za iný kmeň *S. spinosus*. Pri druhom testovaní kmeňa KN17 som použil dvakrát koncentrovanejšie inokulum, pretože v prvom testovaní som v zásobnej kultúre nemal dostatok biomasy. Pri druhom testovaní s väčším inokulum som však zaznamenal o 50% vyšší obsah lipidov v bunkách. Rýchlosť rastu a produkcie biomasy sa medzi jednotlivými testami kmeňa KN17 výrazne nelíšili (Obr. 16A,B).

Nižšiu priemernú produkciu biomasy 0,1 mg/l/deň som zaznamenal pri kmeni KN16.

**Hmotnosť lipidov v bunkách** rozdeľovali testované kmene na dve skupiny (Obr. 15D). Hmotnosť lipidov v bunkách väčšiny kmeňov bola približne rovnaká a pohybovala sa okolo 3,5 pg a nepresahovala viac ako 4 pg. A však u piatich kmeňov bola hmotnosť lipidov v bunkách výrazne vyššia a pohybovala od 5 až do 12 pg. Kmene, ktoré dosahovali vyššie hodnoty boli *S. intermedius* KN07, *S. maximus* KN08, KN11, KN12 a *S. acutus* KN14 (Obr. 16D). Tieto kmene majú v porovnaní s ostatnými väčšie bunky, a to pravdepodobne spôsobilo výraznú odchýlku od celkového priemeru. Produktivita lipidov kmeňov s väčšími bunkami nie je už tak výrazná, ale až na kmeň KN11 dosahujú aj tak všetky nadpriemerných hodnôt (Obr. 16C). To znamená, že veľkosť buniek resp. vyššia hmotnosť lipidov na bunku dokážu vykompenzovať nižšiu rýchlosť rastu a dané kmene sú stále efektívne na produkciu lipidov.

Najvyššiu hmotnosť lipidov v bunke som zaznamenal pri kmeni *S. maximus* KN12, a to 13,3 pg a v priemere 12,5 pg. Najnižšiu hmotnosť lipidov mali kmene *S. raciborskii* KN03, *S. subspicatus* KN09 a *S. spinosus* KN16, a to približne 0,5 pg.

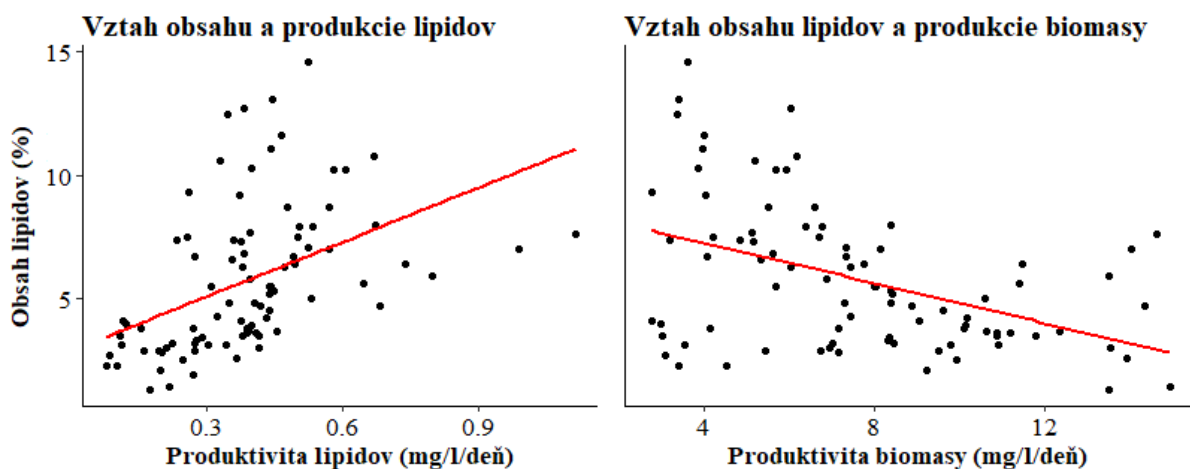
### **Vzťah medzi obsahom lipidov a dennou produkciou**

Pri nízkych koncentráciách NaCl od 0,04 do 1,2 mM/l, kedy salinita nijak neovplyvňovala obsah lipidov je medzi obsahom a produkciou lipidov pozitívny vzťah (Obr. 17 vľavo). Pri vyšších koncentráciách by NaCl zvýšil obsah lipidov, ale to by negatívne ovplyvnilo produkciu biomasy, čo

by malo za následok zníženie denne produktivity lipidov. Na takto vyzerajúcom grafe by sme sledovali pravdepodobne negatívny vzťah medzi obsahom a produktivitou lipidov.

Na druhej strane vzťah obsahu lipidov a produkciou biomasy je negatívny (Obr. 17 vpravo).

Bunky s vysokým obsahom lipidov približne nad 8%, ako napríklad druh *S. maximus*, majú nižšiu produkciu biomasy, čo ma za následok menšiu dennú produktivitu lipidov oproti bunkám s menším obsahom lipidov (Obr. 17 vľavo). Podľa tohto grafu môžeme vidieť, že najefektívnejšie druhy s vyššou dennou produkciou lipidov sú prekvapivo kmene s nízkym obsahom lipidov. Druhy s nízkym obsahom lipidov môžu svojou vysokou produkciou biomasy vyprodukovať za deň viac lipidov, než druhy s vysokým obsahom lipidov, ktoré rastu veľmi pomaly.



Obr. 17: Vzťah medzi obsahom lipidov a dennou produkciou lipidov a biomasy; červená čiara predstavuje trendovú spojnicu.

## Hodnotenie kmeňov

Zo všetkých testovaných kmeňov boli najefektívnejšie dva kmene, a to *Scenedesmus acutus* KN14 a *Scenedesmus intermedius* KN07. Obidva kmene vykazovali nadpriemernú produktivitu biomasy a lipidov. Obidva kmene patrili skupiny kmeňov, ktoré majú omnoho väčšie bunky, a tým pádom aj väčšie množstvo lipidov. Pomerne vysoký obsah lipidov som zaznamenal aj u kmeňov *S. maximus* KN08, KN11 a KN12. Vysoký obsah lipidov daných kmeňov dokázal vykompenzovať nízku produkciu biomasy natoľko, že denná produkcia lipidov dosahovala priemerných alebo mierne nadpriemerných hodnôt. Naopak kmene *S. subspicatus* KN09 a KN23 hodnotím ako veľmi neefektívny zdroj lipidov, pretože dosahovali v produkcií biomasy aj obsahu lipidov veľmi nízke hodnôt.

Tab. 2: Hodnotenie testovaných kmeňov (\*hodnota vyššia než priemer; \*\* hodnota vyššia než 3 kvartil; ? nejednoznačné dáta, zvýraznené názvy kmeňov znázorňujú 2 najefektívnejšie kmene a kmeň KN05, ktorý bol použitý v nasledujúcich experimentoch)

Kmeň	Rýchlosť rastu	Produktivita biomasy	Produktivita lipidov	Lipidy v bunke	Celkový počet bodov
<i>S.dimorphus</i> KN02	*	*	*		***
<i>S.raciborskii</i> KN03	*	**			***
<i>S.intermedius</i> KN04				*	*
<b><i>S.obliquus</i> KN05</b>	**	*			***
<i>S.serratus</i> KN06	*	**	*		****
<b><i>S.intermedius</i> KN07</b>		*	**	**	*****
<i>S.maximus</i> KN08			**	**	****
<i>S.subspicatus</i> KN09	*				*
<i>S.maximus</i> KN11	*	*		**	****
<i>S.maximus</i> KN12			*	**	***
<b><i>S.acutus</i> KN14</b>		*	**	**	*****
<i>S. spinosus</i> KN16	**				**
<i>S. spinosus</i> KN17		**	**	?	****?
<i>S. spinosus</i> KN18	**				**
<i>S. intermedius</i> KN21	**			*	***
<i>S.ellipsoideus</i> KN22	**		*	*	****
<i>S. intermedius</i> KN23	*				*
<i>S.subspicatus</i> KN27			*		*
<i>S.brasilliensis</i> KN29		**		*	***

Tab. 3: Súhrn všetkých testovaných parametrov kmeňov zelenej riasy *Scenedesmus* sp. (zvyraznené hodnoty sú najvyššie dosiahnuté v danej kategórii; KN05\* vybraný kmeň na experimentálne zvýšenie produkcie lipidov pomocou salinity; KN17\* druhé testovanie daného kmeňa, kde som zaznamenal vysoký obsah lipidov oproti predchádzajúcemu testovaniu)

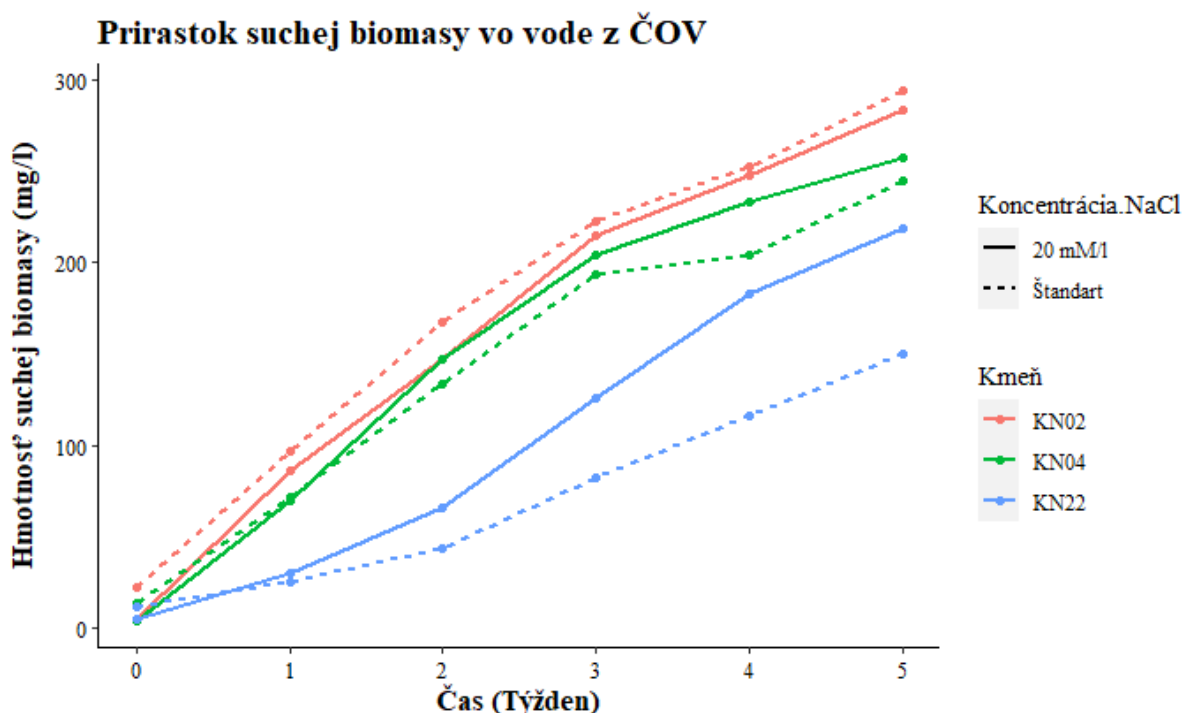
Kmeň	Špecifická rýchlosť rastu	Čas zdvojenia	Množstvo lipidov na bunku (pg)	Produktivita biomasy (mg/l/deň)	Produktivita lipidov (mg/l/deň)	Obsah lipidov (%)
S.acutusKN14	0,067 ±0,0043	10,467 ±0,71	10,1172 ±1,32	8,7 ±1,32	0,5 ±0,10	5,8 ±1,33
S.brasiliensisKN29	0,060 ±0,0063	11,701 ±1,13	2,6036 ±1,25	11,0 ±1,79	0,4 ±0,15	3,8 ±1,13
S.dimorphusKN02	0,087 ±0,0024	7,994 ±0,22	1,3919 ±0,22	8,2 ±0,79	0,4 ±0,07	4,9 ±1,02
S.ellipsoideusKN22	0,090 ±0,0075	7,766 ±0,67	2,6585 ±0,33	6,3 ±1,47	0,4 ±0,08	6,8 ±0,77
S.intermediusKN04	0,066 ±0,0045	10,629 ±0,78	2,6357 ±0,37	6,5 ±0,97	0,4 ±0,04	5,8 ±0,72
S.intermediusKN07	0,064 ±0,0042	10,821 ±0,72	5,4727 ±2,82	8,6 ±1,30	0,5 ±0,12	6,5 ±1,03
S. intermediusKN21	0,095 ±0,0093	7,379 ±0,76	3,5507 ±0,14	3,8 ±0,85	0,2 ±0,14	8,6 ±0,91
S. intermediusKN23	0,086 ±0,0039	8,088 ±0,37	1,9154 ±0,73	3,8 ±0,53	0,1 ±0,06	4,0 ±1,49
S.maximusKN08	0,044 ±0,0020	15,810 ±0,72	9,0918 ±1,79	6,2 ±0,82	0,5 ±0,09	9,0 ±1,74
S.maximusKN11	0,055 ±0,0028	12,537 ±0,68	8,4390 ±1,34	9,2 ±1,74	0,3 ±0,06	3,8 ±0,65
S.maximusKN12	0,059 ±0,0015	11,837 ±0,31	<b>12,3026</b> ±1,30	3,8 ±0,23	0,4 ±0,05	<b>12,2 ±1,51</b>
S.obliquusKN05*	0,112 ±0,0064	7,291 ±0,85	1,3974 ±0,36	8,5 ±1,11	0,3 ±0,08	3,3 ±0,79
S.raciborskiiKN03	0,086 ±0,0039	8,180 ±0,19	0,6824 ±0,09	9,8 ±0,89	0,3 ±0,04	3,0 ±0,31
S.serratusKN06	0,088 ±0,0017	7,906 ±0,15	1,1750 ±0,10	12,0 ±0,94	0,4 ±0,02	3,5 ±0,23
S. spinosusKN16	0,095 ±0,0093	7,098 ±0,40	0,6394 ±0,11	3,4 ±0,70	0,1 ±0,02	3,2 ±0,71
S.spinosusKN17	0,051 ±0,0022	13,506 ±0,56	1,9161 ±0,42	<b>13,6</b> ±1,12	<b>0,8</b> ±0,17	6,3 ±0,98
S.spinosusKN17*	0,066 ±0,0028	10,599 ±0,45	1,6329 ±0,88	12,9 ±1,77	0,3 ±0,10	2,2 ±1,18
S. spinosusKN18	<b>0,112</b> ±0,0064	<b>6,232</b> ±0,37	1,1691 ±0,27	4,6 ±0,91	0,3 ±0,05	10,8 ±2,09
S.subspicatusKN09	0,079 ±0,0008	8,732 ±0,09	0,6914 ±0,24	6,3 ±0,80	0,2 ±0,08	3,8 ±1,71
S.subspicatusKN27	0,045 ±0,0026	15,537 ±0,92	2,0287 ±0,25	6,3 ±0,68	0,5 ±0,04	8,3 ±1,10

### 3.2. Kultivácia rias vo vode z ČOV

Aj napriek vysokej účinnosti moderných mestských čističiek odpadných vôd, nedokážu dokonale odstrániť veľké množstvo dusíku a fosforu. Vypúšťanie veľkého množstva dusíku a fosforu do vodných recipientov môže v stojatých úsekoch spôsobovať prudký nárast biomasy rias najmä siníc. Tento jav je možné však jednoducho vyriešiť pomocou kultivácie rias v uzavretých nádržiach mimo vodného recipientu. Okrem očistenej vody od eutrofných prvkov dusíku a fosforu získame taktiež cennú biomasu rias, ktorú možno využiť na výrobu biopalív.

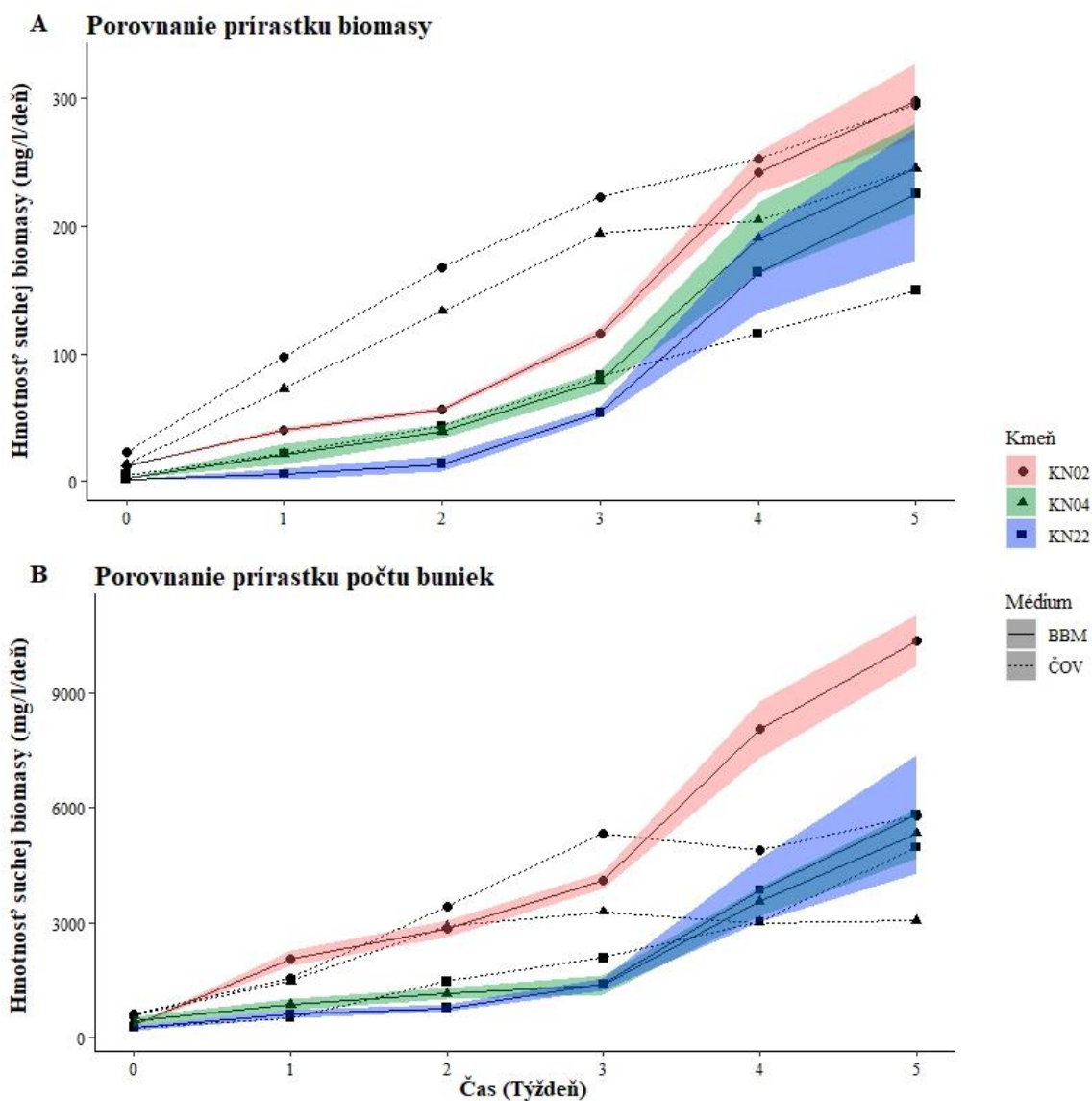
Na overenie tejto teórie s výstupov vodou z ČOV Nové Sady som vybral náhodne tri kmene, jeden z podrodu *Acutodesmus* (KN02) a dva z podrodu *Desmodesmus* (KN04, KN22). Všetky vybrané kmene rástli bez problémov a počas pokusu som nezaznamenal nijakú kontamináciu alebo fyziologické zmeny spôsobené polutantom (Obr. 18). Vo vode z ČOV bola koncentrácia celkového dusíka 9,83 mg/l, čo je približne 4× menej než v médiu BBM, a celkového fosforu 5,71 mg/l približne 9× menej než v BBM. V laboratórnom médiu je okrem vyššej koncentrácie aj opačný pomer N:P, v ktorom je viac fosforu než dusíku (BBM 41:51 mg/l – 1:1,24; ČOV 9,83: 5,71 mg/l - 1,72:1).

