

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Ana JARC

**VPLIV GLIVNE RAZGRADNJE PIŠČANČJEGA
GNOJA NA RAST BAKTERIJ IN PRODUKCIJO
BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Ana JARC

**VPLIV GLIVNE RAZGRADNJE PIŠČANČJEGA GNOJA NA RAST
BAKTERIJ IN PRODUKCIJO BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF FUNGAL PRETREATED CHICKEN MANURE ON
BACTERIAL GROWTH AND BIOGAS PRODUCTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za lesarstvo, Katedri za patologijo in zaščito lesa.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo študij je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Franca POHLEVNA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: Član: prof. dr. Franc POHLEVEN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Član: prof. dr. Rajko BERNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana JARC

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 582.28:602.4:606:628.385(043.2)
KG	lignin/glive bele trohnobe/anaerobna digestija/bioplín/piščančji gnoj/ <i>Fallaopía japonica</i> /biomasa
AV	JARC Ana
SA	POHLEVEN, Franc (mentor)
KZ	SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2016
IN	VPLIV GLIVNE RAZGRADNJE PIŠČANČJEGA GNOJA NA RAST BAKTERIJ IN PRODUKCIJO BIOPLINA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 48 str., 4 pregl., 17 sl., 49 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cilj do leta 2020 je zmanjšanje emisij za 20 %. Eden od možnih ukrepov je zamenjava fosilnih goriv z obnovljivimi viri energije. Biomasa predstavlja bogat vir organsko vezane snovi, ki tvori malo toplogrednih plinov. Učinkovito jo lahko izrabljamo v procesih anaerobne digestije, kjer se razgradi s pomočjo anaerobnih bakterij, na bioplín in presnovljeni digestat. Razgradnjo biomase lahko zavira njena kemična struktura, ki je zgrajena iz lignin, celuloze in hemiceluloze. Največ težav povzroča lignin, ki obdaja celulozo ter jo tako varuje pred bakterijsko razgradnjo. Celuloza predstavlja za anaerobne bakterije vir ogljika iz katerega v procesu digestije nastane metan. Da postane organska snov dostopna tudi bakterijam jo je potrebno predhodno obdelati. V diplomskem delu smo uporabili v ta namen edine organizme, ki so sposobni deliginifikacije lignin. To so lesne glive, med katerimi še posebaj izstopajo glive bele trohnobe. Za vhodni substrat smo uporabili piščančji gnoj, ki vsebuje tudi lesne oblance in žagovino. Ti zaradi svoje sestave zavirajo anaerobno digestijo. Piščančjemu gnuju smo dodali še ustrezno razmerje japonskega dresnika (<i>Fallopia japonica</i>), da smo zagotovili optimalno C/N razmerje tako za glivno preraščanje, kot tudi za nadaljno anaerobno razgradnjo. Pripravljeno mešanico smo cepili z bukovim ostrigarjem (<i>Pleurotus ostreatus</i>) in pisano ploskocevko (<i>Trametes versicolor</i>). Po končanem preraščanju, katerega čas smo določili, smo preraslim mešanicam dodali gnojevko bogato z anaerobnimi bakterijami. Pripravljene vzorce smo izpostavili anaerobnim razmeram ter spremljali nastanek bioplina. Ugotovili smo, da glivna predobdelava substratov vpliva na produkcijo bioplina. Tudi različen čas preraščanja vpliva na nastanek bioplina. Največ bioplina je nastalo pri bukovemu ostrigarju, ki je substrat preraščal 21 dni, ter pri pisani ploskocevki, ki je razkrajala substrat 14 dni.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 582.28:602.4:606:628.385(043.2)
DX lignin/white rot fungus/anaerobic digestion/biogas/chicken manure/*Fallaopia japonica*/biomass
AU JARC, Ana
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)
PB SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2016
TI IMPACT OF FUNGAL PRETREATED CHICKEN MANURE ON
BACTERIAL GROWTH AND BIOGAS PRODUCTION
DT Graduation thesis (University studies)
NO XII, 48 p., 4 tab., 17 fig., 49 ref.
LA sl
AL sl/en
AB WHO's aim is for emissions to be lower by 20 % by 2020. One possible action to achieve this is to replace fossil fuels with renewable energy sources. Biomass represents a rich source of organic bound substance that forms small amounts of greenhouse gases. Biomass can be effectively exploited in the process of anaerobic digestion, where it is decomposed by anaerobic bacteria, biogas and metabolised digestate. Decomposition of biomass can be inhibited by its chemical structure, which is built from lignin, cellulose and hemicellulose. Most problems are caused by lignin, which surrounds the cellose and in this way protects it against bacterial decomposition. For the anaerobic bacteria cellulose represents a source of carbon which in the process of digestion forms methane. For the organic matter to become available to the bacteria pretreatment is necessary. In this thesis, for this purpose we only used microorganisms that are capable of delignification of lignin. These are wood-decay fungi, among which especially white-rot fungi are prominent. For feedstock we used chicken manure that also contained wood chips and sawdust, which due to its composition inhibit anaerobic digestion. An appropriate ratio of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) was added to the chicken manure to ensure optimal C / N ratio for both fungus overgrowth as well as for further anaerobic digestion. The prepared mixture was then inoculated with oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) and turkey tail mushroom (*Trametes versicolor*). After the completion of overgrowth, with a set time, we added manure rich in anaerobic bacteria to the substrate. The prepared samples were subjected to anaerobic conditions and monitored for the formation of biogas. We have found that fungal pretreatment of substrates affects the production of biogas. Different times of outgrowth also has an influence on the formation of biogas. The most biogas was generated by the oyster mushroom, from which the substrate was overgrown in 21 days, and the tail mushroom that disintegrated the substrate in 14 days.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 BIOMASA	4
2.1.1 Lignocelulozna biomasa	4
2.1.1.1 Celuloza.....	5
2.1.1.2 Hemiceluloza.....	5
2.1.1.3 Lignin	6
2.1.2 Piščančji gnoj	6
2.1.3 Hitro rastoče rastline	7
2.1.3.1 Japonski dresnik	8
2.2 PREDOBDELAVA LIGNOCELULOZNE BIOMASE	9
2.2.1 Ragradnja celuloze	11
2.2.2 Razgradnja hemiceluloze	11
2.2.3 Razgradnja lignina	12
2.2.4 Glive bele trohnobe	12
2.2.4.1 Bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	13
2.2.4.2 Pisana ploskocevka (<i>Trametes versicolor</i>).....	14
2.3 ANAEROBNA DIGESTIJA	15
2.3.1 Proces anaerobne digestije.....	16
2.3.1.1 Hidroliza.....	17
2.3.1.2 Acidogeneza	18
2.3.1.3 Acetogeneza	18
2.3.1.4 Metanogeneza.....	19
2.3.2 Vpliv dejavnikov na anaerobno digestijo	19

2.3.2.1	Temperatura	19
2.3.2.2	Vrednost pH	20
2.3.2.3	Inhibitorne snovi	20
2.3.2.4	Mešanje	21
2.3.2.5	C/N razmerje	22
2.3.3	Produkti anaerobne digestije.....	22
3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	MATERIALI.....	24
3.1.1	Laboratorijska oprema	24
3.1.2	Vhodni substrati	25
3.1.2.1	Japonski dresnik (<i>Fallopia japonica</i>).....	25
3.1.2.2	Piščančji gnoj (PG).....	25
3.1.2.3	Vrste gliv	25
3.1.2.4	Inokulum	25
3.2	METODE.....	25
3.2.1	Priprava substrata	25
3.2.2	Meritev vlažnosti.....	25
3.2.3	Priprava mešanice	27
3.2.4	Vlaženje mešanice	28
3.2.5	Polnjenje kozarcev.....	28
3.2.6	Avtoklaviranje	28
3.2.7	Inokulacija in inkubacija	28
3.2.8	Priprava anaerobne digestije.....	28
3.2.9	Odčitavanje rezultatov	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	PRODUKCIJA BIOPLINA	31
4.1.1	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 7 dni preraščenega substrata z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
4.1.2	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 14 dni preraščenega substrata z glivo <i>Pleurotus osteratus</i>	32
4.1.3	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 21 dni preraščenega substrata z glivo <i>Pleurotus osteratus</i>	33
4.1.4	Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenimi substrati z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (7, 14 in 21 dni)	34

4.1.5	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 7 dni preraščenega substrata z glivo <i>Trametes versicolor</i>	35
4.1.6	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 14 dni preraščenega substrata z glivo <i>Trametes versicolor</i>	36
4.1.7	Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 21 dni preraščenega substrata z glivo <i>Trametes versicolor</i>	37
4.1.8	Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenimi substrati z glivo <i>Trametes versicolor</i> (7, 14 in 21 dni)	38
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	39
5.1	RAZPRAVA	39
5.2	SKLEPI	42
6	POVZETEK	43
7	VIRI	44
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Japonski dresnik (foto: Pohleven F.).	8
Slika 2: Predobdelava lignoceluloznega materiala (Antognoni, 2013).	10
Slika 3: V gostem šopu razraščen bukov ostrigar (foto: Pohleven F.).	14
Slika 4: Barviti klobučki pisane ploskocevke (foto: Pohleven F.).	15
Slika 5: Potek anaerobne digestije (Serna, 2009).	17
Slika 6: Plastična cev z nepovratnim ventilom, ki vodi v bireto (foto: Jarc A., 2010).	29
Slika 7: Laboratorijska aparatura za pridobivanje bioplina (foto: Jarc A., 2010).	30
Slika 8: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 7 dni z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	31
Slika 9: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 14 dni z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	32
Slika 10: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 21 dni z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	33
Slika 11: Primerjava količin dnevno nastalega boplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenim substratom z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (7, 14 in 21 dni), kot tudi primerjava različno preraščenih vzorcev.	34
Slika 12: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 7 dni z glivo <i>Trametes versicolor</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	35
Slika 13: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 14 dni z glivo <i>Trametes versicolor</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	36
Slika 14: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 21 dni z glivo <i>Trametes versicolor</i> , kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.	37

Slika 15: Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenim substratom z glivo *Trametes versicolor* (7, 14 in 21 dni), kot tudi primerjava različno preraščenih vzorcev. 38

Slika 16: Primerjava skupnih volumnov nastalega bioplina po 14. dnev ob uporabi različno preraščenega substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) z glivo *Pleurotus ostreatus* ter volumnov DPG brez preraščanja in inokulumov. 40

Slika 17: Primerjava skupnih volumnov nastalega bioplina po 14. dnev ob uporabi različno preraščenega substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) z glivo *trametes versicolor* ter volumnov DPG brez preraščanja in inokulumov. 41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Masni delež vode japonskega dresnika	26
Preglednica 2: Masni delež vode piščančjega gnoja	26
Preglednica 3: Masni delež vode v mešanici piščančjega gnoja in japonskega dresnika....	26
Preglednica 4: Povprečni masni deleži vode v japonskemu dresniku, piščančjem gnoju in v mešanici obeh skupaj	26

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AD	anaerobna digestija
PG	piščančji gnoj
GBT	glove bele trohnobe
<i>Plo5</i>	bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>)
<i>Tv6</i>	pisana ploskocevka (<i>Trametes versicolor</i>)
m (PG)	teoretična masa PG za pripravo mešanice
W (PG)	vlažnost PG
X (PG)	dejanska masa PG za pripravo mešanice
m (D)	teoretična masa trstikovca za pripravo mešanice
W (D)	vlažnost trstikovca
X (D)	dejanska masa trstikovca za pripravo mešanice
HRR	hitro rastoče rastline
C/N	razmerje med ogljikom in dušikom
CBH	ekso-1,4-glukanaze
ED	endo-1,4- β -glikanaze
SS	suha snov
LB	lignocelulozna biomasa
MnP	mangan peroksidaza
LiP	lignin peroksidaza
W _(H₂O)	masni delež vode (%)
DPG	mešanica japonskega dresnika in piščančjega gnoja
DPG+Plo	preraščena mešanica z bukovim ostrigarjem
DPG+Tv	preraščena mešanica s pisano ploskocevkjo

1 UVOD

Za prihodnost človeštva predstavlja velik okoljevarstveni problem globalno segrevanje in izčrpavanje fosilnih goriv. Z njihovim izgorevanjem pridobivamo energijo, ki jo potrebujemo in uporabljamo v vsakodnevnu življenju. Posledica izgorevanja energetov je, da na ta način v naše okolje izpustimo tudi škodljive snovi oziroma toplogredne pline kot so ogljikov dioksid, ogljikov monoksid, dušikove in žveplove okside, metan ter prašne delce. Ti v prekomerni količini povzročajo segrevanje ozračja ter posledično podnebne spremembe.

Sveženj ukrepov za zmanjšanje globalnega segrevanja so voditelji držav EU sprejeli decembra 2008. Tako naj bi do leta 2020 zmanjšali izpust toplogrednih plinov za 20 %. To bi lahko dosegli z zmanjšano porabo energije ter z uporabo obnovljivih virov energije (sončna, veterna, vodna, biomasa) (Makovšek, 2010).

Fosilna goriva (nafta, premog in zemeljski plin) so nastala iz ostankov odmrlih, nekdaj živečih, organizmov, ki so se milijone let nalagali v zemeljski skorji, kjer so pod vplivom visoke temperature in pritiska spremenili svojo kemično sestavo (Makovšek, 2010). Ker se njihove stare zaloge porabljam hitreje kot pa nastajajo nove, niso obnovljivi vir energije (Al Seadi in sod., 2010).

Kot obnovljiv vir energije, ki bi lahko nadomestil fosilna goriva, uporabimo tudi biomaso. Predelamo jo v napravah za pridobivanje bioplina. Biomasa se v procesu anaerobne digestije (AD), ki poteka v odsotnosti kisika in s pomočjo anaerobnih mikroorganizmov, razgradi do bioplina ter digestata oziroma presnovljenega substrata.

Plini, ki nastanejo s tem procesom, so kljub temu nevarni za okolico, saj vsebujejo toplogredne pline (Jejčič in sod., 2010). Vendar pa je razlika v tem, da se v procesu AD metan ne izloča v okolico, ampak se v bioplinski napravi pretvori v toplotno in električno energijo. Ogljikov dioksid, ki nastane po procesu AD, pa je bil v naši biomasi vezan iz atmosfere, zaradi česar se z izpustom ne poveča količina tega plina v ozračju. Le ta je spet dostopen rastlini (Al Seadi in sod., 2010).

Eden od učinkovitejših načinov pridobivanja bioplina je ko-digestija, s katero mešamo živilski gnoj z rastlinsko biomaso (energetske rastline, kmetijski rastlinski ostank...). Na ta način lahko v živilsko-predelovalnih obratih rešimo okoljski problem z odvečnimi odpadki ter preprečimo dodatne izpuste emisij. Poleg tega pa z izbrano mešanicó vhodnega substrata zagotovimo ustrezno razmerje med ogljikom in dušikom (C/N), ki je pomembno za proizvodnjo bioplina.

Rastlinska biomasa lahko vsebuje lignocelulozni material, katerih glavni gradniki so celuloza, hemiceluloza in lignin. Slednji obdaja celulozo ter jo tako varuje pred mikrobnou razgradnjo. Zato je za bakterije tak material težko razgradljiv, saj te nimajo ustreznih encimov za degradacijo lignina, kar posledično vpliva tudi na produkcijo bioplina.

Da bi bil izkoristek biomase za bakterije, čim boljši in donos metana čim večji, lignocelulozni material izpostavimo predobdelavi. Obstaja več načinov predobdelave: kemična, fizikalna, biološka ter kombinirana. Biološki način predobdelave je razgradnja lignina z glivami bele trohnobe, ki s svojimi ekstracelularnimi lignolitičnimi encimi depolimerizirajo ligninske molekule. Tako imajo metanogene bakterije za nadaljnjo razgradnjo več razpoložljivega substrata.

Perutnina Ptuj d.o.o. ima svojo bioplinsarno v Dražencih, s katero želijo zmanjšati količino odpadkov, ki nastanejo v obratu pri priteki piščancev. Odpadno snov v procesu AD pretvorijo v bioplín oziroma energijo in toplovo.

Pretežni del substrata, ki ga uporabljam, je piščančji gnoj, ki vsebuje tudi lesne oblance in žagovino (Kalan, 2010). Lesni oblanci in žagovina zaradi svoje kemične zgradbe delujeta zavirajoče na bakterije. S tem pa se zmanjša možnost okužb, kar je pri vzreji piščancev zelo pomembno. Po drugi strani pa predstavlja problem pri produkciji bioplina, saj ju bakterije v anaerobnih pogojih ne morejo razgraditi. Posledica tega je slabši doprinos bioplina, prav tako pa se jim ne zmanjša količina odpadne snovi.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen diplomskega dela je ugotoviti, ali lahko vplivamo na doprinos bioplina, če vhodni substrat predhodno izpostavimo delovanju gliv bele trohnobe.

Naš vhodni substrat je sestavljen iz mešanice piščančjega gnoja in japonskega dresnika (*Fallopia japonica*), ki je energetsko bogata hitrorastoča rastlina. Pripravljen substrat smo izpostavili predobdelavi z glivama bele trohnobe, bukovemu ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*) in pisani ploskocevkami (*Trametes versicolor*). Ta proces razgradnje je potekal v aerobnih razmerah.

Po določenem času preraščanja, smo z gobo preraščenemu in delno razgrajenemu substratu dodali inokulum ter vse skupaj izpostavili anaerobnim razmeram in ugotavljali količino sproščenega bioplina.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Zastavili smo si naslednje hipoteze:

- predobdelava substrata glivam bele trohnobe poveča količino nastalega bioplina
- bukov ostrigar in pisana ploskocevka različno vplivata na količino bioplina
- različni čas preraščanja substrata vpliva na količino nastalega bioplina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOMASA

Biomasa je surovina organskega izvora, ki jo lahko uporabimo pri proizvodnji bioplina (Al Seadi in sod., 2010). Predstavlja energetski material, ki je spremelnjiv v električno, toplotno ali mehansko energijo, ki je neodvisna od časa dneva ali letnega časa (Bernik in Zver, 2006). Izhaja lahko iz organskih odpadkov iz kmetijstva (živilski gnoj, gnojevke, ostankov pridelkov, organskih odpadkov iz mlekarn), prehrambene in kmetijske industrije (odpadki rastlinskega in živalskega izvora), organski del komunalno trdnih odpadkov rastlinskega in živalskega izvora, organskih odpadkov iz gospodinjstev in gostinstva, energetske rastline (koruza, sirek, trstikovec,...), odpadke čistilnih naprav (gošča iz odpadnih vod) (Al Seadi in sod., 2010).

