

Mogućnosti proizvodnje bioplina iz mikroalga eutrofnog jezera i cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja

Deže, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:920304>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Zaštita prirode i okoliša

Denis Deže

**Mogućnosti proizvodnje bioplina iz mikroalga eutrofnog jezera
i cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja**

Diplomski rad

Osijek, 2018

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij: Zaštita prirode i okoliša
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Mogućnosti proizvodnje bioplina iz mikroalga eutrofnog jezera i cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja

Denis Deže

Rad je izraden na: Odjel za biologiju i Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr. sc. Melita Mihaljević, izvanredni profesor

Komentor: Dr. sc. Davor Kralik, redoviti profesor

Sažetak

Bioplin je obnovljivi izvor energije koji se proizvodi iz biomase i predstavlja potencijalno veliki izvor energije. Cilj ovog istraživanja je utvrditi mogućnosti proizvodnje bioplina postupkom anaerobne fermentacije goveđe gnojovke u kodigestiji s mikroalgama eutrofnog jezera i cijanobakterijama iz akvarijskog uzgoja. Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazali su kako su prirodne zajednica mikroalga i cijanobakterija pogodne za proizvodnju bioplina. Količina i sastav bioplina ovisni su o kvalitativnom sastavu vrsta, te je ovo istraživanje pokazalo da je zajednica eukariotskih alga iz skupine Euglenophyta bila bolja u proizvodnji bioplina (568,64 ml/g suhe organske tvari) od zajednice cijanobakterija roda *Lyngbya* (458,17 ml/g suhe organske tvari). Objekti eksperimentalne skupine proizvele su više plina od čiste gnojovke (399,57 ml/g suhe organske tvari). U odnosu na razne biosirovine iz poljoprivredne proizvodnje, upotreba mikroalga i cijanobakterija može imati višestruke prednosti.

Broj stranica: 31

Broj slika: 20

Broj tablica: 2

Broj literaturnih navoda: 56

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: anaerobna fermentacija, biogoriva, mikroalge, cijanobakterije, obnovljivi izvori

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo:

1. Dr. sc. *Janja Horvatić*, izvanredni profesor, predsjednik povjerenstva
2. Dr. sc. *Filip Stević*, docent, član
3. Dr. sc. *Melita Mihaljević*, izvanredni profesor, mentor, član
4. Dr. sc. *Dubravka Čerba*, docent, zamjena člana

Rad je pohranjen u: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology
Graduate university study programme in Nature and Environmental Protection
Scientific Area: Natural sciences
Scientific Field: Biology

Posibility of biogas production from microalgae in eutrophic pond and cyanobacteria

Denis Deže

Thesis performed at: Department of Biology, and Faculty of Agriculture, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Supervisor: Melita Mihaljević, PhD, Associate Professor

Cosupervisor: Davor Kralik, PhD, Full profesor

Abstract

Biogas as renewable energy can potentially provide high energy production from biomass. Purpose of this research is to establish possibilities of biogas production using anaerobic digestion process from eutrophic pond microalgae and aquarium cyanobacteria. This research showed that natural groups of microalgae Euglenophyta and cyanobacteria are suitable for biogas production. Amount and content of biogas depends on qualitative structure of species. Results indicate that efficiency of biogas production for group of Euglenophyta (586,64 ml/g organic dry matter) is higher than production of aquarium cyanobacteria (458,17 ml/g organic dry matter). both experimental groups have higher production than cow manure (399,57 ml/g organic dry matter). In contrast with other agriculture materials, microalgae and cyanobacteria can possess multiple benefits for biogas production.

Number of pages: 31

Number of figures: 20

Number of tables: 2

Number of references: 56

Original in: Croatian

Keywords: anaerobic fermentation, biofuels, microalgae, cyanobacteria, renewable energy

Date of the thesis defence:

Reviewers:

1. *Janja Horvatić*, PhD, Associate Professor
2. *Filip Stević*, PhD, Assistant Professor
3. *Melita Mihaljević*, PhD, Associate Professor, supervisor
4. *Dubravka Čerba*, PhD, Assistant Professor

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatia Digital Theses Repository of National and University Library in Zagreb.

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Meliti Mihaljević i komentoru
prof. dr. sc. Davoru Kralik na pomoći i savjetima pri izradi i pisanju diplomskog rada.*

*Veliko hvala Dariji Jovičić, univ. spec. i Dunji Čeple, mag. ing.
na pomoći pri izvođenju istraživanja.*

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Proizvodnja bioplina	1
1.2.	Alge kao potencijalna sirovina u proizvodnji bioplina.....	3
1.3.	Cilj rada.....	6
2.	MATERIJALI I METODE	7
2.1.	Uzorkovanje i analiza sastava zajednica mikroalga i cijanobakterija.....	7
2.2.	Metoda anaerobne fermentacije.....	8
2.3.	Analiza sastava plina.....	10
2.4.	Analiza suhe tvari.....	10
2.5.	Određivanje sadržaja pepela i organske tvari.....	10
2.6.	Određivanje pH.....	10
3.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	11
3.1.	Sastav zajednica mikroalga i cijanobakterija.....	11
3.2.	Količina suhe i organska tvar.....	12
3.3.	Koncentracija pH.....	14
3.4.	Količina proizvedenog bioplina.....	14
3.5.	Dinamika proizvodnje bioplina.....	15
3.6.	Sastav bioplina.....	17
4.	RASPRAVA	21
5.	ZAKLJUČAK	25
6.	LITERATURA.....	26

1. UVOD

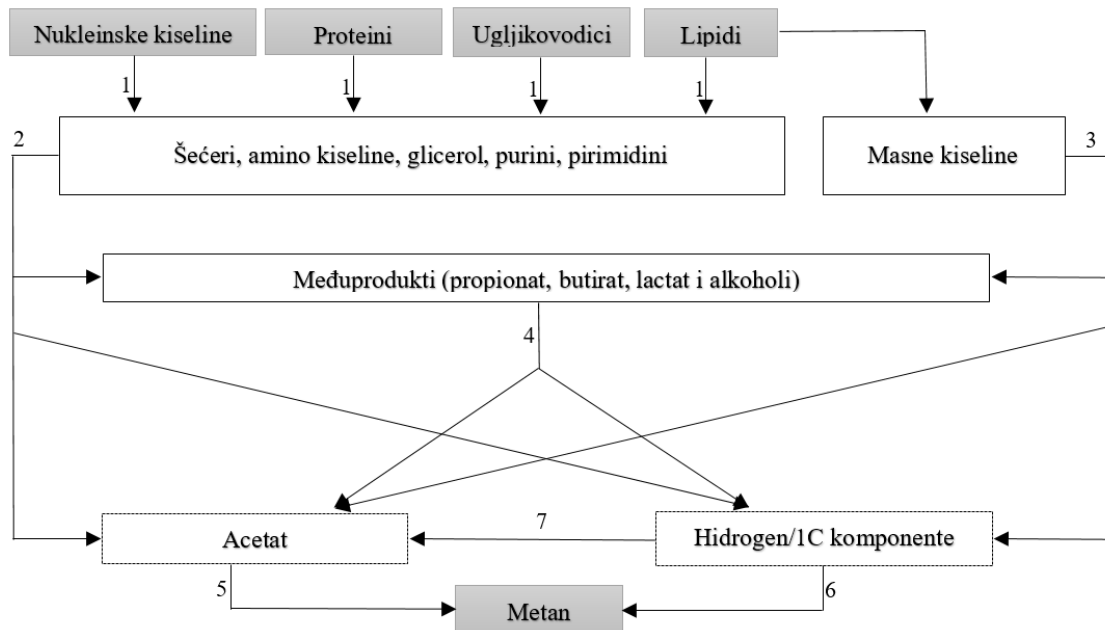
1.1. Proizvodnja bioplina

Povećane emisije stakleničkih plinova, globalne klimatske promijene i energetska ovisnost o fosilnim gorivima utjecali su na rast interesa za istraživanja alternativnih izvora energije. Rezerve fosilnih goriva troše se brže nego što nastaju, a njihovo korištenje oslobađa visoke koncentracije štetnih i otrovnih plinova u atmosferi. Kako bi se smanjila ovisnost o fosilnim gorivima i njihov ekološki štetan učinak, postepeno se razvijaju i iskorištavaju obnovljivi izvori energije. Prema Hrvatskom zakonu obnovljivi izvori energije definirani su kao „izvori energije koji su sačuvani u prirodi i obnavljaju se u cijelosti ili djelomično, posebno energija vodotoka, vjetra, neakumulirana sunčeva energija, biodizel, biomasa, bioplin, geotermalna energija itd.” (Web 1).

Bioplin kao obnovljivi izvor energije koji se proizvodi iz biomase predstavlja veliki potencijalni izvor energije. Mogućnost iskorištavanja različitih sirovina u proizvodnji bioplina omogućava mu široki spektar primjena na različitim lokacijama.

Bioplin nastaje iz organske tvari pod utjecajem mikroorganizama u anaerobnim uvjetima, a sastav mu je približno oko 65% metana, 30% ugljikova dioksida i niske koncentracije dušika, amonijaka, vodika, sumporovodika, ugljikovog monoksida i vodene pare. Zbog svoje energetske vrijednosti metan dobiven iz organske tvari anaerobnom fermentacijom može biti adekvatna zamjena za fosilna goriva. Anaerobna fermentacija je proces razgradnje organskog materijala na manje čestice u anaerobnim uvjetima. Učinkovitost ovisi o količini prisutnih mikroorganizama, temperaturi, koncentraciji amonijaka i hlapljivih masnih kiselina.

Proces proizvodnje bioplina sastoji se od 4 faze: hidroliza, acidogeneza, acetogeneza i metanogeneza (Gerardi 2003; Dueblein i Steinhauser 2008). U hidrolizi organska tvar se razlaže na monomere i oligomere. Produkti u ovoj fazi su jednostavni šećeri, aminokiseline i masne kiseline. U acidogenezi acidogene bakterije transformiraju produkte nastale u hidrolizi u metanogene spojeve. Produkti fermentacije koji se ne mogu direktno transformirati u metanogene spojeve transformiraju se u acetogenezi. Ključni korak procesa proizvodnje bioplina je metanogeneza u kojoj se odvija proizvodnja metana i ugljikovog dioksida pomoću metanogenih mikroorganizama. U ovoj fazi iz acetata nastaje oko 70 % metana dok ostalih 30 % nastaje iz vodika i ugljikovog dioksida (Schink 1997).