Medzi neupravenou vodou a vodou s pridaním NaCl na molárnu koncentráciu 20 mM/l som okrem kmeňa KN22 nezaznamenal nijaký výrazný rozdiel v produkcii biomasy (Obr. 18). To znamená, že ani táto koncentrácia NaCl rovnako ako predchádzajúcich experimentoch nijak výrazne neovplyvňuje produkciu biomasy.



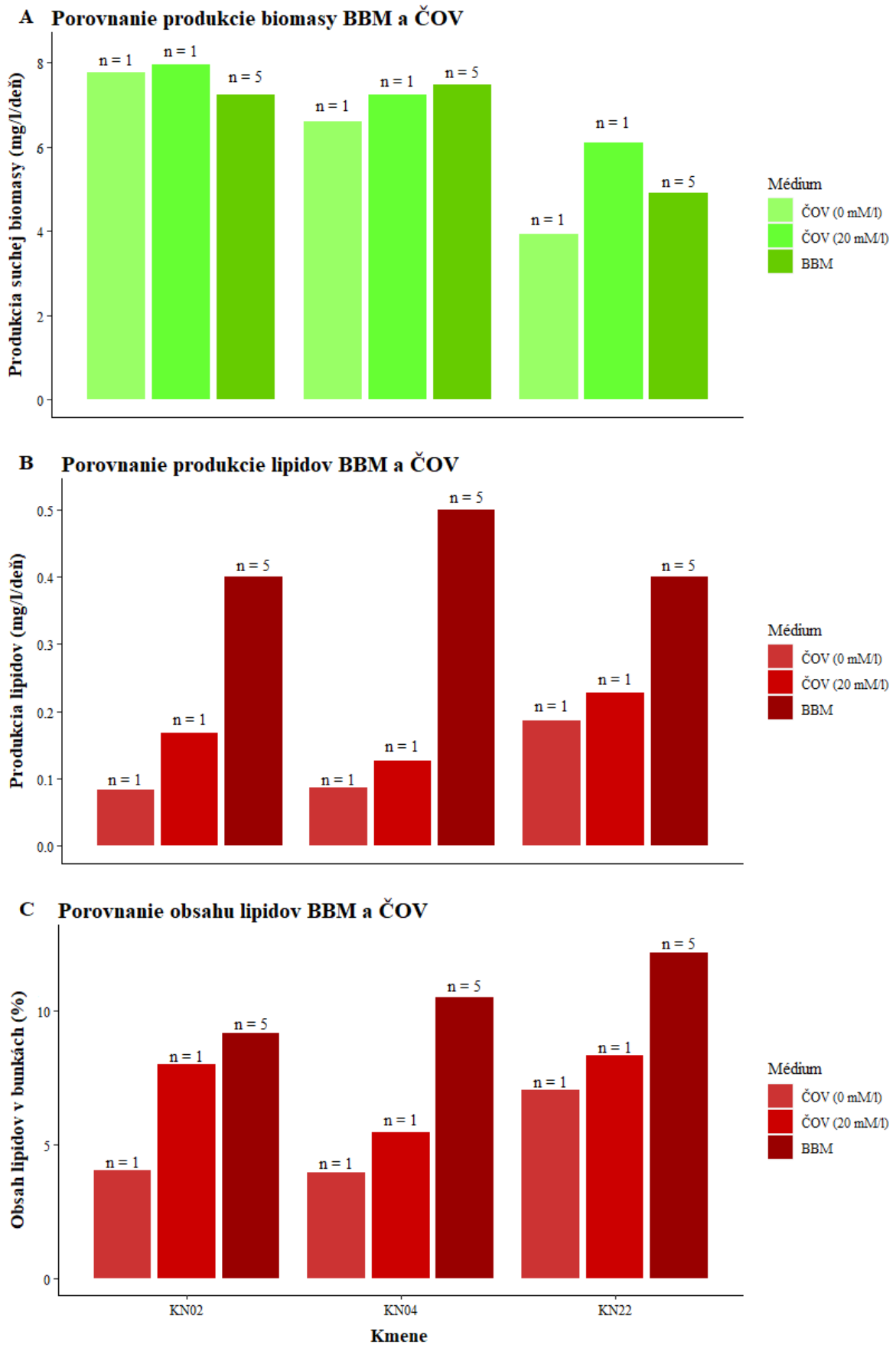
Obr. 18: Produkcia suchej biomasy počas experimentu ČOV; počet sledovaní pri každom kmeni je  $n = 1$ , kvôli malému množstvu vody z ČOV som nemohol uskutočniť opakovania.

Zaznamenal som však výrazný rozdiel v produkcii biomasy rias kultivovaných v laboratórnom médiu BBM a vo vode z ČOV. Z výsledkov je jasné, že voda z ČOV obsahovala všetky potrebné živiny na produkciu biomasy a však ich množstvo nebolo dostačujúce na to, aby riasy rástli po celú dobu experimentu (Obr. 18). Počas experimentu som zaznamenal výrazný rozdiel v produkcii biomasy a počtu buniek. Vo vode z ČOV môžeme na začiatku vidieť výrazné rýchlejší nárast nových buniek a ešte výrazne vyššiu produkciu biomasy všetkých troch kmeňov oproti médiu BBM. Ale približne po 3 až 4 týždni experimentu som zaznamenal stagnáciu prírastku nových buniek pri kmeňoch KN02 a KN04 (Obr. 19B). Na druhej strane v tom danom čase v médiu BBM môžeme vidieť naopak prudký nárast buniek pri všetkých troch kmeňoch. Na konci experimentu je počet buniek vo vode z ČOV o polovicu nižší pri kmeňoch KN02 a KN04 a pri KN22 je približne rovnaký.



Obr. 19: Produkcia v laboratórnom médiu BBM a vo vodou z ČOV, farebné pole okolo kriviek s médiom BBM znázorňuje štandardnú odchýlku; BBM n = 5, ČOV n = 1; kvôli malého množstvu vody z ČOV som nemohol uskutočniť opakovania.





Obr. 20: Finálna produkcia média BBM a vody z ČOV, čísla nad stĺpcami znázorňujú počet sledovanie v jednotlivých mediach.

Z výsledkov je očividné, že v priebehu kultivácie rias vo vode z ČOV dochádza k spomaleniu spomaľuje množenie buniek, ktoré však ďalej rastu a zväčšujú sa, čo nijak negatívne neovplyvňuje množstvo biomasy .

Podobné zníženie po 3. týždni môžeme vidieť aj pri produkcii biomasy, a však nie až tak výrazné ako pri počte buniek. Nemôžeme hovoriť o úplnej stagnácii ako pri počte buniek, ale oproti prvým týždňom produkcia biomasy spomaľuje, čo je úplný opak situácie v média BBM (Obr. 19A). Ale aj napriek spomaleniu, dokázali riasy vo vode z ČOV vyprodukovať rovnaké množstvo biomasy ako v médiu BBM. Jedine v kmeňa KN22 bolo vo vode z ČOV biomasy menej než v médiu BBM.

Produkcia lipidov bola v médiu BBM približne 2 až 5 krát vyššia než vo vode z ČOV (Obr. 20B). Najväčší pokles v produkcii lipidov medzi vodou z ČOV a laboratórnym médiom som zaznamenal pri kmeni KN04, a to približne o 76%. To bolo pravdepodobne spôsobené nízkym obsahom živím, ktoré po dlhšej dobe kultivácie spomalili produkciu biomasy aj lipidov.

Dôležitý rozdiel som však zaznamenal medzi neupravenou vodou z ČOV a vodou s pridaným chloridom sodným, ktorý mal predstavovať stresový faktor. Kmene v prítomnosti stresu produkovali približne o 25% viac lipidov než v neupravenej vode z ČOV. Kmeň *S. dimorphus* KN02 zvýšil dennú produkciu lipidov v prítomnosti NaCl až o 50%. Rovnaký nárast som zaznamenal aj v percentuálnom obsahu lipidov v biomase (Obr. 20C).

Zaujímavé zistenie je, že prítomnosť vysokej koncentrácie NaCl nijak výrazne neovplyvnila produkciu biomasy (Obr. 20A). Zo zvýšenej dennej produkcie aj obsahu lipidov je evidentné, že použitá koncentrácia NaCl už bola bunkami vyhodnotená ako stresový faktor s následkom zvýšenej produkcie lipidov. Ale produkcia biomasy nebola nijak ovplyvnená, čo veľmi zvyšuje dennú produkciu lipidov.

Tab. 4: Zníženie koncentrácie eutrofných prvkov po kultivácii riasy *Scenedesmus* sp.; \*záporné percento je pravdepodobné spôsobené nedokonalou filtráciou média od suchej biomasy rias ale chybou v chemickej analýze dusičnanovú.

NaCl	<i>S. dimorphus</i> KN02		<i>S. intermedius</i> KN04		<i>S. ellipsoideus</i> KN22	
	0 mM/l	20 mM/l	0 mM/l	20 mM/l	0 mM/l	20 mM/l
<b>Pred (mg/l)</b>						
NO <sub>3</sub>	6,62	6,62	6,62	6,62	6,62	6,62
NH <sub>4</sub>	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43	6,43
Pc	5,71	5,71	5,71	5,71	5,71	5,71
<b>Po (mg/l)</b>						
NO <sub>3</sub>	7,5	0,4	0,4	0,798	0,758	0,4
NH <sub>4</sub>	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039
Pc	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<b>Zníženie (%)</b>						
NO <sub>3</sub>	-14,35*	93,96	93,96	87,95	88,55	93,96
NH <sub>4</sub>	99,39	99,39	99,39	99,39	99,39	99,39
Pc	97,90	97,90	97,90	97,90	97,90	97,90

Všetky kmene dokázali z odpadovej vody takmer úplne spotrebovať všetok dusík a fosfor. Koncentrácia fosforu po 5 týždňoch klesla vo všetkých pozorovaniach o 97% (Tab. 4). Rovnaký výsledok som zaznamenal aj pri odstraňovaní amoniaku. Vo všetkých pozorovaniach klesla hladina amoniaku o 99,39%. Malé rozdiely som zaznamenal pri odstraňovaní dusičnanov, kde pri dvoch pozorovaniach sa znížila hladina  $\text{NO}_3^-$  približne len o 88% a pri troch ďalších pozorovaniach zhodne 93,96%. S neznámych príčin jedna vzorka vyšla v negatívne, čo bolo pravde podobne spôsobené chybou v analýze dusičnanov (Tab. 4).

Nezaznamenal som žiadny vplyv zastresovania buniek a odstraňovanie dusíku a fosforu.

### 3.3. Efekt zvýšenej koncentrácie NaCl na produktivitu lipidov

Zo všetkých otestovaných kmeňov som vybral na experimenty s cieľom zvýšenia produktivity lipidov kmeň *S. obliquus* KN05. Aj napriek tomu, že nedosahoval vysokých hodnôt, podľa odborných publikácií bol tento kmeň veľmi dobre hodnotený ako potenciálny zdroj lipidov. Preto som sa rozhodol použiť na experimenty práve tento kmeň.

Riasy boli kultivované v médiu BG-11, čo je vysoko produkčné médium s bohatším množstvom živín než médium BBM. Ďalej boli riasy kultivované v miestnosti so silnejšou intenzitou svetla približne 150  $\mu\text{mol fotón/m}^2/\text{s}$  a vyššej teplote okolo 22 °C. To malo za následok ďaleko vyššiu produkciu. Najvyššia nameraná produktivita biomasy v predchádzajúcom experimente bola 14,96 mg/l/deň pri kmeni KN17 (Obr. 15C, 16B). Priemerná denná produktivita biomasy v kontrolnom médiu kmeňa KN05 v danom experimente bola 35 mg/l/deň, čo je 2 krát vyššie (Obr. 21A, 22A) než v predchádzajúcich experimentoch (Obr. 15C).

Kmeň zelených rias *Scenedesmus obliquus* KN05 som v týchto experimentoch kultivoval v dvoch rôznych režimoch, a to jednostupňovom a dvojstupňovom (úvod kapitola 1.5.3).

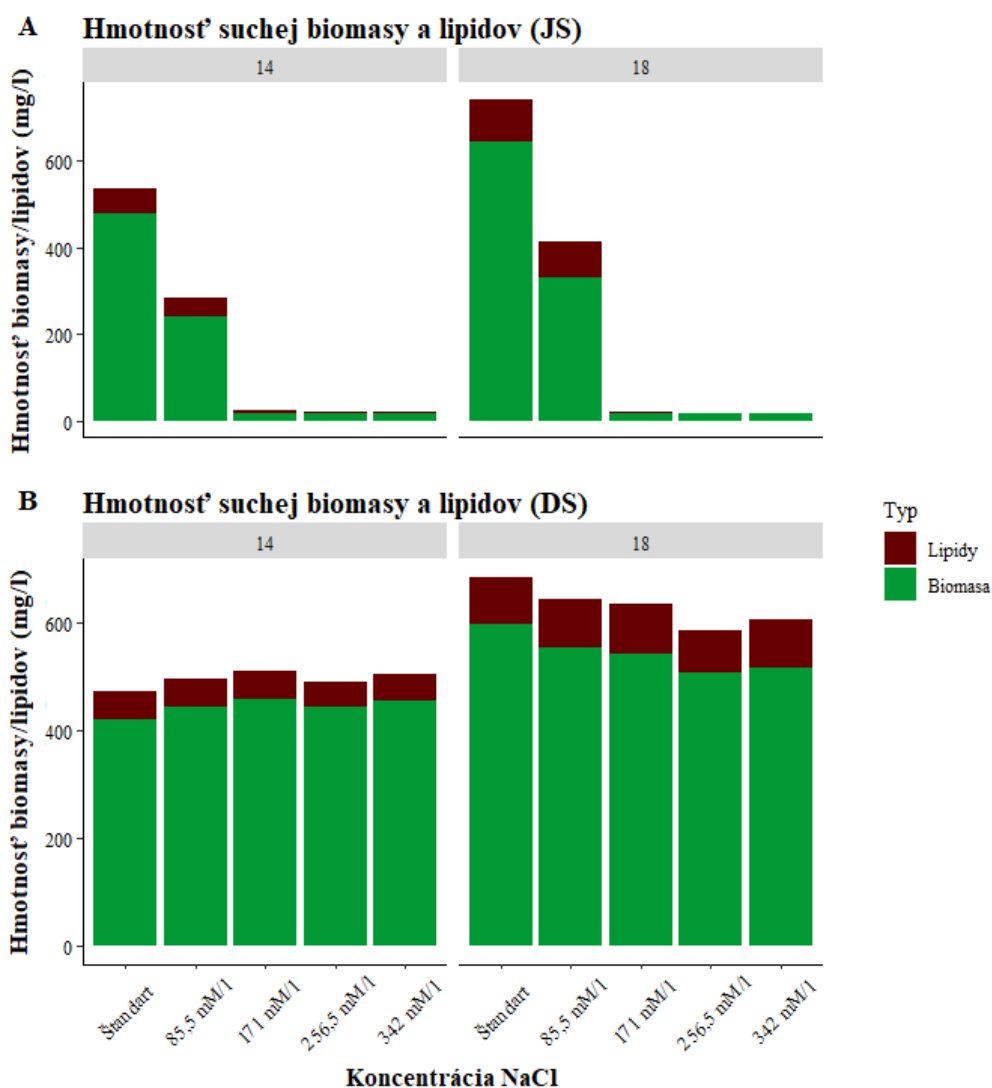
#### 3.3.1. Jednostupňový režim (JS)

##### Produktivita biomasy

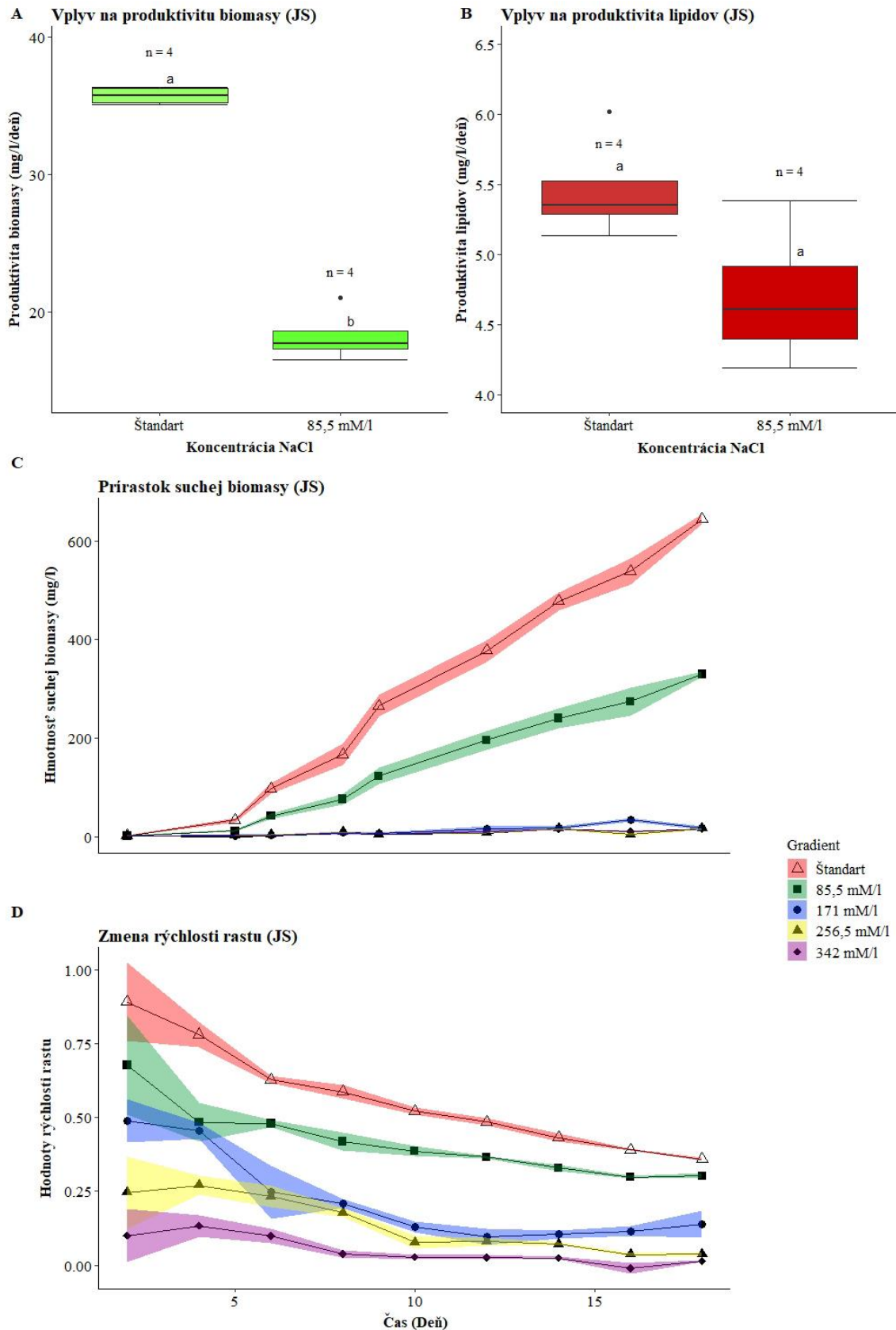
V jednostupňovom režime, kde bol gradient NaCl prítomný od začiatku experimentu, bol rozdiel v produkcii biomasy vidieť už po 2 až 4 dni kultivácie. V bankách s najnižšou salinitou (85 mM/l) rástla biomasy približne o 50% pomalšie než v kontrolnej banke. V bankách so salinitou 171 až 342 mM/l som zaznamenal veľmi prudký pokles produkcie biomasy oproti kontrole (Obr. 21A). V týchto bankách sa biomasa takmer vôbec neprodukovala a na konci experimentu banky neobsahovali viac

ako 20 mg/l suchej biomasy. Kontrolná banka obsahovala približne 630 mg/l a banka s najnižším zasolením okolo 300 mg/l suchej biomasy (Obr. 21A).

Produkcia suchej biomasy na deň bola v kontrolnej banke 35,5 mg/l/deň a pri koncentrácii 85,5 mM/l NaCl, bola produkcia biomasy 17 mg/l/deň (Obr. 22A) (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 2,6 \times 10^{-6}***$ ). Pri vyššej koncentrácii NaCl bola denná produkcia biomasy extrémne nízka a neprekročila 1 mg/l/deň. Rozdiel v produktivite je dobre viditeľný pri hodnotách rýchlosti rastu (Obr. 22D) už na druhy deň pozorovania. Z prírastku suchej biomasy nebol rozdiel v tu dobu ešte takmer vôbec vidieť (Obr. 22C). Hodnoty rýchlosti rastu medzi jednotlivými skupinami za celú dobu experimentu rovnomerne klesajú s rastúcou salinitou. Riasy reagujú na prítomnosť stresu hneď od začiatku experimentu a nie až po dlhšej dobe.



