

Heterotrofní kultivace řas *Chlorella* v bioreaktoru

Eva Krajíčková

Bakalářská práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

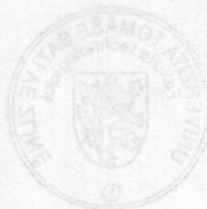
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Krajčíková**
Osobní číslo: **T12781**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Heterotrofní kultivace řas Chlorella v bioreaktoru**

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte dostupnou literaturu a informační zdroje vztahující se k zadanému tématu.
2. Provedte kultivaci řas Chlorella v bioreaktoru.
3. Sledujte vliv obsahu vybraných sloučenin používaných v prostředcích osobní péče na průběh kultivace řas.
4. Výsledky kriticky zhodnoťte a formulujte závěry.



Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. Michael A. Borowitzka, Navid R. Moheimani: *Algae for Biofuels and Energy: Developments in Applied Phycology Svazek 5*. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN: 9400754795, 9789400754799.
2. Faizal Bux (Ed.): *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*. CRC Press, 2013. ISBN: 1466515295, 9781466515291.
3. Álvaro Torres, et al. *Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion, Biodegradation – Engineering and Technology*, Dr. Rolando Chamy (Ed.), ISBN: 978-953-51-1153-5, InTech, DOI: 10.5772/55975.
4. Anderson R. A. (Ed.): *Algal culturing techniques*. Academic Press, 2005. ISBN: 0120884267, 9780120884261.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Roman Slavík, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí


Datum zadání bakalářské práce:

20. ledna 2015

Termín odevzdání bakalářské práce:


22. května 2015

Ve Zlíně dne 10. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan




doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

ředitel ústavu

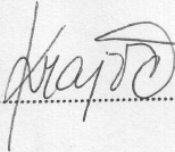
Příjmení a jméno: KRAVIČKOVÁ EVA Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 15.5.2015


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce pojednává o autotrofní a heterotrofní kultivaci řas na čtyřech vybraných organických substrátech: glukóza, syrovátka, sacharóza, glycerol. Ke kultivaci byla vybrána řasa *Chlorella vulgaris*. Rychlost růstu řas byla sledována dle hodnot sušiny zjišťované pomocí spektrofotometrického měření optické hustoty při vlnové délce 680 nm. Dále byl v této práci sledován vliv vybraných sloučenin používaných v prostředcích osobní péče na průběh růstu řas.

Klíčová slova: *Chlorella vulgaris*, kultivace, prostředky osobní péče, substrát

ABSTRACT

This thesis is about autotrophic and heterotrophic cultivation of alga on four carefully selected organic substrates. The substrates used for cultivation were glucose, sacharose, whey and glycerol. The alga species selected for the cultivation was *Chlorella vulgaris* and the growth rate was determined by measuring the content of dry matter using spectrophotometry at fixed wavelength 680 nm. Furthermore, pharmaceutical and personal care products were administered to the cultivation process to observe the effects on the growth rate.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, cultivation, Personal Care Products, substrate

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Romanu Slavíkovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a konzultace. V neposlední řadě děkuji také rodině za podporu při studiu a mému příteli, který mě motivoval během studia mottem: „Základem neúspěchu je odklad.“

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ŘASY (ALGAE)	12
2 CHLORELLA	15
2.1 KULTIVACE A VYUŽITÍ	15
II PRAKTICKÁ ČÁST	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 POUŽITÉ LÁTKY, PŘÍSLUŠENSTVÍ A PŘÍSTROJE	21
3.2 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU KULTIVAČNÍHO MÉDIA BG11	22
3.3 STANOVENÍ SUŠINY MĚŘENÍM OPTICKÉ HUSTOTY	22
3.4 AUTOTROFNÍ KULTIVACE	23
3.5 HETEROTROFNÍ KULTIVACE	23
3.6 KULTIVACE ŘAS V PŘÍTOMNOSTI PCP'S	23
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1 AUTOTROFNÍ KULTIVACE	24
4.2 HETEROTROFNÍ KULTIVACE	28
4.3 KULTIVACE S PCP'S	32
ZÁVĚR	36
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41
SEZNAM TABULEK	42

ÚVOD

Chlorella je v poslední době nejpoužívanějším experimentálním organismem, který reprezentuje fyziologické a biochemické vlastnosti zelených mikroorganismů a rostlin. Má širokou škálu využití, a proto v současnosti probíhá stále více a více výzkumů s těmito organismy. Je nejpoužívanější řasou současného výzkumu, také pro své biologické hodnoty, ovladatelnosti při kultivaci a vysoké růstové rychlosti. *Chlorella* nejvíce roste třetí, pátý a desátý den. Tato řasa potřebuje ke svému růstu zdroj energie ve formě světla nebo organického substrátu, zdroj živin, přísun vzduchu, míchání, určité pH a teplotu. V současné době je řasa komerčně nejznámější jako doplněk stravy pro detoxikaci organismu a jako přírodní antibiotikum. Dále také probíhají výzkumy na používání řas pro výrobu biopaliv a pro zpracování odpadních vod.

Tato práce se zabývá sledováním nárůstu koncentrace a rychlosti růstu řas rodu *Chlorella vulgaris* na různých druzích substrátu- sacharóza, glukóza, glycerol, syrovátka. Kultivace probíhá autotrofně, heterotrofně a s přídavkem sloučenin používaných v prostředních osobní péče po dobu 5 až 16 dní, za laboratorních podmínek.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ŘASY (*ALGAE*)

Řasy můžeme obecně definovat jako poměrně jednoduché, fotosyntetizující organismy produkující kyslík. Tyto organismy tvoří rozsáhlou skupinu, ve které se řasy liší různými životními cykly, velikostí, tvarem, pigmentací a konstrukční složitostí. Vyskytují se ve všech klimatických pásech od severního a jižního pólu až po tropické oblasti. Můžeme je najít například v oceánech, řekách, rýžových polích, betonových površích, ale také například v poušti a pitné vodě, kde způsobují změnu chuti a zápachu.

Existuje několik způsobů rozmnožování řas. První způsob, jak se mohou řasy množit, je vegetativní rozmnožování, kdy dochází u jednobuněčných řas k rozpadu kolonií nebo příčnému dělení buněk. U mnohobuněčných řas pak k fregmentaci stélek. Dalším způsobem je nepohlavní rozmnožování, kdy se vytváří pohyblivá spora (zoospora), nebo nepohyblivá zmenšená kopie mateřské buňky (autospora – u rodu *Chlorella*). Posledním způsobem je pohlavní rozmnožování, kde pomocí gamet vzniká zygota. Pohlavní rozmnožování je ekonomicky náročnější, protože dochází ke ztrátě zárodečných buněk, u kterých nedochází k páření. [1,2]

Řasy obecně dělíme na sladkovodní a mořské. Objevují se ve formě planktonu (organismy tvoří ve vodě suspenzi a jsou přenášeny pasivně – proudem) nebo jsou přisedlé na povrchu (např. na sedimentech, kamenech, rostlinách nebo na stěně nádrže). [2]

V minulosti byly klasifikovány hlavní skupiny na základě pigmentace, skladování produktu fotosyntézy, druhu chloroplastu, druhu bičíků aj. Avšak nedávno uskutečněné genetické analýzy výrazně rozvinuly taxonomii a rozdělily řasy do 9 skupin:

1. Ruduchy (*Rhodophyta*), neboli červené řasy, jsou převážně mořské řasy, které se vyskytují nejvíce na rovníku, a ubývá jich směrem k pólům. Díky využívání modrozeleného spektra, mohou žít ve větších hloubkách (až do 180 m). Ruduchy, které žijí ve sladkých vodách, se kvůli snadnějšímu přísunu živin a kyslíku vyskytují v místech s prudčeji tekoucí vodou. Mohou se také zavrtávat do kamenů či lastur nebo parazitovat na jiných ruduchách. Nejvíce využívaným zástupcem z červených řas je řasa *Porphyra*, která je složkou potravy, krmiv a hnojiv. [3]

2. Obrněnky (*Dinophyta*) jsou řasy sladkovodní i mořské, heterotrofní a fotosyntetické a mají některé jedinečné orgány. Obrněnky jsou důležitou součástí planktonu. Ve dne se vyskytují spíše u hladiny, kde mají větší přísun světla. Kvůli většímu přísunu živin

najdeme tyto řasy v noci ve větších hloubkách. U pobřeží eutrofních vod dochází často k přemnožení, což způsobuje vegetační zbarvení a vznikají tzv. „červené přílivy“, které často způsobují otravu korýšů a ryb, potravním řetězcem také otravu člověka. [4]

3. Skrytěnky (*Cryptophyta*) jsou sladkovodní i mořští, autotrofní i heterotrofní bičíkovci. Tvoří největší část planktonní biomasy. Vyskytují se v horských jezerech, ve vodách mírného pásu, a to i v zimě, kdy jsou těsně pod ledem, protože tyto řasy mají při snížené respiraci velmi efektivní fotosyntetický systém. Někteří zástupci skrytěnek jsou toxičtí, což může způsobit otravu ryb.

4. *Chrysophyta* jsou jednobuněčné organismy s dvěma heterokontními bičíkama. Nejznámějšími zástupci jsou zlato-hnědé řasy (*Chrysophyceae*), neboli zlativky. Živí se mixotrofně, autotrofně nebo heterotrofně. Najdeme je převážně ve sladkých vodách, ale mohou se vyskytovat také ve vodách mořských. Upřednostňují vodu s nízkým obsahem vápníku. Při přemnožení zlativek dochází k silnému zápachu po rybím tuku.

5. Rozsivky (*Bacillariophyta*) jsou jednobuněčné zlato-hnědé řasy, vyznačující se buněčnou stěnou z oxidu křemičitého. Vyskytují se všech možných biotopech. Jsou sladkovodní i mořské. Rozsivky zajišťují 25% primární produkce rostlin na Zemi. Tyto řasy jsou velmi významné při zjišťování znečištění vod, jelikož jsou na kvalitu vody velmi citlivé. Z frustul těchto řas se usazují křemeliny (diatomity), které jsou velmi významné jako filtrační nebo absorpční materiál pro farmaceutický průmysl. Využívají se také při biotechnologii pro získávání oleje a k testování optických mikroskopů.[3,4]

6. *Phaeophyta* jsou hnědé řasy neboli chaluhy. Vyskytují se převážně v mořských vodách, kde je najdeme v maximální hloubce do 50m, protože jsou velmi závislé na světle. [3] Tyto sladkovodní řasy se nacházejí například v rychle tekoucích potocích nebo podél odvodňovacích příkopů. Některé hnědé řasy mohou tvořit kolonie na vlhké půdě. Největší využití nalézají *Phaeophyta* v zemědělství jako krmivo pro ovce, hnojivo a palivo. Déle také v potravinářství k stabilizaci pokrmů nebo imobilizaci kvasinek. Zástupce *Ascophyllum* je zdrojem pesticidu proti hlísticím na citrusech.[3,4]

7. *Xanthophyta* neboli různobrvky jsou spíše sladkovodní řasy. Vzácně se vyskytují v mořských vodách a v půdě, s dvěma různými bičíky.