2.1.1 Lignocelulozna biomasa

Glavna komponenta biomase je lignoceluloza, ki zajema okoli polovico vse rastlinske mase, proizvedene s pomočjo fotosinteze in predstavlja najbogatejši vir obnovljivih organskih snovi v tleh (Sanchez, 2009).

Lignocelulozna biomasa (LB) predstavlja obnovljiv vir energije. Sestava biomase je bogata z organskimi snovmi in tvori malo toplogrednih plinov. Večina rastlinskega materiala vsebuje približno 90 % suhe snovi, ki je shranjena v obliki celuloze, hemiceluloze, ligninin in pektina. Poleg teh snovi vsebuje rastlinska biomasa v manjših količinah še proteine, ekstraktive (topne enostavne snovi, kot so enostavni sladkorji, dušikove snovi, klorofil in voski) ter pepel. Sestava teh snovi variira od ene rastlinske vrste do druge. Tako na primer lesnate rastline vsebujejo večje količine celuloze, medtem ko slama pšenice in listi vsebujejo več hemiceluloze. Razlike se kažejo tudi znatno posameznih rastlin, glede na njihovo starost, razvojno fazo, itd. (Kumar in sod., 2009).

Hemiceluloze, beljakovine, protopektini in manjče količine glukoze so gradniki primarne celične stene. Od tega je 90 % polisaharidov (od tega 20 do 30 % celuloze, ostalo so necelulozni polisaharidi) ter 10 % beljakovin. Za razliko od primarne celične stene, pa sekundarno sestavljajo hemiceluloze, večje količine celuloze (80 %) ter lignin, ki je v primerjavi z nitastimi celuloznimi molekulami mrežasto prepleten (Sinkovič, 2000).

V kmetijstvu in gozdarstvu se celulozo, hemicelulozo in lignin, kot stranske produkte le malokrat uporablja in se jih obravnava kot odpad. Veliko organizmov je sposobnih razgraditi in uporabiti celulozo in hemicelulozo kot vir ogljika in energije. Večji problem predstavlja lignin, ki ga lahko razgradi le manjša skupina nitastih gliv (Sanchez, 2009).

2.1.1.1 Celuloza

Celuloza ima v rastlinski celični steni oporno vlogo in predstavlja do 45 % suhe snovi v lesu. Celuloza je homogen polimer, sestavljen iz D-glukoznih enot, ki so med seboj povezane z β -1,4 glikozidnimi vezmi. Skupaj tvorijo celobiozne molekule, ki predstavlja celulozno verigo. Ti dolgo verižni polimer se povezuje, skupaj z vodikovimi vezmi in van der Waalsovimi vezmi, v celulozna vlakna ali elementarne fibrile. 15-20 fibrilov je združenih v mikrofibrile. Vmesne prostore mikrofibrilov zapolnila hemiceluloza in lignin. Mikrofibrile se združujejo v celulozna vlakna (Sinkovič, 2000; Perez in sod., 2002).

Kemično je celuloza precej neobčutljiva in z večino razredčenih kislin in baz ne reagira. Z encimi, ki jih izločajo bakterije in saprofitske glive, rastlinojedci in prežvekovalci razgrajujejo celulozo. Razgradnja celuloze do glukoze poteka postopoma z encimi celulaz (Sinkovič, 2000).

Celuloza se pojavlja v kristalni obliki in jo tako imenujemo kristalna celuloza. Poleg nje pa je prisoten še majhen procent manj urejenih celuloznih verig (molekul), ki tvorijo amofrno celulozo. Ta oblika je bolj dovetna za encimsko razgradnjo (Perez in sod., 2002).

2.1.1.2 Hemiceluloza

Je kompleksni heteropolimer ogljikovih hidratov, ki predstavlja od 25 % do 30 % suhe snovi v lesu. Hemiceluloza je polisaharid, ki ima v primerjavi s celulozo, nižjo molekulsko maso. Sladkorji so med seboj povezani z β -1,4 glikozidno vezjo, včasih tudi z β -1,3 glikozidno vezjo (Perez in sod., 2002). V nasprotju s celulozo, ki je homogen polimer glukoze, so makromolekule hemiceluloze velikokrat polimeri pentoz (ksiloze in arabinoze), heksoz (največkrat manoze) ter polimeri večjega števila sladkornih kislin (galakturonska in glukaronska kislina) (Howard in sod., 2003). Tako lahko rečemo, da je hemiceluloza sestavljena iz polisaharidnega dela in poliuronoidnega dela. Slednji je zgrajen iz uronskih kislin, ki so precej odporne na mikrobnou razgradnjo (Leštan, 2001). Naloga hemiceluloze je, da križno povezuje med seboj celulozna mikrovlakna ter molekule celuloze z ligninom (Kumar in sod., 2008; Belšak Šel, 2015).

Glavna veriga hemiceluloze je lahko sestavljena iz ene vrste sladkorjev in takšne polimere imenujemo homopolimer. Heteropolimeri pa so sestavljeni iz dveh ali več vrst sladkorja. Primer holopolimerov je ksilan zgrajen iz zaporedno povezanih ksiloznih enot. Glukomanani pa so primer heteropolimerov, ki so zgrajeni iz glukoze in manoze (Tišler in Pavlič, 2000).

Glavna razlika med celulozo in hemicelulozo je ta, da ima slednja kratke stranske verige z različnimi sladkorji, kar povzroča veliko lažjo hidrolizacijo v monomerne molekule (Perez in sod., 2002).

2.1.1.3 Lignin

Lignin je skupaj s celulozo eden bolj bogatih polimerov v naravi. V izgradnji sekundarne celične stene se lignin vlaga v njen celulozni skelet. Ta proces imenujemo lignifikacija ali olesenitev. Lignin poveča trdnost celične stene, jo naredi nepropustno, jo varuje pred napadi herbivorov ter jo ščiti pred oksidativnim stresom. Ob sočasni prisotnosti celuloze v sekundarni celični steni naredi celico čvrsto na poteg. Velika koncentracija lignina se nahaja tudi v srednji lameli, med celuloznimi vlakni (Sinkovič, 2000; Martinez in sod., 2005; Sanchez, 2009).

Strukturno je lignin amorfni heteroplermer, netopen v vodi ter optično neaktivni. Sestavljen je iz fenilpropanskih enot, ki so med seboj povezane z različnimi nehidrogenacijskimi etrskimi vezmi. Sinteza polimera poteka s povezovanjem treh prostih radikalov, ki se sproščajo v peroksidazno posredovano dehidrogenacijo treh fenil propanskih alkoholov. Ti so koniferil (gvajacil propanol), sinapil (siringilni propanol) in kumaril (hidroksilfenil propanol) alkohol, ki prestavljajo glavne gradbene enote lignina. Iglavci in listavci se razlikujejo glede na razmerje teh treh alkoholov oziroma gvajacilnih, siringilnih in hidroksifenilnih enot. Glavna komponenta iglavcev je gvajacil alkohol (gvajacilni lignin) medtem ko sta prevladujoča gradnika pri listavcih gvajacil in siringil alkohol (gvajacilni-siringilni lignin). Razlike v sestavi lignina so tudi znotraj različnih lesnih tkiv in znotraj celične stene. Naprimer v srednji lameli ima lignin nižje razmerje gvajacil/siringil kot lignin v sekundarni celični steni (Humar in Tišler, 1999; Perez in sod., 2002; Martinez in sod., 2005; Kumar in sod., 2009). Skupaj s hemicelulozo tvori lignin amorfni matriks, v katerega so vgrajena celulozna vlakna, ki so tako zaščitena pred biološko in kemično razgradnjo (Martinez in sod., 2005).

2.1.2 Piščančji gnoj

Piščančji gnoj (PG) se tradicionalno uporablja kot gnojilo, prav tako pa služi za proizvodnjo bioplina. Zaradi sestave PG je dopirnos bioplina dvakrat večji kot tisti iz govejege gnoja. Po vsebnosti dušika (N) je trikrat do štirikrat močnejši od govejega, po vsebnosti fosforja (P_2O_5) petkrat do desetkrat ter po vsebnosti kalija (K_2O) dva do trikrat. Ravno zaradi visokih vsebnosti fosforja, lahko pride do izpiranja le tega v podtalnico, saj ga perutninski gnoj vsebuje veliko več, kot pa ga rastlina potrebuje za rast in razvoj. Še večji problem pa predstavljajo dušikove spojine. PG vsebuje visoke koncentracije organsko veznega dušika, zaradi prisotnosti beljakovin in aminokislin. Glede na okoljske razmere, se velik delež organsko vezanega dušika, tekom leta spremeni v amoniak. Ta je lahko v neionski (plinski) obliki (NH_3), ki izhlapeva v atmosfero ali v ionski obliki (NH_4^+), ki je topna v vodi. Slednja se lahko s pomočjo mikroorganizmov pretvori v nitrat (NO_3^-), ki se izpira v podtalnico in jo onesnažuje (Kelleher in sod., 2001; Kalan, 2010).

Na leto se pridela ogromne količine perutninskega gnoja, kar povzroča težave z njegovo odstranitvijo. Tako se pojavijo estetski problemi, kot tudi možna razlitja, onesnaženost površinskih voda, kontaminiranje podtalnice, razvoj živalskih patogenov, neprijeten vonj in pojav virusov. Za reševanje teh težav se še razvijajo alternativne možnosti, kot so kompostiranje, direktno izgorevanje, fermentacija itd. (Kalan, 2010).

Glede na to, kje in zakaj bomo uporabili PG, je potrebno upoštevati različne parametre, kot so: sestava gnoja glede na način perutninske priteje, vrsta perutnine, starost gnoja in zunanja temperatura. PG z nastilom ima več organske snovi, se pravi ligninoceluloze, kot čisti kokošji gnoj izpod baterij. Vrednost organske snovi je tudi različna glede na sestavo nastilja (slama, žaganje, lesni oblanci...). Skupaj z nastiljem vsebuje piščančji gnoj v večji meri vodo in ogljik (C), manjše količine dušika (N), fosforja (P) in kalija (K) ter v sledovih klor (Cl), kalcij (Ca), magnezi (Mg), natrij (Na), mangan (Mn), železo (Fe), baker (Cu), cink (Zn) in arzen (As) (Kelleher in sod., 2001; Kalan, 2010).

2.1.3 Hitro rastoče rastline

Energetsko bogate so tiste rastline, ki so hitro rastoče in v kratkem času absorbirajo velike količine CO₂ (Pohleven, 2013). Sem štejemo predvsem C4 rastline, saj so zaradi kopiranje sončne energije in pri proizvodnji biomase najbolj učinkovite (Kalan, 2010). Njihova prednost pred C3 rastlinami je, da ima fosfoenolpiruvat karboksilaza veliko afiniteto za CO₂ in je kisik ne inhibira. Imajo tudi nizko kompenzacijsko točko fotosinteze za CO₂ in tudi netofotosinteza ni zasičena pri polni svetlobi (Sinkovič, 2000).

Al Seaid in sodelavci (2010) definirajo energetske rastline kot namensko gojene rastline, katerih pridelke se uporablja kot surovino za proizvodnjo energije. Pridelki so lahko rastlinski (trava, koruza, trstikovec, repica, itd.) ali lesni (vrba, topol, hrast). Lesne pridelke pa je potrebno, zaradi vsebnosti lignina, predhodno obdelati saj tako povečamo zmožnost za njihovo učinkovitejšo anaerobno razgradnjo.

Za pridelavo bioplina mora biti energijski vnos hitro rastočih rastlin (HRR) manjši od končnega pridelka biomase. Izpolnjevati morajo naslednje razmere: visok masni pridelek - kg/ha izbrane rastline, majhni stroški gojenja, gnojenja in zaščite rastlin (pesticidi, herbicidi) ter optimalni način spravila in transporta (Bernik in Zver, 2006; Kalan, 2010).

HRR so lahko gojene (uporabne lahko tudi v prehrani ljudi) in negojene. Pri gojenih HRR se porabi več energije za pridelavo in transport (na primer pri oljni repici za to porabimo od 30 do 50 % energije) (Koprivnikar, 2010). Na omejenih kmetijskih površinah se tudi pojavi "tekmovanje" energetskih rastlin z rastlinami namenjenimi prehrani ljudi. Zaradi povečanega povpraševanja po biogorivu, se zviša tudi njegova cena in na koncu se kmetovalcu bolj izplača gojiti rastline v te namene. To pa pripelje do dviga cen hrane, saj

se zaradi zmanjšanja obdelovalnih površin, namenjenim gojenju hrane za ljudi in živali, zmanjša tudi količina pridelka (Marolt, 2013). Problem HRR je, da so velikokrat invazivne zaradi svoje visoke produktivnosti, pri čemer je potrebno paziti, da se ne poruši biodiverziteta (Kalan, 2010).

2.1.3.1 Japonski dresnik

Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) velja za močno invazivno rastlino Severne Amerike in Evrope. Spada med 100 najbolj invazivnih rastlin sveta. Prvič so japonski dresnik zanesli v Evropo leta 1823, 1092 pa je bila ta vrsta prvič zabeležena v naravi. Nizozemci so ga v 20. letih 19. stoletja uvozili iz Japonske. Uporabljali so ga kot okrasno rastlino v vrtovih in parkih, med drugim tudi kot krmno oziroma medonosno rastlino. Prav tako so ga sadili za utrjevanje brežin in za preprečevanje erozije. Pri nas se prvič omenja leta 1908 ob Savinji pri Celju. Dandanes pa je, z izjemo submediteranskega fitogeografskega območja, razraščen po vsej Sloveniji, zlasti na mestih ob Dravi, Savi, Savinji, Muri in drugih rekah in potokih (Frajman, 2008).

Sodi v družino dresnovk (*Polygonaceae*), za katere je značilno kolenčasto členjeno steblo, ki je votlo, pogosto rdečkasto lisasto. Iz kolenc izraščajo celorobi, široko jajčasti listi, s prisekanim dnom in naglo zožanim vrhom. Listi so premenjalno nameščeni. Iz podzemnih delov vsako vegetacijsko sezono zrastejo dva do tri metre visoki grmi (grmičasta razrast) (slika 1). Pozimi nadzemni deli odmrejo, prezimijo le dolge podzemne razrasle korenike. Japonski dresnik cveti pozno jeseni, pri nas pa konec julija. Cveti z drobnimi belkastimi do zelenkastimi enospolnimi cvetovi, ki so združeni v pokončna latasta socvetja. Plod je črno obarvan trikotni orešek (Frajman, 2008).



Slika 1: Japonski dresnik (foto: Pohleven F.).

Uspešno se razmnožuje vegetativno, saj se stebelni členki zlahka zakoreninijo. Iz koščkov korenike lahko poženejo mlade rastlinice. K njegovem širjenju prispeva tudi spolno razmnoževanje s semenom, a le če sta prisotni tako ženska kot moška rastlina. Pomembno vlogo pri širjenju imata tudi človek ter vodni tokovi rek in potokov (Frajman, 2008).

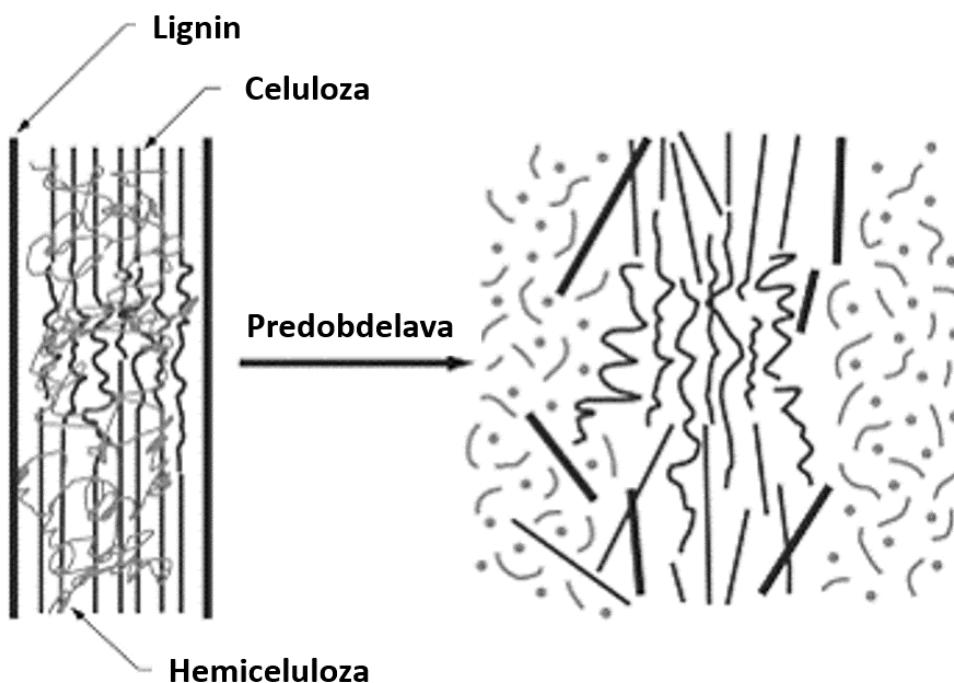
Japonski dresnik uporabljajo v tradicionalni kitajski in japonski medicini. Zaradi njegove hitre rasti pa naj bi bil primeren tudi kot obnavljiv vir energije (Frajman, 2008; Pačnik, 2016).

Pačnikova (2016) tudi navaja, da so zaradi njegove hitre rasti, znanstveniki v Veliki Britaniji, ocenili kot enega najbolj produktivnih rastlin, saj dosega donose tudi od 23 do 37 t suhe mase/ha na leto. V svoji raziskavi sta Bernik in Zver (2006) prišla do zaključka, da je japonski dresnik zelo dobra rastlina za proizvodnjo bioplina, tako zaradi dobrega pridelka kot tudi primernega C/N razmerja pri mladi rastlini.

