

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maša ČATER

**OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE BIOPLINA IZ
LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA Z GRANULIRANO
ANAEROBNO BIOMASO IZ UASB BIOREAKTORJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**OPTIMIZATION OF BIOGAS PRODUCTION FROM
LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATE WITH GRANULATED
ANAEROBIC BIOMASS FROM UASB BIOREACTOR**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobeno biotehnologijo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze z dne 20. 1. 2009 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študiju Bioznanosti s področja biotehnologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gregor Drago Zupančič

IOS d.o.o.; Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za znanosti o okolju

Član: prof. dr. Miha Humar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora: 22. oktober 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija 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.

Maša Čater, univ. dipl. bioteh.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 606:620.951:628.336.6(043.3)
KG bioplil/lignoceluloza/tropine/hidroliza/*Pseudobutyrivibrio xylanivorans* Mz5^T
/Clostridium cellulovorans/Fibrobacter succinogenes S85/encimi
AV ČATER, Maša, univ. dipl. biotehnologinja
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
BIOZNANOSTI, znanstveno področje: biotehnologija
LI 2015
IN OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE BIOPLINA IZ LIGNOCELULOZNEGA
SUBSTRATA Z GRAULIRANO ANAEROBNO BIOMASO IZ UASB
REAKTORJA
TD Doktorska disertacija
OP XIII, 95, [36] str., 22 pregl., 19 sl., 4 pril., 245 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Lignocelulozni substrati so na voljo v velikih količinah, vendar v bioplinski proizvodnji niso pogosto uporabljeni zaradi slabe anaerobne razgradnje. S testom biometanskega potenciala smo raziskali možnosti izboljšanja bioplinske proizvodnje z bioaugmentacijo s hidrolitskimi bakterijami *Pseudobutyrivibrio xylanivorans* Mz5^T, *Clostridium cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85, individualno ali v kokulturah. Kot vir aktivnih mikroorganizmov smo uporabili anaerobno mikrobično biomasso iz bioreaktorja UASB Čistilne naprave Laško, pivovarske tropine pa so predstavljalje modelni lignocelulozni substrat. Testirali smo tudi možnosti izboljšanja bioplinske proizvodnje z dodajanjem komercialnih encimskih mešanic MethaPlus L120, MethaPlus 100 in Axiase 100 v različnih doziranjih. Za najučinkovitejšo izboljšavo bioplinskega procesa se je izkazala bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T. Izmed testiranih encimskih mešanic je bila najučinkovitejša Axiase 100. Za aplikacijo v bioplinalnah so potrebna nadaljnja testiranja v pilotnem in industrijskem merilu, natančnejša opredelitev najmanjše količine dodajanja bakterij ali encimov za še zadovoljivo povečanje proizvodnje metana in s tem minimiziranje stroškov obdelave lignoceluloznega substrata.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
DC UDC 606:620.951:628.336.6(043.3)
CX biogas/lignocellulose/brewery spent grain/hydrolysis/*Pseudobutyryvibrio xylanivorans* Mz5^T /*Clostridium cellulovorans*/*Fibrobacter succinogenes* S85/enzymes
AU ČATER, Maša
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field: biotechnology
PY 2015
TI OPTIMIZATION OF BIOGAS PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATE WITH GRANULATED ANAEROBIC BIOMASS FROM UASB REACTOR
DT Doctoral Dissertation
NO XIII, 95, [36] p., 22 tab., 19 fig., 4 ann., 245 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Lignocellulosic substrates are widely available but not frequently used for biogas production due to inefficient anaerobic degradation. Impact on accelerating biogas production by bioaugmentation with hydrolytic bacteria *Pseudobutyryvibrio xylanivorans* Mz5^T, *Clostridium cellulovorans* and *Fibrobacter succinogenes* S85 added individually or in cocultures, was determined by biochemical methane potential assay. Anaerobic microbial biomass from the Wastewater treatment plant Laško UASB bioreaktor was used as a source of active microorganisms and brewery spent grain as a model lignocellulosic substrate. Additions of different doses of commercial enzyme mixtures MethaPlus L120, MethaPlus 100 and Axiase 100 were tested, too. Bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T and continuous addition of Axiase 100 were the most successful treatments of lignocellulosic substrate for enhanced methane production. Further research at pilot and industrial level is needed to determine the smallest quantity of the bacteria or enzyme mixture added into the system for achieving desirable biogas production enhancement and minimize the cost of the lignocellulosic substrate treatment.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG	XII
SLOVARČEK.....	XIII

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DOKTORSKE DISERTACIJE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BIOPLIN IN NJEGOVA PROIZVODNJA.....	2
2.1.1 Stopnje bioplinskega procesa	2
2.1.2 Bakterijski in arhejski predstavniki posameznih faz anaerobne metanogeneze	3
2.1.3 Vrste bioplinskih reaktorjev.....	4
2.2 SUBSTRATI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA.....	6
2.2.1 Lignocelulozni odpadki.....	7
2.2.1.1 Pivovarske tropine	7
2.2.2 Zgradba lignoceluloznih materialov	8
2.2.3 Encimatična razgradnja lignoceluloznih materialov	9
2.3 POSTOPKI OBDELAVE LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV	10
2.3.1 Fizikalno-kemijski postopki predobdelave substrata	11
2.3.2 Biološki postopki predobdelave substrata	12
2.3.2.1 Ligninocelulolitične glive.....	12
2.3.2.2 Ligninocelulolitične bakterije.....	13
2.3.2.3 Ligninocelulolitični encimski pripravki	14
2.3.3 Ugotavljanje metanskega potenciala obdelanega substrata	15

2.4	MIKROBNA ZDRUŽBA V BIOPLINSKEM BIOREAKTORJU	16
2.4.1	Vpliv temperature	16
2.4.2	Vpliv pH	17
2.4.3	Obremenitev s substratom	17
2.4.4	Zadrževalni čas	17
2.4.5	Vpliv toksičnih intermediatov	18
2.4.6	Spremljanje sprememb v sestavi mikrobne združbe	18
2.4.6.1	Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)	19
2.4.6.2	PCR v realnem času	19
2.4.6.3	Gelska elektroforeza z denaturirajočim gradientom (DGGE)	20
2.4.6.4	Polimorfizem dolžin restriktijskih fragmentov (T-RFLP)	21
3	MATERIALI IN METODE	22
3.1	MATERIALI	22
3.1.1	Mikrobna biomasa	22
3.1.2	Lignocelulozni substrat	22
3.1.3	Anaerobne hidrolitske bakterije	22
3.1.4	Komercialne encimske mešanice	22
3.2	METODE	23
3.2.1	Priprava hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo bioplinskega procesa	23
3.2.1.1	Mikrobiološka gojišča za gojenje bakterij	23
3.2.1.2	Določanje koncentracije proteinov po Lowry-ju	25
3.2.1.3	Analiza encimske aktivnosti	25
3.2.2	Test biometanskega potenciala (BMP)	26
3.2.2.1	Analiza suhe in organske snovi mikrobne biomase in substrata	27
3.2.2.2	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	27
3.2.2.3	Shema testov BMP in analiz strukture mikrobne združbe	28
3.2.2.4	Priprava mešanic za laboratorijske teste BMP	29
3.2.2.5	Priprava mešanic za pilotno testiranje bioaugmentacije	31
3.2.3	Spremljanje parametrov bioplinskega procesa	32
3.2.3.1	Analiza sestave in volumna nastalega bioplina	33
3.2.3.2	Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)	34

3.2.3.3	Vrednost pH	35
3.2.4	Analize sprememb v sestavi mikrobne združbe	35
3.2.4.1	Izolacija DNA.....	35
3.2.4.2	Polimorfizem dolžin terminalnih restriktivskih fragmentov (T-RFLP)	36
3.2.4.3	Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE)	38
3.2.4.4	Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR).....	39
3.2.5	Statistična analiza rezultatov proizvodnje metana	41
4	REZULTATI	42
4.1	LASTNOSTI MIKROBNE BIOMASE IN SUBSTRATA	42
4.2	ENCIMSKE AKTIVNOSTI IZBRANIH HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO.....	42
4.3	SESTAVA PLINSKIH PRODUKTOV ČISTIH KULTUR HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO.....	42
4.4	PROIZVODNJA KMK V ČISTIH KULTURAHH HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO.....	43
4.5	VREDNOSTI KPK V UPORABLJENIH TESTNIH MEŠANICAH	44
4.6	TESTI BMP Z BIOAUGMENTACIJO S HIDROLITSKIMI BAKTERIJAMI..	45
4.6.1	Bioaugmentacija s <i>P. xylanivorans</i> Mz5^T, <i>F. succinogenes</i> S85, <i>C. cellulovorans</i> in kokulturami (1. biološka ponovitev)	45
4.6.1.1	Proizvodnja bioplina in metana.....	45
4.6.1.2	Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin	47
4.6.1.3	Redukcija KPK.....	47
4.6.1.4	Rezultati analiz sestave mikrobne združbe	47
4.6.2	Bioaugmentacija s <i>C. cellulovorans</i>, individualno in v kokulti s <i>F. succinogenes</i> S85, ter s <i>P. xylanivorans</i> Mz5^T (2. biološka ponovitev)	49
4.6.2.1	Proizvodnja bioplina in metana.....	49
4.6.2.2	Statistična analiza rezultatov	50
4.6.2.3	Vrednost pH	53
4.6.2.4	Redukcija KPK.....	53
4.6.2.5	Sledenje <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T in <i>C. cellulovorans</i> v mešani anaerobni mikrobeni združbi z DGGE	53
4.6.2.6	Kvantitativno sledenje <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T v mešani anaerobni mikrobeni združbi z metodo qPCR.....	54

4.6.3 Pilotni test BMP z bioaugmentacijo s kokulturo <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	55
4.6.3.1 Proizvodnja bioplina in metana.....	55
4.6.3.2 Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin.....	56
4.6.3.3 Redukcija KPK	56
4.7 TESTI BMP Z DODAJANJEM KOMERCIALNIH ENCIMSKIH MEŠANIC METHAPLUS L100, METHAPLUS L120 IN AXIASE 100	57
4.7.1 Proizvodnja bioplina in metana	57
4.7.2 Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin.....	61
4.7.3 Redukcija KPK	61
4.7.4 Rezultati analiz sestave mikrobine združbe	61
4.7.5 Statistična analiza rezultatov	59
5 RAZPRAVA	62
6 SKLEPI	70
7 POVZETEK (SUMMARY)	71
7.1 POVZETEK	71
7.2 SUMMARY	72
8 VIRI.....	75

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Raznolikost sestave pivovarskih tropin	8
Pregl. 2: Primeri aerobnih in anaerobnih gliv, ki izločajo celulaze, ksilanaze in različne peroksidaze za razgradnjo lignoceluloze.....	12
Pregl. 3: Primeri aerobnih in anaerobnih bakterij, ki so sposobne razgradnje lignoceluloze.	13
Pregl. 4: Sestava gojišča M2 za gojenje hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo.....	24
Pregl. 5: Sestava ogljikovih hidratov v modificiranem inducibilnem gojišču M2 za gojenje hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo.	24
Pregl. 6: Sestava reagentov Lowry A in B.	25
Pregl. 7: Sestava reagenčne mešanice PAHBAH.....	26
Pregl. 8: Sestava raztopin 1 in 2 za pripravo fosfatnega pufra za test BMP.	31
Pregl. 9: Sestava kalibracijske mešanice KMK za plinsko kromatografijo.	34
Pregl. 10: Sestava raztopin za klasično metodo izolacije DNA čistih kultur.	36
Pregl. 11: Sestava mešanice PCR za analizo T-RFLP.	36
Pregl. 12: Programa PCR za pomnoževanje bakterijskih in arhejskih genov 16S rRNA za analizo T-RFLP.	37
Pregl. 13: Program PCR za pomnoževanje bakterijskih genov 16S rRNA za analizo DGGE.	39
Pregl. 14: Sestava raztopin za DGGE.....	39
Pregl. 15: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za sledenje <i>P. xylanivorans</i> Mz5T z metodo qPCR.	40
Pregl. 16: Program qPCR za pomnoževanje odseka enolaznega gena <i>P. xylanivorans</i> Mz5T.....	40
Pregl. 17: Encimske aktivnosti izbranih hidrolitskih bakterij za bioaugmentacije.	42
Pregl. 18: Vrednosti KPK obeh inducibilnih gojišč M2 in v njih nagojenih bakterijskih kultur za bioaugmentacijo.....	45
Pregl. 19: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih na 30. dan testa BMP z bioaugmentacijo s <i>P. xylanivorans</i> Mz5, <i>F. succinogenes</i> S85 in <i>C. cellulovorans</i> pri dveh ponovitvah (I in II).	46
Pregl. 20: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih na 30. dan testa BMP z bioaugmentacijo s <i>C. cellulovorans</i> , individualno in v kokulturi s <i>F. succinogenes</i> S85, ter s <i>P. xylanivorans</i> Mz5	49
Pregl. 21: Proizvodnja bioplina v pilotnih bioreaktorjih v času pilotnega poskusa.	55
Pregl. 22: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih 30. dan testa BMP z dodajanjem MethaPlus L100, MethaPlus L120 in Axiase 100...	58

KAZALO SLIK

Sl. 1: Shema bioplinskega procesa s predstavitevijo glavnih korakov in intermediatov.....	3
Sl. 2: Nekaj pogosto uporabljenih vrst bioreaktorjev za proizvodnjo bioplina.....	5
Sl. 3: Priprava testnih mešanic bioreaktorjev za test BMP.....	28
Sl. 4: Optimizacije bioplinske proizvodnje iz pivovarskih tropin z različnimi vrstami bioaugmentacije in z dodajanjem encimov ter molekularne analize sestave mikrobine združbe.....	30
Sl. 5: Pilotna bioreaktorja s pretočnimi merilniki nastalega bioplina, črpalkami odpadne vode in steklenima kivetama za vzorčenje bioplina za nadaljnje analize sestave bioplina.....	32
Sl. 6: Časovni prikaz dodatnega spremljanja parametrov bioplinskega procesa testov BMP.....	33
Sl. 7: Postopek merjenja volumna nastalega bioplina z manometrom na vodni stolpec in brizgalko.....	34
Sl. 8: Sestava plinov, ki jih producirajo čiste kulture bakterij, uporabljenih za bioaugmentacijo.....	43
Sl. 9: Deleži kratkoverižnih maščobnih kislin v čistih kulturah bakterij, uporabljenih za bioaugmentacijo.....	43
Sl. 10: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorjih na dan 0, ki izvirajo zgolj iz bioaugmentacije s čistimi kulturami izbranih bakterij.....	44
Sl. 11: Vpliv bioaugmentacije (združeni rezultati) s <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T , <i>F.</i> <i>succinogenes</i> S85, <i>C. cellulovorans</i> ali z njihovimi kokulturami na povečanje proizvodnje metana na g KPK _{substrata} glede na kontrolni bioreaktor, ki je vseboval tropine in neinokulirano gojišče.....	47
Sl. 12: Profili DGGE vzorcev iz bioreaktorjev in pomnožkov DNA čistih kultur dodanih bakterij.....	48
Sl. 13: Vpliv bioaugmentacije s <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T , <i>C. cellulovorans</i> ter kokulturo <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85 na povečanje proizvodnje metana na g KPK _{substrata} glede na kontrolni bioreaktor, ki je vseboval tropine in neinokulirano gojišče.....	50
Sl. 14: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK _{substrata} v bioreaktorjih z dodanim živim in mrtvim <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T ter živo in mrtvo kokulturo <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85.....	51
Sl. 15: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK _{substrata} v bioreaktorjih z dodanim živim in mrtvim <i>C. cellulovorans</i> ter živo in mrtvo kokulturo <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85.....	52
Sl. 16: Rezultati DGGE analize mikrobine združbe iz bioreaktorja ob različnih časih testa BMP in identifikacija <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T ter <i>C. cellulovorans</i> na podlagi pomnožkov DNA čiste kulture.....	53

Sl. 17: Prikaz upadanja količine genomske DNA <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T v bioreaktorju po dodatku v bioreaktor v času testa BMP.....	55
Sl. 18: Redukcija KPK v kontrolnem bioreaktorju in bioreaktorju z dodano kokulturo ob koncu pilotnega testa BMP.....	56
Sl. 19: Združeni rezultati vpliva dodajanja encimskih mešanic na povečanje proizvodnje metana na g KPK _{substrata} glede na kontrolne bioreaktorje s samimi tropinami.....	58

KAZALO PRILOG

Priloga A – Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami

Priloga B – Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5, *C. cellulovorans* ter kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85

Priloga C – Bioaugmentacija s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 na pilotnem nivoju

Priloga D – Rezultati testov BMP z dodajanjem MethaPlus L100, MethaPlus L120 in Axias 100

SLOVARČEK

- ABR - anaerobni bioreaktor s preprekami
AFFR - anaerobni bioreaktor s fiksiranim filmom
ARDRA - analiza razrezanih pomnožkov ribosomske DNA
BMP – biokemijski metanski potencial
CSTR - bioreaktor s popolnim mešanjem
 C_T – prag detekcije signalov pomnožkov qPCR
DGGE – denaturirajoča gradientna gelska elektroforeza
DNA – deoksiribonukleinska kislina
FISH – fluorescenčna *in situ* hibridizacija
KMK – kratkoverižne maščobne kisline
KPK – kemijska potreba po kisiku
OS – organska snov
PCR – verižna reakcija s polimerazo
qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RISA - analiza ribosomske medgenske razdalje
RNA – ribonukleinska kislina
rRNA – ribosomalna ribonukleinska kislina
SS – suha snov
SSCP - polimorfizem konformacije enojnih verig
TGGE – temperaturna gradientna gelska elektroforeza
T-RFLP - polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
UASB - mezofilni bioreaktor z muljno posteljico

1 UVOD

1.1 NAMEN DOKTORSKE DISERTACIJE

Namen doktorske disertacije je bil najti učinkovit način biološke obdelave lignoceluloznega substrata za povečanje proizvodnje bioplina iz pivovarskih tropin. S testom biometanskega potenciala (BMP) smo ovrednotili učinek bioaugmentacije z anaerobnimi hidrolitskimi bakterijami *Pseudobutyrivibrio xylanivorans* Mz5^T, *Clostridium cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85 in ter učinke dodajanja encimskih mešanic MethaPlus L120, MethaPlus 100 in Axiase 100 na proizvodnjo bioplina. Nekatere učinkovite bioaugmentacije z izbranimi bakterijami smo testirali tudi na pilotnem nivoju. Učinke različnih optimizacij bioplinske proizvodnje iz lignoceluloznega substrata smo spremljali tudi na nivoju mikrobnih združb, katerih sestavo smo analizirali s sodobnimi molekularnimi tehnikami.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Z bioaugmentacijo z izbranimi hidrolitskimi bakterijami se bo proizvodnja bioplina iz pivovarskih tropin zaradi učinkovitejše razgradnje lignoceluloznega substrata povečala.
- Predhodna indukcija celulaz in ksilanaz bo dodanim bakterijam pomagala hitreje razgraditi substrat, zaradi česar bo proizvodnja metana v prvih dneh v bioaugmentiranih bioreaktorjih hitrejša in končni volumen nastalega metana večji.
- Predvidevamo, da bomo bioaugmentacijo iz laboratorijskega nivoja uspešno prenesli tudi na pilotni nivo.
- Gojišče, ki pride v bioreaktor pri bioaugmentaciji, predstavlja anaerobnim bakterijam v bioplinski mikrobeni združbi dodaten vir hrani, zato predvidevamo, da se proizvodnja bioplina prav tako poveča od dodatku neinokuliranega gojišča, vendar v manj kot pri dodatku bakterij.
- Dodatek encimskih mešanic bo izboljšal razgradnjo substrata in s tem povečal bioplinsko proizvodnjo, pri čemer bo povečevanje doziranja encimskih mešanic vplivalo na povečevanje proizvodnje bioplina.
- V sestavi bakterijske združbe pričakujemo večje spremembe kot v arhejski, saj so bakterije v bioplinskih reaktorjih veliko številčnejše, vršijo več korakov bioplinskega procesa kakor arheje in hitreje rastejo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLIN IN NJEGOVA PROIZVODNJA

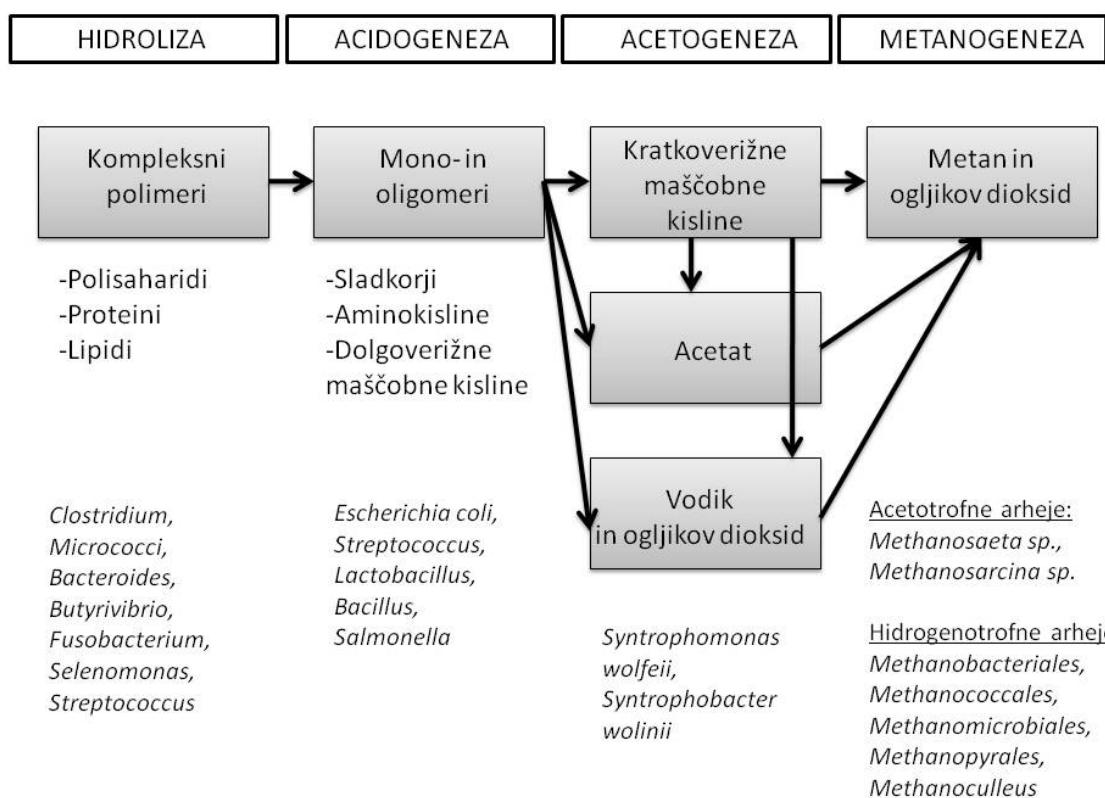
Bioplín je postal zanimiv že leta 1779, ko je Alessandro Volta (1777) nad jezerom Como (Italija) zajel in osamil metan ter ugotovil, da je vnetljiv. Bioplinska znanost se je nato razvijala predvsem v dveh smereh: a) proizvodnja bioplina iz živalskega gnoja in gospodinjskih ostankov in b) uporabnost anaerobne razgradnje za stabilizacijo blata iz čistilnih naprav. Zadnja leta pa se težnja raziskav, poleg povečevanja izplenov bioplina, premika tudi v smer povečevanja dezinfekcijske sposobnosti anaerobne predelave, saj je za vračanje iztoka iz bioplinskega reaktorja na kmetijske površine za namene gnojenja pomembna odsotnost patogenov v njem. Zato postajajo termofilni anaerobni procesi razgradnje vedno popularnejši. Anaerobna razgradnja različnih ostankov omogoča zmanjšanje količine organskih ostankov, ki končajo na odlagališčih, recikliranje organskega materiala in hrani, zmanjšano porabo energije in celo proizvodnjo obnovljive energije (Ahring, 2003).

Bioplín je sestavljen iz 55-65 % metana, 35-45 % ogljikovega dioksida, 1 % dušika, 5 % vodika, 0,3 % vodne pare, vodikovega sulfida in ogljikovega monoksida v sledovih (Yadava in Hesse, 1981; Rasi in sod., 2007). Predstavlja končni produkt razgradnje organskega materiala v odsotnosti kisika in obnovljivo energijo, ki je uporabna za nadaljnjo proizvodnjo elektrike ali toplice. Ponavadi prav vsebnost metana narekuje nadaljnjo uporabo bioplina. Bioplín, ki vsebuje do 60 % metana, se navadno zažge za energetske namene. Očiščen bioplín pa ima podobno sestavo kot zemeljski plin in je uporaben kot gorivo. Z ločevanjem plinske mešanice s posebnimi sistemi in membranskimi moduli lahko povečamo delež metana do 95 %; tak bioplín se uporablja za pridobivanje elektrike in v motorjih z notranjim izgorevanjem (Gassanova in sod., 2006; Bochiwal in sod., 2010; Verstraete, 2010; Tsavkelova in Netrusov, 2012).

2.1.1 Stopnje bioplinskega procesa

Za anaerobno razgradnjo organske snovi (OS), ki v naravi lahko poteka v sedimentih, poplavljenih poljih in v vampu prežekovalcev, so odgovorni različni mikroorganizmi (Zinder, 1993). Po ključnih nalogah, ki jih opravlja, jih lahko razdelimo na hidrolitske, acidogene in acetogene bakterije ter hidrogenotrofne in acetotrofne metanogene arheje. Hidrolitske bakterije razgrajujejo polimere ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov in iz njih proizvajajo monomere in oligomere kot so enostavni sladkorji, aminkokisline in dolgorižne maščobne kisline (Slika 1). Acidogene bakterije iz produktov hidrolitske faze proizvajajo vodik, acetat in kratkoverižne maščobne kisline (KMK). Nato nastopi acetogena faza, kjer bakterije iz KMK proizvajajo vodik in acetat. V končni, metanogeni fazi pa se v proces vključijo arheje. Hidrogenotrofne arheje tvorijo bioplín iz vodika in ogljikovega dioksida, acetotrofne arheje pa iz acetata (Schink, 1992). V optimalnih bioplinskih procesih večinski ogljikov tokokrog poteka med hidrolitskimi in acidogenimi

bakterijami in acetotrofnimi arhejami, kjer se kar okrog 50 % razgrajenih polimerov preko monomerov pretvori v acetat in kar 70 % acetata v metan. V hidrolitski in acidogeni fazi je torej acetogeneza povečana, saj vodika in ogljikovega dioksida nastane le 19 % in 30 % ostalih KMK. Večji delež teh KMK (19 %) se nato pretvori v acetat in 11 % v vodik in ogljikov dioksid. Metan torej v splošnem nastaja največ po acetotrofnji poti in le 30 % ga nastane po hydrogenotrofnji poti. V primeru odsotnosti metanogenih arhej pa se ogljikov tokokrog v prvih dveh fazah spremeni in nastajati začne 50 – 70 % KMK, 20 – 30 % vodika in ogljikovega dioksida in le 10 – 30 % acetata (Mackie in Bryant, 1981).