8. Krásnoočka (*Euglenophyta*) jsou sladkovodní i mořské, výhradně bičíkové řasy, které jsou značně závislé na dostatku organických látek a vitamínů. [3]

9. Zelené řasy (*Chlorophyta*) jsou většinou sladkovodní organismy, z 10% mořské. Velmi často se vyskytují v jezerech, rybnících, mokřích půdách a i v ošetřovaných vodních nádržích. Některé druhy se vyskytují v měkkých, kyselých vodách, které jsou nevhodné pro většinu jiných řas. Zelené řasy jsou obecně považovány za neškodné v zásobárnách vody, avšak mohou se přemnožit a vytvářet „zelenou“ vodu, která poté proudí ven do distribučního systému a mohou způsobovat změnu chuti a zápachu. Některé jejich životní cykly se značně shodují s cykly zelených rostlin. Tyto rostliny jsou pravděpodobně vyvinuty ze zelených řas. Mají širokou škálu využití – například testování trofie vody, využití v medicíně, pro přípravu kosmetických přípravků a krmných směsí. [2-4]

2 CHLORELLA

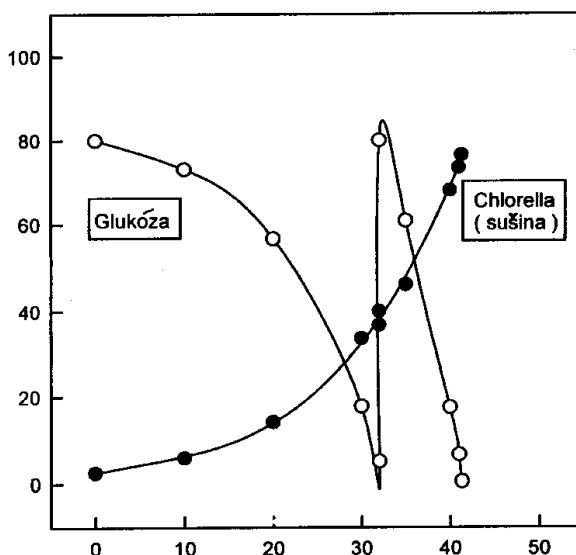
2.1 Kultivace a využití

Bylo prokázáno, že *Chlorella* roste autotrofně, mixotrofně i heterotrofně, přičemž při heterotrofní kultivaci dochází k mnohem lepší akumulaci lipidů za použití různých zdrojů uhlíku a při různých podmínkách. Jedná se o jednu z nejrychleji rostoucích řas, která není nijak náročná na kultivaci. [5] Způsob kultivace řas popisuje také patentový spis vydaný 9. srpna 1961. Tento spis popisuje zejména kultivaci rodu *Chlorella* pro výrobu tuků a mastných kyselin. Tato výroba má značný význam pro výrobu krmiv. Pokud se řasa kultivuje obvyklým způsobem, obsahuje kolem 5 % tuků. Při kultivaci, v důsledku pozdějšího využití tuků řas, je nutné zvýšit obsah tuků alespoň na pěti až šesti násobek normálního. Je potřeba, aby tato kultivace fungovala i v malém objemu a v co nejkratší době. Postup je založen na kultivaci v prostředí, obsahující roztok anorganických živných solí, které obsahují dusík, fosfor a jiné biogenní prvky. Tento roztok je dávkován nadvakrát (poprvé, dojde ke spotřebování a poté se dodají živiny podruhé). K zastavení kultivace dochází v pátém dni, kdy je dosaženo maximálního obsahu tuku v řase. [6]

Zjišťování koncentrace řas, popř. rychlosti růstu, většinou probíhá spektrofotometrickou analýzou, která je nejčastější metodou k určování přibližné koncentrace chlorofylu v roztoku. Metoda je založena na měření absorbancí v jedné nebo několika vlnových délkách s následným odhadem koncentrace chlorofylu, získaných prostřednictvím standardizované rovnice. Kromě chlorofylů, je také možno měřit rostlinné karotenoidy z extrakce roztoku. Síla spektrofotometrické metody spočívá v její jednoduchosti, rychlé analýze vzorků a flexibilitě v testování různých pigmentů. Tato metoda je také levná, a tudíž patří ke každodennímu posuzování obsahu chlorofylu ve vodních zdrojích a dalších environmentálních aplikacích. Největší nevýhodou je nedostatek citlivosti.

Ke kultivaci je potřeba zajistit kultivační médium ve vhodné nádobě, přísun vzduchu, aby umožnil výměnu oxidu uhličitého mezi médiem a atmosférou, a neustálé míchání. Autotrofní řasy potřebují pro růst světlo, oxid uhličitý, vodu, živiny a stopové prvky. Prostřednictvím fotosyntézy bude řasa schopna syntetizovat všechny biochemické sloučeniny, které potřebuje pro růst. Při heterotrofní kultivaci se využívá substrát jako zdroj uhlíku. Nejčastěji používaným substrátem je glukóza, sacharóza a glycerol. [7] Způsob kultivace *Chlorella vulgaris* na glukóze v kultivačním tanku za přítomnosti minerálních živin popi-

suje patentový spis, který popisuje kultivaci probíhající ve dvou fázích. V první se zahajuje kultivace řas při počáteční koncentraci alespoň 10 g/l a koncentrace glukózy by měla být mezi 60 až 90 g/l. Poté dochází k růstu řas a snižování koncentrace glukózy pod 10% počáteční hodnoty. Nastává druhá fáze, kdy se přidává znovu glukóza, které by mělo být dvojnásobné množství odpovídajícím dvojnásobku nárůstu řas a potřebné minerální živiny. Příklad – Kultivace řas probíhala při teplotě 30°C, pH 6,5-7, v 5 l Erlenmayerově baňce, obsahující 3 l živného roztoku o složení (na litr): 80 g glukóza, 16,2 g KNO₃, 2,72 g KH₂PO₄, 4 g MgSO₄·7H₂O, 0,112 g FeSO₄·7H₂O, 0,178 g CaCl₂, mikroelementy Cu, Zn, Co, Mo. Řasy se pěstovaly ve tmě, za stálého třepání na třepačce po dobu 5 dnů. Dosáhlo se koncentrace řas cca 80g/l. [8]



Obrázek 1 Závislost koncentrace (g/l) na čase [8]

Nejdůležitějšími parametry pro růst řas jsou živiny ve správné kvantitě i kvalitě, světlo, pH a teplota. [9]

Teplota při kultivaci by se měla co nejvíce blížit teplotě z místa, ze kterého organismy pochází. *Chlorella*, jakožto řasa pocházející z mírného pásma, by se měla kultivovat při teplotě 13-30°C. Měla by se dodržovat stálá teplota, pokud je potřeba teplotu snížit nebo zvýšit, měla by být měněna po maximálně 2°C za týden. Při teplotách nižších než 13°C dochází ke zpomalení růstu, zatímco teplota vyšší než 30°C může být pro *Chlorellu* až letální. [7]

Světlo je zdrojem energie, která pohání fotosyntetickou reakci. Nejdůležitější roli hraje intenzita světla. Se zvyšující se koncentrací musí být světlo intenzivnější. Ovšem může také dojít k přehřátí. Intenzita a barva světla se dle potřeby může vylepšit různými filtry.

Jak již bylo zmíněno, pro kultivaci je také důležité správné pH prostředí, které se pohybuje mezi 7 až 9.

Míchání je nutné, aby se zabránilo usazování řas, a aby všechny buňky populace měly stejný přístup živin a světla. Většinou se míchání zajišťuje probubláváním vzduchem, denně ručním mícháním, nebo přístroji.

Kultivační nádoby měly být vyrobeny z netoxických, chemicky inertních materiálů s dobrou propustností světla, sterilizovatelné a snadno čistitelné.[7]

Kultivace *Chlorelly* za různých podmínek srovnával ve svém výzkumu Rattanapoltee a kol. Sledovali produkci biomasy a lipidů v základním médiu při třech různých podmínkách - autotrofně, heterotrofně, mixotrofně. Maximálního růstu buněk dosáhli ve třetím, pátém a desátém dni. Obsah lipidů bylo přibližně 57% hmotnosti sušiny biomasy. Heterotrofní růst *C. vulgaris* vedl oproti autotrofní kultivaci k vyšší produkci biomasy a vyšší kumulaci lipidů. Kultivace probíhala v 250 ml láhvi s použitím média o složení (na litr): 0,25g NaNO₃, 0,074g K₂HPO₄, 0,0175g KH₂PO₄, 0,024g CaCl₂·2H₂O, 0,073g MgSO₄·7H₂O, 0,025g NaCl, 0,005g FeSO₄ a 0,045g EDTA při pH 6,8, stálého osvětlení 3000 lux a teplotě 25°C.[9]

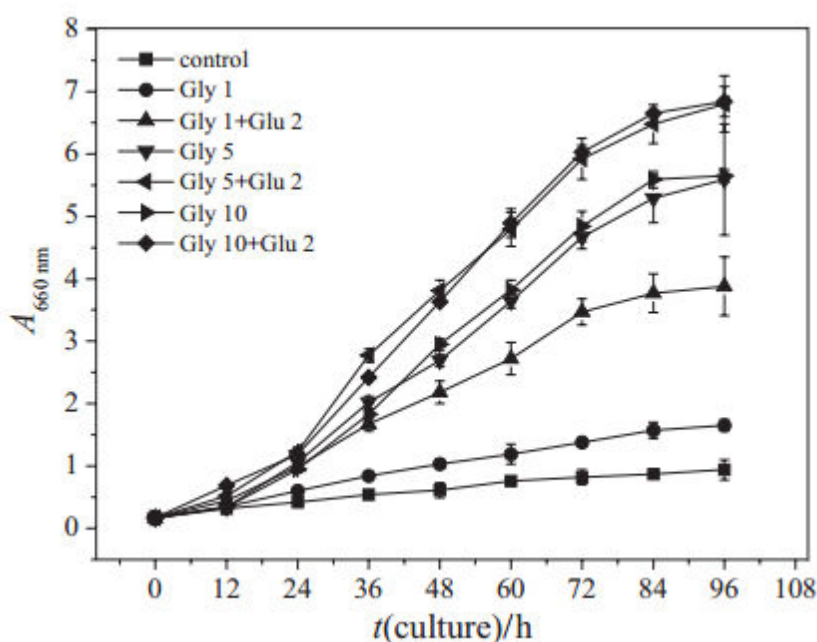
Chlorella je sladkovodní jednobuněčná zelená řasa, která má širokou škálu využití. V porovnání s jinými kmeny je to jedna z nejvíce používaných řas současného výzkumu.[5] Tato řasa je příkladem dokonalého modelu experimentálního organismu, který reprezentuje fyziologické a biochemické vlastnosti zelených mikroorganismů a procesy fyziologie rostlin. *Chlorella* se také v některých zemích používá jako prevence proti nádorovému onemocnění a pro posílení imunity. [10]