2.2 PREDODELAVA LIGNOCELULOZNE BIOMASE

Anaerobna digestija (AD) lignocelulozne biomase (LB) je ena najbolj učinkovitih načinov za pridobivanje obnovljivih virov energije. Zaradi sestave lignocelulozne biomase, je ovirane hidroliza celuloze do enostavnih sladkorjev. Tako sta celuloza in hemiceluloza nedostopni ostalim mikroorganizmom pri nadaljnjih procesih razgradnje (Kumar in sod., 2009; Rouches in sod., 2016).

Hidrolizo katalizirajo kisline in encimi cellulaze. Dejavniki, ki vplivajo na hidrolizo celuloze so poroznost biomasnega materiala, kristalna oblika celuloznih vlaken ozziroma kristalna struktura celuloze ter sestava in zgradba tako lignina kot hemiceluloze. Predvsem prisotnost lignina in hemiceluloze otežuje encimom cellulaze in kislinam dostop do celuloze, katero bi razgradile do sladkorjev. Posledično se tako zmanjša učinkovitost hidrolize. Zato je potrebna predobdelava LB, ki spremeni velikost in strukturo biomase, kot tudi njeni kemični sestavo (slika 2). Tako je hidroliza ogljikovih hidratov do monomernih sladkorjev hitrejša in učinkovitejša (McMillan, 1994).



Slika 2: Predobdelava lignoceluloznega materiala (Antognoni in sod., 2013).

Obstaja več načinov predobdelave LB. Ti se delijo na fizikalno (mehanska, termična, ultrazvočna, elektrokemična), kemijsko (alkalna, kislinska, oksidativna), biološke (mikrobiološka, encimska) ter kombinirano tehniko (parna eksplozija, ekstruzija, termokemijska) (Belšak Šel, 2015).

Biološki način preobdelave je v primerjavi z ostalimi načini cenejši in okolju prijazen (Zheng in sod., 2014), vendar pa je stopnja hidrolize v večini bioloških procesih zelo nizka (Kumar in sod., 2009). Rouches in sod. (2016) navajajo, da bi se bilo predvsem potrebno izogniti visokim izgubam fermentiranega sladkorja. Če selektivne lignifikacije ni, se produkcija metana zmanjša, saj zaradi predobdelave, ogljikove hidrate porabijo glive. Na koncu za anaerobno digestijo in posledično nastanek bioplina le teh zmanjka (Rouches, 2016).

Pomembno je tudi C/N razmerje v substratu saj je od tega odvisna razgradnja lignoceluloznega materiala v predobdelavi oziroma delovanje lignolitičnih encimov. Da mikroorganizmi razgradijo molekulo ogljika, potrebujejo določen delež dušika. Glive imajo v primerjavi z bakterijami (C/N 10:1), višje razmerje (C/N 30:1), ker je njihova odvisnost od dušika primerljivo manjša kot pri bakterijah. Zaradi tega so glive bolj sposobne razgraditi katerikoli lignocelulozni material (Kumar in sod., 2009).

2.2.1 Razgradnja celuloze

Večina organizmov, ki razgrajujejo celulozo, so bakterije in glive. V celuloznem odpadu skupaj z necelulotičnimi vrstami popolnoma razgradijo celulozo. V aerobnih pogojih se pri tem sproščata se CO_2 in voda, v anaerobnih pogojih pa nastajajo CO_2 , metan in voda (Perez in sod., 2002).

Organizmi, ki razkrajajo celulozo, izločajo celulitične encime imenovane celulaze. Ti hidrolizirajo β -1,4-glikozidno vez celuloze. Celulaze so navadno razdeljene v tri skupine, to so endoglukanaze, celobiohidrolaze ali eksonukleaze in beta-glukozidaze. Endoglukanaze (endo-1,4- β -glikanaze ali ED) hidrolizirajo notranje vezi glukoze, najraje na področju amorfne celuloze, kjer tako nastanejo novi terminalni konci. Celobiohidrolaze (ekso-1,4-glukanaze ali CBH), delujejo na že obstoječe ali pa na novo nastale endoglukanazne vezi. Oba encima razgrajujeta amorfno obliko celuloze, s tem, da lahko CH edini učinkovito razgradijo celulozo kristalne oblike. CBH in ED razgradita celulozo do disaharida celobioze. Za učinkovito hidrolizo pa so pomembni še encimi β -glukanaze ali celobiaze, ki razgradijo celobiozo do glukoze. Molekuli glukoze sta pri celobiozi povezani z β -glikozidno vezjo C1-C4 (Sinkovič, 2000; Perez in sod., 2002).

Produkti celulozne hidrolize so dostopni kot ogljik, ki služi kot vir energije za celulotične mikroorganizme, kot tudi za organizme, ki živijo v okolju, kjer je potekala razgradnja celuloze (Perez in sod., 2002).

Okoli 5 do 10 % celuloze je v naravi razgrajene v anaerobnih pogojih. Sestava encimov je pri anaerobnih mikroorganizmih drugačna kot pri aerobnih glivah in bakterijah. Vendar pa ti mikroorganizmi zahtevajo za svojo rast in celulozno razgradnjo visoke temperature in ravno iz tega razloga je njihova vloga pri razgradnji celuloze v naravi majhna. Dobro znani anaerobni celulotični mikroorganizmi, ki razgradijo velike količine celuloze so bakterije vampa, glive in protozoa (Perez in sod., 2002).

2.2.2 Razgradnja hemiceluloze

Hemicelulozo razgrajujejo hemicelulaze na monomerne sladkorje in ocetno kislino. Ksilan je glavni ogljikohidrat v hemicelulozi. Najpogosteje je zastopan v travah in lesu listavcev. Za svojo razgradnjo potrebuje skupno/sinergijsko delovanje naslednjih encimov: endo-beta-ksilanaze, beta-ksilosidaze, alfa-glukuronidaze, alfa-L-arabinofuranosidaze ter acetilksilan esteraze. Ksilane notranje β -1,4-ksilozidne vezi cepijo endo-1,4-ksilaze. Pri tem nastane mešanica β -D-ksilopiranozilnih oligomerov. Te oligosaharide nato hidrolizirajo β -ksilosidaze iz nereduiranih koncev oligomerov do ksiloz. V razgradnji ksilana do ksiloz, je zaradi same kompleksne strukture polisaharidov hemiceluloz, vključenih še veliko drugih encimov (Perez in sod., 2002; Polizeli in sod., 2005).

2.2.3 Razgradnja lignina

Proces razgradnje lignina je oksidativen proces, saj so monomerske fenilpropanske enote lignina med seboj povezane z eterskimi vezmi in vezmi ogljik-ogljik. Sam proces je ekstracelularen (lizotrofen), saj je polimer lignina prevelik za endocitozo. Delovanje ektoencimov je nespecifično, zaradi prostorske neurejenosti lignina (Hammel, 1995; Kirk in Cullen, 1998).

Glavni skupini encimov so fenolne oksidaze (lakaze) in peroksidaze (lignin peroksidaze-LiP, mangan peroksidaze-MnP). Mednje spadajo še številni encimi, kot so glioksal oksodaze, reduktaze aromatskih kislin, veratril alkohol oksidaze, kinon oksidoreduktaze, oksidaze aromatskih aldehidov itd. Ti ali proizvajajo H_2O_2 , ki služi za aktivnost peroksidaz, ali pa katalizirajo razčlenjene produkte zgoraj omenjenih encimov (Howard in sod., 2003; Belšak Šel, 2015).

Lakaze in MnP v principu delujeta na fenolne skupine, LiP pa načeloma ceipi nefenolne (lignin) spojine. Pod določenimi pogoji lahko MnP deluje, podobno kot lakaze, tudi na nefenolne dele. Vsi trije encimi lahko v prisotnosti mediatorjev (molekul z majhno molekulsko maso) po oksidaciji, tvorijo proste kationske radikale ligninskih podenot. Ti zaradi svoje nestabilnosti in reaktivnosti povzročijo številne spontane cepitve ligninske makromolekule v manjše enote (Kirk in Cullen, 1998; Ulčnik, 2009; Belšak Šel, 2015; Rouches in sod., 2016).

2.2.4 Glive bele trohnobe

Gobe, ki razgradijo les oziroma lignocelulozno biomaso, razdelimo v glive bele in rjave trohnobe ter v glive mehke trohnobe. Slednje spadajo v deblo zaprtotrosnic (*Ascomycota*) in *Deuteromycota*. Za razkroj jim odgovarja les z manjšo vsebnostjo lignina in so bolj znane po tem, da razgrajujejo ne fenolne strukture. Glive rjave trohnobe spadajo v deblo prostotrosnic (*Basidiomycota*). Te glive razgrajujejo celulozo in hemicelulozo ter naredijo le manjše spremembe v sestavi lignina, torej ta po razgradnji lesne mase ostane (Rouches in sod., 2016).

Glive bele trohnobe (GBT) so najučinkovitejše v procesu delignifikacije. To jim omogoča njihov edinstven encimski sistem, ki omogoča glivi razgradnjo fenolnih struktur in transformacijo lignina v CO_2 . Razgradnja lignina postane vidna, ko se okuženi substrat oziroma les obarva belo (bela vlakna). Večji del GBT pripada deblu prostotrosnic, ki so hitrejši razgrajevalci lignina, manjši del pa k deblu zaprtotrosnic. Nekateri sevi glive kot vir ogljika uporabljajo hemicelulozo, kar zmanjšuje izgube celuloze. Encimi GBT imajo širok spekter delovanja (Rouches in sod., 2016).

Glive bele trohnobe imajo sposobnost simulativne (sočasne) ali selektivne (postopne) delignifikacije lesa. Pri simulatni delignifikaciji, ki je značilna za listavce, redkejša pri iglavcih, gre za sočasno razgradnjo celuloze, hemiceluloze in lignina. Selektivna delignifikacija pa poteka tako pri listavcih kot iglavcih, kjer se najprej razgradita hemiceluloza in lignin, šele kasneje pa celuloza. Prvi način razgradnje povzročajo nekatere prostotrosnice (npr. *Trametes versicolor*, *Irpeus lacteus*, *Phanerochaete chrysosporium* in *Heterobasidium annosum*) in nekatere zaprototrosnice (npr. *Xylaria hypoxylon*). Drugi način razgradnje pa je prisoten le pri prostotrosnicah *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Pleurotus* spp. in *Phellinus pini*) (Martinez in sod., 2005).

Sposobnost glive, da učinkovito razgraditi lignocelulozo je povezano z rastjo micelija, ki omogoča transport mineralov, kot so dušik in železo, na daljše razdalje v slabo hranljiv lignocelulozni substrat, ki ji predstavlja vir ogljika (Hammel, 1997). Vendar (jim glavni vir ogljika in vir energije ne predstavlja lignin) glivam bele trohnobe lignin ne predstavljal glavni vir ogljika in energije, saj se predpostavlja, da je razgradnja lignina zgolj nujna za dostop glive do celuloze in hemiceluloze (Sanchez, 2009).

Za razgradnjo lesa gliva uporablja dva tipa ekstracelularnih encimskih sistemov. Prvi je: hidrolitični sistem, z encimi hidrolaze, ki so odgovorne za razgradnjo polisaharidov, kot sta celuloza in hemiceluloza. Za depolimerizacijo lignina pa skrbi unikaten oksidativni in ekstracelularni ligninolitični sistem, ki odpre fenilni obroč (Perez in sod., 2002; Sanchez, 2009).

2.2.4.1 Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)

Bukov ostrigar je goba zmernega in subtropskega podnebnega pasu severne poloble. Je tipična gliva bele trohnobe, ki s svojim saprofitskim načinom življenja razkraja les listavcev (najpogosteje bukovino), bolj redko pa tudi les iglavcev. Kot znak razkroja lesa je viden bel usnjat micelij. Raste od oktobra do marca, saj njeno rast izzove temperatura, ko pade vsaj pod 15 °C. Prav tako glive ne prenese sušnih obdobij. Najbolj jim ustreza vlažnost lesa med 60 % in 80 % in temperatura okoli 27 °C (Garnweider, 1989; Humar, 2008).

Ostrigarji izraščajo v gostih šopih (slika 3). Trosnjaki so sestavljeni iz klobuka in beta. Klobuki imajo globoko spodvihan rob, so sivorjave do rumenkasto rjave barve in dosežejo premer od 5 cm do 15 cm. Po obliku spominjajo na školjko. Beti so beli, debeli ter različnih dolžin. Nameščeni so stransko, poševno. Lamele trosišča na spodnji strani klobuka so belkasto rjave, ozke in zelo zgoščene ter prirasle k betu. Spore cilindrične oblike so bele in velike od 8 µm do 12 µm × 3 µm do 4,5 µm (Garnweider, 1989; Humar, 2008).



Slika 3: V gostem šopu razraščen bukov ostrigar (foto: Pohleven F.).

Uporaba ostrigarja je vsestranska, tako v prehrani ljudi, kot v medicini. V naravi se ga lahko uporablja kot biofilter ali celo biokontrolni agent. Pomemben je tudi v postopkih remediacije (razstrupljanje zemlje, okužene z odpadnimi olji, peticidi ali biocidi). Gliva lahko to onesnažilo v določenih razmerah mineralizira, če je le struktura onesnažila sorodna strukturi lignina (Humar, 2008).

2.2.4.2 Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)

Najpogostejša in razširjena lesna goba pri nas in po svetu je pisana ploskocevka, ki jo najdemo tako v listnatih, kot v mešanih gozdovih. Najdemo jo na posekanem lesu, na poškodovanih oslabljenih drevesih, lahko pa okužuje tudi izdelke iz lesa, le če so ti v stiku s tlemi. Okužbo opazimo kot belo obarvan strohnjen les (Pohleven, 2008).

Predvsem pozno jeseni in zgodaj spomladi, ob zadosni vlagi iz snega in zadostni količini energije, iz snežno belega podgobja na lesu poženejo tanki klobučki. Le ti izraščajo v skupinah eden zraven drugega. Klobučki so veliki od 5 do 9 cm, so usnjatasto žilave strukture in različnih barv: od svetlo do temno rjave, okrasto rdeče do sive pa vse do črno modre barve. Robovi klobučkov so vedno svetlejši (pri mladih gobah beli), ostale barve klobučka pa so razporejene v koncentričnih pasovih (slika 3). Na spodnji trani klobučka se nahaja bela trosovnica, sestavljena iz kratkih cevk. Dnevno se iz njih sprosti na miljone belih trosov (Pohleven, 2008; Gregori, 2013).

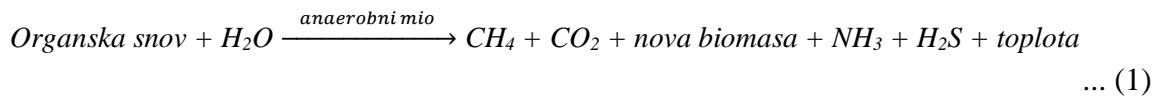


Slika 4: Barviti klobučki pisane ploskocevke(foto: Pohleven F.).

V prehrani jo zaradi njene žilave strukture ne uporabljam. Vendar pa je zaradi zdravilnih učinkov primerna za kuho čaja in tinktur, ker naj bi povečevala odpornost. Izoliran polisaharid iz ploskocevke je od vseh gob najbolj uspešen pri zdravljenju raka, kot tudi pri izboljšanju počutja po kemoterapiji in raditerapiji. Na številne bolezni deluje tudi preventivno. Zaradi nespecifičnega delovanja encimov se jo uporablja tudi pri raztrupljanju polj (mikroremidiaciji), uničevanju posebnih odpadkov, itd. (Pohleven, 2008; Gregori, 2013).

2.3 ANAEROBNA DIGESTIJA

AD je biološki proces, ki s pomočjo mikroorganizmov, v odsotnosti kisika, spremeni kompleksno organsko maso (zelena biomasa in odpadki, živalska gnojevka in blato, organski odpadki in odplake, kanalizacijska gošča) v metan in digestat (presnovljeni material) (enačba 1). Metan iz AD je lahko uporabljen v plinovodnem omrežju ali kot biogorivo. Prav tako se ga lahko pretvori v toploto ali elektriko. Digestat pa je zelo uporaben kot bogato gnojilo, ki ga recikliramo nazaj v zemljo (Al Seadi in sod., 2010; Rouches in sod., 2016).



Najpogostejši način proizvodnje bioplina v sodobnih bioplarnah je ko-digestija oziroma kofermentacija. Količino bioplina povečamo z mešanico živinskega gnoja in različnih substratov iz zelene biomase (energetske rastline, organski odpadki, kmetijski ostanki in stranski proizvodi...). Smiselnost kodigestije je v tem, da obdržimo ugodnejše C/N razmerje v procesu AD in posledično povečamo produkcijo metana. Sama živinska gnojevka, bogata z dušikom, ima nižje C/N razmerje, ki rezultira tudi v nižjem donosu metana. Zato ji dodamo rastline, ki so bogate z ogljikom, katerih C/N razmerje je pogosto večje od optimalne vrednosti za AD, ki je med 20 in 35. Prednost kodigestije je tudi lažje upravljanje s hlevskim gnojem in drugimi organskimi odpadki, posledično se tako zmanjša tudi izpust toplogrednih plinov (Nemet, 2009; Al Seadi in sod., 2010; Rouches in sod., 2016).

Živinska gnojevka in gnoj sta še posebaj uporabna v AD. Vsebujeta naravno prisotne anaerobne bakterije z visoko vsebnostjo vode (8 do 4 % SS v gnojevki) kar omogoča topljenje oziroma raztpljanje sosubstrata ter zagotavlja ustrezno mešanje in tekočo biomaso. Ker v živinoreji gnojevka in gnoj predstavlja odpadek, sta zato tudi lahko dostopna in poceni (Al Seadi in sod., 2010).

Glede na vsebnost suhe snovi (SS), poznamo suho in mokro digestijo. Živinski gnoj in gnojevka ter mokri organski odpadki iz prehrambene industrije imajo delež SS manjši od 20 % zato se jih uporablja za mokro digestacijo. Energetske rastline in silaža, katerih vsebnost SS doseže 35 %, pa uporabljam za suho digestijo. Kakšno mešanico substrata bomo vzeli za AD, tako glede na vrsto vhodnih surovin kot tudi njihovo količino, je odvisno od njihove vsebnosti SS, sladkorjev, lipidov in proteinov (Al Seadi in sod., 2010).