Slika 1: Shema bioplinskega procesa s predstavljivo glavnih korakov in intermediatov (Čater in sod., 2013).
 Figure 1: A schematic overview of the biogas process with main phases and intermediates presented (Čater et al., 2013).

2.1.2 Bakterijski in arhejski predstavniki posameznih faz anaerobne metanogeneze

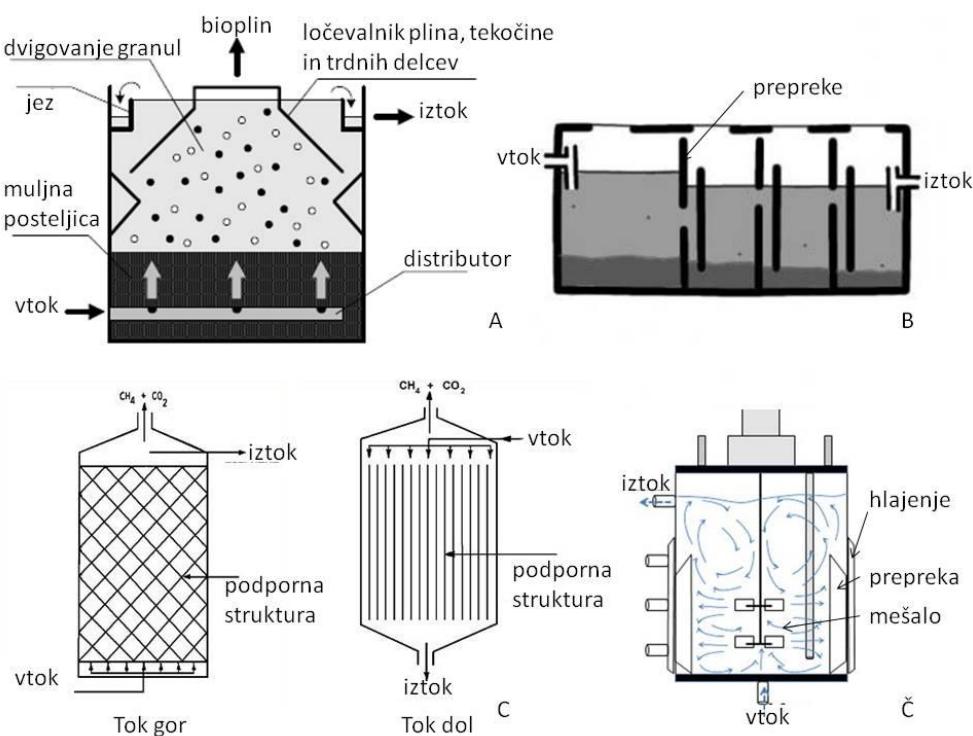
Ozirajoč se na količino in število vrst, je v bioplinskih reaktorjih prisotnih le 10-20 % arhej, vse ostalo so bakterije (Jaenicke in sod., 2011; Zakrzewski in sod., 2012). Pomembno vlogo v fazi hidrolize imajo bakterije iz rodov *Clostridium*, *Micrococcii*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* in *Streptococcus*, v acidogeni fazi pa so aktivne acidogene bakterije kot so *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* in *Salmonella*. Znano je, da hidrolitske in acidogene bakterije rastejo skoraj desetkrat hitreje kot metanogene arheje. V acetogenezi so aktivne striktno anaerobne bakterije, ki rastejo počasi in so precej občutljive na nihanja v organskih obremenitvah in

spremembah temperature ali pH v bioreaktorju. Za prilagoditev na nove pogoje običajno potrebujejo dolgo lag fazo. Acetogene bakterije, kot sta *Syntrophomonas wolfeii* in *Syntrophobacter wolinii*, so obligatne vodik-proizvajajoče bakterije in se sintrofično povezujejo z arhejami, ki vodik porabljam. Filamentozne acetotrofne arheje *Methanosaeta* sp. in *Methanosarcina* sp. navadno prevzamejo glavno vlogo v fazi metanogeneze. Predstavniki hidrogenotrofne metanogeneze, ki rastejo veliko hitreje in so manj občutljivi od acetotrofov (Xing in sod., 1997; Merlin in sod., 2014), pa so *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicroiales*, *Methanopyrales*, *Methanoculleus* in vrste, sorodne rodu *Methanoculleus* (Schlüter in sod., 2008; Kröber in sod., 2009; Liu in sod., 2012). Novejše raziskave kažejo, da se lahko razmerje med acetotrofno in hidrogenotrofno metanogeno spreminja glede na vrsto substrata v bioreaktorju. Acetotrofne arheje naj bi prevladovale v primeru uporabe blata iz čistilnih naprav, hidrogenotrofne pa ob uporabi mešanice različnih substratov (Sundberg in sod., 2011).

V uravnoteženem bioplinskem procesu je izjemno pomembna sintrofija acetogenih bakterij in arhej. Metanogene arheje odstranjujejo vodik iz sistema, s čimer je omogočena termodinamika metabolizma acetogenih bakterij. Njihove reakcije so endergone pri standardnih pogojih in lahko potekajo le pri nizkih koncentracijah vodika (Westermann, 1996). Uspešnost medvrstnega prenosa vodika narekujejo tudi razdalje med acetogenimi bakterijami in arhejami, zato je tvorba metana v granulah in kosmih hitrejša v primerjavi s tisto, kjer mikroorganizmi prosto plavajo v tekočem mediju in niso v tako tesnem medsebojnem stiku (Thiele in Zeikus, 1988). V termofilnih bioplinskih procesih, kjer so temperature večje od 60 °C, je sintrofna pretvorba acetata v vodik in ogljikov dioksid izboljšana, kar je lahko uporabno predvsem pri večjih koncentracijah amonija ali sulfida v bioreaktorju, ki inhibira *Methanosaeta* sp. Večje količine amonija in sulfida so pogoste v substratih kot so svinjski ali goveji gnoj. V takem primeru *Methanosarcineae* prevzamejo metanogeno (Schnurer in sod., 1994; Ahring in sod., 2001). Metanogena aktivnost *Methanosaeta* sp. je pospešena v primeru nizkih koncentracij acetata (Petersen in Ahring, 1991), medtem ko ob izobilju acetata prevladuje metanogena aktivnost *Methanosarcineae*, kar jim omogoča njihova imobilizacija v kosme in granule, s čimer se zavarujejo pred inhibitornimi snovmi (Ahring in sod., 1993; Demirel in Scherer, 2008).

2.1.3 Vrste bioplinskih reaktorjev

Za proizvodnjo bioplina se uporabljam različne vrste bioreaktorjev, nekateri od teh so predstavljeni na Sliki 2. Za čiščenje odpadnih vod z visoko koncentracijo trdnih delcev (3-10 %) so primerni bioreaktorji s popolnim mešanjem (CSTR; angl. Completely Stirred Tank Reactor). Gre za bioreaktor, kjer se celotna vsebina meša mehansko ali s pomočjo plina. Sestoji iz reaktorske posode z mešalom, zajemalnika bioplina, dotoka in odtoka (Khemkhao in sod., 2015).



Slika 2: Nekaj pogosto uporabljenih vrst bioreaktorjev za proizvodnjo bioplina. A – bioreaktor UASB, B – bioreaktor ABR, C – bioreaktor AFFR, Č – bioreaktor CSTR (Weiland, 1987; Tilley in sod., 2014; Khemkhao in sod., 2015).

Figure 2: Presentation of different bioreactor systems often used for biogas production. A – UASB bioreactor, B – ABR bioreactor, C – AFFR bioreactor, Č – CSTR bioreactor (Wiland, 1987; Tilley et al., 2014; Khemkhao et al., 2015).

Za čiščenje močneje in srednje onesnaženih odpadnih vod z manjšo koncentracijo trdnih delcev so pogosto v uporabi mezofilni bioreaktorji z muljno posteljico (UASB; angl. Upflow Anaerobic Sludge Blanket), kjer je mikrobnna biomasa imobilizirana v obliki granul. Sestoji iz reaktorske posode, ločevalnika plinov, zbiralnika bioplina, dotoka za dohranjevanje in odtoka. Mezofilni procesi potekajo pri temperaturi med 32 in 42 °C. So najbolj razširjeni in stabilnejši od termofilnih (50 – 58 °C) ali psihrofilnih (15 – 20 °C) (Kim in sod., 2002; Gouveia in sod., 2015). Za bioreaktorje UASB je značilno, da imajo dolg zagonski čas (Lettinga in Hulshoff Pol, 1991; Khan in sod., 2015) ter da ne potrebujejo mešala. Substrat vstopa v sistem na dnu bioreaktorja in v reakcijski coni granulirana biomasa OS pretvori v bioplín. Zaradi pripetih plinskih mehurčkov se granule dvigajo proti površju. Te v plinskem ločevalniku udarijo ob nagnjeno steno, kar povzroči ločitev plinskih mehurčkov od granul. Bioplín se zbira preko plinsko zbiralnega sistema in izstopa iz bioreaktorja, granule pa se prično spuščati nazaj proti dnu bioreaktorja (Marinšek Logar, 1992; Khanal, 2008a).

Za čiščenje odpadnih vod, katerih značilnosti se lahko hitro spreminja, so v uporabi anaerobni bioreaktorji s fiksiranim filmom (AFFR; angl. Anaerobic Fixed Film Reactor). Bioreaktorji AFFR v reaktorski posodi vsebujejo podporno strukturo za imobilizacijo

mikrobne biomase v obliki biofilma, distribucijski sistem za odpadno vodo, zajemalnik bioplina in odtok. Ponujajo več prednosti kot so enostavna konstrukcija, odsotnost mehanskega mešanja, dobra stabilnost pri velikih obremenitvah ter prilagodljivost na toksične šoke ali na spremjanje temperature. Zaradi neenakomerne rasti biofilma ali pregoste odpadne vode pa lahko pride do zamašitve podporne konstrukcije (van den Berg in sod., 1985; Patel in sod., 1999).

Za bioplinsko proizvodnjo se uporabljajo tudi anaerobni bioreaktorji s preprekami (ABR; angl. Anaerobic Baffled Reactor), kjer prepreke delno razdelijo bioreaktor na več prostorov in prisilijo procesno brozgo, da se giblje počasneje, s čimer se povečata zadrževalni čas biomase in hitrost čiščenja. Bioreaktorji ABR omogočajo večjo odpornost na šoke zaradi organske obremenitve, spremembe v temperaturi ali pH. V posameznih razdelkih se ustvarijo različni gradijenți OS, kar povzroči razvoj različnih mikrobnih populacij (Barber in Stuckey, 1999).

2.2 SUBSTRATI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA

Na uspešnost anaerobne razgradnje poleg delovnih pogojev in vrste bioreaktorja močno vpliva tudi izbira substrata. Stabilnost bioplinskega procesa je zato odvisna tudi od fizikalno-kemijskih lastnosti substrata kot so vsebnost vlage, OS, hranil, velikosti delcev in biorazgradljivosti (Uçkun Kiran in sod., 2014; Divya in sod., 2015). Velik delež industrijske proizvodnje bioplina v svetu še vedno temelji na izrabi energetskih rastlin (Patterson in sod., 2011; Dressler in sod., 2012), čeprav se zakonodaja o zmanjšanju njihove uporabe za te namene vse bolj uveljavlja. Kar tretjina organskih ostankov, ki se uporablja za bioplinsko proizvodnjo, so kmetijsko-industrijski ostanki, tretjina pripada živalskemu gnuju in tretjina gospodinjskim ostankom (Chaiprasert, 2011). V Evropi imajo največ izkušenj v Nemčiji, sledijo ji Velika Britanija, Italija, Češka, Francija, Nizozemska in Španija (Baromètre Biogaz, 2014). Tehnološke izboljšave omogočajo povečevanje bioplinske proizvodnje z ustreznejšo izbiro substrata, testiraji učinkovitosti kodigestije različnih substratov in razvojem različnih načinov predhodne obdelave substratov.

Pri selekciji substrata se je potrebno ozirati na naravo substrata, njegovo dostopnost skozi celo leto, na razmerje ogljika in dušika, ki ga vsebuje, ter na vpliv na okolje, ki ga substrat izraža. Raziskave kažejo, da je proizvodnja bioplina iz mladih rastlinskih ostankov zaradi relativno dobre topnosti njihovih sestavin boljša kakor iz olesenelih rastlinskih ostankov, ki vsebujejo več v vodi netopnih snovi kot so lignin, celuloza, hemiceluloza in proteini. Substrati z optimalnim razmerjem ogljika in dušika 10-35 (živalski gnoj, gospodinjski ostanki, ostanki predelave sadja in zelenjave, ostanki žit, trava, detelja in ostanki iz klavnic) najbolje zadovoljijo potrebe mikroorganizmov po hranilih in vsaka spremembă, bodisi zmanjšano ali povečano razmerje, lahko vodi v nestabilnost bioplinskega procesa (Zeshan in Visvanathan, 2012; Naik in sod., 2014; Divya in sod., 2015). Kodigestija različnih substratov se pogosto izkaže za učinkovitejšo od uporabe le enega organskega

substrata za proizvodnjo bioplina, saj s kodigestijo lažje uravnavamo optimalno razmerje ogljika in dušika. Mešanje kmetijskih ostankov in živalskega gnoja v razmerju 1:1 prinaša najboljše izplene metana (Iyagba in sod., 2009; Vivekanandan in Kamaraj, 2011), saj v splošnem velja, da živalski gnoj vsebuje večje količine dušika, medtem ko kmetijski ostanki vsebujejo večje deleže ogljika. Tako lahko s kombinacijo dveh substratov, ki vsak posebej dajeta nizke izplene, dosežemo optimalno razmerje ogljika in dušika in s tem izboljšano proizvodnjo bioplina (Bagudo in sod., 2011).

2.2.1 Lignocelulozni ostanki

Energetske rastline, žetveni ostanki, gospodinjski ostanki, ostanki lesne predelovalne industrije in pivovarske industrije predstavljajo neizčrpen vir lignoceluloznega materiala, primerenega za proizvodnjo energije. Lignocelulozna biomasa je, poleg premoga, naftne in zemeljskega plina, eden najpomembnejših energetskih virov na svetu, saj gre za obnovljiv vir, ki je vedno na razpolago in je relativno poceni (Bochiwal in sod., 2010). Vzrok, zakaj se lignocelulozni materiali malo uporabljajo za pridobivanja bioplina, je v nepopolni in počasni anaerobni razgradnji tega substrata. Razgradnja lignina in kristalinične celuloze je izredno otežena, pri tem lahko nastajajo tudi toksični intermediati. Zato v primeru uporabe lignoceluloznega materiala kot substrat za bioplinsko proizvodnjo pride do težav že v prvi fazи bioplinskega procesa, v hidrolizi (Madsen in sod., 1995).

Lignocelulozni materiali sestojijo iz dveh vrst ogljikovih hidratov, celuloze in hemiceluloze, ki skupaj z ligninom tvorita kompleksno lignocelulozno mrežo. Razmerje med njimi je specifično za posamezni lignocelulozni material, v splošnem pa velja, da vsebujejo 45 % celuloze, 30 % hemiceluloze in do 25 % lignina. Poleg teh pa v lignoceluloznih substratih najdemo tudi organske topne ekstrakte (terpeni, estri, maščobne kisline, voski, trigliceridi, alkoholi, tanini, flavonoidi), proteine, lipide, sladkorje, škrob, vodo, pektine in anorganske spojine (Saha, 2000; Demirbas, 2009; Menon in Rao, 2012; Monlau in sod., 2013). Metanski potencial lignoceluloznega substrata je odvisen od vsebnosti celuloze in lignina v njem; z višanjem njune vsebnosti se metanski potencial niža (Buffiere in sod., 2006).

2.2.1.1 Pivovarske tropine

Pivovarske tropine spadajo med industrijske lignocelulozne ostanke, katerih v Sloveniji letno proizvedemo kar 17000 ton, njihov teoretični letni potencial metanske proizvodnje pa znaša 1656000 m³. Zato so pivovarske tropine zanimive ne le kot krmni dodatek v živinoreji, ampak tudi v bioplinski proizvodnji (Keller-Reinspach, 1992; Sežun, 2011). Sestojijo iz lupine, oziroma perikarpa semena ječmena in nekaj beljakovin in maščob. Lupina je vir vlaknin, ki jih sestavljajo celuloza, hemiceluloze in lignin, poleg tega pa lupina vsebuje tudi kremen, polifenolne spojine, vitamine, aminokisline in minerale v sledovih (Macleod, 1979; Huige, 1994). Natančna sestava pivovarskih tropin je odvisna od

vrste uporabljenega ječmena, časa žetve, pogojev tlačenja, postopka priprave sladu in različnih načinov kuhanja (Preglednica 1).

Preglednica 1: Raznolikost sestave pivovarskih tropin (Kanauchi in sod., 2001; Mussatto in Roberto, 2006; Russ in sod., 2005; Khidzir in sod., 2010).

Table 1: The diversity of the brewery spent grain composition (Kanauchi et al., 2001; Mussatto and Roberto, 2006; Rus set al., 2005; Khidzir et al., 2010).

Delež v suhi snovi (%)	Kanauchi in sod. (2001)	Russ in sod. (2005)	Mussatto in Roberto (2006)	Khidzir in sod. (2010)
celuloza	25,4	23,0 – 25,0	16,8	-
arabinoksilan	21,8	-	28,4	-
lignin	11,9	7,0 – 8,0	27,8	-
beljakovine	24,0	19,0 – 23,0	15,2	6,4
maščobe	10,6	-	-	2,5
pepel	2,4	4,0 – 4,5	4,6	2,3

2.2.2 Zgradba lignoceluloznih materialov

Različne hemiceluloze in amorfni polimeri kot so sladkorji in pektin povezujejo celulozna mikrovlakna med seboj, ki so stabilizirana z vodikovimi vezmi in prekrita z ligninom. Zgradba mikrovlaken je tako tesno prepletena, da otežuje dostop encimom, vodnim molekulam ali kislinam. Kristalinična celuloza ima zapleteno terciarno strukturo in je zato netopna v vodi, le amorfni deli z manj zapleteno zgradbo in deli z nižjo stopnjo polimerizacije so občutljivejši na razgradnjo (Arantes in Saddler, 2010). Celuloza je sestavljena izključno iz glukoznih monomerov ($4-O-\beta-D\text{-glukopiranozil}\text{-}D\text{-glukoza}$), ki so povezani med seboj z β -(1,4)-glikozidno vezjo. Hemiceluloza pa sestoji iz različnih monosaharidnih enot kot so arabinoza, ksiloza, manoza, galaktoza in ramnoza. Hemiceluloze so lahko pentozani ali heksozani, od celuloze pa se močno razlikujejo tudi v stopnji polimerizacije, ki je pri celulozi precej višja. Hemiceluloze predstavljajo enega temperaturno in kemijsko najobčutljivejših delov lignoceluloznega materiala, so topne v bazičnem ali kislem in se jih zato zlahka hidrolizira (Demirbas, 2008; Harmsen in sod., 2010; Monlau in sod., 2013).

Lignin je izredno kompleksen hidrofoben aromatski polimer, ki je močno odporen na biološko razgradnjo, zato v bioplinski proizvodnji ni najbolj zaželen. Tridimenzionalno zgradbo tvorijo enote fenilpropana: siringil, gvajacil in *p*-hidroksifenil. Gre za tri monolignolne monomere *p*-kumaril alkohola, koniferil alkohola in sinapil alkohola (Freudenberg in Neish, 1968), ki so metoksilirani do različnih stopenj, njihovo razmerje pa se spreminja glede na vrsto rastline, dele lesa in plasti celične stene (Menon in Rao, 2012). Pri listavcih je lignin kovalentno vezan na ksilan, pri iglavcih pa na galaktomanan (Demirbas, 2008). Odpornost lignoceluloznega materiala je odvisna od vsebnosti lignina v substratu, porazdeljenosti podenot, pogostosti esterskih vezi med ligninom in ogljikovimi hidrati in količini ferulatnih povezav v ligninu (Chandra in sod., 2007; Grabber in sod., 2008) in je rahlo omajana z uporabo kislin ali baz ter nekaterih topil kot so nizko

molekularni alkoholi, dioksani, aceton, piridin in dimetil sulfoksidi (O'Connor in sod., 2009).

2.2.3 Encimatična razgradnja lignoceluloznih materialov

Sistem razgradnih encimov, ki sinergistično katalizirajo hidrolizo celuloze, sestoji iz celulolitičnih endoglukanaz ($1,4\text{-}\beta\text{-}D\text{-glukan-4-glukanohidrolaze}$), eksoglukanaz (celodekstrinaze), celobiohidrolaz ($1,4\text{-}\beta\text{-}D\text{-glukan celobiohidrolaze}$) in β -glukozidaz (β -glukozid glukohidrolaze), ki jih proizvajajo številne bakterije in glice. Endoglukanaze cepijo notranje vezi celulozne verige, eksoglukanaze pa zunanje konce te verige, pri čemer pride do sprostitev celobioze. β -glukozidaze pa so usmerjene proti oligosaharidom in s cepitvijo celobioze povzročijo sprostitev monomerov glukoze. Znano je, da celobioza inhibira sintezo endo- in eksoglukanaz preko povratne zanke. Zato je za pospešeno hidrolizo pri anaerobni metanogeni presnovi celuloze smiselna uvedba dveh ločenih bioreaktorjev, kjer se v prvem odvija hidroliza do stopnje nastajanja celobioze, ki se nato odvaja iz prvega v drugi bioreaktor, v katerem se razgradnja celobioze do glukoze nadaljuje (Bisaria in Ghose, 1981; Kumar in sod., 2008). Ksilanolitični encimi kot so endo- $1,4\text{-}\beta$ -ksilanaze, β -ksilozidaze, α -glukuronidaze, α -L-arabinofuranozidaze in acetilksilan esteraze razgrajujejo ksilan, ki je prisoten pri listavcih, v ksilozo. Glukomanan pri iglavcih razgrajujejo endomanananaze in β -manozidaze, pektin pa razgrajujejo pektinaze (Henrissat in sod., 1998; Lynd in sod., 2002; Meyer in sod., 2009).

Aerobna razgradnja lignina poteka kot oksidativni proces v okviru sekundarnega metabolizma gliv bele in rjave trohnobe, pri čemer ekstracelularne fenolne oksidaze (lignin-, mangan-, alkoholne, glioksalne, aril-alkoholne, hibridne in vsestranske peroksidaze ter kinon reduktaze) (Niemenmaa, 2008) kot vmesni produkt proizvajajo vodikov peroksid, ki prav tako deluje na celulozo (Evans in sod., 1994). Poleg vodikovega peroksidu nastajajo tudi drugi vmesni produkti kot so fenoksični radikali fenolov (Dashtban in sod., 2009). Anaerobna razgradnja lignina pa je poznana šele od leta 1934 naprej, ko sta Tarvin in Buswell testirala razgradnjo aromatskih struktur v bioreaktorjih z blatom čistilnih naprav kot virom aktivnih mikroorganizmov (Taylor in sod., 1970; Zeikus in sod., 1982). Sledilo je več dokazov o obstoju razgradnje lignina pri anaerobnih pogojih (Couteaux in sod., 1995; Kim in sod., 1998; Pareek in sod., 2001; McGenity, 2010). Gre za oksidacijo z radikali, ki nastanejo pri razgradnji celuloze, zato je za uspešnejšo razgradnjo lignina potrebna predhodna razgradnja celuloze. Lignin se na ta način razgradi v treh korakih: najprej pride do depolimerizacije, nato do oksidacije stranskih verig in nazadnje do demetilacije (Ko in sod., 2009).

V splošnem so mikroorganizmi z encimsko hidrolizo sposobni razgraditi manj kot 20 % celuloze (Zhang in Lynd, 2004), pri čemer izpleni metana ne presegajo 60 % teoretičnega izplena. Za uspešno bioplinsko proizvodnjo je potrebna dovolj učinkovita hidroliza makromolekul substrata in stabilnost procesov nadaljnjih faz bioplinskega procesa. Ker

zgradba lignoceluloznih substratov preprečuje uspešnost hidrolize, je za boljše izplene metana potrebna dodatna obdelava takšnega substrata.