Jedním ze způsobů využití řas *Chlorelly* je jakožto zdroj biomasy pro výrobu bionafety. Je to nová technologie, šetrná k životnímu prostředí tak, aby se omezilo vyčerpávání fosilních paliv a změny klimatu. K udržení optimálních podmínek řas, jako je dostatek světla, tepla, oxidu uhličitého a živin, se používá fotobioreaktor. [11] Nejčastěji používaným zdrojem uhlíku je u této kultivace glycerol, ale bylo dokázáno, že účinnější je využití

směsi glycerolu s glukózou. Tato směs zvyšuje jak rychlost růstu, tak růst biomasy. Tato kombinace snižuje celkové náklady na výrobu bionafty. Řasové buňky byly v této studii pěstovány v modifikovaném extraktu půdního média, které obsahovalo (na litr) : 0,25g NaNO₃, 0,175g KH₂PO₄, 0,075g K₂HPO₄, 0,075g MgSO₄·7H₂O, 0,025g NaCl, 0,025g CaCl₂·2H₂O, 5mg FeCl₃, 0,278mg ZnSO₄·7H₂O, 0,169mg MnSO₄·H₂O, 0,061mg H₃BO₃, 2,5mg CuSO₄·5H₂O, 1,24mg Na₆Mo₇O₂₄·7H₂O. Hodnota pH byla upravena na 7,2. Zkoušely se různé poměry koncentrace glukózy s glycerolem. Všechny kultury byly kultivovány při 30°C ve 250ml baňkách při osvětlení 2500 lux (12 hod světlo/ 12 hod tma). Čtvrtý den byla kultivace ukončena. Koncentrace biomasy byly stanoveny absorbcí při 660nm. Růstová rychlost byla počítána následující rovnicí:

$$\mu = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{(t_2 - t_1)}, \quad (1)$$

kde X₁ a X₂ je hmotnostní koncentrace biomasy [g/l] a t₁, t₂ je čas. Výsledky naměřené absorpce v závislosti na čase jsou popsány grafem:



Obrázek 2 Závislost absorpce na čase při různých koncentracích glukózy a glycerolu [12]

Dalším ze způsobů využití je čištění odpadních vod. Při této kultivaci se odstraňuje z vody dusík a fosfor. Existují tři hlavní zdroje odpadních vod: komunální, zemědělské a průmyslové.[13] Například odpadní vody z pivovarů se používají pro heterotrofní pěstová-

ní *Chlorelly*. Qu Chunbo a kol. se věnovali tomuto výzkumu za použití pěti různých kmenů *Chlorelly*, z nichž 2 kmeny byly s vysokou specifickou růstovou rychlostí a maximální tvorbou biomasy pro čištění odpadních vod. Při kultivaci bylo také použito základní médium a glukóza o koncentraci 10 g/l. Dosáhli velkého nárůstu biomasy a bylo odstraněno až 92,2% CHSK, 95,1% BSK₅, 98,5% NO₃ a 92,3% NH₄. [14] Dalšímu výzkumu se věnoval Ji Min-Kyu a kol., kteří zkoumali vliv různých odpadních vod z potravinářského průmyslu na nárůst biomasy, lipidů a produkci sacharidů. Odpadní vody různě ředili a přidávali roztoky soli nebo mořskou vodu. Nejvyšších hodnot dosáhli 6. den, kdy hodnota mastných kyselin se zvýšila až o 8%. Zlepšil se růst lipidů, produktivita sacharidů a nárůst biomasy. [15]

V roce 2015 bylo 125. výročí popisu druhu *Chlorella vulgaris*. [10]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité látky, příslušenství a přístroje

Chlorella vulgaris 269, Mikrobiologický ústav AV ČR Třeboň

Destilovaná voda

D-Glukóza, 99,1%, Ing. Petr Lukeš

Sacharóza, Tereos

Glycerol, 99,5%, Reachim

Syrovátka, Magador

Fenoxyethanol, 99%, Aldrich

Oktamethylcyklotetrasiloxan, 98%, Aldrich

Živný roztok BG11, Mikrobiologický ústav AV ČR Třeboň (dusičnan sodný, fosforečnanový pufr, roztok stopových prvků, chlorid vápenatý, kyselina citronová, EDTA, uhličitan sodný, heptahydrát síranu hořečnatého)

Kyselina chlorovodíková, 35%, Chemapol

Hydroxid sodný, 99%, Chemapol

250ml Erlenmayerovy nádoby

2l skleněná kultivační nádoba

Magnetické míchadlo

Vzduchový motorek

Třepačka

LED osvětlení

Spektrofotometr Helios Epsilon, Thermo Spectronic

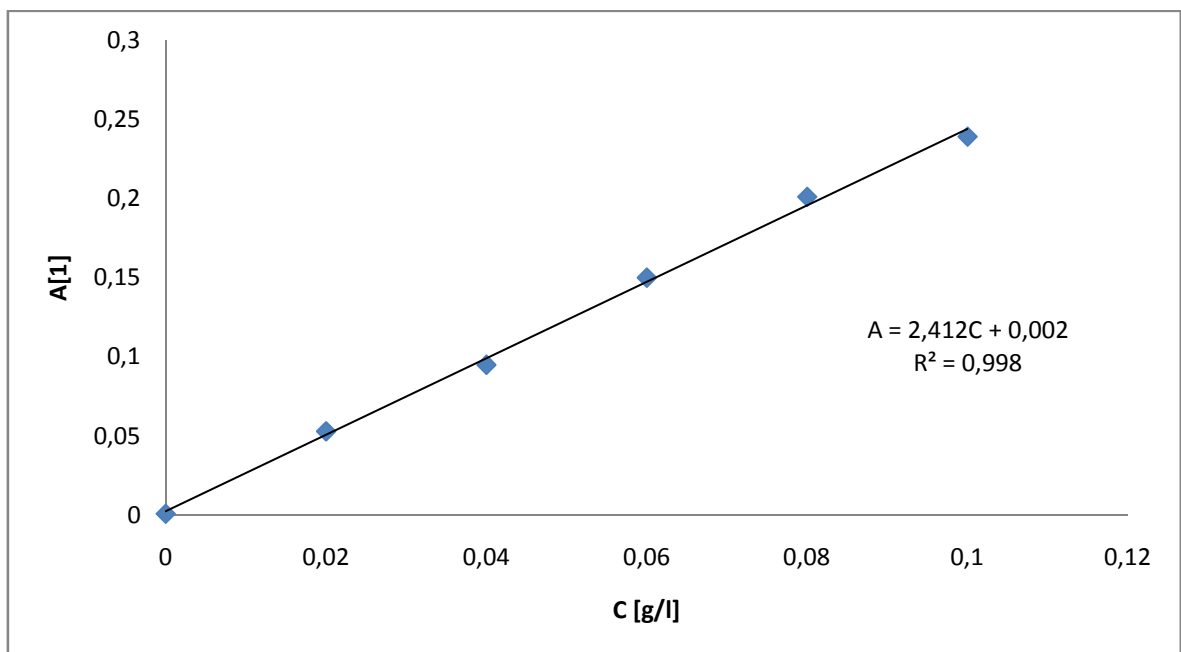
Dále byly použity ostatní pomůcky využívané při běžné laboratorní práci.

3.2 Příprava zásobního roztoku kultivačního média BG11

Jako zdroj živin pro řasy bylo použito základní živné médium BG11. Médium se připravovalo v 1l láhvi, do které se nejdříve nadávkovalo: 1,5g NaNO₃, 1,8ml fosforečnanového pufru, 3,3g roztoku MgSO₄·7H₂O, 1,3ml roztoku CaCl₂, 2,0ml roztoku stopových prvků, 2,0ml roztoku kyseliny citronové o koncentraci 0,6g/l, 1,0ml roztoku EDTA o koncentraci 1g/l, 1,0ml roztoku Na₂CO₃ o koncentraci 20,0g/l. Poté jsme láhev doplnili destilovanou vodou do objemu 1l a adjustovali na pH 7,1 pomocí roztoku koncentrované HCl nebo NaOH. Láhev jsme následně sterilizovali po dobu 20 minut v tlakovém hrnci při teplotě 120°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo médium připraveno k použití.

3.3 Stanovení sušiny měřením optické hustoty

Již v teoretické části je popsáno zjištění koncentrace řas pomocí absorbance a následnému vypočítání rychlosti růstu během kultivace. Měřením absorbance roztoků řas s koncentracemi 0-0,1g/l při 680nm byly stanoveny kalibrační standardy.



Obrázek 3 Stanovení kalibračních standardů pomocí závislosti koncentrace řas v roztoku na absorbanci.

Díky rovnici přímky, kde C je koncentrace a A absorbance, lze vypočítat přibližnou koncentraci řas při dané absorbanci

3.4 Autotrofní kultivace

Tato kultivace probíhala dvěma způsoby. První způsob, byl při použití substrátu glukózy a syrovátka, kdy byly řasy nasazeny do osmi 250ml Erlenmayerových baněk. V každé baňce byla různá koncentrace substrátu (od 0-1000mg/l), 15ml živného média, 30ml roztoku řas a pro doplnění na objem 150ml byla přidána, dle potřeby, destilovaná voda. Kultivace probíhala po dobu 16 dní. Druhým způsobem probíhal růst řas na sacharóze a glycerolu po dobu pěti dní. K 0,5l tohoto substrátu o koncentraci 10g/l bylo přidáno 0,5l živného média a voda na doplnění do 1,5l a určité množství základního roztoku řas. Růst probíhal za stálého osvětlení 800lux, třepání a při laboratorní teplotě. Rychlost růstu řas byla počítána dle rovnice (1) z teoretické části.