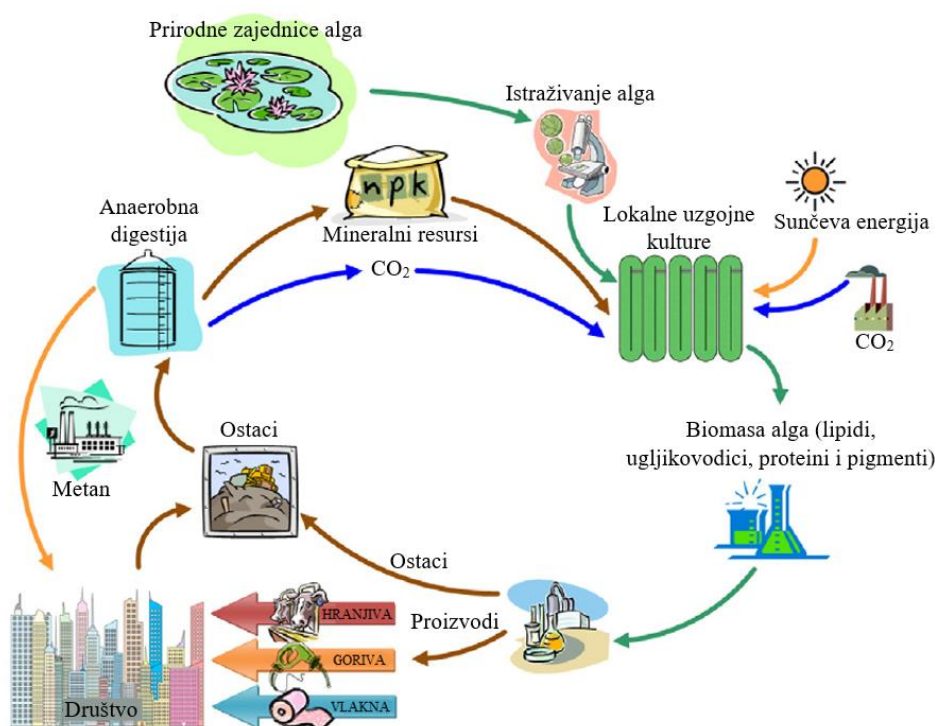


Slika.1. Dijagram reakcijskog slijeda kompleksnih organskih molekula u anaerobnoj fermentaciji (1) hidroliza; (2) fermentacija; (3) beta-oksidacija; (4) acetogeneza; (5) acetoklasna metanogeneza; (6) hidrogenotrofna metanogeneza; (7) homoacetogeneza
izvor: prilagođeno prema Bohutskyi i Bouwer (2013)

Sirovine za proizvodnju bioplina mogu biti razne organske tvari. Sve vrste bioloških sirovina iz poljoprivrednog sektora i različite vrste organskog otpada dobri su izvori plina, a prema pregledu istraživanja (Kralik i sur. 2007; Mihić i sur. 2011) vidljivo je da je najpogodnija sirovina gnojovka iz govedarskih, svinjogojskih i peradarskih farmi, te uzgajališta riba, a potom slijede poljoprivredni usjevi od kojih se najčešće koriste žitarice i razne trave. Bioplin iz stajskog gnoja se proizvodi postupkom anaerobne fermentacije, a zbog visokog udjela dušika stajski gnoj je vrlo pogodan za razvoj anaerobnih mikroorganizama. Međutim, zbog visoke koncentracije amonijaka u stajskom gnoju može doći do inhibicije razvoja mikroorganizama, te se stajski gnoj koristi u kodigestiji s nekom drugom vrstom organskog otpada, obično od poljoprivrednih kultura, voća ili povrća, što poboljšava omjer ugljika i hranjivih tvari te se povećava prinos bioplina.

1.2. Alge kao potencijalna sirovina u proizvodnji bioplina

Potencijalna sirovina u proizvodnji bioplina su alge, koje se smatraju tzv. "trećom generacijom biomase" zbog velikog kapaciteta proizvodnje energetski bogatih spojeva.



Slika 2. Ciklus iskorištavanja prirodnih zajednica alga u svrhu proizvodnje bioplina izvor: prilagođeno prema Wilkie i sur. (2011)

Mikroalge su raznolika skupina jednostaničnih i kolonijalnih organizama koje se razlikuju od makroalgi po biokemijskom sastavu (Bohutskyi i Bouwer 2013), a neke vrste mikroalgi prirodno akumuliraju visoke koncentracije ulja u suhoj biomasi (Hannon i sur. 2010). Razvijaju se u različitim vodenim ekosustavima, a u kratkom vremenu mogu proizvesti veliku količinu biomase. Nemaju lignina što su prepoznate komparativne vrijednosti u odnosu na makrofitske vrste. Upravo zbog tih karakteristika mikroalge smatraju se potencijalnom sirovinom za proizvodnju različitih oblika biogoriva kao što su bioplin, biodisel, bioetanol i biohidrogen (Debowski i sur. 2013). Za proizvodnju biogoriva istražuju se vrste koje po svojim fiziološkim, biokemijskim i genetskim karakteristikama imaju najpovoljnije prinose u proizvodnji različitih oblika biogoriva. Mikroalge koje sadrže veliki udio lipida (20-50%) (Chisti 2007) pogodne su za proizvodnju biodizela. Uz lipide, alge mogu proizvesti niz drugih potencijalnih molekula biogoriva. Neke vrste alga mogu također

proizvoditi vodik koristeći redukcijski potencijal fotosinteze u reakciji kataliziranoj pomoću enzima hidrogenaze, ali i druge sekundarne metabolite koji imaju mnogo sličnija svojstva postojećim naftnim gorivima. Takva vrsta metabolita su terpeni, koji predstavljaju potencijalni novi izvor goriva koji je kompatibilan s već postojećim gorivima na tržištu (Hannon i sur. 2010). Vrste koje su bogate škrobom koriste se u proizvodnji bioetanola, a proces je jednostavniji od proizvodnje biodizela. Škrob se može ekstrahirati iz stanica mehaničkim postupcima ili korištenjem enzima za razgradnju stanične stijenke, a Etanol iz škroba se može dobiti suhim ili vlažnim mljevenjem (Bothast i Schlicher 2005). Alge predstavljaju jedinu pravu alternativu trenutnim usjevima za proizvodnju bioetanola, kao što su kukuruz i soja jer im za rast nije potrebna obradiva zemlja (Chaudhary i sur. 2014).

Proizvodnja bioplina iz alga odvija se postupkom anaerobne fermentacije kao i kod ostalih sirovina koje se koriste za proizvodnju. Budući je metan najvažniji sastojak bioplina, alge s najvećom količinom lipida su najbolji izvor metana. Poznato je da su makroalge, kao što su zelene alge poput vrsta roda *Ulva*, *Enteromorpha* i *Cladophora*, te smeđe morske makroalge, uglavnom vrste *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Durvillea antarctica*, *Sargasum spp.*, i *Laminaria spp.*, pogodne za proizvodnju bioplina (Bohutskyi i Bouwer 2013). Međutim, malo je poznato koje vrste mikroalga se mogu koristiti u proizvodnji bioplina, te su postupci još uvijek u eksperimentalnoj fazi, a primjena je izuzetno mala.

Zelene alge su skupina koja sa različitim morfološkim oblicima, visokom koncentracijom lipida i brzim rastom predstavlja često istraživanu skupinu algi. Najčešće se koriste zbog različitih pigmenata koje posjeduju (klorofil -a, -b i karotenoidi), građe stanične stijenke (celuloza i pektin), fotosintetskog produkta škroba i mogućnosti nastanjanja različitih tipova staništa. Također neke alge (*Botryococcus spp.*) mogu sintetizirati metabolite poput triterpenoida i botriocena koji su potencijalne molekule goriva (Hannon i sur. 2010).

Prema Hannon i sur. (2010) cijanobakterije nisu bile atraktivne u početnim istraživanjima za proizvodnju biogoriva, zbog relativno niskih koncentracija lipida. Njihova sposobnost razvoja u ekstremnim uvjetima i mogućnost genetskih modifikacija povećali su interes za njihovu primjenu. Koncentracija lipida u cijanobakterijama nikada nije dosegla koncentraciju u eukariotskim algama, ali mogućnost manipulacije genoma i fiksacija dušika omogućile su njihovu kompetentnost kao važnu sirovinu za proizvodnju biogoriva.

Neke vrste mikroalgi danas se masovno uzgajaju za proizvodnju biogoriva. Za uzgoj potrebno je osigurati dovoljne količine ugljika, dušika i fosfora. Wilkie i sur. (2011) navode da kod odabir pogodnih algi za uzgoj u svrhu proizvodnje prednost bi se trebala dati autohtonim vrstama koje su već prilagođene na uvijete u okolišu te bi se na taj način smanjili

troškovi kontrole uvjeta uzgoja. Također remedijacijske sposobnosti algi mogu iskoristiti lokalne otpadne resurse kao nutrijente pri uzgoju. Primjer toga je *Euglena cf. sanguinea* koja je pronađena u jezercu, obogaćeno nutrijentima ispranih s poljoprivrednih površina. Vrsta sadrži obilnu količinu karotenoida i ugljikovodika (Wilkie i sur. 2011). Suvremene tehnike masovnog uzgoja vrlo brzo se razvijaju, iako je komercijalni uzgoj ograničen samo na nekoliko vrsta (*Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* i ostale). Mikroalge se mogu uzgajati u otvorenim i zatvorenim bioreaktorskim sustavima, koje prate postrojenja za preradu i proizvodnju biomase. Otvoreni sustavi mogu biti prirodni vodotoci, lagune i jezera, kao i umjetno iskopani bazeni i kanali (Brennan i Owende 2010). Takvi sustavi uzgoja algi najčešće se koriste zbog niske vrijednosti investicija i rada. Njihovi nedostatak su evaporacija vode, slabo korištenje CO₂, a kao najveći nedostatak smatra se nemogućnost kontrole uvjeta, koji mogu dovesti do onečišćenje sojeva u uzgoju, što uzrokuje smanjenu produkciju biomase (Costa i de Morais 2014). Moguća proizvodnja mikroalgi u otvorenom sustavu iznosi od 0,06 do 0,2 g biomase/L na dan ili godišnje oko 30 tona biomase po hektaru (Mata i sur. 2010).



Slika 3. Prikaz a) Otvoreni i b) zatvoreni bioreaktorski sustav za uzgoj alga izvor: (Web 2)

Zatvoreni sustavi imaju veću produkciju biomase, ali i veće početne troškove. Takvi sustavi moraju se prilagođavati fiziološkim karakteristikama različitih vrsta mikroalga u svrhu optimizacije njihova rasta i proizvodnje lipida. Proizvodnja u zatvorenim sustavima može biti i do 3 g biomase/L na dan , a godišnji prinos u takvim sustavima može biti od 40 do 150 tona biomase po hektaru (Pulz i Gross 2001).

1.3. Cilj rada

Cilj ovog istraživanja je utvrditi mogućnosti proizvodnje bioplina postupkom anaerobne fermentacije stajskog gnoja u kodigestiji s mikroalgama i cijanobakterijama. U tu će se svrhu koristiti prirodna zajednica mikroalga iz malog eutrofnog jezera i zajednica cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja. Na temelju količine i sastava bioplina utvrdit će se prednosti i nedostaci između mikroalga i cijanobakterija u proizvodnji bioplina.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje i analiza sastava zajednica mikroalga i cijanobakterija

Uzorci mikroalga za istraživanje prikupljeni su iz malog jezera u Osijeku na lokaciji Biljska cesta (Slika 4.). Vodena površina jezera je cca. 40 m², maksimalna dubina vode je oko 0,5 m. Veći dio obale jezera obrastao je trskom, a dno vodenim biljem.