2.3 POSTOPKI OBDELAVE LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV

Cepitev vezi med ligninom in ogljikovimi hidrati in odstranitev lignina predstavljata največji izziv v razvoju biorazgradljivosti lignoceluloznih substratov. S cepitvijo teh vezi postanejo celuloza in hemiceluloze dostopnejše za hidrolitske encime (Monlau in sod., 2013). V preteklih 30 letih je razvoj različnih postopkov za obdelavo lignoceluloznih substratov dosegel velik razmah (Hendriks in Zeeman, 2009; Parawira, 2012; Čater in sod., 2014). Izkazalo se je, da je uspešnost hidrolize odvisna ne le od pH, temperature in kemijske zgradbe substrata, temveč tudi od velikosti delcev substrata, saj razgradnja večjih delcev zaradi manjše površine poteka počasneje (Vavilin in sod., 1996). Obdelava lignoceluloznega substrata je usmerjena k zmanjšanju velikosti delcev substrata, povečevanju njihove površine in poroznosti, spremjanju zgradbe in odstranitev lignina, depolimerizaciji hemiceluloz in s tem k olajšanju nadaljnje razgradnje. Lahko pa povzroči tudi nezaželjene spremembe v zgradbi substrata, proizvodnjo strupenih spojin ali izgubo organskega materiala, zaradi česar se razgradljivost lahko poslabša. Znano je, da termična metoda, pri kateri uporabljajo temperature nad 160 °C, povzroči sproščanje strupenih spojin kot so furfural, hidroksimetilfurfural in topne fenolne spojine, kar vodi v zmanjšanje količine uporabnega organskega materiala in v slabe izplene metana (Ramos, 2003; Carlsson in sod., 2012). Substratne obdelave skušajo tudi zmanjševati kristaliničnost celuloze, saj je stopnja razgradnje močno povezana s stopnjo kristaliničnosti. Pri razgradnji lignoceluloznih substratov nastajajo tudi intermediati razgradnje lignoceluloze, ki so toksični za metanogene arheje. Z različnimi postopki obdelav se nastajanju teh strupenih spojin ne moremo izogniti. Znano je le, da nekateri postopki njihovo nastajanje pospešujejo, druge pa gaupočasnjujejo. Stopnja razgradnje lignina neugodno vpliva na učinkovitost razgradnje lignoceluloznega substrata, saj imajo razgradni produkti lignina, ki se spročajo med fizikalno-kemijskimi predobdelavami, močnejši inhibitorni vpliv na anaerobno razgradnjo in bioplinsko proizvodnjo kot lignin sam (Sežun in sod., 2011; Sežun, 2011). Testiranih je bilo že mnogo različnih postopkov obdelav in predobdelav substrata, največ fizikalno-kemijskih in v zadnji letih tudi nekaj bioloških, vendar se jih je le nekaj razvilo v uporabne tehnologije (Čater in sod., 2014). V splošnem se je izkazalo, da lahko največje izplene metana dosežemo z uporabo kombinacije različnih fizikalno-kemijskih postopkov obdelave substrata in mešanih celulolitičnih mikrobnih kultur. Obdelava substrata predstavlja relativno drag del bioplinskega procesa, vendar je proizvodnja bioplina iz neobdelanega lignoceluloznega substrata še dražja. Najoptimalnejši postopek obdelave substrata izberemo na podlagi tipa substrata, ekonomike obdelave in vpliva na okolje (Eggeman in Elander, 2005).

2.3.1 Fizikalno-kemijski postopki predobdelave substrata

Kemijski postopki predobdelave lignoceluloznega substrata so najstevilčnejši med znanimi predobdelavami in vključujejo uporabo natrijevega hidroksida, perklorne, perocetne, žveplove ali mravljične kisline, organskih topil (etanol, metanol, aceton) ali amonijaka. Za učinkovito delovanje organskih topil je predhodno potrebno odstraniti lignin, pri čemer so se za uspešne izkazale različne baze in kombinacije pare s kislino ali bazo. Popolno odstranitev hemiceluloz lahko dosežemo z uporabo redčenih kislin (Kumar in sod., 2008; Harmsen in sod., 2010; Krishania in sod., 2013). Kar 22 % razgrajene celuloze in 60 % razgrajenega lignina in hemiceluloz pa lahko dosežemo z uporabo vroče vode in visokih tlakov (Mok in Antal, 1992). Inkubacija vlaknin iz gnoja 25 dni pri 15 °C in ob dodatku kalcijevega oksida doprinese k 66 % večjemu izplenu metana v primerjavi z neinkubiranim substratom (Bruni in sod., 2010). Največja težava kemijskih predobdelav lignoceluloznih substratov pa je ravno v uporabi velikih količin kemikalij, njihovi ceni in ravnjanju z odpadnimi kemikalijami, ki so lahko okoljsko sporne.

Drobljenje, mletje (lahko v kombinaciji z visokim tlakom ali pri nizkih temperaturah), ultrazvočno razbijanje, uporaba pare (parna eksplozija), mokre oksidacije ali mikrovalov (Hu in sod., 2012) so primeri nekaterih fizikalnih postopkov predobdelave lignoceluloznega substrata. Vsem je skupno zmanjševanje velikosti delcev substrata in s tem povečevanje skupne površine delcev ter zmanjševanje stopnje kristaliničnosti celuloze (Krishania in sod., 2013). Tako postane substrat dostopnejši za razgradne encime. Z drobljenjem navadno dosežemo velikosti delcev 10-30 mm, z mletjem pa 0,2-2 mm (Monlau in sod., 2013). Pri predobdelavi substrata s paro je substrat izpostavljen visokim temperaturam pod visokim tlakom. Drobljenje in uporaba pare imata primerljiv učinek na pospešitev razgradnje lignoceluloznega substrata. Pri anaerobni razgradnji grobo mlete slame (velikost delcev 2 mm) z encimsko mešanico, bogato s ksilanazami *Trichoderma reesei* CL847 (48 ur, 37 °C) se razgradi le 4 % celuloze, ob uporabi finega drobljenja (velikost delcev 0,2 mm) ali pare pa pride do pospešitve razgradnje celuloze in večjih izplenov hirolize (40 %) (Ghizzi in sod., 2012). Drobljenje in inkubacija algne biomase 10 min pri 50 °C doprineseta h kar 52 % večjem izplenu bioplina in 53 % večjem izplenu metana v primerjavi z neobdelanim substratom (Tedesco in sod., 2014). Več kot 90 % razgrajenost lignina pa je možno doseči z inkubacijo pivovarskih tropin 5 dni s klorovodikovo kislino ($\text{pH} = 2$) ali natrijevim hidroksidom ($\text{pH} = 10$) pri sobni temperaturi (Sežun, 2011). Termična predobdelava z uporabo visokih tlakov in dodajanjem kisika, imenovana tudi mokra oksidacija, lahko poleg pospešitve razgradnje povzroči tudi izgubo organskega materiala in se največ uporablja za predobdelavo lignoceluloznega substrata pri proizvodnji bioetanola (Uellendahl in sod., 2008; Hendriks in Zeeman, 2009). Poleg možnosti izgube organskega materiala pa imajo fizikalne predobdelave tudi druge slabosti kot so oblikovanje mikrobnih celulaznih inhibitorjev, velika poraba energije, cena predobdelave in težko izvedljiva nadgradnja v večje industrijske sisteme (Mes-Hartree in sod., 1987; Harmsen in sod., 2010; Menon in Rao, 2012).

2.3.2 Biološki postopki predobdelave substrata

Biološke obdelave ali predobdelave lignoceluloznih substratov, ki vključujejo uporabo gliv bele, rjave in mehke trohnobe, bakterije ali le selektivne encime, so perspektivnejše od fizikalno-kemijskih, saj so stroški predobdelave precej nižji, poraba energije je manjša, zmanjšana je tudi količina preostalega digestata, ni uporabe kemikalij in zato tudi ni strupenih odpadkov. Običajno je čas predobdelave daljši v primerjavi s fizikalno-kemijskimi postopki predobdelav, pomembno je pogosto in natančno spremljanje rastnih pogojev (Nizami in sod., 2009; Bundhoo in sod., 2013; Čater in sod., 2014). Bioaugmentacija z mikroorganizmi je biotehnološki postopek, ki se med drugim uporablja za izboljšanje hidrolize lignoceluloznih substratov, za hitrejši zagon bioplinskega procesa ali za lažje okrevanje mikrobne združbe v bioplinskem reaktorju po inhibiciji z amonijem ali akumulaciji KMK (Westerholm in sod., 2012; Goud in sod., 2014).

2.3.2.1 Ligninocelulolitične glive

V bioloških predobdelavah lignoceluloznih substratov z glivami so v uporabi tako aerobne kot anaerobne glive (Preglednica 2). Encimska aktivnost in razgradnja lignina sta odvisni od glivnega seva, količine prisotnega kisika, pH, temperature, vlage in sestave gojišča (Isroi in sod., 2011).

Preglednica 2: Primeri aerobnih in anaerobnih gliv, ki izločajo celulaze, ksilanaze in različne peroksidaze za razgradnjo lignoceluloze.

Table 2: Examples of aerobic and anaerobic fungi exerting cellulases, xylanases and different peroxidases for lignocellulose degradation.

Razgradnja	Encimi	Glive	Vir
celuloza	celulaze	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Aspergillus niger</i> , <i>Hemicola insolens</i> ,	Jana in sod., 1994
hemiceluloza	ksilanaze	<i>Thermomonospora fusca</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Trichoderma koningii</i>	Polizeli in sod., 2005
lignin	peroksidaze lakaze	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Dashtban in sod., 2009

Aerobne glive rjave in mehke trohnobe so znane kot uspešne razgrajevalke celuloze, medtem ko v zgradbi lignina napravijo le manjše spremembe. Uspešnejše pri razgradnji lignina so glive bele trohnobe (Sanchez, 2009). Biološke predobdelave substrata z glivami bele trohnobe so običajno izvedene s fermentacijo na trdnem nosilcu, kajti proizvodnja ligninolitičnih encimov je v takšnem sistemu boljša kot v primeru fermentacije v tekočini (Xu in sod., 2001). Anaerobne glive, ki naseljujejo vamp in imajo celulolitične in hemicelulolitične encime združene v ekstracelularnih kompleksih (celulosomih) (Hyeon in sod., 2013), prav tako razgrajujojo rastlinske celične stene, saj proizvajajo velike količine celulaz in ksilanaz. Vampne glive imajo celo boljšo sposobnost kolonizacije in razgradnje lignoceluloznih materialov kot bakterije, saj so sposobne penetracije v kultikulo, pri čemer pa fenole iz ligina raztopljamajo, a jih ne presnavljajo. Kokultivacija gliv z metanogeno

mikrobeno združbo pa daje še boljše rezultate, saj stimulira razgradnjo celuloze s povečanjem proizvodnje hidrolitičnih encimov (Akin in Borneman, 1990).

Take in sod. (2006) so primerjali vplive različnih fizikalno-kemijskih in bioloških postopkov predobdelave lesnih sekancev na povečanje proizvodnje metana. Pri neobdelanih sekancih je bila proizvodnja metana skoraj nična, medtem ko je bila pri bioaugmentaciji z glivama *Cyathus stercoreus* AW 03-72 in *Trametes hirsute* NBRC 4917 kar 35-krat večja. Bioaugmentacija z glivama se je izkazala za primerljivo uporabi pare in mletja. Največjo proizvodnjo metana pa so dosegli s parno eksplozijo. Mackulak in sod. (2012) so kostanjevo listje inkubirali 4 tedne pri 37 °C z glivo *Auricularia auricula-judae*. Nato so iz delno razgrajenega listja, pomešanega s senom v razmerju 1:2 pridobili 15 % več bioplina kot z neobdelanim substratom.

2.3.2.2 Ligninocelulolitične bakterije

Tudi nekatere bakterije proizvajajo celulaze, ksilanaze in ligninaze (Preglednica 3), zato so biotehnološko zanimive za uporabo za bioaugmentacijo.

Preglednica 3: Primeri aerobnih in anaerobnih bakterij, ki so sposobne razgradnje lignoceluloze.

Table 3: Examples of aerobic and anaerobic bacteria capable of lignocellulose degradation.

Razgradnja	Encimi	Bakterija	Vir
celuloza	celulaze	<i>Clostridium stercorarium</i> , <i>Clostridium cellulovorans</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Butyrivibrio xylovorans</i> , <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides cellulosolvens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Bacillus</i> sp.	Hyeon in sod., 2013 Polizeli in sod., 2005 Čater in sod., 2015
	ksilanaze	<i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> sp., <i>Colibacillus cellulovorans</i> , <i>Caldicellulosiruptor</i> sp. Rt8B, <i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Morris in sod., 1995 Sunna in sod., 2000 Zhang in sod., 2006
hemiceluloza	mananaze	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Actinomycetes</i> , <i>Actinobacter anitratatus</i> , <i>Clostridiales</i> , <i>Geovibrio thiophilus</i> , <i>Desulfomicobium</i> , <i>Azoarcus</i> sp., <i>Thauera</i> , <i>Paenibacillus</i> sp., <i>Cohnella</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Microbacterium</i>	Zimmermann, 1990 Lopretti in sod., 1993 Wang in sod., 2013
lignin	peroksidaze		

Največ raziskav bakterijske razgradnje lignina je bilo narejenih na različnih vrstah rodu *Pseudomonas* in gram pozitivnih aktinomicetah (Zimmermann, 1990). Podobno kot anaerobne glive imajo tudi anaerobne vampne bakterije celulolitične in hemicelulolitične encime združene v celulosomih (Hyeon in sod., 2013), pri čemer pa so bakterijski

celulosomi precej bolje raziskani kot glivni (Bayer in sod., 1998; Dashtban in sod., 2009). Celulosomi omogočajo večji razgradni potencial kot encimi, ki delujejo posamično (Van Dyk in Pletschke, 2012). V zgodnji lag fazi v času rasti bakterij so celulosomi pritrjeni na celice. Sprostijo se šele v pozni eksponentni fazi. V času stacionarne faze pa jih največ najdemo v gojišču in pritrjene na celulozo (Thomas in sod., 2014).

Bioaugmentacija z vampnimi ali drugimi celulolitičnimi bakterijami je pogosto v uporabi za izboljšanje hidrolize lignoceluloznih substratov in povečano proizvodnjo KMK (Lissens in sod., 2004; Ward in sod., 2008; Čater in sod., 2015). Hu in Yu (2005, 2006) sta z vampnimi bakterijami inkubirala koruzno slamo (240 ur pri 25-40 °C) in vodno rastlino *Typha latifolia linn* (125 ur) in s tem v šaržnem bioreaktorju dosegla 70 % in 66 % uspešnost pretvorbe KMK do bioplina. Vedno bolj se uveljavlja tudi bioaugmentacija z mešanimi mikrobnimi združbami (Yan in sod., 2012; Čater in sod., 2014). Zhong in sod. (2011) so anaerobno razgradnjo koruzne slame izboljšali z dodatkom celulolitičnih bakterij (*Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis*, *Pleurotus florida*), kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis*, *Hansenula anomala*) in mlečnokislinskih bakterij (*Lactobacillus deliehii*). Po 15 dneh pri 20 °C in rednem 0,01 % dodajanju mikroorganizmov so dosegli 75 % večji izplen metana in kar 35 % krajsi razgradni čas v primerjavi z neobdelanim substratom. Kvasovke so izkoristile enostavne sladkorje v koruzni slami za svojo rast in hkrati razčlenile rigidno zgradbo slame. S tem sta postali kristalinična in amorfna celuloza dostopnejši celulolitičnim bakterijam. *B. licheniformis* sp., *Pseudomonas* sp. in *B. subtilis* sp. so razgradili celulozo in hemicelulozo, *P. florida* sp. pa lignin. Mlečnokislinske bakterije so uravnavele pH. Tudi nekateri biološki pripravki za izboljšanje silaže, ki vsebujejo kvasovke, glive, bakterije in nekatere encime so se izkazali za uspešne pri pospeševanju hidrolize z izboljšano razgradnjo kompleksnih ogljikovih hidratov koruze (Vervaeren in sod., 2010). 7 tednov trajajoča obdelava koruze z bioaugmentacijo s hetero- in homofermentativnimi bakterijami in encimi (α -amilaze, celulaze, hemicelulaze, pentozanaze) (Silasil Energy®) ter z glivami in kvasovkami (Microferm®) je pripomogla k povečanju proizvodnje bioplina za 12, 10 in 15 %. Bioaugmentacija le s homofermentativnimi ali le s heterofermentativnimi bakterijami (Bonsilage Mais®) ni imela učinkov na povečanje bioplinske proizvodnje v primerjavi z neobdelano korozo.

2.3.2.3 Ligninocelulolitični encimski pripravki

Uporaba živih mikroorganizmov za izboljšanje anaerobne razgradnje lignoceluloznih substratov je običajno uspešnejša kot uporaba prostih encimov, saj se mikroorganizmi razmnožujejo in sočasno proizvajajo različne koristne encime, njihova proizvodnja pa je odvisna od razpoložljivega substrata, medtem ko so encimi izredno občutljivi; njihova aktivnost je odvisna od substrata, časa inkubacije, izbire bioreaktorskega sistema, temperature in pH (Parawira, 2012). V primerjavi s kemijskimi postopki predobdelave substratov pa imajo encimske predobdelave veliko prednost v tem, da lahko v zmernih

procesnih pogojih dobimo velike izplene produkta, brez težav s korozijo in z nižjimi stroški (Menon in Rao, 2012).

Uporabljajo se tako naravni encimi gliv ali bakterij kot sintetični encimi. Lahko so imobilizirani na inertnem materialu ali pa prosto plavajo v procesni brozgi v bioreaktoru. Sintetični encimi so stabilnejši in imajo izboljšano aktivnost v primerjavi z naravnimi encimi, vendar so običajno predragi za uporabo v industrijskih volumnih. Za izboljšanje hidrolize lignoceluloznih substratov se uporabljajo tako posamezni encimi kot njihove kombinacije, ki so komercialno dostopne v že vnaprej pripravljenih mešanicah. Slabost komercialnih encimskih pripravkov je v njihovi nepopolni karakterizaciji, saj lahko vsebujejo tudi številne nepotrebne encime (Banerjee in sod., 2010a, 2010b, 2010c; Van Dyk in Pletschke, 2012). Ob uporabi posameznega, očiščenega encima je potrebno skrbno upoštevati optimalni pH in temperaturo za njegovo maksimalno stabilnost, specifičnost in aktivnost. Uporaba visoko specifičnih encimov pomeni manjšo porabo encimov, kar močno zmanjša ceno procesa. Prav tako lahko znižamo ceno encimske obdelave lignoceluloznega substrata z izbiro multifunkcionalnih encimov, saj se s tem zmanjša število potrebnih encimov za učinkovito hidrolizo (Prates in sod., 2001; Kosugi in sod., 2002). Ziemiński in sod. (2012) so povečali izplen bioplina za 19 % z inkubacijo sladkorne pese z encimskima pripravkoma Celustar XL in Agropect pomade, ki vsebujeta endoglukanaze, ksilanaze in pektinaze, in za 13 % z inkubacijo hmelja z istima pripravkoma.

Raziskave kažejo, da so lahko biološke obdelave lignoceluloznih substratov pri povečevanju bioplinske proizvodnje in izplena metana uspešnejše v kombinaciji s še z drugimi načini predobdelav. Tako so Bruni in sod. (2010) s kombinacijo natrijevega hidroksida, pare in dodatka lakaz v šaržnem bioreaktorju uspeli povečati proizvodnjo metana iz gnoja za 34 %. Juntarasiri in sod. (2011) pa so uspeli povečati proizvodnjo metana iz mešanice listja in industrijske odpadne vode v šaržnem bioreaktorju za 78 % z namakanjem substrata v natrijevem hidroksidu, spiranjem in inkubacijo s celulazami. Imai in sod. (2004) so dokazali, da je lahko hidroliza lignoceluloznega substrata kar dvakrat učinkovitejša ob dodatku encimov in sočasni uporabi ultrazvoka.

2.3.3 Ugotavljanje metanskega potenciala obdelanega substrata

Metanski potencial in razgradljivost substrata ter vpliv obdelave substrata na povečanje proizvodnje bioplina lahko testiramo s testom BMP (Owen in sod., 1979), pri čemer redno spremljamo kumulativno proizveden bioplín, njegovo sestavo in s tem delež metana, temperaturo, pH, koncentracijo KMK in redukcijo kemijske potrebe po kisiku (KPK) (Hansen in sod., 2004; Triolo in sod., 2012; Čater in sod., 2015). Testi BMP se uporabljajo (a) za določanje koncentracije OS v odpadnih vodah ali drugih substratih, iz katere je možno anaerobno proizvesti metan, (b) za ocenitev učinkovitosti anaerobne razgradnje specifičnega substrata, (c) za merjenje ostanka organskega materiala, ki je uporaben za nadaljnjo anaerobno obdelavo in (č) za testiranje količine ostanka biološko nerazgradljivih

spojin po končani anaerobni razgradnji določenega substrata (Speece, 1996). V splošnem velja, da lahko iz substratov, bogatih z lipidi in enostavno razgradljivimi ogljikovimi hidrati, dosežemo največje izplene metana ter da kodigestija več različnih substratov prinese boljše rezultate od uporabe le enega substrata. Obstaja tudi nekaj teoretičnih izračunov izplena metana glede na sestavo substrata, vendar te običajno precenijo metanski potencial substrata, saj jih večina ne upošteva dejanske biorazgradljivosti substrata (Labatut in sod., 2011).

2.4 MIKROBNA ZDRUŽBA V BIOPLINSKEM BIOREAKTORJU

Mikrobna združba v bioplinskih reaktorjih je izjemno pестra in ravno to ji omogoča vzpostavitev stabilnosti in izvedbo številnih biokemijskih procesov za učinkovito proizvodnjo bioplina. Različne fizikalno-kemijske spremembe v bioreaktorju pa lahko povzročijo spremembe v sestavi in aktivnosti mikrobne združbe, kar lahko vodi v upočasnitve procesa ali celo v njegovo zaustavitev (Nielsen in sod., 2007; Dong in sod., 2011; Mao in sod., 2015).

2.4.1 Vpliv temperature

Mikroorganizmi v bioplinskem bioreaktorju so izredno občutljivi na temperaturna nihanja, ki vplivajo na proizvodnjo vodika in metana ter na razgradnjo organskega substrata. Znižanje temperature povzroča počasnejše nastajanje KMK in amonija, upočasni se koriščenje substrata in metabolizem mikroorganizmov, povečajo se zagonski časi bioreaktorja in znižajo izpleni metana. Povišanje temperature pa poveča vrednost pH, pospeši hidrolizo organskega substrata in poveča izplen metana (Wang in sod., 2014). Temperatura vpliva na aktivnost in sestavo mikrobne združbe, kar nato narekuje hitrost in pot ogljika med anaerobno presnovo (Glissman in sod., 2004). Termofilna anaerobna razgradnja poteka pri temperaturi med 55 in 69 °C in je precej hitrejša od mezofilne (37 °C), kjer reakcije tečejo počasneje in je produktivnost nižja. Vendar pa pri termofilnih postopkih lahko hitreje pride do zakisanja, kar inhibira bioplinsko proizvodnjo, stabilnost procesa je zmanjšana, iztok je manj kvaliteten, toksičnost je povečana in mikrobna združba je bolj občutljiva na pogoje v okolju kot pri mezofilnih postopkih. Termofilna proizvodnja bioplina predstavlja tudi večje stroške, saj je potrebne več energije za ogrevanje bioreaktorjev. V primeru mezofilne razgradnje pa je proces stabilnejši in bakterije v združbi pestrejše, metanogeneza poteka bolje, izpleni metana pa so nižji in substrati nepopolno razgrajeni (Bowen in sod., 2014). Zato je za najoptimalnejši bioplinski proces smiselno združiti termofilno hidrolizo in acidogenezo ter mezofilno metanogenezo, čemur pravimo dvofazni proces anaerobne razgradnje. Tudi dvofazni proces, ki vključuje hipertermofilno hidrolizo in acidogenezo (70 °C) ter termofilno metanogenezo (55 °C) se je izkazal za izredno učinkovitega pri razgradnji substratov, ki vsebujejo visoke koncentracije proteinov, lipidov in nerazgradljive snovi (Myungyeol Lee in sod., 2009).

2.4.2 Vpliv pH

pH, pri katerem poteka bioplinski proces, direktno vpliva na aktivnost metabolizma mikroorganizmov in nastajanje produktov. Odvisen je od aktivnosti hidrolize in sinteze KMK. Optimalni pH za anaerobno razgradnjo je povprečno med 6,8 in 7,4, medtem ko imajo posamezne faze v bioplinskem procesu svoje optimume. Acidogeneza poteka najbolje pri pH med 5,5 in 6,5, medtem ko je metanogeneza najučinkovitejša pri pH med 6,5 in 8,2, z optimumom pri 7,0 (Fang in Liu, 2002; Kim in sod., 2003; Dae Hee Lee in sod., 2009). Spremembe v pH vplivajo tudi na spremembe v hitrosti rasti mikroorganizmov v bioreaktorju, zato pri različnih vrednostih pH prevladujejo različne populacije bakterij. Pri pH pod 6,6 se rast metanogenih arhej močno upočasni, njihova aktivnost pa se zmanjša tako pri višjem kot pri nižjem pH od optimalnega (Horiuchi in sod., 1999; Zhang in sod., 2009).

2.4.3 Obremenitev s substratom

Količina substrata, s katero obremenimo bioplinski reaktor, predstavlja količino OS, ki jo vnesemo v bioreaktor. Povečevanje obremenitve s substratom poveča izplen metana, vendar lahko povzroči tudi neravnovesje sistema in manjšo produktivnost, saj lahko pride do inhibicije aktivnosti acetogenih bakterij in metanogenih arhej. Prevelike obremenitve s substratom zato vodijo v povečano hidrolizo in acidogenezo, ki postaneta veliko hitrejši od metanogeneze, zaradi česar se koncentracija KMK v reaktorju poveča. Metanogene arheje niso sposobne tako hitro porabljati kislin in vodika in proizvajati metana, zato se pojavi nepovratna zakisanost, saj se vrednost pH zniža, kar inhibira metanogenezo. V kolikor pride do organske preobremenitve v mezofilnem bioreaktorju, lahko sistem uravnotežimo s prehodom na termofilni sistem in vzpostavljivo kroženje iztoka (Mao in sod., 2015). Poleg zakisanosti pa lahko preobremenitev s substratom povzroči tudi spremembe v mikrobnih populacijih. Že z rahlim povečanjem obremenitve s substratom se število arhej poveča, znano pa je tudi, da pri nizkih organskih preobremenitvah prevladujejo bakterije iz skupine *Firmicutes*, pri visokih pa *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* in *Deferribacteres* (Rincón in sod., 2008; Zielińska in sod., 2013).

2.4.4 Zadrževalni čas

Zadrževalni čas predstavlja čas, ki je potreben za popolno razgradnjo organskega substrata. Povezan je s hitrostjo mikrobnih rasti in je odvisen od obremenitve s substratom, sestave substrata in temperature v bioreaktorju. V splošnem velja, da je optimalni zadrževalni čas v mezofilnih bioreaktorjih 15 do 30 dni. Skrajševanje zadrževalnega časa vodi v kopičenje KMK, medtem ko podaljševanje vodi v nepopolno koriščenje sposobnosti mikrobnih biomase v reaktorju. Za doseganje največjih in konstantnih izplenov metana je ponavadi najoptimalnejša kombinacija nizke obremenitve s substratom in daljšega zadrževalnega časa (Mao in sod., 2015).