Digestat oziroma presnovljeni material, ki ga želimo uporabljali kot gnojilo, mora biti varen. Zato moramo zagotoviti kakovost vhodnega substrata, ki vsebuje kemične, biološke in fizične okužbe. Z raznimi rastlinskimi ali živalskimi povzročitelji bolezni so lahko okuženi živinska gnojevka, blato in zelenjavni odpadki. Direktiva evropskega parlamenta 1774/2002 določa izvedbo minimalnih zahtev in meritev, hkrati pa navaja tipe živalskih stranskih proizvodov, ki se lahko uporablja v bioplinskih napravah. Tako postavlja zdravstvene zahteve glede uporabe in ravnanja z živalskimi stranskimi proizvodi (Al Seadi in sod., 2010).

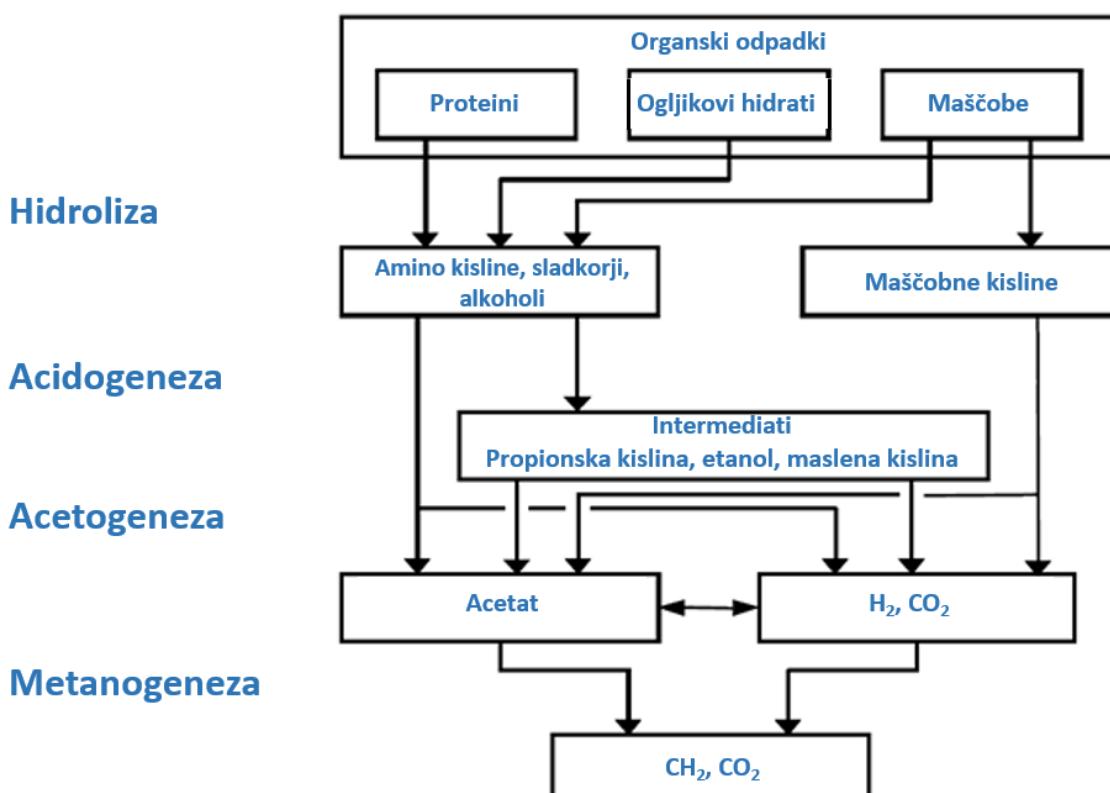
2.3.1 Proces anaerobne digestije

AD sestoji iz štirih glavnih procesov, kjer v vsaki od njih sodelujejo številni specifični mikroorganizmi. Ti procesi so:

- hidroliza,
- acidogeneza,
- acetogeneza in
- metanogeneza (Rouches in sod., 2016).

Z vsakim procesom, se prvotna organska masa stalno deli na manjše enote oziroma na enostavne organske spojine (Al Seadi in sod., 2010).

Proces, ki lahko najbolj omejuje AD, če gre za razgradnjo lignocelulznega materiala, je hidroliza. Spojine dobljene po hidrolizi, se v procesu acidegeneze pretvorijo v hlapljive maščobne kisline, hkrati se proizvajata tudi H_2 in CO_2 . V procesu acetogeneze se hlapljive maščobne kisline oziroma kratkoverižne maščobne kisline večinoma razgradijo na acetat, ta pa se v metanogenezi pretvorji v bioplín (v glavnem v CO_2 in CH_4). Metan prav tako nastane še iz CO_2 in H_2 (Belšak Šel, 2015; Rouches in sod., 2016) (slika 5).



Slika 5: Potek anaerobne digestije (Serna, 2009).

Za razliko od kompostiranja, ki je aeroben proces, se med AD sprosti zelo malo toplotne oziroma energije, saj je ta kemično vezana v substratu in tako ostane v proizvedenem bioplínu v obliki metana (Al Seadi in sod., 2010). Za uspešno AD je pomembo tudi, da vse štiri stopnje delujejo enakovredno oziroma v ustreznom razmerju, saj so med seboj povezane in odvisne ena od druge (Hočevard, 2015).

2.3.1.1 Hidroliza

Hidroliza je prva stopnja razgradnje kompleksnih (polimernih) molekul organske snovi na manjše enote (monomerne in oligomerne molekule). To razgradnjo omogoča vrsta različnih anaerobnih hidrolitičnih bakterij, ki izločajo hidrolitične encime oziroma eksoencime. Tako bakterije razgradijo z lipazami lipide do maščobnih kislin in glicerola,

proteazami proteine do aminokislin ter celulazami, celobiazami, ksilanazami in amilazami polisaharide do monosaharidov. V procesih hidrolize sodelujejo tako fakultativne kot obligativne anaerobne bakterije (*Clostridium*, *Peptococcus*, *Vibrio*, *Micrococcus* in *Bacillus*) (Anderson in sod., 2003; Demirel in Scherer, 2008; Al Seadi, 2010).

Hitrost hidrolize narekuje najpočasneje se razgrajajoči substrat. V primeru zelene biomase so to substrati, ki vsebuje celulozo, hemicelulozo in lignin. Novo nastali topni monomeri služijo kot substrat bakterijam, ki nastopajo v nadaljnih procesih AD (Demirel in Scherer, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

2.3.1.2 Acidogeneza

Na tej stopnji acidogene (kvasne) bakterije pretvarjajo produkte hidrolize, kot so topne monomerne molekule, v metanogene substrate. Iz enostavnih sladkorjev, aminokislin in maščobnih kislin nastanejo acetat, CO₂ in H₂, kot tudi kratko verižne maščobne kisline (propionate, laktat, butirat, itd.) in alkoholi (Demirel in Scherer, 2008; Al Seadi in sod., 2010). Pri acidogenezi sodelujejo številni mikroorganizmi, med njimi *Clostridium*, *Bacteroides*, *Butyribacterium*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Ruminococcus*, *Propionibacterium*, *Desulfobacter*, *Bacillus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* in *Escherichia* (Anderson in sod., 2003).

2.3.1.3 Acetogeneza

V stopnji digestije pride do razgradnje maščobnih kislin in alkoholov do H₂, CO₂ ter acetata. Alkoholi z ogljikovimi verigami dalšimi od ene enote ter dolgo verižne maščobne kisline z ogljikovimi verigami daljšimi od dveh enot se pretvorijo pod vplivom acetogenimi bakterijami (*Acetobacterium woodii* in *Clostridium aceticum*) v acetat in H₂. Acetogene bakterije lahko preživijo in rastejo le v okolju z zelo nizkim parcialnim tlakom H₂. Pri proizvodnji H₂ oziroma razgradnji maščobnih kislin in alkoholov, kjer ta nastaja, pa se parcialni tlak H₂ poveča, kar ovira bakterijski metabolizem. Zato acetogene bakterije živijo v simbiozi z metanogenimi arhejami. Slednje lahko preživijo le ob visokem parcialnem tlaku H₂. Tako metanogene arheje porabljam H₂, ki ga acetogene bakterije nenehno proizvajajo ter s tem vzdržujejo nizek parcialni tlak H₂ (Demirel in Scherer, 2008; Deublein in Steinhauser, 2008; Hočevar, 2015).

V acetogenezi delujeta acetat oksidirajoče in acetat reducirajoče bakterije. Pri nizkih koncentracijah vodika acetat oksidirajoče bakterije razgradijo acetat na H₂ in CO₂. Acetat reducirajoče bakterije pa pri visokih koncentracijah vodika pretvarjajo H₂ in CO₂ v acetat (Demirel in Scherer, 2008).

2.3.1.4 Metanogeneza

Metanogeneza je zadnja stopnja AD, kjer pod vplivom metanogenih mikroorganizmov, arhej, iz intermediatov nastajata metan in CO₂. Metan nastaja na dva načina. Če metan in CO₂ nastaneta s cepitvijo acetata, govorimo o acetotrofni metanogenski poti. Na ta način se v AD proizvede 70 % metana. 30 % metana pa nastane po hidrogenotrofni metanogenski poti, pri čemer se le ta reducira iz H₂ in CO₂ ali formata (HCOO⁻) (Al Seadi in sod., 2010; Hočevar, 2015).

Pri acetotrofni metanogenski poti gre za razcep acetata, pri čemer se metan reducira iz metilne skupine z metiltrofnimi metanogeni. Acetotrofni metanogeni pa oksidirajo karboksilno skupino do CO₂ (enačba 2). Kot substanci uporabljajo acetat arheje iz rodu *Methanosarcina* in *Methanosaeta* (Demirel in Scherer, 2008).



Po hidrogenotrofni metanogenski poti metanogene arheje uporabljajo za nastanek metana H₂ kot akceptor elektronov. Po drugi strani pa veliko vodik-porabljajočih arhej (*Methanobacterium* in *Methanococcus*) uporablja format (HCOO⁻) kot elektronski donor za redukcijo CO₂ v metan (Demirel in Scherer, 2009). (enačba 3)



Metanogeneza je napočasnejša, a tudi ključna biokemična reakcija v anaerobnem procesu. Nanjo močno vplivajo, poleg sestave substrata, še okoljske spremembe, kot so temperatura, vrednost pH in koncentracija inhibitorjev (Hočevar, 2015).

2.3.2 Vpliv dejavnikov na anaerobno digestijo

Za učinkovito AD je pomembno zagotoviti ustrezne pogoje za rast in preživetje anaerobnih mikroorganizmov. Nanj vplivajo prisotnost kisika, temperatura, vrednost pH, oskrba s hranili ter prisotnost in količina inhibitorjev (Al Seadi in sod., 2010). Vsi dejavniki so si med seboj povezani in so odvisni en od drugega.

2.3.2.1 Temperatura

Procesi AD lahko potekajo pri treh različnih optimalnih temperturnih območjih:

- psihrofilno območje (pod 25 °C)
- mezofilno območje (25 do 45 °C)
- termofilno območje (43 do 55 °C) (Al Seadi in sod., 2010).

V psihrofilnem območju najučinkovitejše delujejo psihrofilne arheje, v mezofilnem mezofilne arheje ter v termofilnem termofilne arheje. Od temperature je tudi odvisen zadrževalni čas. To je čas v katerem je možno doseči celoten razkorj organskega substrata. Minimalni čas zadrževanja v psihrofilnem območju je 70 do 80 dni, v mezofilnem 30 do 40 dni ter v termofilnem 15 do 20 dni (Yadvika in sod., 2004; Khanal, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

V mezofilnem temperaturnem območju živi večina metanogenih arhej, ki so tudi manj občutljive na na temperaturne spremembe, v primerjavi z termofilnimi arhejami. Slednje so občutljive na temepraturna nihanja +/- 1 °C, medtem ko mezofilne prenesejo +/- 3 °C, pri čemer ne pride do upada proizvodnje metana (Deublein in Steinhauser, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

Od temperature je dvisna tudi toksičnost amoniaka, viskoznost zmesi ter topnost različnih sestavin kot so NH₃, H₂, CH₃, H₂S in hlapne maščobne kisline. Dvig temperature vpliva na povečanost tokičnosti amoniaka, saj se le ta zvišuje skupaj s temepraturo in obratno. Pri višjih temepraturah je substrat bolj tekoč, zaradi česar je olajšana difuzija razkrojenega materiala. Temperatura je tudi pomembna za snovi, ki inhibirajo proces, saj je od nje odvisna topnost le teh (Al Seadi in sod., 2010).

2.3.2.2 Vrednost pH

V AD ima pH vrednost neposredni vpliv na rast mikorbov, kot tudi razgradnjo nekaterih snovi (amonijak, organske kisline, sulfidi). Glede na zahteve po pH razdelimo anaerobne mikroorganizme na acidogene in metanogene. Za acidogene je optimalna pH vrednost med 5,5 in 6,5, pri metanogenih pa je ta od 7,8 do 8,2. pH med 6,5 in 8 je optimalen za mezofilno presnovo. Če pH pade pod 6 ali naraste nad 8,3 je proces AD močno oviran (Deublein in Steinhauser, 2008; Al Seadi in sod., 2010). Razpadli CO₂ ob reakciji z vodo tvori ogljikovo kislino. Pri povišani temperaturi se topnost CO₂ v vodi zmanjša. Zaradi tega je v termofilnih digestorijih vrednost pH višja kot v mezofilnih (Al Seadi in sod., 2010).

Pri ragradnji proteinov nastaja amoniak in ta lahko s svojo bolj strupeno neionizirano obliko NH₃ poveča vrednost pH do 8 ali več. Posledica tega je zmanjšana aktivnost metanogenih arhej. pH vrednost pa lahko zmanjšuje akumulacijo hlapnih maščobnih kislin, ki nastane zaradi nestabilnosti procesa znotraj digestorja (Khanal, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

2.3.2.3 Inhibitorne snovi

Na zaviranje delovanja anaerobnih mikroorganizmov in toksičnost v procesih AD močno vplivajo različne inhibitorne snovi (organske in anorganske), ki so lahko prisotne v

odpadkih snoveh (Kroeker in sod., 1979). Ali bo neka snov inhibirala AD, je odvisno od njene koncentracije in pa od sposobnosti mikroorganizmov, da se prilagodijo na prisotne inhibitorje (Deublein in Steinhauser, 2008).

Kratkoverižne maščobne kisline, amoniak, težke kovine in sulfidi ob prekomerni koncentraciji delujejo zavirajoče na procese razgradnje. Posledica njihovega učinka se kaže z zmanjšanim ravnovesjem med proizvodnjo metana in povečano koncentracijo kratko verižnih maščobnih kislin (propionska kislina, maslena kislina, laktat). Njihova toksičnost pa se izrazi s popolno ustavitevijo metanogene aktivnosti (Kroeker in sod., 1979). Pri kratko verižnih maščobnih kislinah lahko pride, zaradi kopičenja le teh, do inhibitornega delovanjana. Na primer, če je parcialni tlak vodika previsok, to močno ovira acetogene bakterije, ki oksidirajo bodisi propionsko, masleno ali valerinsko kislino do acetata. Zaradi tega pride do kopičenja kratkoverižnih maščobnih kislin. Metanogene arheje tako nimajo dovolj ustreznegra substrata (acetata, CO_2 in H_2), ki bi ga pretvorile v metan. Posledica kopičenja je tudi znižana pH vrednost (Deublein in Steinhauser, 2008).

Amoniak, ki nastane pri razgradnji proteinov, se lahko v procesu AD nahaja v prosti ali neionizirani obliki (NH_3) in v obliki amonijevega iona (NH_4^+). Amoniak je pomembno hranilo za anaerobne mikroorganizme, a ima hkrati v NH_3 obliku inhibitorni učinek na metanogene arheje, saj lahko zlahka prehaja skozi celično membrano. V večjih koncentracijah je tudi toksičen, zato je potrebno, da je njegova koncentracija pod 80mg/l. Amonijevi ioni (NH_4^+) so bolj ali manj neškodljivi. Njihov inhibitorni učinek se začne šele pri 1,5 do 10 g/l, toksičnost pa pri 30 g/l (Deublein in Steinhauser, 2008; Khanal, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

Glede na to, v kakšni obliki bo amoniak oziroma v kakšnem razmerju bosta NH_3 in NH_4^+ , je odvisno od temperature in vrednosti pH. Ob povečanju temperature se poveča tudi koncentracija prostega amonijaka, kar lahko vodi pri termofilnih temperaturah do zaviranja procesov AD. Višja koncentracija prostega amoniaka pa vodi tudi do povisanega pH. Pri pH 7 je razmerje med NH_4^+ in NH_3 približno 99:1, pri pH 9 pa je to razmerje 70:30 (Deublein in Steinhauser, 2008; Al Seadi in sod., 2010).

2.3.2.4 Mešanje

Da zagotovimo dober stik med mikroorganizmi in substratom, moramo v digestorju zagotoviti mešanje vsebine. Mešanje zmanjšuje temperaturne in koncentracijske gradiente v digestorju, pomaga pri zmanjševanju velikosti delcev, preprečuje tvorbo pene ter pomaga pri sprostitvi bioplina iz digestata (Karim in sod., 2005).

2.3.2.5 C/N razmerje

Za AD in njeno učinkovitost je zelo pomembno razmerje med ogljikom in dušikom (C/N). Ključna je že priprava ustrezne mešanice vhodnih substratov, saj lahko z njo zagotovimo, da ostaja ramerje C/N znotraj ustreznega območja. Mikroorganizmi v procesu razgradnje porabljajo ogljik 25 do 30 krat hitreje kot dušik, zaradi tega je sprejemljivo razmerje C/N v razponu od 25 do 50/ od 0,75 do 1. Če uporabljamо substrate z nižjim C/N razmerjem lahko pride do povečane proizvodnje amonjaka, posledično se pH dvigne nad 8,5 in s tem pride do zaviranja proizvodnje metana. Prav tako pride do zaviranja produkcije metana v primeru previsokega C/N razmerja. Takrat pride do hitre porabe dušika s strani metanogenih arhej, kar vodi do pomanjkanja le tega. To pa negativno vpliva na rast mikroorganizmov in na tvorbo bioplina (Monnet, 2003; Yadvika in sod., 2004; Deublein in Steinhauser, 2008).