Slika 4. istraživano jezero (Biljska cesta, Osijek) izvor: autor

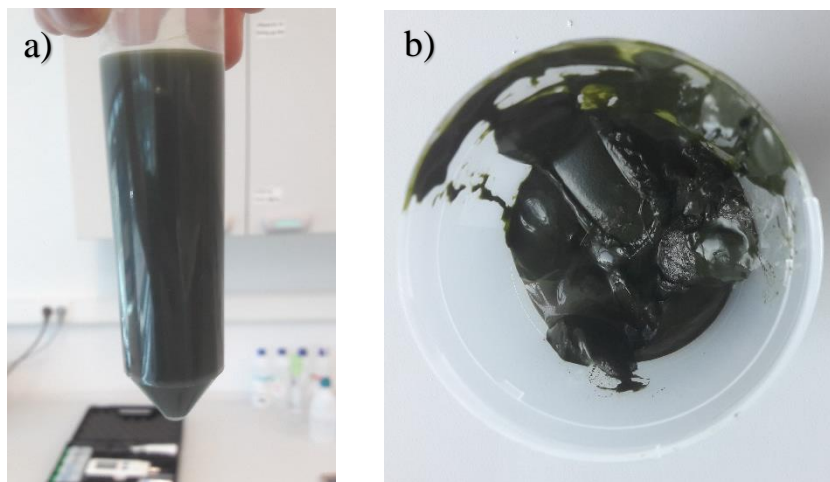
Uzorci mikroalga su sakupljeni filtriranjem vode jezera kroz fitoplanktonsku mrežicu veličine pora 25 µm. Filtriranje se obavljalo tijekom srpnja 2017. godine. Profiltrirano je oko 88 700 litara jezerske vode da bi se dobilo 111,32 g biomase svježe tvari zajednice mikroalga.

Cijanobakterije roda *lyngbya* su uzgajane tijekom razdoblja rujna - prosinac 2017. godine u laboratoriju u akvarijima zapremnine 5 L (Slika 5.) uz dodavanje nutrijenata (razrijeđena otopina gnojovke).



Slika 5. Akvariji za uzgoj cijanobakterija a) početak uzgoja i b) prije filtracije izvor: autor

Filtracija se obavljala svaka 3 tjedna pomoću fitoplanktonske mrežice veličine pora 25 μm , a filtrirana voda se ponovno koristila za nastavak uzgoja. Ukupna količina svježe tvari biomase sakupljena akvarijskom uzgojem iznosila je 286,56 g.



Slika 6. Pripremanje uzoraka mikroalga za anaerobnu fermentaciju a) prije centrifugiranja i b) nakon centrifugiranja izvor: autor

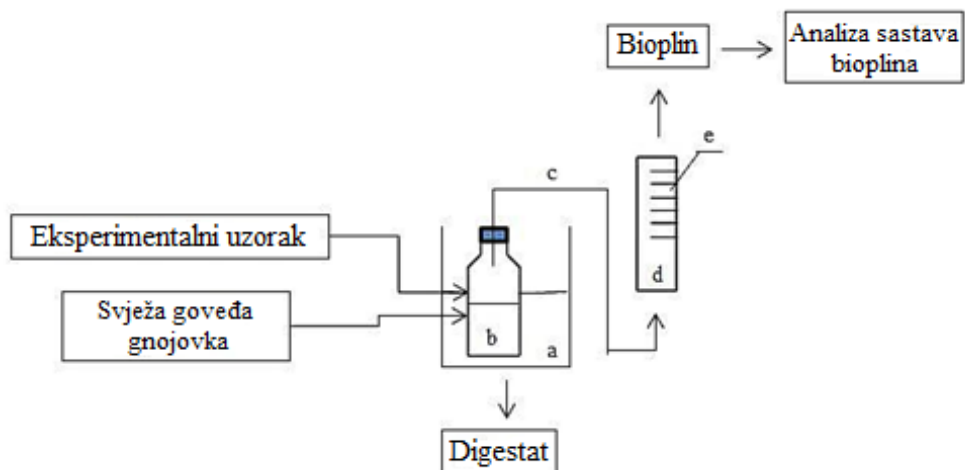
Dobiveni uzorci mikroalga i cijanobakterija centrifugirani su 3 min na 5.000 okretaja, dekantirani i zamrznuti radi očuvanja. Sakupljeni uzorci zajednica mikroalga i cijanobakterija kvalitativno su se analizirali pomoću svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Njemačka) i ključeva za determinaciju vrsta (Hindak i sur. 1978).

2.2. Metoda anaerobne fermentacije

Za proizvodnju bioplina koristile su se 3 skupine uzoraka:

- a) svježa goveđa gnojovka 500 g (100%) prikupljena je sa farme Orlovnjak, Tenja iz prijemne jame smještene prije ulaska u bioplinsko postrojenje - kontrola skupina K;
- b) smjesa 475 g (95% ukupne biomase) svježe goveđe gnojovke + 25 g svježe biomase alga eutrofnog jezera (5% ukupne biomase) - eksperimentalna skupina A;
- c) smjesa 475 g (95% ukupne biomase) svježe goveđe gnojovke + 25 g svježe biomase cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja (5% ukupne biomase) - eksperimentalna skupina B.

Kontrola je postavljena u dva ponavljanja dok su eksperimentalne skupine postavljane u 3 ponavljanja.



Slika 7. Shematski prikaz provedbe procesa anaerobne fermentacije: termostatska vodena kupelj (a); reaktorska boca (b); PVC cijev (c); prezasićena otopina NaCl (d); menzura za prikupljanje bioplina (e) izvor: prilagođeno po Kovačić (2017)

Anaerobna fermentacija se provodila u diskontinuiranim bioreaktorima zapremnine 1 L pri termofilnim uvjetima (55°C) u kupelji tijekom razdoblja do 30 dana. Fermentacija se svakodnevno pratila a proizvedeni bioplina sakupljan je kroz prezasićenu otopinu NaCl u graduiranim menzurama (2 L) spojenim na bioreaktore preko PVC cijevi.



Slika 8. Provedba procesa anaerobne fermentacije izvor: autor

2.3. Analiza sastava bioplina

Sastav uzorka bioplina i to udio metana (CH₄), ugljikovog dioksida (CO₂) i dušika (N), analiziran je pomoći plinskog kromatografa Varian 3900 opremljen TCD detektorom prema modificiranoj metodi HRN ISO 6974-4:2000. Temperatura injektora bila je 150°C, Temperatura detektora 150°C, Temperatura kolone 90°C. Tip kolone: 10x1/8" od nehrđajućeg čelika (Restek SN: C14030) za analizu metana, dušika, ugljičnog dioksida, a plin nositelj je helij s protokom kroz kolonu 1 mL/min.

2.4. Analiza suhe tvari

Suha tvar u uzorcima utvrđena je sušenjem 100 g svježe tvari uzorka u sušioniku, na 75°C kroz 24 sata, zatim dodatna 3 sata na temperaturi od 105°C do konstantne mase (Thompson, 2001.). Udio ukupne suhe tvari u uzorku izračunata je prema jednadžbi:

$$\text{Ukupna suha tvar (\%)} = [\text{neto suha tvar (g)} \div \text{neto svježi uzorak (g)}] \times 100$$

2.5. Određivanje sadržaja pepela i organske tvari

Ukupan sadržaj pepela i organske tvari određen je žarenjem na 550°C tijekom 3-4 sata (Thompson, 2001.) u peći za žarenje, a korišteni su uzorci suhe tvari nakon sušenja na 75°C i sljedeće formule:

$$\text{pepeo (\%)} = [\text{neto masa pepela nakon 550°C (g)} \div \text{neto suhi uzorak (g)}] \times 100$$

$$\text{organska tvar} = [1 - \text{neto pepela nakon 550°C (g)} \div \text{neto suhi uzorak (g)}] \times 100$$

2.6. Određivanje pH

Određivanje pH vrijednosti u uzorcima obavljeno je pH metrom Mettler Toledo FiveEasy.

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

3.1. Sastav zajednica mikroalgi i cijanobakterija

U zajednicama alga eutrofnog jezera ukupno je utvrđeno 17 vrsta (Tab. 1.) od kojih su apsolutno dominirale vrste iz skupine Euglenophyta i to vrste roda *Lepocinclis*, što se može okarakterizirati kao masovni razvoj i „cvjetanje“ alga te skupine.

Tablica 1. Sastav zajednice mikroalga u istraživanom eutrofnom jezeru

Vrsta	Procjena brojnosti
CYANOBACTERIA	
<i>Phormidium retzii</i> Kützing ex Gomont	3
EUGLENOPHYTA	
<i>Euglena oxyuri</i> Schmarda	3
<i>Lepocinclis fusiformis</i> Lemmermann	3
<i>Lepocinclis ovum</i> Lemmermann	5
<i>Lepocinclis texta</i> Lemmermann	3-5
<i>Phacus curvicaud</i> Svirenko	3
<i>Phacus longicaud</i> (Ehrenberg) Dujardin	3
CHRYSOPHYTA	
Xanthophyceae	
<i>Centritractus belenophorus</i> (Schmidle) Lemmermann	3
Bacillariophyceae	
<i>Cyclotella</i> sp.	1
<i>Gomphonema ventricosum</i> W.Gregory	1
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grunow in Cleve & Grunow	1
<i>Synedra ulna</i> (Nitzsch) Ehrenberg	1
CHLOROPHYTA	
<i>Closterium parvulum</i> Nägeli	3-5
<i>Closteriopsis acicularis</i> (Chodat) J.H.Belcher & Swale	1
<i>Coelastrum astroideum</i> De Notaris	1
<i>Gonium pectorale</i> O.F.Müller	1
<i>Scenedesmus</i> spp.	1

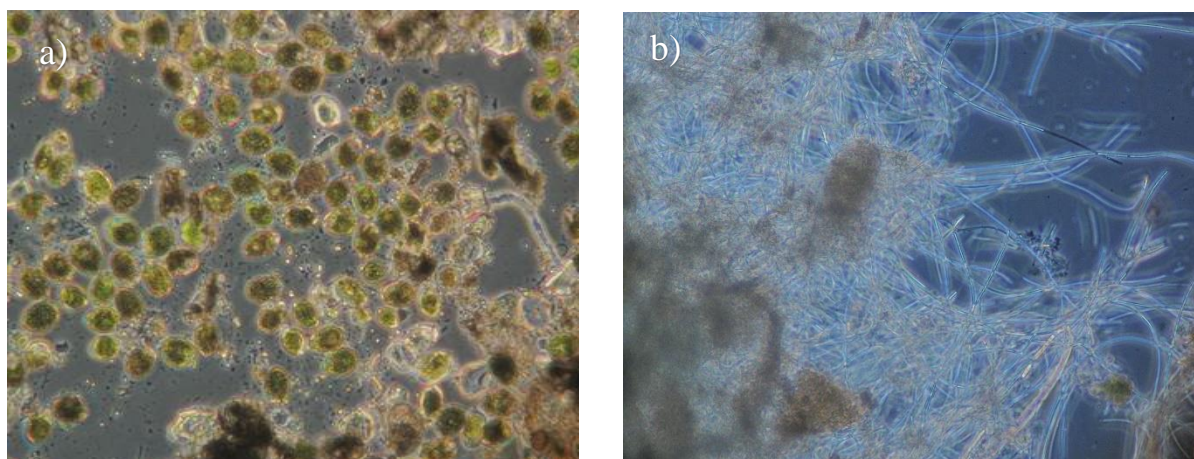
Legenda: 5- masovno razvijena vrsta, 3- dobro razvijena vrsta, 1- pojedinačno zastupljena vrsta

U uzorku uzetom iz akvarijskog uzgoja bile su zastupljene 4 vrste roda *Lyngbya* iz skupine Cyanobacteria (Tab. 2). Prema procijeni brojnosti dominantna i masovno razvijena vrsta bila je *Lyngbya limnetica*.

