

**ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ELEKTROTECHNICKÁ**

Katedra elektroenergetiky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Možnosti energetického využití fyto-
masy eutrofizovaných vod**

vedoucí práce: Ing. Petr Jindra, Ph.D.

2013

autor: Bc. Michaela Sedláčková

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta elektrotechnická
Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela SEDLÁČKOVÁ**
Osobní číslo: **E11N0100P**
Studijní program: **N2612 Elektrotechnika a informatika**
Studijní obor: **Technická ekologie**
Název tématu: **Možnosti energetického využití fytohmoty eutrofizovaných vod**
Zadávající katedra: **Katedra elektroenergetiky a ekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Popište problematiku eutrofizovaných vod. (Příčiny eutrofizace, důsledky, rostlinné druhy) Sledujte složení a možné využití populací mikrořas pro energetické využití. Zaměřte se také na rozdíl mezi čistou a směsnou kulturou.
2. Na vybraných lokalitách získejte vzorky fytohmoty a analyzujte jejich energetický potenciál. Navrhněte technologii pro využití tohoto potenciálu.
3. Popište složení a možné využití kultur mikrořas kultivovaných pro energetické využití.
4. Zhodnoťte výsledky výzkumu a možnosti praktického využívání.

Rozsah grafických prací: **podle doporučení vedoucího**
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 40 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:


Student si vhodnou literaturu vyhledá v dostupných pramenech podle doporučení vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Petr Jindra**
Katedra elektroenergetiky a ekologie

Datum zadání diplomové práce: **15. října 2012**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2013**


Doc. Ing. Jiří Hammerbauer, Ph.D.
děkan




Doc. Ing. Karel Noháč, Ph.D.
vedoucí katedry

V Plzni dne 15. října 2012

Anotace

Předkládám diplomovou práci zaměřenou na využití energetického potenciálu fytohmoty. V práci analyzuji vybrané druhy mikrořas a vodních rostlin rostoucích v eutrofizovaných vodách. Na základě zjištění výhřevnosti a obsahu energeticky bohatých látek v biomase hledám vhodnou technologii pro uvolnění a následné využití energie z těchto organismů.

Klíčová slova

Energetický potenciál, využití energie, energie vodní biomasy, vodní rostliny, mikrořasy, sacharidy, lipidy, eutrofní vody, biopaliva

Abstract

I present a diploma thesis focused on the potential use of the energy saved in a phytomass. I analyse different types of microalgae and aquatic plants growing in the eutrophic waters. I search for a suitable technology for the energy release from these organisms and their subsequent use in the application based on the identification of the calorific value, the content of lipids and saccharides.

Key words

Energy potential, utilization of energy, energy of water phytomass, water plants, microalgae, lipids, saccharides, eutrophic waters, biofuels

Prohlášení

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci, zpracovanou k závěru studia na Fakultě elektrotechnické Západočeské univerzity v Plzni.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu použité literatury, který je součástí této diplomové práce.

.....
podpis

V Plzni dne 6.5.2013

Bc. Michaela Sedláčková

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala mému vedoucímu diplomové práce Ing. Petrovi Jindrovi, Ph.D. za vedení práce.

Děkuji Mikrobiologickému ústavu AV ČR v Třeboni za možnost pracovat v jejich laboratořích a paní Ing. Magdě Sergejevové, Pd.D. v roli konzultanta, děkuji za velmi cenné rady a vedení v průběhu výzkumu.

Děkuji Centru obnovitelných zdrojů energie v Dánsku (Nordic Folkecenter for Renewable Energy in Denmark) za možnost prezentovat svoji práci na mezinárodním poli.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD.....	10
1.1 ENERGETICKÉ VYUŽITÍ BIOMASY.....	11
1.2 EUTROFIZACE VOD.....	14
1.3 VYBRANÉ ROSTLINNÉ DRUHY - MAKROFYTA.....	15
1.4 VYBRANÉ KMENY MIKROŘAS.....	17
1.5 METODY ZÍSKÁNÍ BIOMASY Z VODNÍHO PROSTŘEDÍ.....	21
1.6 VYSVĚTLENÍ POJMŮ	22
1.6.1 <i>Lyofilizace</i>	22
1.6.2 <i>Sonikace</i>	23
1.6.3 <i>Škroby</i>	23
1.6.4 <i>Lipidy</i>	24
1.6.5 <i>Spalné teplo</i>	24
1.6.6 <i>Výhřevnost</i>	24
2 ANALÝZA ENERGETICKÉHO POTENCIÁLU BIOMASY.....	26
2.1 LOKALIZACE, ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ MAKROFYT PRO EXPERIMENTY.....	26
2.2 KULTIVACE A ZPRACOVÁNÍ VYBRANÝCH DRUHŮ MIKROŘAS PRO EXPERIMENTY.....	27
2.3 STANOVENÍ ŠKROBŮ.....	30
2.4 STANOVENÍ LIPIDŮ.....	33
2.5 SPALNÉ TEPLA A VÝHŘEVNOST.....	35
3 VÝSLEDKY ANALÝZY ENERGETICKÉHO POTENCIÁLU.....	36
3.1 MIKROŘASY.....	36
3.2 MAKROFYTA.....	38
4 ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	43
4.1 MIKROŘASY.....	43
4.2 MAKROFYTA.....	44
5 ZÁVĚR.....	46
6 POUŽITÁ LITERATURA.....	47
7 PŘÍLOHY.....	52
7.1 PŘÍSTROJE.....	52

Seznam použitých zkratek

H ₂	... dvouatomová molekula vodíku
H ₂ S	... sulfan, sirovodík
POXČ	... průměrné oxidační číslo uhlíkového atomu
m	... hmotnost sušiny [g]
Abs625	... absorbance extraktu měřená při 625 nm proti lepému vzorku
C _{glukóza}	... koncentrace glukózy ve vzorku počítaná z kalibrační rovnice [mg/l]
C _{škrob}	... koncentrace škrobu ve vzorku [mg/l]
C%	... koncentrace škrobů v biomase [%]
k	... směrnice kalibrační křivky k = 0,0041
N	... dusík
P	... fosfor
K	... draslík
MBU AV ČR	... Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky
rpm	... otáčky za minutu
Q _{ir}	... výhřevnost paliva [MJ/kg]
Q _{rs}	... spalné teplo paliva [MJ/kg]
DCM	... dichlormethan
MetOH	... methanol

1 ÚVOD

Tuto práci zaměřuji na možné využití energetického potenciálu vodní biomasy rostoucí v eutrofních vodách. Zaměřila jsem se na tři druhy vodních rostlin – makrofyty, které se přirozeně vyskytují ve volné přírodě a pět vybraných kmenů mikrořas, které je možné kultivovat v akvakulturách pro biotechnologické účely.

Vodní rostliny, které zkoumám, se až na jeden druh, přirozeně vyskytují ve vodních ekosystémech České republiky. Patří mezi vysoce eutrofní druhy a svým enormním růstem ohrožují přirozenou rovnováhu vodních ekosystémů. V rámci mé práce se snažím zjistit, zda by bylo možné využít tyto invazní druhy pro energetické účely. V případě mikrořas se jedná o čisté jedno druhové kultury vypěstované, až na jeden kmen ve fotobioreaktorech Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni.

V práci se zabývám stanovením obsahu lipidů a sacharidů v sušině a spalného tepla a výhřevnosti biomasy vybraných rostlin a mikrořas. Na základě této toho se snažím najít vhodnou technologii pro využití jejich energetického potenciálu. Mikrořasy a makrofyty porovnávám druhově mezi sebou. Makrofyty dále hodnotím i v rámci sezóny s cílem zjistit, zda se v rostlinách liší obsah látek v závislosti na vegetačním období, protože některé druhy akumulují zásobní látky pro přežití zimního klidového období [24].

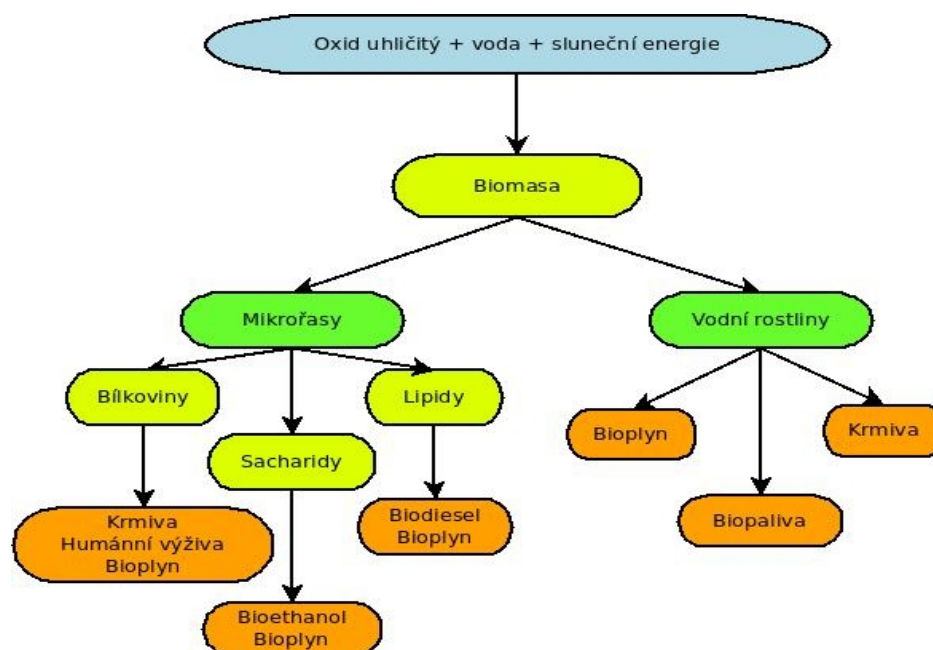
Využití energetického potenciálu biomasy zelených rostlin, s ohledem na ochranu životního prostředí a udržitelný rozvoj technologií, má hned několik výhod. Nárůst biomasy zelených rostlin a mikrořas je vždy spojen s odčerpáním skleníkového plynu oxidu uhličitého ze vzduchu pro fotosyntézu. Výroba biopaliv z biomasy a jejich následné využití šetří vyčerpateľné zdroje energie a zároveň vzniká méně škodlivých látek a emisních plynů než při energetickém využívání fosilních paliv [11].

Vzhledem k vysokému energetickému potenciálu mikrořas, jejich rychlému růstu a současné možnosti eliminace oxidu uhličitého z emisních plynů se neustále vyvíjí a zdokonalují způsoby kultivace a zpracovávání biomasy mikrořas pro energetické účely [16]. Například u kmenů mikrořas *Trachydiscus sp.* a *Nannochloropsis sp.* je všeobecně

znám vysoký obsah lipidů v biomase [17][19].