2.3.3 Produkti anaerobne digestije

Po končanem procesu AD nastane bioplín, ki predstavlja zmes različnih plinov ter presnovljeni substrat ali digestat (Jejčič in sod., 2010). Sestava bioplina je predvsem odvisna od substrata oziroma od sestave organskih snovi v substratu ter od razmer v katerih poteka proces njihove AD (Braun, 2007). Od vsebnosti proteinov, maščob in ogljikovih hidratov v substratu pa je odvisen donos metana (Al Seadi in sod., 2010). Jejčič in sodelavci (2010) navajajo, da dajejo maščobe, v primerjavi z beljakovinami, največ plina z visoko vsebnostjo metana. Zelo siromašen z metanom pa naj bi bil plin iz ogljikovih hidratov.

Bioplín sestavlja:

- metan CH₄ (50 do 75 %),
- ogljikov dioksid CO₂ (10 do 40 %),
- vodik H₂ (1 do 3 %),
- vodikov sulfid H₂S (0,1 do 0,5 %),
- dušik N₂ (0,5 do 2 %),
- amoniak NH₃ (< 1 %),
- ogljikov monoksid CO (manj kot 0,1)
- vodna para H₂O (2 do 7 % (20 °C do 40 °C)) (Jejčič in sod., 2010; Al Seadi in sod., 2010).

V bioplínu se nahaja več primesi, ki so ali strupena ali pa mu zmanjšujejo energijsko vrednost. V želji, da bioplín nadomestimo z zemeljskim plinom, mora le ta ustrezati določenim specifikacijam. Zato ga moramo očistiti do faze biometana (metan pridobljen iz biomase). Za to obstajajo kemične, biološke in fizikalne metode. Glavne primesi, ki mu jih moramo odstraniti, so voda, CO₂ in H₂S. Z odstranitvijo CO₂ močno dvignemo delež metana in tako povečamo njegovo energijsko vrednost. Vodikov sulfid H₂S odstranimo iz

dveh razlogov. Eden od razlogov je, da skupaj z vodo tvorita strupene žveplove kisline, ki zaradi svoje močne korozivnosti in agresivnosti povzroča okvare motorjev z notranjim izgorevanjem v kogeneratorskih enotah (kombinirana topotna in električna enota) na bioplinskih napravah ter deluje korozivno na cevovode. Žveplo je tudi eden od povzročiteljev kislega dežja, pri izgorevanju nastaja SO_2/SO_3 , ki je še bolj strupen kot H_2S , kar predstavlja drugi razlog za odstranitev. Vodo pa odstranimo, da se ne kondenzira po cevovodih (Jejčič in sod., 2010).

Za v omrežje zemeljskega plina mora biometan vsebovati 99 % metana. Za vozila na motorni pogon pa mora biometan vsebovati vsaj 90 % metana. Torej biometan lahko uporabljam za motorje z notranjim izgorevanjem, lahko ga vbrizgavamo v javno plinsko omrežje, za proizvodnjo električne energije in toplotne na kogeneracijskih enotah... (Jejčič in sod., 2010).

Čisti ogljikov dioksid iz bioplina lahko uporabljam v kmetijstvu kot gnojilo v toplih gredah ali pa za proizvodnjo polikarbonatov in suhega ledu v kemični industriji. Uporablja se ga lahko tudi pri obdelovanju površin s peskanjem s CO_2 (Al Seadi in sod., 2010).

Digestat ali presnovljeni substrat, ki ostane po AD, lahko uporabimo za gnojenje rastlin. Tako gnojilo vsebuje nekoliko manj dušika, a je bogato s fosforjem, kalijem in mikrohranili (Jejčič in sod., 2010). Ker so ta hrnila mineralizirana, so tako rastlini lažje dostopna. Dušik v obliki amonjaka rastlina lažje in hitreje sprejme, kot dušik vezan v organski oblici. Posledično je tudi možnost izpiranja, ob pravilnem gnojenju, majhna (Lusk, 1998).

Uporabimo lahko celotno količino presnovljenega substrata ali pa ga ločimo na trdno (vlaknine digestata) in tekočo (filtrat) fazo. Na obdelovano površino ga lahko nanašamo z običajno opremo za gnoj in gnojevko. V procesu AD se uniči oziroma zmanjša količina in število vrst škodljivih organizmov v substratu (stopnja uničenja je odvisna od temperature, časa in pH substrata). Prav tako se odstrani 80 % neprijetnega vonja. S tem, ko se večina metana izloči iz substrata, dobimo substrat z optimalnim razmerjem med ogljikom in dušikom, kar pozitivno vpliva na kvaliteto humusa in na mikrobiološke procese v tleh. Z uporabo tako pridobljenega gnojila, hrnilne snovi recikliramo nazaj v zemljo in zmanjšamo uporabo mineralnih gnojil, za katera pri izdelavi porabimo veliko fosilne energije (Lusk, 1998; Jejčič in sod., 2010; Al Seadi in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Oprema, ki smo jo uporabljali pri poskusu:

- mlin RETSCH SM2000
- petrijevke
- tehntica
- laboratorijski sušilnik
- eksikator
- plastična posoda, 5 l
- merilni valj, 100 ml
- destilirana voda
- pH meter
- stekleni kozarci za vlaganje
- preluknjani pokrovčki
- sanitetna vata
- etanol
- avtoklav
- brezprašna komora
- špitirni gorilnik
- eza
- plutovrt, Ø 0,5 mm
- rastna komora
- erlenmajerice z enim stranskim izhodom in navojem ter izbočenim dnom, 250 ml
- gumjasti zamaški
- plastična cev
- nepovratni ventili
- magnetno mešalo IKA, RT 15 power
- magnetni mešalčki
- birete, 100 ml
- stojalo za birete
- prižeme
- kovinske posode
- stisnjeni argon
- termometer
- žogica za pipetiranje

3.1.2 Vhodni substrati

3.1.2.1 Japonski dresnik (*Fallopia japonica*)

Japonski dresnovec smo nabrali v Ljubljani ob Cesti IV. v Rožni dolini, ob Oddelku za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire.

3.1.2.2 Piščančji gnoj (PG)

Uporabili smo zreli piščančji vzrejni gnoj z lesnimi oblanci, ki smo ga dobili v Perutnini Ptuj d.d.

3.1.2.3 Vrste gliv

Pri inokulaciji smo uporabili glivi bele trohnobe, pisano ploskocevko - *Trametes versicolor* ((Tv6) - ZIM L057 (Raspor in sod., 1995)), ter bukovega ostrigarja - *Pleurotus ostreatus* ((Plo5) – ZIM L031 (Raspor in sod., 1995)).

Obe glivi hranijo na Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

3.1.2.4 Inokulum

Inokulum z bakterijami smo dobili iz digestorja iz bioplinarne Farma Ihan.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava substrata

Nabrani dresnovec smo zmleli v mlinu Retsch SM2000, katerega sito je imelo 1 mm velike odprtinice. Enako smo naredili s piščančjim gnojem.

3.2.2 Meritev vlažnosti

Za merjenje vlažnosti tako japonskega dresnovca kot tudi piščančjega gnoja ali njune skupne mešanice (JD + PG) smo uporabljali enako metodo. Najprej smo z vsakim substratom napolnili po pet petrijevk, katere smo predhodno stehtali. V vsako petrijevko smo odtehtali približno 5 g svežega substrata. Petrijevke smo nato postavili v sušilnik, kjer se je material sušil 24 ur pri temperaturi 103 °C. Po tem času smo naše posušene vzorce ohladili v eksikatorju, ter jih ponovno stehtali. Stehtanim vzorcem s posušenim materialom smo odšteli maso petrijevk ter tako dobili suho maso substara.

Iz dobljenih podatkov smo po enačbi 4 za določitev vlažnosti izračunali masne deleže vode izražene v odstotkih (preglednica 1, 2 in 3):

$$W_{(H_2O)} = \frac{m_{(\text{vlažne snovi})} - m_{(\text{suhe snovi})}}{m_{(\text{vlažne snovi})}} \cdot 100\% \quad \dots(4)$$

Preglednica 1 : Masni delež vode japonskega dresnika

Oznaka	$m_{(\text{vlažne snovi})}$ (g)	$m_{(\text{suhe snovi})}$ (g)	$W_{(H_2O)}$ (%)
1D	5,06	4,76	5,93
2D	5,08	4,82	5,12
3D	5,01	4,75	5,19
4D	5,03	4,75	5,57
5D	5,01	4,73	5,59

Preglednica 2: Masni delež vode piščančjega gnoja

Oznaka	$m_{(\text{vlažne snovi})}$ (g)	$m_{(\text{suhe snovi})}$ (g)	$W_{(H_2O)}$ (%)
1PG	5,10	4,56	10,59
2PG	5,01	4,48	10,58
3PG	5,06	4,55	10,08
4PG	5,02	4,50	10,36
5PG	5,02	4,50	10,36

Preglednica 3: Masni delež vode v mešanici piščančjega gnoja in japonskega dresnika

Oznaka	$m_{(\text{vlažne snovi})}$ (g)	$m_{(\text{suhe snovi})}$ (g)	$W_{(H_2O)}$ (%)
1DPG	5,54	1,92	65,34
2DPG	5,59	1,96	64,93
3DPG	5,43	1,91	64,83
4DPG	5,49	1,94	64,66
5DPG	5,62	1,97	64,95

V povprečju znaša masni delež vode v japonskem dresniku (D) 5,48 %, piščančjem gnoju (PG) 10,39 % ter v mešanici PG in D 64,94 % (preglednica 4).

Preglednica 4: Povprečni masni deleži vode v japonskemu dresniku, piščančjem gnoju in v mešanici oben skupaj

Substrat	japonski dresnik	piščančji gnoj	mešanica japonskega dresnika in piščančjega gnoja
$W_{(H_2O)}$ (%)	5,48	10,39	64,94

3.2.3 Priprava mešanice

Za pripravo mešanice smo izbrali glede na rezultate preliminarnih poskusov razmerje 60 % japonskega dresnovca in 40 % piščančjega gnoja. Izkazalo se je, da je pri tem masnem razmerju micelij še dovolj dobro preraščal, pri pripravi substrata pa se je porabila zadostna količina piščančjega gnoja, kar je tudi zaželeno pri proizvodnji bioplina (Kalan, 2010).

Ugotovili smo tudi, da z 1000 g mešanice lahko izvedemo vse poskuse. Če bi bila tako D kot PG enake vlažnosti, bi enostavno uporabili 600 g D in 400 g PG. Ker pa japonski dresnik in piščančji gnoj nimata enake vlažnosti, smo morali izračunati kolikšno maso oziroma količino enega in drugega moramo dodati, da bo mešanica ustrezala razmerju 60:40.

Enačba 5 za izračun mase japonskega dresnika (D) za pripravo mešanice:

$$X(D) = \frac{m(D)}{1 - W(D)}$$
$$X(D) = \frac{600 \text{ g}}{1 - 0,0548} = 599,9 \text{ g}$$
$$X(D) = 599,9 \text{ g} \quad \dots (5)$$

Kjer je:
m (D) – teoretična masa japonskega dresnika (D) za pripravo mešanice (g)
W (D) – vlažnost japonskega dresnika (D)
X (D) – dejanska masa japonskega dresnika (D) za pripravo mešanice (g)

Enačba 6 za izračun mase piščančjega gnoja (PG) za pripravo mešanice:

$$X(PG) = \frac{m(PG)}{1 - W(PG)}$$
$$X(PG) = \frac{400 \text{ g}}{1 - 0,1039} = 446,4 \text{ g}$$
$$X(PG) = 446,4 \text{ g} \quad \dots (6)$$

Kjer je:
m (PG) – teoretična masa piščančjega gnoja (PG) za pripravo mešanice (g)
W (PG) – vlažnost piščančjega gnoja (PG)
X (PG) – dejanska masa piščančjega gnoja (PG) za pripravo mešanice (g)

3.2.4 Vlaženje mešanice

Mešanici japonskega dresnovca in PG smo postopoma dodajali destilirano vodo. Vse skupaj smo po vsakem dodatku vode dobro premešali ter vsake toliko stisnili mešanico v pest. Mešanica je bila dovolj vlažna takrat, ko je skozi stisnjeno pest pritekla kaplica vode (Staments in Chilton, 1983). Mokri mešanici smo nato izmerili še vlažnost (že opisano na ko bodo osteviljeni naslovi..), ki je bila med 60 in 70 %.

3.2.5 Polnjenje kozarcev

Kozarce in preluknjane pokrovčke smo predhodno razkužili v etanolu in osušili. V luknje pokrovčkov smo vstavili vato, s čimer smo omogočili glivam, ki razkrajajo substrat, dostop do zraka, obenem pa zaščitili notranjost kozarca pred okužbami. Vsak kozarec smo nato napolnili s 50 g mokre mešanice in ga zaprli.

3.2.6 Avtoklaviranje

Napolnjene kozarce smo zložili v avtoklav ter počakali, da se je le ta segrel na temperaturo 121 °C, pri tlaku 1 bar. Nato smo pri teh pogojih avtoklavirali pol ure. Po tem času smo avtoklav ugasnili ter počasi spuščali paro. Tako razkužene kozarce ter njihovo vsebino smo pustili, da so se ohladili, saj je bil šele ohlajeni substrat pripravljen za cepitev glive.

3.2.7 Inokulacija in inkubacija

Inokulacijo s pisano ploskocevkjo (*Trametes versicolor*) in bukovim ostrigarjem (*Pleurotus ostreatus*) smo izvedli v sterilnih pogojih v brezprašni komori. Vanjo smo postavili kozarce z mešanicami ter jih izpostavili UV svetlobi, da so se še dodatno razkužili. Iz petrijevke z gojiščem smo ob špiritu nem gorilniku s pomočjo plutovrta izrezali cepiče. Z ezo smo vsakega posebej prenesli v kozarce ter jih tam enakomerno razporedili. V vsakega smo nacepili po tri cepiče ter takoj zaprli s pokrovčkom, da ne bi prišlo do okužb. Na vsak pokrovček smo napisali kaj smo cepili ter datum cepljenja.

Inokulirane kozarce smo nato postavili v rastno komoro s temperaturo 25 °C in 95% zračno vlago, kjer se je pričelo preraščanje. Ker nas je zanimalo tudi, kako čas preraščanja vpliva na proizvodnjo bioplina, smo določili tudi različne čase inkubacija. Inkubacija je potekala 7, 14, 21 dni od inokulacije z glivo.

3.2.8 Priprava anaerobne digestije

Po poteku inkubacijskega časa smo pripravili anaerobni digestor. Ta je bil sestavljen iz 250 ml erlenmajerice z enim stranskim izhodom, na katerem je bila pritrjena plastična cev z nepovratnim ventilom (slika 6). Nepovratne ventile smo uporabljali zato, ker se je v erlenmajerici ustvaril podtlak, ki je povzročil uhajanje vode v cevi. Predhodno smo tudi številčno označili erlenmajerice ter njihove birete, tako da je imela vsaka erlenmajerica

svojo bireto. Pri vsaki nastavitevi smo za posamezno preraščanje imeli 9 paralelk preraščene mešanice z glivo, 3 paralelke kontrole (mešanico brez preraščanja) in dve paralelki samega inokuluma.



Slika 6: Plastična cev z nepovratnim ventilom, ki vodi v bireto (foto: Jarc A., 2010).

Na podlagi podatkov iz preliminarnih poskusov, smo se odločili za razmerje inokulum 50 % in mešanica 50 %. V erlenmajerico smo odtehtali ustrezno količino preraščene mešanice ali pa kontrole. Masa preraščene mešanice in masa kontrole, je bila preračunana tako, da je ustrezala masi trdne snovi (3 g) ter njuni vlažnosti. Nato smo odpipetirali še inokulum, ter ga dodali odtehtanim vzorcem, ter vse to še dopolnili z destrilirano vodo z umerjenim pH = 7. Vsaki erlenmajerici je pripadal še magnetni mešalček ter plinotesni gumjasti zamašek.

Štirinajst tako pripravljenih anaerobnih digestorjev smo postavili na magnetno mešalo IKA (RT 15 power) s petnajstimi mešalnimi mesti. Na petnajsto mesto smo postavili z vodo napolnjeno erlenmajerico z magnetnim mešalčom. Ta erlenmajerica nam je služila kot kontrola temperature v naših digestorjih. Nato smo napeljali posamezno plastično cev do označene, narobe obrnjene, malo v vodo potopljene, 100 ml birete. Le te so bile napolnjene z vodo. Vsak anaerobni digestor smo nato prepihal z argonom ter vstavili cevko v bireto. Tako smo ustvarili anaerobne pogoje.

Po končanem prepihanju smo vključili magnetno mešalo, ki je začelo tako z mešanjem kot z gretjem vsebine anaerobnega digestorja. Magnetno mešalo smo imeli naravnano na temperaturo 38 °C, z vrtilno hitrostjo 360 1/min.

3.2.9 Odčitavanje rezultatov

Bioplín, ki je nastajal v erlenmajerici je potoval po cevki v bireto, kjer je izpodrival vodo iz nje. Pred vsakim odčitavanjem smo izmerili temperaturo vode in tako preverjali temperaturo naših vzorcev.

Nastajanje plina smo spremljali 14 dni, odčitavanje pa je potekalo enkrat na dan. Iz razlike v nivoju vode smo lahko določili količino nastalega bioplina (slika 7).