Obr. 21: Množstvo vyprodukovanej biomasy a lipidov počas 18 dní; každý stĺpec má  $n = 4$ , čísla v šedých poliach nad grafom znázorňujú deň experimentu; JS – jednostupňový režim, DS – dvojestupňový režim.



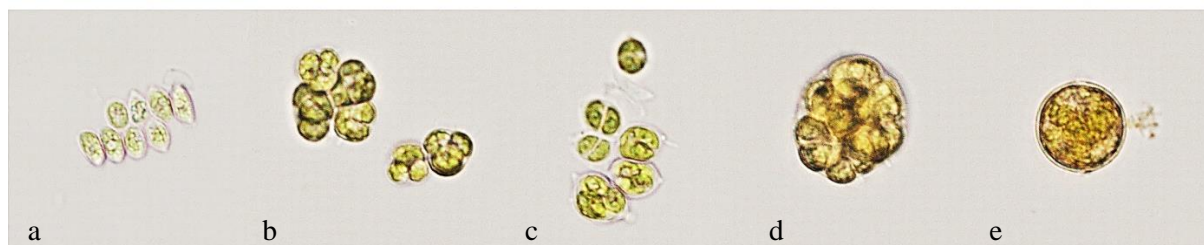
Obr. 22: Výsledky kultivácie v jednostupňovom režime; A,B: sú uvedené len banka kontrolná a s najnižším zasolením., pretože pri vyššom zasolení bola produktivita veľmi nízka; malé písmená nad boxplotmi znázorňujú signifikanciu štatistického rozdielu po Tukeyho test  $p < 0,05$ ; n znázorňuje počet pozorovaní, čiara v boxplote znázorňuje medián, bodky znázorňujú extrémne hodnoty; C,D: farebné polia okolo kriviek znázorňujú štandardnú odchýlku.

## Produktivita a obsah lipidov

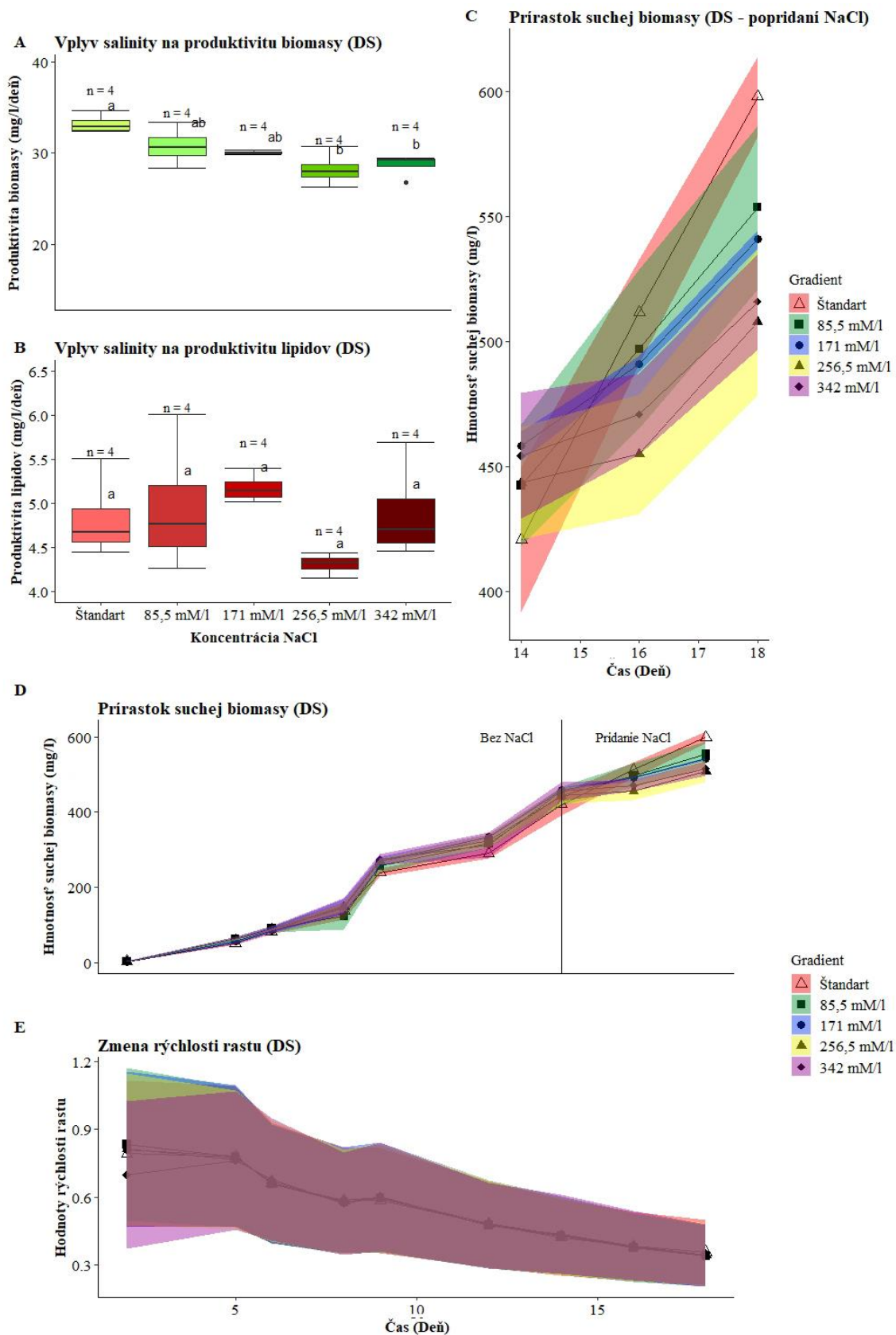
Denná produktivita lipidov bola v jednostupňovom režime najviac efektívna v kontrolnej skupine, a to v priemere 5,5 mg/l/deň (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 2,6 \times 10^{-6***}$ ). Najmenej efektívna bola pri salinite 171 mM/l a viac, čo bolo spôsobené extrémne nízkou produktivitou biomasy. Pri vysokej salinite bola denná produktivita lipidov približne 0,115 mg/l/deň. Vysokú produktivitu lipidov vzhľadom na nižšiu produktivitu biomasy vykazovala skupina kultivovaná pri koncentrácii 85,5 mM/l, a to v priemere 4,6 mg/l/deň. Produktivita bola takmer totožná s kontrolnou skupinou napriek tomu, že produkcia biomasy bola o polovicu nižšia (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,053$ ). Použitá koncentrácia NaCl zvýšila percentuálny obsah lipidov na 25%, čo je takmer o 2/3 viac než pri kontrole (obr.10A) (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 2,25 \times 10^{-5***}$ ). Vysoký obsah lipidov dokázal kompenzovať nižšiu produkciu biomasy a na konci experimentu dokázala daná skupina vyprodukovať v priemere 84 mg/l lipidov, čo je len o 10 mg/l menej než v kontrole (Obr. 21A, B). Obsah lipidov však nekoreloval s gradientom salinity, ako som pôvodne očakával, pretože v vyšších koncentráciách bol obsah lipidov nižší než v kontrole.

## Morfologické zmeny spôsobené stresom

Pod mikroskopom bolo so stúpajúcim gradientom vidieť aj morfologické zmeny buniek. Už pri najnižšej koncentrácii NaCl (85,5 mM/l) boli vidieť evidentné zmeny oproti kontrole, a to že dcérske bunky prestávajú opúšťať materskú bunku (Obr. 23). Pri koncentrácii 171 mM/l NaCl je nie je vidieť výrazná zmena proti 85,5 mM/l. Ale pri 256 mM/l sú viditeľné mohutné guľovité agregáty buniek, pravdepodobne kryté ešte materskou bunkovou stenou. Pri najvyššej použitej koncentrácii 342 mM/l NaCl mali bunky úplne odlišný tvar ako pri normálnych podmienkach. Guľovité útvary mali tvar spory a často bunky vo vnútri často neboli rozoznateľné, na rozdiel od predchádzajúcej koncentrácie 256 mM/l, kde boli bunky aspoň trochu v agregátoch rozoznateľné.



Obr. 23: Efekt salinity na morfológiu buniek; a – 0 mM/l; b – 85,5 mM/l; c – 171 mM/l; d – 256,5 mM/l; e – 342 mM/l.



Obr.

24: Vysledky kultivácie v dvojstupnovom režime; A,B: malé písmená nad box plotmi znázorňujú signifikanciu štatistického rozdielu po Tukeyho test  $p < 0,05$ ; písmeno n znázorňuje počet pozorovaní, čiara v boxplote znázorňuje medián, bodky znázorňujú extrémne hodnoty; C,D,E: farebné polia okolo kriviek znázorňujú štandardnú odchýlku.

### 3.3.2. Dvojstupňový režim (DS)

#### Produktivita biomasy

Pri dvojstupňovom (DS) režime bol NaCl pridaný až na 14 deň experimentu. Do 14 dňa nebol vidieť žiadny rozdiel produkcií biomasy (Obr. 24D, E) (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,334$ ). V bankách sa v 14. deň nachádzalo približne 420 mg/l suchej biomasy (Obr. 21B). Po prípadní gradientu NaCl som na 18. deň zaznamenal nižšiu produkciu biomasy oproti kontrole (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,186$ ). Množstvo biomasy nepriamo úmerne korelovalo so stúpajúcim gradientom salinity (Obr. 24C).

Produktivita biomasy však ani v jednej skupine po pridaní NaCl neprestala, dokonca ani po pridaní najvyššej koncentrácie 346,5 mM/l. Pridanie NaCl však negatívne ovplyvnilo celkovú dennú produkciu biomasy oproti kontrole, ktorá klesla z 34 na 29 mg/l/deň (Obr. 24A).

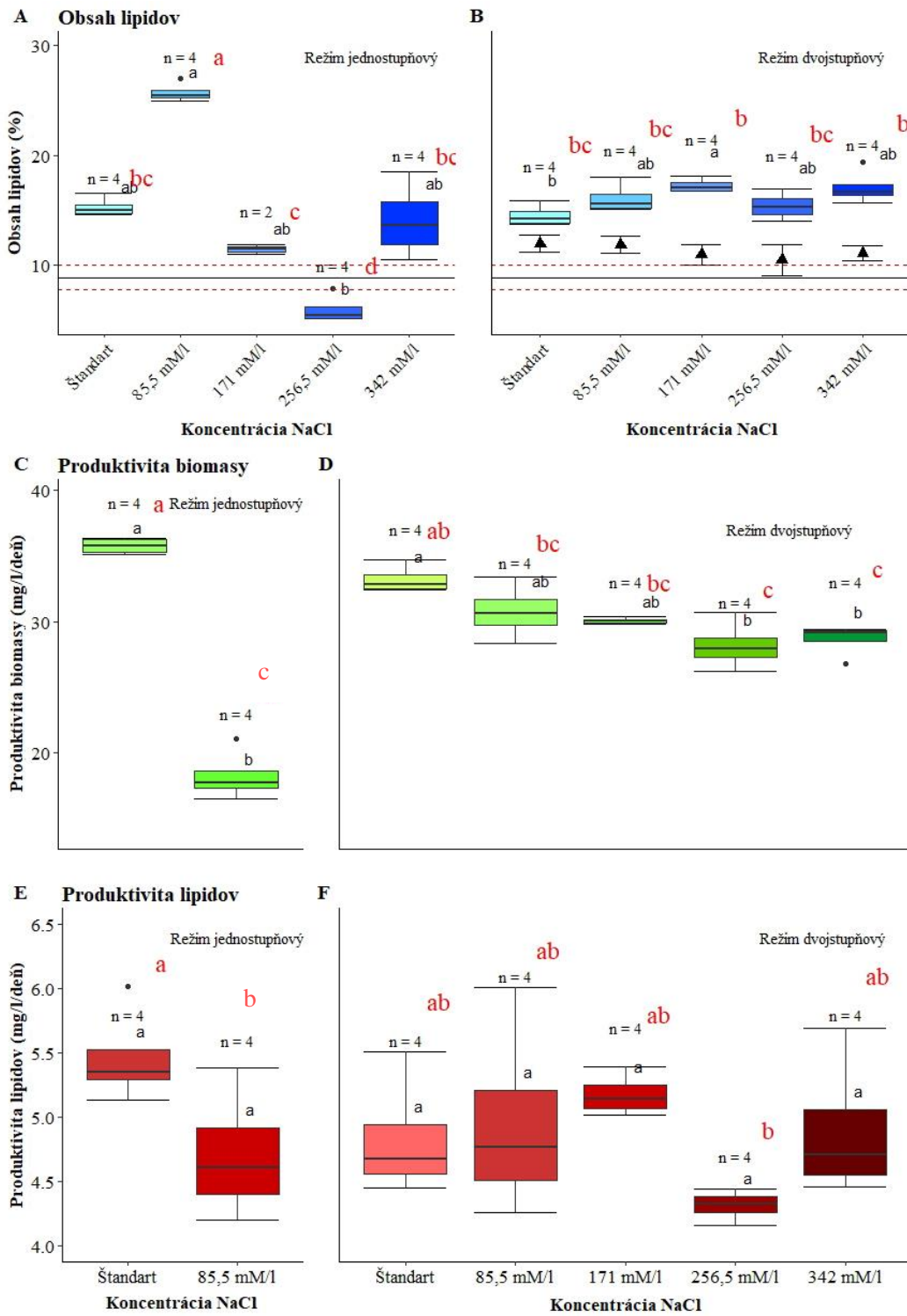
#### Produktivita a obsah lipidov

Najvyšší a štatisticky jediný signifikantný nárast obsah lipidov som zaznamenal pri koncentrácií 171 mM/l, a to v priemere 18%, čo je o 2% vyššie oproti kontrole (Obr. 25A) (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,0442$ ). Celková denná produkcia lipidov však ani u jednej zo skupín neprevyšovala kontrolu skupinu (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,189$ ). Najvyššiu produkciu lipidov dosahovala spomínaná skupina s koncentráciou 171 mM/l, a to v priemere 5,18 mg/l/deň (Obr. 24B) a však s veľmi nízkou štatistickou signifikanciou (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,837$ ).

### 3.3.3. Porovnanie jednostupňového a dvojstupňového režimu

Najvyšší percentuálny obsah lipidov som zaznamenal v jednostupňovom režime pri koncentrácií 85,5 mM/l, a to viac ako 25% (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,000^{***}$ ). Druhy s najvyšším obsah lipidov som zaznamenal v dvojstupňovom režime pri koncentrácií 171 mM/l, a to v priemere 18%. Pri tej to koncentrácií však rozdiel od kontroly nebol štatisticky veľmi signifikantný (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,327$ ). Najnižší obsah lipidov v priemere 5% som zaznamenal v jednostupňovom režime pri koncentrácií 256,5 mM/l (Obr. 25A) (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,8 \times 10^{-6^{***}}$ ).





Obr. 25: Porovnanie jednostupňového a dvojstupňového režimu kultivácie; malé čierne písmená znázorňujú signifikanciu štatistického rozdielu v rámci jedného režimu, malé červené písmená znázorňujú signifikanciu štatistického rozdielu v rámci obidvoch kultivačných režimov po Tukeyho teste ( $p < 0,05$ ); písmeno n znázorňuje počet pozorovaní; A,B: čierna čiara cez celý graf znázorňuje priemerný obsah lipidov kmeňa KN05 pred začatím experimentu, červené prerušované čiary znázorňujú štandardnú odchýlku obsahu lipidov pred začatím, plné trojuholníky znázorňujú obsah lipidov v 14 deň experimentu, čiarnu nad a pod trojuholníkmi znázorňujú štandardnú odchýlku obsahu lipidov v 14 deň.

## Produkcia biomasy

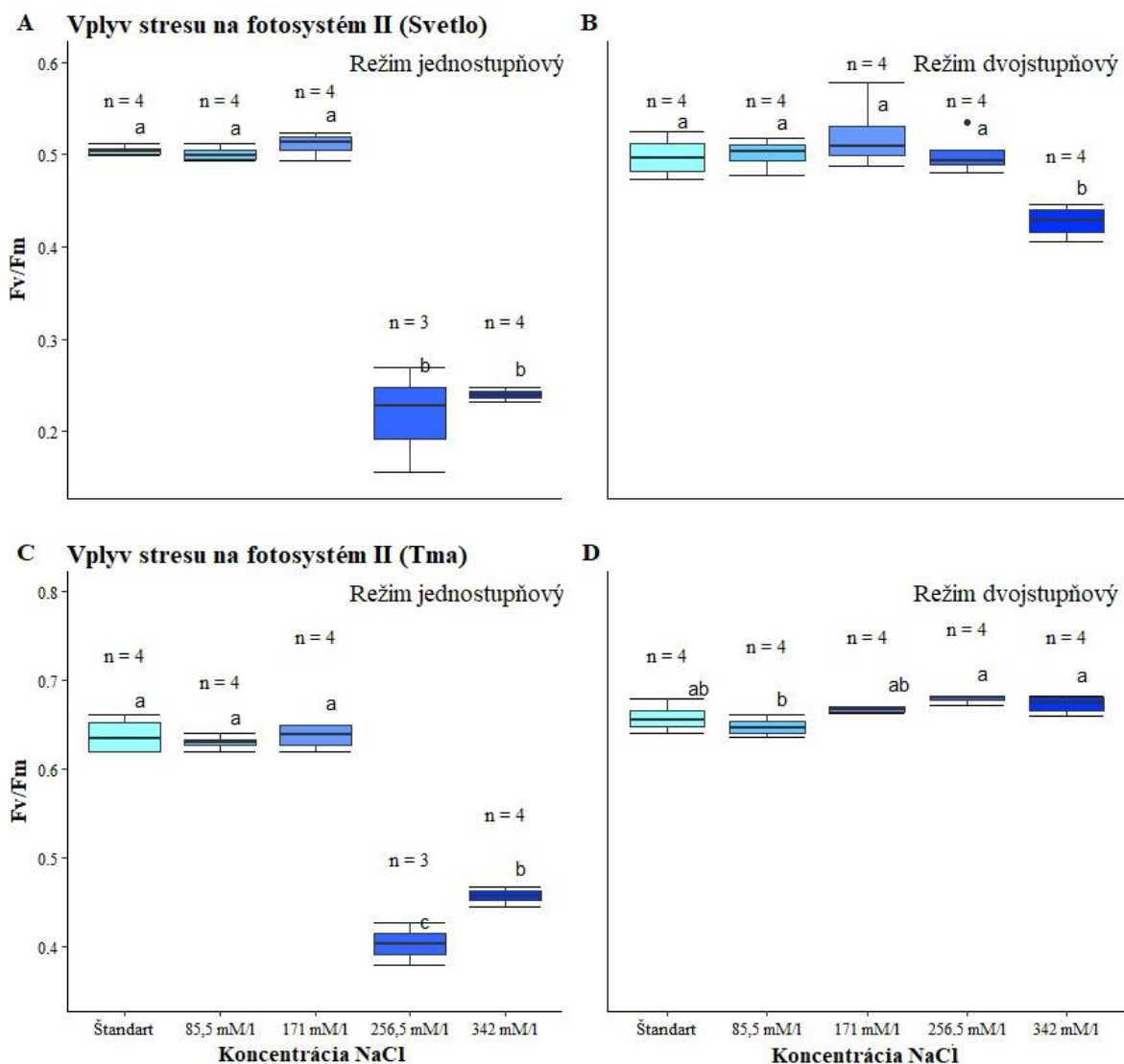
Produkcia biomasy bola najefektívnejšia podľa očakávania v kontrolných skupinách. V oboch režimoch kultivácie sa po pridaní NaCl, ako stresového faktoru, produkcia spomalila alebo stagnovala. Pri dvojstupňovom režime boli rozdiely v produkcii biomasy veľmi nízke (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 2,6 \times 10^{-6***}$ ) v porovnaní s jednoduchým (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,189$ ). V jednoduchom režime pri vysokých koncentráciách NaCl kultivácia stráca ekonomický význam a jediná koncentrácia, pri ktorej by bola kultivácia ešte efektívne je 85,5 mM/l (Obr. 25A).