Tablica 2. Sastav zajednice cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja

Vrsta	Procjena brojnosti
CYANOBACTERIA	
<i>Lyngbya limnetica</i> Lemmermann	5
<i>Lyngbya thornensis</i> W.Bunting & J.W.G.Lund	3
<i>Lyngbya versicolor</i> Gomont	3
<i>Lyngbya lutea</i> Gomont ex Gomont	3

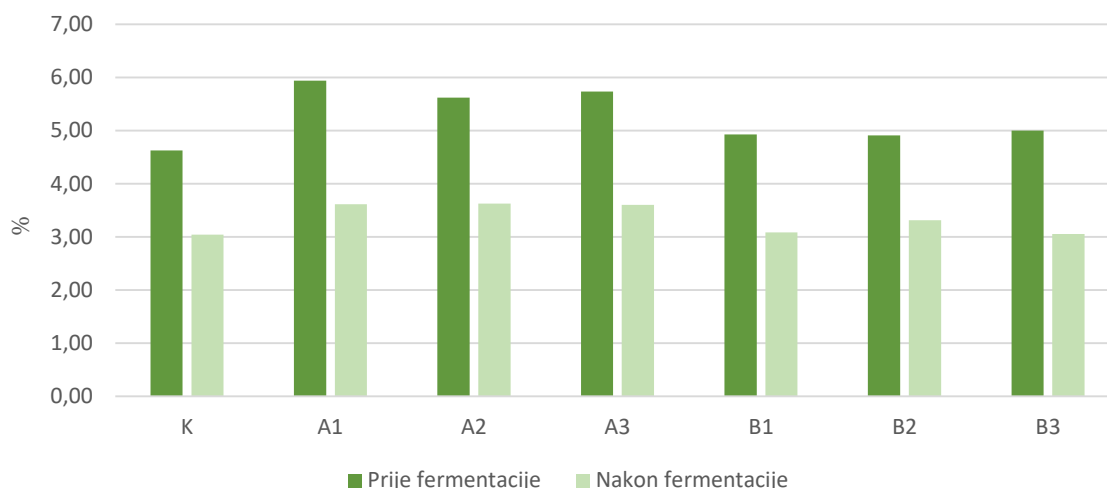
Legenda: 5- masovno razvijena vrsta, 3- dobro razvijena vrsta, 1- pojedinačno zastupljena vrsta



Slika 9. Mikroskopski prikaz zajednica a) mikroalga iz eutrofnog jezera i b) cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja izvor: autor

3.2. Količina suhe i organske tvari

Postotak suhe tvari u goveđoj gnojovci (kontrolnoj skupini - K) iznosio je 4,63 %, u supstratu mikroalga eutrofnog jezera iznosio je 26,77 %, a supstratu cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja 7,64 %. Dodatak 25 g supstrata algi u 475 svježe goveđe gnojovke promijenio je udio suhe tvari u eksperimentalnoj skupini mikroalge iz eutrofnog jezera (A) na 5,77 %, a u eksperimentalnoj skupini cijanobakterije iz akvarijskog uzgoja (B) na 4,95 %.

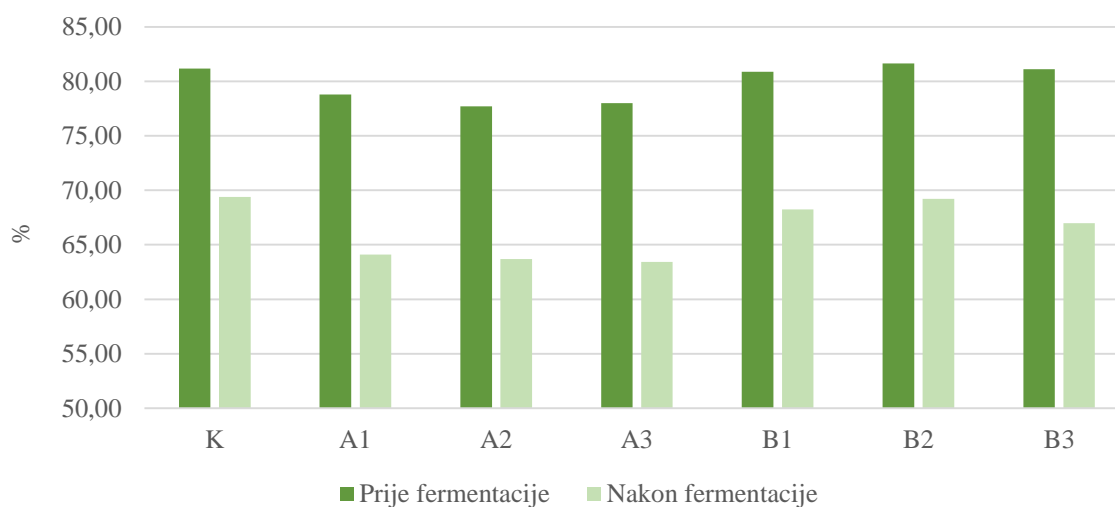


Slika 10. Usporedba prosječnih vrijednosti suhe tvari prije i nakon fermentacije između kontrolne skupine (K) i eksperimentalnih skupina mikroalga (A1-A3) i cijanobakterija (B1-B3)

Udio suhe tvari nakon fermentacije se smanjio u sve tri skupine, pa je tako kontrolna skupina imala 3,04 % dok su eksperimentalne skupinama mikroalga imale 3,62 %, a cijanobakterija na 3,15 %.

U istraživanim supstratima udio organske tvari u suhoj tvari prije fermentacije iznosio je za govedu gnojovku 81,16 %, mikroalga 62,30 %, a cijanobakterije 65,47 %.

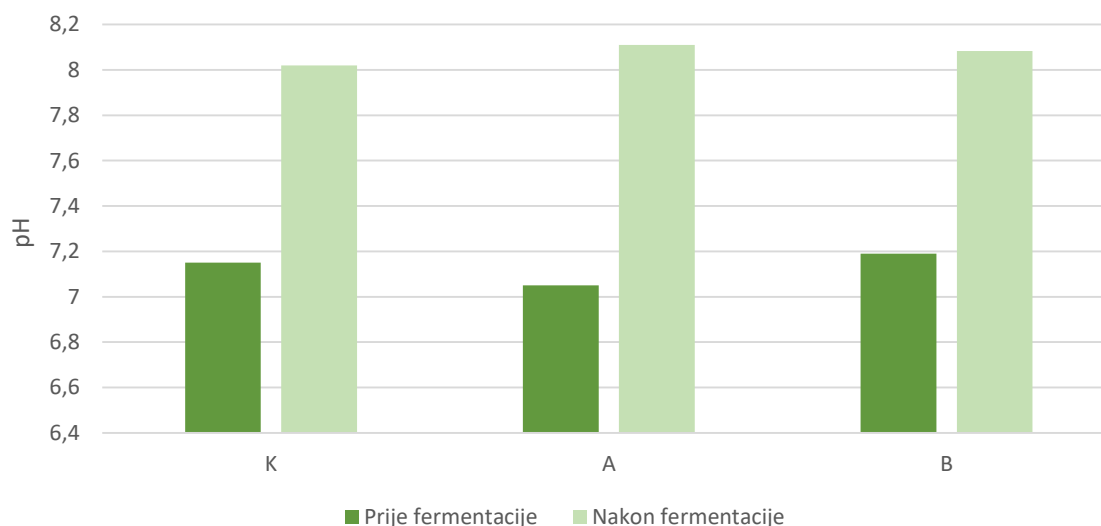
Prije fermentacije najveći udio organske tvari u suhoj tvari od 81,21% imala je eksperimentalna skupina cijanobakterija (B) dok je kontrolna skupina (K) imala 81,16 %. Eksperimentalna skupina mikroalga (A) sadržavao je 78,17 % organske tvari.



Slika 11. Prosječne vrijednosti organske tvari prije i nakon fermentacije u kontrolnoj skupini (K) te eksperimentalnim skupina mikroalga (A1-A3) i cijanobakterija (B1-B3)

Nakon fermentacije dolazi do smanjenja u količini organske tvari u suhoj tvari pri čemu udio u kontrolnoj skupini (K) iznosi 68,62 %, a u eksperimentalnim skupinama mikroalga (A) 63,73 % i cijanobakterija (B) 68,14 %.

3.3. Koncentracija pH

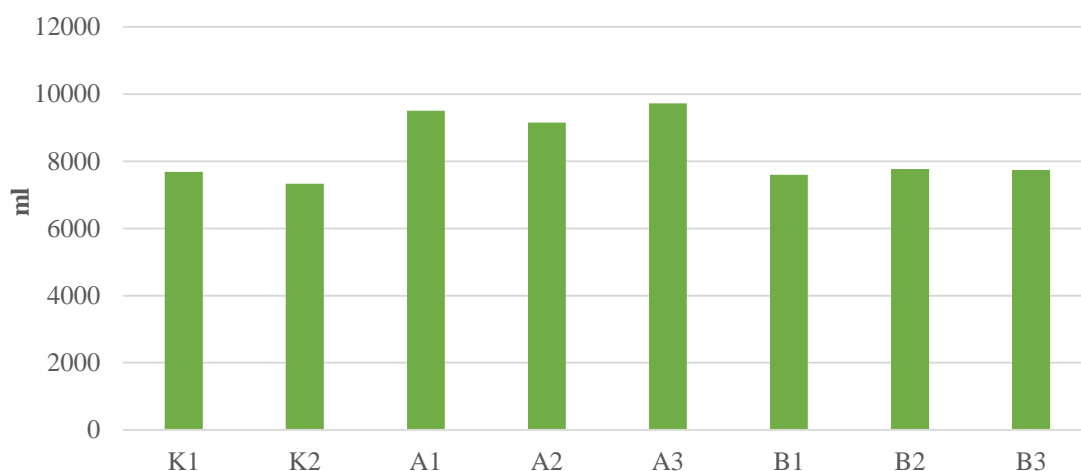


Slika 12. Prosječne vrijednosti pH u kontrolnoj skupini (K) i eksperimentalnim skupinama mikroalga (A) i cijanobakterija (B) prije i poslije fermentacije

Dobivena pH vrijednost za kontrolnu skupinu iznosi 7,15, a za eksperimentalnu skupinu mikroalga 7,05 i cijanobakterija 7,19. Nakon fermentacije pH vrijednost kontrole se povećala na 8,02, kao i vrijednosti eksperimentalnih skupina mikroalga na 8,11 i cijanobakterije na 8,08.