2.4.5 Vpliv toksičnih intermediatov

Med hidrolizo lignoceluloznega substrata se oblikujejo šibke kisline, derivati furana, krezoli in fenolne spojine, ki lahko inhibirajo acetotrofno metanogenezo. Fenolne spojine v bioplinskem reaktorju inhibirajo aktivnost arhej in posledično tudi aktivnost acetogenih bakterij. Koncentracije KMK močno narastejo, kar zniža pH in upočasni celoten bioplinski proces (Zemek in sod., 1979; Palmqvist in Hahn-Hägerdal, 2000). Raziskave kažejo, da je proizvodnja metana inhibirana pri koncentraciji fenola večji od 2000 mg/L (Fedorak in Hrudey, 1986) ter da so krezoli še bolj toksični od fenolov, pri čemer je hidrogenotrofna metanogeneza občutljivejša od acetotrofne. Prav tako so prosto plavajoče mikrobne celice občutljivejše na *p*-krezol kot imobilizirana (npr. granulirana) mikrobna biomasa. Inhibicija aktivnosti neimobilizirane mikrobne biomase se prične že pri 125 mg/L *o*-krezola in 100-240 mg/L *p*-krezola (Sežun in sod., 2011).

Težke in alkalne kovine (baker, svinec, kadmij, cink, nikelj, krom, natrij, kalij, kalcij, magnezij) v sledovih v bioplinskem reaktorju stimulirajo mikrobnno rast in njihovo aktivnost, kadar pa so prisotni v večjih koncentracijah v substratu, pa postanejo toksični za acidogene bakterije (Lin, 1992). Tudi amonijak ali amonijev ion, vmesna produkta razgradnje proteinov in hidrolize uree, sta lahko problematična za metanogenezo. Povečana proizvodnja amonija se lahko pojavi v bioplinskih reaktorjih pri uporabi substratov z nizkim razmerjem ogljika in dušika (Deublein in Steinhauser, 2008). Inhibicija z amonijem je odvisna od prisotnosti prostega neioniziranega amonija, ki je rezultat sprememb v pH in temperaturi (Angelidaki in Ahring, 1994; Sung in Liu, 2003; Eldem in sod., 2004). Količina topnega dušika v obliki prostega amonija je večja pri višjih temperaturah in višjem pH, v tem primeru je amonij bolj toksičen kot amonijev ion. Prosti amonij inhibira metanogenezo pri koncentraciji 100-1100 mg/L, nekaj raziskav pa je pokazalo, da so se mikroorganizmi sposobni adaptirati na visoke koncentracije amonija (Hansen in sod., 1998; Pind in sod., 2003).

2.4.6 Spremljanje sprememb v sestavi mikrobne združbe

Za optimizacijo bioplinske proizvodnje in povečevanje izplena metana je potrebno dobro razumevanje prehranske verige in interakcij med mikroorganizmi v bioreaktorju. V okviru vzpostavljanja učinkovitega biolinskega procesa se najpogosteje pojavljajo vprašanja glede vrste mikroorganizmov, ki so prisotni v bioreaktorju in njihovega števila oz. zastopanosti, in kateri od teh so aktivni in rastejo; koliko različnih vrst mikroorganizmov je v bioreaktorju in kako se obnašajo pri določenih pogojih. Pri tem so v pomoč molekularne metode, saj nekaterih mikroorganizmov še vedno ne znamo gojiti. Molekularne metode so hitre, podajo veliko količino podatkov, z njimi lahko identificiramo in kvantificiramo mikroorganizme, prisotne v bioreaktorju. Zaznavanje mikroorganizmov temelji na analizi DNA, aktivno populacijo pa lahko analiziramo le na podlagi RNA (Carballa et al., 2011; Fraher et al., 2012; Čater et al., 2013). Mikroorganizme lahko identificiramo s fluorescenčno *in situ* hibridizacijo (FISH, angl. fluorescence *in situ* hybridization)

(Ariesyady in sod., 2007), DNA mikromrež (Franke-Whittle in sod., 2009, 2014) ali s sekvenciranjem (Ács in sod., 2013). Pestrost in zgradbo mikrobne združbe lahko analiziramo z genetskimi tipizacijskimi tehnikami kot so analiza razrezanih pomnožkov ribosomske DNA (ARDRA, angl. amplified ribosomal DNA restriction polymorphism), polimorfizem konformacije enojnih verig (SSCP, angl. single strand conformation polymorphism) (Kampmann in sod., 2012), gelska elektroforeza z denaturacijskim gradientom (DGGE, angl. denaturing gradient gel electrophoresis), gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom (TGGE, angl. temperature gradient gel electrophoresis), polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (T-RFLP, angl. terminal restriction fragment length polymorphism) in analiza ribosomske medgenske razdalje (RISA, angl. amplified ribosomal intergenic spacer analysis) (Boulanger in sod., 2012). Optimalna izbira tehnike temelji na naravi informacije, ki jo potrebujemo, ter na prednostih in slabostih, ki jih ponuja vsaka tehnika (Muyzer in Smalla, 1998; Collins in sod., 2003; Čater in sod., 2013).

2.4.6.1 Metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR)

Analiza mikrobne združbe se začne z izolacijo DNA iz vzorcev. Nato je potrebno pomnožiti ustrezen odsek DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction). Odsek pomnoževanja izberemo glede na naravo informacije, ki jo z analizo združbe iščemo. S splošnimi oligonukleotidnimi začetniki lahko analiziramo celokupno združbo bakterij, arhej ali posameznih družin, s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki pa lahko pridobimo vpogled v posamezne vrste, prisotne v vzorcu (Klocke in sod., 2008; Traversi in sod., 2011; Karlsson in sod., 2012). Metoda PCR ni zmožna kvanitifikacije pomnožkov DNA v vzorcu, za ta namen se uporablja metoda PCR v realnem času (qPCR, angl. quantitative PCR).

2.4.6.2 PCR v realnem času

qPCR deluje na podobnem principu kot klasična metoda PCR, le da se v reakcijski mešanici uporabi še nespecifično fluorescentno barvilo, ki se veže na dvojnovidni pomnožek DNA. Stopnja fluorescence v vzorcu glede na število ciklov PCR nato razkrije količino pomnožkov PCR glede na referenčno standardno umeritev z znano količino celic, števila kopij ali količine genomske DNA (Carey in sod., 2007; Traversi in sod., 2012). Eden izmed pogosto uporabljenih fluorescenčnih barvil je SYBR Green, ki se nespecifično veže v vse dvojnovidne verige DNA. Zato je pomembno, da na koncu metode qPCR preverimo, ali so nastali le specifični produkti, kar je razvidno iz talilne krivulje. Z višanjem temperature spremljamo razpad pomnožkov qPCR na enoverižne molekule DNA; pri tem se vezano barvilo sprosti in fluorescensa izgine. V primeru nastanka specifičnega produkta so vse talilne krivulje enake, saj imajo produkti z enako nukleotidno sestavo enako temperaturo taljenja. Obstaja tudi drug tip metode qPCR, kjer spremljjanje nastalih produktov poteka s pomočjo tretjega oligonukleotida oziroma specifične oligonukleotidne sonde (Taqman probe). Le-ta nalega na tarčno mesto na DNA v območju

znotraj naleganja uporabljenega para začetnih oligonukleotidov. Sonda ima na 5'-koncu pritrjen fluorokrom, na 3'-koncu pa dušilec (angl. quencher), katerega bližina na sondi omejuje fluorescenco, ki jo oddaja fluorokrom. Ko med reakcijo qPCR polimeraza doseže mesto, kjer je vezana sonda, s 5' eksonukleazno aktivnostjo odcepi nukleotide sonde in s tem se sprostita fluorokrom in dušilec. Fluorescanca naraste, kar lahko izmerimo (Heid in sod., 1996; Mackay, 2004; Smith in Osborn, 2009).

Ena večjih težav, ki se pogosto pojavlja v reakcijah qPCR, pa je slabše delovanje metode zaradi inhibicije. Na slabše pomnoževanje tarč lahko vplivajo termodinamski pogoji, ostanki kemikalij iz metode za izolacijo DNA ali RNA in interferenca prevelikih količin le-teh (Gallup in Ackermann, 2006). Prav tako se pojavljajo inhibicije, specifične za vzorce, kar je pogosto pri okoljskih vzorcih (zemlja, voda, feces, urin). Pri izolaciji DNA ali RNA iz teh vzorcev lahko pride do sočasne izolacije tudi drugih spojin, ki vplivajo na kinetiko in vezavo polimeraze ter na celotno reakcijo PCR. Te spojine so običajno ostanki nukleinskih kislin, fenolne spojine, etanol, humične in fluvične kisline, težke kovine ter rastlinski polisaharidi in polifenolne kisline (Wilson, 1997; Bustin, 2004; Schriewer in sod., 2011). Ob pojavu inhibicije se pojavi prvi znaki kot so padec učinkovitosti in zmanjšana občutljivost pomnoževanja tarč (Huggett in sod., 2008).

Običajno se za boljši vpogled v stanje mikrobne združbe poslužujemo več metod analize DNA hkrati, tako je kvantitativna metoda qPCR velikokrat uporabljena hkrati s pol-kvantitativnimi tipizacijskimi tehnikami (Fraher in sod., 2012; Ács in sod., 2015). Tipizacijske tehnike se uporabljo za analizo mikrobne združbe, kjer se primerjajo fragmenti DNA v vzorcu brez filogenetske identifikacije. V sklopu raziskav za doktorsko nalogu smo poleg qPCR uporabili tudi tehniki DGGE in T-RFLP. Metoda qPCR v kratkem času poda veliko informacij, ni pa sposobna identifikacije neznanih vrst mikroorganizmov, katerih nukleotidno zaporedje genoma še ni poznano.

2.4.6.3 Gelska elektroforeza z denaturirajočim gradientom (DGGE)

S tehniko DGGE lahko ločujemo pomnožke gena za 16S rRNA enakih dolžin, vendar različnih sekvenc. Pomnožke nanesemo na poliakrilamidni gel z linearno naraščajočim gradientom denaturanta. S pomočjo električnega toka pomnožki potujejo skozi gel glede na molekulsko težo, zaradi denaturirajočega gradiента pa se pomnožki denaturirajo in se ustavijo pri različnih koncentracijah denaturanta, glede na različne specifične lastnosti pomnožkov. Zato ločevanje pomnožkov DNA pri tehniki DGGE temelji na različnih sekvencah pomnožkov DNA (Muyzer in sod., 1993; Muyzer in Smalla, 1998). Gre za hitro, pol-kvantitativno tehniko, primerno za primerjavo med vzorci, odvzetih ob različnih časih bioplinskega procesa ali iz različnih bioreaktorjev, ki uporabljajo različne substrate ali različne postopke obdelave substrata. Slabost tehnike DGGE pa predstavlja nezmožnost ločevanja med mikroorganizmi s podobnim deležem GC (Malin in Illmer, 2008; Worm in sod., 2009; Čater in sod., 2015). Pomnožke je možno iz gela celo izrezati, sekvencirati in jim določiti natančno nukleotidno zaporedje (Fraher in sod., 2012).

2.4.6.4 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (T-RFLP)

Tehnika T-RFLP pa temelji na principu ločevanja pomnožkov gena za 16S rRNA, razrezanih z restrikcijskimi endonukleoazami. Podobnost profilov T-RFLP se statistično obdela, oceni pomembnejše razlike v sestavi mikrobne združbe in analizira dalje s pomočjo hierarhičnih porazdelitvenih algoritmov (Blackwood in sod., 2003; Gilbride in sod., 2006). S tehniko T-RFLP tako lahko pridobimo informacijo o pestrosti, sestavi in dinamiki kompleksne mikrobne združbe v anaerobnih bioplinskih reaktorjih. Slabost tehnike T-RFLP je možnost napak v reakciji PCR, po drugi strani pa je T-RFLP izjemno hitra, natančna in relativno poceni pol-kvantitativna tehnika (McKeown in sod., 2009; Osborn in sod., 2000; Zupančič in sod., 2012; Čater in sod., 2013, 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mikrobnia biomasa

V študiji smo kot vir aktivnih anaerobnih mikroorganizmov uporabili svežo anaerobno mikrobnio biomaso iz industrijskega bioreaktorja UASB Čistilne naprave Laško, ki čisti odpadno pivovarsko vodo in ostanke pivovarskega kvasa iz Pivovarne Laško. Reaktor volumna 750 m³ obratuje pri temperaturi 33 – 36 °C in pri pH vrednostih 6,5 - 7. Povprečni hidravlični zadrževalni čas je bil 18,5 ur, povprečen pretok 1150 m³/dan in zadrževalni čas bakterij 40-85 ur.

3.1.2 Lignocelulozni substrat

Kot substrat za proizvodnjo bioplina smo uporabljali pivovarske tropine. Glede na podatke Pivovarne Laško, kjer smo pridobili pivovarske tropine za eksperimente v tej doktorski disertaciji, le-te vsebujejo 26,2 % beljakovin, 5,8 % škroba in 29,8 % lignina v suhi snovi (SS).

3.1.3 Anaerobne hidrolitske bakterije

Za bioaugmentacijo bioplinskega procesa smo izbrali anaerobne hidrolitske bakterije, ki so sposobne razgrajevati lignocelulozne materiale. Zato smo iskali potencialno uporabne bakterije, izolirane iz govejega vampa in drugih, podobnih virov, za katere je že znano, da izražajo dobro celulolitično in ksilanolitično aktivnost. Testirali smo vampni bakteriji *Pseudobutyryrivibrio xylanivorans* Mz5^T (DSM 14809), ki je bil izoliran na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnio biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani (Kopečny in sod., 2003), in *Fibrobacter succinogenes* S85, ki smo ga dobili iz Raziskovalnega instituta Rowett na Škotskem (Stewart in Flint, 1989). *Clostridium cellulovorans* smo kupili v zbirkni DSMZ (DSM3052) in izvira iz metanogenega bioreaktorja, ki je fermentiral hibridni topolov les (Sleat in sod., 1984).

3.1.4 Komercialne encimske mešanice

Testirali smo tudi, ali lahko izboljšamo hidrolizo pivovarskih tropin in s tem povečamo proizvodnjo metana z dodajanjem komercialnih encimskih mešanic v bioplinski bioreaktor. Nizozemsko podjetje DSM Biogas izdeluje encimske mešanice, namenjene povečanju bioplinske proizvodnje, ki vsebujejo encime, potrebne za razgradnjo vlaknin v žitih, ki se uporablja v proizvodnji bioplina. Testirali smo tri encimske mešanice in sicer Axiase 100, MethaPlus L100 in MethaPlus L120. Encimski mešanici MethaPlus sta v uporabi v nekaterih bioplinalnah v Franciji, Nemčiji in na Češkem, encimska mešanica Axiase 100 pa v Nemčiji in Veliki Britaniji.

Axiase 100 vsebuje encime za razgradnjo pektinov, betaglukanov, pentozanov, hemiceluloze in celuloze. Po navodilih proizvajalca omogoča dobro hidrolizo pri širokem spektru žit za bioplinsko proizvodnjo (rž, ječmen in podobno), izboljšano razgradljivost in zato izboljšano ekonomičnost bioplinarne. Poleg tega pa zmanjšuje tudi viskoznost procesne brozge in stabilizira bioplinski proces. Priporočeno začetno doziranje je 500 in kasneje 100 gramov na tono OS substrata na dan. Encimi Axiase 100 so stabilni pri pH 4,5-8 in temperaturi 35-50 °C (Axiase 100..., 2012). Cena na slovenskem trgu je 30 € za kilogram Axiase 100.

MethaPlus L100 je kompleksna encimska mešanica, pridobljena s submerzno fermentacijo izbranega seva *Trichoderma reesei*. Glavne aktivnosti te encimske mešanice so celulolitične, ksilanolitične in betaglukanazne narave. MethaPlus L100 z razgradnjo celuloze in hemiceluloze omogoča mikroorganizmom v bioplinskem bioreaktorju lažji dostop do substrata in s tem povečano proizvodnjo bioplina. Poleg tega pa zmanjšuje tudi viskoznost procesne brozge in plavajočo plast v bioplinskem bioreaktorju. Priporočena doza za kontinuirino dodajanje je 100-250 gramov na tono OS substrata na dan. Encimi v mešanici MethaPlus L100 so aktivni pri pH 4,5-8 in temperaturi 35-50 °C. Encimska aktivnost je inaktivirana pri temperaturi nas 65 °C (MethaPlus L100..., 2012).

MethaPlus L120 pa je različica MethaPlus L100 in se kot mešanica hidrolitičnih encimov uporablja za izboljšano anaerobno razgradnjo blata iz čistilnih naprav, ki čistijo komunalne in industrijske odpadne vode. Tudi ta z izboljšano hidrolizo omogoči mikroorganizmom, ki proizvajajo bioplín, lažji dostop do substrata. Prav tako pa povečuje odstranjevanje vode iz odvečnega blata, zmanjšuje porabo flokulantov in volumen končne odpadne procesne brozge. Priporočeno doziranje je 100-200 gramov na tono OS substrata na dan (MethaPlus L120..., 2011). Cena na slovenskem trgu je 35 € za kilogram MethaPlus L100 ali L120.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo bioplinskega procesa

3.2.1.1 Mikrobiološka gojišča za gojenje bakterij

Izbrane bakterije smo najprej anaerobno oživili v modificiranem tekočem gojišču M2 za vampne bakterije (Preglednica 4) (Hobson, 1969), v katerem smo jih pustili rasti 24 ur pri 37 °C do $OD_{654nm} = 1$. Vse sestavine, razen L-cisteina HCl, smo zatehtali in raztopili ob počasnem mešanju in kuhalni do vretja. Potem smo gojišče odstavili, dodali L-cistein HCl in še enkrat pustili, da zavre. Tako pripravljeno gojišče smo 20 minut prepričovali s CO₂, anaerobno s steklenimi brizgami alikvotirali po 10 ml v Hungate epruvete in jih 15 min avtoklavirali pri 121 °C in 1,1 bara. Za analize encimske aktivnosti smo nato bakterije nekajkrat aseptično in anaerobno precepili s sterilno Pasteurjevo pipeto. Vcepki bakterij v 10 ml inducibilnega gojišča M2 so bili volumna 160 µL.

Preglednica 4: Sestava gojišča M2 za gojenje hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo (modificirano po Hobson, 1969).

Table 4: The composition of M2 medium for culturing hydrolytic bacteria for bioaugmentation (modified after Hobson, 1969).

Sestavina	Končna koncentracija	Proizvajalec
tripton	1 vol. %	Biolife, ZDA
kvasni izvleček	0,25 vol. %	Biolife, ZDA
D-(+)-glukoza	0,2 vol. %	Kemika, Hrvaška
D-(+)-celobioza	0,2 vol. %	Merck, Nemčija
topni škrob	0,2 vol. %	Merck, Nemčija
NaHCO ₃	0,4 vol. %	Merck, Nemčija
L-cistein HCl	0,1 vol. %	Sigma-Aldrich, ZDA
mineralna raztopina I	15 vol. %	
K ₂ HPO ₄	3 g/L	Merck, Nemčija
mineralna raztopina II	15 vol. %	
KH ₂ PO ₄	3 g/L	Kemika, Hrvaška
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g/L	Merck, Nemčija
NaCl	6 g/L	Merck, Nemčija
MgSO ₄ x 6H ₂ O	0,65 g/L	Merck, Nemčija
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,6 g/L	Kemika, Hrvaška
vampni sok	30 vol. %	
resazurin	0,001 vol. %	Fluka, Švica
destilirana voda	40 vol. %	

Pred začetkom testov BMP, kjer smo testirali učinek bioaugmentacije z izbranimi bakterijami na proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin, smo le-te predhodno gojili do OD_{654nm} = 0,5 (19-24 ur, 37 °C) v inducibilnem gojišču M2 s spremenjeno sestavo ogljikovih hidratov (Preglednica 5) in s tem inducirali encimsko aktivnost celulaz in ksilanaz. Pri tem OD je bila rast izbranih bakterij v drugi polovici eksponencialne faze. *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 sta uspešno rasla v inducibilnem gojišču 1 s CMC celulozo in brezovim ksilanom, medtem ko je *C. cellulovorans* za uspešno rast in indukcijo encimov zahteval Avicel celulozo, brezov ksilan in celobiozo (gojišče 2).

Preglednica 5: Sestava ogljikovih hidratov v modificiranem inducibilnem gojišču M2 za gojenje hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo.

Table 5: The composition of carbohydrates in modified inducible M2 medium for culturing hydrolytic bacteria for bioaugmentation.

Modificirani ogljikovi hidrati	Končna koncentracija	Proizvajalec
Gojišče 1: za <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T in <i>F. succinogenes</i> S85		
brezov ksilan	0,3 vol. %	HiMedia Laboratories, Indija
karboksimetylceluloza (CMC)	0,3 vol. %	Sigma-Aldrich, ZDA
Gojišče 2: za <i>C. cellulovorans</i>		
brezov ksilan	0,25 vol. %	HiMedia Laboratories, Indija
Avicel celuloza	0,25 vol. %	Merck, Nemčija
celobioza	0,1 vol. %	Merck, Nemčija

3.2.1.2 Določanje koncentracije proteinov po Lowry-ju

Za določanje koncentracije proteinov v vzorcih kultur posameznih hidrolitskih bakterij smo uporabili metodo po Lowryju (Lowry in sod., 1951). Vzorec so predstavljale izbrane hidrolitske bakterije v 10 ml inducibilnega gojišča M2 pri $OD_{654nm} = 0,5$. Za umeritveno krivuljo smo pripravili redčitveno vrsto osnovne raztopine BSA. Nato smo standardnim raztopinam BSA in encimskim vzorcem dodali NaOH in kuhalo 5 minut pri 100 °C za alkalno hidrolizo. Pripravili smo mešanico reagentov Lowry A: Lowry B = 50 : 1 s pH = 7 (Preglednica 6). Ohlajenim vzorcem smo dodali 625 µL mešanice Lowry reagentov in med mešanjem na Vorteks mešalu še 125 µL razredčenega reagenta Folin Ciocalteu z destilirano vodo (1 : 1). Razvoj barve je potekal 30 minut. Absorbanci pri 700 nm smo izmerili na spektrofotometru (Shimadzu, UV-160A, Japonska).

Preglednica 6: Sestava reagentov Lowry A in B.

Table 6: The composition of Lowry A and B reagents.

Reagent	Sestava
Lowry A	Na ₂ CO ₃ 5 %
Lowry B	NaK-tartrat 1 %
	CuSO ₄ ·5H ₂ O 0,5 %

3.2.1.3 Analiza encimske aktivnosti

Za analizo encimske aktivnosti kultur posameznih hidrolitskih bakterij v inducibilnem gojišču M2 pri $OD_{654nm} = 0,5$ smo določali redukcijske sladkorje s hidrazidom benzojske kisline (PAHBAH) (Lever, 1977). Za testiranje ksilanazne aktivnosti smo kot substrat uporabili 1 % ksilan iz brezovega lesa (HiMedia Laboratories, India), za testiranje endoglukanazne aktivnosti 1 % CMC celulozo (Sigma–Aldrich, USA), ki je poznana kot topna celuloza zaradi svoje amorfnosti, za testiranje eksoglukazane aktivnosti pa 1 % Avicel celulozo (Merck, Germany), ki predstavlja kristalinično celulozo. Substrate smo suspendirali v 50 mM fosfstnem pufru (pH = 6,5). Encimske vzorce smo s substratom inkubirali 150 minut pri 37 °C. Kontrolne vzorce smo pripravili tako, das mo jih pred inkubacijo s substratom 15 minut kuhalo pri 100 °C in s tem inaktivirali encime. Po inkubaciji smo encimsko delovanje v vzorcih in kontrolah zaustavili z dodatkom 10 % trikloroacetne kisline. Za spektrofotometrično določanje sproščenih redukcijskih sladkorjev smo pripravili svežo reagenčno mešanico PAHBAH (Preglednica 7). Encimske vzorce in kontrole smo inkubirali z reagenčno mešanico PAHBAH 10 minut pri 100 °C. Zaradi sproščenih redukcijskih sladkorjev se vzorci pobarvajo rumeno; intenzitetu barve smo izmerili na spektrofotometru (Shimadzu, UV-160A, Japonska) pri 420 nm. Za umeritveno krivuljo smo za merjenje aktivnosti ksilanaz uporabili standardne raztopine ksiloze, v primeru sledenja endo- in eksoglukanazne aktivnosti pa z raztopinami glukoze.

Preglednica 7: Sestava reagenčne mešanice PAHBAH.
Table 7: The composition of PAHBAH reagent mixture.

Reagenti	Začetna koncentracija	Volumen za 100 ml mešanice PAHBAH
Na ₂ SO ₃	1M	5 ml
natrijev citrat	0,5 M	5 ml
NaOH	5 M	5 ml
destilirana voda	-	80 ml
CaCl ₂	0,2 M	5 ml
hidrazid parahidroksi benzojeve kisline	-	1 g
bidestilirana voda	-	do skupnega volumna

Specifične encimske aktivnosti vzorcev smo izračunali po enačbi 1, kjer ΔRS pomeni razlika v količini sproščenih redukcijskih sladkorjev med vzorcem z aktivnim encimom in kontrolo z inaktiviranim encimom (mol/L), V količino mešanice v encimski reakciji (L), c_P koncentracijo proteinov v posameznem vzorcu (mg/ml), V_E količino encimskega vzorca (ml) in t čas inkubacije (min).

$$\text{specifična encimska aktivnost} = \frac{\Delta RS \times V}{c_P \times V_E \times t} \quad \dots (1)$$

Specifično encimsko aktivnost smo izrazili v nanomolih sproščenih redukcijskih sladkorjev na mg proteinov in minuto (nmol RS/mg PROT/min) (Čepeljnik, 2005).

3.2.2 Test biometanskega potenciala (BMP)

Za testiranje razgradljivosti lignoceluloznega substrata in kako bioaugmentacija in dodatek encimov učinkujeta na bioplinsko proizvodnjo, smo uporabili test BMP (Owen in sod., 1979). V laboratorijskih anaerobnih bioreaktorjih volumna 1 L smo v najmanj dveh ponovitvah spremljali šaržni proces z vsaj dvema paralelkama testnih bioreaktorjev in s tem obseg in hitrost pretvorbe pivovarskih tropin v bioplín oz. metan pri bioaugmentacijah z različnimi hidrolitskimi bakterijami in pri dodajanju različnih encimov.