1.1 Energetické využití biomasy

Každý zelený organismus je primární producent glukózy, kterou vytváří z oxidu uhličitého pomocí fotosyntézy a následně syntetizuje lipidy a bílkoviny. Energetický potenciál biomasy je uložen především v zásobních látkách, v lipidech a sacharidech. Mikrořasy na rozdíl od vyšších rostlin většinou ukládají energii přednostně buď do lipidů, nebo do sacharidů, upřednostňují jednu sloučeninu před druhou. Vyšší obsah lipidů a sacharidů v buňkách hraje velkou roli při využití energetického potenciálu biomasy. Předpokládané využití vodních rostlin pro energetické účely v porovnání s mikrořasami jsem znázornila na *Obr. 1*.

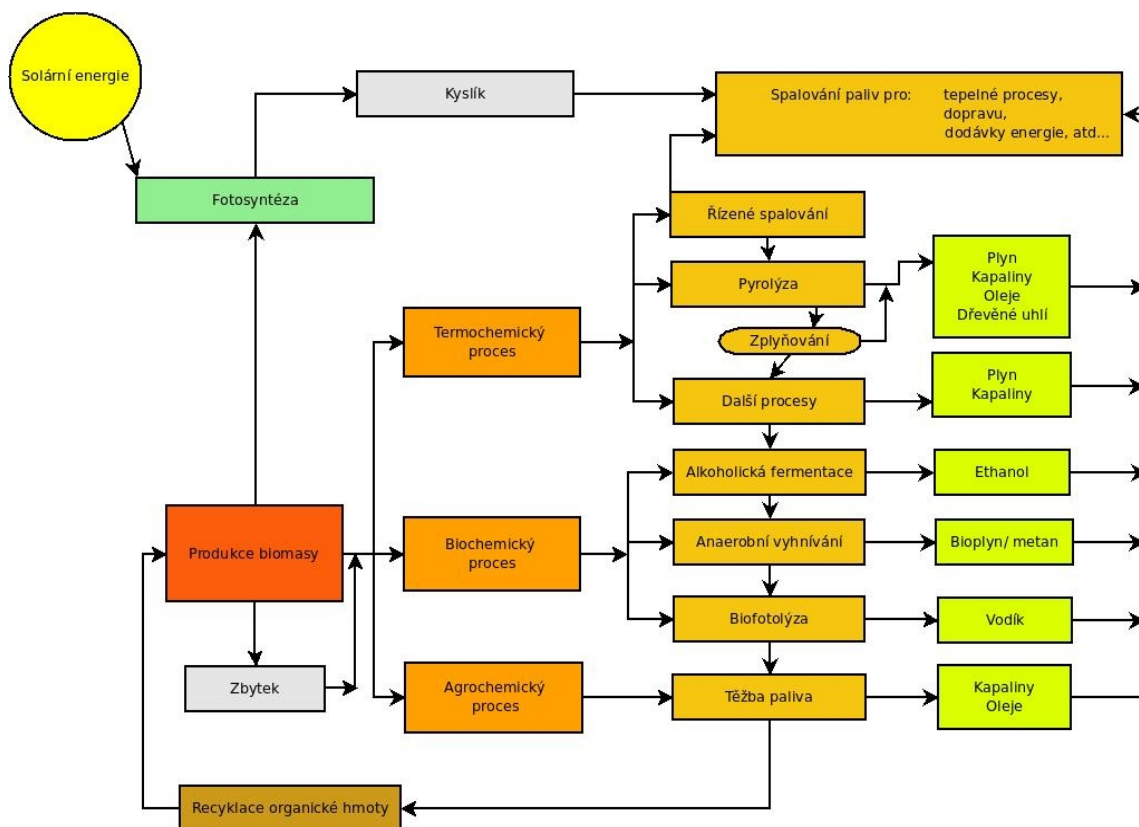


Obr. 1. Možnosti využití biomasy vodních rostlin a mikrořas v závislosti na obsahu energetických látek

Energetické využití biomasy, ať už vodní nebo suchozemské, je velmi široké. Produkce biopaliv z biomasy se zaměřuje především na výrobu biodieselu a bioetanolu. Biodiesel je možné získat chemickými reakcemi z biomasy bohaté na lipidy. Jedná se o proces transesterifikace, kdy katalytickou reakcí vzniká biodiesel a glycerol [11]. Je známé použití mikrořas *Chlorella sp.* (23% lipidů) a *Nannochloropsis sp.*, (28 % lipidů) [10]. Výhodou biodieselu je jeho biologická odbouratelnost, netoxičnost, odpadními produkty při spalování jsou převážně oxid uhličitý, voda, olej a dusíkaté sloučeniny [11].

Pro výrobu bioetanolu se naopak využívá biomasa s vysokým obsahem škrobů, neboli sacharidů. Bioetanol je palivo, které je možné získat alkoholovým kvašením, jinak také nazývaném alkoholová fermentace biomasy. Při tomto procesu dochází k štěpení škrobů na nižší cukry, které lze následně fermentovat pomocí mikroorganismů a enzymů na alkohol (etanol) a oxid uhličitý [25]. Škroby jsou látky, které neumíme synteticky vyrobit. Syntetizovat je umí pouze zelené organismy díky fotosyntéze. Z vodních makrofyt se pro výrobu bioetanolu využívají rostliny z čeledi *Lemnaceae* [12], kam také patří mnou zkoumaný okřehek. Bylo zjištěno, že okřehek může obsahovat škrob ve velmi širokém rozmezí, a to 3 – 75 %. Hodnota 75 % je srovnatelná s obsahem škrobu kukuřice, který činí 65 – 75 % [12]. Rostlinné druhy patřící do čeledi *Lemnaceae* (okřehek, spirodella) jsou také významné z hlediska obsahu proteinů, (15 – 45 % bílkovin v sušině), což je srovnatelné se sójou, (30 – 49 % bílkovin) [12]. Z tohoto důvodu je možné okřehek využívat i jako krmnou surovinu pro dobytek.

Možnosti využití energetického potenciálu biomasy a jejího zpracování je zachyceno na Obr. 2 [2].



Obr. 2. Možnosti zpracování biomasy pro energetické účely. Obrázek zachycuje jednotlivé kroky v rámci technologických procesů

Biomasu bohatou na polysacharidy i lipidy je kromě produkce bioetanolu a biodieselu možné využít i pro výrobu bioplynu procesem anaerobní digestace v bioplynové stanici. Jedná se o proces přeměny organických látek bez přístupu vzduchu za vzniku směsi plynů (methan 65 - 70 %, oxid uhličitý 65 - 70 %, H_2 , H_2S) a zbytku po vyhnívání - digestátu, který lze dále využít jako hnojivo [7].

Množství vyrobeného bioplynu závisí na potencionálním obsahu methanu v biomase, který je možné zjistit výpočtem pomocí Průměrného oxidačního čísla uhlíkového atomu (POXČ). POXČ nabývá hodnot od -4 do +4, a platí, že čím nižší hodnota POXČ, tím je obsah methanu vyšší. POXČ udává, do jaké míry je zkoumaný vzorek látky vhodný pro výrobu bioplynu [5]. Lipidy mají POXČ v intervalu od -1,63 do -1,70 a proteiny od -1,2 do -2. Pro všechny polysacharidy, kam patří i škroby, je hodnota POXČ rovna nule. Z chemických rovnic lze spočítat, že z jedné molekuly sacharidů

je možné získat tři molekuly CH₄ a tři molekuly CO₂, teoretický obsah methanu v bioplynu je potom 50 % [7].

1.2 Eutrofizace vod

Eutrofizace je proces, kdy dochází ke zvýšení koncentrace živin ve vodním prostředí a důsledkem toho k přemnožení vodní fytomasy, mikrořas, sinic, planktonu a vodních makrofyt. Eutrofizaci vod je možné rozdělit na přirozenou a nepřirozenou. Přirozená eutrofizace je součástí vodního ekosystému, tudíž součástí koloběhu látek v ekosystému a do určité míry je potřebná. Eutrofizace vzniká uvolňováním živin ze sedimentů, z půdy a z odumřelé vodní organické hmoty. V současnosti je to pojem široce diskutovaný. Pro rostliny, ať už vodní či suchozemské, jsou rozhodující tři hlavní živiny označované jako makroprvky; dusík (N), fosfor (P) a draslík (K). Fosfor je nejčastěji limitujícím prvkem eutrofizace, protože se vyskytuje v prostředí nejméně. Toto platí na základě Liebigova zákona minima [1]. Limitujícím prvkem může být ale i dusík. Draslíku je většinou ve vodách dostatečné množství. Zvýšení koncentrace fosforu a dusíku v přírodních vodách vede k nepřirozené eutrofizaci vod, k nadměrnému množení zelených mikroorganismů, tvorbě vodního květu a přemnožení vodních makrofyt.

Nepřirozená eutrofizace je zapříčiněna především používáním fosforečnanových hnojiv v oblasti zemědělství, masovou živočišnou výrobou, pracími a čisticími prostředky s obsahem fosforečnanů. Právě fosforečnany se dostávají do povrchových vod nejčastěji splachem z půdy nebo nedostatečným vyčištěním odpadních vod.

Člověkem způsobená nadměrná eutrofizace vytváří ve vodním prostředí mnohé změny v podobě narušení přirozeného vodního ekosystému a snížení biodiverzity, čímž klesá stabilita vodních ploch a schopnost retence při povodních.

1.3 Vybrané rostlinné druhy - Makrofyta

Okřehek menší (*Lemna minor*)

Vodní plovoucí rostlina rozšířená téměř po celém světě. V České republice se vyskytuje ve stojatých vodách rybníků, jezírek a nádrží. Považuje se za eutrofní rostlinu. Při přebytku živin, zejména dusíku, zcela pokryje vodní hladinu, což způsobí zastínění vodní plochy. To vede ke kyslíkovým deficitům, a ke zpomalení nebo k úplnému zastavení fotosyntézy a látkových koloběhů ve vodních ekosystémech. Obsah kyslíku ve vodě je navíc limitující pro veškeré aerobní živočichy žijící ve vodním prostředí.



Obr. 3. Ukázka eutrofizace vod
Okřehekem menším (*Lemna minor*)

Vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*)

Tato vodní rostlina, která pochází ze Severní Ameriky a Jižní Kanady, byla do Evropy zavlečena v polovině 19. století [18]. Žije převážně ve stojatých až mírně tekoucích vodách a řadí se mezi ponořená makrofyta. Roste z vodního dna a vytváří až jedem metr dlouhé stonky. V Evropě se považuje za invazní rostlinu, jelikož svým rychlým růstem vytlačuje původní rostlinné druhy a vytváří ve vodním prostředí nestabilní monokultury.



Obr. 4. Nárost vodního mor (*Elodea canadensis*) ve Velkém Boleveckém rybníku v Plzni. Foto: RNDr. Jindřich DURAS, Ph.D.