3.4. Količina proizvedenog bioplina

Ukupna količina proizvedenog bioplina tijekom retencijskog razdoblja od 30 dana iz 500ml supstrata prikazana je na Sl. 13. Dobiveni rezultati pokazuje da su obje eksperimentalne skupine nadmašile proizvodnju bioplina kontrolne skupine čija je prosječna vrijednost iznosila 7507,5 ml/500ml. Tako je ukupna količina bioplina u eksperimentalnoj skupini A (zajednica mikroalga), postigla prosječnu vrijednost proizvodnju od 9365 ml/500ml, dok je u eksperimentalnoj skupini B (zajednica cijanobakterija) prosječna vrijednost ukupne količine bioplina bila dosta niža i iznosila 7705 ml/500ml.

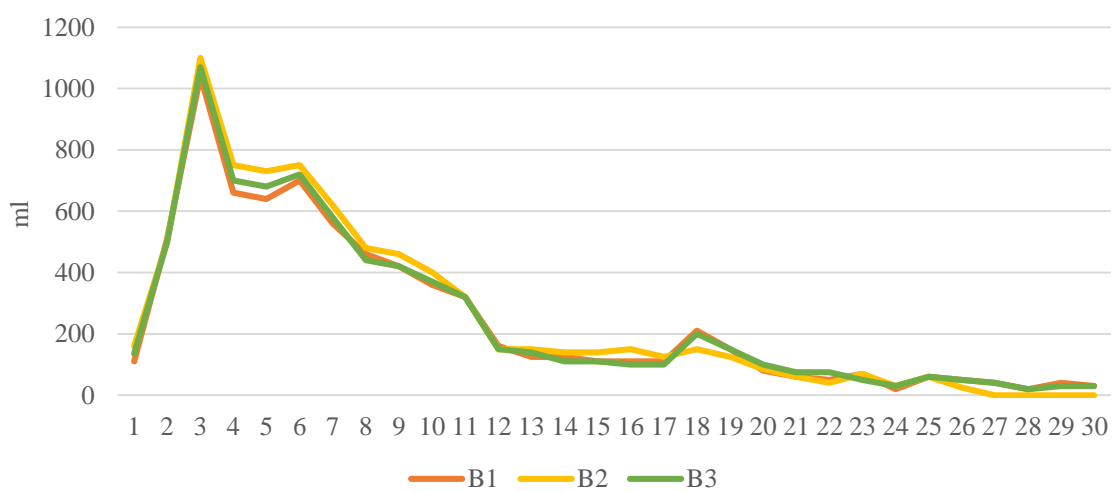
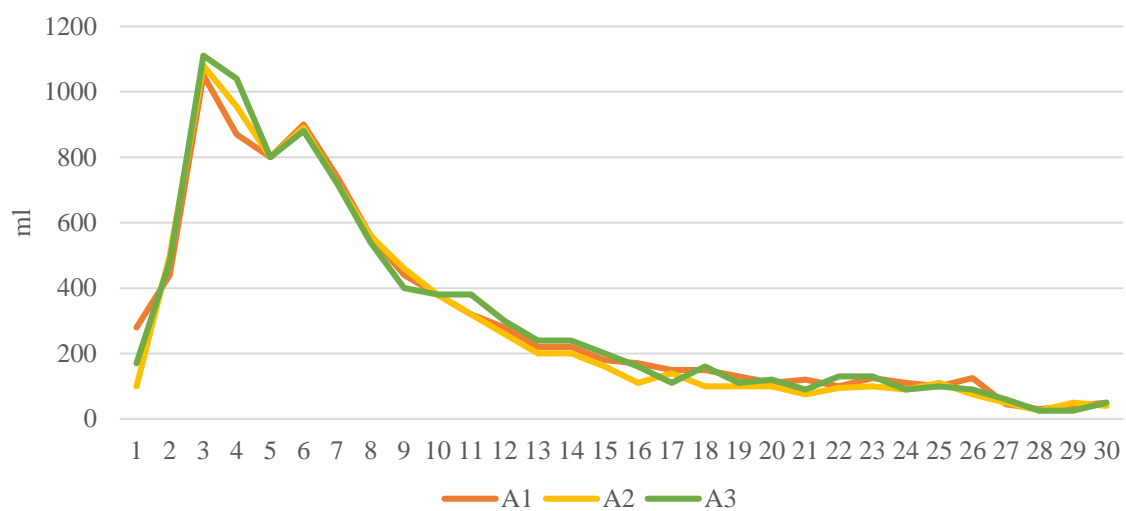
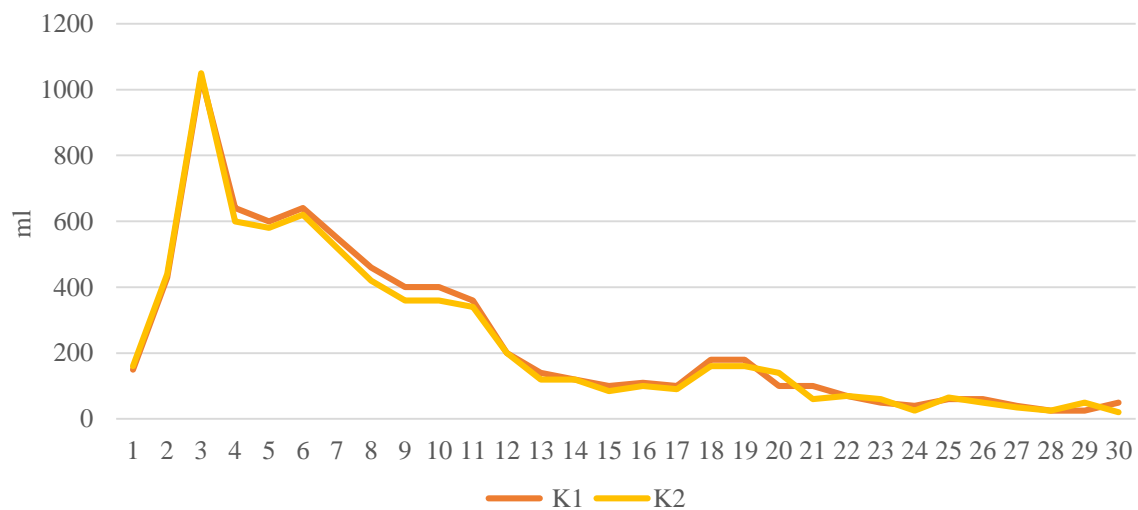


Slika 13. Prosječne vrijednosti ukupne količine proizvedenog bioplina u kontrolnim uzorcima (K1-K2) te eksperimentalnim uzorcima mikroalga (A1-A3) i cijanobakterija (B1-B3)

3.5. Dinamika proizvodnje bioplina

Dinamika proizvodnje bioplina praćena je tijekom razdoblja od 30 dana. Prema Sl. 14. može se uočiti kako kontrolna skupina ima nagli rast proizvodnje bioplina do 3. dana s maksimumom od 1045 ml bioplina. Nakon toga naglo pada do 5. dana (620 ml), te od 5. do 17. dana proizvodnja nastavlja opadati. Blagi rast produkcije plina bio u razdoblju od 17. do 19. dana. Od 19. dana do kraja retencijskog razdoblja pada i proizvodnja ne prelazi više od 100 ml.

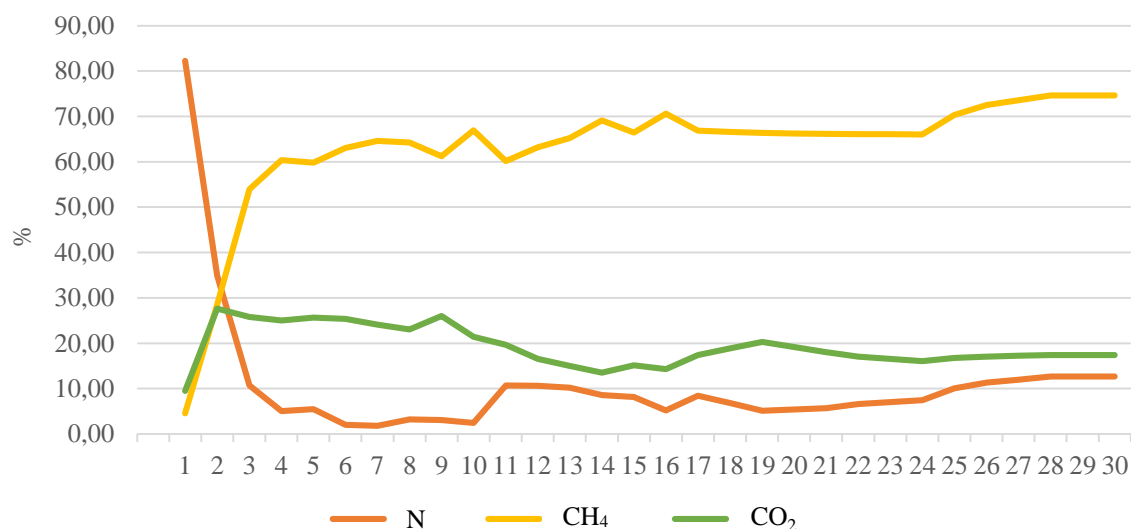
Eksperimentalna skupina A svoj maksimum u proizvodnji bioplina dostiže istodobno kad i kontrolna skupina, s maksimalnom vrijednosti od 1080 ml, nakon toga slijedi pad 5. dan i ponovni rast 6. dan na vrijednost od 890 ml. količina proizvedenog bioplina nakon 6. dana opada do 30. Dana. Eksperimentalna skupina B svoj maksimum dosežu kao i prethodne skupine 3. dan s vrijednosti od 1070 ml. U narednom razdoblju do 6. dana proizvodnja pada na 723 ml, te nakon toga nastavlja opadati do 17. dana kada je zabilježen blagi rast. Od 20. dana do kraja retencijskog razdoblja proizvodnja ne prelazi više od 100 ml po danu.