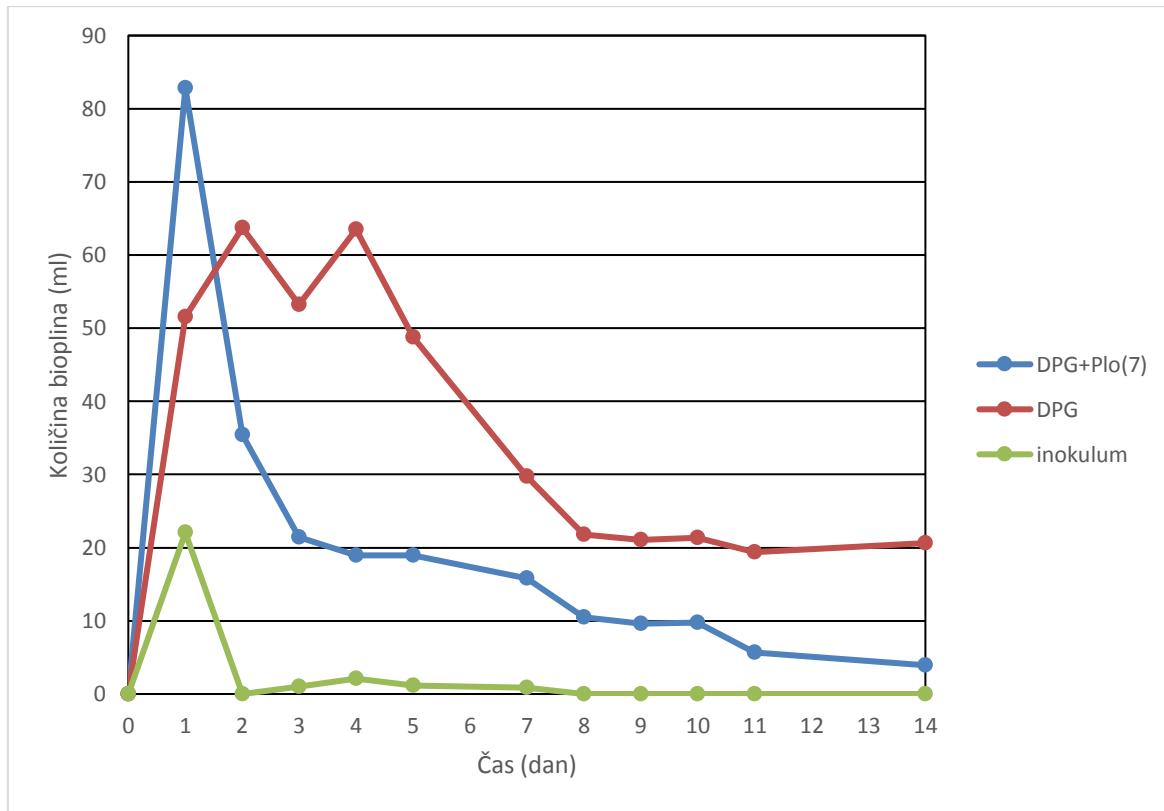
Slika 7: Laboratorijska aparatura za pridobivanje bioplina (foto: Jarc A., 2010).

4 REZULTATI

4.1 PRODUKCIJA BIOPLINA

4.1.1 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 7 dni preraščenega substrata z glivo *Pleurotus ostreatus*

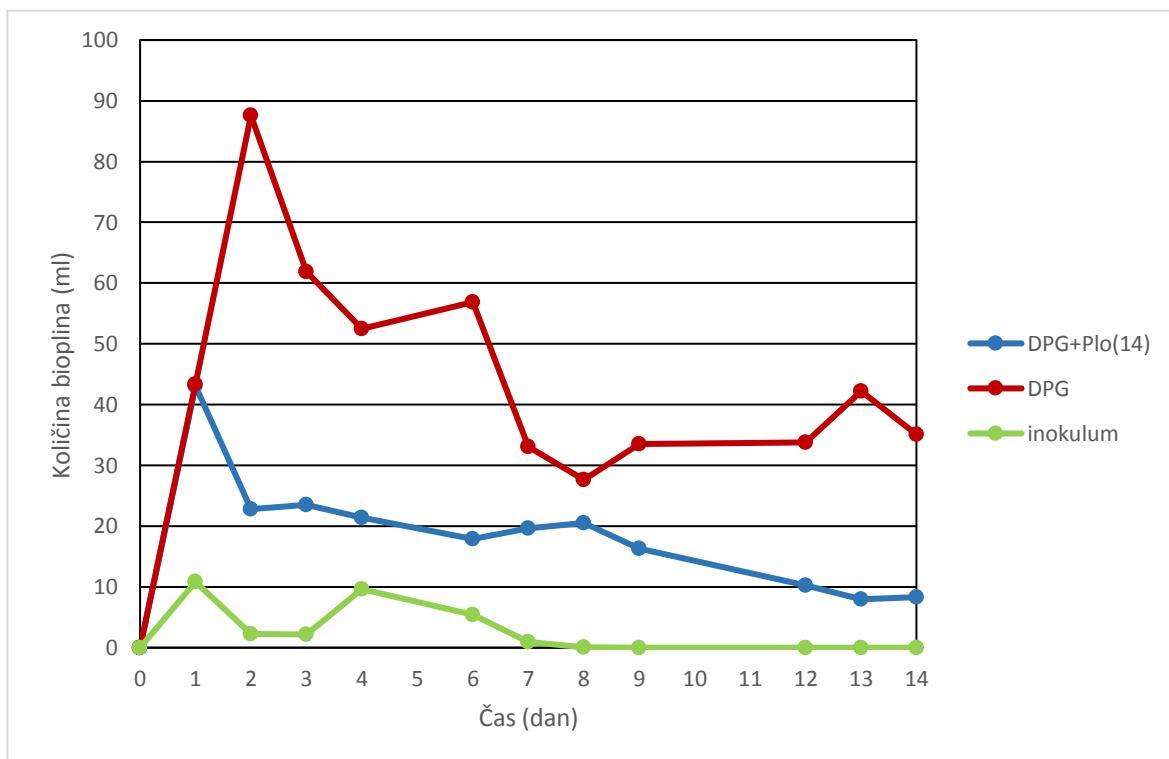
Prvi dan nastane največ bioplina, 82,8 ml, pri vzorcu s preraščenim substratom (DPG+Plo). Kljub največjemu doseženemu volumnu pa preraščen substrat že drugi dan proizvede za 47,7 ml manj bioplina. Njegova količina nato konstantno pada. Iz grafa je razvidno, da največ bioplina nastane v vzorcu z nepreraščenim substratom (DPG). Le pri tem se pojavita dva vrhova. Prvi vrh z 63,7 ml bioplina doseže v 2. dnevu, drugi vrh pa v 4. dnevu, z volumnom 63,5 ml. 8., 9. in 10. dan je proizvodnja bioplina v vzorcih DPG in DPG+Plo približno konstantna. Inokulum je najbolj aktivен prvi dan, nato pa je njegova aktivnost minimalna. Po 7. dnevu le te ne zaznamo več (slika 8).



Slika 8: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 7 dni z glivo *Pleurotus ostreatus*, kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.

4.1.2 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 14 dni preraščenega substrata z glivo *Pleurotus ostreatus*

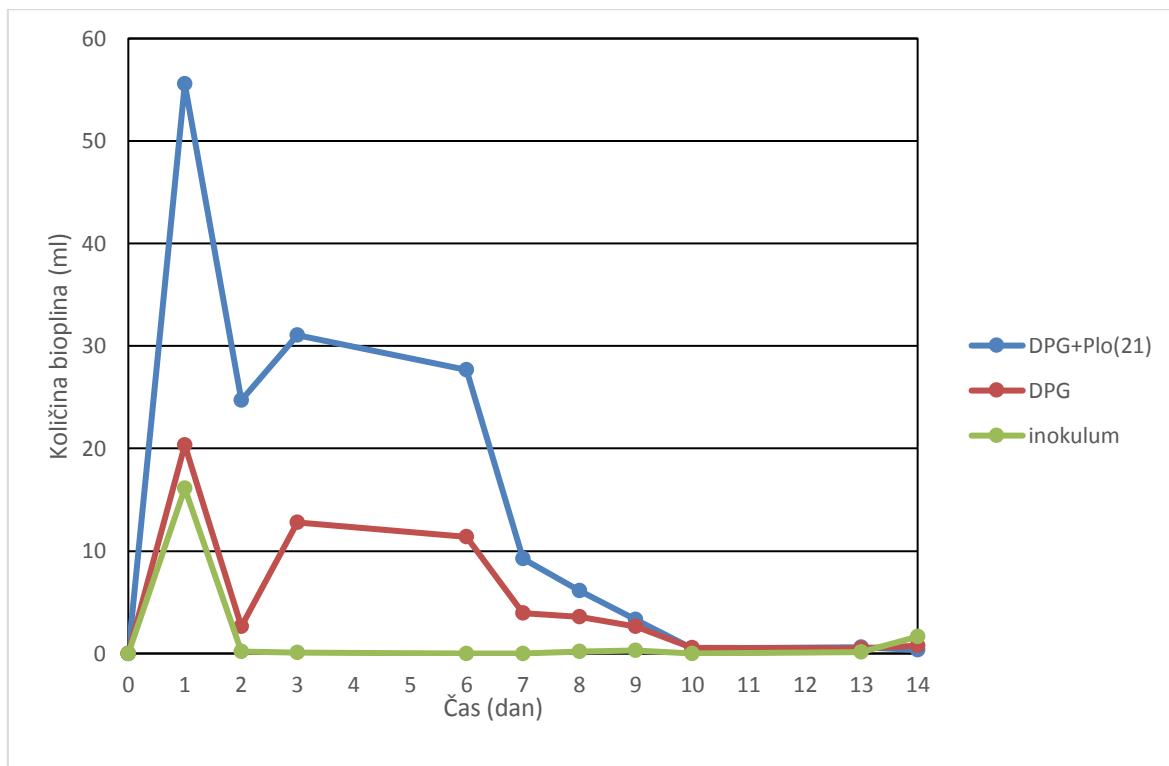
Prvi dan nastane, tako pri preraščenemu (DPG+Plo) kot nepreraščenemu (DPG) vzorcu, enaka količina bioplina. V naslednjem dnevu se pri DPG vzorcu količina bioplina podvoji in naraste iz 43,3 ml na 87,6 ml. Le ta nato postopno pada, z rahlim povišanjem 6. in 13. dan. Pri DPG+Plo vzorcu največ bioplina nastane prvi dan. Od 2. do 8. dne pa ga v povprečju nastane približno 21,0 ml na dan. Z devetim dnem začne produkcija bioplina v preraščenem vzorcu upadati. Največ bioplina 14 dneh nastane v DPG vzorcu. Inokulum je najbolj aktiven prvi in četrti dan, s približno 10 ml nastalega bioplina. Po sedmem dnevu je njegova aktivnost minimalna (slika 9).



Slika 9: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 14 dni z glivo *Pleurotus ostreatus*, kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.

4.1.3 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 21 dni preraščenega substrata z glivo *Pleurotus ostreatus*

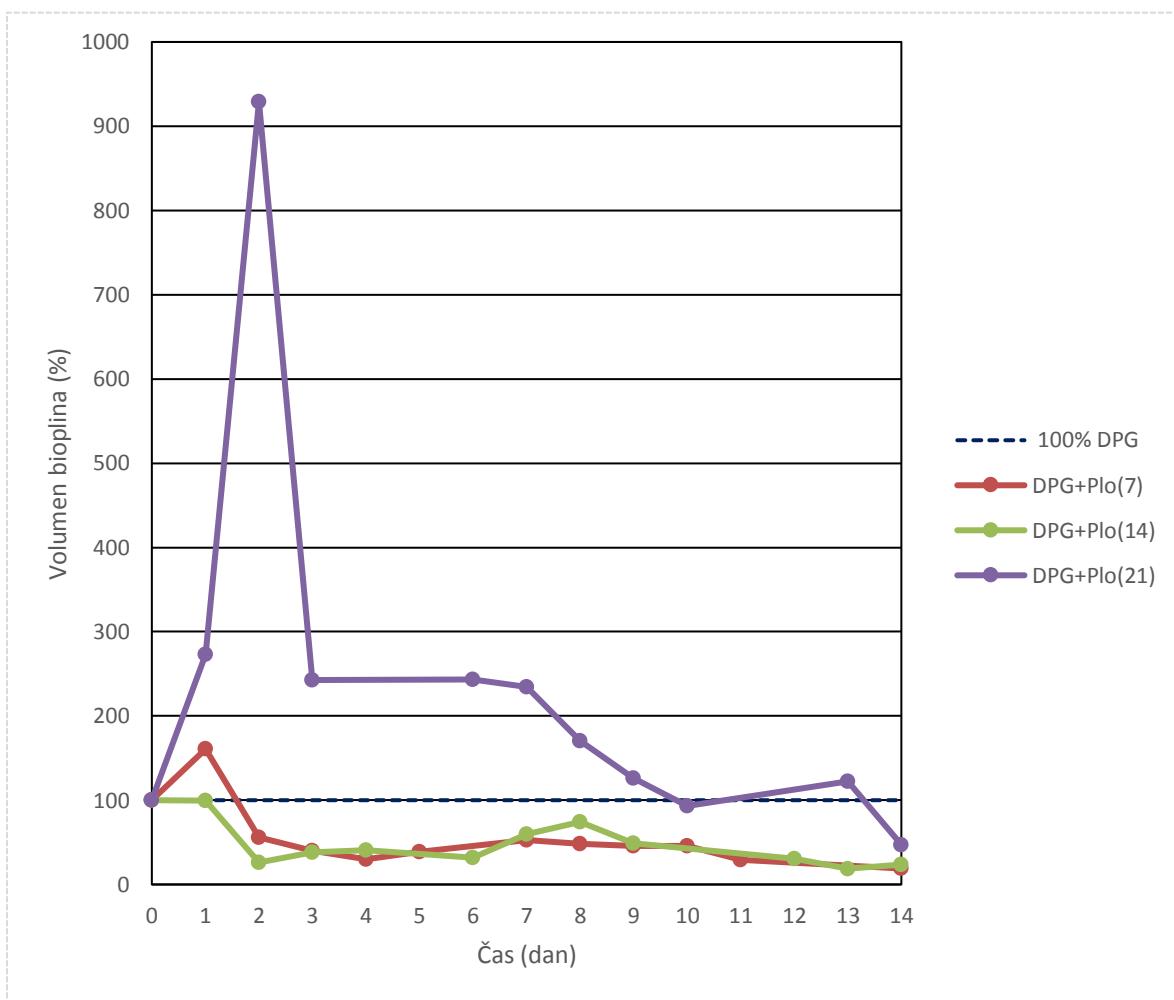
Trend nastajanja bioplina si je pri preraščenem (DPG+Plo) in nepreraščenem (DPG) vzorcu zelo podoben. Vsi trije vzorci dosežejo svojo vrh prvi dan. Takrat največ bioplina nastane pri 55,6 ml v vzorcu DPG+Plo, temu sledita z 20,3 ml in 16,1 ml še vzorec DPG ter inokulum. Pri slednjemu se z začetkom 2. dne kaže minimalna aktivnost vse do 14. dne. Po 6. dnevu začne produkcija bioplina pri vzorcih DPG in DPG+Plo naglo padati. Po 9. dnevu je količina bioplina pri obeh minimalna. Iz grafa je razvidno, da največ bioplina nastane pri vzorcu DPG+Plo preraščenim 21 dni, kar kaže na pozitivni učinek predobdelave z glivo (slika 10).



Slika 10: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 21 dni z glivo *Pleurotus ostreatus*, kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.

4.1.4 Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenimi substrati z glivo *Pleurotus ostreatus* (7, 14 in 21 dni)

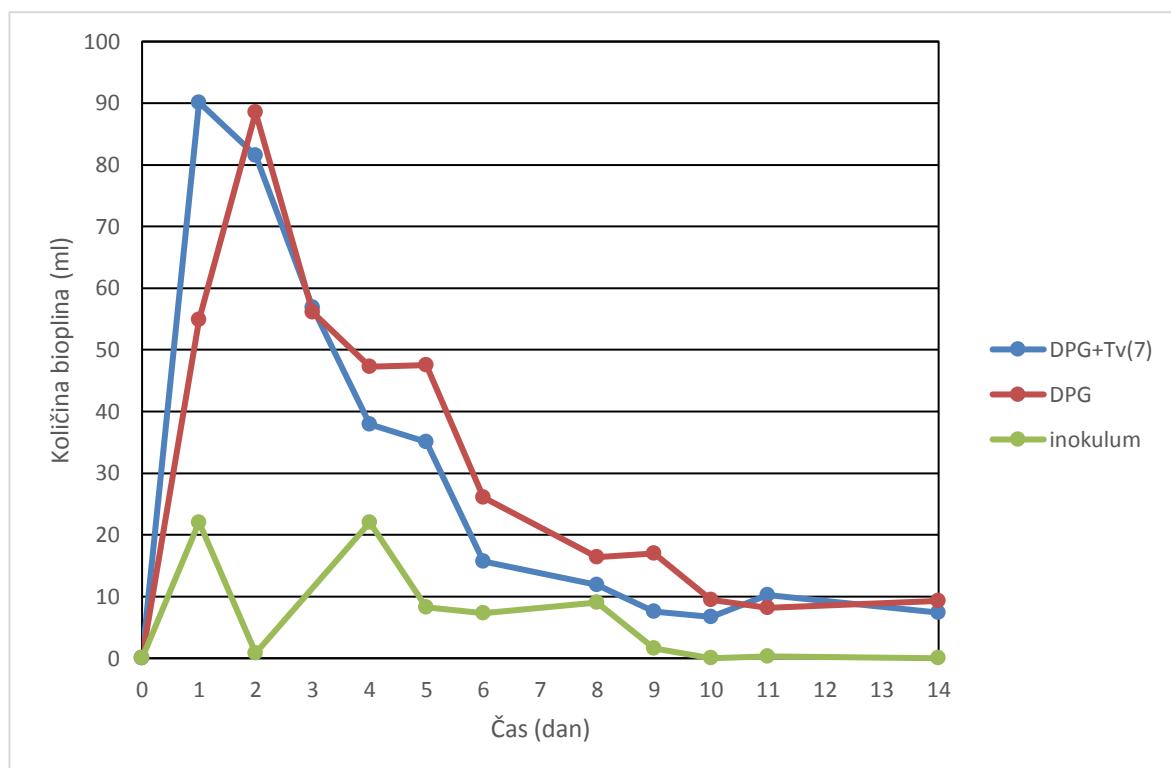
2. dan nastane pri 21 dni preraščenemu substratu (DPG-Plo(21)) za več kot 900 % večja količina bioplina glede na nepreraščen substrat (DPG). V 3. dnevu pa ta količina naglo pada za 687 %. Količina bioplina pri DPG+Plo(21) nato postopno pada, z rahlim povišanjem v 13. dnevu. Vzorca z 7 in 14 dni preraščenim substratom ne vplivata na povečano produkcijo bioplina, saj po drugem dnevu in do konca štirinajstega dne, nastane manj bioplina kot v DPG (slika 11).