Obr. 5. Hustý porost Azolly (*Azolla filiculoides*) na vodní hladině

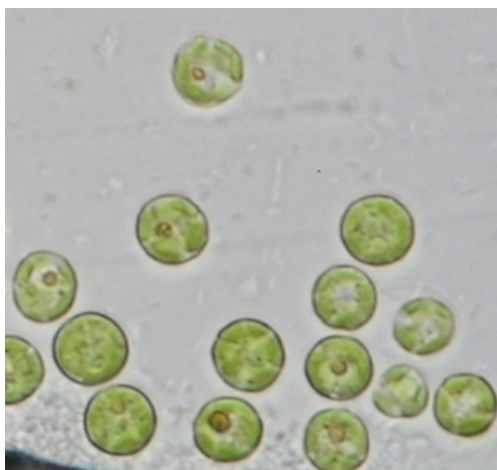
Azolla filiculoides

Kapradina pocházející z tropických a subtropických oblastí Ameriky, Afriky, Asie a Austrálie. Je to plovoucí vodní rostlina, která žije především ve vodách bohatých na živiny. V eutrofizovaných vodách, stejně jako okřehek, způsobuje zastínění vodního sloupce a s tím spojený nedostatek rozpuštěného kyslíku ve vodě a zpomalení látkových koloběhů ve vodním ekosystému. Pro českou krajinu představuje do jisté míry invazní nebezpečí, protože zde není původní. Limitujícím faktorem jsou ale klimatické podmínky a délka slunečního svitu. Rostlina je velice zajímavá pro vysoký obsah fosforu a bílkovin, a pro schopnost čistit odpadní vodu. Využívá se především jako hnojivo nebo krmivo. V dánském městě Thisted tuto rostlinu využívají k dočišťování odpadní vody, kde je schopna z vody odstranit organické znečištění [14].

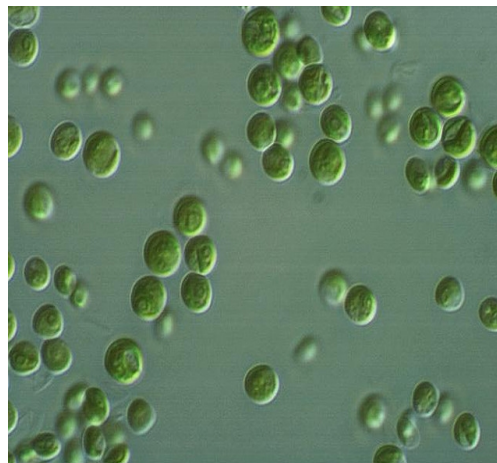
1.4 Vybrané kmeny mikrořas

Trachydiscus minutus

Mikrořasa *Trachydiscus minutus* patří do třídy *Eustiogmatofyceae*. Jedná se o sladkovodní kmen rostoucí při teplotách 25 – 28 °C. Vysoký obsah lipidů a jejich kumulace ve stresových podmínkách z něj dělá velice zajímavý kmen z hlediska biotechnologického využití. Další jeho předností je poměrně snadná kultivace, sklizeň a uchování sušené biomasy. Potenciální využití této řasy je v humánní výživě jako zdroj nenasycených mastných kyselin, v kosmetickém průmyslu a také v bioenergetice pro vysoký obsah lipidů.



Obr. 7. Buňky kmene *Trachydiscus minutus* v optickém mikroskopu při zvětšení 600 ×. Velikost buněk 7 - 9 μm. (Foto: Jose Malapasqua, MBU AV ČR)



Obr. 6. Buňky mikrořasy *Chlorella vulgaris* v optickém mikroskopu při zvětšení 600 ×. Velikost buněk (4 - 7 μm) závisí na stáří buňky a kultivačních podmínkách. (<http://ccala.butbn.cas.cz>)

Chlorella sp.

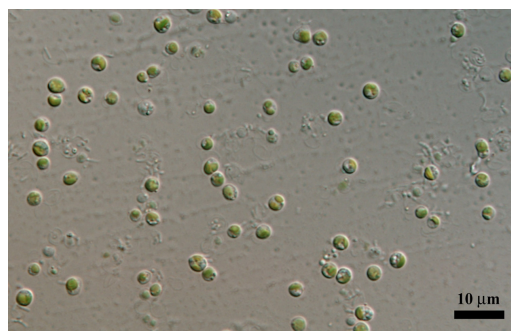
Zelená sladkovodní řasa používaná především v přírodní medicíně, kosmetice, jako doplněk stravy pro humánní výživu a také v krmivářství. Je zajímavá komplexním složením, vysokým obsahem pigmentů, antioxidantů, vitamínů, vlákniny, lipidů a polysacharidů. Pro biotechnologii je *Chlorella* výjimečná především bezproblémovou kultivací, širokou teplotní tolerancí, vysokou rychlostí růstu a širokým spektrem použití. *Chlorella* je schopná růst jak v autotrofních, tak heterotrofních podmínkách. To znamená, že se kultivuje na organickém substrátu glukózy ve tmě. Heterotrofní kultivace je nezávislá na klimatických podmínkách a produkce jsou vyšší než v případě autotrofní kultivace [15]. Vzhledem ke své snadné a bezproblémové kultivaci a vysokému obsahu škrobů může být významná i pro výrobu biopaliv [4]. Problémem by mohla být značná variabilita v obsahu sacharidů v závislosti na kultivačních a světelných podmínkách a také rozdílnost jednotlivých kmenů.

KMEN 218

Kmen zelené mikrořasy získaný z laboratoře Aquakultur na univerzitě v Canakkale v Turecku (Çanakkale Onsekiz Mart University, Department of Aquaculture, Çanakkale, Turecko) od prof. Tolgy Goksana. Jedná se o kmen z třídy *Chlorophyceae*, druh se zatím nepodařilo určit.



Obr. 9. Sladkovodní kmen *Scenedesmus quadricauda* focený v optickém mikroskopu při zvětšení 400 × (Foto: Ing. Magda Sergejevová, Ph. D., MBU AV ČR)



Obr. 8. Buňky *Nannochloropsis limnetica* focené v optickém mikroskopu při zvětšení 400
(<http://ccala.butbn.cas.cz>)

Scenedesmus (Desmodesmus) almeriensis

Zelená sladkovodní řasa z třídy *Chlorophyceae*. Kmeny scenedesmů se vyskytují převážně v planktonu stojatých vod. Kmen *almeriensis* je známý vysokým obsahem karotenoidu luteinu a je chráněn patentem [28]. Tento antioxidant je velice prospěšný pro lidský zrak, chrání oči před šedým zákalem [4]. Kultivace může být problematická, optimální teplota je 25 °C, proto je nutné kulturu během kultivace chladit na požadovanou teplotu. Další známé kmeny s potencionálním použitím v biotechnologiích jsou *Scenedesmus quadricauda* a *Scenedesmus obliquus*. Podle nového názvosloví je tento druh pojmenován *Desmodesmus* [15].

Nannochloropsis limnetica

Mezi mikrořasy druhu *Nannochloropsis* patří jak sladkovodní tak mořské kmeny. *Nannochloropsis limnetica* je sladkovodní kmen, který se řadí do třídy *Eustigmatofyceae*. Buňky jsou kulaté, malé 2 – 3 μm a špatně sedimentují. Kultivační teplota je nízká,

24 - 25 °C. Tento kmen je zajímavý především vysokým obsahem lipidů s potenciálem využití v kosmetice, farmacii nebo k produkci biopaliv [19].

1.5 Metody získání biomasy z vodního prostředí

Získání biomasy mikrořas vyžaduje převážně fyzikálně – chemické procesy v podobě sedimentace, flokulace nebo odstředění [29]. Pro biotechnologické účely je zapotřebí z biomasy mikrořas získat kašovitou zahuštěnou suspenzi a toho lze docílit právě zmíněnými metodami.

Nejčastější metodou je použití průtočně centrifugy, kde je suspenze buněk zahuštěna odstředivou silou a čerpadlem rovnou vedena do sprejové sušárny kde dochází k odpaření vody a získání suchého prášku. Pokud bude biomasa využívána pro energetické účely, je možné centrifugaci nahradit flokulací, přidávkem flokulantu a vysrážením biomasy ve vločkách. K její separaci postačí gravitace, což celý proces zrychlí a zlevní.

Metody pro získání biomasy makrofyt jsou založené čistě na mechanickém principu. Vodní mor z Velkého Boleveckého rybníka v Plzni je sklizen pomocí podvodní kosa s žacími listy poháněné elektromotorem. Toto zařízení je schopné kosit ponořenou biomasu v hloubce až 1,8 m. Přes kosa je třeba položit konstrukce na připevnění plastových hrábí pro dopravení posečené biomasy ke břehu [26].



Obr. 10. Ukázka podvodní kosa firmy Reedman Services, Ltd.

Dalším zařízením pro sklizeň ponořené biomasy je podvodní harvester - kombajn, který je schopen účinnějšího a pohodlnějšího sečení. Oproti podvodní kose je vybaven sběračem biomasy, tudíž odpadá potřeba hrábí pro dopravení posečené biomasy ke břehu. Biomasa je jednoduše vyzdvižena na palubu kombajnu a takto odvezena [26].



Obr. 11. Harvestoru používaný ve Velké Británii
(<http://www.aquaticcontrol.co.uk>)

V případě plovoucích makrofyt (*Lemna minor*, *Azolla filiculoides*) se jedná o povrchovou sklizeň. V čistírně odpadních vod Thisted v Dánsku, kde využívají Azollu k dočišťování odpadní vody, sklízí rostlinu vysátím z vodní hladiny pomocí vozidla určeného k čištění kanalizací a septiků [14]. Plovoucí biomasu je také možné odstranit pomocí speciálních naběráků, tato metoda je však vhodná pouze pro menší vodní plochy. V případě velkých nádrží je efektivnější použít mechanizaci [30].

1.6 Vysvětlení pojmů

1.6.1 Lyofilizace

Lyofilizace je proces, kdy dochází k odpaření vody ze zmrzlého vzorku ve vakuu při teplotách 15 – 20 °C. Zařízení pro získání sušiny touto metodou se nazývá lyofilizátor. Tento proces je ohleduplný ke všem látkám v buňkách (vitamíny, sacharidy, lipidy, aminokyseliny, enzymy, ...). Čerstvá biomasa se zmrazí při teplotě -80 °C nejméně

po dobu 30 min a vloží se do předem vychlazeného lyofilizátoru, kde se vytvoří vakuum. Teplota sušení je 20 - 25 °C. Délka sušení je závislá na množství vzorku a musí být experimentálně odzkoušena. Metoda je často používaná v potravinářském průmyslu k získání trvanlivých potravin v suchém stavu za současného zachování co nejvyšší nutriční hodnoty bez přidavku chemických konzervantů a stabilizátorů.