Slika 14. Dinamika proizvodnje bioplina u kontrolnim skupinama (K1-K2) te eksperimentalnim skupinama mikroalga (A1-A3) i cijanobakterija (B1-B3)

3.6. Sastav bioplina

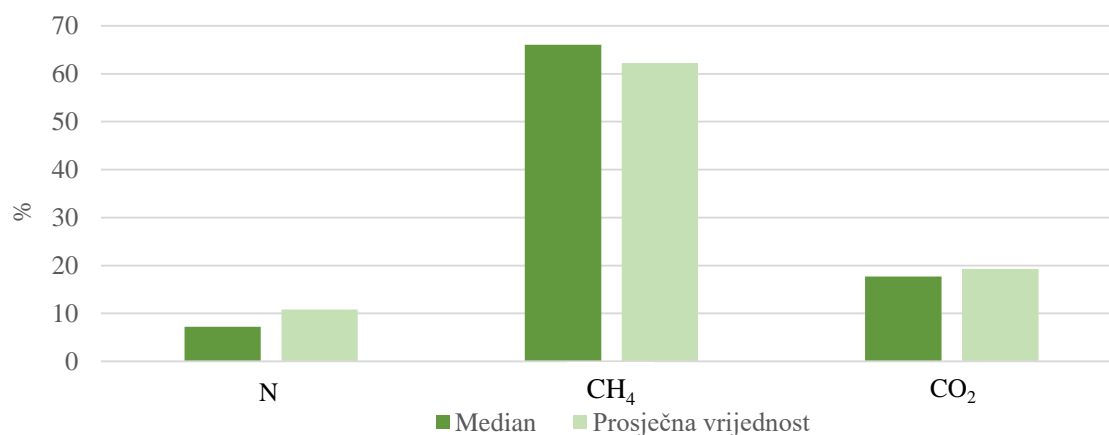
Na početku procesa u kontrolnoj skupini (K) koncentracija dušika iznosi 82,27 % nakon čega je zabilježen nagli pad koncentracije ispod 10 % u prva tri dana, te ostaje ispod 10% do 10. dana. 10. dan dolazi do rast koncentracije i na kraju retencijskog razdoblja koncentracija je 12,65%.



Slika 15. Koncentracija dušika, metana i ugljikovog dioksida u kontrolnoj skupini (K)

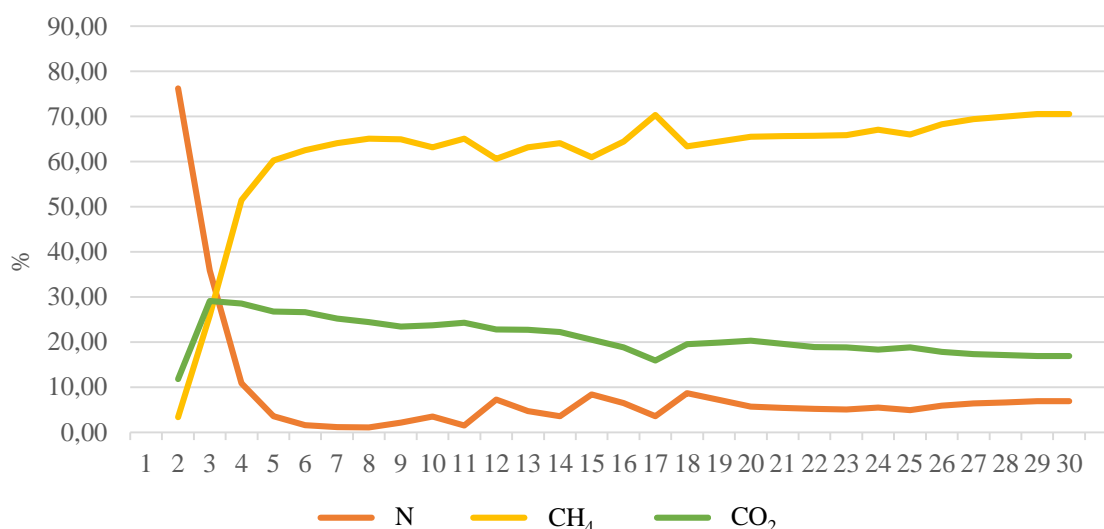
Rast koncentracije metana intenzivan je u prva četiri dana u kojima dostiže vrijednosti od 60,35%. Maksimalna koncentracija metana zabilježena je 28. dan 74,65%.

Ugljikov dioksid maksimalnu vrijednost od 27,66% postiže 2. dan. Od 2. do 11. dana vrijednost koncentracije je iznad 20%, a nakon 11. dana kraja retencijskog razdoblja koncentracija pada ispod 20 %.



Slika 16. Vrijednost medijana i prosječne vrijednosti dušika, metana i ugljikovog dioksida u kontrolnoj skupini (K)

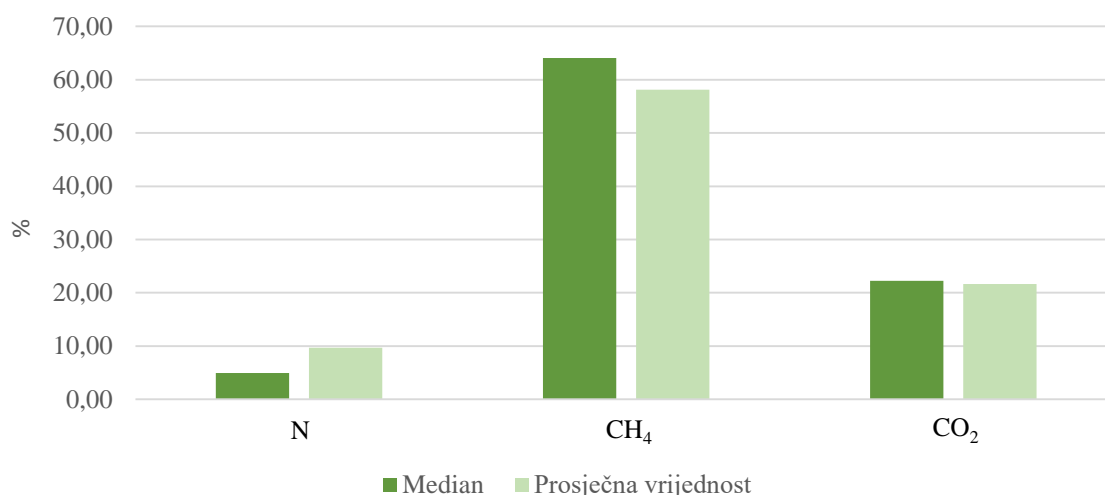
Izračunata vrijednost medijana u kontrolnoj skupini (K) za koncentraciju metana iznosi 64,62 %, koncentraciju ugljikovog dioksida 19,63 %, a dušika 7,45 %. Prosječna vrijednosti koncentracije metana iznosi 60,09%, 19,86% za ugljikov dioksid i 11,62 % za dušik.



Slika 17. Koncentracija dušika, metana i ugljikovog dioksida u eksperimentalnoj skupini mikroalga (A)

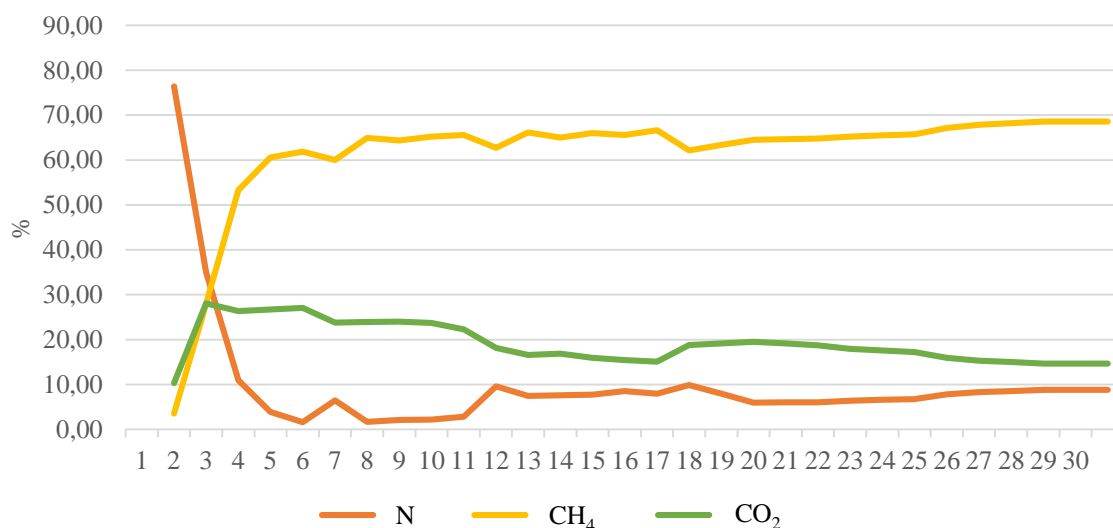
U eksperimentalnoj skupini (A) koncentracija metana intenzivno raste u prvih šest dana do koncentracija od 62,54 %, nakon čega dolazi do usporavanja rasta koncentracije. Od 6. dana do kraja retencijskog razdoblja koncentracija je između 60 i 70 % osim 17. i 29. dana kada prelazi 70 %.

Koncentracija dušika sa 76,23 % naglo opada u prvih šest dana do koncentracije 1,5%. od 10. do 19. dana zabilježena je oscilacija u koncentracije dušika, te od 20. dana do kraja retencijskog razdoblja koncentracija je između 5 i 7 %. Maksimalna koncentracija ugljikovog dioksida dostiže se 3. dan 29,12 %, nakon čega kontinuirano opada do 30. dana, osim 17. dana kada je zabilježen nagli pad i najmanja koncentracija ugljikova dioksida od 15,87%.



Slika 18. Vrijednost medijana i prosječne vrijednosti dušika, metana i ugljikovog dioksida u eksperimentalnoj skupini mikroalga (A)

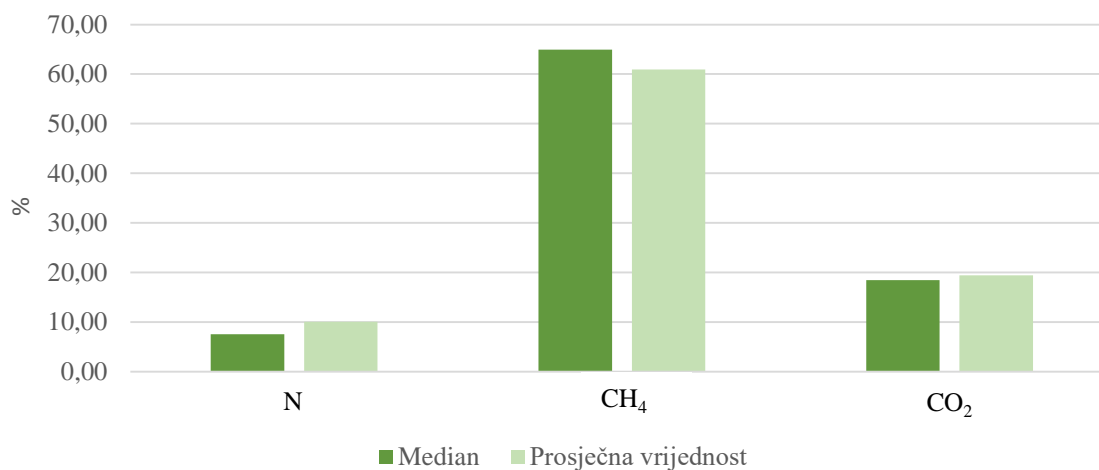
Vrijednost medijana za eksperimentalnu grupu mikroalge iznosi za metan 64,06 %, 22,23 % za ugljikov dioksid i 4,92 % za dušik. Prosječna vrijednost metana je 58,13 %, dušika 9,65 %, i ugljikova dioksida 21,62%.