## Produktivita lipidov

Najvyššia významná produktivita lipidov bola v kontrole pri jednoduchom režime. Z toho vyplýva, že salinita v použitých koncentráciách nijak významne nezvýšila produkciu lipidov (Obr. 25A) (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,067$ ). Hodnoty dennej produkcie lipidov v prítomnosti stresu boli približne rovnaké ako v kontrolnej skupine. To je spôsobené nižšou produktivitou biomasy oproti kontrole a väčší obsah lipidov dosiahnutý pomocou stresu, nedokázal prevýšiť produktivitu lipidov kontrolnej skupiny. Z ekonomického hľadiska by použitie stresu v oboch režimoch nebolo výhodné. Používanie čistého NaCl ako stresového faktoru zvýši výrobné náklady, ale objem získaných lipidov nijak významne nezvýši.

### 3.3.4. Fluorescencia chlorofylu

Aj keď použitie vyššej koncentrácie NaCl (85,5-356 mM/l) malo neutrálny vplyv na dennú produkciu lipidov, na rast a morfológiu buniek mal naopak vplyv výrazný. Koncentráciu NaCl vyššiu než 85,5 mM/l môžeme hodnotiť ako výrazný stresový faktor. Technika pomocou, ktorej možno kvantitatívne ohodnotiť stupeň stresu buniek je analýza fluorescencie chlorofylu (Parkhill 2001; Murchie a Lawsom 2013). Pri tejto technike sa meria maximálna účinnosť fluorescencie fotosystému II. Ak sa bunky rias vyskytujú v horších podmienkach a sú vystavené stresu, je účinnosť fotosyntézy nižšia. To nám pomáha určiť prítomnosť aj intenzitu stresového faktoru. Hodnotu, ktorú pri tejto technike sledujeme je pomer medzi variabilitou fluorescencie ( $F_v$ ) a maximálnou účinnosťou fluorescencie ( $F_m$ ).  $F_v$  je rozdiel medzi maximálnou fluorescenciou  $F_m$  a minimálnou fluorescenciou  $F_o$ .  $F_o$  nastáva po ožiarení svetlom s nízkou intenzitou, ktoré nedokáže spustiť elektrónový reťazec, ale má dostatočnú energiu na vyvolanie fluorescencie ( $F_v = F_m - F_o$ ). Pri optimálnych podmienkach je pomer  $F_v/F_m$  veľmi stabilný a nadobúda v tme hodnoty približne až 0,6 a počas svetla 0,5. Pri svetle sa viac energie využije pri fotosyntéze, a preto sú hodnoty o niečo nižšie. Ak sa však bunky nachádzajú v nepriaznivých podmienkach, hodnota pomeru  $F_v/F_m$  sa znižuje.



Obr. 26: Hodnotenie stresu buniek, pomocou účinnosti fluorescencie chlorofylu; n nad boxplotmi znázorňuje počet pozorovaní, malé písmená nad box plotmi znázorňujú signifikanciu štatistického rozdielu po Tukeyho test ( $p < 0,05$ ).

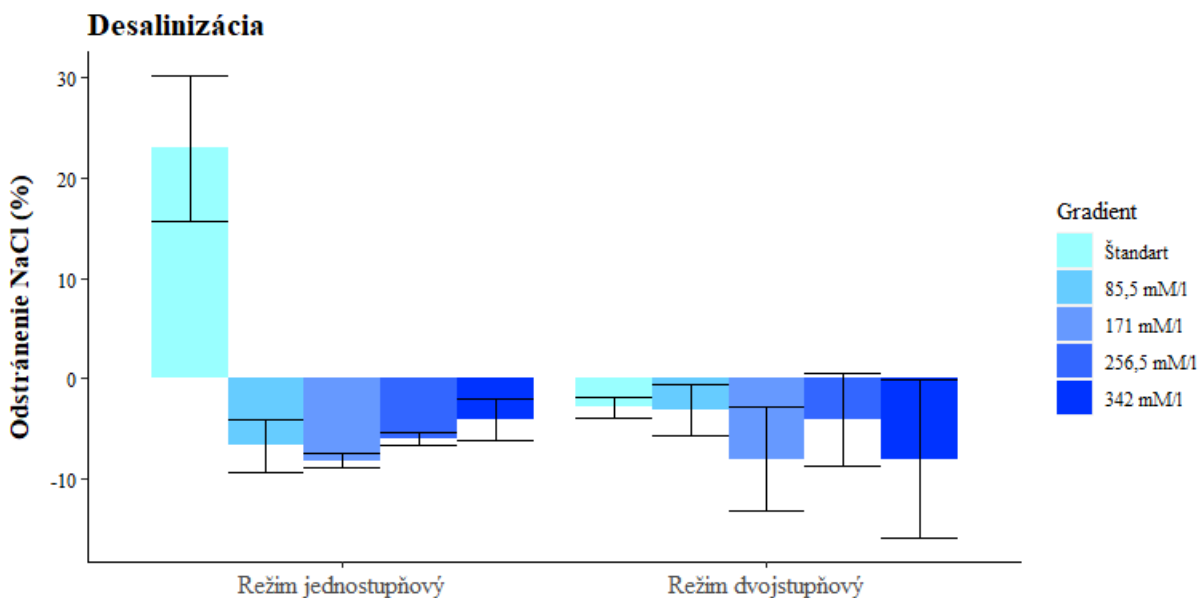
Pomer  $F_v/F_m$  pri jednostupňovom režime ukazuje, že v kontrolnej banke a bankách s koncentráciou NaCl 85,5 a 171 mM/l nie sú žiadne zmeny (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,999$ ;  $p = 0,993$ ). V tme dosahovali hodnôt 0,6 a vo svetle 0,5. Výrazný pokles som zaznamenal až pri posledných dvoch koncentráciách, kde v tme dosahovali hodnôt v priemere 0,22 a vo svetle 0,4 až 0,45 (Obr. 26A, C) (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p_{tma} = 0,000^{***}$ ;  $p_{svetlo} = 0,000^{***}$ ). V bankách s koncentráciou 171 mM/l bola veľmi nízka produkcia lipidov rovnako ako v bankách s vyššou koncentráciou (256,5 – 342 mM/l). Ale podľa hodnôt fluorescencie daná koncentrácia ešte nepredstavovala výrazný stres. Je možné, že bunky sa časom na stres adaptovali lebo na konci experimentu som zaznamenal mierny nárast biomasy a zvýšenie rýchlosti rastu (Obr. 22D).

V dvojstupňovom režime je signifikantný rozdiel pomeru  $F_v/F_m$  vidieť len pri svetle a vykazuje ho len skupina s najvyššou koncentráciou 342 mM/l NaCl (Tukey ( $p < 0,05$ )  $p = 0,011^*$ ). V tme sú

rozdiely veľmi minimálne aj keď dosahujú štatistickú signifikanciu (ANOVA ( $p < 0,05$ )  $p = 0,005^{**}$ ). Pomer  $F_v/F_m$  je mierne vyšší pri koncentráciách 256,5 a 342 mM/l, čo by naznačovalo, že pri tej koncentrácií majú bunky priaznivejšie podmienky než v kontrole. Je to však pravdepodobne spôsobené veľmi nízkou variabilitou jednotlivých skupín, čo zvýšilo signifikanciu rozdielov. Doba počas, ktorej boli bunky vystavené vyššej koncentrácii NaCl nebola dostatočná na to, aby výrazne ovplyvnila fotosystém II.

### 3.3.5. Biologická desalinizácia

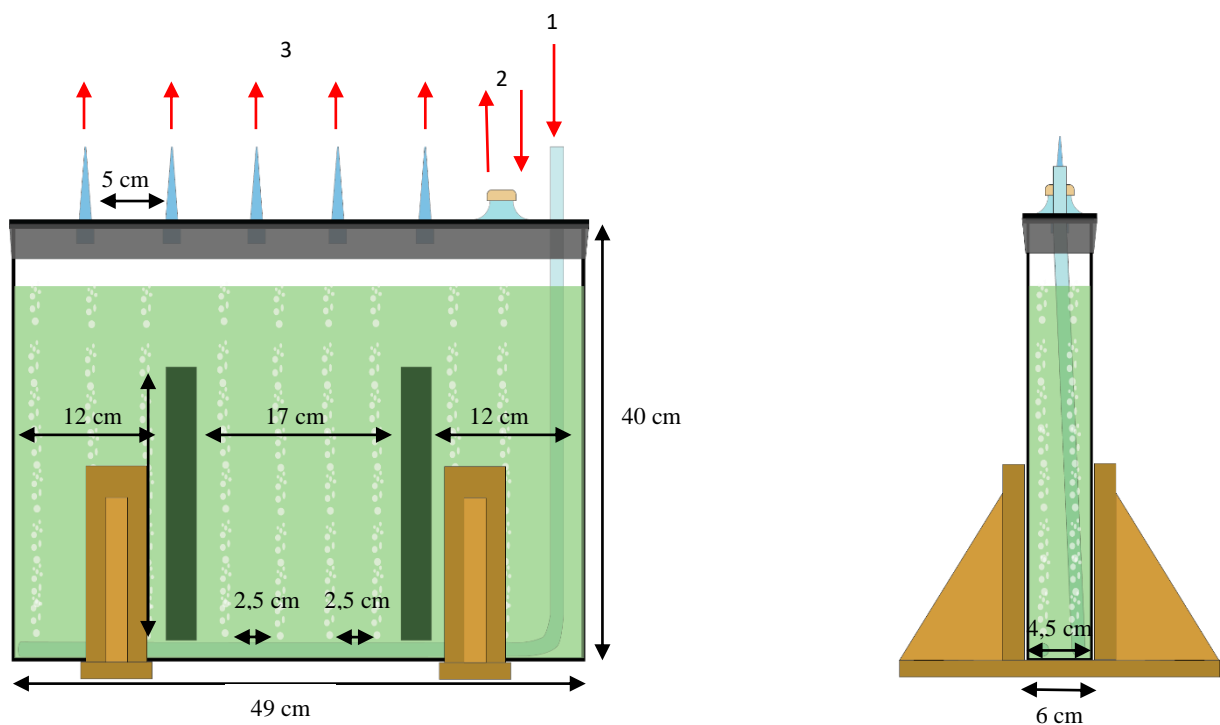
Schopnosť biologickej desalinizácie kmeňa *Scenedesmus obliquus* KN05 dopadla negatívne. Podľa rozdielu konduktivity pred začiatok a po ukončení experimentu je vidieť, že salinita sa naopak zvyšuje. Ani u jednej skupiny nie je vidieť pozitívne percento desalinizácie. Jediný pozitívny výsledok je v kontrolnej vzorke pri jedноступňovom režime. Pozitívny výsledok je však spôsobený znížením koncentrácie živín, ktoré majú taktiež vplyv na konduktivitu. Konduktivita kontrolného média bola približne 1,9 mS/cm<sup>3</sup> a po skončení experimentu klesla na 1,5 mS/cm<sup>3</sup>. Konduktivita najnižšej koncentrácie NaCl 85,5 mM/l bola približne 10,5 mS/cm<sup>3</sup> a najvyššej 342 mM/l bola 37 mS/cm<sup>3</sup>. Médium bez NaCl malo veľmi nízku konduktivitu než médium s najnižšou koncentráciou NaCl a aj malá zmena môžeme spôsobiť vysoké percento rozdielu hodnôt konduktivity (Obr. 27).



Obr. 27: Biologická desalinizácia kmeňa KN05 (fúzy nad a pod stĺpcami znázorňujú štandardnú odchýlku).

### 3.4. Kultivácia rias v semikontinuálnom režime vo fotobioreaktoroch

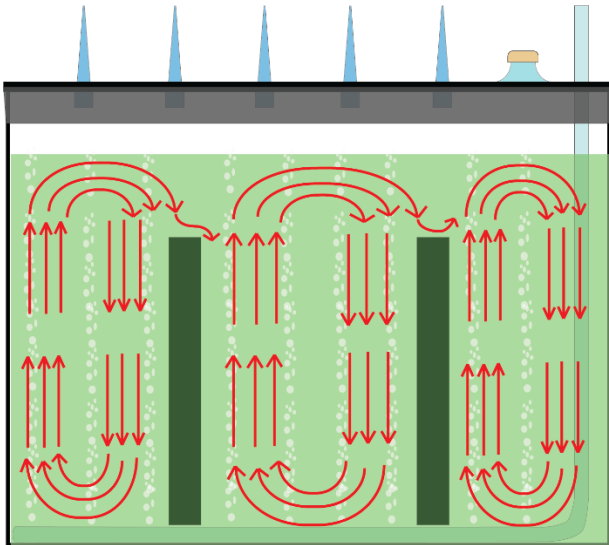
Počas odbornej stáže na Univerzite v Gdansku som mal možnosť vyskúšať aj semikontinuálny režim kultivácie v panelovom laboratórnom fotobioreaktore. Cieľom tejto časti bola nie len obsluha reaktora, ale aj jeho samotná konštrukcia. Reaktory sú skonštruované z 10l skleneného akvária s rozmermi  $6 \times 40 \times 60$  cm (šírka x výška x dĺžka). Pri výbere materiálu som sa snažil zamerať hlavne na jeho dostupnosť v laboratóriu alebo domácnosti a hlavne na nízku cenu. Panelový fotobioreaktor predstavuje zatvorený systém (úvod kapitola 1.5), ktorý sa premiešava pomocou aerácie a preto je nutné, aby mal reaktor otvor na uvoľňovanie prebytočného vzduchu. Na ich uzavretie som použil polykarbonátové lišty a ako výfuk prebytočného vzduchu som použil plastové špičky s automatických pipet. Vrchnú lištu som k akváriu pripevnil pomocou izolačnej kobercovej pásky. Na vrchnú lištu som ešte pridal zatvárateľný otvor z PET fľaše na dodávanie média a odoberanie biomasy (príloha 6). Aby som dosiahol čo najdokladnejšie premiešanie média s biomasou, pridal som do stredu 2 rozdeľovacie steny. Tieto steny rozdeľujú reaktory na 3 segmenty, v ktorý sa prúd odráža od stien a lepšie sa tak dostáva aj do rohových miest. Aerácia bola zabezpečená pomocou vzduchovej pumpy a gumených hadičiek, ktoré sú vedené na spodnú stranu reaktorov a uchytené pomocou rozdeľovaných stien (Obr. 28).



Obr. 28: Schéma panelového reaktora (1 – Aerácia; 2 – Manipulačný otvor; 3 – Exhalačné otvory)

Po dokončení konštrukcie a uvedení oboch reaktorov do prevádzky som začal hneď s kultiváciou rias (Obr. 31). Na kultiváciu v semikontinuálnom režime som vybral kmene *S. acutus* KN14, ktorý patril medzi najefektívnejšie kmene a *S. obliquus* KN05, ktorý som použil aj predchádzajúcich

experimentoch s cieľom zvýšiť produkciu lipidov. Reaktory fungovali na prvý pokus veľmi dobre a však po pár dňoch ako biomasa začala narastať som zaznamenal výrazné zmeny v hodnotách pH. Pri uzavretom systéme nedochádza k výmene plynov medzi vodou a voľnou atmosférou a vysoká rýchlosť fotosyntézy spotrebúva omnoho väčšie množstvo  $\text{CO}_2$ , než je dodávané do systému pomocou aerácie. Nízka koncentrácia  $\text{CO}_2$  v médiu zvyšuje hodnotu pH, ktorá môže vystúpiť zo 7 až na hodnotu 11,2 za približne 8 hodín. Je preto nutné pravidelne do fotobioreaktorov dodávať  $\text{CO}_2$  a pH znížiť na úroveň približne 6,5 až 7.



Obr. 29: Prudenie média v reaktore; nákres prudenie média je len približný, smer média sa časom menil a intenzita prudenie nebola rovnomerne rozložená v celom reaktore, najsilnejšie prudenie bolo v zadnej časti kde sa hadička stačala, čo spôsobovalo vyšší tlak a silnejší prud bublín.

## pH systém

V prvých týždňoch som  $\text{CO}_2$  pridával manuálne dvakrát denne a počas víkendov som reaktory nechával v tme, kedy fotosyntéza neprebíha a uhlík sa nespotrebuje. Po čase som však s cieľom zefektívniť produkciu a zabrániť vysokým výkyvom pH vytvoril automatický systém. Tento systém pridáva  $\text{CO}_2$  neustále v malom množstve do aeračného systému, kde sa premiešava so vzduchom. Koncentrácia  $\text{CO}_2$  vo vzduchu sa tak zvýši na úroveň približne 4%. Pri vyššom množstve biomasy som koncentráciu zvýšil až na 8%. Po dôkladnej kalibrácii systém dokázal udržať pH na hodnote od 6,5 do 8,5.

## Aerácia

Fotobioreaktory neboli arované neustále, pretože dlhá doba aerácie rýchlo zvyšovala hodnoty pH. Neustálym prevzdušňovaním sa zo systému pravdepodobne odstraňovalo veľké množstvo

dodávaného CO<sub>2</sub>. Aeráciu som pomocou časovača nastavil na 15 a 30 minútové intervaly, medzi ktorými bola 2 hodinová prestávka. Pri spustení aerácie sa hodnota pH prudko znížila približne o 0,5 až 1 stupeň, čo bolo spôsobené vyššou koncentráciou CO<sub>2</sub>, pretože dodávanie CO<sub>2</sub> bolo neustále aktívne aj počas nečinnosti pumpy. Z dlhodobého hľadiska však tieto výkyvy nemali na produkciu nijaký negatívny význam (Obr. 29, 30).



Obr. 30: Systém dodávania CO<sub>2</sub>; 1. 100% CO<sub>2</sub>; 2. Vzduch z pumpy; 3. Obohatený vzduch o CO<sub>2</sub> na 4% až 8%.

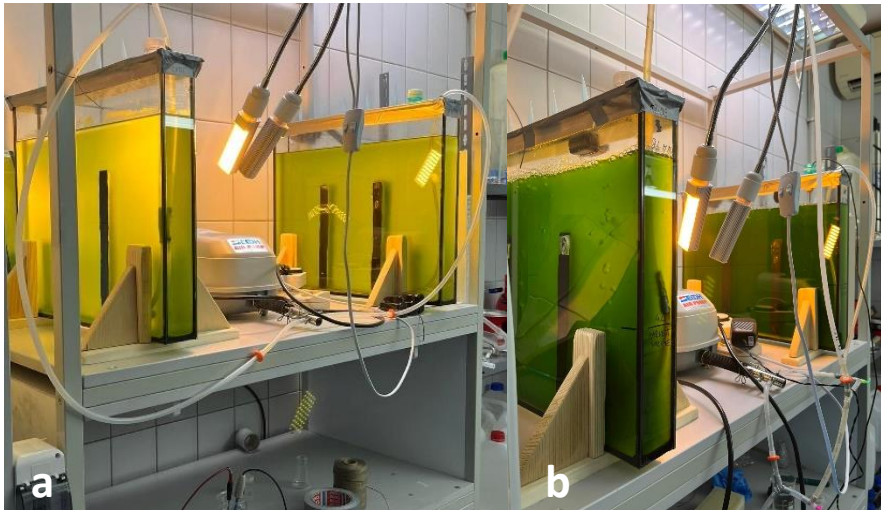
## Produkcia biomasy

V prvých týždňoch kultivácie rias neboli rozdiely v produkcii biomasy medzi reaktormi veľmi výrazne. V reaktore č. 1, kde bol kultivovaný kmeň *S. acutus* KN14, bola kultivácia bez problémová (Obr. 32A). V prvých týždňom dosahovala dennú produkciu biomasy od 33 do 47 mg/l/deň (Obr. 33). Na začiatku kultivácie, kedy som upravoval pH manuálne, bola produkcia biomasy počas víkendy veľmi nízka až nulová. Spôsobili to veľmi vysoké hodnoty pH, ktoré dosahovali až hodnoty 11,2.