1.6.2 Sonikace

Sonikace je proces, při kterém jsou použity ultrazvukové vlny pro destrukci buněčné stěny. Vzorky jsou ponořeny do vodní lázně a vysíláním ultrazvukových vln o vysoké frekvenci dochází k rozkmitání a mechanickému poškození buněčné stěny. Tím se docílí uvolnění látek obsažených v buňkách a je pak možné s nimi dále pracovat, popřípadě analyzovat jejich množství. Proces destrukce je intenzivnější se zvyšující se teplotou. Při teplotách vyšších než 35 °C může docházet k destrukci jak buněčné stěny, tak látek obsažených v buňkách.

1.6.3 Škroby

Škroby jsou zásobní látky, které syntetizují zelené rostliny prostřednictvím fotosyntézy. Zelené rostliny jsou jedinými producenty těchto látek. Neumíme je vyrábět uměle pomocí chemických procesů. Škrob je polysacharid tvořící dlouhé řetězce vzájemně spojených molekul glukózy, kterých bývá několik desítek tisíc v jedné řetězci. Složení makromolekul škrobu je poměrně složité a liší se podle rostlinného druhu, ze kterého pochází. Škroby jsou hlavním zdrojem energie, která je pro organismus rychle dostupná. Jsou obsaženy ve všech rostlinných buňkách, nejvíce v jádrech, semenech i plodech. Jsou ve vodě nerozpustné, pouze bobtnají, mají bílou barvu a jsou bez chuti. Pokud chceme použít škrob pro výrobu ethanolu, je nezbytné ho hydrolyzovat na zkvasitelné nižší sacharidy.

1.6.4 Lipidy

Lipidy jsou látky, ve kterých je uchována zásoba energie jak v rostlinných, tak živočišných buňkách (1 g lipidu obsahuje 39 kJ) [23]. V organismech mají často další funkce, jako je tepelná izolace či přenos látek přes buněčnou stěnu. Jsou součástí mnoha enzymatických komplexů, sorbují na sebe některé toxické látky a tím chrání organismus před jejich negativními účinky. Chemické složení lipidů se velice liší, většinou se jedná o estery trojmocného alkoholu (glycerolu) a vyšších mastných kyselin. Nezávisle na složení jsou všechny lipidy hydrofobní, nerozpustné ve vodě, rozpustné v organických rozpouštědlech. Lipidy obsažené v biomase rostlin je možné izolovat a uchovanou energii dále využít.

1.6.5 Spalné teplo

Spalné teplo je množství tepla, uvolněné úplným spálením vzorku v kyslíku za předepsaných podmínek. Produkty spalování se skládají z plyných látek (kyslík, dusík, oxid uhličitý, oxid siřičitý), kapalných látek (voda v kapalném stavu nasycená oxidem uhličitým za reakčních podmínek v tlakové nádobě) a nespalitelných pevných látek (popel). Stanovení se provádí při referenční teplotě 25 °C [3]. Spalné teplo se udává jako hodnota specifické energie spalování v joulech na jednotku hmotnosti tuhého biopaliva [J/kg]. Zařízení, ve kterém se stanovení provádí, se nazývá kalorimetr s tlakovou nádobou [3].

1.6.6 Výhřevnost

Je to hodnota spalného tepla snižená o skupenské výparné teplo vody, které vzniká při hoření každého paliva a je odváděno spolu se spalinami. Celková voda reakčních zplodin zůstává ve formě vodní páry při referenční teplotě 25 °C [3]. Udává se jako hodnota specifické energie spalování v joulech na jednotku hmotnosti biopaliva [J/kg] uvolněné jeho spálením v kyslíku. Zařízení, ve kterém se stanovení provádí, se nazývá

kalorimetr s tlakovou nádobou [3]. Pomocí výhřevnosti je možné porovnat energetický potenciál biomasy různých druhů rostlin a mikrořas s jinými zdroji energie.

2 Analýza energetického potenciálu biomasy

2.1 Lokalizace, odběr a zpracování vzorků makrofyt pro experimenty

Ve své práci jsem se zaměřila na rostliny, které způsobují ekologické problémy při vysoké eutrofizaci ekosystémů rybníků a přehrad a jejich možné využití v bioenergetice. Jedná se o dva druhy běžně se vyskytující v České republice, o okřehek a vodní mor a dále o rostlinu *Azolla*, se kterou jsem se setkala během svého studijního pobytu v Dánsku v Centru obnovitelných zdrojů energie (Nordic Folkecenter for Renewable Energy in Denmark) v rámci programu Free-movers. Při odběrech makrofyt jsem sledovala také změny během vegetační sezóny.

Tabulka 1. Označení vzorků makrofyt včetně jejich termínu sběru z přírody

Název rostliny	Označení vzorku	Datum sběru
<i>Lemna minor</i>	L - VII	9. 7. 2012
	L - VIII	20. 8. 2012
	L - X	10. 10. 2012
<i>Elodea canadensis</i>	E - VII	8. 7. 2012
	E - VIII	21. 8. 2012
	E - X	18. 10. 2012
<i>Azolla filiculoides</i>	A - VIII	6. 8. 2012
	A - IX	25. 9. 2012

Vzorky okřeheku L – VII a L – VIII jsem odebrala z celoročně provozovaných nádrží třeboňských sádek, které se nacházejí pod hrází rybníka Svět. Okřehek L - X jsem odebrala ze starých sádek v Třeboni, nedaleko Mikrobiologického ústavu AV ČR. Vodní mor (*Elodea*) E – VII a E - X jsem odebrala z rybníka Malé Stavidlo v Třeboni. Vzorek E - VIII byl odebrán z Velkého Boleveckého rybníka v Plzni. Vzorky A – VIII a A – IX jsem

odebrala z bazénů pro kultivaci této rostliny v Centru obnovitelných zdrojů energie v Dánsku (Nordic Folkecenter for Renewable Energy in Denmark).

Všechny uvedené vzorky jsem nasbírala do plastové vzorkovnice, ihned po odběru promyla pitnou vodou, a v maximální možné míře jsem odstranila nečistoty případně jiné rostliny. Během 2 hodin jsem vzorky zmrazila při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně je nechala vysušit pomocí lyofilizace. Pouze vzorky Azolly A – VIII a A – IX jsem sušila teplým vzduchem v troubě při teplotě $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky L – VII a E – VIII byly vysušeny jak lyofilizací, tak sušením v horkém vzduchu pro srovnání vlivu procesu sušení na obsah sledovaných látek. Suchou biomasu jsem uchovávala pro další zpracování v nepropustném igelitovém sáčku na suchém místě při teplotě $20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Kultivace a zpracování vybraných druhů mikrořas pro experimenty

Všechny kmeny mikrořas jsem získala v laboratoři Biotechnologie Mikrobiologického ústavu s možností otestovat jejich energetický potenciál v rámci své diplomové práce.

Tabulka 2. Seznam kmenů mikrořas a jejich označení v diplomové práci. U jednotlivých kmenů je uveden způsob kultivace a vysušení biomasy před uskladněním.

Název kmene	Označení vzorku	Způsob kultivace	Metoda sušení
KMEN 218	218	laboratorní kultivace	lyofilizace
<i>Chlorella vulgaris</i> (autotrofní)	Chl-a	kultivace na tenké vrstvě	sprejová sušárna
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Sc	neznámá kultivace	lyofilizace
<i>Chlorella sp.</i> (heterotrofní)	Chl-h	ve fermentorech na glukóze	sprejová sušárna
<i>Trachydiscus minutus</i>	Trch	panelový fotobioreaktor	lyofilizace
<i>Nannochloropsis limnetica</i>	Nan	laboratorní kultivace	lyofilizace

Proces lyofilizace je podrobně popsán v teoretické části a byl použit k sušení mikrořas získaných kultivací v laboratorních fotobioreaktorech o objemu do 100 ml. *Chlorella* byla získána z masové velkoobjemové kultivace (2000 litrů) a pro sušení byla použita sprejová sušárna, kde je zahuštěná suspenze mikrořas vstříkována do proudu horkého vzduchu o teplotě 150 °C. Suspenze je během několika sekund vysušena a odpadáva ze sušící komory vlivem gravitace. Jedná se o běžně užívanou metodu sušení biomasy mikrořas v biotechnologii. Celý proces je odladěn tak, aby i přes to, že je dosaženo 2x vyšších teplot vzduchu než je teplota degradace bílkovin, nedocházelo k znehodnocení zásobních látek v buňce. Doba zdržení v horkém vzduchu je několik sekund. Odpařováním vody z biomasy dochází k jejímu ochlazení, tudíž teplota biomasy je nižší než teplota vzduchu a nutriční hodnota biomasy je zachována.

Kmeny mikrořas *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus almeriensis* a *Nannochloropsis limnetica* jsem získala již vysušené a připravené pro analýzy. Kmen 218 a *Trachydiscus minutus* jsem odstředila na vysokorychlostní chladicí centrifuze (Jouan Kr

22i) a zahuštěnou biomasu zmrazila při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně vysušila pomocí lyofilizace.

Následující obrázky demonstrují jednotlivé kultivace uvedené v Tabulce 2.



Obr. 12. Kultivace mikrořasy *Trachydiscus minutus* v panelovém fotobioreaktoru



Obr. 13. Kmen 218 – kultivace mikrořasy v laboratorních podmínkách



Obr. 15. Fermentory pro heterotrofní kultivaci *Chlorelly* sp., MBU AV ČR



Obr. 14. Venkovní kultivace mikrořas na tenké vrstvě, MBU AV ČR

2.3 Stanovení škrobů

Všechny sacharidy obsažené v buňkách byly stanoveny jako obsah škrobů pomocí metody: Stanovení škrobu reakcí s anthronovým činidlem [27] s následnými modifikacemi. Mechanické rozdrčení buněk v třecí misce s mořským pískem místo skleněných kuliček, třepání na vortexu a zmrazování vzorku při teplotě - 20 °C. Pro extrakci pigmentů jsem zvolila 70 % etanol místo 80 %.

Princip metody spočívá v hydrolýze sacharidu na pentózy a hexózy (pěti a šesti uhlíkaté cukry) v kyselém prostředí. Tyto cukry, zjednodušeně glukóza, následně reagují s anthronovým činidlem (fenolová sloučenina) za vzniku zeleného zbarvení, které lze měřit spektrofotometriky při vlnové délce 625 nm. Barva vzorků zůstává stálá 20 minut.