Slika 11: Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenim substratom z glivo *Pleurotus ostreatus* (7, 14 in 21 dni), kot tudi primerjava različno preraščenih vzorcev.

4.1.5 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 7 dni preraščenega substrata z glivo *Trametes versicolor*

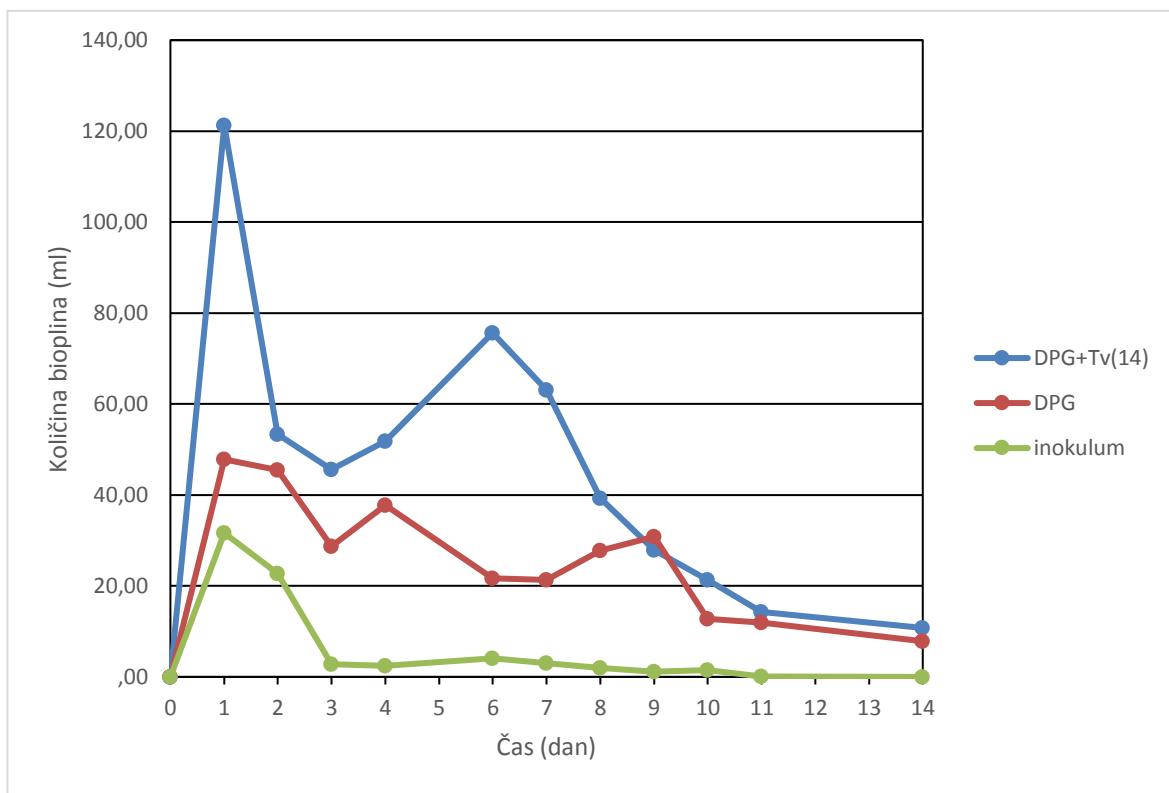
Zelo podoben trend nastajanja bioplina imata tako preraščen (DPG+Tv) kot nepreraščen (DPG) vzorec. Vzorec DPG+Tv doseže svoj vrh z 90,1 ml, prvi dan medtem, ko ga DPG z 88,5 ml doseže drugi dan. Pri obeh vzorcih volumen bioplina z dnevi počasi padati. V vzorcu DPG nastaja v povprečju le za 5 % več bioplina kot v DPG+Tv vzorcu. Inokulum ima dva vrhova, z 22,0 ml, ki ju doseže 1. in 4. dan. Po 9. dnevu je njegova aktivnost minimalna (slika 12).



Slika 12: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 7 dni z glivo *Trametes versicolor*, kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.

4.1.6 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 14 dni preraščenega substrata z glivo *Trametes versicolor*

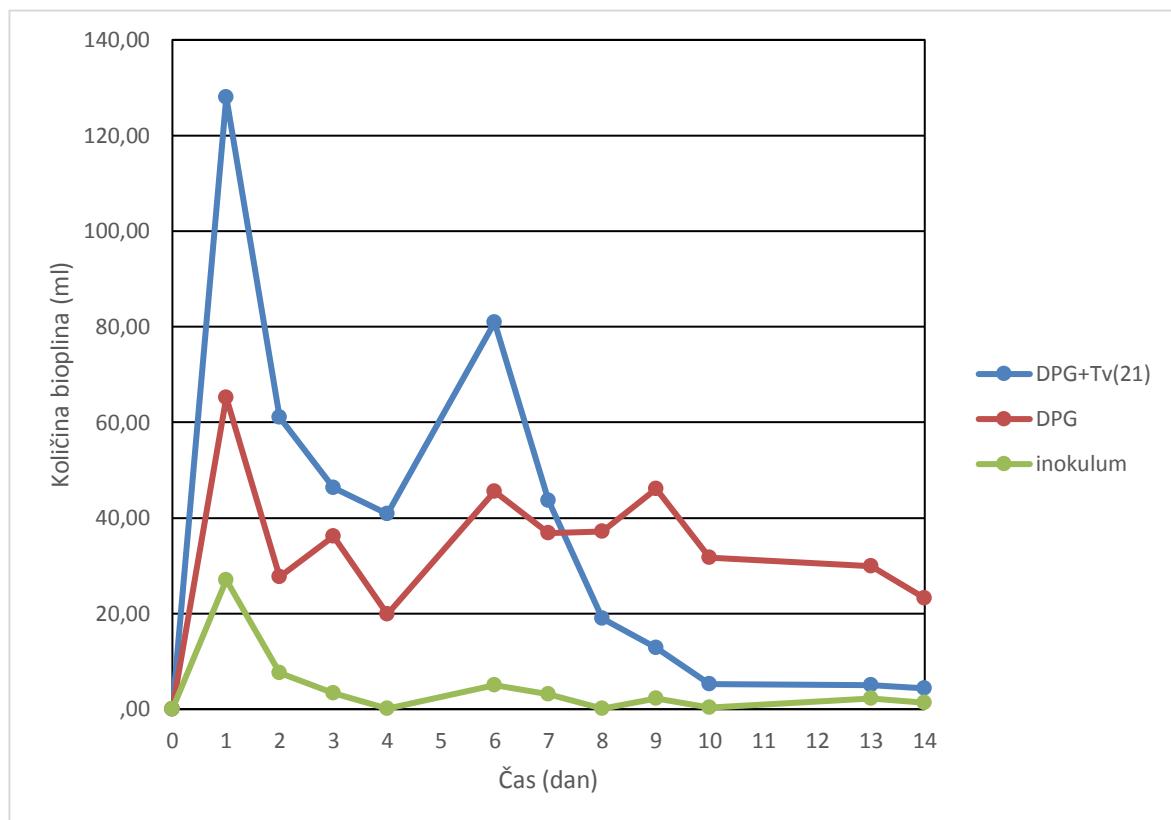
Volumen bioplina se pri preraščenem substratu (DPG+Tv) močno poveča prvi dan, kjer doseže volumen 121,2 ml. Nato postopno pada z rahlim povišanjem v 6. dnevu z 75,7 ml bioplina. Prav tako dosežeta svoj vrh v prvem dnevu tudi nepreraščen substrat (DPG) z 47,8 ml in inokulum z 31,6 ml bioplina. Količina pri DPG vzorcu, po prvem dnevu, počasi upada, vendar pa se rahlo poviša v 4. in 9. dnevu. Po 2. dnevu količina inokuluma pada, aktivnost le tega pa je do konca štirinajstih dni minimalna. Iz grafa je razvidno, da največ bioplina v 14. dneh nastane pri preraščenemu substratu (slika 13).



Slika 13: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 14 dni z glivo *Trametes versicolor*, kontrole DPG brez preraščanja in inokulum.

4.1.7 Količina dnevno nastalega bioplina z mešanico 21 dni preraščenega substrata z glivo *Trametes versicolor*

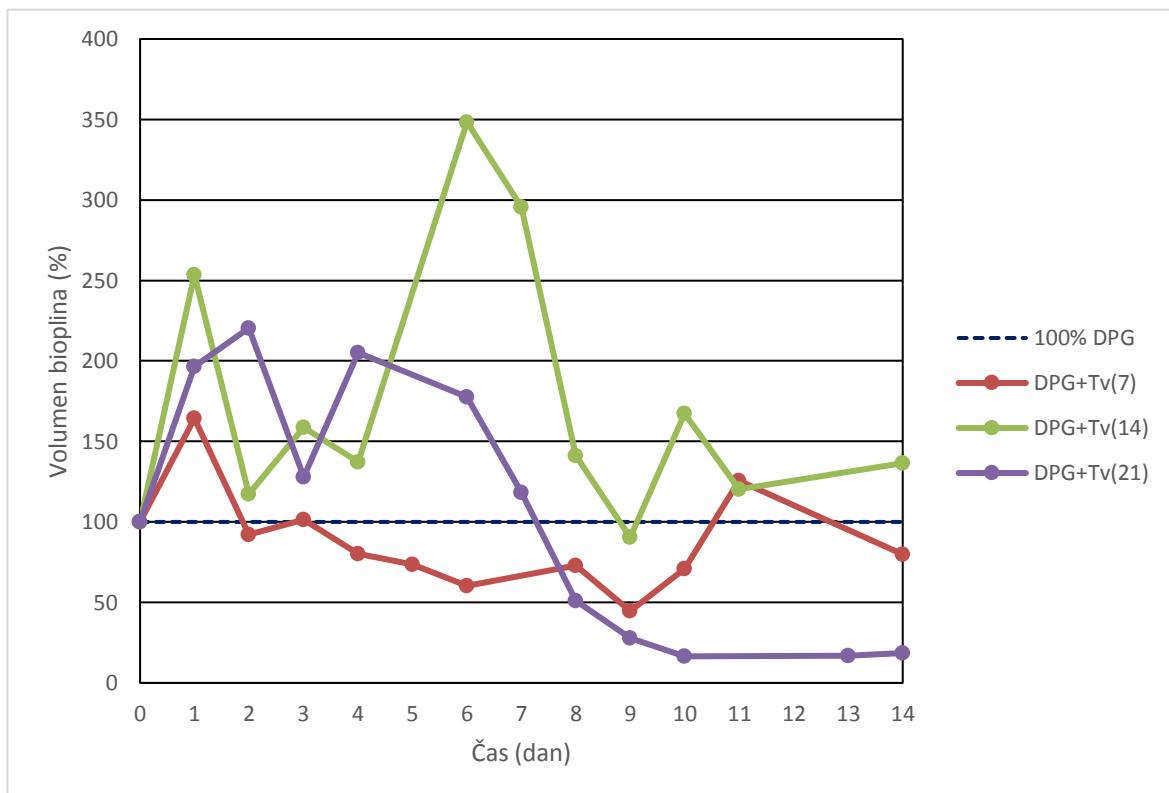
Od prvega do šestega dne nastane največ bioplina pri preraščenem substratu (DPG+Tv). Le tega v primerjavi z nepreraščenim vzorcem (DPG), nastane za 46 % več. Nato količina bioplina pri DPG-Tv vzorcu naglo pade, med 6. in 8. dnem, iz 80,9 ml na 18,9 ml. Količina bioplina DPG vzorca nastaja kontinuirano s povišanji v 1., 3., 6. in 9. dnevu. V 14. dnevu se količina bioplina v vzorcu DPG s preraščenim razlikuje za 18,9 ml. Inokulum ima značilno začetno rast v prvem dnevu, nato pa količina bioplina postopno pada z rahlim vzponom v 6. dnevu. Skupno vsem trem vzorcem je, da se jim poleg prvega dne, volumen poveča še 6. dan (slika 14).



Slika 14: Volumen nastalega bioplina v 24 urah z uporabo substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) preraščenega 21 dni z glivo *Trametes versicolor*, kontrole DPG brez preraščanja in inokuluma.

4.1.8 Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenimi substrati z glivo *Trametes versicolor* (7, 14 in 21 dni)

Najintenzvinejša produkcija bioplina je v prvem dnevu, pri vseh treh vzorcih. Najslabše nastaja bioplín pri vzorcu s substratom preraščenim 7 dni (DPG+Tv(7)), pri katerem od 2. do 10. dne nastane manj bioplina, kot v nepreraščenem substratu (DPG). 13. dan se količina bioplina v tem vzorcu rahlo poveča in seže nad količino DPG, vendar pa do 14. dne zopet postopno pada. Največ bioplina proizvede vzorec s substratom preraščenim 14 dni (DPG+Tv(14)). Le v 9. dnevu pade za slabih 10 % pod vrednostjo DPG. Pri vzorcu s substratom preraščenim 21 dni (DPG+Tv(21)), je produkcija bioplina v primerjavi z DPG večja do 7. dne. Nato pa ta naglo pade za slabih 70 % in po 8. dnevu, od vseh treh vzorcev, proizvede najmanj bioplina (slika 15).



Slika 15: Primerjava količin dnevno nastalega bioplina v % med nepreraščenim substratom in različno preraščenimi substrati z glivo *Trametes versicolor* (7, 14 in 21 dni), kot tudi primerjava različno preraščenih vzorcev.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, če lahko s predhodno izpostavitvijo vhodnega substrata glivam bele trohnobe vplivamo na doprinos bioplina v procesu anaerobne digestije. Ena prvih ovir, ki se pojavi v procesu AD in od katere je tudi odvisna nadaljna produkcija bioplina, je sestava vhodnega lignoceluloznega materiala. Ta se sestoji iz celuloze in hemiceluloze ter lignina. Ta je zaradi svoje kompleksne strukture za marsikatere mikroorganizme težko razgradljiv, s čimer imajo ti oviran dostop do celuloze. Edini organizmi, ki uspešno razgradijo lignin so glive bele trohnobe. Predobdelava je eden od načinov, kako povečati dostopnost celuloznega materiala, ki predstavlja bakterijam vir energije za producijo metana.

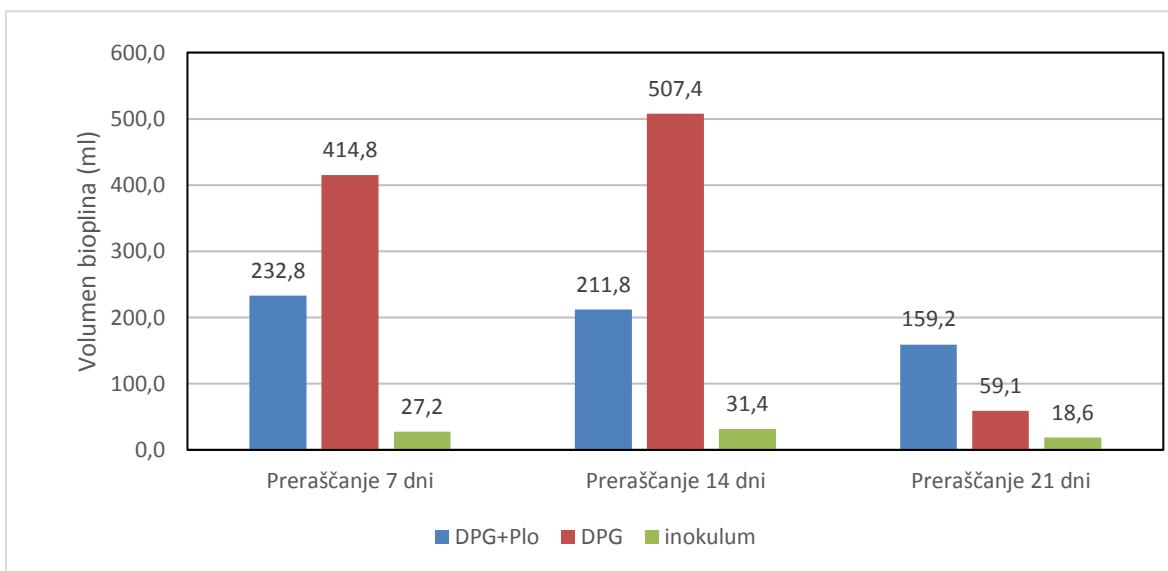
Za vhodni substrat smo vzeli mešanico japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) v razmerju 60:40. Ker nas je zanimalo kako časovno različno preraščen substrat vpliva na produkcijo bioplina, smo le tega izpostavili delovanju dvema različnima gobama bele trohnobe, bukovemu ostrigarju (*Pleurotus ostreatus*) ter pisani ploskocevki (*Trametes versicolor*).

Preraščanju posameznih substratov nismo namenili toliko pomena, kar se je izkazalo za ne tako učinkovito potezo. V začetku gliva prerašča iz ceipiča parcialno. Okoli ceipiča se po površini različno hitro razrašča micelij. V samih kozarcih s DPG, ki smo jih izpostavili delovanju glive, smo po določenem času opazili neneakomerno preraščenost. Substrat smo vseeno uporabili po 7., 14. in 21. dneh preraščanja. Bolj smotorno bi bilo vsebino premešati in tako omogočiti inokulacijo celotnega substrata z micelijem. Hočev (2015), je prišel do ugotovitve, da je to najprimernejše storiti, ko meri micelij okoli ceipiča od 1 do 2 cm, med 4. in 6. dnem po inokulaciji.