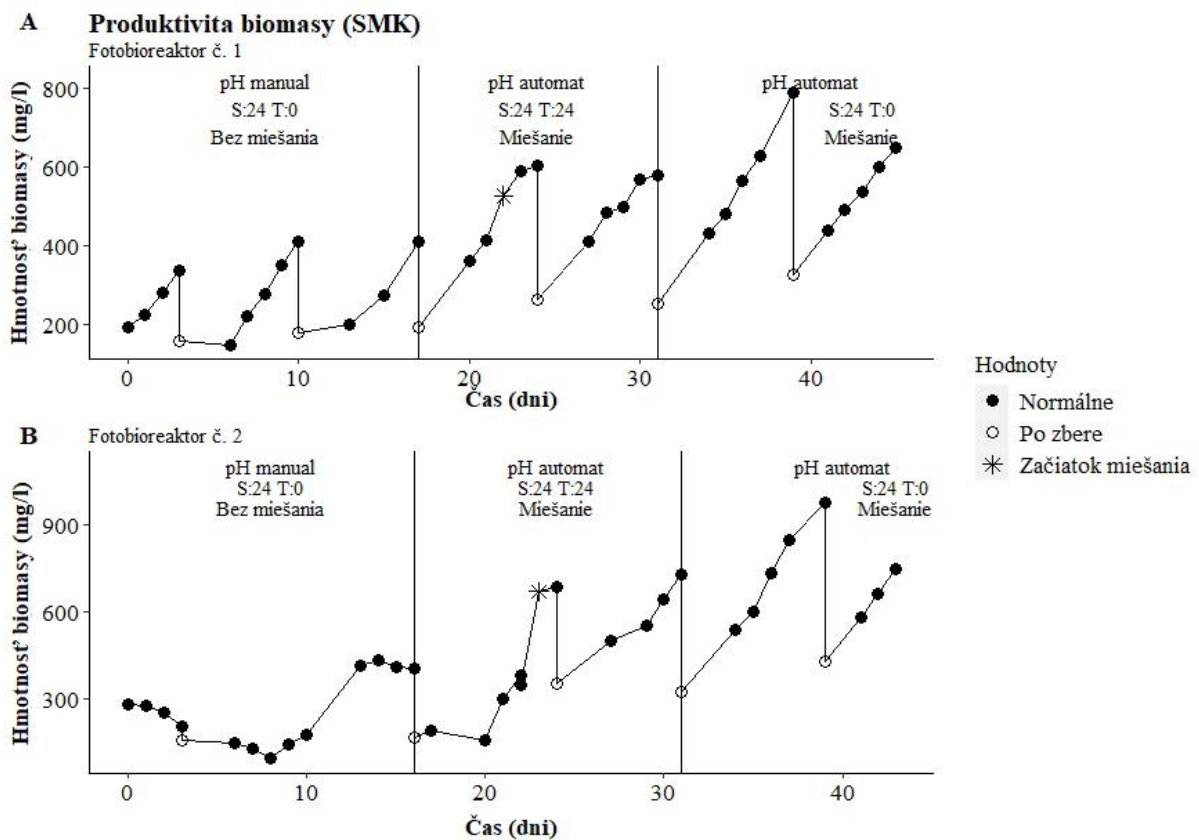
V reaktore č. 2, kde bol kultivovaný kmeň *S. obliquus* KN05, som zaznamenal v prvých týždňom pokles biomasy namiesto jej produkcie. Pôvodne som predpokladal, že živnom médiu je nedostatok nejakej konkrétnej živiny a tým pádom limituje produkciu biomasy. Po odobratí biomasy sa produkcia na krátky čas zvýšila, ale po pár dňoch som zaznamenal opätovný pokles. Reaktor nevykazoval žiadnu prítomnosť kontaminácie baktériami a bunky vyzerali fyziologicky v poriadku. Kontamináciu som tým pádom ako príčinu poklesu produkcie vylúčil. Po čase som zistil, že bunky kmeňa KN05 omnoho rýchlejšie sedimentujú než bunky kmeňa KN14 a sila prúdenia média nie je dostačujúca na to, aby väčšinu buniek udržala v médiu. Bunky veľmi rýchlo sedimentovali na dno a časť z nich už prúdenie nevnieslo späť hore. To malo za príčinu veľmi nízke hodnoty absorbancie z čoho som usúdil, že v reaktore sa neprodukuje žiadna biomasa.



Od 17. dna kultivácie som začal biomasu v oboch reaktoroch vymiešavať aj manuálne pomocou akvaristického magnetického stierača. V reaktore č. 2 sa koncentrácia biomasy zvýšila z 348,1 až na 669,5 mg/l (Obr. 32B). To znamená, že viac ako polovica vyprodukovanej biomasy klesla na dno a po spustení aerácie už nevystúpila naspäť do supernatantu. Po každodennom manuálnom vymiešavaní sa podobná situácia s poklesom biomasy už neopakovala.



Obr. 31: Množstvo biomasy vo fotobioreaktoroch

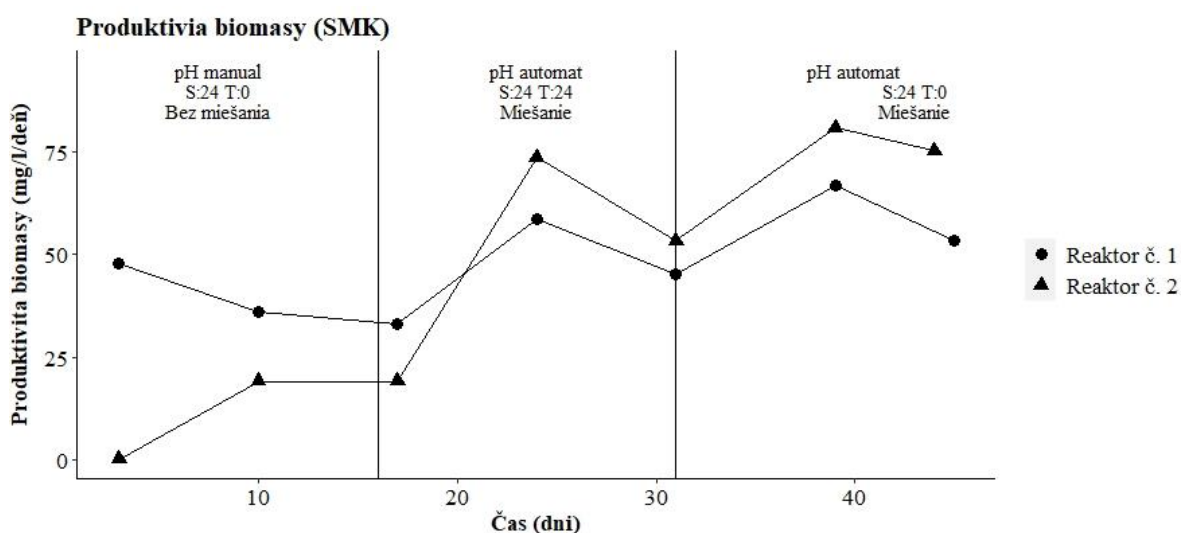


Obr. 32: Produktivita suchej biomasy v reaktoroch; pH manuál – manuálne dodávanie CO<sub>2</sub>; pH automat – automatické dodávanie CO<sub>2</sub>; S – svetlo, T – tma; miešanie – miešanie média pomocou akvaristického stierača.



Zvýšenie koncentrácie biomasy po prvom manuálnom vymiešaní som zaznamenal aj v reaktore č. 1, ale nie až tak výrazný ako v reaktore č. 2. Koncentrácia biomasy sa zvýšila zo 416,5 na 526 mg/l (Obr. 32A). Bunky kmeňa *S. acutus* majú podlhovastý elipsový tvar, čo pravdepodobne umožnilo bunkách ľahšie sa udržať vo vodnom stĺpci. Bunky kmeňa *S. obliquus* majú bunky okrúhle a klesajú tak omnoho rýchlejšie.

Počas kultivácie som testoval aj rôzne svetelné režimy (príloha 4). Vyššiu produkciu biomasy som zaznamenal pri neustálom svetle, než pri kombinácii svetla a tmy. Pri striedaní svetla a tmy svietili na jeden reaktor obidve lampy tým pádom mali viac energie než pri neustálom svetle, keď na reaktor svietila len jedna lampa. Dve lampy však nezvýšili produkciu biomasy na takú úroveň, aby dokázala kompenzovať nulovú produkciu počas tmavej fázy a zvýšiť tak celkovú dennú produkciu biomasy. Denná produkcia biomasy pri striedaní svetla a tmy bola v 45,1 – 58,5 mg/l/deň (Reaktor č. 1) a 53 – 73 mg/l/deň (Reaktor č. 2). Pri neustálom svetle bola denná produkcia 53,2 – 66,9 mg/l/deň a 75,3 – 80,9 mg/l/deň (Obr. 32).

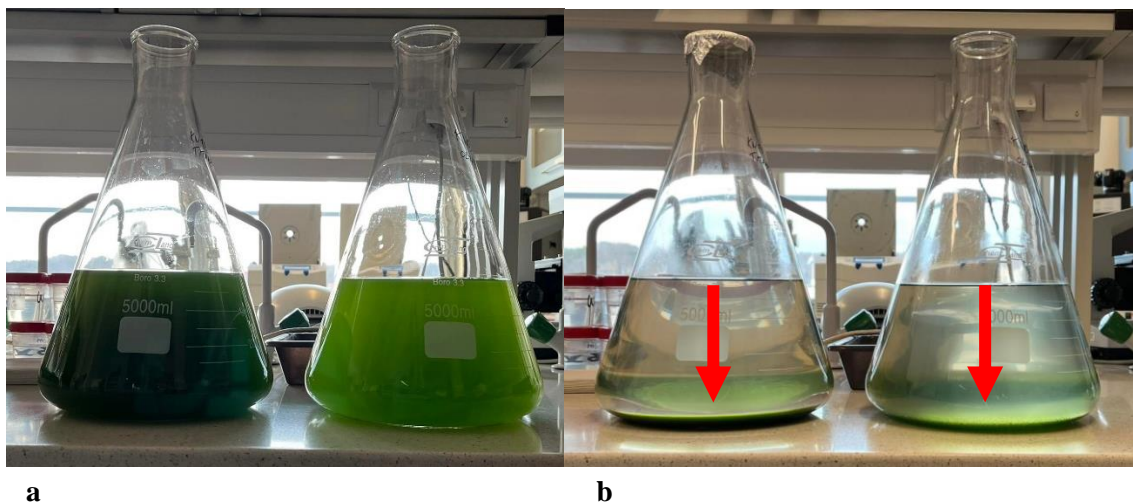


Obr. 33: Denná produktivita biomasy v reaktoroch.

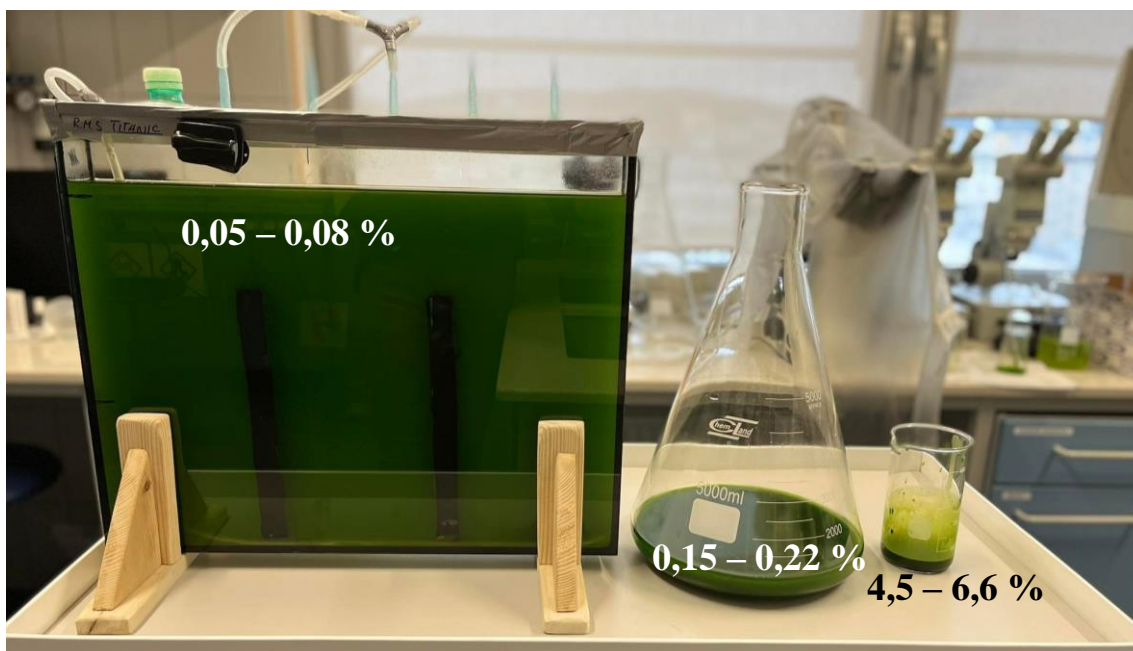
## Zber biomasy

Pri zbere biomasy som sa snažil využívať energeticky nenáročné techniky, pri ktorých je strata biomasy čo najnižšia (príloha 7). Percentuálna koncentrácia biomasy v reaktore počas zberu bola približne od 0,06 do 0,08%. Po sedimentácii sa koncentrácia zvýšila na 0,16 až 0,21%. Na prvý pohľad vyzerá zahustenie biomasy pomocou sedimentácie veľmi nízke ale celkový objem média sa znížil o 62,5% (zo 4 litrov na 1,5 litra). Takmer všetka biomasa sedimentovala na dno banky a pri odstránení hornej vrstvy boli straty biomasy veľmi nízke (Obr. 34). Pri sedimentácii je však nutné banky umiestniť do úplnej tmy, inak časť biomasy zostane v hornej vrstve a hrozia veľké straty pri jej odstraňovaní (príloha 5). Biomasu som následne centrifugoval a zakonzervoval na 4,5 až 6,6% (Obr.

35). Maximálny objem centrifúgy bol 0,24l a sedimentovanú biomasu bolo nutné centrifugovať 7 krát ( $1,5 / 0,24 = 7$ ). Bez predchádzajúceho zakoncortovania by som musel biomasy centrifugovať až 17 krát. Vďaka sedimentácií, pri ktorej nie je potrebné dodávať energiu, som pri nasledujúcim kroku ušetril až 58% energie.



Obr. 34: Sedimentácia (sedimentácia biomasy za 16 hodín)



Obr. 35: Objemový pomer medzi biomasou pred a po zakoncortovaní; % znázorňujú množstvo gramov na liter, reaktor predstavuje nezakoncortovanú biomasu, v banke je zakoncortovaná biomasa po sedimentácií 4 litrov média, v kadičke je vysedimentovaná biomasa z banky po zakoncortovaná centrifugácií.

## Porovnanie fotobioreaktorov

Aj napriek tomu, že kmeň *S. obliquus* KN05 mal horšie výsledky prvej časti mojich experimentov (pozri tab. 1 a 2) než kmeň *S. acutus* KN14, v kultivácii nijak nezaostával, ale práve naopak. Kmeň KN05 po približne 22. dni kultivácie, kedy som odstránil väčšinu chýb (manuálne vymiešavanie a automatické dodávanie pH) a stabilizoval kultiváciu, v produkcii biomasy predbehol kmeň KN14 v reaktore č. 1. Kmeň KN05 v reaktore č. 2 dosiahol aj maximálnu záznamnému dennú produkciu biomasy, a to 80 mg/l/deň (Obr. 32), čo je približne 3 krát viac než v kultivačných bankách.

Čo sa týka obťažnosti kultivácie, kmeň KN14 v reaktore č. 1 bol efektívnejší a nenáročnejšie než kmeň KN05 v reaktore č. 2. Produkcia biomasy kmeňa KN14 bola od začiatku bez problémová a počas celej kultivácie som nezaznamenal nijaký výrazný pokles alebo stagnáciu produkcie biomasy (Obr. 32A). Sila aerácie bola dostačujúca na to, aby po prestávke všetky bunky opäť vystúpili nahor a biomasa sa rovnomerne rozložila v reaktore. Po začatí manuálneho vymiešavania sa množstvo biomasy v supernatante reaktora nijak výrazne nezvýšila (Obr. 32A).

V reaktore č. 2 s kmeňom KN05 bola kultivácia o niečo obťažnejšia. Okrúhle bunky kmeňa *S. obliquus* neboli dostačujúce na to, aby po prestávke medzi intervalmi aerácie bola jej sila dostačujúca na homogenizáciu biomasy. Bolo preto nutné raz denne reaktor vymiešavať aj manuálne. Po prvom vymiešaní stúpila koncentrácia biomasy v supernatante reaktora z 350 na 670 mg/l, čo je takmer o 50%. S manuálnym vymiešavaním bola produkcia v reaktore č. 2 stabilná a podobná reaktoru č. 1.

## 3.5. Extrakcia lipidov a produkcia biodiesla

Po skončení kultivácie biomasy v reaktoroch som dohromady vyprodukoval 30 g suchej biomasy. Na produkciu biodiesla som použil 21,7 g suchej biomasy (Obr. 36), čo bola suma suchej biomasy vyprodukovanej

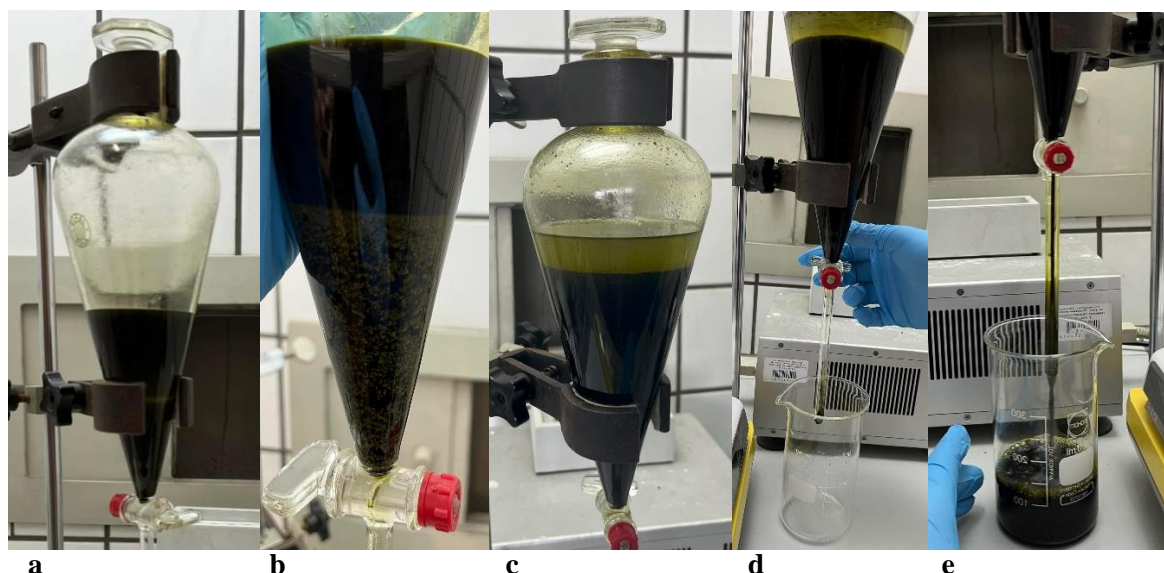


Obr. 36: Príprava suchej biomasy; Obrázok vľavo sú veľké kusy suchej biomasy vysušené v peci; obrázok vpravo je rozdrvená suchá biomasa na prach v mažiari.

za 39 dní kultivácie. Zvyšných 8g suchej biomasy bola suma z celkového objemu obidvoch reaktorov po ukončení kultivácie. Zo zvyšných 8 g biomasy som len extrahoval lipidy, pretože na produkciu biodiesla bol vyextrahovaný objem veľmi malý.

Z 21,7 g suchej biomasy sa mi podarilo vyextrahovať 4,8 g surových lipidov a tým pádom bol obsah lipidov bol 22,3%. Kvôli efektívnejšej extrakcii a ušetrení času som lipidy extrahoval z biomasy obidvoch reaktorov naraz a nemôžem preto určiť obsah lipidov pre jednotlivé kmene.