Přesný postup stanovení:

1. Navážila jsem si od každého vzorku 5 mg sušiny s přesností na 0,0001g, převedla do třecí misky, přidala 0,5 ml 70 % etanol, lžičku mořského písku a vzorky jsem třela 3 minuty tloučkem v třecí misce.
2. Obsah třecí misky jsem kvantitativně pomocí 70 % etanolu převedla pipetou do skleněné šroubovací zkumavky o objemu 10 ml a do každé jsem přidala magnetické míchadlo o velikosti 6 mm. Takto připravené vzorky jsem krátce promíchala na vortexu a vložila na 20 minut do vody o teplotě 70 °C.
3. Po odstavení z horké lázně jsem do každé zkumavky přidala 5 ml 70 % etanolu a krátce promíchala na vortexu..
4. Vzorky jsem odstředila 5 min při 3000 rpm a vzniklou horní vrstvu etanolu odsála do odpadu. Celý postup jsem opakovala maximálně třikrát, do úplného odbarvení vzorku. Po posledním odsátí etanolu zůstane na dně zkumavky magnetické míchadlo, rozdrčený mořský písek a rozdrčené buňky obsahující škrob.
5. Do této směsi jsem přidala 3,3 ml 30% kyseliny chloristé (HClO₄), zkumavky zavíčkovala, promíchala na vortexu a vložila na 15 minut do třepané vodní lázně

o teplotě 25 °C. Obsah zkumavek jsem odstředila 5 min při 3000 rpm a vrchní vrstvu převedla odsátím do kalibrované zkumavky. Tento krok jsem opakovala celkem třikrát a jednotlivé podíly pro každý vzorek jsem shromažďovala vždy v jedné zkumavce. Obsah kalibrovaných zkumavek jsem doplnila 30 % kyselinou chloristou do 10 ml a uložila do ledové tříště.

6. Z každého vzorku jsem odebrala 0,5 ml a smíchala s 2,5 ml činidla (0,2 g anthronu v 100 ml 72 % kyselině sírové) v šroubovacích zkumavkách umístěných v ledové tříšti. Zkumavky jsem zašroubovala.
7. Obsah zkumavek jsem intenzivně promíchala a vložila do vroucí vody na 8 minut a po vytažení z vroucí vody jsem vzorky okamžitě zchladila v ledové tříšti.
8. Po zchlazení jsem měřila absorpenci vzorků při vlnové délce 625 nm na spektrofotometru (SPEKOL, Německo) v 0,5 cm skleněných kyvetách proti slepému vzorku. Slepý vzorek jsem připravila reakcí 0,5 ml 30 % kyseliny chloristé a anthronovým činidlem dle bodu 6, má světle žlutou barvu.
9. Z lineární rovnice kalibrační křivky jsem stanovila koncentraci glukózy ve vzorku a vynásobením koeficientem 0,9 jsem provedla korekci na obsah škrobu ve vzorku. Kalibrační roztoky byly připraveny z roztoku glukózy v koncentraci 0 až 400 mg/l stejným způsobem jako vzorky. Kalibrační křivka je charakterizovaná lineární rovnicí se směrnici $k = 0,004$.

Výpočet obsahu škrobu

Pro výpočet obsahu glukózy ve vzorku jsem použila vzorec (1).

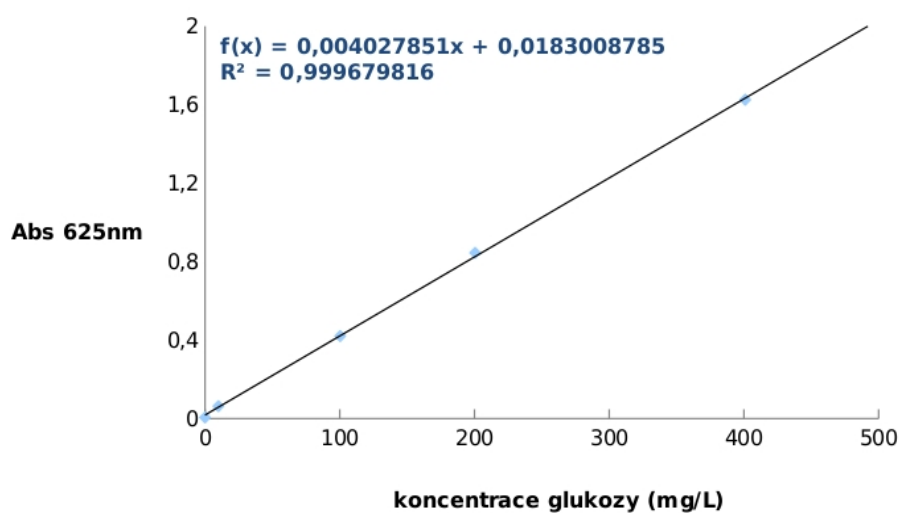
$$C_{\text{glukóza}} = \text{Abs}_{625}/k \quad (1)$$

Obsah škrobu (mg/l) ve vzorku jsem získala vynásobením koncentrace glukózy $C_{\text{glukóza}}$ koeficientem 0,9 podle vzorce (2).

$$C_{\text{škrob}} = C_{\text{glukóza}} * 0,9 \quad (2)$$

V posledním kroku jsem přepočítala koncentraci škrobu (mg/l) na jednotku biomasy (mg/g) a procentuální obsah v biomase (%).

m	... hmotnost sušiny [g]
Abs ₆₂₅	... absorbance extraktu měřená při 625 nm proti lepému vzorku
C _{glukóza}	... koncentrace glukózy ve vzorku spočítaná z kalibrační rovnice [mg/l]
C _{škrob}	... koncentrace škrobu ve vzorku [mg/l]
C%	... koncentrace škrobů v biomase [%]
k	... směrnice kalibrační křivky k = 0,0041
0,9	... koeficient pro výpočet obsahu škrobu ve vzorku z koncentrace glukózy



Obr. 16. Kalibrační křivka závislosti absorbance extraktu na koncentraci glukózy.

Příklad výpočtu pro okřehek:

$$m = 0,0055 \text{ g}$$

$$k = 0,0041$$

$$\text{Abs}_{625} = 0,278$$

$$C_{\text{glukóza}} = 0,278/k = 0,278/0,0041 = 67,80 \text{ mg/l}$$

$$C_{\text{škrob}} = 67,80 * 0,9 = 61,02 \text{ mg/l}$$

Přepočet hmotnosti škrobu na jednotku biomasy:

61,02 mg škrobu 1 litr

X mg škrobu..... 10 ml

X = 0,6102 g škrobu v 10 ml, tzn v 0,0055 g biomasy

$$C_{\text{škrob}} = 0,6102/0,0055 = 111 \text{ mg/g}$$

$$C\% = (C_{\text{škrob}} / 1000) \cdot 100 = 11,10 \%$$

2.4 Stanovení lipidů

Stanovení obsahu všech lipidů v biomase jsem prováděla podle metody Fabrice Pernet and Rejean Tremblay z roku 2003 [8]. Princip metody spočívá v extrakci všech látek z buňky do rozpouštědla a rozdělení vyextrahovaných látek podle polaritativy mezi 2 nemísitelná rozpouštědla. Hydrofobní fáze s obsahem lipidů je odpařena a množství lipidů stanoveno gravimetricky.

Přesný postup stanovení:

1. Do 10 ml skleněných šroubovacích zkumavek jsem navážila 20 mg suchého vzorku s přesností na 0,0001 g.
2. Do každé zkumavky jsem přidala 1 ml dichlormethanu (DCM), 2 ml methanolu (MetOH) a 1 ml destilované vody. Zkumavky jsem zavíčkovala a promíchala na vortexu.
3. Promíchané vzorky jsem vložila na 15 minut do ultrazvukové vodní lázně při 30 °C.
4. Do každé zkumavky jsem přidala 1 ml DCM a 1 ml destilované vody a takto vzniklou směs jsem opět promíchala na vortexu.
5. Vzorky jsem odstředila v centrifuze při 3500 rpm po dobu 15 minut. Po odstředění

vznikly v každé zkumavce tři vrstvy. Vrchní vrstva obsahovala roztok MetOH, destilované vody a rozpuštěných polárních látek. Prostřední tenká vrstva byla složená čistě z rozbitých buněk biomasy obsahující pigmenty a spodní vrstva obsahovala DCM a v něm rozpuštěné lipidy. Pokud je prostřední vrstva příliš silná, je nezbytné celé stanovení opakovat s menší navázkou biomasy.

6. Poslední vrstvu DCM s lipidy jsem Pasteurovou pipetou odsála do destilační hruškové baňky (srdcovky). Jedná se o nejsložitější krok celé analýzy, který může zane­st velkou chybu do celého stanovení. Odsátí spodní vrstvy ze zkumavky lze provést pouze jednou, pipetou se totiž rozmíchají jednotlivé vrstvy. Pokud je třeba odsát spodní vrstvu na dvakrát, je nutné před druhým odsátím vzorek ve zkumavce promíchat a znovu odstředit.
7. Do zkumavky jsem přidala 2 ml DCM, promíchala a odstředila. Spodní vrstvu jsem odsála Pasteurovou pipetou a přidala do srdcovky se vzorkem. Tento krok je možné opakovat celkem dvakrát.
8. Extrakty DCM s lipidy jsem odpařila na vakuové odparce a odparek rozpustila v 0,5 ml roztoku DCM : MetOH v poměru 2 : 1 a kvantitativně převedla do zvážené skleněné vialky o objemu 2 ml.
9. Roztok jsem odpařila pomocí plynného N₂ a vialku zvažila. Z rozdílu hmotnosti vialky se vzorkem a čisté vialky jsem stanovila hmotnost lipidů ve vzorku a přepočtem na navázkou jsem vyjádřila procentuální obsah lipidů v biomase.

Výpočet obsahu lipidů

Podle vzorce (3) jsem spočítala procentuální obsah lipidů v biomase.

$$C_{lipid} = (m_{lipid} * 100) / m_{vz} \quad (3)$$

C_{lipid} ... obsah lipidů ve vzorku [%]

m_{lipid} ... hmotnost lipidů ve vzorku [g]

m_{vz} ... hmotnost vzorku pro analýzu [g]

Příklad výpočtu pro *Nannochloropsis limnatica*:

$$m_{vz} = 0,0214 \text{ g}$$

$$m_{lipid} = 0,0083 \text{ g}$$

$$C_{lipid} = (0,0083 * 100) / 0,0214 = 38,78 \%$$

2.5 Spalné teplo a výhřevnost

Analýza spalného tepla byla provedena na izoperibolickém kalorimetru LECO AC 350. Jedná se o kalorimetr s konstantní teplotou okolí zajištěnou temperovaným vnějším pláštěm. Teplo uvolněné spálením vzorku se předává do vody ve vnitřní vyjímatelné nádobě. Současně byl u vzorků stanoven popel a obsah vody.

Stanovení spalného tepla a výhřevnosti provedla Teplárna Strakonice, a.s.

Metoda stanovení vody v původním vzorku vychází z normy ČSN 44 1377.

Metoda stanovení popela a spalného tepla vychází z normy ČSN ISO 1171.