Pred začetkom testa BMP smo iz UASB reaktorja Čistilne naprave Laško odvzeli 4 L sveže aktivne mikrobne biomase, ki smo jo nato v laboratoriju prepihalo z dušikom, alikvotirali v posamezne steklenice in jo stabilizirali z inkubacijo 7 dni pri 37°C. V tem času se porabijo vsa hranila, prisotna v procesni brozgi iz UASB reaktorja, in lahko v testu BMP sledimo proizvodnji bioplina le iz dodanega substrata (EN ISO 11734). Za izvedbo testa BMP v merljivem območju je potrebno zagotoviti ustrezno obremenitev mikrobne biomase s substratom. Obremenitev mikrobne biomase s potencialno razgradljivo OS smo ocenili s KPK substrata, izraženo na OS mikrobne biomase. Pred začetkom testa BMP smo oživili in encimsko inducirali izbrane hidrolitske bakterije za bioaugmentacijo.

3.2.2.1 Analiza suhe in organske snovi mikrobne biomase in substrata

Žarilne lončke smo pred analizo očistili in žarili 3 ure pri 105 °C in ohladili v eksikatorju. Prazne lončke smo stehtali (Scaltec SAC51, Nemčija), nato pa v njih odpipetirali 10 ml sveže mikrobne biomase, odvzete iz UASB reaktorja Čistilne naprave Laško, in jih ponovno stehtali. Mikrobično biomaso smo nato čez noč sušili pri 105 °C in nato zopet stehtali. SS smo izračunali po enačbi 2, kjer je m_{POS} masa lončka z vzorcem po sušenju, m_{LON} masa praznega lončka in V količina vzorca pred sušenjem.

$$SS \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_{POS} - m_{LON}}{V} \times 1000 \quad \dots (2)$$

Posušeno mikrobično biomaso smo čez noč žarili pri 550 °C, stehtali in izračunali OS po enačbi 3, kjer je m_{POS} masa lončka z vzorcem po sušenju, m_{POŽ} masa lončka z vzorcem po žarjenju in V količina vzorca pred sušenjem.

$$OS \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_{POS} - m_{POŽ}}{V} \quad \dots (3)$$

BMP teste smo izvajali z 2g OS mikrobne biomase na liter testne mešanice. Po enakem postopku smo analizirali tudi količino vsebujoče SS in OS pivovarskih tropin (Standard Methods..., 2006).

3.2.2.2 Kemijkska potreba po kisiku (KPK)

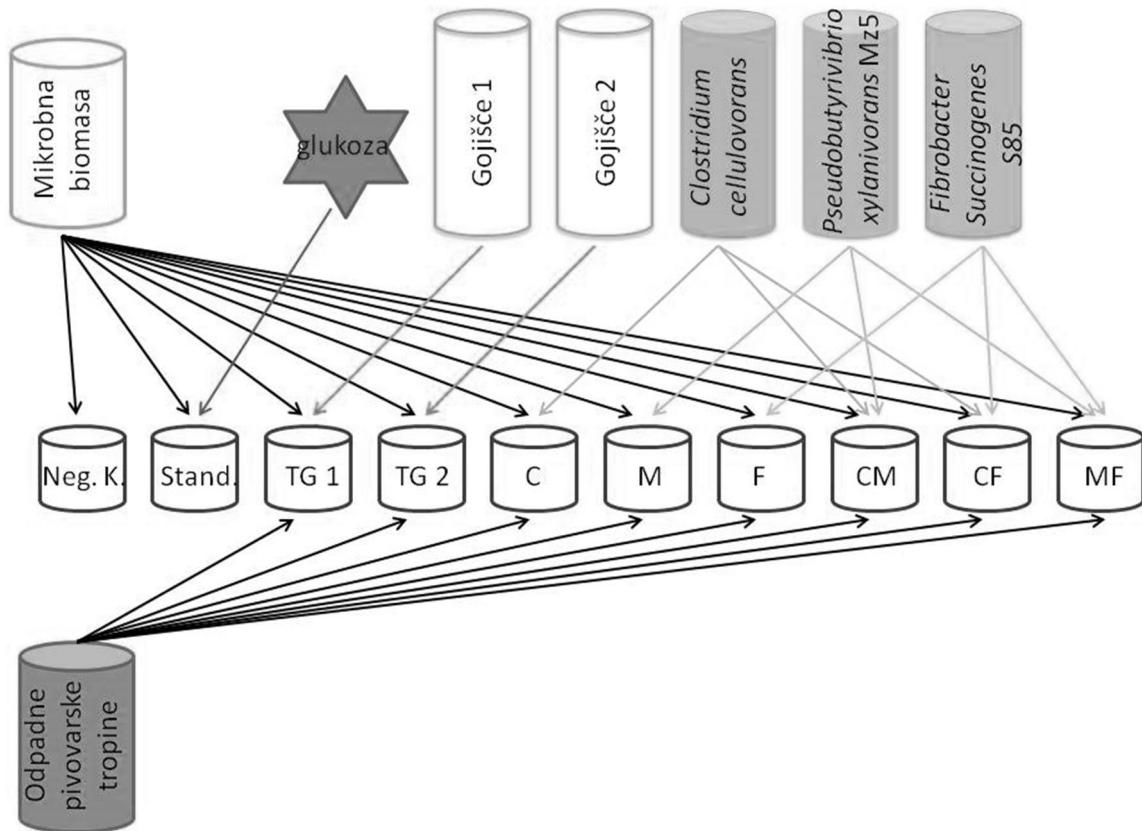
Za ocenitev primerne obremenitve mikrobne biomase s substratom smo določali vrednost KPK (Standard Methods..., 2006) pivovarskih tropin. KPK predstavlja kisikov ekvivalent vsebnosti OS v vzorcu, ki jo je možno oksidirati z močnim kemijskim oksidantom (kalijev dikromat). Za umeritveno krivuljo smo uporabili standardne raztopine glukoze. Zaradi narave pivovarskih tropin smo za lažje pipetiranje 50 g tropin dodali 90 ml destilirane vode in homogenizirali s homogenizatorjem Polytron (PT 1200E, Kinematica AG, Švica). Takšno mešanico smo uporabili za analizo KPK in tudi v testu BMP. 2,5 ml vzorca mešanice tropin smo dodali 1,5 ml raztopine s kalijevim dikromatom in žvepleno kislino in 3,5 ml srebrovega sulfata v žvepleni kislini, premešali in kuhalni 2 uri pri 150 °C. Pri kontroli smo namesto vzorca reagentom dodali destilirano vodo. Absorbance pri 600 nm smo merili na spektrofotometru (Shimadzu UV-160A). V testih BMP smo mikrobično biomaso bremenili z 0,2 g KPK substrata na 1 g OS mikrobne biomase.

Po enakem postopku smo analizirali tudi vrednost KPK mikrobne biomase in vzorce iz bioreaktorjev z dne 0 in 30. Za dosego umeritvenega območja so bile potrebne 10-kratne redčitve vzorcev dneva 0 in 5-kratne redčitve vzorcev dneva 30. Reduciran KPK smo izračunali kot razliko med vrednostjo KPK na dan 0 in na dan 30, s čimer smo izrazili količino OS, ki se je porabila v 30 dneh testa BMP.

Za določitev KPK_{substrata} v posameznih bioreaktorjih smo analizirali tudi KPK mikrobnih kultur dodanih hidrolitskih bakterij v inducibilnem gojišču M2 1 in 2 in neinokulirani gojišči 1 in 2 ter priporočenih doz dodanih encimskih mešanic.

3.2.2.3 Shema testov BMP in analiz strukture mikrobne združbe

V prvem sklopu raziskav smo proučevali učinek bioaugmentacije z bakterijami na razgradnjo pivovarskih tropin in proizvodnjo bioplina. Bioreaktorjem smo dodali anaerobne hidrolitske bakterije *Clostridium cellulovorans*, *Pseudobutyryrivibrio xylanivorans* Mz5^T in *Fibrobacter succinogenes* S85. V bioreaktorje smo jih dodajali z že inducirano encimsko aktivnostjo ($OD_{654nm} = 0,5$) skupaj z gojiščem, v količini 5 % od celotnega volumna testnih mešanic. Dodajali smo jih individualno in v kombinacijah (Slika 3). Za opredelitev učinka same bioaugmentacije smo testirali tudi mešanice, v katere smo poleg mikrobne biomase in pivovarskih tropin dodali tudi neinokulirano gojišče.

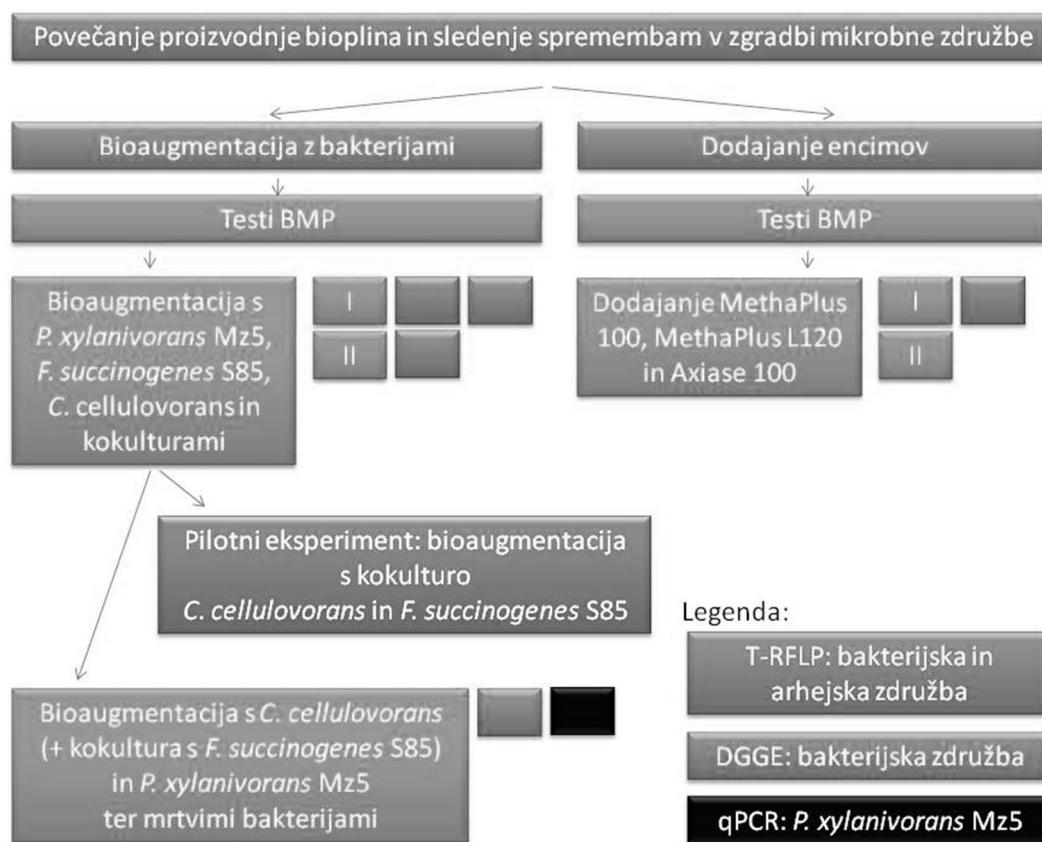


Slika 3: Priprava testnih mešanic bioreaktorjev za test BMP.
Figure 3: The preparation of bioreactor experimental mixtures for BMP assay.

V prvem sklopu raziskav smo izvedli smo različne bioaugmentacije z bakterijami (Slika 4):

- a) Izvedli smo dve ponovitvi laboratorijskega testa BMP z bioaugmentacijo s hidrolitskimi bakterijami *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, dodanimi individualno in v kokulturah, pri čemer so bili bioreaktorji v vsaj dveh paralelkah. Mikrobi združbo obeh testov BMP smo analizirali s tehniko T-RFLP, z DGGE pa le prvega. Dodatno smo testirali tudi, kako dodatek mrtvih bakterij učinkuje na proizvodnjo bioplina ozziroma metana.
- b) Nekatere kokulture iz sklopa a) so se izkazale za neuspešne pri povečevanju proizvodnje bioplina, zato jih v nadaljevanju nismo več testirali. V 4 paralelkah smo izvedli ponovitveni test BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, ki so se izkazali za najboljše pri povečevanju proizvodnje metana iz pivovarskih tropin. Za razliko od prejšnjih testov BMP smo pri tem pogosteje vzorčili procesno brozgo za molekularne analize mikrobne združbe. Prisotnost dodanega *P. xylanivorans* Mz5^T v kompleksni mikrobi združbi smo analizirali z DGGE in qPCR.
- c) Izvedli smo pilotni test BMP z bioaugmentacijo s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, ki se je izkazala za eno od najučinkovitejših pri povečevanju proizvodnje metana.

V drugem sklopu raziskav pa smo testirali, kako redno dodajanje komercialnih encimskih mešanic v bioreaktorje učinkuje na proizvodnjo bioplina. Tekoče encimske mešanice MethaPlus L120, MethaPlus 100 in Axiase 100 smo hranili pri 4 °C. V bioreaktorje smo jih injicirali vsak drugi dan v različnih dozah. Priporočeno doziranje za industrijske bioreaktorje je 100-250 g/tos substrata/dan, kar je v našem primeru predstavljalo 0,02 µL encimske mešanice/bioreaktor. Testirali smo priporočeno, dvakratno, petkratno in desetkratno dozo. V kontrolni bioreaktor pa smo k mikrobi biomasi dodali le pivovarske tropine. Pri prvem testu BMP z dodajanjem encimskih mešanic smo analizirali mikrobi združbo s tehniko T-RFLP.



Slika 4: Optimizacije bioplinske proizvodnje iz pivovarskih tropin z različnimi vrstami bioaugmentacije in z dodajanjem encimov ter molekularne analize sestave mikrobne združbe.

Figure 4: Optimization of biogas production from brewery spent grain with different bioaugmentations and enzyme additions and microbial community structure analyses with molecular methods.

3.2.2.4 Priprava mešanic za laboratorijske teste BMP

Litrski bioreaktorji v najmanj dveh paralelkah smo med pripravo testnih mešanic s končnim volumnom 700 ml in delovnim volumnom 450 ml (po vzorčenju za dan 0 za nadaljnje analize) stalno preprihovali s CO₂ za zagotavljanje anaerobnosti. V bioreaktorje smo glede na izračunane obremenitve dodali ustrezno količino pivovarskih tropin in mikrobne biomase. Že omenjeno delovno mešanico pivovarskih tropin in granulirano mikrobnou biomaso smo ločeno 10 min homogenizirali na največji hitrosti s homogenizatorjem Polytron (PT 1200E, Kinematica AG, Švica). S tem smo substratu povečali površino delcev za večjo dostopnost hidrolitskih encimov, iz mikrobnih granul pa smo sprostili notranje mikroorganizme, da jim je bil neraztopljeni substrat lažje dostopen.

Pri testih BMP, kjer smo ugotavljali, kako dodane hidrolitske bakterije izboljšajo bioplinsko proizvodnjo iz pivovarskih tropin, smo bakterije z inducirano encimsko aktivnostjo dodajali v količini 5 % od celotnega volumna mešanic (Slika 3). Pri testih BMP, kjer smo ugotavljali, kako dodane komercialne encimske mešanice vplivajo na bioplinsko proizvodnjo iz pivovarskih tropin, pa smo encimske mešanice redno dodajali v

bioreaktorje vsake dva dneva in sicer v priporočeni, dvakratni, petkratni in 10-kratni dozi. Po navodilih proizvajalca encimskih mešanic (DSM Food Specialties B. V., Nizozemska) je okvirno priporočeno doziranje 100-250 g encimske mešanice na tono OS substrata na dan, kar v našem primeru pomeni 0,0182-0,0455 µL encimske mešanice na bioreaktor na dan. V testih BMP smo z injekcijsko iglo dozirali encimske mešanice vsak drugi dan po 0,02 µL na bioreaktor v primeru testiranja priporočene doze, 0,04 µL pri dvakratni dozi, 0,1 µL pri petkratni dozi in 0,2 µL pri 10-kratni dozi.

Za vzdrževanje puferske kapacitete smo dodali fosfatni pufer, ki smo ga pripravili iz raztopin 1 in 2 (Preglednica 8). Raztopini smo nato zmešali v enakovrednih količinah. Do polnega volumna mešanic (700 ml) smo dodali predhodno pripravljeno anaerobno vodo, katero smo pripravili tako, da smo vodo prekuhalili do vretja in jo nato še 20 minut prepohovali s CO₂ za zagotovljeno anaerobnost.

Preglednica 8: Sestava raztopin 1 in 2 za pripravo fosfatnega pufra za test BMP.

Table 8: The composition of dilutions 1 and 2 for the preparation of phosphate buffer for BMP assay.

Raztopine	Sestava	
raztopina 1	KH ₂ PO ₄	45,06 g
	destilirana voda	1000 mL
raztopina 2	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	97,54 g
	destilirana voda	1000 mL

Ko so bile mešanice popolne, smo vzorčili 150 ml za analize mikrobne združbe, centrifugirali 5 min pri 3200 rpm, odlili odvečno tekočino, posedli vzorec pa sušili preko noči pri 45 °C in nato zamrznili do nadaljnjih analiz. Iz bioreaktorjev smo odvzeli tudi 100 ml mešanice za analizo KPK in zamrznili. Vzorčili smo še 1,5 ml mešanice za analizo koncentracije KMK in zamrznili ter pomerili vrednost pH v bioreaktorjih. Tako je bil končni delovni volumen v bioreaktorjih 450 ml. Bioreaktorje smo prepohovali s CO₂ še 15 minut in jih nato dobro zatesnili ter vse bioreaktorje istočasno postavili na temno in jih inkubirali 30 dni pri 37 °C in mešanju 120 rpm.

Vsak test BMP je vseboval pozitivno in negativno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo kot substrat uporabili hitro razgradljivo glukozo z enako obremenitvijo kot je bila obremenitev s substratom, pri negativni kontroli pa substrata nismo dodali, ampak smo spremljali le osnovno aktivnost mikrobne biomase. Volumen proizvedenega bioplina negativne kontrole smo odšteli od volumna nastalega bioplina pri vseh ostalih testnih mešanicah in s tem zagotovili, da v rezultatih vrednotimo le bioplín, nastal iz dodanih tropin.

3.2.2.5 Priprava mešanic za pilotno testiranje bioaugmentacije

C. cellulovorans in *F. succinogenes* S85 smo testirali tudi v pilotnem bioreaktorju volumna 200 L na Čistilni napravi Laško (Slika 5). Približno na sredini bioreaktorja je bila nameščena kovinska mreža, na kateri so bile pivovarske tropine, prav tako pa je ločevala

bioreaktorsko posodo na zgornji in spodnji del. V spodnjem delu, v konusu bioreaktorske posode je bila odpadna voda, v zgornjem delu posode pa prostor za nastali bioplín. V zgornji del bioreaktorja je bila tudi speljana cev za kroženje odpadne vode. Na koncu cevi je bila za enakoverno porazdelitev odpadne vode po substratu nameščena šoba. Ko sta bakteriji v inducibilnem gojišču M2 dosegli $OD_{654nm} = 0,5$, smo ju dodali v spodnji del bioreaktorja, v odpadno vodo, v količini 5 % od celotnega volumna mešanice. Reaktor smo obremenili s 17,5 kg tropin, 17,5 kg mikrobne biomase iz UASB reaktorja in 50 L odpadne pivovarske vode. Skupni delovni volumen mešanic v pilotnih reaktorjih je bil 53 L. Pretok odpadne vode je bil nastavljen na 26,5 L/h. Proizveden bioplín smo merili s pretočnima merilnikoma, vzorčili pa smo ga v steklenih kivetah, ki so se nahajale zunaj bioreaktorske posode. pH in temperaturo pa je spremljal računalniški program. Proizvodnjo bioplina v bioaugmentiranem bioreaktorju smo primerjali s kontrolnim bioreaktorjem, v katerem je bila le mikrobna biomasa, substrat in neinokulirano inducibilno gojišče M2. Pilotni test BMP je potekal 38 dni pri $37 - 40^{\circ}\text{C}$.



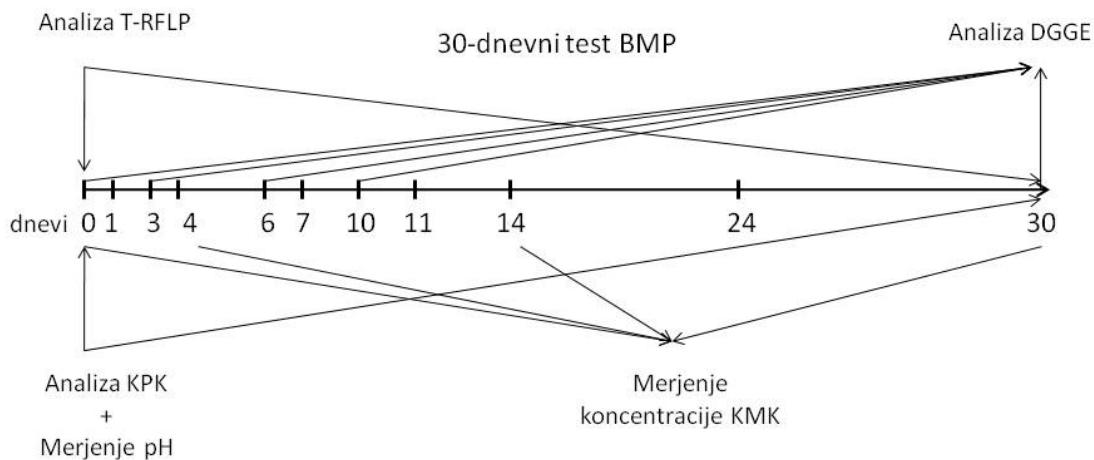
Slika 5: Pilotna bioreaktorja s pretočnimi merilniki nastalega bioplina, črpalkami odpadne vode in steklenima kivetama za vzorčenje bioplina za nadaljnje analize sestave bioplina.

Figure 5: Pilot bioreactors with the equipment for measuring volumes of biogas produced, wastewater pumps and glass quvets for biogas sampling for further biogas composition analyses.

3.2.3 Spremljanje parametrov bioplinskega procesa

V času testov BMP, ki so potekali 30 dni, smo, poleg osnovnih spremljanj procesa kot je analiza sestave bioplina in merjenje volumna proizvedenega bioplina, izvajali tudi dodatni monitoring bioplinskega procesa (Slika 6). Že ob začetku testa BMP (dan 0) ter ob

njegovem zaključku (dan 30) smo izvedli vzorčenja za analizo KPK, pH, koncentracije KMK ter za nadaljnje analize sestave mikrobine združbe. Med potekom bioplinske proizvodnje pa smo redno spremljali sestavo in volumen novonastalega bioplina in koncentracijo prisotnih KMK.



Slika 6: Časovni prikaz dodatnega spremljanja parametrov bioplinskega procesa testov BMP.

Figure 6: Time view over the additional monitoring of biogas process parameters during BMP assay.

3.2.3.1 Analiza sestave in volumena nastalega bioplina

Sestavo in volumen proizvedenega bioplina smo spremljali na dan 1, 3, 4, 11, 14, 24 in 30. Odstotne deleže metana, ogljikovega dioksida in dušika v bioplincu smo izmerili s plinskim kromatografom z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD) (Shimadzu GC14A, Japonska) in kolono PORAPAK-Q (Agilent, ZDA), kjer smo za nosilni plin uporabili helij. Kalibracijska mešanica plinov je bila sestavljena iz 15,3 % vodika, 19,9 % dušika, 20,3 % metana in 44,5 % ogljikovega dioksida. Kromatografski signali so bili na podlagi absolutne kalibracije s kalibracijsko plinsko mešanicijo ovrednoteni z integratorjem Chromatopack CR-4A (Shimadzu, Japonska). Sestavo bioplina smo merili pri naslednjih pogojih: temperatura injektorja 50 °C, temperatura kolone 25 °C, temperatura detektorja 80 °C, tok 60 mA. Izmerjene odstotke vsebovanega metana smo normalizirali v vrednosti pri standardnih pogojih (Hansen in sod., 2004). Izmerili smo tudi sestavo plinov, nastalih pri gojenju čistih kultur izbranih bakterij za bioaugmentacijo v inducibilnem gojišču M2 ($OD_{654nm} = 0,5$).

Volumen proizvedenega bioplina smo izmerili z manometrom na vodni stolpec v obliki črke U in brizgalke, priklopljene nanj (Slika 7). Novonastali bioplinski sestavi smo nato vedno izpustili iz reaktorja in v obdelavi rezultatov upoštevali kumulativno vseh meritev. Na podlagi podatkov o volumenu novonastalega bioplina in deležu metana v njem smo izračunali volumen novonastalega metana in v obdelavi rezultatov upoštevali kumulativno proizvodnjo metana. Hitrost nastajanja metana v prvih dneh testa BMP smo izračunali na podlagi enačbe premice, ki se je najbolj prilegala krivulji proizvodnje metana na g $KPK_{\text{substrata}}$.



Slika 7: Postopek merjenja volumna nastalega bioplina z manometrom na vodni stolpec in brizgalko.
Figure 7: Measuring the volume of the produced biogas with a water column manometer and a syringe.

3.2.3.2 Analiza kratkoverižnih maščobnih kislín (KMK)

KMK smo ekstrahirali z dvojno etsko ekstrakcijo (Holdeman, 1977) in izmerili njihovo ekstrakcijo s plinskim kromatografom s plamensko ionizacijskim detektorjem (Shimadzu GC14A, Japonska) in kolono DB-WAXetr (Agilent, ZDA). Nosilni plin je bil helij, kvantifikacija pa je bila izvedena z metodo internega standarda (krotonska kislina, 100 mg/ml) z intergatorjem Chromatopack CR-4A (Shimadzu, Japonska) (Preglednica 9). Analizo smo izvedli pri naslednjih pogojih: temperatura injektorja 160 °C, temperatura detektorja 210 °C, začetna temperatura 90 °C, začetni čas 4 min, končna temperatura 160 °C, končni čas 2 min, temperaturni program 15 °C/min.