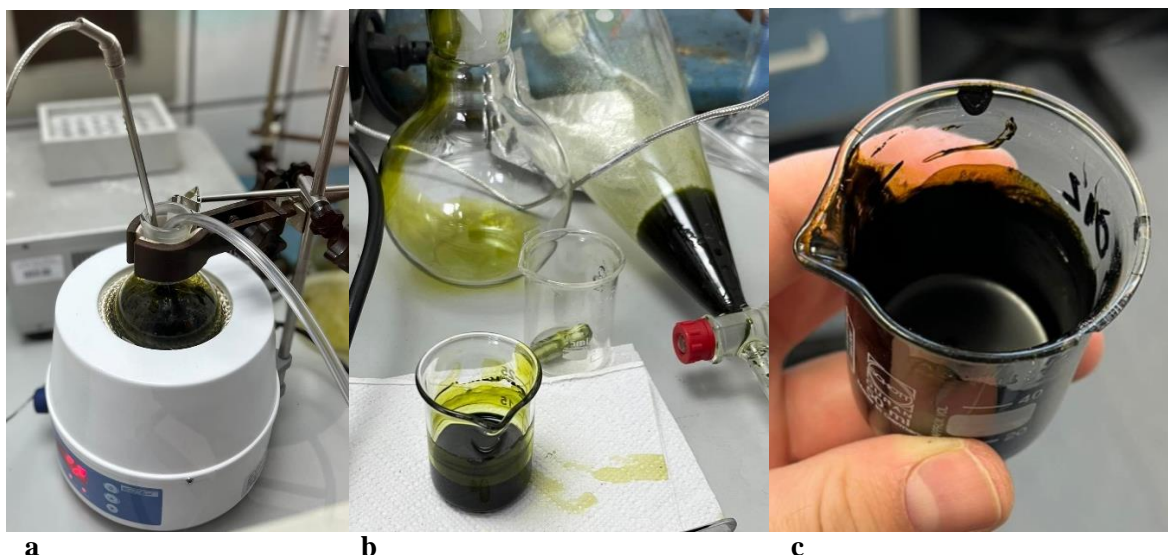
Vyextrahované surové lipidy mali hustú konzistenciu čiernej farby, čo bolo spôsobené pravdepodobne chlorofylom (Obr. 37, 38). Ten je nutné pred transesterifikáciou odstrániť pomocou chromatografie (gélovej alebo plynovej). Tento krok som musel však vynechať, pretože potrebné vybavenie som v tom čase nemal k dispozícii. Objem surových lipidov bol však veľmi nízky, a preto som k nim primiešal ešte 20 ml prepáleného kuchynského oleja. Vytvoril som tak zmes olejov v pomere 1:5, ktorú som následne transesterifikoval.



Obr. 37: Extrakcia lipidov pomocou zmesi chloroform – metanol; a: rozrušenie buniek pomocou metanolu; b: pridanie chloroformu; c: pridanie roztoku 0,9% NaCl a vytvorenie bifázického rozdelenia; d,e: odstraňovanie dolnej vrstvy s chloroformom a lipidmi.

Po transesterifikácii som výslednú zmes biodiesla a glycerolu následne centrifugoval pri 2000 otáčkach za minútu, aby sa zmes rýchlejšie bifázicky rozdelila. Kvôli chlorofylu, ktorý bol rozpustený v obidvoch fázach bolo oddelenie veľmi náročné. Na dne centrifugačnej kyvety bola však hustá usadenina, v ktorej bol pravdepodobne glycerol s chlorofylom. Objem usadeniny bol približne 5 ml, čo by odpovedalo očakávanému objemu oddeleného glycerolu.





Obr. 38: Odparovanie chloroformu a: odparovanie organického rozpušťača chloroformu zahrievaným vo variči a odvetraný plynným dusikom; b: posledných 20 ml zmesi, ktoré odparoval na indukčnom variči; c: finálne surové lipidy.

Výsledný biodiesel som testoval zapálením na vate a pozoroval som intenzitu a dĺžku horenia. Ako kontrolu som použil všetky horľavé látky, ktoré by zmes mohla obsahovať, ak by transesterifikácia neprebehla, a to metanol, zmes olejov (olej z rias + prepálený) a čistý prepálený olej. Z každej horľaviny som použil 600  $\mu\text{l}$  a pomocou pipety som ich umiestnil na kúsok vaty. Všetky kontrolné horľaviny horeli iba 10 až 15 sekúnd a prepálený olej nehorel vôbec. Vata s biodieslom horela približne 2 minúty. To je dokaz toho, že transesterifikácia prebehla úspešne a horľavá látka bola skutočne biodiesel a nie metanol, ktorý bol použitý pri transesterifikácii. Ak by transesterifikácia neprebehla tak by v 600  $\mu\text{l}$  zmesi biodiesla bolo približne 120  $\mu\text{l}$  metanolu, čo je tak isto horľavá látka.



Obr. 39: Test horľavosti finálneho biodiesla (vľavo biodiesel a vpravo vata s olejom)

Metanol by však zhorel omnoho rýchlejšie než horela vata s biodieslom. Zmes olejov na rozdiel od čistého prepáleného oleja horela pravdepodobne kvôli zostatku chloroformu, ktorý bol použitý počas

Tab. 5: Porovnanie efektivity jednotlivých režimov; pri semikontinuálnom režime je produktivita biomasy a lipidov uvedená ako priemer dennej produkcie od 24. dna kedy bola kultivácia najefektívnejšia, obsah lipidov je uvedený ako priemer obidvoch reaktorov.

	<b>Biomasa mg/l</b>	<b>Lipidy mg/l</b>	<b>Produktivita biomasy (mg/l/deň)</b>	<b>Produktivita lipidov (mg/l/deň)</b>	<b>Obsah lipidov (%)</b>
<b>Jednostupňový režim</b>					
Štandard	643,924 ±9,964	98,488 ±5,995	35,733 ±0,554	5,464 ±0,333	15,288 ±0,766
85,5 mM/l	329,938 ±30,567	84,760 ±7,933	18,289 ±1,698	4,701 ±0,441	<b>25,697</b> ±0,776
171 mM/l	18,688 ±3,114	4,399 ±2,310	0,998 ±0,173	0,237 ±0,128	15,931 ±6,338
256,5 mM/l	17,188 ±1,604	1,041 ±0,268	0,914 ±0,089	0,050 ±0,015	5,991 ±1,112
342 mM/l	16,188 ±1,339	2,250 ±0,362	0,859 ±0,074	0,117 ±0,020	14,058 ±2,980
<b>Dvojstupňový režim</b>					
Štandard	420,737 ±28,907	87,00 ±7,335	33,187 ±0,891	4,60 ±0,123	14,529 ±0,855
85,5 mM/l	442,579 ±24,261	89,23 ±11,829	30,731 ±1,818	4,95 ±0,657	16,048 ±1,179
171 mM/l	458,368 ±5,867	93,30 ±2,552	30,029 ±0,202	5,18 ±0,142	<b>17,244</b> ±0,551
256,5 mM/l	443,500 ±22,455	77,76 ±1,866	28,179 ±1,604	4,31 ±0,104	15,370 ±1,099
342 mM/l	454,421 ±25,035	88,21 ±8,708	28,633 ±1,070	4,89 ±0,484	17,082 ±1,389
<b>Semikontinuálny režim</b>					
Reaktor č. 1	-	-	55,94 ±7,92	12,86 ±1,82	22,32
Reaktor č. 2	-	-	<b>70,81 ±10,41</b>	<b>16,28 ±2,39</b>	

extrakcie. Výsledný objem získaného biodiesla bol 20 ml a 5 ml glycerolu čo je 80% výtťažnosť transesterifikácií (Obr. 39).

### Prepočet mnou získaných dát na produkciu 1t biodiesla.

Na produkciu 4,8 g surových lipidov z rias bolo potrebných 48 l média a 39 dní kultivácie. Ak by bola počas celej doby kultivácie maximálna dosiahnutá denná produkcia lipidov, a to 80 mg/l/deň a koncentrácia biomasy pri zbere 1g/l/deň, bolo by možné dobu kultivácie skrátiť na 21 dní. Pri

maximálnej produkcii reaktorov, ktorú som dosiahol po odstránení chýb a zefektívnení kultivácie, by som získal za 21 dní približne 3,84 g biodiesla (ak je účinnosť transesterifikácia 80%).

Ak by som chcel za týždeň pri týchto podmienkach vyprodukovať 1 tonu biodiesla, potreboval by som kultivačnú nádrž s objemom 416 kubíkov. Najekonomickejšia možnosť ako kultivovať riasy na biodiesel je v race-way nádrži. Aby nádrž dosahovala požadovaného objemu, museli by dosahovať rozmerov  $6 \times 240$  m ak by mali hĺbku 30 cm, čo je maximálna efektívna hĺbka. Plocha potrebná na vyprodukovanie 1 tony 100 % biodiesla z rias za 3 týždne by bola približne 1440 m<sup>2</sup>. Tento objem ako aj čas je možné skrátiť pomocou primiešania prepáleného oleja k lipidom z rias.

Tieto výpočty sú samozrejme len teoretické a skutočnosti sa môžu veľmi líšiť od podmienok okolia, kde budú riasy kultivované. Výpočty slúžia len ako teoretický príklad, aká veľká plocha by bola potrebná na vypestovanie dostatočného množstva biomasy na tvorbu 1 tony biodiesla, za rovnakej produkcie akú som zaznamenal pri mojich experimentoch.

# DISKUSIA

## 4.1 Koncentrácia NaCl

Pri použití molárnej koncentrácie NaCl v rozsahu 0,08 až 1,2 mM/l nemala salinita nijaký vplyv na produkciu biomasy ani lipidov (Obr. 14). Koncentrácia bola príliš nízka na to, aby mohla byť považovaná za stresový faktor. Podobné výsledky dosiahli aj autori Kirroliya, Bishnoi & Singh (2011), ktorí použili rovnakú molárnu koncentráciu NaCl, a to od 0,2 do 1 mM/l. Aj napriek tomu, že autori používali iné živné médium, silnejšie svetlo a kratšiu dobu kultiváciu, naše výsledky sa takmer zhodovali. Tým pádom môžem vylúčiť možnosť, že nízke rozdiely boli spôsobené zlým alebo iným nastavením experimentov. Podľa Kirroliya, Bishnoi & Singh (2011) daná koncentrácia nijak významne neovplyvnila ani obsah lipidov bunkách, ktorý sa pohyboval okolo hodnoty 6,5 %. Podobný obsah lipidov som zaznamenal aj ja pri podobných kmeňoch, ktoré sú príbuzné druhu *S. quadricauda*, ako použili autori, a to od 4 až 8,6 %. Prvý významný rozdiel produkcií biomasy a lipidov som zaznamenal až pri koncentracii 85,5 mM, čo je približne 5 g/l NaCl, kedy denná produkcia biomasy klesla o 50 % oproti kontrole. Po prevýšení molárnej koncentrácie 171 mM/l NaCl sa biomasa takmer vôbec neprodukovala. V mnohých publikáciách, v ktorých autori používali podobne vysoké koncentrácie, však zaznamenali produkciu biomasy aj pri vyšších koncentraciách od 171 do 350 mM/l NaCl (Gan et al. 2016; Rocha et al. 2019; Anand et al. 2021). Autori však použili omnoho väčšie inokulum, ktoré už na začiatku experimentu dosahovalo hodnoty absorbancie 0,2 pri 664 nm. V mojom prípade však na začiatku experimentu absorbancia dosahovala približne hodnoty 0,02. Pri použití hustejšieho inokula je pravdepodobne stres na jednotku biomasy omnoho nižší a riasy tak dokážu produkovať biomasu aj pri vyšších hodnotách salinity.

Vo väčšine publikácií autori uvádzajú, že produktivita biomasy negatívne koreluje so zvyšujúcou sa koncentraciou NaCl (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Gan et al. 2016; Rocha et al. 2019; Anand et al. 2021) rovnako ako som zaznamenal aj ja. Gour, Garlapati & Kant (2019) však zaznamenali pri koncentracii 80 mM/l NaCl väčšiu produktivitu biomasy než v kontrole a vo vyšších koncentraciách bola produkcia biomasy o niečo menšia alebo rovná kontrole (Tab. 6). To sa výrazne líši od mojich výsledkov ako aj výsledkov väčšiny iných publikácií.

Korelácia percentuálneho obsahu lipidov a koncentrácie NaCl sa vo výsledkoch z rôznych publikácií veľmi líšila. Podľa niektorých publikácií zaoberajúcich sa touto tematikou by mala byť medzi koncentraciou NaCl a obsahom lipidov pozitívna korelácia (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Gan et al. 2016; Rocha et al. 2019). Rocha et al. (2019) použili tri rôzne kultivačné režimy a zaznamenali pozitívnu koreláciu vo všetkých režimoch. Najvyšší celkový obsah lipidov zaznamenali v dvojstupňovom režime. Ja som pozitívnu koreláciu zaznamenal iba v dvojstupňovom režime, ale rozdiely medzi koncentraciami boli len veľmi nepatrné a štatisticky nesignifikantné. Pri



jednostupňovom režime bol obsah lipidov najvyšší pri koncentrácií 85,5 mM/l NaCl. Pri vyššej koncentrácií NaCl obsah lipidov klesol aj pod úroveň kontroly. Veľmi podobné výsledky uvádzajú aj Gour, Garlapati & Kant (2019) a Anand et al. (2021), ktorí zaznamenali najvyšší obsah lipidov v rozmedzí od 100 až 160 mM/l NaCl a pri koncentrácií nad 300 mM/l obsah lipidov výrazne klesol. Zvyšovanie obsahu lipidov pomocou salinity podľa výsledkov nie veľmi jednoznačné a pravdepodobne je podmienený ešte iným neznámym faktorom alebo v metódach analýzy lipidov, čo by vysvetľovalo veľké rozdiely po výsledkoch.

Tab. 6: Efekt salinity na rýchlosť rastu, obsahu lipidov a produktivity podľa autorov Gour, Garlapati & Kant (2019)

Media (mM)	Specific growth rate ( $\mu\text{day}^{-1}$ )**	Doubling per day (K)*	Biomass ( $\text{g l}^{-1}$ )	Biomass productivity, Bp ( $\text{g l}^{-1} \text{day}^{-1}$ )	Lipids content, Lc (%)*	Lipid productivity, Lp ( $\text{mg l}^{-1} \text{day}^{-1}$ )
BG-11 media						
Control	0.117 <sup>ab</sup>	0.169 <sup>ab</sup>	0.746 <sup>a</sup>	0.049 <sup>a</sup>	26.58 <sup>b</sup>	13.02 <sup>a</sup>
40	0.133 <sup>b</sup>	0.193 <sup>b</sup>	0.760 <sup>a</sup>	0.050 <sup>a</sup>	29.18 <sup>b</sup>	14.59 <sup>a</sup>
80	0.112 <sup>a</sup>	0.162 <sup>ab</sup>	0.583 <sup>a</sup>	0.038 <sup>a</sup>	28.46 <sup>b</sup>	10.81 <sup>a</sup>
160	0.098 <sup>a</sup>	0.141 <sup>ab</sup>	0.678 <sup>a</sup>	0.045 <sup>a</sup>	30.70 <sup>b</sup>	13.81 <sup>a</sup>
320	0.088 <sup>a</sup>	0.127 <sup>a</sup>	0.624 <sup>a</sup>	0.041 <sup>a</sup>	12.28 <sup>a</sup>	05.03 <sup>a</sup>
CHU-10 media						
Control	0.089 <sup>a</sup>	0.129 <sup>a</sup>	0.485 <sup>a</sup>	0.032 <sup>ab</sup>	17.16 <sup>bc</sup>	5.42 <sup>b</sup>
40	0.114 <sup>a</sup>	0.165 <sup>a</sup>	0.553 <sup>a</sup>	0.036 <sup>c</sup>	15.06 <sup>b</sup>	5.42 <sup>b</sup>
80	0.098 <sup>a</sup>	0.142 <sup>a</sup>	0.458 <sup>a</sup>	0.030 <sup>a</sup>	18.16 <sup>c</sup>	6.42 <sup>b</sup>
160	0.088 <sup>a</sup>	0.127 <sup>a</sup>	0.524 <sup>a</sup>	0.0349 <sup>bc</sup>	18.42 <sup>c</sup>	6.42 <sup>b</sup>
320	0.090 <sup>a</sup>	0.130 <sup>a</sup>	0.483 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	07.61 <sup>a</sup>	2.43 <sup>a</sup>

\*Significant at  $\alpha=5\%$ , \*\* Significant at  $\alpha=1\%$ , \*\*\* Significant at  $\alpha=0.1\%$ , level of significance. a–g means in the column with same superscript letter are not significantly different ( $\alpha=0.05$ ) as measured by 2-sided Tukey's post hoc range test between isolates

Veľmi jednoznačný je však negatívny vplyv salinity na produkciu biomasy a rozdiely sú len v jeho intenzite. Takmer všetky publikácie, ktoré použili gradient koncentrácie v rozmedzí podobnému môjmu, uvádzajú negatívnu koreláciu medzi salinitou a produkciou biomasy. V mojich experimentoch som zaznamenal pokles produkcie biomasy oproti kontrole už pri najnižšej použitej koncentrácií 85,5 mM/l. Gour, Garlapati & Kant (2019) však použili nižšiu koncentráciu NaCl ako ja, a to 40 mM/l, pri ktorej zaznamenali naopak vyššiu produkciu biomasy než v kontrole (Tab. 6). Najvyššia koncentrácia, ktorú som použil v prvej časti mojich experimentov bola 1,2 mM/l. Pri danej koncentrácií som nezaznamenal nijaký výrazný nárast produkcie biomasy, rovnako ako aj Kirrolia, Bishnoi & Singh (2011). Tým pádom poznáme približnú dolnú hranicu, pri ktorej koncentrácia NaCl prestáva mať vplyv na produkciu biomasy. Pri experimentoch s vodou z ČOV som použil 20 mM/l NaCl, ale ani pri tejto koncentrácií som nezaznamenal výraznú zmenu. Z výsledkov vyplýva, že optimálna koncentrácia NaCl na kultiváciu riasy *Scenedesmus* sp. je v rozmedzí približne od 40 do 80 mM/l NaCl.

## 4.2. Denná produktivita lipidov

Najdôležitejším parametrom pri kultivácii rias za účelom produkcie biopalív je denná produktivita lipidov. Vysoký obsah lipidov nie je záruka efektívnej kultivácie, pretože vysoký negatívny vplyv salinity na produkciu biomasy znižuje aj výsledný objem získaných lipidov. Podľa mojich výsledkov z tretej časti experimentov bola najefektívnejšia denná produkcia lipidov v kontrolnej skupine, a to 5,45 mg/l/deň. Už 85,5 mM/l NaCl bol negatívny vplyv v jednostupňovom režime tak vysoký, že ani zvýšený obsah lipidov nedokázal vykompenzovať stratu biomasy, aby celková suma vyprodukovaných lipidov bola vyššia než pri kontrole. Pri dvojestupňovom režime bola denná produkcia lipidov približne rovnaká alebo mierne vyššia ako v kontrole. Rovnaké výsledky zaznamenali aj Gan et al. (2016) a Roch et al. (2019) vo všetkých typoch kultivačných režimoch. To znamená, že kultivácia rias rodu *Scenedesmus* pri salinite vyššej ako približne 80 mM/l NaCl prestáva byť finančne efektívna. Na druhej strane pri použití koncentrácie 40 mM/l ako uvádzajú Gour, Garlapati & Kant (2019) je možné zvýšiť dennú produkciu lipidov tak, aby prevyšovala kontrolnú skupinu. V mojom prípade som podobný výsledok zaznamenal pri kultivácii rias vo vode z ČOV. Okrem toho, že 2 z 3 testovacích kmeňov dosiahli vyššiu dennú produkciu biomasy než kontrolná skupina bez NaCl, bol oproti kontrole aj vyšší obsah lipidov, čo prispelo k zvýšeniu dennej produkcie lipidov všetkých testovacích kmeňov (Obr. 20).

Gour, Garlapati & Kant (2019) uvádzajú však veľmi odlišné výsledky a najvyššiu dennú produkciu lipidov dosiahli pri koncentracii 160 mM/l (Tab. 6), čo by vyvrátilo moje tvrdenie, že kultivácia pri vysokých hodnotách salinity je neefektívna. Autori testovali tri druhy rias, a to *Scenedesmus dimorphus*, ktorý je veľmi príbuzný môjmu kmeňu *Scenedesmus obliquus* KN05, ďalej *Scenedesmus quadricauda* a *Chlorella* sp. Všetky tri kmene dosiahli najvyššiu dennú produkciu lipidov pri 160 mM/l NaCl. Tieto výsledky sa výrazne líšia od mojich, ako aj od Kaewkannetra, Enmak & Chiu (2012), Gan et al. (2016) a Roch et al. (2019). Stresový faktor ako je napríklad salinita je nutné z finančného hľadiska brať ako extra výdaj a použiť ho len v prípade očakávania efektívnejšieho výsledku. Podľa výsledkov Gour, Garlapati & Kant (2019) bol nárast dennej produkcie lipidov pri danej koncentracii o 13 až 35 %, čo by bezproblémovo pokrylo náklady za stresový faktor a kultivácia by tak bola efektívnejšia. Podľa mojich výsledkov ako aj väčšiny ostatných autorov by však použitie stresového faktoru naopak znížilo dennú produkciu lipidov a jeho použitie by bolo v danom prípade neefektívne a stratové.