3 Výsledky analýzy energetického potenciálu

3.1 Mikrořasy

Tabulka 3. Obsah lipidů v sušině mikrořas

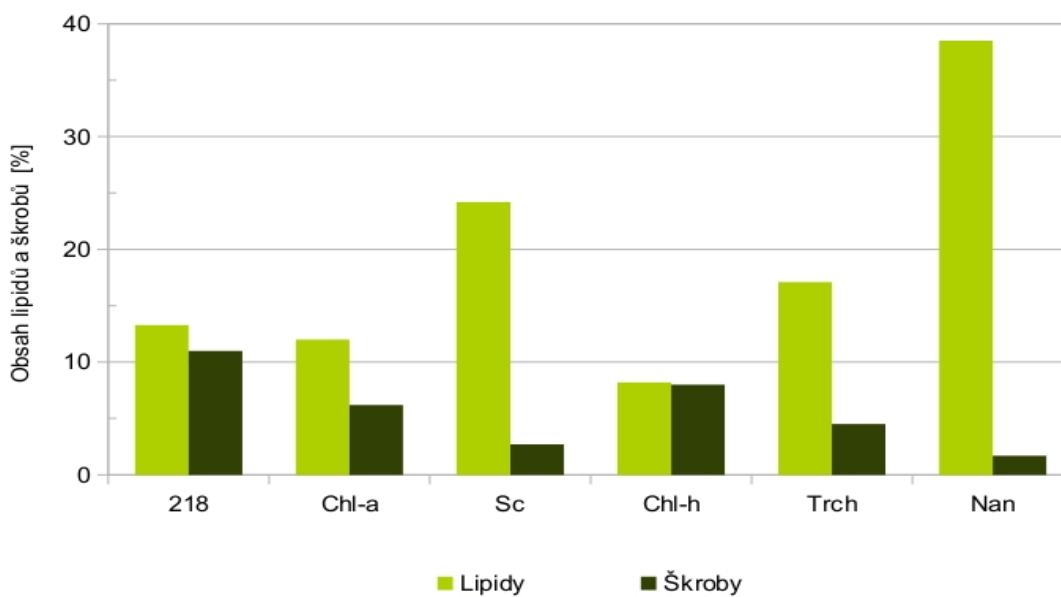
Vzorek		218	Chl-a	Sc	Chl-h	Trch	Nan
1	[%]	19,6	12,1	19,7	7,8	18,7	41,6
2	[%]	13,2	11,5	27,3	8,7	17,6	33,8
3	[%]	12,4	11,2	26,7	8,4	16,1	38,8
4	[%]	8,1	13,1	23,3	8,0	15,9	40,0
Průměrná hodnota	[%]	13,3	12,0	24,2	8,2	17,1	38,5
Směrodatná odchylka	[%]	4,8	0,8	3,5	0,4	1,3	3,4

Tabulka 4. Obsah sacharidů v sušině mikrořas

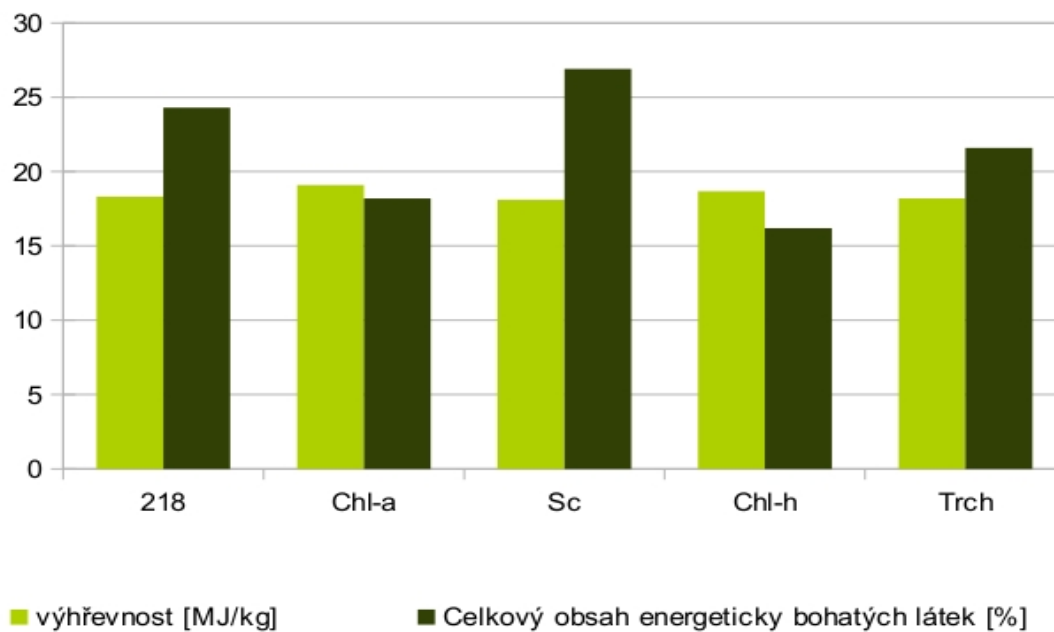
Vzorek		218	Chl-a	Sc	Chl-h	Trch	Nan
1	[%]	14,0	6,6	2,5	7,3	5,2	1,9
2	[%]	10,6	5,0	3,1	7,2	2,9	1,6
3	[%]	9,0	6,8	2,6	8,9	5,4	1,5
Průměrná hodnota	[%]	11,2	6,2	2,7	8,0	4,5	1,7
Směrodatná odchylka	[%]	2,6	1,0	0,3	1,2	1,4	0,2

Tabulka 5. Složení biomasy vodní rostliny *Lemna minor* a její výhřevnost. Organické látky byly stanoveny odečtením obsahu popela a vody ze 100 %.

Vzorek	Popel [%]	Voda [%]	Organické látky [%]	Lipidy [%]	Sacharidy [%]	Q _{ir} [MJ/kg]	Q _{rs} [MJ/kg]
218	5	13	82	13	11	18,3	19,7
Chl-a	5	10	85	12	6	19,1	20,4
Sc	11	9	80	24	3	18,1	19,4
Chl-h	4	11	85	8	8	18,7	20,3
Trch	2	13	85	17	5	18,2	19,6



Obr. 17. Obsah škrobů a lipidů mikrořas



Obr. 18. Závislost výhřevnosti na obsahu energeticky bohatých látek mikrořas

3.2 Makrofyta

Lemna minor

Tabulka 6. Obsah lipidů [%] v suché biomase vodní rostliny *Lemna minor*. Vzorek VII-S byl sušen teplým vzduchem, zbývajících 3 vzorky VII, VIII a X byly sušeny lyofilizací.

Vzorek		L -VII	L - VII - S	L - VIII	L - X
1	[%]	5,8	4,9	6,8	7,4
2	[%]	3,4	7,9	5,8	5,2
3	[%]	3,3	5,0	7,8	6,2
Průměrná hodnota	[%]	4,2	6,4	6,8	6,3
Směrodatná odchylka	[%]	1,4	2,6	1,0	1,1

Tabulka 7. Obsah sacharidů v suché biomase vodní rostliny *Lemna minor*. Vzorek VII-S byl sušen teplým vzduchem, zbývajících 3 vzorky VII, VIII a X byly sušeny lyofilizací.

Vzorek		L -VII	L - VII - S	L - VIII	L - X
1	[%]	11,1	7,9	10,7	8,6
2	[%]	10,7	4,9	12,1	8,4
3	[%]	24,1	9,7	12,2	8,9
Průměrná hodnota	[%]	15,3	7,5	11,7	8,6
Směrodatná odchylka	[%]	7,6	2,4	0,9	0,3

Tabulka 8. Složení biomasy vodní rostliny *Lemna minor* a její výhřevnost. Organické látky byly stanoveny odečtením obsahu popela a vody ze 100 %.

Vzorek	Popel [%]	Voda [%]	Organické látky [%]	Lipidy [%]	Sacharidy [%]	Q _{ir} [MJ/kg]	Q _{rs} [MJ/kg]
L - VII	11	13	77	4	15	14,2	15,5
L - VIII	11	13	76	7	12	13,8	15,1
L - X	13	12	75	6	9	13,7	14,9

Elodea canadensis

Tabulka 9. Obsah lipidů [%] v suché biomase vodní rostliny *Elodea canadensis*. Vzorek VII-S byl sušen teplým vzduchem, zbývající 3 vzorky VII, VIII a X byly sušeny lyofilizací.

Vzorek		E - VII	E - VIII	E - VIII - S	E - X
1	[%]	9,4	6,8	4,9	10,5
2	[%]	7,2	3,4	9,0	11,4
3	[%]	5,3	10,2	6,1	11,3
Průměrná hodnota	[%]	7,3	6,8	6,7	11,1
Směrodatná odchylka	[%]	2,1	3,4	2,1	0,5

Tabulka 10. Obsah sacharidů v suché biomase vodní rostliny *Elodea canadensis*. Vzorek VII-S byl sušen teplým vzduchem, zbývající 3 vzorky VII, VIII a X byly sušeny lyofilizací.

Vzorek		E - VII	E - VIII	E - VIII - S	E - X
1	[%]	3,4	10,7	17,2	13,8
2	[%]	8,2	9,5	11,1	14,5
3	[%]	3,5	15,1	13,8	19,0
Průměrná hodnota	[%]	5,0	11,8	14,1	15,8
Směrodatná odchylka	[%]	2,7	2,9	3,1	2,8

Tabulka 11. Složení biomasy vodní rostliny *Elodea canadensis* a její výhřevnost. Organické látky byly stanoveny odečtením obsahu popela a vody ze 100 %.

Odběr vzorku	Popel [%]	Voda [%]	Organické látky [%]	Lipidy [%]	Sacharidy [%]	Q _{ir} [MJ/kg]	Q _{rs} [MJ/kg]
E – VII	14	14	72	7	5	12,2	13,5
E - VIII	10	28	62	7	12	12,8	14,1
E - X	12	11	77	11	16	12,5	14,8

Azolla filiculoides

Tabulka 12. Obsah lipidů [%] v suché biomase vodní rostliny *Azolla filiculoides*. Vzorke VIII a IX byly sušeny horkým vzduchem místo lyofilizace.