Slika 19. Koncentracija dušika, metana i ugljikovog dioksida u eksperimentalnoj skupini cijanobakterija (B)

U eksperimentalnoj skupini (B) koncentracija metana intenzivno raste do 5. dana (60,61 %). Od 6. do 17. dana zabilježene su oscilacije s tendencijom rasta do koncentracije od 66,62 %. 18. dan zabilježena je smanjena koncentracija od 62,17 % nakon čega do kraja retencijskog

razdoblja raste na 68.55 %. Koncentracija ugljikovog dioksida najveći koncentraciju postiže 3. dan sa vrijednosti od 28,04 %. Od 3. dana do 12. dana koncentracije su iznad 20 %, nakon čega pada na 15,07 % i vrijednosti ostaju ispod 20 % do kraja retencijskog razdoblja. Koncentracija dušika na početku proizvodnje iznosi 76,40 % i nakon toga opada do vrijednosti od 1,62 % 6. dan. Porast koncentracija dušika vidljiv je 7., 12. i 18. dan ali vrijednost koncentracija od 6. do 30. dana ne prelazi 10 %.



Slika 20. Vrijednost medijana i prosječne vrijednosti dušika, metana i ugljikovog dioksida u eksperimentalnoj skupini cijanobakterija (B)

Vrijednost medijana za eksperimentalnu skupinu cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja (B) iznosi za dušik 7,48 %, metan 64,76 % i ugljikov dioksid 18,84 %. Prosječna vrijednost dušika iznosi 10,94 %, metana 60,96 % i ugljikova dioksida 20,17 %.

4. RASPRAVA

U ovom su istraživanju kao izvor biomase korištene prirodne zajednice mikroalaga iz eutrofnog jezera i zajednica cijanobakterije roda *Lyngbya* iz akvarijskog uzgoja. U prirodnoj zajednici fitoplanktona istraživanog jezera dominirale su vrste roda *Lepocinclis* iz skupine Euglenophyta. Poznato je da se euglene mogu masovno razviti u eutrofnim vodama, a pogoduje im velika količina raspadnute organske tvari (Reynolds 2006). Istraživano jezero je plitko jezero sa širokom litoralnom zonom obraslom makrovegetacijom i debelim naslagama organskog sedimenta što je uz visoku temperaturu vode pogodovalo masovnom razvoju euglena (Mihaljević i sur. 2015).

Poznato je da se neke vrste iz skupine Euglenophyta koriste u istraživanjima za proizvodnju biogoriva (biodizela) zbog količine lipida koje sadržavaju (Chisti 2007). Tako *Euglena gracilis* može sadržavati 14 - 20 % lipida u suhoj biomasi, a proizvodnja biomase iznosi 7,70 g/L/danu (Mata i sur. 2009). *Lepocinclis ovum*, koji je masovno bio razvijen u uzorku mikroalga eutrofnog jezera može sadržavati 18,4 % lipida u suhoj biomasi s produkcijom od 10 - 20 g/L/danu (Muthu 2016). Također uz visoku količinu lipida, vrste iz skupine Euglenophyta sadržavaju različite pigmente (klorofil -a, -b, karotenoide i ksantofile) i nakupine ugljikohidrata paramiluma, pričuvne tvari slične škrobu. Takve karakteristike mogu pridonijeti pri njihovom odabiru kao sirovine u proizvodnji biogoriva (Wilkie i sur. 2011).

Iako su aktualne studije usredotočene uglavnom na eukariotske mikroalge sve se više istražuju i mogućnosti upotrebe prokariotskih cijanobakterija u proizvodnji biogoriva zbog povoljnog lipidnog sastava i velike brzine rasta (Beetul i sur. 2014). Cijanobakterije sadrže klorofil -a i karotenoide, ali i fikobiline te mogu u svojoj citoplazmi pohranjivati esencijalne nutrijente i metabolite (Carr i Whitton, 1973). Cijanobakterija *Lyngbya limnetica* koja je bila dominantna u eksperimentalnoj skupini (B) može sadržavati 18 % lipida u suhoj tvari (Sharathchandra i Rajashekhar 2011), a produkcija biomase iznosi od 0,088 do 0,423 g/L/danu (Kushwaha i sur. 2017).

Poznato je da količina proizvedenog bioplina izravno ovisi o udjelu suhe i organske tvari u biomasi koja se koristi za proizvodnju (Gunaseelan 1997). Što je postotak suhe i organske tvari veći to je proizvodnja i energetska vrijednost bioplina viša. Suha tvari predstavlja podlogu za rast i razvoj bakterija (Panjičko 2015). Dobiveni rezultati u ovom istraživanju pokazali su da je znatno veći udio suhe tvari u supstratu mikroalgi (26,77 %) u odnosu na

supstrat cijanobakterija (7,64%) i kontrolni uzorak gnojovke (4,63%). Dodatkom supstrata u gnojovku u oba eksperimentalna uzorka za kodigestiju vrijednosti suhe tvari se povećala u odnosu na čistu gnojovku. Usporedbom dobivenih rezultata vrijednosti organske tvari u suhoj tvari prije i nakon fermentacije vidljivo je da skupina B (cijanobakterije) imala slične vrijednosti kao i kontrolna skupina (K) dok je skupina A (mikroalge) imala nižu vrijednosti. Međutim nakon fermentacije najveće smanjenje količine organske tvari bilo je u eksperimentalnoj skupini (A). Smanjenje organske tvari je posljedica djelovanja metanogenih mikroorganizama koji koriste organsku tvar kao energetski izvor u proizvodnju bioplina. Poznato je da povećanje udjela organske tvari i masti u suhoj tvari za rezultat ima i veći postotak metana u sastava bioplina (Majkovčan i sur. 2010).

Uz organsku i suhu tvar važan čimbenik u odvijanju anaerobne fermentacije predstavlja pH. Acidogeneza se najbolje odvija pri pH vrijednosti od 5,5 do 6,5, dok je metanogeneza osjetljiva na promjene pH vrijednosti, a najbolji uvjeti za njeno odvijanje su pri neutralnom ili blago bazičnom pH (7,8 – 8,2). Ukoliko pH vrijednost padne ispod 6,5 koncentracija CO₂ u plinu raste, a aktivnost metanogenih mikroorganizama i koncentracija metana opada. Ukoliko je pH viši od 8 dolazi do pretvorbe NH₄⁺ u NH₃ koji inhibira metanogene mikroorganizme (Bohutskyi i Bouwer 2013). U provedenom eksperimentu pH vrijednosti prije fermentacije u kontrolnoj skupini (K) kao i u eksperimentalnim skupinama mikroalga (A) i cijanobakterija (B) bila je iznad 7, nakon fermentacije vrijednost je narasla i prešla preko 8, ali je ostala u rasponu optimalnih uvijeta za odvijanje anaerobne fermentacije.

U dinamici proizvodnje bioplina u razdoblju od 30 dana, ističe se razdoblje od prva tri dana kada količina plina intenzivno raste do vršnih vrijednosti, što ukazuje na početak procesa metanogeneze. Tijekom cijelog retencijskog razdoblja zabilježena je veća proizvodnja kod eksperimentalnih skupine A i B u odnosu na kontrolnu skupinu (K), osim u razdoblju od 17 do 19. dana kada je zabilježen blagi rast proizvodnje kontrolne skupine koji je veći u odnosu na eksperimentalne skupine.

U sastavu bioplina analiziran je udio dušika, ugljikova dioksida i metana te je utvrđena visoka koncentracija dušika na početku proizvodnje u sve tri skupine, a od 6. dana koncentracije su bile niže od 10 %. Kako se smanjivala koncentracija dušika tako je dolazilo do intenzivnog raste koncentracije metana (CH₄). Pa je tako zabilježen najviši intenzitet rasta koncentracije metana u prvih 6 dana kod eksperimentalnih skupina, dok je kod kontrolne

skupine bio u prva 4 dana. Vrijednost koncentracije metana rasla je do kraja retencijskog razdoblja, a najvišu prosječnu vrijednost imala je eksperimentalna skupina (B) (60,96 %) te nešto manje vrijednosti eksperimentalna skupina (A) (58,13 %) i kontrolna skupina (K)(60,96 %). Koncentracija ugljikovog dioksida kod sve tri skupine rasla je u prva 3 dana i nije prešla koncentraciju višu od 30 %, a nakon toga je bila u opadanju do kraja retencijskog razdoblja. Prosječna vrijednost ugljikovog dioksida bila je viša kod eksperimentalnih skupina (A: 21,62 %; B: 20,17 %) nego kod kontrolne skupine (K) (19,86 %). Dosadašnja istraživanja proizvodnje bioplina iz različitih sirovina kao npr. goveđe gnojovke (Kralik i sur. 2009), svinjske gnojovke (Majkovčan i sur. 2010), kukuruzne silaže (Kovačić i sur. 2014) pokazala su da koncentracija metana uglavnom varira između 50% i 70 % dok se količina ugljikovog dioksida kreće između 10% i 40%. Metan se može dobivati anaerobnom fermentacijom iz biomase te je primarna komponenta bioplina, također je glavni sastojak i zemnoga plina. Spada u skupinu stakleničkih plinova i zadržava veću količinu topline u atmosferi od ugljikovog dioksida. Upravo zbog tih karakteristika pokušava se pronaći način sprječavanja njegove emisije u atmosferu te njegovo korištenje u proizvodnji električne i toplinske energije (Krička i sur. 2009).

Ukupna količina proizvedenog bioplina razlikovala se između istraživanih eksperimentalnih skupina i kontrolne skupine. Najveću količinu bioplina (9365 ml/500 ml) proizvela je eksperimentalna skupina mikroalga (A), što se moglo očekivati s obzirom da je imala i najviši postotak suhe tvari te najveće smanjenje organske tvari u odnosu na ostale dvije skupine. Manje vrijednosti proizvedenog bioplina utvrđene su u eksperimentalnoj skupini cijanobakterija (B) (7705 ml/500 ml) i kontrolnoj skupini (K) (7507 ml/500 ml).

Proizvodnja bioplina preračunata prema vrijednostima suhe organske tvari (SOT) za eksperimentalnu skupinu (A) u kojoj je dominantna skupina Euglenophyta iznosi 568,64 ml/gSOT, što je više od čiste uzgojene kulture *Euglene gracilis* (485 ml/gSOT) (Mussgnug i sur. 2010.). Količina proizvodnje bioplina eksperimentalne skupine (B) u kojoj su bile cijanobakterije iznosila je 458,17 ml/gSOT. Prema preračunu na vrijednosti suhe organske tvari eksperimentalne skupine proizvele su više bioplina od kontrolne skupine (K) koja je proizvela 399,57 ml/gSOT. Vrijednost proizvodnje bioplina kukuruzne silaže koja je trenutno najvažniji supstrat u proizvodnju bioplina iznosi 653 ml/gSOT (Mussgnug i sur. 2010.).