### 4.3. Obsah lipidov

Obsah lipidov zelenej riasy *Scenedesmus* sp. v rámci druhu je veľmi variabilný a pri výbere kmeňa na kultivácie je dôležité kmeň určiť aspoň do podrodu *Acutodesmus* alebo *Desmodesmus*. Podľa viacerých publikácií sú kmene patriace do podrodu *Acutodesmus* omnoho efektívnejší zdroj lipidov než kmene z podrodu *Desmodesmus* (Gour, Garlapati & Kant 2019; Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012, Covell et al. 2020). Obsah lipidov je veľmi variabilný aj v rámci jedného kmeňa a ovplyvňuje ho hlavne doba kultivácie, kultivačné médiu a stres. Pri testovaní všetkých kmeňov v médiu BBM s nízkou koncentráciou NaCl počas 35 dní som zaznamenal obsah lipidov v rozmedzí 3 až 12% (Tab. 2). S podobnými výsledkami prichádzajú aj Gour, Garlapati & Kant (2019), ktorí v médiu CHU-10 zaznamenali o 50 % nižší obsah lipidov v biomase než v médiu BG-11. Môj kmeň *S. obliquus* KN05 pri nízkej salinite dosiahol percentuálny obsah lipidov len 3,3 %. Rovnaký kmeň KN05 však v médiu BG-11, intenzívnejšom svetle a kratšej dobe kultivácie dosiahol bez NaCl obsah lipidov približne 15 % a pri 85,5 mM/l NaCl až 25 % (Obr. 25). Obsah lipidov 25 % dosiahnutý kmeňom KN05 je zároveň najvyšší obsah lipidov, ktorý som zaznamenal počas celej práce.

V porovnaní s ostatnými autormi, ktorí ako stresový faktor použili vyššie koncentrácie NaCl, je 25 % mierne nadpriemerom (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Gan et al. 2016; Roch et al. 2019). Roch et al. (2019) zaznamenali obsah lipidov pri rovnakom nastavení experimentu pri jednostupňovom režime od 9 do 14 % a pri dvojestupňovom 12 až 22 %. Na druhej strane Kaewkannetra, Enmak & Chiu (2012), Kudahettige, Pickova & Gentili (2018) pri extrémne vysokých koncentráciách 600 až 3000 mM/l NaCl zaznamenali ďaleko vyšší obsah lipidov, a to 32 až 40%.

Vyššie percento obsahu lipidov je možné dosiahnuť aj pri nižších koncentráciách NaCl, a to kombináciou s iným stresom. Anand et al. (2021) sa podarilo zvýšiť obsah lipidov z 21 na 38 % kombináciou 100 mM/l NaCl a dusíkovým deficitom. Veľmi efektívna kultivácia podľa Liu et al. 2022 je pri kombinácii salinity a xylózy. Prítomnosť xylózy v médiu umožní riasam vyživovať sa mixotrofne a majú tak omnoho väčší a stabilnejší zdroj uhlíka. Pri mixotrofnej výžive sa produktivita biomasy zvýšila takmer 5 násobne, čím sa znížil negatívny dopad salinity. Autori, ako testovací druh použili *S. quadricauda*, ktorý v kontrolnom médiu dosahoval veľmi nízkej produkcie biomasy, ale mal relatívne vysoký obsah lipidov približne 20%, čo je viac ako dosahoval v kontrole môj *S. obliquus* KN05. Zdanlivo neefektívny kmeň vďaka mixotrofnej výžive zvýšil produktivitu biomasy a v kombinácii so salinitou dosiahol aj vyššieho obsahu lipidov, a to takmer 40%. Pri mojich experimentoch s kmeňom *S. obliquus* KN05 som najvyššiu dennú produkciu zaznamenal v kontrole bez NaCl, a to bolo 5,5 mg/l/deň (Obr. 22). Denná produktivita lipidov riasy *S. quadricauda*, ktorú uvádzajú Liu et al. 2022 v kontrole bez xylózy a NaCl je 2,8 mg/l/deň ale vďaka kombinácii mixotrofie a salinity ju dokázali zvýšiť až na 40 mg/l/deň.

#### 4.4. Najefektívnejšie kmene ako zdroj lipidov

Z mnou vyizolovaných kmeňov by som na kultiváciu za účelom výroby biodiesla, určite vybral kmene *Scenedesmus obliquus* KN05, *Scenedesmus acutus* KN14, *Scenedesmus dimorphus* KN02, *Scenedesmus intermedius* KN07 a *Scenedesmus spinosus* KN17. Kmeň KN05 počas experimentov dosiahol celkom vysokú dennú produkciu biomasy aj lipidov. Pri kultivácii vo fotobioreaktoroch dokázal bez problémov konkurovať kmeňu KN14, ktorý dosiahol v prvej časti ďaleko vyššie hodnotenie. Vo fotobiorekatore kmeň KN05 dokonca prekoval kmeň KN14 v dennej produkcii biomasy takmer o 20 mg/l/deň. Druh *S. obliquus* pozitívne hodnotí aj množstvo iných autorov ako veľmi efektívny a potenciálny zdroj lipidov (Kaewkannetra, Enmak & Chiu 2012; Gan et al. 2016; Gour, Garlapati & Kant 2019; Roch et al. 2019;). Obsah lipidov samotného kmeňa KN14 počas kultivácie v médiu BG-11 som presne neanalyzoval, ale po zmiešaní biomasy kmeňa KN14 a KN05 sa obsah lipidov v BG-11 bez NaCl zvýšil zo 15% na 23% (extrahovať lipidy samostatne by bolo časovo veľmi náročné). Ak by vo fotobiorekatore bol obsah lipidov kmeňa KN05 bol rovnaký ako v kontrole počas experimentov, a to 15%, tak obsah lipidov KN14 musel byť minimálne 30%, aby sa po zmiešaní z biomasou KN05 zvýšil na 23%. Ako ďalší kmeň na kultiváciu by som odporučil *Scenedesmus dimorphus* KN02. V prvej časti mojich experimentov dosiahol podobných výsledkov ako KN05 a daný druh pozitívne hodnotia aj Gour, Garlapati & Kant (2019) a Kudahettige, Pickova & Gentili (2018). Autori uvádzajú, že daný kmeň môže dosiahnuť v médiu BG-11 až 28% obsah lipidov. Podľa mojej hodnotiacej tabuľky z prvých experimentov bol najlepšie hodnotený kmeň *Scenedesmus intermedius* KN07. Podľa iných autorov sa daný druh ako zdroj lipidov veľmi nepoužíval, alebo sa používajú pod názvom *Scenedesmus quadricauda*. Kvôli nedodatočným informáciám by som určite daný kmeň odporučil na ďalšie experimenty.

#### 4.5. Kultivácia vo fotobiorekatore

V poslednej časti mojej diplomovej práce som sa venoval konštrukcií vlastného fotobioreaktora a produkovaniu dostatočného množstva biomasy na produkciu vlastného biodiesla. Hlavným cieľom bolo získanie praktických skúsenosti vo veľkokultivácii rias, zefektívňovanie kultivácie, odstraňovanie nedostatkov a vyprodukovať čo najväčšie množstvo biomasy. Maximálnu dennú produkciu biomasy, ktorú sa mi podalo dosiahnuť bolo 70 mg/l/deň, čo bolo približne 2 krát viac ako v bankách pri jednostupňovom a dvojestupňovom režime (Obr. 22A, 24A, 32) . V porovnaní s ostatnými autormi je mnou dosiahnutá denná produktivita biomasy nízka ale rozhodne nie zanedbateľná. Rodolfi et al. (2009), ktorí kultivovali širokú škálu rôznych kmeňov rias v panelových fotobioreaktoroch uvádzajú, že riasa *Scenedesmus* sp. dosahovala maximálnej produkcie 200 až 260 mg/l/deň, čo je len približne 3 krát viac než som dosiahol ja (Obr. 32). Podobných výsledkov však dosiahli An et al. (2019), ktorí

taktiež kultivovali riasu *S. obliquus* v laboratórnych podmienkach a však v menšom valcovitom fotobioreaktore. Vo výsledkoch autori uvádzajú však len dennú produktivitu lipidov, a to 15,95 mg/l/deň, čo je veľmi podobné môjmu výsledku vo fotobioreaktore č. 2, a to 16,28 mg/l/deň. Vo väčšine štúdií sa však často uvádza skôr plošná produktivita než objemová. V prepočetne 70 mg/l/deň na plochu môjho fotobioreaktora, kde svietilo svetlo, je približne 2,8 g/m<sup>2</sup>/deň. Mnou dosiahnutá produkcia oproti zaužívaným fotobioreaktorom je opäť relatívne nízka. Vo výsledkoch štúdií, ktoré kultivovali riasy v race-way nádržiach uvádzajú plošnú produkciu v rozmedzí od 8 do 25 g/m<sup>2</sup>/deň a objemovú produktivitu približne 117 mg/l/deň. Vo fotobioreaktoroch je plošná produkcia od 14 až 60 g/m<sup>2</sup>/deň (Chisty 2007; Masojidek & Torzillo 2008; Narala et al. 2016; Liu et al. 2019). Jeden z najlepších výsledkov uvádzajú vo svojej štúdií Rocca et al. (2022), ktorí kultivovali riasy v panelových reaktoroch v tvare písmena V s nastavovateľným uhlom sklonu. Priemernú dennú plošnú produkciu biomasy dosiahli pri uhle 85 stupňov, a to 50,5 g/m<sup>2</sup>/deň a maximálnu 62 g/m<sup>2</sup>/deň. Autori dosiahli aj veľmi vysokých hodnôt objemovej produkcie, a to 3600 mg/l/deň, čo približne 50 krát viac ako som dosiahol vo svojich fotobioreaktoroch. Vysoké hodnoty dennej produkcie nad 1000 mg/l/deň sú bežné vo veľmi tenkých reaktoroch, ktoré umožňujú kultivovať riasy vo veľkej hustote bez toho, aby hrozilo zatienenie buniek v strede fotobioreaktora (Chisty 2007; Egbo, Okoani & Okoh 2018). Reaktor, ktorí použili Rocca et al. (2022), dosahoval hrúbky 10 cm, čo je približne 2 krát viac než môj reaktor. Vysokých hodnôt teda autori dosiahli dokonalým nastavením uhlu a tým pádom maximálne zefektívnilí absorbančiu svetla.

#### 4.6. Zber biomasy

Zber biomasy je jedna z najzložitejších častí kultivácie rias. Snažil som sa vybrať takú kombináciu metód, aby cena na gram získanej biomasy a strata biomasy boli čo najnižšie. Ako prvú metódu oddelenia biomasy od média som vybral sedimentáciu. Napriek tomu, že množstvo iných štúdií hodnotí sedimentáciu veľmi negatívne (Muylaert et al. 2017; Kumar et al. 2022; Yin et al. 2020), ja som bol s výsledkom spokojný a danú metódu by som zvolil aj pri kultivácii riasy *Scenedesmus* vo väčšej mierke. Ostatní autori kritizujú na sedimentácii hlavne dlhú dobu trvania, nízku efektivitu a veľké straty biomasy. S tým však nemôžem úplne súhlasiť, pretože podľa mojich výsledkov obidva testovacie kmene *S. obliquus* KN05 aj *S. acutus* KN14 sedimentovali takmer dokonale, dokonca aj po menšom rozrušení biomasy, pri odstraňovaní média, rýchlo sedimentovala späť (Obr. 34). Po sedimentácii som dokázal odstrániť viac ako 60% média, ktoré som odsával hadičkou pomocou podtlakovej pumpy. Z odsávaním som prestal akonáhle sa hladina znížila natoľko, že pumpa začala nasávať aj biomasu. Po zefektívnení odoberania média alebo tvaru sedimentačnej nádoby, by však bolo možné odobrať aj viac média. Odobrané médium po sedimentácii je možné vrátiť späť do fotobioreaktora alebo race-way nádrže, čím sa nechcane odobraná biomasa vráti späť do

kultivácie a zabráni sa jej strate. Ďalšia podľa mňa veľmi praktická vlastnosť sedimentácie je, že výsledná biomasa nie je príliš hustá a možno ju jednoducho vyliat' zo sedimentačnej nádoby. Pri veľmi hustej biomase približne 4% a viac je potrebné myslieť na to, že biomasa sa začína lepíť, čo môže spôsobiť veľké straty. Po sedimentácii je možné zahustenú biomasy premiestniť do menšej sedimentačnej nádoby, kde môže ešte raz sedimentovať. Ako náhle ďalšia sedimentáciu už nebude účinná, môžeme použiť inú metódu s pridaním energie. Osobne by som ako ďalšiu metódu navrhoval centrifugáciu, pretože oproti iným metódam má najväčšiu efektivitu (Obr. 35). Vďaka prechádzajúcemu kroku sa výrazne zníži objem mokrej biomasy a energetické náklady zberu sa znížia, čo potvrdzujú aj autori Shelef, Sukenik & Green (1984). Podľa Milledge & Heaven (2013) by sa množstvo energie bez predchádzajúceho zahustenia sedimentáciou (poprípade aj inej metódy) rovnalo 5 násobku energie získanej z biodiesla. Zahustením biomasy aspoň na 0,5% je možné potrebnú energiu znížiť až na 15% z celkovej získanej energie z biodiesla. Mne sa podarilo sedimentáciou biomasu zahustiť na 0,15 až 0,22% aj pri nie úplne efektívnom odoberaní média pri takmer nulovej spotrebe energie a použití chemických koagulantov (Obr. 35). Ako externú energiu dodávanú na centrifugovanie by bolo možné využiť napríklad iný obnoviteľný zdroj, ako napríklad solárnu alebo veternú energiu, čím by sa strata čistého zisku energie z biodiesla de jure znížila na 0%.

## ZÁVER

Zelená riasa rodu *Scenedesmus* sp. vďaka rýchlemu rastu a relatívne vysokému obsahu lipidov má veľký potenciál byť efektívnym zdrojom lipidov na výrobu biopalív. Nie však všetky druhy v rámci rodu *Scenedesmus* dokážu vyprodukovať dostačujúce množstvo lipidov a je potrebné riasu *Scenedesmus* rozlišovať aspoň do podrodu. Druhy s najvyššiu produkciou patria do podrodu *Acutodesmus*. Experimentálne najčastejšie používaný druh ako potenciálnu zdroj lipidov je *Scenedesmus obliquus*. Tento druh sa mi taktiež podarilo vyizolovať v rámci mojej bakalárskej práce a snažil som sa experimentálne zvýšiť jeho dennú produkciu lipidov. Riasy počas prítomnosti stresu môžu produkovať omnoho väčšie množstvo lipidov než v optimálnych podmienkach. Ako stresový faktor som pre moje experimenty vybral salinitu. Testoval som širokú škálu molárnej koncentrácie NaCl od 0,08 do 342 mM/l alebo 4mg do 20g/l NaCl. Najefektívnejšia koncentrácia NaCl je približne 20 mM/l, ktorá nemá negatívny vplyv na produkciu biomasy, ale zvýši percentuálny obsah lipidov. Danú koncentráciu je možné použiť v jednodušných alebo semikontinuálnych režimoch, čím sa ušetrí práca aj energia na premiestňovanie biomasy do iného kultivačného zariadenia so stresovými podmienkami. Použitie vysokej koncentrácie NaCl pri dvojitom režime nemusí byť vždy efektívne, pretože pri premiestnení do stresových podmienok sa spomalí produkcia biomasy. Ak sa obsah lipidov nedostatočne zvýši, tak výsledný objem získaných lipidov môže byť nižší alebo rovnaký ako v optimálnych podmienkach počas celej kultivácie.

Najefektívnejšie kmene ako zdroje lipidov z mojej kolekcie boli *Scenedesmus acutus* KN14, *Scenedesmus intermedius* KN07 a *Scenedesmus obliquus* KN05. Podľa ďalších odborných štúdií je veľmi efektívny druh *Scenedesmus dimorphus*, ktorý sa taktiež nachádza v mojej kolekcii ako kmeň KN02. Z časového obmedzenia som tento kmeň nepodrobil experimentálnemu zvýšeniu produkcie lipidov, ako kmeň KN05, ale podľa môjho celkového hodnotenia kmeňov (Tab. 2) a iných publikácií by mohol dosahovať lepších výsledkov. Odporúčam použiť tento kmeň pri nasledujúcich prácach s cieľom zvýšenia produkcie lipidov.

Počas pracovnej stáže na Oceánografickom inštitúte v Gdyni som mal možnosť skonštruovať vlastný fotobioreaktor a z vyprodukovanej biomasy som úspešne vytvoril biodiesel. Vďaka pracovnej stáži, bakalárskej a diplomovej práci som si mohol vyskúšať produkciu biopalív v celej škále od izolácie kmeňa, vyber efektívneho kmeňa, kultivácie biomasy, zberu biomasy, extrakcie lipidov a ich transesterifikáciu na biodiesel.

## ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Adámek Z., Helešic J. Maršálek B., Rulík M. (2010): Aplikovaná hydrobiologie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2010; ISBN 978-80-87437-09-4: 194 – 196 pp.