Preglednica 9: Sestava kalibracijske mešanice KMK za plinsko kromatografijo.

Table 9: The composition of the calibration mixture of short chain fatty acids for gas chromatography.

Kratkoverižna maščobna kislina	Količina na 100 ml (µl)	Koncentracija (g/L)	Koncentracija (mM)
ocetna	50	0,525	8,743
propionska	50	0,495	6,682
izo-maslena	50	0,475	5,391
n-maslena	50	0,480	5,448
izo-valerenska	50	0,465	4,554
n-valerenska	50	0,470	4,603
krotonska (interni standard)	100	1,000	dodano pri ekstrakciji
n-kapronska	50	0,465	4,002

Za ovrednotenje količine KMK v bioreaktorjih na dan 0, ki izvirajo iz kultur, ki smo jih uporabili za bioaugmentacijo, smo analizirali koncentracijo KMK tudi v čistih kulturah izbranih bakterij, ki so zrasle do $OD_{654nm} = 0,5$ v inducibilnem gojišču M2.

3.2.3.3 Vrednost pH

Ob začetku in zaključku testa BMP smo vzorcem izmerili vrednost pH (pH 700, Eutech Instruments, Singapur).

3.2.4 Analize sprememb v sestavi mikrobne združbe

Sestavo bakterijske in arhejske mikrobne združbe in njeno spreminjanje v času testa BMP smo sledili z metodo T-RFLP (določanje polimorfizmov dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov) in z metodo DGGE (denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo). Ker smo uporabljali težko razgradljiv lignocelulozni substrat in hkrati še dodajali hidrolitske bakterije, so bile spremembe v sestavi mikrobnih združb pričakovane. Zaradi prisotnosti sorodnih klostridijev v bioreaktorjih in podobnosti genov je bilo sledenje *C. cellulovorans* z metodo DGGE oteženo. Hkrati nas je zanimalo preživetje najuspešnejšega *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorskem sistemu po bioaugmentaciji, kar smo proučevali z DGGE in s qPCR.

3.2.4.1 Izolacija DNA

Zamrznjene vzorce iz bioreaktorjev smo odtalili in z uporabo kita za izolacijo DNA PowerSoil DNA Isolation Kit (MO-BIO Laboratories, Inc., ZDA) po navodilih proizvajalca iz 150 mg vzorca izolirali DNA.

DNA čistih kultur hidrolitskih bakterij, uporabljenih za bioaugmentacijo, pa smo izolirali po klasični metodi s kloroformom, mešanico fenol:kloroform:izoamilalkohol in izopropanolom. Najprej smo 1 ml kulture s približnim $OD_{654nm} = 1,0$ centrifugirali (5 min, 10000 x g), celice sprali v pufru TE (Preglednica 10), spet centrifugirali in resuspendirali v 567 µl pufra TE. Dodali smo 3 µl proteinaze K (18,5 mg/ml) (Thermo Scientific, ZDA) in 30 µl 10 % SDS ter inkubirali eno uro v inkubatorju pri 37 °C, da smo razbili celice. Nato smo dodali 100 µl 5M NaCl, premešali in dodali 80 µl CTAB/NaCl, ki smo ga prej segreli na 65 °C, in spet premešali ter inkubirali v termobloku 10 min pri 65 °C. Nato smo vzorcem dodali 600 µl kloroforma (Merck, Nemčija), premešali, centrifugirali (5 min, 12000 x g) in prenesli vodno fazo v novo epico. Ekstrakcijo smo ponovili z mešanico fenol:kloroform:izoamilalkohol (25:24:1, pH = 8) (Sigma-Aldrich, ZDA), zopet centrifugirali in prenesli vodno fazo v novo epico. Nato smo ponovili ekstrakcijo še s kloroformom, centrifugirali in prenesli vodno fazo v novo epico. DNA smo oborili s 300 µl izopropanola (Merck, Nemčija), centrifugirali (5 min, 14000 x g), odstranili supernatant in pelet sprali z 1 ml 70 % etanolom. Pelet smo nato v odprtih epicah osušili ob gorilniku in izolirano DNA nato raztopili v 30 µl pufra TE.

Uspešnost izolacije DNA smo preverili z gelsko elektroforezo (BioRad, ZDA) na 1% agaroznem gelu (SeaKem, ZDA), pri čemer smo agarozo Sea Kem LE (Lonza, ZDA) raztopili v 0,5 x TBE pufru s segrevanjem v mikrovalovni pečici. TBE pufer so sestavljeni: 0,045 M Tris, 0,045 M H_3BO_3 in 1 mM EDTA. Na gel smo naložili po 3 μ l velikostnega standarda GeneRuler 1 kb DNA Ladder in mešanico DNA (4 μ l) in nalagalnega pufra. Nalagalni pufer je bil sestavljen iz 0,25 vol. % bromfenol modrega, 0,25 vol. % ksilen cianola in 40 ut. % saharoze. Elektroforeza je tekla 30 minut na 100 V in 400 mA. Nato smo gel barvali v etidijevem bromidu (1 μ g/ml) 10 minut in razbarvali v destilirani vodi naslednjih 15 minut. Gele smo slikali z Gel Doc 1000 (Bio-Rad, USA) in optimizirali sliko s programom Molecular AnalystTM/PC (Bio-Rad, USA). Izolirana DNA je rezultirala v dolžini 900 bp. Čistost in koncentracijo izolirane DNA smo preverili s spektrofotometrom NanoVue-Plus (GE Healthcare, VB).

Preglednica 10: Sestava raztopin za klasično metodo izolacije DNA čistih kultur.

Table 10: The composition of the reagents for a classical method for pure cultures DNA isolation.

Raztopina	Sestava	Proizvajalec
pufer TE	10 mM Tris-HCl	Merck, Nemčija
	1 mM EDTA	Merck, Nemčija
CTAB/NaCl	10 ut. % CTAB	Sigma-Aldrich, ZDA
	0,7 M NaCl	Merck, Nemčija

3.2.4.2 Polimorfizem dolžin terminalnih restriktijskih fragmentov (T-RFLP)

Vzorce iz bioreaktorjev, vzorčene na dan 0 in 30, smo analizirali z metodo T-RFLP. Ločeno smo izvedli analize bakterijske mikrobne združbe ter arhejske mikrobne združbe.

3.2.4.2.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za analizo T-RFLP

1 μ l DNA, izolirane iz posušenega vzorca iz bioreaktorja, smo dodali v 24 μ l mešanico za verižno reakcijo s polimerazo (PCR) (Preglednica 11). Za pomnoževanje bakterijskih 16S rRNA genov smo uporabili oligonukleotidni začetnik fD1 (Weisburg in sod., 1991), označen z barvilom 6-FAM, in 926r (Muyzer in sod., 1993), za pomnoževanje arhejskih 16S rRNA genov pa 109f (Grosskopf in sod., 1998), označen z barvilom 6-FAM, in 915R (Peng in sod., 2008).

Reakcije PCR so bile izvedene v napravi MyCycler (BIO-RAD, ZDA) po programu za analizo bakterijske ali arhejske združbe (Preglednica 12). Pri obeh programih se je cikel med 95°C 30 sekund in 72°C 1 (ali 1,3) minuta ponovil 30-krat.

Preglednica 11: Sestava mešanice PCR za analizo T-RFLP.
Table 11: The composition of the PCR mixture for T-RFLP analysis.

Reagent	Založna koncentracija	Koncentracija v 25 µL reakciji
pufer	10 x	1 x
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTP	2 mM	0,2 mM
oligonukleotidni začetniki	10 µM	0,3 µM
polimeraza Taq	5 U/ µl	0,5 U
Sigma voda	-	do polnega volumna

Preglednica 12: Programa PCR za pomnoževanje bakterijskih in arhejskih genov 16S rRNA za analizo T-RFLP.

Table 12: PCR programmes for the amplification of bacterial and archaeal 16S rRNA genes for T-RFLP analysis.

Bakterije		Arheje	
Temperatura (° C)	Čas	Temperatura (° C)	Čas
95	5 minut	95	5 minut
95	30 sekund	95	30 sekund
55	30 sekund	52	45 sekund
72	1 minuta	72	1,3 minut
72	7 minut	72	7 minut
4	∞	4	∞

Uspešnost reakcije PCR smo preverili z gelsko elektroforezo (BioRad, ZDA) na 1% agaroznem gelu (SeaKem, ZDA) po že omenjenem postopku. Pomnožene produkte PCR smo po navodilih proizvajalca očistili s High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Basel, Švica). Za pridobitev zadostne količine pomnoženih produktov PCR je bilo potrebno pomnožiti triplikate vsakega vzorca, katere smo pri čiščenju DNA združili. S pomočjo spektrofotometra NanoVue-Plus (GE Healthcare, VB) smo izmerili koncentracijo očiščenih pomnožkov PCR. Kot standard smo uporabili elucijski pufer iz kita za čiščenje pomnožkov PCR. Vsak vzorec smo merili 3x, nato pa izračunali povprečno koncentracijo DNA v vzorcu.

3.2.4.2.2 Restrikcija pomnožkov PCR

Testirali smo primernost treh restrikcijskih endonukleaz: HhaI (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), BsU RI (HaeIII) (Fermentas, Kanada) in MspI (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA). Največ fragmentov in najlepšo porazdelitev terminalnih restrikcijskih fragmentov smo dobili z BsU RI. 300 ng DNA za analizo bakterijske ter 400 ng DNA za analizo arhejske združbe smo uporabili v restrikcijski reakciji, kjer smo dodali 1,5 µl restrikcijskega encima BsU RI, 3 µl pripadajočega pufra R in Sigma vodo do končnega volumna 30 µl. Reakcijsko mešanico smo inkubirali 16 ur v vodni kopeli pri 37°C. Po končani inkubaciji smo restrikcijsko delovanje encima BsU RI prekinili z 20 minutno

inaktivacijo v vodni kopeli pri 85°C. Nato smo razrezane pomnožke PCR ponovno očistili s kitom za čiščenje pomnožkov PCR.

3.2.4.2.3 Analiza profilov T-RFLP

Pripravili smo svežo mešanico 0,5 µl internegra velikostnega standarda GeneScan™ - 500 ROX™ (Applied Biosystems, Velika Britanija) in 8 µl Hi-DiT™ formamida (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Produkte T-RFLP in 8,5 µl mešanice standarda smo odpipetirali na mikrotitrsko ploščo, denaturirali 5 minut pri 95°C in nato ohladili na ledu. Nato smo terminalne restrikcijske fragmente ločili s kapilarno gelsko elektroforezo na ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, ZDA). Profile T-RFLP smo analizirali s pomočjo računalniškega programa Bio Numerics (Applied Maths, Belgija). Količino produktov T-RFLP na mikrotitrsko ploščo smo optimizirali sproti glede na intenzitetu profilov. V povprečju je bilo za analizo bakterijske združbe najbolj optimalno dati na mikrotitrsko ploščo 3-4 µl produktov T-RFLP, medtem ko za arhejsko združbo 4-5 µl. Elektroferograme smo analizirali z računalniškim programom BioNumerics software 5.1 (Applied Maths, Belgija). Podobnost mikrobnih združb med vzorci smo ocenili s Pearsonovim koreacijskim koeficientom z metodo neponederirane aritmetične sredine UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Razlike med posameznimi gručami so bile narejene na podlagi mejnih parametrov v programu BioNumerics.

S pomočjo razrezanih pomnožkov PCR izolirane DNA čistih kultur dodanih hidrolitskih bakterij, smo identificirali profile T-RFLP čistih kultur. Ker so bili profili T-RFLP pomnožkov 16S rRNA čistih kultur sestavljeni iz več signalov, smo za sledenje prisotnosti dodanih bakterij v bioreaktorjih morali uporabiti drugo molekularno metodo (DGGE).

3.2.4.3 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (DGGE)

Spremembe bakterijske združbe v vzorcih iz bioreaktorskih mešanic z dneva 0 in 30 smo sledili tudi z metodo DGGE. Vsebino bioreaktorjev, v katere smo dodali *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans* individualno, pa smo vzorčili tudi na dan 3, 6 in 10 za sledenje njunega obstoja v kompleksni mikrobeni združbi v bioreaktorju.

3.2.4.3.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) za analizo DGGE

Za analizo bakterijske združbe smo v reakciji PCR uporabili naslednje oligonukleotidne začetnike: HDA1 z GC kleščami in HDA2 (Walter in sod., 2000). Izvedli smo program PCR (Preglednica 13), kjer se je cikel med 95°C 30 sekund in 72°C 30 sekund ponovil 30-krat.

Preglednica 13: Program PCR za pomnoževanje bakterijskih genov 16S rRNA za analizo DGGE.
Table 13: PCR programme for the amplification of bacterial 16S rRNA genes for DGGE analysis.

Bakterije	
Temperatura (° C)	Čas
95	2 minuti
95	30 sekund
58	30 sekund
72	30 sekund
72	7 minut
4	∞

3.2.4.3.2 Tehnika DGGE

Pomnožke PCR smo preverili z gelsko elektroforezo na 1 % agaroznem gelu in nato ločili na akrilamidnem gelu z denaturacijskim gradientom 30 % - 65 %, kjer je 100 % predstavljalo 7 M ureo (Merck, Nemčija) in 40 % formamida (vol/vol) (Fluka, Švica). Pri pripravi gela smo uporabljali mešanico akrilamida in bisakrilamida z razmerjem 37:1 (Sigma-Aldrich, ZDA). Metodo DGGE smo opravili z univerzalnim mutacijskim detekcijskim sistemom DCode (Bio-Rad, ZDA) v 1x TAE pufru (Preglednica 14) pri 60 °C, 16 ur in 30 min, 75 V, 70 mA in 5W. Gele smo obarvali s SYBR zlatim nukleinskim kislinskim barvilom za gele (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA) 45 minut. Nato smo jih slikali pod UV lučjo z Chemi Genius (Syngene, VB) in analizirali z računalniškim programom Gene Snap (Syngene, VB). Gele smo normalizirali na podlagi dveh zunanjih in ene sredinske lestvice, ki je bila narejena v našem laboratoriju iz produktov PCR desetih 16S rRNA genov čistih kultur, in analizirali z računalniškim programom Bio Numerics (Applied Maths, Belgija).

Preglednica 14: Sestava raztopin za DGGE.
Table 14: DGGE dilutions composition.

Raztopina	Sestava	Proizvajalec
pufer TAE	40 mM Tris	Merck, Nemčija
	20 mM CH ₃ COOH	Merck, Nemčija
	1 mM EDTA	Merck, Nemčija
nalagalni pufer	0,05 vol.% bromfenol modro	Serva, Nemčija
	0,05 vol. % ksilen cianol	Sigma-Aldrich, ZDA
	70 vol. % glicerol	Sigma-Aldrich, ZDA

3.2.4.4 Verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR)

Celotni genom *P. xylanivorans* Mz5^T še ni poznan, znano pa je delno zaporedje genov za enolazo (GU937437), ksilanazo (JX136954) in 16S rRNA (AJ428548). Zaporedja so dostopna v bazi PubMed (NCBI). Za sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T v izjemno pestri mikrobeni združbi bioreaktorja smo izdelali oligonukleotidne začetnike Eno_1f in Eno_1r, ki pomnožujejo odsek enolaznega gena (Preglednica 15). Za optimalno delovanje v metodi

qPCR smo pri oblikovanju le-teh upoštevali ustreznost naslednjih parametrov: dolžina nastalega produkta (50 – 400 bp), dolžina oligonukleotidnega začetnika (18-24 bp), talilna temperaturo (52-65 °C) in razliko med oligonukleotidnima začetnikoma največ 5°C, vsebnost GC (40-60 %), ponovitev C ali G na 3' koncu največ dvakrat, pojavljanje lasnih zank, lastnih in medsebojnih dimerov ter specifičnost (Kim in sod., 2013; Thornton in Basu, 2011).

Preglednica 15: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T z metodo qPCR.
Table 15: Oligonucleotide primers used for a qPCR quantification of *P. xylanivorans* Mz5^T.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje 5'→3'	Tarčno mesto	Dolžina produkta	Specifičnost
Eno_1f	TCT CGC AAC CTC CAT TGC TT	104-123	161 bp	<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T
Eno_1r	ACTCCTGAGTGTCAACAGCG	264-245		<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T

Za ugotavljanje prisotnosti *P. xylanivorans* Mz5^T v bioaugmentiranih bioreaktorjih skozi čas smo uporabili metodo qPCR s fluorescenčnim barvilm SYBR Green I. V reakcijski mešanici smo uporabili KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit (Kapa Biosystems, ZDA), normalizacijsko barvilo ROX Low, 0,3 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov in vodo do 15 µl. Pripravljeno mešanico smo nanesli na optično ploščo MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystem, ZDA), nato smo dodali po 5 µl redčitvene vrste standarda in vzorcev v treh paralelkah. Kot standard za umerjanje vzorcev smo uporabili DNA čiste kulture *P. xylanivorans* Mz5^T, izolirano po klasični metodi in z znano začetno koncentracijo DNA, v petih različnih redčitvah (100x – 1000000x oziroma 53,5 – 0,00535 ng genomske DNA). *P. xylanivorans* Mz5^T smo zaradi nepoznanega genomskega zaporedja bakterije kvantificirali glede na količino genomske DNA. Vzorce DNA mešane družbe bioaugmentiranega bioreaktorja, odvzete na dan 0, 3 in 6, smo redčili 10x, vzorce, odvzete na dan 10 pa smo analizirali neredčene. Poleg standarda in vzorcev smo vedno analizirali tudi negativno kontrolo v treh paralelkah, kjer smo namesto DNA dodali vodo. Odsek enolaznega gena *P. xylanivorans* Mz5^T smo pomnoževali s specifičnim optimiziranim programom (Preglednica 16) z napravo ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ZDA). Začetni denaturaciji je sledilo pomnoževanje tarč v 45 ciklih, nato pa je naprava v zadnjih treh korakih analizirala še talilno krivuljo pomnožkov.

Glede na standardno krivuljo je program ViiA™ 7 Software, Version 1.2.1 (Applied Biosystems, ZDA) izračunal njeno učinkovitost, R² in točko praga zaznave fluorescentnega signala (C_T) (Carey in sod., 2007), ki sta parametra ustreznosti krivulje, ter količino genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v vzorcih iz bioreaktorjev. Z določitvijo dejanske količine DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v vzorcih, kjer smo upoštevali tudi redčitev vzorca in količino uporabljeni DNA vzorca v reakcijski mešanici za PCR, smo lahko relativno

ocenili, kako hitro po bioaugmentaciji *P. xylanivorans* Mz5^T izginja iz šaržnega bioreaktorskega sistema.

Preglednica 16: Program qPCR za pomnoževanje odseka enolaznega gena *P. xylanivorans* Mz5^T.
Table 16: qPCR programme for the amplification of the part of a *P. xylanivorans* Mz5^T enolase gene.

<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T	
Temperatura (° C)	Čas
95	5 minut
95	40 sekund
60	30 sekund
72	30 sekund
72	1 minuta
95	15 sekund
60	1 minuta
95	15 sekund

3.2.5 Statistična analiza rezultatov proizvodnje metana

Za analizo statistično značilnih razlik v proizvodnji metana na g KPK_{substrata} med bioreaktorskimi mešanicami z dodanim neinokuliranim gojiščem in tropinami ter med mešanicami z različnimi dodanimi kombinacijami hidrolitskih bakterij smo uporabili metodologijo nelinearnih mešanih modelov. Uporabili smo postopek NLMIXED z optimizacijsko metodo Newton-Raphson v statističnem programu SAS/STAT (SAS Inst. Inc., 2008). Pri proizvodnji metana ni bilo izražene lag faze, zato je kumulativno proizvodnjo metana na g KPK_{substrata} v času testa BMP najbolje opisala negativna eksponentna krivulja. Uporabili smo statistični model kot kaže enačba 4, kjer je y_{ijk} opazovanje v času t_{ijk} , K_i in r_i sta parametra krivulje – končna proizvodnja in hitrost proizvodnje, $e^{()}$ je eksponentna funkcija, u_{ij} je efekt naključnega vzorca, ki pokriva posamezne variacije med vsemi paralelkami vzorcev, in ε_{ijk} je ostanek.

$$y_{ijk} = K_i * (1 - e^{-r_i * t_{ijk}}) + u_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \dots (4)$$

Predpostavili smo, da sta efekt naključnega vzorca in ostanki normalno porazdeljeni. S tem modelom smo statistično obdelali rezultate vpliva najučinkovitejših bioaugmentacij s *P. xylanivorans* Mz5^T individualno, *C. cellulovorans* individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85.

Vpliv dodajanja encimskih mešanic MethaPlus L120, MethaPlus 100 in Axiase 100 na proizvodnjo metana na g KPK_{substrata} iz pivovarskih tropin pa smo analizirali z uporabo linearne regresije in mešanim modelom REML z metodo Satterthwaite v statističnem programu SAS/STAT (SAS Inst. Inc., 2008).

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI MIKROBNE BIOMASE IN SUBSTRATA

Rezultati analiz SS in OS pivovarskih tropin ter KPK so pokazali, da mikrobnia biomasa vsebuje 56 gss/L, 47 gos/L in 59 gKPK/L, pivovarske tropine pa 140 gss/L, 137 gos/L in 131 59 gKPK/L. Tropine vsebujejo veliko OS, ki je potencialno uporabna za proizvodnjo bioplina, če se izboljša stopnja razgradnje kompleksno zgrajene lignoceluloze.

4.2 ENCIMSKE AKTIVNOSTI IZBRANIH HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO

P. xylanivorans Mz5^T in *F. succinogenes* S85 izražata največjo ksilanolitično aktivnost med testiranimi bakterijami (71,8 in 77,6 nmol/mg/min) (Preglednica 17). *C. cellulovorans* izraža največjo endoglukanazno aktivnost (1,7 nmol/mg/min) ter nizko ksilanolitično in endoglukulanazno aktivnost. Uspešnejši je bil pri razgradnji kristalinične Avicel celuloze (21,6 nmol/mg/min), kar predstavlja eksoglukanazno aktivnost. Koncentracije proteinov so bile podobne pri vseh testiranih bakterijah, zaradi česar lahko sklepamo, da smo v teste BMP dajali podobne količine bakterijskih celic.

Preglednica 17: Encimske aktivnosti izbranih hidrolitskih bakterij za bioaugmentacije.

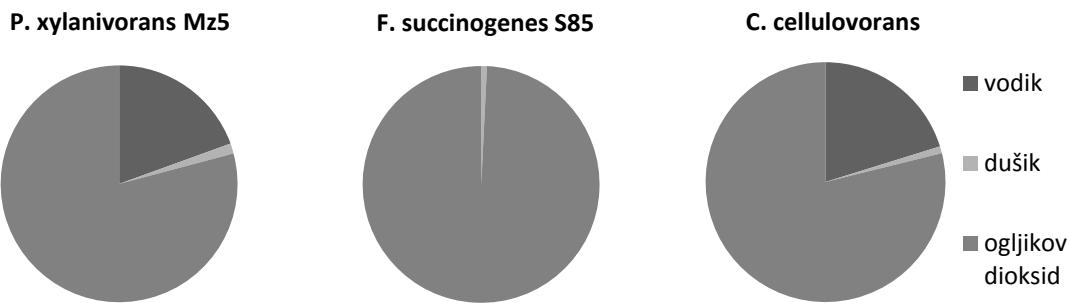
Table 17: Enzyme activity of hydrolytic bacteria, used for bioaugmentation.

	Encimska aktivnost (nm/mg/min)			Koncentracija proteinov (mg/ml)
	Ksilanolitična	Endoglukanazna (CMC)	Eksoglukanazna (Avicel)	
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T	71,8	1,6	np*	6,2
<i>F. succinogenes</i> S85	77,6	0,9	np*	6,4
<i>C. cellulovorans</i>	1,0	1,7	21,6	6,6

*np – ni podatka

4.3 SESTAVA PLINSKIH PRODUKTOV ČISTIH KULTUR HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO

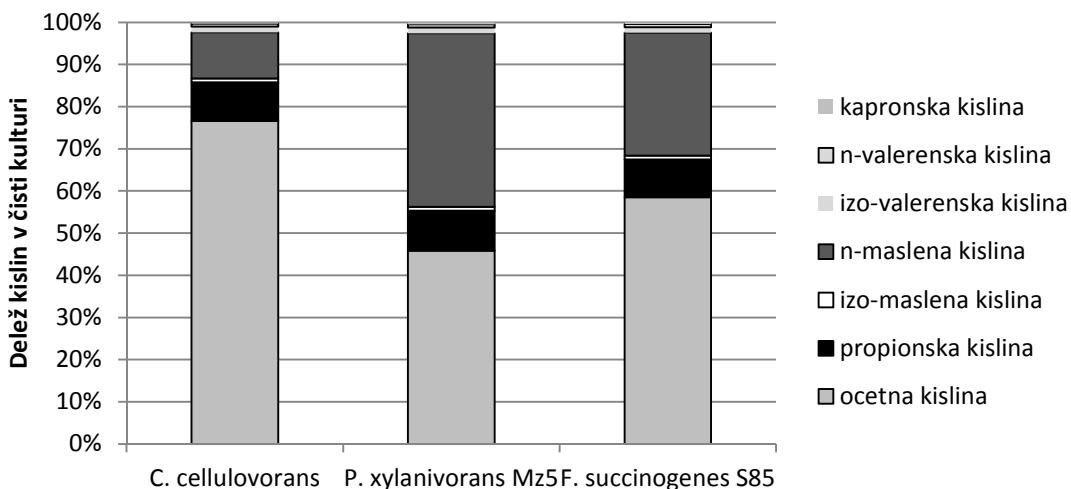
Meritve plinov, ki jih producirajo čiste kulture izbranih bakterij za bioaugmentacijo v inducibilnem gojišču M2 ($OD_{654\text{nm}} = 0,5$), so pokazale na pomembne razlike med njimi (Slika 8). *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans*, za razliko od *F. succinogenes* S85, poleg ogljikovega dioksida proizvajata tudi vodik (približno 20 %).



Slika 8: Sestava plinov, ki jih producirajo čiste kulture bakterij, uporabljenih za bioaugmentacijo.
 Figure 8: The composition of gas produced by pure cultures of bacteria, used for bioaugmentation.