Produkcija bioplina iz nekih kultura alga koje se najviše koriste u komercijalnoj proizvodnji iznosi 481 ml/gSOT za *Spirulina*, 335 ml/gSOT za *Chlorella kessleri* i 505 ml/gSOT za *Dunaliella salina* (Mussgnug i sur. 2010). Prema dobivenim rezultatima istraživanja vidljivo je kako eksperimentalna skupina zajednica mikroalga iz eutrofnog jezera ima veću produkciju bioplina u odnosu na navedene komercijalne vrste iz kultura alga.

Količina proizvedenog plina preračunata prema postotku organske tvari u suhoj tvari izražena u m³/t iznosi za kontrolnu grupu 399,59 m³/t, dok vrijednost za eksperimentalne uzorke mikrolaga iz eutrofnog jezera (A) iznosi 568,54 m³/t i cijanobakterija iz akvarijskog uzgoja 458,17 m³/t, dobiveni rezultati pokazuju da mikroalge i cijanobakterije mogu proizvesti veću količinu bioplina od goveđe gnojovke.

Općenito je poznato da mikroalge mogu proizvesti u zatvorenim sustavima 40 do 150 t/ha svježe biomase (Pulz i Gross, 2001.), odnosno mogu doseći tri puta veću vrijednost od maksimalne proizvodnje biomase kukuruzne silaže koja prema Kralik i sur. (2009) iznosi 40 do 51,42 t/ha. Temeljem rezultata dobivenih istraživanjem možemo izračunati da je mogućnosti za proizvodnju bioplina iz mikroalga 22833,46 m³/ha, što je 3 puta više u odnosu na proizvodnju iz kukuruzne silaže koja prema Kralik i sur. (2009) iznosi 7938,3 m³/ha.

5. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati ovog istraživanja pokazali su kako su prirodne zajednice mikroalga i cijanobakterija pogodne za proizvodnju bioplina. Količina i sastav bioplina ovisni su o kvalitativnom sastavu vrsta, te je ovo istraživanje pokazalo da je zajednica eukariotskih alga iz skupine Euglenophyta bila bolja u proizvodnji bioplina od zajednice cijanobakterija roda *Lyngbya*. U odnosu na razne biosirovine iz poljoprivredne proizvodnje, upotreba mikroalga i cijanobakterija može imati višestruke prednosti.

6. LITERATURA

Beetul, K., Sadally, S. B., Taleb-Hossenkhan, N., Bhagooli, R., Puchooa, D. (2014) An investigation of biodiesel production from microalgae found in Mauritian waters. *Biofuel Research Journal* 2: 58-64.

Bohutskyi, P., Bouwer, E. (2013) Biogas Production from Algae and Cyanobacteria Through Anaerobic Digestion: A Review, Analysis, and Research Needs. U: Lee JW (Ur.) *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer Science+Business Media, New York, USA. 873-975.

Brennan, L., Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae— a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Review* 14: 557–577.

Carr, N. G., Whitton, B. A. (1973) *The Biology of Blue-Green Algae*. Botanical Monographs Vol. 9, Blackwell Scientific Publications. str. 676

Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalga. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

Costa, J. A.V., de Morais, M. G. (2014) An Open Pond System for Microalgal Cultivation. U: Pandey, A., Lee, D. J., Chisti, Y., Soccol, C. R., *Biofuels from algae*, Elsevier, San Diego, chapter 1, 1-22.

Dębowski, M., Krzemieniewski, M., Zieliński, M. (2012) Effect of algae biomass addition on the effectiveness of methane fermentation of maize silage. U: Fourth international symposium on energy from biomass and waste, San Servolo, Venice, Italy.

Dębowski, M., Zieliński, M., Grala, A., Dudek, M. (2013) Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies—Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27: 596–604.

Dobričević, N., Pilešić, S., Krička, T., Miletić, S., Jukić, Ž. (1999) Energetski potencijali biomase iz poljoprivrede u Republici Hrvatskoj. *Krmiva* 41: 283-289.

Golueke, C. G., Oswald, W. J., Gotaas, H. B., (1957) Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiology* 5, 47–55.

Gunaseelan, N. V. (1997) Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. *Biomass Bioenergy* 13: 83–114.

Hannon, M., Gimpel, J., Tran, M., Rasala, B., Mayfield, S. (2010) Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* 1: 763–784.

Hindak, F., Cyrus, Z., Marvan, P., Javornicky, P., Komarek, J., Ettl, H., et al. (1978) *Slatkovodne riasy*. Slovenske pedagogicke nakladelstvo, Bratislava

HRN ISO 6974-4:2000 (Određivanje sastava s određenom nesigurnošću plinskom kromatografijom - 4. dio: Određivanje dušika, ugljikovog dioksida i C1 do C5 i C6+ ugljikovodika u laboratorijskom i on-line mjernom sustavu uporabom dviju kolona (ISO 6974-4:2000; EN ISO 6974-4:2001))

Huerlimann, R., de Nys, R., Heimann, K. (2010) Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology Bioengineering* 107: 245-257.

Kovačić, Đ. (2017) Razvoj procesa predobrade lignoceluloznih materijala toplinom i električnim poljem u svrhu primjene u proizvodnji bioplina anaerobnom kodigestijom s goveđom gnojovkom. Doktorski rad. Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku i Institut Ruđer Bošković, Osijek.

Kovačić, Đ., Kralik, D., Matošević, D., Jovičić, D. (2014.) Mogućnost korištenja biomase vodene leće (lemna minor) u proizvodnji bioplina. *Krmiva* 56: 57-62.

Kralik, D., Elter, A. M., Kukić, S., Uranjek, N., Spajić, R., (2009) Sudanska trava – energetska biljka za proizvodnju bioplina. *Krmiva* 51: 171-178.

Krička, T., Voća, N., Jurišić, V. (2009) *Pojmovnik bioplina: priručnik*. Grad Zagreb, Gradski ured za poljoprivredu i šumarstvo, Zagreb.

Kukić, S., Bračun, B., Kralik, D., Burns, R. T., Rupčić, S., Jovičić D. (2010) Comparison between biogas production from manure of laying hens and broilers. *Poljoprivreda* 16: 67-72.

Kushwaha, D., Upadhyay, S. N., Mishra, P. K. (2017) Growth of Cyanobacteria: Optimization for Increased Carbohydrate Content. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 184: 1247-1262.

Lončar, S. (2011) Proizvodnja bioplina iz organskog otpada pri proizvodnji rajčice u stakleničkim uvjetima. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Majkovčan, I., Kralik, D., Kukić, S., Spajić, R., Lamza, S., Jovičić D. (2010) Utjecaj suhe tvari na sastav bioplina proizvedenog iz svinjske gnojovke. *Krmiva* 52: 15-20.

Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Review* 14: 217–232.

McKendry, P. (2002) Energy production from biomass (Part2): Conversion technologies. *Bioresource Technology* 83:47–54.

Mihaljević, M., Stević, F., Špoljarić, D., Žuna Pfeiffer, T. (2015) Spatial pattern of phytoplankton based on the morphology-based functional approach along a river-floodplain gradient. *River Research and Applications* 31: 228-238.

Mussnug, J. H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. (2010) Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology* 150: 51-56.

Muthu, S. S. (2016) *The Carbon Footprint Handbook*, Taylor & Francis Group, LLC

Nakano, Y., Urade, Y., Urade, R., Kitaoka, S., (1987) Isolation, purification and characterization of the pellicle of *Euglena gracilis* z. *Journal of Biochemistry* 102: 1053–1063.

Nozzi, N. E., Oliver, J. W. K., Atsumi, S. (2013) Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 1: 7.

Panjičko, M. (2015) Razvoj procesa proizvodnje bioplina anaerobnom digestijom pivske komine kao monosupstrat. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D. (2011) Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology* 102:10163–72.
- Potočnik, V., Lay, V. (2002) *Obnovljivi izvori energije i zaštita okoliša u Hrvatskoj*; Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja Republike Hrvatske, Zagreb
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Le Gouic, B., Couzinet-Mossion, A., Legrand, J. (2011) Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresource Technology* 102: 150–158.
- Pulz O., Gross W. (2001) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 287-293.
- Pulz, O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 287-293.
- Reynolds, C. S. (2006) *The Ecology of Phytoplankton*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Rezić, T., Filipović, J., Šantek, B. (2014) Mikroalge – potencijalni izvor lipida za proizvodnju biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 9: 26-36.
- Rittmann, B.E., (2008) Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering* 100: 203–212.
- Rodolfi, L., Zittelli G. C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., et al. (2009) Mikroalgea for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 100-112.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 262-280.
- Scott, A. S., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., Smith, A. G. (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 277-286.

- Selvan, B. K., Revathi, M., Piriya, P. S., Vasana, P. T., Prabhu, I. G., Vennison, J. (2013) Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors. *Indian Journal of Experimental Biology* 51: 262-268.
- Sharathchandra, K., Rajashekhar, M. (2011) Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *J. Algal Biomass Utilization* 2: 83– 97.
- Stević, F., Mihaljević, M. (2011) Cyanobacterial blooms in a temperate river-floodplain ecosystem: the importance of hydrological extremes. *Aquatic Ecology* 45: 335-349.
- Thajuddin, N., Subramanian, G. (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 89: 11.
- Tredici, M. R., Zittelli, G. C. (1998) Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* 5:187–97.
- Utermöhl, H. (1958) Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton – Methodik. *Mitteilungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie* 9:1-38.
- Wiley, P. E., Campbell, J. E.,McKuin, B. (2011) Production of biodiesel and biogas from algae: a review of process train options. *Water Environment Research* 83: 326–38.
- Wilkie, A. C., Edmundson, S. J., Duncan, J. G. (2011) Indigenous algae for local bioresource production: Phycoprospecting. *Energy for Sustainable Development* 15: 365-371.
- Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J., Verstraete, W. (2010) The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology* 102: 1149–1158.
- Zhong, W., Zhang, Z., Lou, Y., Qiao, W., Xiao, M., Zhang, M. (2012) Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straws as an external carbon source. *Bioresource Technology* 114: 281-286.
- Zittelli, G. C., Rodolfi, L., Bassi, N., Biondi, N., Tredici, M. R. (2013) Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production. *Algae for Biofuels and Energy* 285- 115.

Zorko, A. (2011) Proizvodnja bioplina iz pšenične silaže. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Web izvori:

Web 1. Fond za Zaštitu Okoliša i Energetsku Učinkovitost- FZOEU

http://www.fzoeu.hr/hr/energetska_ucinkovitost/obnovljivi_izvori_energije/ (5.6.2018.)

Web 2. ClimateTechWiki

<http://www.climatechwiki.org/technology/co2-mitigation-micro-algae> (7.6.2018.)

Web 3. Hrvatska Poljoprivredna- Šumarska Savjetodavna Služba

<https://www.savjetodavna.hr/savjeti/13/223/proizvodnja-silazne-mase-citave-stabljike-kukuruza/> (15.6.2018.)