3.5 Heterotrofní kultivace

Kultivace bez světla probíhala ve všech způsobech stejně. Do 2l sterilizované bylo přidáno 0,5l substrátu o koncentraci 10g/l, 0,5l živného média, určitý objem řas na požadovanou počáteční koncentraci a destilovaná voda pro doplnění do objemu 1,5l. Růst probíhal bez světla, nádoba byla obalena alobalem, za stálého míchání a přísunu vzduchu. Kultivace probíhala po dobu pěti dní za každodenního měření absorbance. Růstová rychlost řas byla počítána dle rovnice (1) z teoretické části.

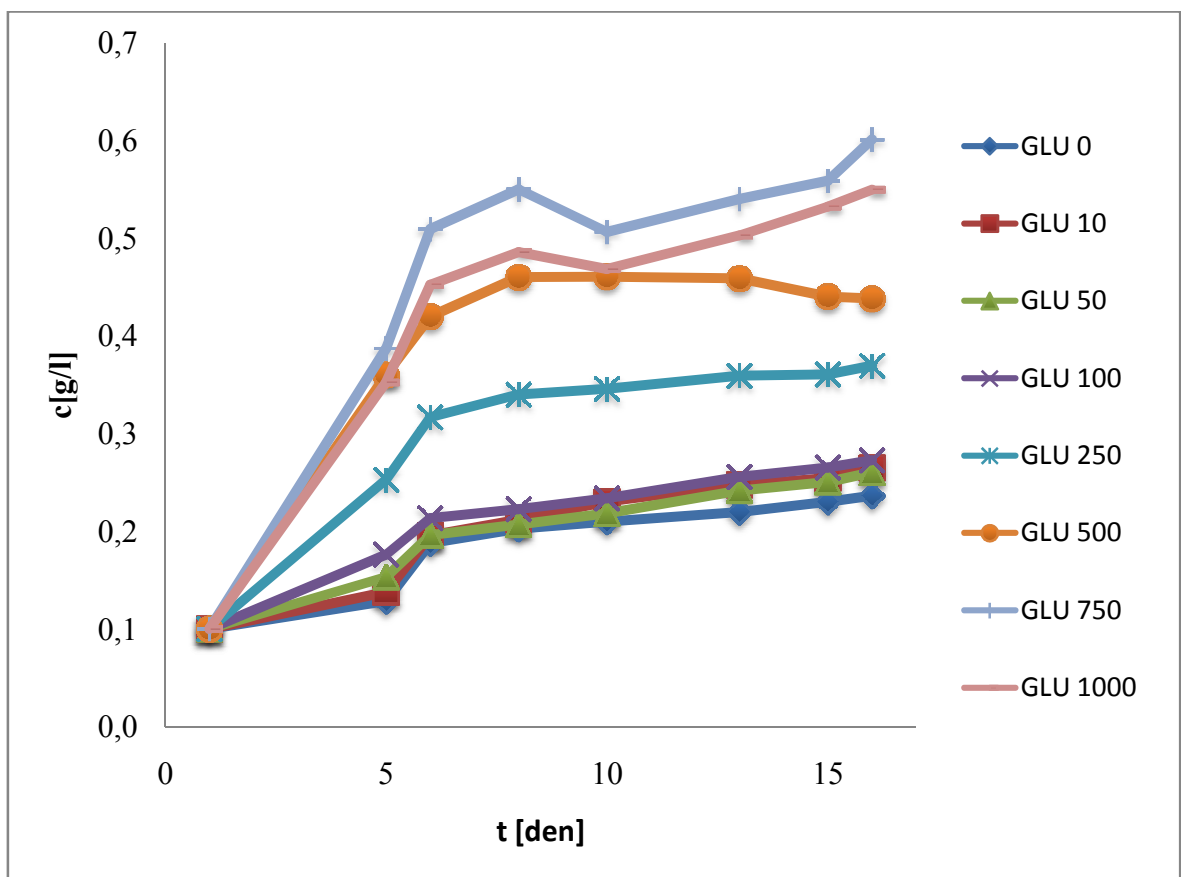
3.6 Kultivace řas v přítomnosti PCP's

Byl sledován také vliv vybraných sloučenin používaných v prostředcích osobní péče na průběh růstu řas. Těmito sloučeninami byly zvoleny fenoxxyethanol a oktamethylcyklotetrasiloxan. Kultivace probíhala po dobu pěti dní na substrátu glukóza o koncentraci 10g/l. Do 2l nádoby bylo přidáno 0,5l roztoku glukózy, 0,5l živného média, určité množství řas, aby koncentrace *Chlorelly* ve výsledném roztoku byla 0,1g/l a destilovaná voda na doplnění do 1,5l. Koncentraci fenoxxyethanolu a oktamethylcyklotetrasiloxanu ve výsledném roztoku byla 100mg/l, tudíž bylo vždy přidáno cca 0,13ml jedné ze sloučenin. Kultivace opět probíhala autotrofně i heterotrofně za stálého míchání, přísunu vzduchu, laboratorní teploty a popř. světla. Rychlost růstu řas byla počítána dle rovnice (1) z teoretické části.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Autotrofní kultivace

Na obr. 4. je znázorněn průběh růstu řas při autotrofní kultivaci, kdy byla použita glukóza jako organický substrát. Lze vidět, že řasy rostly nejrychleji při koncentraci glukózy 750 mg/l, kdy během prvních pěti dnů se hodnota sušiny zvýšila přibližně pětkrát. V tab. 1. je uvedena rychlost růstu řas, v níž lze vidět, že nejrychleji rostly řasy mezi 1. – 3. dnem.

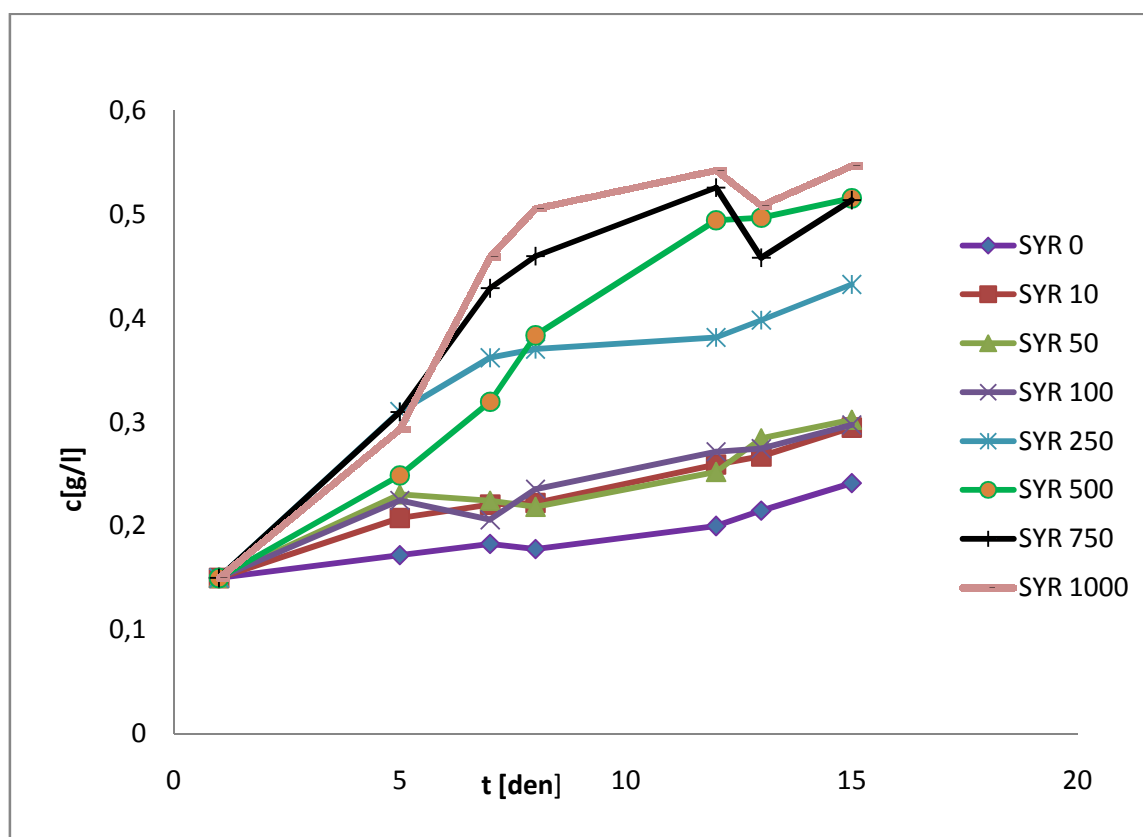


Obrázek 4 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy- autotrofně

Tabulka 1: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze [mg/l]

Č.	μ GLU 0	μ GLU 10	μ GLU 50	μ GLU 100	μ GLU 250	μ GLU 500	μ GLU 750	μ GLU 1000
1.	0,0627	0,0799	0,1063	0,1416	0,2320	0,3204	0,3385	0,3149
2.	0,3493	0,3518	0,2483	0,1921	0,2251	0,1533	0,2745	0,2496
3.	0,0382	0,0397	0,0268	0,0209	0,0354	0,0457	0,0384	0,0358
4.	0,0171	0,0422	0,0273	0,0245	0,0085	0,0005	-0,0412	-0,0182
5.	0,0154	0,0237	0,0337	0,0299	0,0129	-0,0012	0,0214	0,0236
6.	0,0230	0,0140	0,0177	0,0183	0,0017	-0,0207	0,0170	0,0284
7.	0,0267	0,0399	0,0390	0,0277	0,0239	-0,0047	0,0729	0,0322

Obr. 5. znázorňuje průběh autotrofního růstu řas na organickém substrátu syrovátka. Řasy rostly nejrychleji při koncentraci 1000mg/l, kdy během prvních sedmi dnů se koncentrace řas v roztoku zvýšila přibližně pětkrát. V tab. 2. je uvedena rychlost růstu řas, lze vidět, že nejrychleji řasa rostla rychlostí $0,1821\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$, na koncentraci syrovátka 500mg/l.