4.4 PROIZVODNJA KMK V ČISTIH KULTURAHD HIDROLITSKIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO

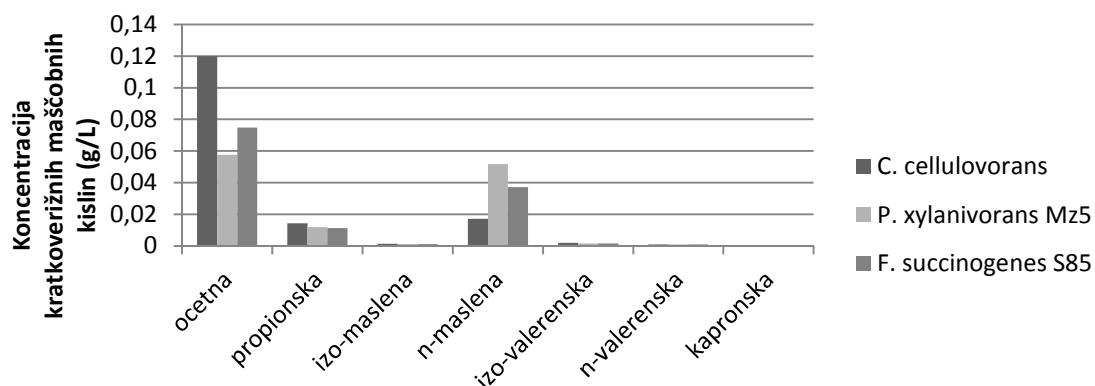
Količino vnešenih KMK v bioreaktorje z bioaugmentacijo smo določili z analizo koncentracij KMK v čistih kulturah izbranih bakterij pri $OD_{654\text{nm}} = 0,5$ v inducibilnem gojišču M2 (Slika 9). Pri vseh treh kulturah je prevladovala acetna kislina, sledi ji n-maslena kislina, katere deleži so najbolj očitno variirali med kulturami. Delež propionske kisline je bil pri vseh treh kulturah približno enak. Ostale KMK so se pojavljale v minimalnih koncentracijah.



Slika 9: Deleži kratkoverižnih maščobnih kislin v čistih kulturah bakterij, uporabljenih za bioaugmentacijo.
 Figure 9: The composition of the short chain fatty acids produced by pure cultures of bacteria, used for bioaugmentation.

Glede na volumen kultur, ki smo ga dodali v posamezne bioaugmentirane bioreaktorje (5 %), smo izračunali koncentracijo KMK, prisotnih v bioplinskih bioreaktorjih na dan 0, ki izvirajo le iz čistih kultur. Rezultati so pokazali, da se vnešene KMK v bioreaktorjih močno razredčijo in zato nekatere več niso zaznavne s plinskim kromatografom (koncentracije manjše od 0,005 g/L). Z dodatkom čistih kultur *C. cellulovorans*, *P. xylanivorans* Mz5^T ali *F. succinogenes* S85 v bioreaktor dodamo 0,06-0,12 g/L acetne

kisline, 0,02-0,05 g/L n-maslene kisline in okrog 0,01 g/L propionske kisline (Slika 10), kar so vse zelo nizke koncentracije KMK.



Slika 10: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorjih na dan 0, ki izvirajo zgolj iz bioaugmentacije s čistimi kulturami izbranih bakterij.

Figure 10: Short chain fatty acids concentrations in bioreactors on day 0, originating solely from the pure cultures of the bacteria used for bioaugmentation.

Z merjenjem koncentracije proizvedenih KMK v čistih kulturah bakterij za bioaugmentacijo (Slika 9) smo ugotovili, da so KMK, detektirane v bioreaktorjih na dan 0 pravzaprav KMK, ki smo jo vnesli v bioreaktor skupaj z inducibilnim gojiščem ob dodatku bakterij. Meritve proizvodnje KMK čiste kulture *P. xylanivorans* Mz5^T so prav tako ujemajo z meritvami koncentracije n-maslene kisline v bioreaktorju z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T (pod 0,06 g/L), saj le-ta proizvaja največ n-maslene kisline med izbranimi bakterijami za bioaugmentacijo. Pri drugih bioaugmentacijah je bila koncentracija n-maslene kisline še nižja ali pa je nismo detektirali.

4.5 VREDNOSTI KPK V UPORABLJENIH TESTNIH MEŠANICAH

Analizirali smo KPK obeh inducibilnih gojišč M2 ter v njih nagojenih kultur hidrolitskih bakterij za bioaugmentacijo ($OD_{654\text{nm}} = 0,5$) (Preglednica 18). Vrednosti smo upoštevali kot doprinos k razpoložljivi OS v bioreaktorjih, poleg pivovarskih tropin, kot KPK_{substrata}. Zaradi različnih vrednosti KPK v posameznih bioreaktorjih smo končne rezultate proizvodnje bioplina in metana za ustreznejšo primerjavo preračunali na 1 g KPK_{substrata}.

Analizirali smo tudi KPK priporočene doze posameznih uporabljenih encimskih mešanic in ugotovili, da vsebuje MethaPlus L120 291,15 gKPK/L, MethaPlus 100 526,92 gKPK/L in Axias 100 451,92 gKPK/L. Na podlagi tega smo izračunali vrednost KPK v posameznih testnih bioreaktorjih glede na število in količine doziranj. Vrednosti smo upoštevali kot doprinos k razpoložljivi OS v bioreaktorjih, poleg pivovarskih tropin, kot KPK_{substrata}. Zaradi različnih vrednosti KPK v posameznih bioreaktorjih smo končne rezultate proizvodnje bioplina in metana za ustreznejšo primerjavo preračunali na 1 g KPK_{substrata}.

Preglednica 18: Vrednosti KPK obeh inducibilnih gojišč M2 in v njih nagojenih bakterijskih kultur za bioaugmentacijo.

Table 18: The COD of inducible M2 mediums with bacteria for bioaugmentation.

Gojišča z bakterijami ali neinokulirana	KPK (g/L)
gojišče M2	21,700
inducibilno gojišče 1	27,162
inducibilno gojišče 2	26,702
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T v gojišču M2	17,250
<i>C. cellulovorans</i> v gojišču M2	16,880
<i>C. cellulovorans</i> + <i>F. succinogenes</i> S85 v gojišču M2	17,080
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T v inducibilnem gojišču 1	28,264
<i>F. succinogenes</i> S85 v inducibilnem gojišču 1	30,943
<i>C. cellulovorans</i> v inducibilnem gojišču 2	30,524
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T + <i>F. succinogenes</i> S85 v inducibilnem gojišču 1	30,265
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T + <i>C. cellulovorans</i> v inducibilnem gojišču 1 in 2	35,489
<i>F. succinogenes</i> S85 + <i>C. cellulovorans</i> v inducibilnem gojišču 1 in 2	35,256

Na podlagi slabe ponovljivosti rezultatov analiz KPK vzorcev iz bioreaktorjev smo ugotovili, da uporabljena metoda, ki je sicer priporočljiva za določevanje KPK vodnih vzorcev, ne omogoča natančne določitve vrednosti KPK v vzorcu iz bioplinskega bioreaktorja. Predvidevamo, da zaradi delcev v vzorcu (zmlete tropine in granule mikrobne biomase) ne pride do popoldne oksidacije vzorca s kalijevim dikromatom, kljub prisotnosti žveplove kisline in visokih temperatur. Zaradi delcev v bioreaktorju pa obstaja možnost nehomogenega odvzema vzorca.

4.6 TESTI BMP Z BIOAUGMENTACIJO S HIDROLITSKIMI BAKTERIJAMI

4.6.1 Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami (1. biološka ponovitev)

Z dvema testoma BMP smo testirali, kako predhodno encimsko inducirani *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85 in *C. cellulovorans* ter njihove kokulture vplivajo na proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin.

4.6.1.1 Proizvodnja bioplina in metana

V bioreaktorjih s samimi tropinami je bilo v 30 dneh proizvedenega najmanj bioplina na g KPK_{substrata} (250-420 ml), največ pa v bioreaktorjih z dodanim *C. cellulovorans* (380-480 ml), v bioreaktorjih z dodano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (380-450 ml) in v bioreaktorjih z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T (350-500 ml) (Prilogi A1, A2). Dodatek *C. cellulovorans* je v primerjavi s kontrolnim bioreaktorjem povečal proizvodnjo bioplina na g KPK_{substrata} za 4-14 %, dodatek kokulture *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 za 3-15 %, dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T pa za 14-16 %. Največje izplene metana smo zabeležili v bioreaktorjih z dodanim *C. cellulovorans* in v bioreaktorjih z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T, najslabši izplen pa v bioreaktorju s samimi tropinami (Preglednica 19).

Deleži metana v proizvedenem bioplisu v bioaugmentiranih bioreaktorjih v povprečju niso bili večji od tistih v kontrolnih bioreaktorjih (okrog 60 %).

Preglednica 19: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih na 30. dan testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85 in *C. cellulovorans* pri dveh ponovitvah (I in II).

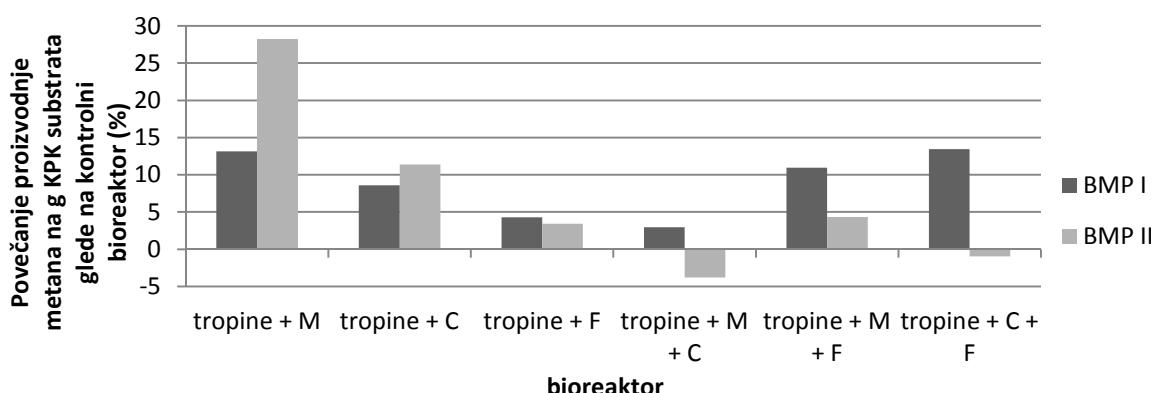
Table 19: Methane content and methane yield in bioreactors on day 30 of the BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85 and *C. cellulovorans* in two replicates (I and II).

Bioreaktor	Povprečni delež metana v bioplisu* (%)		Izplen metana** (%)		Hitrost proizvodnje metana 1.-4. dan (ml/dan)	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.
Test BMP						
standard	54,5	57,1	89,6	112,2	47,6	78,9
tropine	59,7	52,9	38,6	56,8	0,8	17,6
gojišče 1	61,6	61,6	64,9	71,6	35,5	50,2
gojišče 2	62,4	59,0	62,0	73,9	35,0	46,9
tropine + gojišče 1	60,6	58,8	55,9	72,6	29,6	40,0
tropine + gojišče 2	63,7	58,9	64,1	80,4	30,6	44,6
tropine + <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T	61,1	61,7	63,2	93,1	29,3	50,5
tropine + <i>F. succinogenes</i> . S85	62,1	59,7	58,3	75,1	27,1	42,2
tropine + <i>C. cellulovorans</i>	62,1	61,1	69,6	89,6	33,6	48,3
tropine + <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T + <i>C. cellulovorans</i>	63,2	58,5	61,7	73,6	31,1	37,3
tropine + <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T + <i>F. succinogenes</i> S85	62,3	60,4	62,0	75,7	29,1	36,3
tropine + <i>C. cellulovorans</i> + <i>F. succinogenes</i> S85	61,5	58,5	68,0	75,6	37,2	38,7

* 30. dan testa BMP

** glede na dejansko proizvodnje metana na 1 g KPK_{substrata} v bioreaktorjih 30. dan in teoretično maksimalno možno proizvodnjo metana

Proizvodnja metana prve 4 dni testa je bila v bioreaktorjih s samimi tropinami v primerjavi z bioaugmentiranimi bioreaktorji izjemno nizka in se je šele v kasnejših dneh povečala (Prilogi A3, A4), medtem ko je bila hitrost največja v bioreaktorjih z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T in z dodanim *C. cellulovorans*. V bioreaktorjih s samimi tropinami je nastalo najmanj metana (150-200 ml). Pri bioaugmentaciji s *C. cellulovorans* in s *P. xylanivorans* Mz5^T smo izmerili največ proizvedenega metana, saj je nastalo 8-11 % ter 13-28 % več metana na g KPK_{substrata} kot v kontrolnih bioreaktorjih s tropinami in ustreznim neinkuliranim gojiščem (Slika 11). Dodatek kokulture *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 je povečal proizvodnjo metana na g KPK_{substrata} za 4-11 %, medtem ko so imele ostale bioaugmentacije manjši vpliv na proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin.



Slika 11: Vpliv bioaugmentacije (združeni rezultati) s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* ali z njihovimi kokulturami na povečanje proizvodnje metana na g KPK_{substrata} glede na kontrolni bioreaktor, ki je vseboval tropine in neinokulirano gojišče. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, I, II – ponovitvi testa BMP.

Figure 11: The impact of the bioaugmentation (combined results) with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* or their cocultures on the enhancement of methane production per g COD_{substrate} in comparison to a control bioreactor with brewery spent grain and non-inoculated medium. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, I, II – replicates of BMP assay.

4.6.1.2 Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislín

Vrednosti pH so bile v optimalnem območju. Ob začetku testa BMP so se vrednosti pH v bioreaktorjih gibale med 6,70 in 7,33, na dan 30 pa med 6,90 in 7,40 (Priloga A5).

Med detektiranimi KMK se je v največjih koncentracijah pojavljala ocetna kislina, katere je bilo največ prisotne v prvih dveh dneh poskusa (Priloga A6). Na dan 4, 14 in 30 je bilo ocetne kisline največ zaslediti le še v bioreaktorjih, bioaugmentiranimi s *P. xylanivorans* Mz5^T individualno (do 0,06 g/L, 0,05 g/L in 0,03 g/L), v preostalih bioreaktorjih pa je bila njena koncentracija pod 0,02 g/L. Propionska kislina se je med testom BMP pojavljala v nizkih v koncentracijah (pod 0,05 g/L), ostale kisline pa so se v bioreaktorjih pojavljale v minimalnih koncentracijah (pod 0,015 g/L).

4.6.1.3 Redukcija KPK

Rezultati redukcije KPK so med obema ponovitvama testa BMP slabo ponovljivi. Med bioaugmentiranimi bioreaktorji smo največjo redukcijo KPK namerili v bioreaktorjih, bioaugmentiranimi s *C. cellulovorans* (2,1 gKPK/L) (Priloga A7). Pri drugi ponovitvi testa BMP pa se je največ KPK porabilo v bioreaktorjih z dodano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans* (2,9 gKPK/L) in kokulturo *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 (2,8 gKPK/L) ter z dodanim *C. cellulovorans* individualno (2,8 gKPK/L).

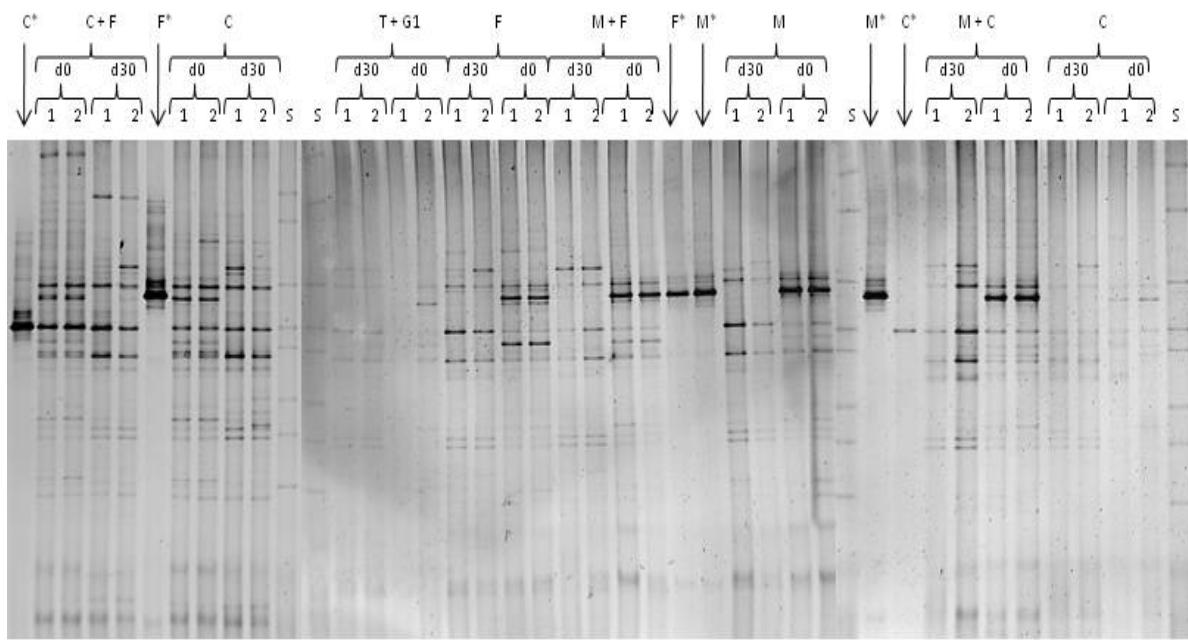
4.6.1.4 Rezultati analiz sestave mikrobné združbe

Analiza bakterijske združbe s T-RFLP je pokazala, da se v splošnem vzorci testnega dneva 0 razlikujejo od vzorcev dneva 30 za približno 27-35 % (Prilogi A8, A10). Bakterijska združba v kontrolnih bioreaktorjih in večini bioaugmentiranih bioreaktorjev se je

spremenila za 20 – 40 %. Najbolj pa se je bakterijska združba spremenila pri bioaugmentaciji s kokulturo *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 (34 in 51 %).

Bakterijsko združbo smo analizirali tudi z DGGE. Analizirali smo združbo v vseh testiranih bioreaktorjih na dan 0 in 30. K analizi smo dodali še vzorce pomnožkov PCR čistih kultur dodanih bakterij. Rezultati so pokazali lokacijo lis čistih kultur *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (Slika 12). Ugotovili smo, da sta si lisi od *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 zelo blizu in je težko ločiti med njima. Iz profilov DGGE je razvidno, da sta *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85, dodana tako individualno kot v kokulturi, prisotna v bioreaktorju na dan 0, ko smo ju dodali v bioreaktor, na dan 30 pa ju ni več zaslediti. Natančna določitev prisotnosti *C. cellulovorans* pa je bila zaradi sorodnih klostridijev v bioplinski mikrobi biomasi otežena, saj se je rahla specifična lisa pojavljala prav v vseh vzorcih.

Z analizo arhejske združbe s T-RFLP smo ugotovili, da se vzorci porazdelijo v dve gruči, glede na odvzem (dan 0 in dan 30), pri čemer se v splošnem sprememijo za približno 10-20 % (Prilogi A9, A11). Izjema so bili nekateri bioaugmentirani bioreaktorji. Dodatek *C. cellulovorans* je najmočneje vplival na zgradbo arhejske združbe (36-48 % spremembe). Zabeležili pa smo tudi manjše spremembe pri dodatku *P. xylanivorans* Mz5^T (20-30 %) in dodatku kokulture *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans* (okrog 22 %).



Slika 12: Profili DGGE vzorcev iz bioreaktorjev in pomnožkov DNA čistih kultur dodanih bakterij. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, * - čista kultura, T – tropine, G – gojišče, d – dan, S – standard.

Figure 12: DGGE profiles of bioreactor samples and amplified pure culture bacterial DNA. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, * - pure culture, T – brewery spent grain, G – medium, d – day, S – ladder.

4.6.2 Bioaugmentacija s *C. cellulovorans*, individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter s *P. xylanivorans* Mz5^T (2. biološka ponovitev)

Izvedli smo ponovitveni test BMP z bioaugmentacijami, ki so v prejšnjih testih pokazale največje povečanje proizvodnje metana, pri čemer smo posamezne bioreaktorje testirali v 4 ponovitvah. Testirali smo, kako dodatek predhodno encimsko inducirane *C. cellulovorans*, individualno ali v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter *P. xylanivorans* Mz5^T individualno vpliva na proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin.

4.6.2.1 Proizvodnja bioplina in metana

Največ bioplina na g KPK_{substrata} je nastalo v bioreaktorjih z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T (18 % več kot v kontroli) (Priloga B1). Tudi bioaugmentacija s *C. cellulovorans* je povečala proizvodnjo bioplina, saj je bilo v tistih bioreaktorjih 7,7 % več, v bioreaktorjih z dodano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 pa 6 % več bioplina na g KPK_{substrata}. Bioaugmentacija z mrtvimi kulturami bakterij ni povečala bioplinske proizvodnje iz tropin. Največje delež metana smo zabeležili v bioaugmentiranih bioreaktorjih (do 65,4 %) (Preglednica 20). Izplen metana je bil okrog 100 % v standardnih bioreaktorjih, kar pomeni, da je test BMP potekal optimalno. Tudi v bioaugmentiranih bioreaktorjih je bil izplen metana okrog 100 %. Bioaugmentacija z mrtvimi kulturami bakterij ni doprinesla k višjemu izplenu metana.

Preglednica 20: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih na 30. dan testa BMP z bioaugmentacijo s *C. cellulovorans*, individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter s *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - mrtva kultura.

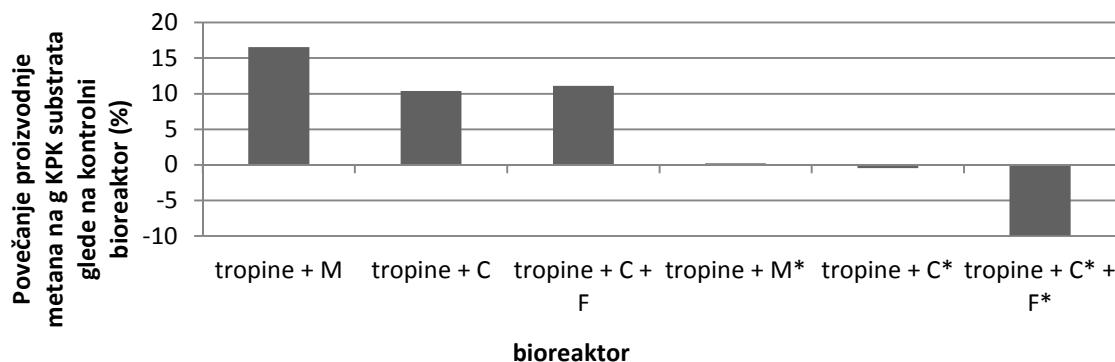
Table 20: Methane content and methane yield in bioreactors on day 30 of the BMP assay with bioaugmentation with *C. cellulovorans*, individually or in coculture with *F. succinogenes* S85, and with *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - dead culture.

Bioreaktor	Povprečni delež metana v bioplizu* (%)	Izplen metana** (%)	Hitrost proizvodnje metana 1.-4. dan (ml/dan)
standard	62,2	133,6	73,3
tropine + gojišče 1	63,5	87,5	50,8
tropine + gojišče 2	63,5	96,1	55,5
tropine + <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T	64,6	102,0	56,7
tropine + <i>C. cellulovorans</i>	65,1	106,1	53,7
tropine + <i>C. cellulovorans</i> + <i>F. succinogenes</i> S85	65,4	102,0	54,1
tropine + <i>P. xylanivorans</i> Mz5 ^T *	64,4	87,7	51,2
tropine + <i>C. cellulovorans</i> *	63,9	95,7	53,4
tropine + <i>C. cellulovorans</i> * + <i>F. succinogenes</i> S85*	65,2	82,7	45,2

* 30. dan testa BMP

** glede na dejansko proizvodnjo metana na 1 g KPK_{substrata} v bioreaktorjih 30. dan in teoretično maksimalno možno proizvodnjo metana

Proizvodnja metana na g KPK_{substrata} je bila najbolj povečana pri bioaugmentaciji s *P. xylanivorans* Mz5^T (16,6 % več kot v kontrolnih bioreaktorjih) (Slika 13). Pri bioaugmentaciji s *C. cellulovorans* smo zabeležili 10,4 % več metana, pri bioaugmentaciji s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 pa 11,1 % več metana kot v kontrolnih bioreaktorjih. Bioaugmentacija z mrtvimi kulturami ni doprinesla k povečanju proizvodnje metana (Priloga B1). Tudi glede na hitrost proizvodnje metana v prvih štirih dneh testa BMP so se najbolje izkazali bioaugmentirani bioreaktorji, kjer je bilo proizvedenega 53,7 – 56,7 ml metana na dan (Preglednica 20).