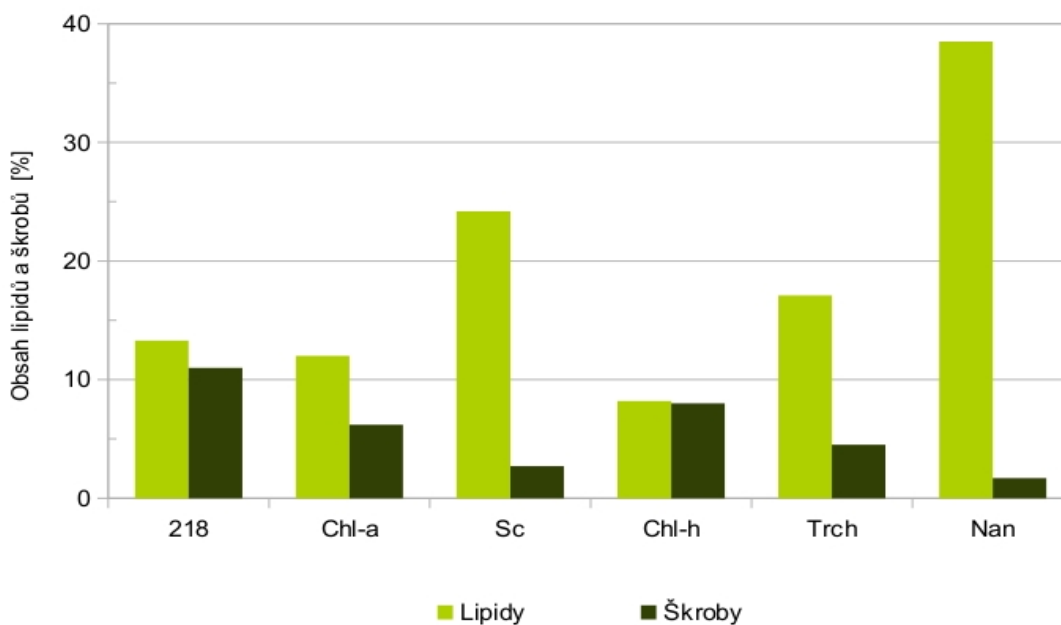
Vzorek		A - VIII	A - IX
1	[%]	14,5	14,1
2	[%]	15,3	15,0
3	[%]	14,9	-
Průměrná hodnota	[%]	14,9	14,5
Směrodatná odchylka	[%]	0,4	0,6

Tabulka 13. Obsah sacharidů v suché biomase vodní rostliny *Azolla filiculoides*. Vzorke A - VIII a A - IX byly sušeny horkým vzduchem místo lyofilizace.

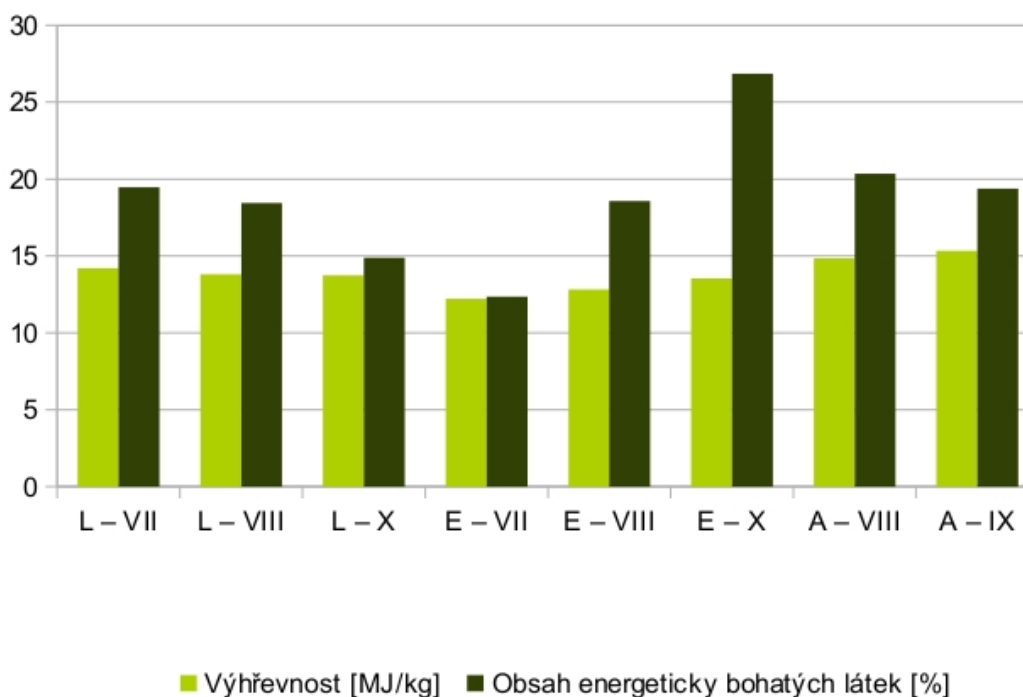
Vzorek		A - VIII	A - IX
1	[%]	6,7	3,5
2	[%]	6,1	5,2
3	[%]	3,5	5,8
Průměrná hodnota	[%]	5,5	4,8
Směrodatná odchylka	[%]	1,7	1,2

Tabulka 14. Složení biomasy vodní rostliny *Azolla filiculoides* a její výhřevnost. Organické látky byly stanoveny odečtením obsahu popela a vody ze 100 %.

Vzorek	Popel [%]	Voda [%]	Organické látky [%]	Lipidy [%]	Sacharidy [%]	Q _{ir} [MJ/kg]	Q _{rs} [MJ/kg]
A - VIII	8	14	78	15	6	14,8	16,2
A - X	7	14	79	15	5	15,3	16,7



Obr. 19. Obsah lipidů a škrobů makrofyt



Obr. 20. Závislost výhřevnosti na obsahu energeticky bohatých látek mikrořas

4 Zhodnocení výsledků

4.1 Mikrořasy

Mikrořasy lze rozdělit do dvou skupin. Kmeny s vysokým obsahem lipidů, *Nannochloropsis limnetica* 39 %, *Scenedesmus almeriensis* 24 % a *Trachydiscus minutus* 17 % a kmeny, které mají srovnatelný obsah lipidů a sacharidů v buňce (kmen 218, *Chlorella vulgaris* a *Chlorella sp.*). V případě mikrořasy *Scenedesmus almeriensis* je obsah lipidů srovnatelný s publikovanými hodnotami v literatuře [9], v případě *Nannochloropsis* je obsah lipidů o 11 % vyšší, u *Chlorella* poloviční [10]. Tyto rozdíly mohou být způsobené 2 faktory: jedná se jiný kmen nebo při kultivaci byly použité jiné kultivační podmínky. U jednotlivých kmenů mohou být velké rozdíly ve složení buněk, v případě mikrořasy *Chlorella vulgaris* se může obsah sacharidů lišit i o více než 20 % [27]. Odladěním kultivace je také možné významně změnit složení buněk jednotlivých kmenů. Regulací světla a nedostatkem některých makroprvků v kultivačním médiu je možné mikrořasu kultivovat při kontrolovatelném stresu a zvýšit v buňkách obsah karotenoidů, sacharidů nebo lipidů [27]. To je pravděpodobně důvod poměrně nízkého obsahu škrobů v mnou sledovaných vzorcích, nevhodné kultivační podmínky pro obsah škrobů v buňce.

Mezi obsahem energeticky bohatých látek lipidů a sacharidů v biomase a samotnou výhřevností biomasy není patrná žádná závislost (obr. 18, 20). Výhřevnost mikrořas je pro většinu kmenů srovnatelná a odpovídá 18 MJ/kg. Nejvyšší výhřevnost má *Chlorella vulgaris* 19,1 MJ/kg, i přesto, že obsah energeticky bohatých látek je u *Chlorella* nejnižší. U kmene *Nannochloropsis limnetica*, který má energii uloženou téměř výhradně v lipidech (39 %) a dvojnásobný obsah energeticky bohatých látek oproti jiným kmenům, se bohužel nepodařilo z časových důvodů změřit výhřevnost a spalné teplo. Přesto předpokládám, že výhřevnost této řasy bude srovnatelná s ostatními zkoumanými kmeny (Tabulka 3). Při srovnání hodnot výhřevností mikrořas a vodních rostlin jsem zjistila, že mikrořasy mají o 3 - 4 MJ/kg vyšší výhřevnost než měřené vodní rostliny, jejichž výhřevnost se pohybuje

v rozmezí 13 – 15 MJ/kg.

Porovnávala jsem výhřevnosti biomasy mikrořas a současných používaných paliv a výsledky jsou velmi zajímavé. Výhřevnosti mikrořas se pohybuje kolem 18 MJ/kg. Oproti tomu výhřevnost hnědého uhlí dosahuje hodnot 10 – 17 MJ/kg. Černé uhlí 21 – 31 MJ/kg, etanol 20 MJ/kg, methan 50 MJ/kg, vodík 120 MJ/kg, palivové dřevo 15 MJ/kg [22].

4.2 Makrofyta

Makrofyta jsem sledovala z hlediska složení biomasy a její výhřevnosti v průběhu sezóny. Na základě změřených hodnot mohu říci, že stejně jako v případě mikrořas, není patrná souvislost mezi obsahem energeticky bohatých látek a výhřevností. Výhřevnost zůstává srovnatelná od července do října, i když složení biomasy je proměnlivé.

V případě okřehek je výhřevnost 14 MJ/kg po celou sezónu, přestože se celkový obsah energeticky bohatých látek snížil o 20 %. Okřehek má obsah lipidů v biomase v průběhu sezóny téměř konstantní (4 – 7 %), což je srovnatelné s hodnotou 4 % lipidů podle *A. Campanella et al., 2012* [9]. Obsah sacharidů okřehek je 15 % v červenci a v říjnu jen 9 %, dochází ke snížení o 6%. Tyto hodnoty se podstatně liší od 48 % obsahu škrobů, jak popisuje Cheng [12]. Cheng pěstoval směsnou kulturu několika vodních rostlin na odpadní vodě, kde vysoké hodnoty dusíku a fosforu – nutrientů mohou zásadně ovlivnit produkci škrobu v buňkách.

V biomase vodního moru narůstá obsah energeticky bohatých látek v průběhu sezóny. Koncentrace sacharidů se zvýšila 3x z 5 % v červenci na 15 % v říjnu, obsah lipidů se zvýšil ze 7 na 11 %. Přesto, že se obsah energeticky bohatých látek zdvojnásobil, hodnoty výhřevnosti zůstávají srovnatelné (12 MJ/kg).

Obsah látek v biomase vodní rostliny *Azolla filiculoides* zůstává v rozmezí srpna a září stejný. Výhřevnost 15 MJ/kg je porovnatelná s hodnotami výhřevností hnědého uhlí (11,72 – 17,18 MJ/kg), obilné slámy (15,50 MJ/kg) nebo palivového dřeva [22]. Použitím

Azolly k dočištění odpadní vody v jedné dosazovací nádrži o objemu 700m² je možné sklídit 20 t biomasy během sezóny [14].

Na rozdíl od cíleně kultivovaných mikrořas, což vždy vyžaduje vstupní investici v podobě živin, vody a energie, jsou makrofyta eutrofizovaných vod přebytečnou biomasou, kterou je třeba redukovat. Nevýhodou makrofyt je objemnost biomasy. V porovnání s ostatními běžně používanými surovinami, může být i několikanásobná. S tím souvisí i nároky na skladování, případně přepravu.

Dále jsem posuzovala, zda sušení biomasy při 40 – 50 °C ovlivňuje celkový obsah lipidů a sacharidů v biomase ve srovnání s lyofilizací. Zjistila jsem, že v případě okřehku je obsah lipidů srovnatelný u obou způsobů sušení, ale obsah sacharidů je poloviční 7,5 % místo 15 % při lyofilizaci. V případě vodního moru je obsah lipidů i sacharidů totožný pro oba způsoby sušení (Tabulka 9, 10).