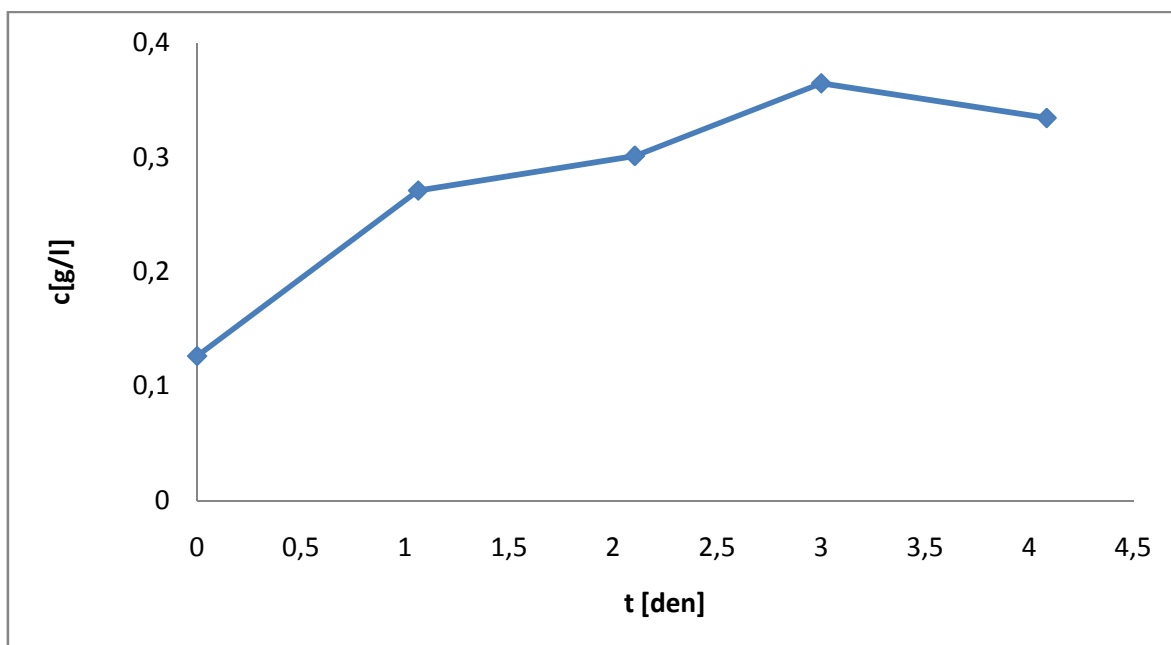


Obrázek 5 Závislost koncentrace řas na čase při použití syrovátka- autotrofně

Tabulka 2: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na syrovátce [mg/l]

Č.	μ SYR 0	μ SYR 10	μ SYR 50	μ SYR 100	μ SYR 250	μ SYR 500	μ SYR 750	μ SYR 1000
1.	0,0343	0,0814	0,1074	0,1010	0,1816	0,1265	0,1812	0,1675
2.	0,0304	0,0300	-0,0137	-0,0433	0,0773	0,1254	0,1626	0,2242
3.	-0,0276	0,0075	-0,0262	0,1335	0,0227	0,1821	0,0700	0,0964
4.	0,0291	0,0384	0,0357	0,0356	0,0074	0,0634	0,0335	0,0176
5.	0,0720	0,0299	0,1207	0,0106	0,0426	0,0050	-0,1376	-0,0647
6.	0,0343	0,0814	0,1074	0,1010	0,1816	0,1265	0,1812	0,1675

Na obr. 6. lze sledovat průběh autotrofního růstu řas na sacharóze. První hodnota je vždy měřena v nulté hodině tzn. neprodleně po nasazení řas do roztoku s živinami a substrátem. Během prvního dne se koncentrace zvýšila na dvojnásobnou hodnotu. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo třetí den. V tab. 3. lze sledovat, že nejrychleji *Chlorella* rostla v prvním dni, kdy hodnota růstové rychlosti byla až $0,7179\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

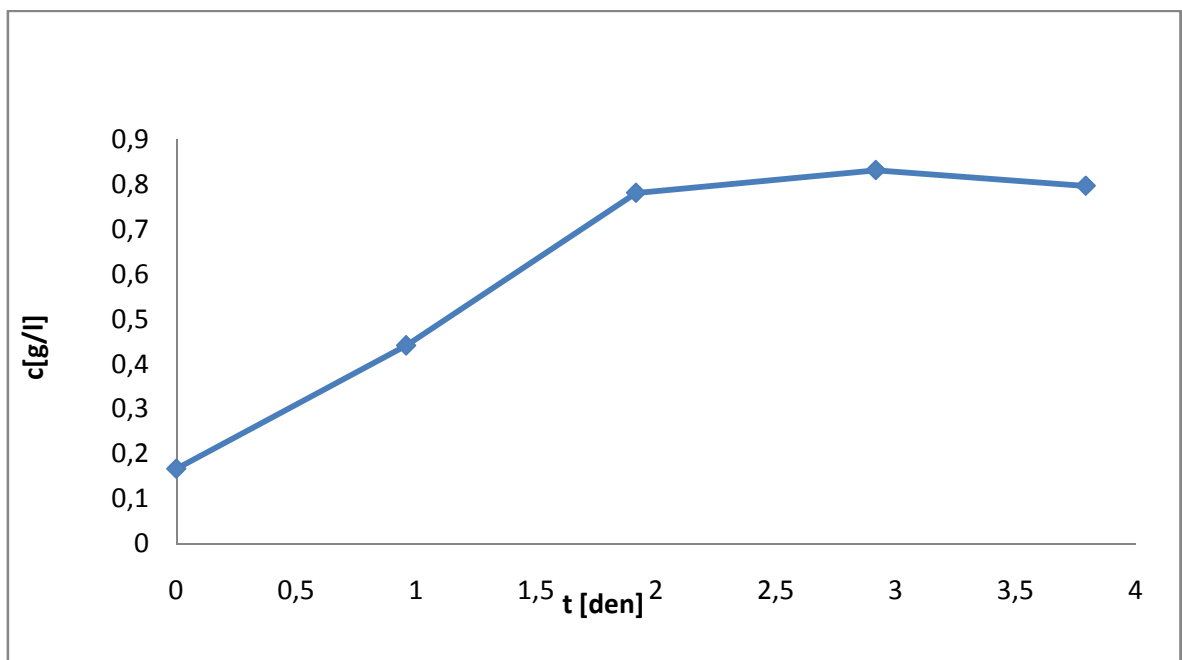


Obrázek 6 Závislost koncentrace řas na čase, při použití sacharózy- autotrofně

Tabulka 3: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na sacharóze

č.	μ
1.	0,7179
2.	0,1015
3.	0,2132
4.	-0,0799

Dále probíhal autotrofní růst na glycerolu, jeho průběh lze sledovat na obr. 7. Nejvyšší koncentrace bylo dosaženo v třetím dni, kdy se její hodnota zvýšila až šestkrát. V tab. 4. lze vidět, že nejvyšší rychlostí řasa rostla mezi prvním a druhým dnem, kdy dosáhla rychlosti $1,014\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.



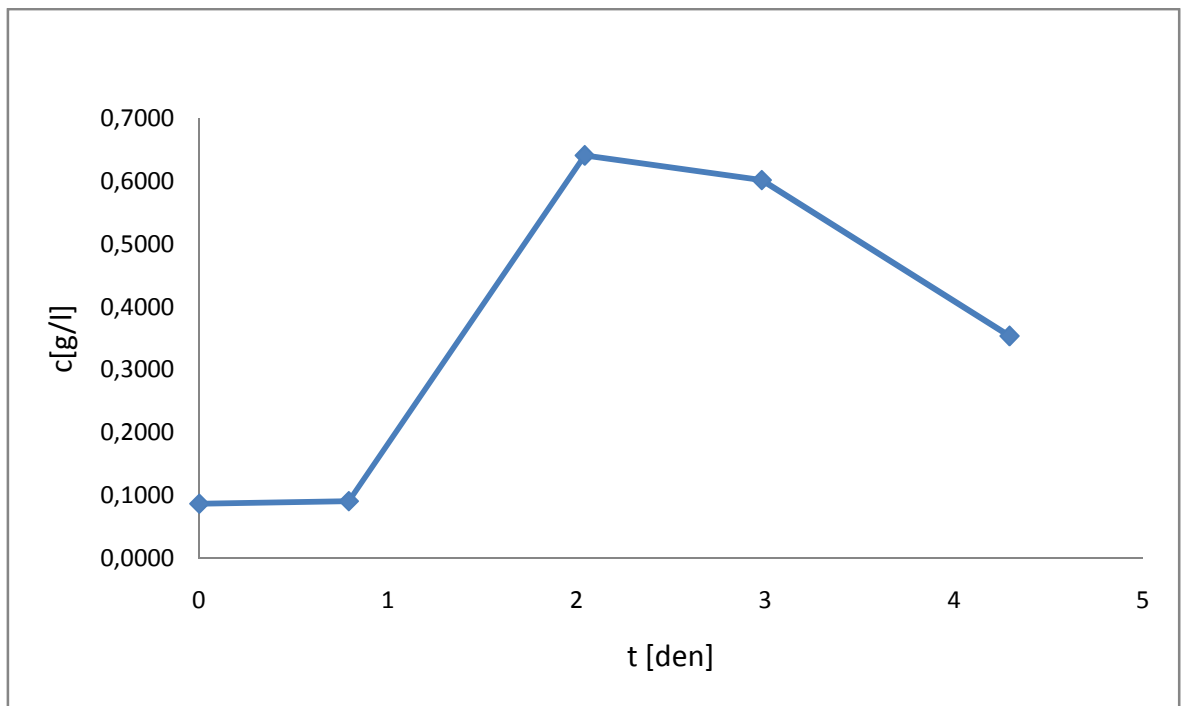
Obrázek 7 Závislost koncentrace řas na čase při použití glycerolu- autotrofně

Tabulka 4: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glycerolu

č.	μ
1.	1,0140
2.	0,5952
3.	0,0627
4.	-0,0488

4.2 Heterotrofní kultivace

Obr. 8. znázorňuje heterotrofní kultivaci *Chlorelly* na glycerolu. Lze vidět, že v prvním dni probíhala adaptace na substrát a následně došlo k rychlému nárůstu biomasy. Hodnota koncentrace se v druhém dni zvýšila téměř sedmkrát. Následně koncentrace klesá, protože došlo k vyčerpání substrátu a řasy začaly odumírat. Nejrychleji řasa rostla mezi prvním a druhým dnem. Rychlost růstu vidíme v tab. 5. Maximální hodnota rychlosti je $1,5598 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