Najprej se pojavi značilen vrh, ki nakazuje povečano količino bioplina že v samem začetku procesa. V našem primeru se je to zgodilo pri vseh vzorcih, ne glede na to ali gre za predhodno obdelan ali neobdelan substrat ali za inokulum. Same sestave bioplina nismo določali, zato smo se zanašali le na predhodno narejene meriteve Nemetove (2009). Te kažejo na to, da delež CO₂ v začetku procesa narašča, nato pa začne sorazmerno padati s povečanjem deleža metana. Na podlagi tega lahko predvidevamo, da se na začetku procesa sprošča CO₂, pa čeprav smo na začetku s prepihovanjem z argonom ustvarili anaerobne pogoje v digestoriju. Verjetno to nismo naredili dovolj temeljito in tako ostane v naših vzorcih še nekaj kisika, s čemer so omogočeni na začetku aerobni pogoji. V tistih, ki vsebujejo preraščen substrat, lahko te razmere takoj izkoristijo glive, ki kisik porabijo za dihanje. Produkt takega dihanja je nastanek CO₂. Po drugi strani pa se lahko zgodi, da se naš plin, s katerim prepihamo digestorje, še nekaj časa izloča iz procesa in tako poveča

začetni volumen bioplina. Po ugotovitvah Belšak Šelove (2015) pa je lahko izrazito začetno povečanje volumna bioplina tudi posledica lahkó dostopnih enostavnih spojin (monosaharidov in aminokislin) iz vhodnih substratov. Te spojine lahko mikroorganizmi porabijo še pred pričetkom hidrolize in acidogeneze.

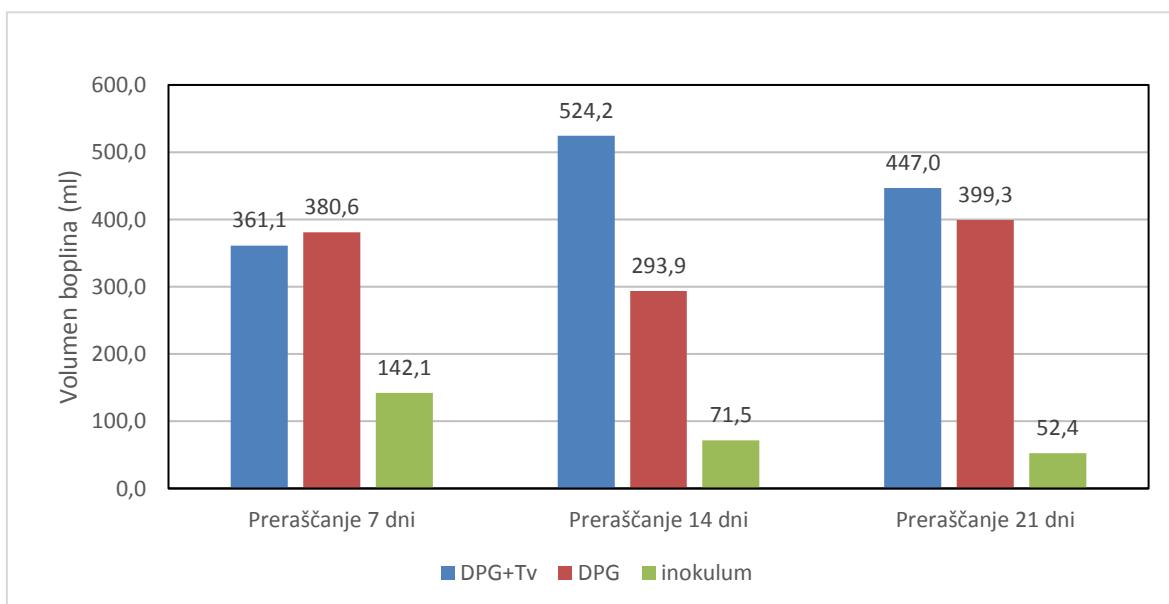
V prvi fazi smo primerjali, kako različno preraščen substrat z glivo bukovega ostrigarja vpliva na produkcijo bioplina. Opazili smo, da je so najbolj produktivni vzorci s substratom preraščenim 21 dni. Količina bioplina se je v primerjavi z nepreraščenim substratom povečala za 63 %. Sama količina nastalega bioplina, v primerjavi z vzorcema 7 in 14 dni preraščenim substratom, pa je bistveno manjša (slika 16). Razlog za to leži v zelo majhnem donosu bioplina po 9. dnevu, kjer je v povprečju nastalo 0,6 ml bioplina na dan (slika 10). Ker ne vemo kakšna je bila sestava bioplina v tistem trenutku in kakšen je bil pH v vzorcih, lahko samo sklepamo, zakaj je prišlo do zaviranja anaerobne digestije. Ravno zaradi tega, bi bilo smotrno spremljati tudi pH vzorcev.



Slika 16: Primerjava skupnih volumnov nastalega bioplina po 14. dnev ob uporabi različno preraščenega substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) z glivo *Pleurotus ostreatus* ter volumnov DPG brez preraščanja in inokulumov.

Domnevamo, glede na dosedanje raziskave, da bi z glivo dobro preraščen substrat proizvajal več bioplina in da bo slaše preraščen substrat proizvajal ravno toliko bioplina, če ne malo več kot nepreraščen substrat. V našem primeru s 7 in 14 dni preraščenima substratoma se je to izkazalo za napačno domnevo (sliki 8 in 9). Kaj ti v nepreraščenem substratu je nastalo za 44 % več bioplina kot v 7 dni z ostrigarjem preraščenem substratu. Ravno tako je v 14 dni preraščenem substratu nastalo za 58 % manj bioplina kot v nepreraščenem. Glede na to, da je bil vpliv inokuluma v obeh primerih minimalen, lahko samo sklepamo, da je razlog za tako nizko produkcijo bioplina, v teh dveh primerih, prisotnost glive (slika 16).

Nekoliko bolje se je pri produkciji bioplina izkazal substrat preraščen s pisano ploskocevko. Količinsko je največ bioplina nastalo pri vzorcih s substrati, preraščenimi 14 in 21 dni. Najslabše je bioplín nastajal pri vzorcu s 7 dñi preraščenim substratom, ki je po skupno nastalem volumnu za nepreraščenim zaostajal le za 19,5 ml. Tudi iz slike 12 je razvidno, da so bile razlike v dnevnom nastajanju bioplina minimalne. Iz tega lahko predvidevamo, da je bil naš substrat v začetku zelo slabo preraščen. Iz slik 13 in 14 lahko vidimo zelo podobno dinamiko dnevno nastajajočega bioplina do šestega dne, tako pri 14 dni kot 21 dni preraščenemu substratu. Kljub vsemu pa je 14 dni preraščen substrat proizvedel največ bioplina, tako glede na nepreraščen substrat, kot tudi na 21 dni preraščen substrat. Pri slednjem je nastalo le za 11 % več bioplina kot pri nepreraščenem substratu (slika 17). Sklepamo lahko, da je do tega prišlo zaradi malo slabše z glivo (micelijem) preraščenega substrata.



Slika 17: Primerjava skupnih volumnov nastalega bioplina po 14. dnev ob uporabi različno preraščenega substrata iz japonskega dresnika in piščančjega gnoja (DPG) z glivo *trametes versicolor* ter volumnov DPG brez preraščanja in inokulumov.

5.2 SKLEPI

Predobdelava, z glivama bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) in pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*), poveča količino nastalega bioplina.

Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) bolj vpliva na količino proizvedenega bioplina kot pa bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*).

Različni čas preraščanja substrata prav tako vpliva na količino nastalega bioplina. Z daljšim časom preraščanja, se proizvede več bioplina.

6 POVZETEK

Pridobivanje bioplina iz biomase s procesom anaerobne digestije, je ena od rešitev, s katero bi lahko zmanjšali izpuste toplogrednih plinov, ki nastajajo z izgorevanjem fosilnih goriv. Z uporabo rastlinske biomase in živinskega gnoja, pa lahko zmanjšamo tudi količino rastlinskih in drugih odpadkov živilsko-predelovalne industrije ter jih v procesu anaerobne digestije pretvorimo v energijo in bogato gnojilo.

Problem v Perutnini Ptuj so odpadki, ki nastanejo v obratu pri prireji piščancev. Težava je tako v količini, kot v prepočasni razgradnji odpadkov. V teh so poleg piščančjega gnoja še lesni oblanci in žagovina, ki ju pri prireji uporabljajo za nastilj. Le ti so zaradi svoje kemične zgradbe, zavarovani pred napadom bakterij, saj jih te ne moreje razgraditi. Zato je tako nastilje idealno za preprečevanje in širjenje baketrijskih okužb perutnine, a hkrati predstavlja oviro pri produkciji bioplina v njihovi bioplinalni v Dražencih. Zato je potrebno PG predhodno obdelati (kemično, fizikalno, biološko ali kombinirano), da postane dostopnejši za anaerobne bakterije, ki ga v nadalnjih procesih izrabljajo za produkcijo metana. Najcenejši in okolju prijazen način predobdelave je z uporabo gliv bele trohnobe, ki so edine sposobne razgradnje lignina.

Zato smo v diplomskem delu žeeli ugotoviti ali lahko s predobdelavo z GTB vplivamo na doprinos bioplina. Odločili smo se za uporabo mešanice piščančjega gnoja in japonskega dresnika (*Fallopia japonica*), ki sta bila v razmerju 60:40. S takim razmerjem smo zagotovili, da je gliva še vedno preraščala, hkrati pa smo zagotovili optimalno porabo piščančjega gnoja. Za predobdelavo smo uporabili lesni glivi, bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*) in pisano ploskocevko (*Trametes versicolor*), ki sta preraščala substrat 7, 14 in 21 dni. Po končanem preraščanju, smo mešanici dodali gnojevko, bogato z anaerobnimi bakterijami ter naše vzorce izpostavili anaerobnim pogojem. V štirinajstih dneh smo spremljali nastajanje bioplina v, za te namene sestavljenem anaerobnem digestorju.

Ugotovili smo, da predobdelava z glivami bele trohnobe, vpliva na povečano produkcijo bioplina. Vendar bukov ostrigar in pisana ploskocevka različno vplivata na količino proizvedenega bioplina. Prav tako je različno vplival na nastanek bioplina tudi čas preraščanja. Pri bukovem ostrigarju je najbolje deloval substrat prerščen 21 dni, pri pisani ploskocevki pa substrat, preraščenemu 14 dni.

7 VIRI

- Al Seadi T. A., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S., Janssen R., Grmek M. 2010. Priročnik o bioplinu. Ljubljana, Agencija za prestrukturiranje energetike, d.o.o. Ljubljana: 144 str.
- Anderson K., Sallis P., Uyanik S. 2003. Anaerobic treatment processes. V: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Mara D., Horan N. (eds.). London, Academic Press: 391-426
- Antognoni S. , Ragazzi M. , Rada E. C. , Plank R. , Aichinger P. , Kuprian M. , & Ebner C. 2013. Potential Effects of Mechanical Pre-treatments on Methane Yield from Solid Waste Anaerobically Digested. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 1: 20-25
- Belšak Šel N. 2015. Razgradnja lignocelulozne biomase z glivo Pleurotus ostreatus pred procesom anaerobne fermentacije v trdnem stanju. Doktorska disertacija. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 105 str.
- Bernik R., Zver A. 2006. Rastlina kot obnovljiv vir energije (OVE). Acta agriculturae Slovenica, 87, 2: 355-364
- Braun R. 2007. Anaerobic digestion: A multi-faceted process for energy, environmental management and rural development. V: Improvement of crop plants for industrial enduses. Ronalli P. Berlin, Springer: 335-416
- Demirel B., Scherer P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7: 173-190
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from Waste and Renewable Resources. Substrate and biogas. Weinheim, Wiley: 443 str.
- Frajman B., 2008. Japonski dresnik Fallopia japonica. Informativni list 1.
<http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF1-japonski-dresnik.pdf> (5. jun. 2016)
- Garnweidner E. 1989. Gobe: žepni gobarski vodnik. Ljubljana, Cankarjeva založba v Ljubljani: 258 str.
- Gregori A. 2013. Zdravilne gobe rastoče v Sloveniji. Ljubljana, Acta biologica Slovenica, 56, 2: 9-22
- Hammel K.E. 1995. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. V: Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals. Young L.Y., Cerniglia C.E. (ur.). New York, Wiley-Liss: 331-346

- Hammel K.E. 1997. Fungal degradation of lignin. V: Plant litter quality and decomposition. Cadisch G., Giller K.E. (ur.). Wallingford, CAB-International: 33–46
- Hočevar V. 2015. Obdelava lignoceluloznih materialov z lesnimi glivami za proizvodnjo bioplina. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 64 str.
- Howard R.D., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., Howard S. 2003. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. V: African Journal of Biotechnology, 2, 12: 602-619
- Humar M. 2008. Bukov ostrigar - užitna goba, ki jo lahko gojimo tudi doma. Les, 60, 9: 353
- Humar M., Tišler V. 1999. Lignin smrekovega lesa. Les, 51, 4: 85-90
- Jejčič V., Poje T., Orešek A. 2010. Uvod v pridobivanje in čiščenje bioplina do faze biometana ter možnosti njegove uporabe. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 18 str.
- Kalan Ž. 2010. Ugotavljanje primernosti mešanice piščančjega gnoja in biomase hitro rastočih rastlin za rast micelija lesnih gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij agronomije: 40 str.
- Karim K., Klasson T., Hoffmann R., Drescher S.R., DePaoli D.W., Al-Dahhan H. 2005. Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mixing. Bioresource Technology, 96: 1607–1612
- Kelleher B.P., Leahy J.J., Henihan A.M., O` Dwyer T.F., Sutton D., Leahy M.J. 2001. Advances in poultry litter disposal technology – a review. Bioresource Technology, 83: 27-36
- Khanal S.K.. 2008. Environmental Factors. V: Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications. Khanal S.K. (ur.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 43-64
- Kirk T.K., Cullen D. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. V: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Young R.A., Akhtar M. (ur.). New York, John Wiley and sons, Inc.: 273-307
- Koprivnikar M. 2010. Pridobivanje biomase. Ljubljana, Biotehniška šola Maribor: 27 str.
- Kroeker E.J., Schulte D.D., Sparling A.B., Lapp H.M. 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. Journal of Water Pollution Control Federation, 51, 4: 718-727
- Kumar P., Barrett D., Delwiche M., Stroeve P. 2009. Methods of pretreatment of lignocellulosic Biomass of efficient hydrolysis and biofuel production. Industrial and Engineering Chemistry Research, 48: 3713–3729

- Leštan D. 2001. Organska snov tal (študijsko gradivo).
<http://web.bf.uni-lj.si/cpvo/Novo/PDFs/OrganskaSnovTal.pdf> (5. maj 2016)
- Lusk P. 1998. Methane Recovery from Animal Manures The Current Opportunities Casebook. Springfield, U.S. Department of Energy: 150 str.
- Makovšek B. 2010. Pridobivanje premoga in fosilnih goriv. Ljubljana, Zavod IRC: 92 str.
- Marolt N. 2013. Geografski potencial energetske rastline *Miscanthus x giganteus* s povdarkom na pridelavi biogoriv v Sloveniji. Zaključna seminarska naloga. Ljubljana, Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo: 37 str.
- Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérrez A., del Río J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, 8: 195-204
- McMillan, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. V: Enzymatic conversion of biomass for fuels production. Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P (ur.). Washington, American Chemical Society: 292-324.
- Monnet F. 2003. An introduction to Anaerobic Digestion of Organic wastes. Final Report Biogasmax. Remade Scotland: 47 str.
- Nemet A. 2009. Anaerobna digestija mešanic japonskega dresnovca (*Polygonum cuspidatum*) in piščančjega gnoja obdelanih z glivo *Pleurotus ostreatus*. Diplomska naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Kemijska tehnologija: 67 str.
- Pačnik L. 2016. Razlike v izbranih ekofizioloških značilnostih japonskega in češkega dresnika. Magistersko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerzitetni podiplomski študij Varstva okolja: 109 str.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Journal of the Spanish Society for Microbiology: 5, 2: 53–63
- Pohleven F. 2008. Pisana ploskocevka: najbolj pogosta lesna goba. Les, 60, 3: 115
- Pohleven F. 2013. Ali je les smiselno kuriti? V: Zbornik prispevkov energetika v kmetijstvu. Podgoršek J., Hrovat I. (ur.). Novo Mesto, Grm Novo mesto – center biotehnike in turizma: 11-15
- Polizeli M.L.M.T., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 67: 577-91

Raspor P., Smole Možina S., Podjavoršek J., Pohleven F., Gogala N., Nekrep F.V., Rogelj I., Hacin J. 1995. Zbirka industrijskih mikroorganizmov Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo: 98 str.

Rouches E., Herpoël-Gimbert I., Steyer J.P., Carrere H. 2016. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 59: 179-198

Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology Advanced, 27, 2: 185–194

Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko. Ljubljana, Oddelek za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani: 176 str.

Serna E. 2009. Anaerobic Digestion Process. Waste-to-Energy Research and Technology Council (25. nov. 2009).
<http://www.wtert.eu/default.asp?Menue=13&ShowDok=12> (9. jul. 2016)

Stamets P., Chilton J. 1983. The Mushroom Cultivator: A Practical Guide for Growing Mushrooms at Home. Olympia, Washington, Agarikon Press: 415 str.

Tišler V., Pavlič M. 2000. Lesne polioze listavcev. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 61: 121-142

Ulčnik A. 2009. Ugotavljanje remediacijskega potenciala ligninolitičnih gliv za razgradnjo lindana. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije. 49 str.

Yadvika S., Sreekrishnan T.R., Kohli S., Rana V. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques - a review. Bioresource Technology, 95: 1-10

Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y. 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. Progress in Energy and Combustion Science, 42: 35-53

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Francu Pohlevnu za vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge in recenzentu prof. dr. Rajku Berniku za strokovni pregled diplomske naloge.

Hvala tudi Maji Vauhnik Gabrič za vso pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala tudi družini, ki mi je podpirala in omogočila študij. Neži, Igorju, Ajdi in mami hvala za pomoč pri oblikovanju diplomskega dela.