5 Závěr

Úkolem této diplomové práce bylo najít možnosti energetického využití fytomasy eutrofizovaných vod. Pro výzkum jsem použila tři volně rostoucí vodní rostliny a šest kmenů mikrořas, které jsem získala, až na jeden kmen, v aquasystémech fotobioreaktorů Mikrobiologického ústavu AV ČR v Třeboni. Všechny vzorky jsem zpracovávala v laboratoři Mikrobiologického ústavu, kde jsem stanovila obsah energeticky bohatých látek (lipidy, škroby) a spolu se zjištěnou hodnotou výhřevnosti jsem zanalyzovala energetický potenciál těchto vzorků.

Mikrořasy mají vyšší výhřevnot než makrofyta. Nepodařilo se mi však najít souvislost mezi výhřevností a obsahem energeticky bohatých látek (lipidů a sacharidů). Jak mikrořasy, tak i makrofyta mají výhřevnost sušiny totožnou s výhřevností hnědého uhlí. I přes tento fakt nedoporučuji vodní biomasu spalovat. Obsah vody v sušině je totiž vzhledem k získané energii příliš vysoký a množství energie vynaložené pro vyušení biomasy by převýšilo energii získanou.

Porovnáním výsledků mezi sebou jsem zjistila, že kmeny mikrořas jsou obecně bohatší na lipidy než vodní rostliny. Naopak makrofyta jsou schopna akumulovat větší množství sacharidů. Z toho plyne i jejich následné využití.

Biomasa mikrořas bohatá na lipidy, především kmeny *Nanochloropsis limnetica*, *Scenedesmus almeriensis* a *Trachydiscus minutus* jsou svým obsahem lipidů více než vhodné pro produkci biopaliv, konkrétně biodieselu. Vodní rostliny jsou zajímavé svým obsahem škrobů v sušině, a proto mohou být lépe využitelné k produkci bioetanolu. Dále mohu navrhnout využití biomasy vodních rostlin pro výrobu bioplynu a pro následnou kombinovanou výrobu elektřiny a tepla.

6 Použitá literatura

Publikace:

- [1] KOČÍ, V., J. BURKHADR, B. MARŠÁLEK. Eutrofizace na přelomu tisíciletí. 2000. Praha, str. 3-13.
- [2] TWIDELL, J.W. a A.D. WEIR. Renewable Energy Resources. Great Britain: E & FN SPON, 1986. ISBN 0 419 12010 6.
- [3] ČSN EN 14918. *Tuhá paliva - Stanovení spalného tepla a výhřevnosti*: Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010, 52 s.
- [4] KALINA, T. *Systém a vývoj sinic a řas*. Praha, 1994. ISBN 80-7066-854-7.
- [5] STRAKA, F., KUNČÁROVÁ, M., LACEK, P. Optimalizace vsázek pro bioplynové stanice při použití biomasy, živočišných odpadů nebo dalších možných vedlejších živočišných produktů: Technická zpráva zakázky ÚVP č. 781/128/12. Ústav pro výzkum a využití paliv, Praha, 2007. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/32354/Optimalizace_vsazek.doc
- [6] KAJAN, M., LHOTSKÝ, R.. Možnosti zvýšení výroby bioplynu na stávajících zařízeních. ev.č. 222004 6194. Třeboň, Listopad 2006. Dostupné z: <http://www.mpo-efekt.cz/dokument/30.pdf>
- [7] DOHÁNYOS, M.. Závislost výtěžku metanu na složení a předúpravě suroviny. In: [online]. [cit. 2013-04-06]. Dostupné z: <http://www.czba.cz/zavislost-vytezku-metanu-na-slozeni-a-preduprave-suroviny.html>

- [8] PERNET, F., TREMBLAY, R. 2003. Effect of Ultrasonication and Grinding on the Determination of Lipid Class Content of Microalgae Harvested on Filters. *Lipids* 38(11):1191-1195.
- [9] CAMPANELLA, A., MUNCRIEF, R., HAROLD, M. P., GRIFFITH, D. C., WHITTON, N. M., WEBER, R. S.. Thermolysis of microalgae and duckweed in a CO₂-swept fixed-bed reactor: Bio-oil yield and compositional effects. 2012, 154–162. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.12.115. Dostupné z: Web of Science
- [10] FRANK, E. D., ELGOWAINY, A., HAN J., WANG, Z.. Life cycle comparison of hydrothermal liquefaction and lipid extraction pathways to renewable diesel from algae. s. 137-158. ISSN 1573-1596. DOI: 10.1007/s11027-012-9395-1. Dostupné z: Web of Science
- [11] WILEY, P. E., CAMPBELL, J. E., MCKUIN, B.. Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options. 2011, s. 326-338. DOI: 10.2175/106143010X12780288628615. Dostupné z: Web of Science
- [12] CHENG, J. Growing Duckweed to Recover Nutrients from Wastewaters and for Production of Fuel Ethanol and Animal Feed. *Clean*. 2009, roč. 37, č. 1, s. 17-26. ISSN 18630650. Dostupné z: Web of Science
- [13] TESLOVÁ, P., KALINA, J., URBAN, O.. Simultánní stanovení obsahu nestrurních sacharidů a škrobů v listech vyšších rostlin metodou využívající anthronového činidla. *Chem. Listy* 104. 2010, 867-870. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_09_867-870.pdf
- [14] SEDLÁČKOVÁ, M.. *Možnosti energetického využití odpadních vod*. Plzeň, 2011. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta elektrotechnická, Katedra elektrenergetiky a ekologie. Vedoucí práce Ing. Petr Jindra, Ph.D.

- [15] BIONDI, N., TREDICI, M.. Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels: Taxonomy, Biology and Biotechnology. 2011. Dostupné z: http://www.aquafuels.eu/attachments/079_Merged%20reports%20Taxonomy_Biology%20%20Biotechnology.pdf
- [16] STRAKA, F.. Výrobu biopaliv z odpadu spalovny umí jenom řasy? (II). *Biom.cz* [online]. 2010-01-20 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyrobu-biopaliv-z-odpadu-spalovny-umi-jenom-rasy-ii>>. ISSN: 1801-2655.
- [17] ILIEV, I., PETKOV, G., LUKAVSKY, J., FURNATZHIEVA, S., ANDREEVA, R., BANKOVA, V.. The alga *Trachydiscus minutus* (*Pseudostaurastrum minutus*): growth and composition. 2010, s. 222 - 231. ISSN 1312-8183. Dostupné z: <http://www.bio21.bas.bg/ipp/>
- [18] Vodní mor kanadský. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 16. 9. 2012 [cit. 2012-10-31]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Vodn%C3%AD_mor_kanadsk%C3%BD
- [19] Nannochloropsis and biofuels. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, last modified on 31 January 2013 [cit. 2013-02-17]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Nannochloropsis_and_biofuels
- [20] Sinice a řasy pro širokou veřejnost a novináře. [online]. 2003 - 2013 [cit. 2013-02-21]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/pro-vsechny#chlota>
- [21] PEREIRA, A. T., PEREIRA, G. N.. Azolla as a Biofertilizer in Coffee Plantations. [online]. January 2006, September 2011 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: <http://www.ineedcoffee.com/06/azolla/>

- [22] NOVÁK, J. Výhřevnost paliv. In: [online]. [cit. 2013-04-07]. ISSN 1801-4399. Dostupné z: <http://vytapeni.tzb-info.cz/tabulky-a-vypoety/11-vyhrevnosti-paliv>
- [23] Lipidy. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 8. 3. 2013 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Lipidy>
- [24] Škrob. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 5. 4. 2013 [cit. 2013-04-27]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%A0krob>
- [25] Alkoholové kvašení. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 8. 3. 2013 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Alkoholov%C3%A9_kva%C5%A1en%C3%AD
- [26] DURAS, J. Bolevecké rybníky a vodní rostliny. Plzeň. 2012. Dostupné z: <http://www.hrachau.de/downloads/bolevak.pdf>
- [27] BRÁNYIKOVÁ, I., MARŠÁLKOVÁ, B., DOUCHA, J., BREANYIK, T., BIŠOVÁ, K., ZACHLEDER, V., VÍTOVÁ, M.. 2011. Microalgae—novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.*, 108: 766–776. doi: 10.1002/bit.23016. Dostupné z: Web of Science

- [28] SÁNCHEZ, J. F., FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M., ACIÉN, F. G., CERÓN, M. C., PÉREZ-PARRA, J., MOLINA-GRIMA, E.. 2008. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. s. 719-729. ISSN: 1432-0614. DOI: 10.1007/s00253-008-1494-2. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-008-1494-2>
- [29] Algae Harvesting. [online]. Januar 2013, [cit. 2013-05-04]. Dostupné z: <http://www.oilgae.com/>
- [30] IQBAL, S. Duckweed Aquaculture Potentials, Possibilities and Limitations for Combined Wastewater Treatment and Animal Feed Production in Developing Countries. March 1999, Dostupné z: <http://www.eawag.ch/forschung/sandec/publikationen/wra/dl/duckweed.pdf>

7 Přílohy

7.1 Pístroje

Sušicí váha: model MAC 50/1/NH RADWAG 201

Radwag Wagi Elektroniczne

S/N: 342458/11

CE

Max 50g

přesnost: 0,1 mg



Obr. 21. Sušicí váha

Váha: SCALTEC SBC 41, ISO 9001

Třída přesnosti II

Měřicí rozsah max. 410g

Pracovní rozsah 0,02 - 320 g

Rozlišení 0,001g váživost

CE 01 01 11 M

TCM 128/95 - 2090



Obr. 22. Váha

Centrifuga: vysokorychlostní chladicí odstředivka

JOUAN KR 22i

chlazení od -8 do 40 °C

Maximální rychlost: 22500 ot/min.



Obr. 23. Centrifuga

Vortex:

Amplituda kmitů	5 mm
Frekvence kmitů	0 až 2500
Krytí:	IP 22
Hmotnost:	2,8 kg



Obr. 24.Vortex

Vakuová odparka:

Rozsah zvedání baňky:	155 mm
Rozsah otáček baňky:	20 ... 28 ot/min
Teplota lázně:	20 ... 210 °C
Výkon topení lázně:	1300 W
Přesnost:	± 1 °C
Krytí:	IP 20



Obr. 25. Vakuová odparka

SPEKOL 11:

Rozsah vlnových délek:	340 - 850 nm
Spektrální pásma:	11 nm
Rozptyl světla při 340 nm:	0,5%



Obr. 26. SPEKOL 11

Laboratorní ultrazvuková vana K-6LM (sonikátor):

celonerezové provedení
UZ výkon 160 W
ohřev 350 W
termostat: 30-80°C
rozměry [mm]: 500x140x100
výška hladiny: 80 mm
objem: 6 l
výpust' ½"



Obr. 27. Sonikátor

Vysokorychlostní centrifuga:

časovač: 1...100 min
rozměry (š x hl x v) 368 x 437 x 261 mm
hmotnost: cca 25 kg
max. rychlost otáček: 6000 ot/min



Obr. 28. Vysokorychlostní centrifuga