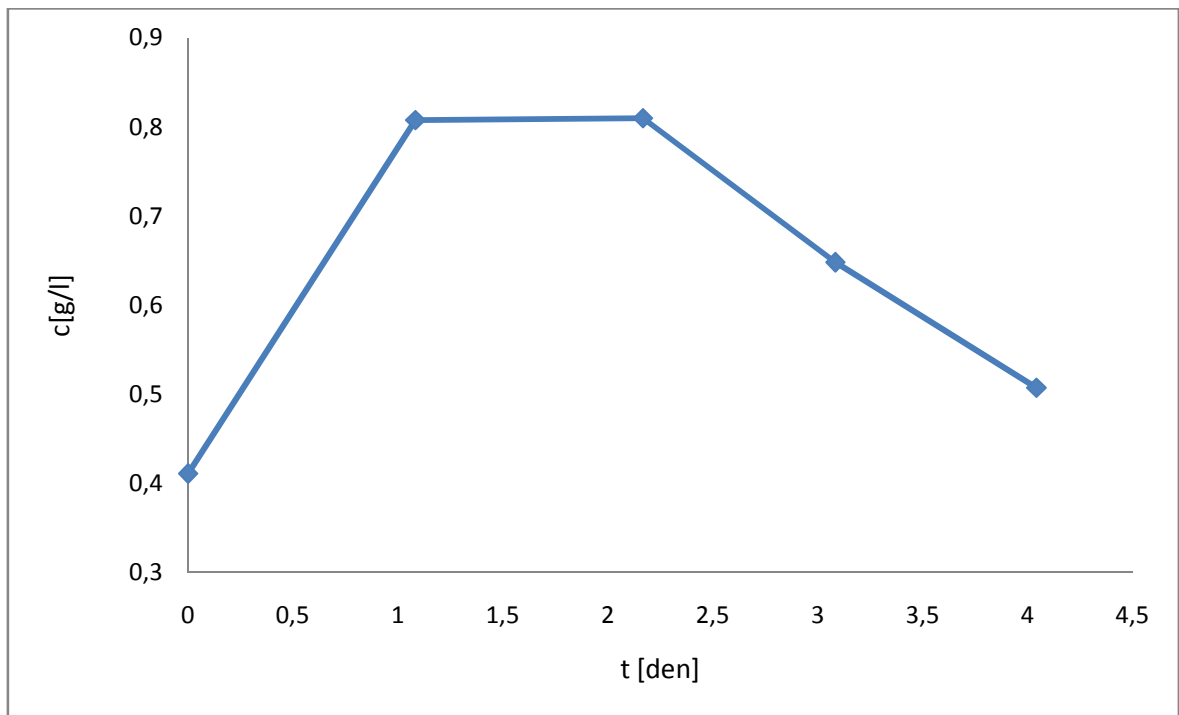


Obrázek 8 Závislost koncentrace řas na čase při použití glycerolu- heterotrofně

Tabulka 5: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glycerolu

č.	μ
1.	0,0588
2.	1,5598
3.	-0,0669
4.	-0,4053

Heterotrofní růst řas na sacharóze je znázorněn a na obr. 9. Hned první den řasa dosáhla nejvyšší koncentrace. Druhý den byla koncentrace téměř stejná a v dalších dnech již koncentrace výrazně klesala. V tab. 6. lze pozorovat, že nejvyšší rychlosti řasa dosáhla v prvním dni, kdy rostla rychlostí až $0,6239 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

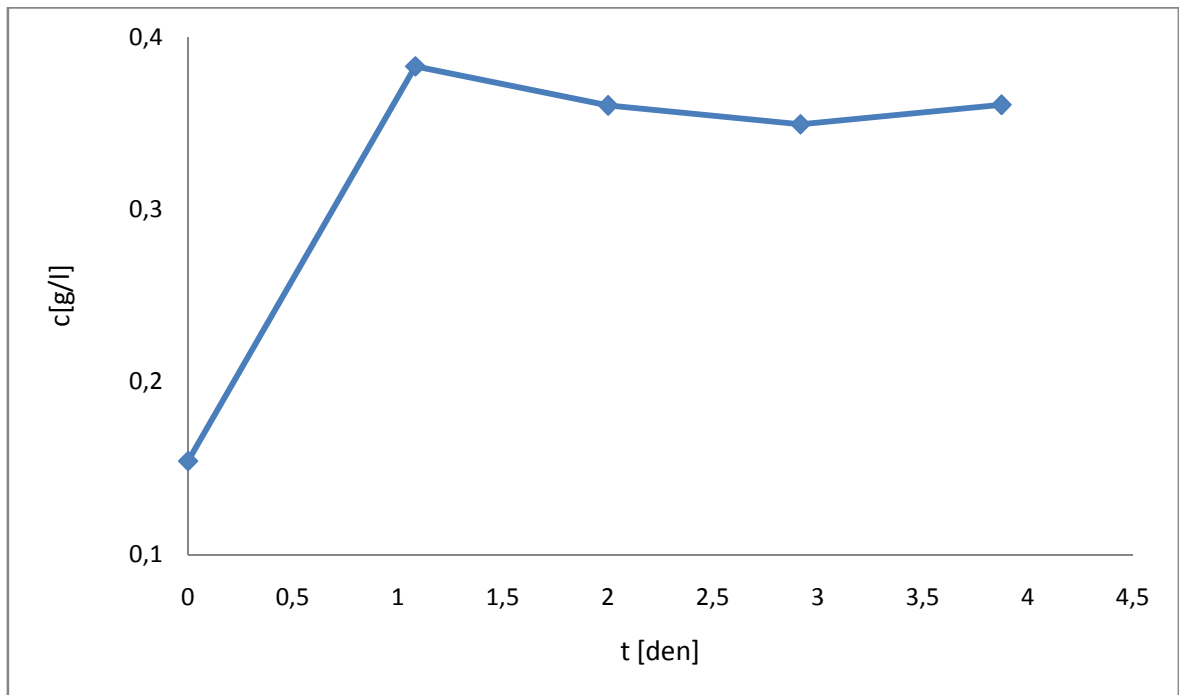


Obrázek 9 Závislost koncentrace řas na čase při použití sacharózy- heterotrofně

Tabulka 6: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na sacharóze

č.	μ
1.	0,6239
2.	0,0024
3.	-0,2430
4.	-0,2551

Následovala heterotrofní kultivace řas na syrovátce, která je znázorněna na obr. 10. Nejvyšší koncentrace bylo opět dosaženo v prvním dni, kdy se koncentrace zvýšila až čtyřikrát. Dá se předpokládat, že během této doby růstu nedošlo k úplnému vyčerpání substrátu, protože nedochází k výraznému poklesu koncentrace řas. Z tab. 7. lze vyčíst rychlost růstu, nejvyšší rychlostí rostla řasa během prvních 24 hodin, kdy růstová rychlost byla $0,6239 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

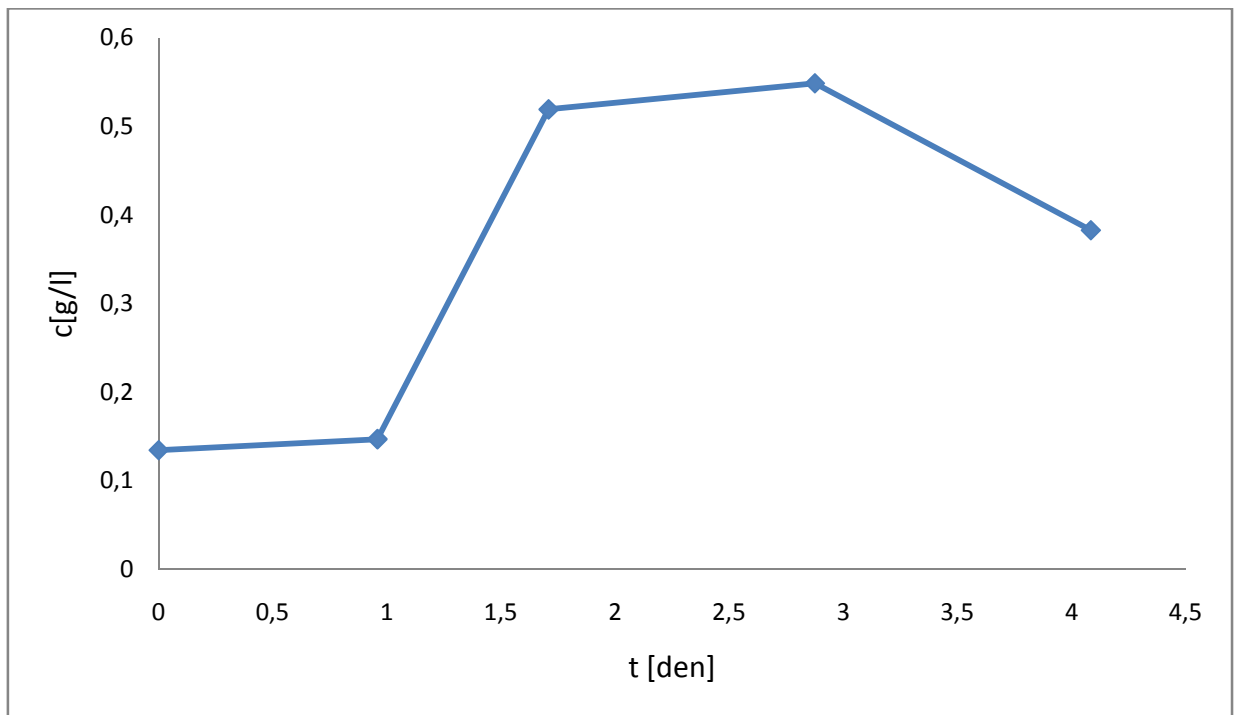


Obrázek 10 Závislost koncentrace řas na čase při použití syrovátka- heterotrofně

Tabulka 7: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na syrovátce

č.	μ
1.	0,6239
2.	0,0024
3.	-0,2430
4.	-0,2551

Probíhala také heterotrofní kultivace *Chlorelly* na glukóze, jak lze vidět na obr. 11. První den se řasy musely na substrát opět adaptovat a ve druhém dni se koncentrace zvýšila přibližně pětkrát. Po třetím měření došlo k vyčerpání substrátu a řasy začaly odumírat. V tab. 8. lze vidět, že mezi prvním a druhým dnem byla rychlost růstu $1,6843 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.