Alam F., Mobin S., Chowdhury H. (2015): Third generation biofuel from Algae. Procedia Engineering 105: 763–768

Apandi N. M., Mohamed R. M. S. R., Latiffi N. A. A., Rozlan N. F. M., Al-Gheethi A. A. A. S. (2017): Protein and Lipid Content of Microalgae *Scenedesmus* sp. Biomass Grown in Wet Market Wastewater. MATEC Web of Conferences 103: 06011

Anand V., Kashyap M., Ghosh A., Samadhiya K., Kiran B. (2021): A strategy for lipid production in *Scenedesmus* sp. by multiple stresses induction. Conversion and Biorefinery, 13: 3037–3047

An, M., Gao L., Zhao W., Chen W., Ming L. (2019): Effects of Nitrogen Forms and Supply Mode on Lipid Production of Microalga *Scenedesmus obliquus*. Energies 13(3): 697–710

Bagchi S. K., Mallick N. (2016): Carbon dioxide biofixation and lipid accumulation potential of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing GA 45 for biodiesel production. RSC Advances 6(36): 29889–29898

Banerjee A., Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. (2002): Botryococcus braunii: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. Critical Reviews in Biotechnology 22(3): 245–279

Bligh E. G., Dyer W. J. (1959): A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 37(8): 911–917

Cervantes T., Morales M., Novelo E., Revah S. (2013): Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. Bioresource Technology 130: 652–658

Concas A., Pisu M., Cao G. (2015): Disruption of microalgal cells for lipid extraction through Fenton reaction: Modeling of experiments and remarks on its effect on lipids composition. Chemical Engineering Journal, 263: 392–401



Covell L., Machado M., Vaz M. G. M. V., Soares J., Batista A. D., Araújo W. L., Martins M. A., Nesi A. N. (2020): Alternative fertilizer-based growth media support high lipid contents without growth impairment in *Scenedesmus obliquus* BR003. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 23

Datta A., Hossain A., Roy F. (2019): An Overview on Biofuels and Their Advantages and Disadvantages. *Asian Journal of Chemistry* 31 (8): 1851–1858

Difusa A., Talukdar J., Kalita M. Ch., Mohanty K., Goud V. V. (2015): Effect of light intensity and pH condition on the growth, biomass and lipid content of microalgae *Scenedesmus* species. *Biofuels* 6(1-2): 37–44

Dunn R. O. (2008): Antioxidants for improving storage stability of biodiesel. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2(4): 304–318

Egbo M. K., Okoani A. O., Okoh I. E. (2018): Photobioreactors for microalgae cultivation-An Overview. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 9(11): 65–74

Eida M. F., Darwesh O. M., Matter I. A. (2018): Cultivation of Oleaginous Microalgae *Scenedesmus obliquus* on Secondary Treated Municipal Wastewater as Growth Medium for Biodiesel Production. *Journal of Ecological Engineering* 19(5): 38–51

Esakkimuthu S., Krishnamurthy V., Govindarajan R., Swaminathan K. (2016): Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy* 88: 126–134

Eustance E., Wray J. T., Badvipour S., Sommerfeld M. R. (2015): The effects of cultivation depth, areal density, and nutrient level on lipid accumulation of *Scenedesmus acutus* in outdoor raceway ponds. *Journal of Applied Phycology* 28(3): 1459–1469

FAO (2008) *The State of Food and Agriculture – Biofuels: Risk, Prospects and Opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105980-7: 1–41 pp

Feng P., Yang K., Xu Z., Wang Z., Fan L., Qin L., Zhu S., Shang Ch., Chai P., Yuan Z., Hu L. (2014): Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology* 173: 406 – 414

- Fernandez R., Herrero P., Moreno F. (1985): Inhibition and Inactivation of Glucose-phosphorylating Enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* by D-Xylose. *Journal of General Microbiology* 131(10): 2705–2709
- Folch J., Ascoli I., Lees M., Meath J. A., Lebaron F.N., (1951): Preparation of lipide extracts from brain tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 1951: 833–41
- Fukuda H., Kondo A., Noda H. (2001): Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5): 405–416
- Griffiths M. J., Harrison S., T., L. (2009): Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21(5): 493–507
- Gan X., Shen G., Xin B., Li M. (2016): Simultaneous biological desalination and lipid production by *Scenedesmus obliquus* cultured with brackish water. *Desalination* 400: 1–6
- Grima E. M., Fernández F. G. A., Medina A. R. (2013): Downstream Processing of Cell-mass and Products. *Handbook of Microalgal Culture*: 215–252
- Halim R., Danquah M. K., Webley P. A. (2012): Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances* 30(3): 709–732
- Hase R., Oikawa H., Sasao Ch., Morita M., Watanabe Y. (2000): Photosynthetic Production of Microalgal Biomass in a Raceway System under Greenhouse Conditions in Sendai City 89(2): 157–163
- Han S.-F., Jin W., Abomohra A. E.-F., Tu R., Zhou X., He Z., Chen Ch., Xie G. (2019): Municipal Wastewater Enriched with Trace Metals for Enhanced Lipid Production of the Biodiesel-Promising Microalga *Scenedesmus obliquus*. *BioEnergy Research*.
- Han, F., Huang, J., Li, Y., Wang, W., Wan, M., Shen, G., Wang, J. (2013): Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO<sub>2</sub>. *Bioresource Technology* 136: 418–424
- Ho S. H., Chan M. Ch., Liu Ch.Ch., Chen Ch. Y., Lee W. L., Lee D. J., Chang J. S (2014): Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology* 152: 275–282

- Chisti Y. (2007): Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3): 294–306
- Peng Z., Liu G., Huang K. (2021): Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Frontiers in Microbiology* 11: 1–18
- Cheng P., Wang Y., Wusu D. O., Wang Y., Liu T. (2018): Development of nitrogen supply strategy for *Scenedesmus rubescens* attached cultivation toward growth and lipid accumulation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41: 435–442
- Chen M., Tang H., Ma H., Holland T. C., Ng K. Y. S., Salley S. O. (2011): Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102(2): 1649–1655
- Chen M., Liu T., Chen X., Chen L., Zhang W., Wang J., Peng X. (2011): Subcritical co-solvents extraction of lipid from wet microalgae pastes of *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(2): 205–212
- Chin-On R. C., Barbosa M. J., Wijffels R. H., Janssen M. (2022): A novel V-shaped photobioreactor design for microalgae cultivation at low latitudes: Modelling biomass productivities of *Chlorella sorokiniana* on Bonaire. *Chemical Engineering Journal*. 449: 137793
- Jerney J., Spilling K. (2018): Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. *Methods in Molecular Biology*: 1–8
- Kaewkannetra P., Enmak P., Chiu T. (2012): The Effect of CO<sub>2</sub> and Salinity on the Cultivation of *Scenedesmus obliquus* for Biodiesel Production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17(3): 591–597
- Kates M. (1986): Definition and classification of lipids. *Techniques of lipidology isolation, analysis, and identification of lipids*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1986a
- Kates M. (1986): Lipid extraction procedures. *Techniques of lipidology isolation, analysis, and identification of lipids*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1986b
- Kirrolia A., Bishnoi N. R., Singh N. (2011): Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Algal Biomass Utilization* 2(4): 28–34

- Knohte G. (2009): Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy & Environmental Science* 2 (7): 759–766
- Kudahettige N. P., Pickova J., Gentili F. G. (2018): Stressing Algae for Biofuel Production: Biomass and Biochemical Composition of *Scenedesmus dimorphus* and *Selenastrum minutum* Grown in Municipal Untreated Wastewater. *Frontiers in Energy Research*, 6
- Kumar N., Banerjee Ch., Negi S., Shukla P. (2022): Microalgae harvesting techniques: updates and recent technological interventions. *Biotechnology*: 1–27
- Lam M. K., Lee K. T (2012): Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances* 30(3): 673–690
- Lee R. A., Lavoie J. M. (2013): From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity. *Animal Frontiers* 3(2): 6–11
- 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(1): 75–77
- Leite G. B., Abdelaziz A. E. M., Hallenbeck P. C. (2013): Algal biofuels: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology* 145: 134–141
- Leite G. B., Paranjape K., Hallenbeck P. C. (2016): Breakfast of champions: Fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. *Algal Research* 16: 338–348
- Liu W., Chen Y., Wang J., Liu T. (2019) Biomass productivity of *Scenedesmus dimorphus* (*Chlorophyceae*) was improved by using an open pond–photobioreactor hybrid system, *European Journal of Phycology*, 54(2): 127–134
- Liu N. Mou Y., Su K., Li X., Yan W., Song M. (2022): The effect of salinity stress on the growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* FACHB-1297 under xylose mixotrophic cultivation. *Process Safety and Environmental Protection* 165: 887–894
- Mansouri H., Nezhad S. E. (2020): Improvement in biochemical parameters and changes in lipid profile of *Scenedesmus obliquus* by plant growth regulators under mixotrophic condition. *Biomass and Bioenergy* 140: 105708

- Medina A. R., Grima E. M., Gimenez A. G., Ibanez M.J. (1998): Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. *Biotechnology Advances*. 16(3): 517–80
- Milledge J. J. (2010): Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Review in Environmental Science and Bio/Technologie* 10(1): 31–41
- Milledge J. Heaven S. (2013): A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(2): 165–178
- Miller R., Wu G., Deshpande R. R., Vieler A., Gärtner K., Li X., Moellering E. R., Zäuner S., Cornish A. J., Liu B. Bullard B., Sears B. B., Kuo M. H., Hegg E. L., Shachar-Hill Y., Shiu S. H., Benning Ch. (2010): Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism. *Plant Physiol* 154(4): 1737–1752
- Mittelbach, M., and Remschmidt, C. (2005) *Biodiesel the Comprehensive Handbook, Second Edition*. Boersedruck Ges. m.b.H, Vienna. 147–205pp
- Moser B.R. (2008) Influence of blending canola, palm, soybean, and sunflower oil methyl esters on fuel properties of biodiesel. *Energy & Fuels* 22(6):4301–4306
- Murchie E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13): 3983–3998
- Muylaert K., Bastiaens L., Vandamme D., Gouveia L. (2017): Harvesting of microalgae: Overview of process options and their strengths and drawbacks. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*: 113–132
- Narala R. R., Garg S., Sharma K. K., Thomas-Hall S. R., Deme M., Li Y., Schenk P. M (2016): Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Race-Way Pond and Two Stage Hybrid System. *Frontiers in Energy Research* 4: 1–10
- Nigham P.S., Singh A. (2011): Production of liquid biofuel from renewable resources (Review). *Progress in Energy and Combustion Science* 37 (1): 52–68
- Nordio R., Delgado F. J., Sánchez-Zurano A., Hernandez J. G., Rodríguez-Miranda E., Guzmán J. L., Lafarga T., Acién G. (2023): Long-term assessment of the nutrient recovery capacity and biomass

productivity of *Scenedesmus almeriensis* in raceway reactors using unprocessed urban wastewater. *Bioresource Technology*: 369

Okcu G. D. (2019): The impact of nitrogen starvation on the dynamics of lipid and biomass production in *Scenedesmus* sp. *Environmental Research & Technology* 2(3): 158–170

Otera J. (1993): Transesterification. *Chemical reviews* 93 (4): 1449–1470pp

Parkhill, J.-P., Maillet, G., & Cullen, J. J. (2001). Fluorescence - based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *Journal of Phycology*, 37(4): 517–529

Pandey A., Srivastava S., Kumar S. (2022): *Scenedesmus* sp. ASK22 cultivation using simulated dairy wastewater for nutrient sequestration and biofuel production: insight into fuel properties and their blends. *Biomass Conversion and Biorefinery*

Pancha I., Choksi K., George B., Ghosh T., Paliwal Ch., Maurya R., Mishra S. (2014): Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology* 156: 146–154

Peng Q., Zhao M., Shen G., Gan X., Li M. (2017): Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) promotes sedimentation and lipid accumulation in *Scenedesmus obliquus*. *RSC Advance* 7(15): 9244–9250

Rai M. P., Gupta. S. (2016): Growth and Lipid Production from *Scenedesmus* sp. Under Mixotrophic Condition for Bioenergy Application. *Proceedings of the First International Conference on Recent Advances in Bioenergy Research*, 159–167

Rai M. P., Gupta S. (2016): Growth and Lipid Production from *Scenedesmus* sp. Under Mixotrophic Condition for Bioenergy Application. *Proceeding of the First International Conference on Recent Advance in Bioenergy Research*: 159–167

Ras M., Steyer J. P., Bernard O. (2013): Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Review in Environmental Science and Bio/Technologie* 12(2): 153–164

Ren H.-Y., Liu B.-F., Kong F., Zhao L., Xie G.-J., Ren N.-Q. (2014): Enhanced lipid accumulation of green microalga *Scenedesmus* sp. by metal ions and EDTA addition. *Bioresource Technology* 169: 763–767

Rodolfi L., Zittelli G. Ch., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M. R. (2009): Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(1): 100–112

Rocha D. N., Martins M. A., Soares J., Vaz M. G. M. J., Leute M. O., Covell L., Mendes L. B. B. (2019): Combination of trace elements and salt stress in different cultivation modes improves the lipid productivity of *Scenedesmus* spp. *Bioresource Technology*. 121644

Ruiz J., Olivieri G., de Vree J., Bosma R., Willems P., Reith J. H., Eppink M. H. M., Kleinegris D. M. M., Wijffels R. H., Barbosa M. J. (2016): Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Science* 9(10): 3036–3043

Rulík M., Baudišová D., Ružička J., Šimek K. (2013): *Mikrobiální ekologie vod*. Univerzita Palackého v Olomouci. 2013. ISBN 978-80-244-3477-3. 98–100 pp.

Sajjadi B., Chen W. Y., Raman A. A. A., Ibrahim S. (2018): Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 97: 200–232

Satpati G. G., Pal R. (2018): Microalgae- Biomass to Biodiesel: A Review. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 9(4): 11–37

Shen Q. H., Jiang J. W., Chen L. P., Cheng L. H., Xu X. H., Chen H. L. (2015): Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresource Technology* 190: 257–263

Singh G., Patidar S. K. (2018): Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management* 217: 499–508

Sompech K., Chisti Y., Srinophakun T. (2012): Design of raceway ponds for producing microalgae. *Biofuel* 3(4): 387–397

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. (2005): Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87–96

Srivastava G., Nishchal G. V. V. (2017): Salinity induced lipid production in microalgae and cluster analysis (ICCB 16-BR\_047). *Bioresour Technol* 242: 244–252

- Sundararaghavan A., Suraishkumar G.K.(2021): New Technologies to Improve the Yield of Microalgae Biomass. *Algae for Food*. 9–36
- Stenius P., Gullichsen J., Paulapuro H. (2000): *Papermaking Science and Technology*. Vol. 3. Helsinki, Finland: Fapet OY. ISBN 952-5216-03-9. 62 – 78pp.
- Sterner R. W., Elser J. J. (2003): *Ecological Stoichiometry: The Biology of Elements from Molecules to the Biosphere*, Princeton: Princeton University Press 2003. ISSN 0-691-07491-7; 27 p.
- Shelef, G, Sukenik, A, and Green, M. (1984): *Microalgae harvesting and processing: a literature review*. Technion Research and Development Foundation Ltd., Haifa: 95p
- The Royal Society (2008): *Sustainable biofuels: prospects and challenges*. The Clyvedon Press Ltd, Cardiff, UK. ISBN 978 0 85403 662. 1 – 29pp.
- Uduman N., Qi Y., Danquah M. K., Forde G. M., Hoadley A. (2010): Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of renewable and sustainable energy* 2(1): 012701
- Viner K. J., Champagne P., Jessop P. G. (2013): Comparison of cell disruption techniques prior to lipid extraction from *Scenedesmus* sp. slurries for biodiesel production using liquid CO<sub>2</sub>. *Green Chemistry*. 1–9
- Wijffels R. H., Barbosa M. J. (2010): An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* 329(5993): 796–799
- Wong Y. K., Yung K. K. L., Tsang Y. F., Xia Y., Wang L., Ho, K. C. (2015): *Scenedesmus quadricauda* for Nutrient Removal and Lipid Production in Wastewater. *Water Environment Research*, 87(12): 2037–2044
- Wu Y. H., Yu Y., Hu H. Y. (2014): Effects of Initial Phosphorus Concentration and Light Intensity on Biomass Yield per Phosphorus and Lipid Accumulation of *Scenedesmus* sp. LX1. *Bioenergy Research* 7(3): 927–934
- Xia L., Song S., Hu Ch. (2015): High temperature enhances lipid accumulation in nitrogen-deprived *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Journal of Applied Phycology* 28(2): 831 – 837



Xia T., Liu Z., Pan X., Huang E., Dan C., Xiao Z. (2019): Effects of dilution ratio on nutrient removal, sedimentation efficiency, and lipid production by *Scenedesmus obliquus* in diluted cattle wastewater. Energy Source, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects: 1–10

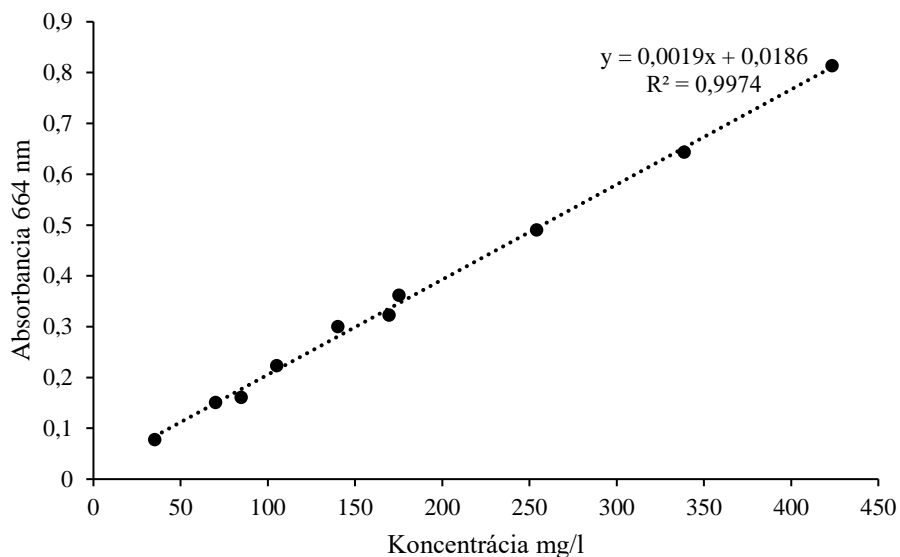
Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., ... Li, B. (2020). A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: environmental pollution control and future directions. Bioresource Technology, 122804.

Zou G., Liu Y., Zhang Q., Zhou T., Xiang S., Gu Z., Gu Z., Huang Q., Yan H., Zheng H., Wu X., Wang Y., Ruan R., Liu M. (2020): Cultivation of *Chlorella vulgaris* in a Light-Receiving-Plate (LRP)-Enhanced Raceway Pond for Ammonium and Phosphorus Removal from Pretreated Pig Urine. Energies 13(7): 1644

## PRÍLOHY

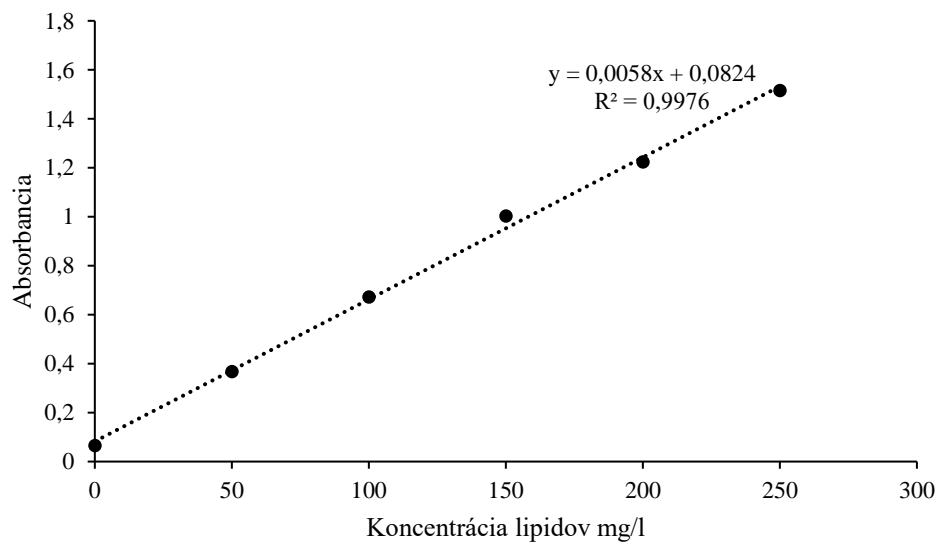
Príloha 1: Kalibračná krivka a rovnica používaná na prepočet suchej váhy biomasy z hodnôt absorbančie

Kalibračná krivka suchej váhy biomasy



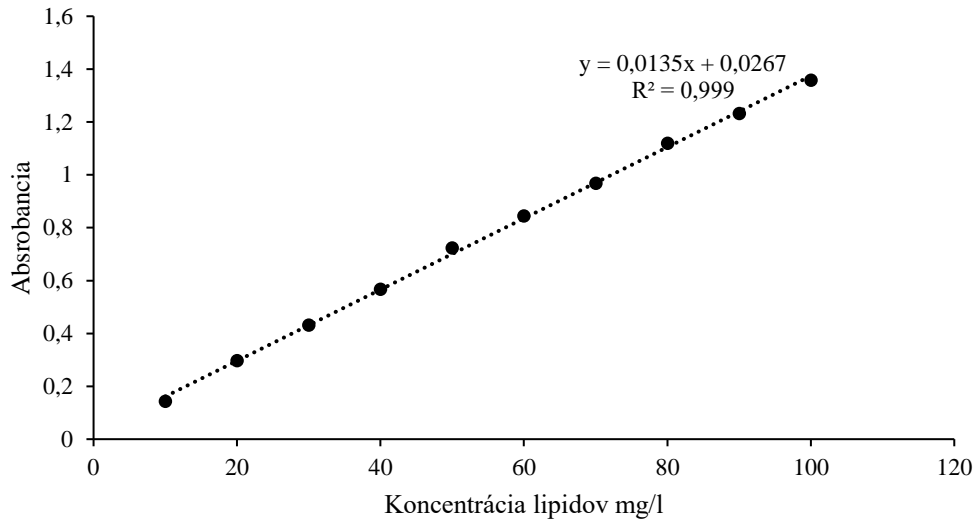
Príloha 2: Kalibračná krivka a rovnica používaná na prepočet váhy lipidov z hodnôt absorbančie na Oceánografickom inštitúte v Gdyni

Kalibračná krivka váhy lipidov



Príloha 3: Kalibračná krivka a rovnica používaná na prepočet váhy lipidov z hodnôt absorbancie na Univerzite Palackého

### Kalibračná krivka váhy lipidov



Príloha 4 (vľavo): Striedanie svetla a tmy 24/24h; počas svetelnej fázy na jeden reaktor svietili obe svetlá

Príloha 5 (vpravo): Nedokonalá sedimentácia, kedy biomasa nebola úplne v tme



Príloha 6 (vľavo): Sonda pH metra

Príloha 7(vpravo): Zariadenie na zber biomasy; zberná nádoba bola umiestnená pod úrovňou fotobioreaktora, pomocou pumpy som vytvoril podtlak a následne biomasa sama vytekala z reaktora do zbernej nádoby, tým pádom na zber biomasy bolo potrebné minimum energie.