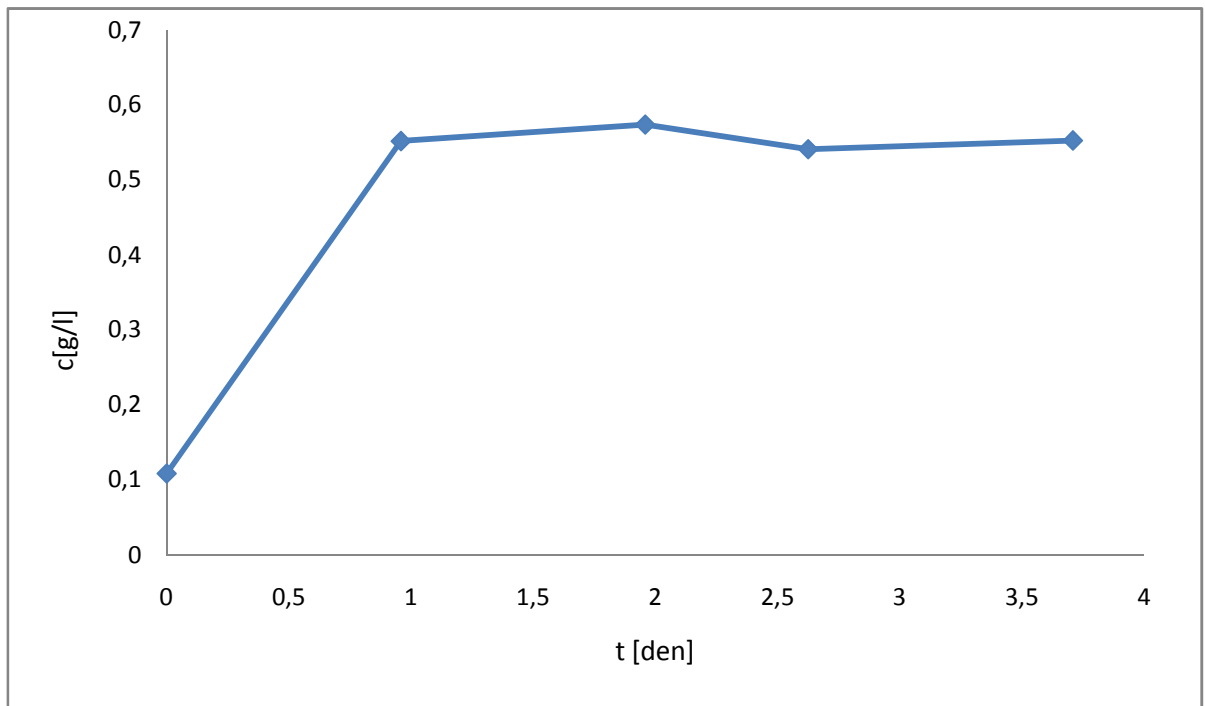
Obrázek 11 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy- heterotrofně

Tabulka 8: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze

č.	μ
1.	0,0924
2.	1,6843
3.	0,0473
4.	-0,2980

4.3 Kultivace s PCP's

Dále byla pozorována autotrofní kultivace řas na glukóze s fenoxylethanolem. Na obr. 12. můžeme sledovat její průběh. První den se koncentrace zvýšila přibližně 5krát a poté byla téměř konstantní. V tab. 9. je vypočítána rychlost růstu. Nejvyšší byla hned během prvního dne, kdy dosáhla rychlosti až $1,6960 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

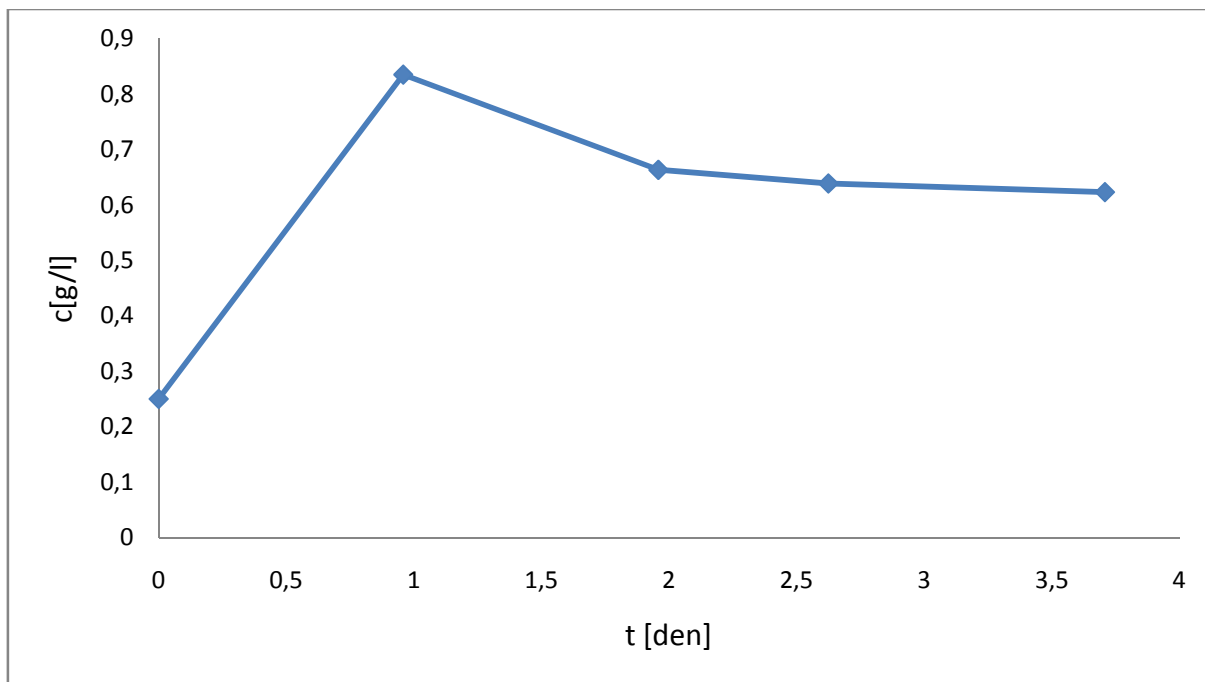


Obrázek 12 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a fenoxylethanolu- autotrofně

Tabulka 9: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s fenoxylethanolem

č.	μ
1.	1,6960
2.	0,0390
3.	-0,0882
4.	0,0196

Autotrofní růst řas na glukóze s oktamethylcyklotetrasiloxanem je zobrazen na obr. 13. Kultivace první den prudce stoupla, zvýšila se až pětkrát, poté lehce klesla a další dny byla opět téměř konstantní. V tab. 10. lze vidět, že první den byla růstová rychlost $1,2566 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

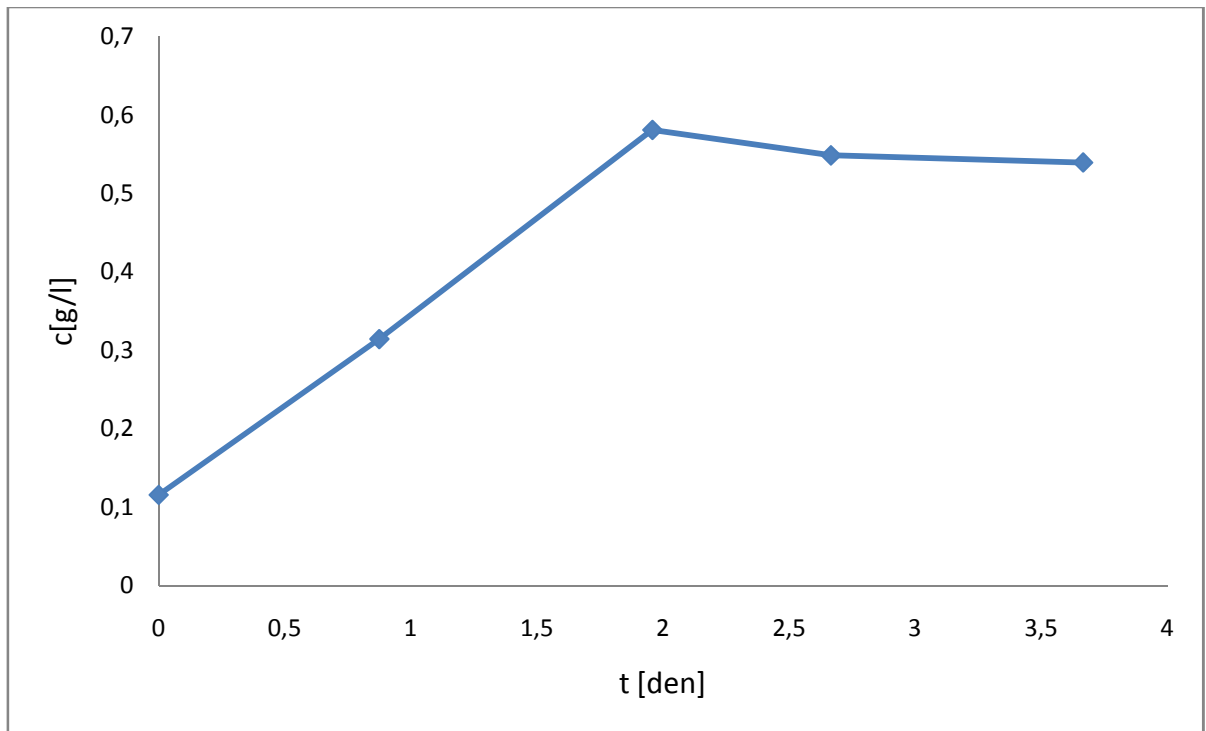


Obrázek 13 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a oktamethylcyklotetrasiloxanu – autotrofně

Tabulka 10: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s oktamethylcyklotetrasiloxanem

č.	μ
1.	1,2566
2.	-0,2301
3.	-0,0563
4.	-0,0231

Následovala heterotrofní kultivace na glukóze s fenoxýethanolem. Je znázorněna na obr.14. Během prvním dvou dnů se hodnota sušiny zvýšila přibližně šestkrát. Následně pozvolna klesala. V tab. 11 lze vidět, že nejvyšší rychlosti dosáhla hned první den, její hodnota byla $1,142 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.

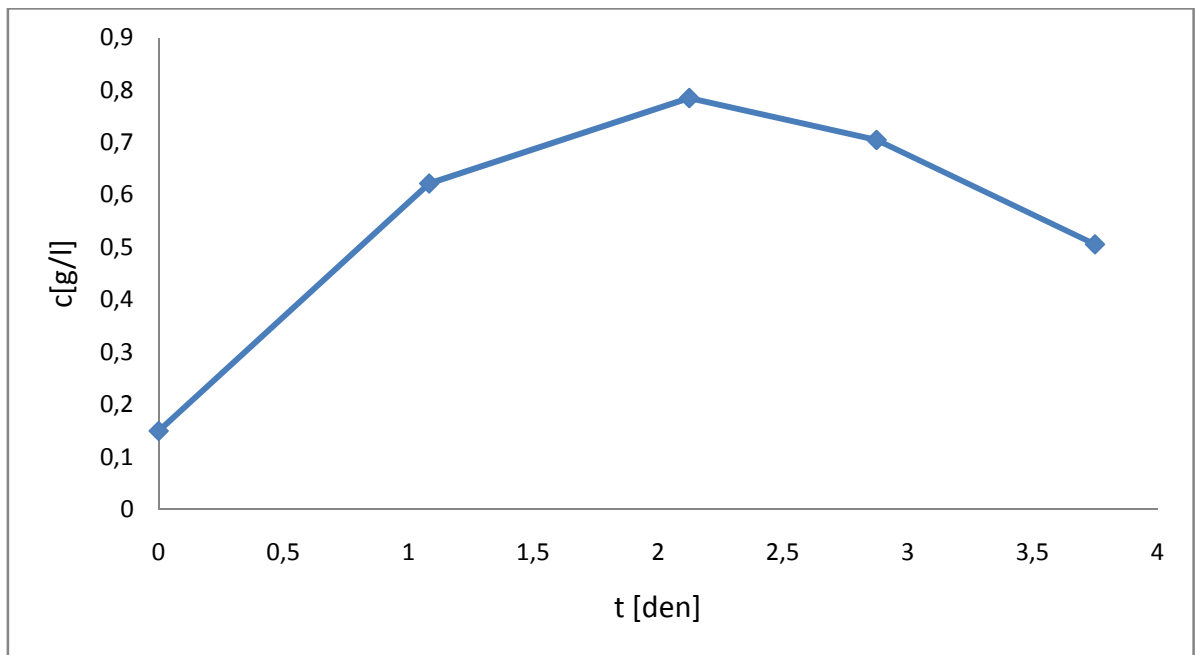


Obrázek 14 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a fenoxýethanolu- heterotrofně

Tabulka 11: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s fenoxýethanolem

č.	μ
1.	1,1422
2.	0,5670
3.	-0,0808
4.	-0,0168

Jako poslední byla prováděna heterotrofní kultivace na glukóze s oktamethylcyklotetrasiloxanem, která je znázorněna na obr. 15. Nejvyšší koncentrace řas byla v druhém dni, kdy dosáhla až sedminásobné hodnoty. Avšak dle tab.12. lze určit, že nejvyšší rychlostí řasa rostla první den, a to rychlostí $1,315\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$.



Obrázek 15 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a oktamethylcyklotetrasiloxanu – heterotrofně

Tabulka 12: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s oktamethylcyklotetrasiloxanem

č.	μ
1.	1,3148
2.	0,2234
3.	-0,1434
4.	-0,3792

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo sledování autotrofní a heterotrofní kultivace řas rodu *Chlorella vulgaris*. Kultivace probíhala na substrátech- glukóza, syrovátka, sacharóza a glycerol. Dále byl sledován vliv fenoxylethanolu a oktamethylcyklotetrasiloxanu na průběh růstu *Chlorelly*.

Při autotrofní kultivaci řas byl pozorován jejich stálý růst. Obsah sušiny řas se stále zvyšoval a růst řas na všech substrátech probíhal skoro stejně.

Naopak při heterotrofní kultivaci bylo dosaženo v poměrně krátkém časovém intervalu určité maximální koncentrace sušiny řas a následně se hodnota sušiny snižovala. Toto bylo zapříčiněno pravděpodobně v důsledku vyčerpání substrátu. Během kultivací na glukóze a glycerolu se první den řasy musely adaptovat na substrát, proto se koncentrace moc nezvyšovala.

Při použití vybraných prostředků osobní péče, řasa překvapivě rostla lépe než bez použití těchto sloučenin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] [HURST, CHRISTON J. CRAWFORD, RONALD L. GARLAND, JAY L. LIPSON, DAVID A. MILLS, AARON L. STETZENBACH, LINDA D. *Manual od Environmental Microbiology*. 3rd Edition. American Society for Microbiology (ASM), 2007 [cit. 2014-12-04]. ISBN 978-1-55581-379-6. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMEME0001/manual-environmental/manual-environmental>]
- [2] [STEARNS,C. *Problem Organisms in Water – Identification and Treatment – Manual of Water Supply Practices*. M7 3rd Edition. American Water Works Association (AWWA), 2004 [cit. 2014-12-4]. ISBN 978-1-58321-292-9. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPOWITMWQ/problem-organisms-in/problem-organisms-in>]
- [3] [Masarykova Univerzita, Systém a vývoj sinic a řas [cit. 2014-12-04]. Dostupné z: <http://www.sci.muni.cz/botany/studium/nr-rasy.htm>]
- [4] [ANONYM. *Algae - Source to Treatment - Manual of Water Supply Practices*. 2010. Water Works Association (AWWA), [cit. 2014-12-04]. M57 (1st Edition). American. Online version available at: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpASTMWSP4/algae-source-treatment/algae-source-treatment>]
- [5] [FENG, XY. WALKER, TH. BRIDGES, WC. THORNTOM, C. GOPALAKRISHNAN, K. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. *The Boulevard*. 17-23, [cit. 2015-02-11]. ISSN 0960-8524. Dostupné z: DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.120.]
- [6] [LIEBSTER, J. DOBIÁŠOVÁ M.. Způsob kultivace řas. Československá republika. 105894. 15. 06. 1962]
- [7] [BARSANTI L GUALTIERI, P. *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Second Edition. CRC Press, 2014, [cit. 2014-12-15]. ISBN 978-

- 1-4398-6733-4. Dostupné z:
<http://www.crcnetbase.com.proxy.k.utb.cz/isbn/>
- [8] [MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, V. V. I., PRAHA 4 - KRČ. Způsob řízené kultivace řas v heterotrofním režimu výživy. Původci: Jiří Doucha, Karel Lívanský. CZ. 9 řady. 288638. 04.06.2001]
- [9] [RATTANAPOLTEE, P. KAEWKANNETRA, P. Cultivation of microalga, *Chlorella vulgaris* under different auto–hetero–mixo trophic growths as a raw material during biodiesel production and cost evaluation. *Energy*[online]. 2014, vol. 78, s. 4-8 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1016/j.energy.2014.06.049.]
- [10] [KRIENITZ, LOTHAR. VOLKER, A.R. HUSS. BOCK, CH. *Chlorella*: 125 years of the green survivalist. *Trends in Plant Science* [online]. 2015, vol. 20, issue 2, s. 67-69 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.11.005]
- [11] [ANONYM. Evaluation of a Photobioreactor Performance Grafting Microalgal Growth Model and Particle Tracking Technique Using CFD. *Transactions of the ASABE*. 2014, s. 121-139 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.13031/trans.57.10339.]
- [12] [KONG, W. B. a kol. Effect of Glycerol and Glucose on the Enhancement of Biomass, Lipid and Soluble Carbohydrate Production by *Chlorella vulgaris* in Mixotrophic Culture, *Food Technology and Biotechnology*. 2013, [cit. 2015-02-25]. Dostupné z:
<http://www.cabi.org.proxy.k.utb.cz/cabdirect/FullTextPDF/2013/20133155274.pdf>
- [13] [CHIU, SY. KAO, CH. CHEN, TY. CHANG, YB. KUO, C. LIN, C.. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology*[online]. 2015, vol. 184, s. 179-189 [cit. 2015-03-21]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.080.]
- [14] [QU CH. SHI, X. Heterotrophic Cultivation of *Chlorella* for Beer brewery wastewater treatment. *Weishengwu Xuebao*. 2013. 780-785 [cit. 2015-02-25]. ISSN 0001-6209. Dostupné z:
http://apps.webofknowledge.com.proxy.k.utb.cz/full_record.do?product=U

A&search_mode=GeneralSearch&qid=10&SID=Z1BouUfjWWFInMsQQE
U&page=1&doc=8&cacheurlFromRightClick=no]

- [15] [JI, Min-Kyu, Hyun-Shik YUN, Sanghyun PARK, Hongkyun LEE, Young-Tae PARK, Sunyoung BAE, Jungyeob HAM a Jaeyoung CHOI. 2015. Effect of food wastewater on biomass production by a green microalga *Scenedesmus obliquus* for bioenergy generation. *Bioresource Technology*[online]. **179**: 624-628 [cit. 2015-05-12]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.053. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414017994>]

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

EDTA Kyselina ethylendiamintetraoctová.

GLU Glukóza.

SYR Syrovátka.

PCP's Prostředky osobní péče (Personal Care Products).

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Závislost koncentrace (g/l) na čase [8].....	16
Obrázek 2 Závislost absorbance na čase při různých koncentracích glukózy a glycerolu [12]	18
Obrázek 3 Stanovení kalibračních standardů pomocí závislosti koncentrace řas v roztoku na absorbanci.....	22
Obrázek 4 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy- autotrofně	24
Obrázek 5 Závislost koncentrace řas na čase při použití syrovátka- autotrofně.....	25
Obrázek 6 Závislost koncentrace řas na čase při použití sacharózy- autotrofně	26
Obrázek 7 Závislost koncentrace řas na čase při použití glycerolu- autotrofně	27
Obrázek 8 Závislost koncentrace řas na čase při použití glycerolu- heterotrofně	28
Obrázek 9 Závislost koncentrace řas na čase při použití sacharózy- heterotrofně	29
Obrázek 10 Závislost koncentrace řas na čase při použití syrovátka- heterotrofně.....	30
Obrázek 11 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy- heterotrofně	31
Obrázek 12 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a fenoxiethanolu- autotrofně.....	32
Obrázek 13 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a oktametycyklotetrasiloxanu – autotrofně	33
Obrázek 14 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a fenoxiethanolu- heterotrofně	34
Obrázek 15 Závislost koncentrace řas na čase při použití glukózy a oktametycyklotetrasiloxanu – heterotrofně	35

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze [mg/l]	25
Tabulka 2: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na syrovátce [mg/l].....	26
Tabulka 3: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na sacharóze	27
Tabulka 4: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glycerolu.....	27
Tabulka 5: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glycerolu.....	28
Tabulka 6: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na sacharóze	29
Tabulka 7: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na syrovátce.....	30
Tabulka 8: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze	31
Tabulka 9: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s fenoxethanolem.....	32
Tabulka 10: Rychlost autotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s oktamethylcyclotetrasiloxanem.....	33
Tabulka 11: Rychlost heterotrofního růstu řas řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s fenoxethanolem	34
Tabulka 12: Rychlost heterotrofního růstu řas μ [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{den}^{-1}$] na glukóze s oktamethylcyclotetrasiloxanem.....	35