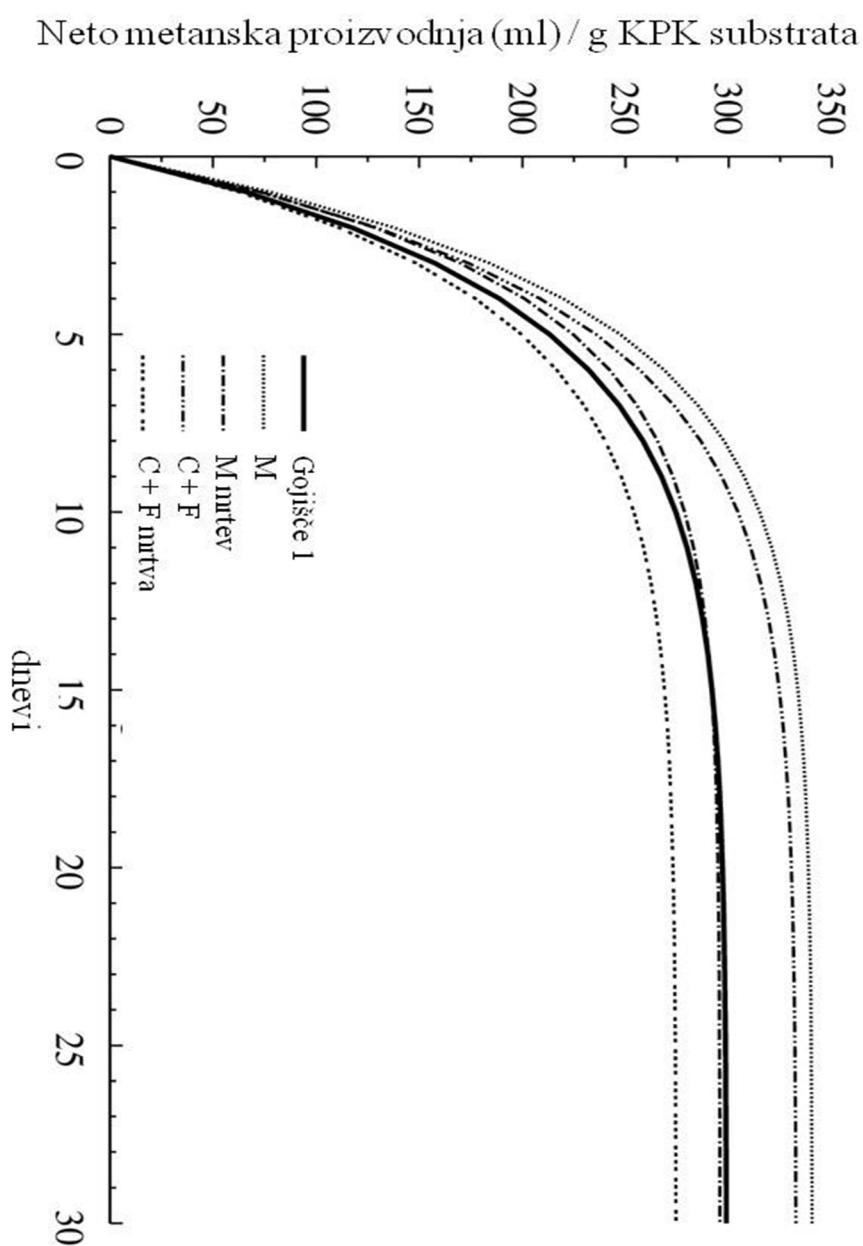


Slika 13: Vpliv bioaugmentacije s *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* ter kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 na povečanje proizvodnje metana na g KPK_{substrata} glede na kontrolni bioreaktor, ki je vseboval tropine in neinokulirano gojišče. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - mrtva kultura.

Figure 13: The impact of the bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* and coculture of *C. cellulovorans* and *F. succinogenes* S85 on the enhancement of methane production per g COD_{substrate} in comparison to a control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated medium. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - dead culture.

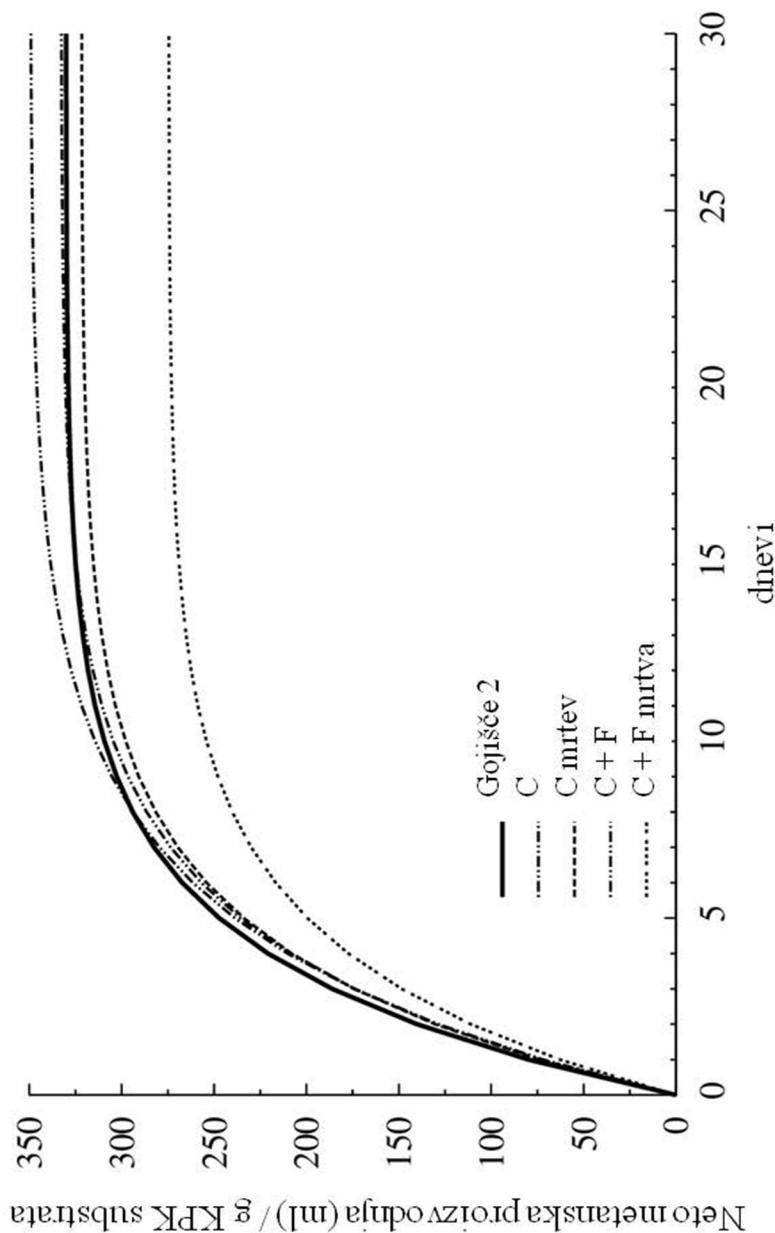
4.6.2.2 Statistična analiza rezultatov

Rezultate proizvodnje metana na g KPK_{substrata} smo statistično analizirali. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med kontrolnimi bioreaktorji in bioreaktorji z dodanimi bakterijami so se pokazale pri vseh bioaugmentacijah z živimi bakterijami (Priloga B2). V primerjavi s kontrolnimi bioreaktorji je bila proizvodnja metana najbolj povečana v bioreaktorjih, bioaugmentiranih s *P. xylanivorans* Mz5^T, kjer je nastalo 41,5 ml več metana, medtem ko je pri bioaugmentaciji s *C. cellulovorans* nastalo do 19 ml več in pri bioaugmentaciji s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 do 18 ml več metana. Tudi v primerjavi med bioreaktorji z dodanimi živimi in mrtvimi bakterijami se kažejo razlike (Sliki 14 in 15).



Slika 14: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK_{substrata} v bioreaktorjih z dodanim živim in mrtvim *P. xylanivorans* Mz5^T ter živo in mrtvo samimi tropinami in nemokultiviranim inducibilnim M2 z brezovim ksilanom in CMC celulozo.

Figure 14: Statistically analysed results of net methane production per g COD_{substrate} in bioreactors with added live or dead *P. xylanivorans* Mz5^T and live or dead coculture of *C. cellulovorans* and *F. succinogenes* S85. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 1 – control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with xylan from birchwood and CMC cellulose.



Slika 15: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK substrata v bioreaktorjih z dodanim živim in mrtvim kulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85. C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 2 – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami in neimokuliranim inducibilnim gojiščem M2 z brezovim ksilanom, celobiozo in Avicel celulozo.

Figure 15: Statistically analysed results of net methane production per g COD_{substrate} in bioreactors with added live or dead *C. cellulovorans* and live or dead coculture of *C. cellulovorans* and *F. succinogenes* S85. C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 2 – control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with birchwood, cellobiose and Avicel cellulose.

V hitrosti nastajanja metana na g KPK_{substrata} pa so se statistično značilne razlike pokazale le med bioreaktorji z dodanim mrtvim *P. xylanivorans* Mz5^T (+0,04 ml/dan) in kontrolnim bioreaktorjem ter med bioreaktorji z dodanim *C. cellulovorans* (-0,05 ml/dan) in kontrolnimi bioreaktorji (Priloga B3).

4.6.2.3 Vrednost pH

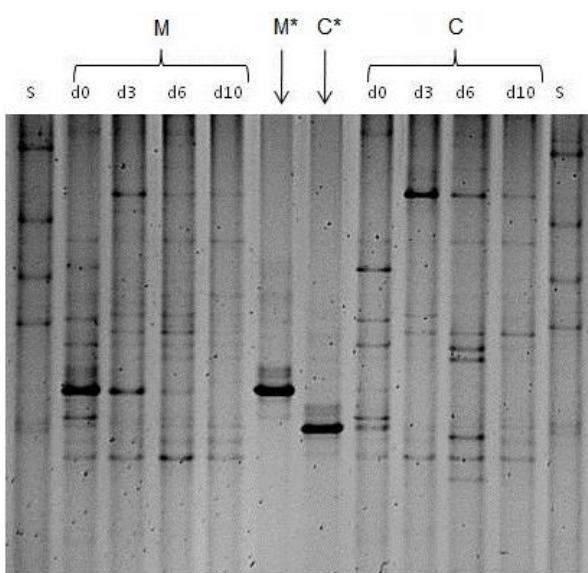
Meritve pH ob začetku in koncu testa BMP so pokazale na ustrezeno delajoč bioplinski proces, saj so bile vrednosti na dan 0 med 6,96 in 7,13 ter med 6,91 in 7,11 na dan 30 (Priloga B4).

4.6.2.4 Redukcija KPK

Redukcija KPK v bioreaktorjih 2. biološkega poskusa ni ponovljiva z redukcijo KPK v 1. biološki ponovitvi. Le v bioreaktorjih, bioaugmentiranimi s *C. cellulovorans*, individualno ali v kokulturi s *F. succinogenes* S85, smo izmerili več reduciranega KPK (0,90-0,98 g/L) v primerjavi s kontrolnim bioreaktorjem (0,75 g/L) (Priloga B5).

4.6.2.5 Sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans* v mešani anaerobni mikrobnii združbi z DGGE

Vzorce, odvzete na dneve 0, 3, 6 in 10 testa BMP smo analizirali z DGGE. Prisotnost *P. xylanivorans* Mz5^T in *C. cellulovorans* smo opredelili s pomočjo pomnožkov DNA čiste kulture dodanih bakterij. Rezultati so potrdili prisotnost dodanega *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju vse do dneva 6 (Slika 16).



Slika 16: Rezultati DGGE analize mikrobske združbe iz bioreaktorja ob različnih časih testa BMP in identifikacija *P. xylanivorans* Mz5^T ter *C. cellulovorans* na podlagi pomnožkov DNA čiste kulture. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, d – dan, S – standard.

Figure 16: DGGE results of the analysis of microbial community structure in bioreactors at different times of BMP assay and identification of *P. xylanivorans* Mz5^T and *C. cellulovorans* based on amplified pure culture bacterial DNA. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, d – day, S – ladder.

Glede na upadanje intenzitete lise, značilne za *P. xylanivorans* Mz5^T, s časom odvzema vzorcev, sklepamo, da se število bakterij *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju s časom zmanjšuje in izgine po enem tednu. Lisa od *C. cellulovorans* pa je bila najintenzivnejša le na dan 0, v preostalih vzorcih pa se je pojavljala le še šibk lisa, najverjetneje zaradi prisotnosti sorodnih klostridijev.

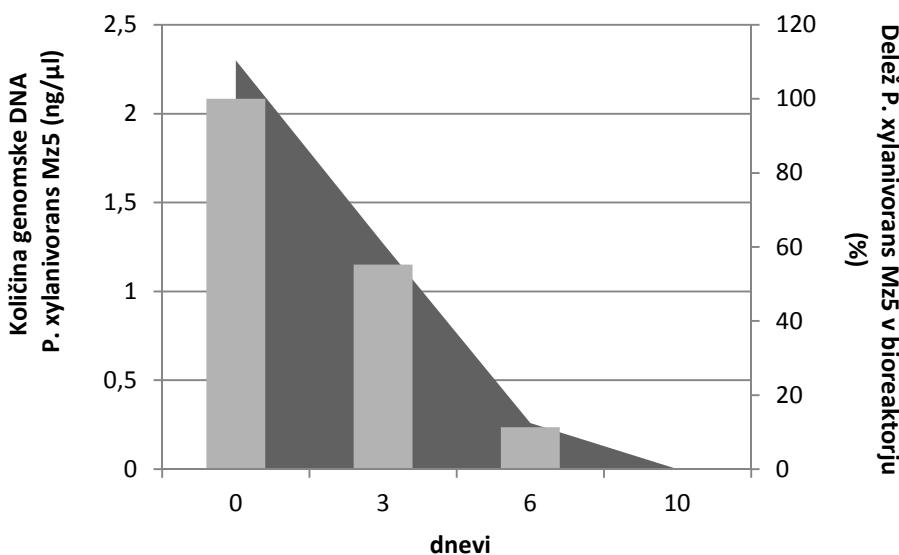
4.6.2.6 Kvantitativno sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T v mešani anaerobni mikrobnii združbi z metodo qPCR

Za natančnejšo analizo prisotnosti dodanih bakterij, ki so se izkazale za učinkovite pri povečanju proizvodnje metana v bioreaktorju, smo uporabili metodo qPCR. Za sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T smo oblikovali več parov začetnih oligonukleotidov. Nekaj parov je dalo ustrezne fluorescenčne signale in za nadaljnje analize smo izbrali par, ki je dal najmočnejše signale. Uporabili smo Eno_1f in Eno_1r ter sistem SYBR Green. Uspeli smo dobiti specifične signale pri redčitveni vrsti standarda (DNA čiste kulture) in vseh analiziranih vzorcih. Standardna krivulja, prikazana v Prilogi B6, je imela R² 0,999 in 100 % učinkovitost. Signali 10-kratnih redčitev standarda so bili ustrezno porazdeljeni.

Signali vzorcev mikrobne združbe iz bioreaktorjev, odvzeti na dan 0, 3 in 6, so prestopili prag detekcije (C_T) med 15. in 19. ciklom, medtem ko signal vzorcev 10. dne, kjer smo analizirali neredčeno DNA, prestopi prag šele pri 25. ciklu, saj vsebujejo zelo majhne količine tarče (Priloga B7). Signali negativne kontrole se pojavijo šele od 44. cikla naprej.

Talilne krivulje pomnožkov qPCR so pokazale na specifičnost produktov in na razlikovanje med ustreznimi produkti in negativno kontrolo (Priloga B8). Višji vrhovi krivulj predstavljajo razpad pomnožkov gena enolaze *P. xylanivorans* Mz5^T v vzorcih iz bioreaktorjev, nižji vrhovi pa so odraz razpada nespecifičnih pomnožkov negativnih kontrol.

Na podlagi izpisa iz programa qPCR (Priloga B9) smo izračunali količino genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v vzorcih iz bioreaktorjev. Na dan 0 je bilo v bioreaktorju 2,30 ng/µl, na dan 3 1,27 ng/µl in dan 6 0,26 ng/µl genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T (Slika 17). 10. dan testa BMP *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju praktično ni bil več prisoten. V prvih treh dneh torej količina vnešenega *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju upade skoraj za polovico; do 6. dneva pa je v bioreaktorju le še desetina vnešene kulture.



Slika 17: Prikaz upadanja količine genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju po dodatku v bioreaktor v času testa BMP. Z rdečo je prikazana količina genomske DNA v bioreaktorju, z modro pa delež v bioreaktorju glede dodano količino *P. xylanivorans* Mz5^T ob dodatu v bioreaktor na dan 0.

Figure 17: Reduction of *P. xylanivorans* Mz5^T genomic DNA in the bioreactor after the bioaugmentation during BMP assay. Red columns represent the genomic DNA quantity in the bioreactor and a blue background represents its proportion in the bioreactor based on the quantity of *P. xylanivorans* Mz5^T added into the bioreactor on day 0.

4.6.3 Pilotni test BMP z bioaugmentacijo s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85

Testirali smo, ali dodatek predhodno encimsko inducirane kokulture *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 poveča proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin tudi v pilotnem bioreaktorju.

4.6.3.1 Proizvodnja bioplina in metana

Proizvodnja bioplina v pilotnem bioreaktorju, bioaugmentiranem s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, se je močno povečala od 7. dne poskusa naprej (Preglednica 21). Tako je ob koncu poskusa nastalo 13 % več bioplina na g KPK_{substrata} v bioreaktorju z dodano kokulturo v primerjavi s kontrolnim bioreaktorjem (Priloga C1). Rezultati jasno kažejo, da se po prvem tednu proizvodnja bioplina poveča zaradi bioaugmentacije.

Preglednica 21: Proizvodnja bioplina v pilotnih bioreaktorjih v času pilotnega poskusa.

Table 21: Biogas production in pilot bioreactors during pilot experiment.

V bioplina (L) / dnevi	0	2	7	10	12	14	17	19	21	24	27	32	38
kontrolni bioreaktor	0	133	591	651	731	801	912	1007	1052	1320	1615	2119	2568
bioaugmentirani bioreaktor	0	159	594	811	1016	1143	1443	1501	1553	1817	2083	2514	2901

Meritve sestave bioplina kažejo, da proces ni potekal optimalno, saj vsebnost metana prve dni poskusa narašča, potem pa začne upadati in nihati (Priloga C1) ter ne doseže pričakovanih količin (60-70%) kot pri laboratorijskih testih BMP. Izračunan volumen proizvedenega metana na g KPK_{substrata} (Priloga C2) kaže, da pogoji v bioplinskem procesu niso bili optimalni. Volumen proizvedenega metana v bioreaktorju z dodano kokulturo je bil sicer večji od volumna, nastalega v kontrolnem bioreaktorju, vendar upadanje volumna v drugi polovici poskusa in nihanje kažeta na nepravilnosti v procesu.

V bioreaktorju z dodano kokulturo je metan v prvem tednu poskusa nastajal kar štirikrat hitreje (6,23 ml/dan) kot v kontrolnem bioreaktorju (1,54 ml/dan), zatorej je vpliv bioaugmentacije s hidrolitičnimi bakterijami jasnoviden.

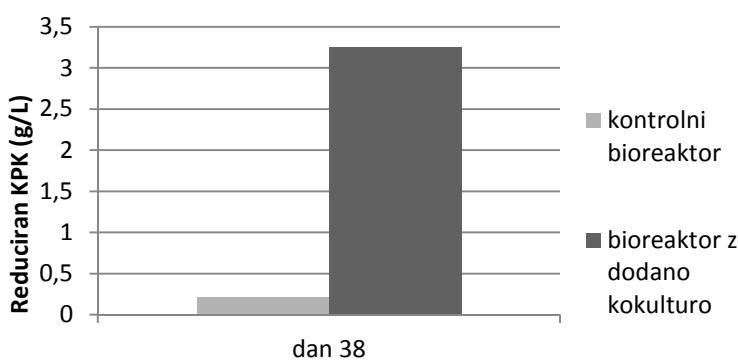
4.6.3.2 Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin

V času pilotnega eksperimenta ni prišlo do pomembnejših sprememb vrednosti pH. Ob začetku poskusa je bil pH 6,9, nato pa je do konca poskusa narasel do 8,2 (Priloga C3).

KMK so se v bioreaktorju z dodano kokulturo akumulirale v večji meri kot v kontrolnem bioreaktorju. Ocetna kislina je v bioreaktorju z dodano kokulturo dosegla najvišjo koncentracijo 1,05 g/L, koncentracija propionske kisline pa je narasla vse do 0,44 g/L (Priloga C4); po 21 dneh pa je koncentracija obeh upadla. Nasprotno se je akumulacija KMK v kontrolnem bioreaktorju odvijala manj intenzivno (0,2 g/L), a dlje časa.

4.6.3.3 Redukcija KPK

V bioreaktorju z dodano kokulturo smo namerili približno 16-krat več reducirane KPK kot v kontrolnem bioreaktorju v 38 dneh pilotnega testa BMP (Slika 18).



Slika 18: Redukcija KPK v kontrolnem bioreaktorju in bioreaktorju z dodano kokulturo ob koncu pilotnega testa BMP.

Figure 18: COD reduction in control bioreactor and bioaugmented bioreactor at the end of the pilot BMP assay.

4.7 TESTI BMP Z DODAJANJEM KOMERCIALNIH ENCIMSKIH MEŠANIC METHAPLUS L100, METHAPLUS L120 IN AXIASE 100

Izvedli smo dve ponovitvi testa BMP z dodajanjem encimskih mešanic MethaPlus L100, MethaPlus L120 in Axiase 100. Laboratorijski bioreaktorji so bili testirani v najmanj dveh paralelkah.

4.7.1 Proizvodnja bioplina in metana

Proizvodnja bioplina na g KPK_{substrata} se je v splošnem z večanjem doziranja encimskih mešanic povečevala (Priloga D1) v primerjavi s kontrolnim bioreaktorjem, ki je vseboval le pivovarske tropine. Pri priporočenem doziranju smo z dodajanjem Axiase 100 dosegli povečanje proizvodnje bioplina za 7-16 %, medtem ko sta pripravka MethaPlus L100 in L120 izkazala neskladne rezultate. Pri dvakratni dozi encimskih mešanic smo uspeli povečati proizvodnjo bioplina v vseh bioreaktorjih. Najučinkovitejša sta bila Axiase 100 in MethaPlus L100, saj sta pri dvakratni dozi povečala proizvodnjo bioplina na g KPK_{substrata} 10-50 %, pri petkratni dozi za 33-58 % in pri desetkratni dozi za 44-113 %.

Delež metana v bioplincu ob koncu testa BMP je bil pri doziranjih nad priporočeno dozo višji od kontrolnih bioreaktorjev. Tako delež kot izplen metana sta bila najvišja v bioreaktorjih z dodanim Axiase 100 (Preglednica 22). V kontrolnih bioreaktorjih s samimi tropinami je bila hitrost proizvodnje metana v prvih dneh 8,7 in 29,2 ml na dan, medtem ko je bila ta v bioreaktorjih z dodanimi encimskimi mešanicami v splošnem povečana. Volumen proizvedenega metana je v bioreaktorjih s časom naraščal (Priloga D2). Z dodajanjem različnih doz encimskih mešanic smo uspeli volumen metana v večini bioreaktorjev povečati, nekateri testni bioreaktorji pa so bili manj uspešni kot kontrolni bioreaktor s samim substratom (Slika 19). To se je predvsem zgodilo pri dodajanju priporočene doze MethaPlus L100 in L120. V obsegu priporočenega doziranja je bil uspešen le Axiase 100, ki je povečal proizvodnjo metana za 20-40 %. Za najprimernejšo encimsko mešanico za uporabo pri razgradnji pivovarskih tropin za proizvodnjo bioplina se je izkazala Axiase 100, saj je pri dvakratni dozi dodatek tega encimskega pripravka povečal proizvodnjo metana za povprečno 17-40 %, pri petkratni dozi za 65-81 % in desetkratni dozi za 52-162 %.

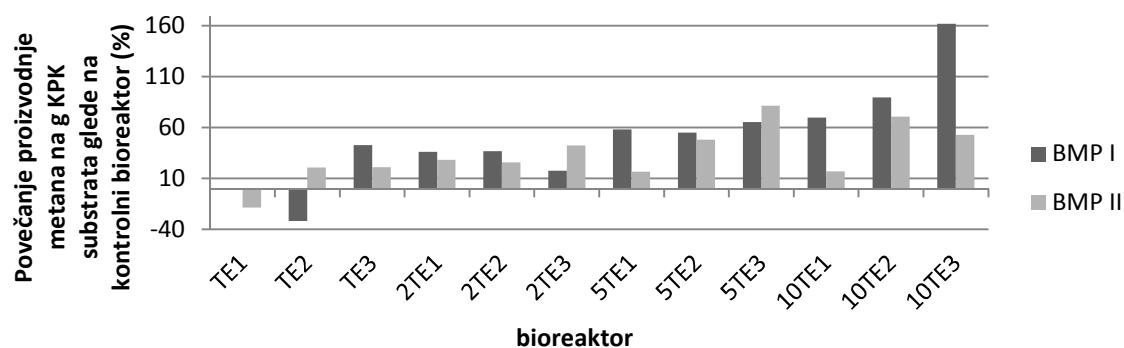
Preglednica 22: Deleži in izpleni metana v bioreaktorjih 30. dan testa BMP z dodajanjem MethaPlus L100, MethaPlus L120 in Axiase 100. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, I, II – ponovitvi testa BMP.

Table 22: Methane content and methane yield in bioreactors on day 30 of the BMP assay with the additions of MethaPlus L100, MethaPlus L120 and Axiase 100. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, I, II – replicates of BMP assay.

Bioreaktor	Povprečni delež metana v bioplinu* (%)		Izplen metana** (%)		Hitrost proizvodnje metana 1.-4. dan (ml/dan)	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.
Testi BMP	I.	II.	I.	II.	I.	II.
standard	52,3	59,8	78,5	98,2	28,8	24,5
tropine	60,3	59,8	67,8	82,2	8,7	29,2
E1	57,0	58,5	-	-	-	-
E2	56,6	53,5	-	-	-	-
E3	58,9	56,9	-	-	-	-
tropine + E1	57,2	59,9	67,9	66,9	10,5	20,2
tropine + E2	51,7	62,3	46,3	99,2	10,4	36,1
tropine + E3	63,6	65,5	96,7	99,6	14,6	49,8
tropine + 2E1	63,7	65,1	92,4	105,5	16,6	41,4
tropine + 2E2	63,1	65,9	92,6	103,4	19,8	47,8
tropine + 2E3	59,6	65,9	79,7	117,0	11,9	36,0
tropine + 5E1	63,6	63,0	107,2	95,8	19,8	31,0
tropine + 5E2	62,8	65,5	105,0	121,8	20,2	33,7
tropine + 5E3	62,9	66,2	112,2	149,0	19,3	58,2
tropine + 10E1	61,0	67,8	115,1	96,1	11,1	36,9
tropine + 10E2	61,9	67,3	128,6	140,4	17,5	48,9
tropine + 10E3	66,6	65,5	177,4	125,6	31,6	34,9

* 30. dan testa BMP

** glede na dejansko proizvodnjo metana na 1 g KPK_{substrata} v bioreaktorjih 30. dan in teoretično maksimalno možno proizvodnjo metana



Slika 19: Združeni rezultati vpliva dodajanja encimskih mešanic na povečanje proizvodnje metana na g KPK_{substrata} glede na kontrolne bioreaktorje s samimi tropinami. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, I, II – ponovitvi testa BMP.

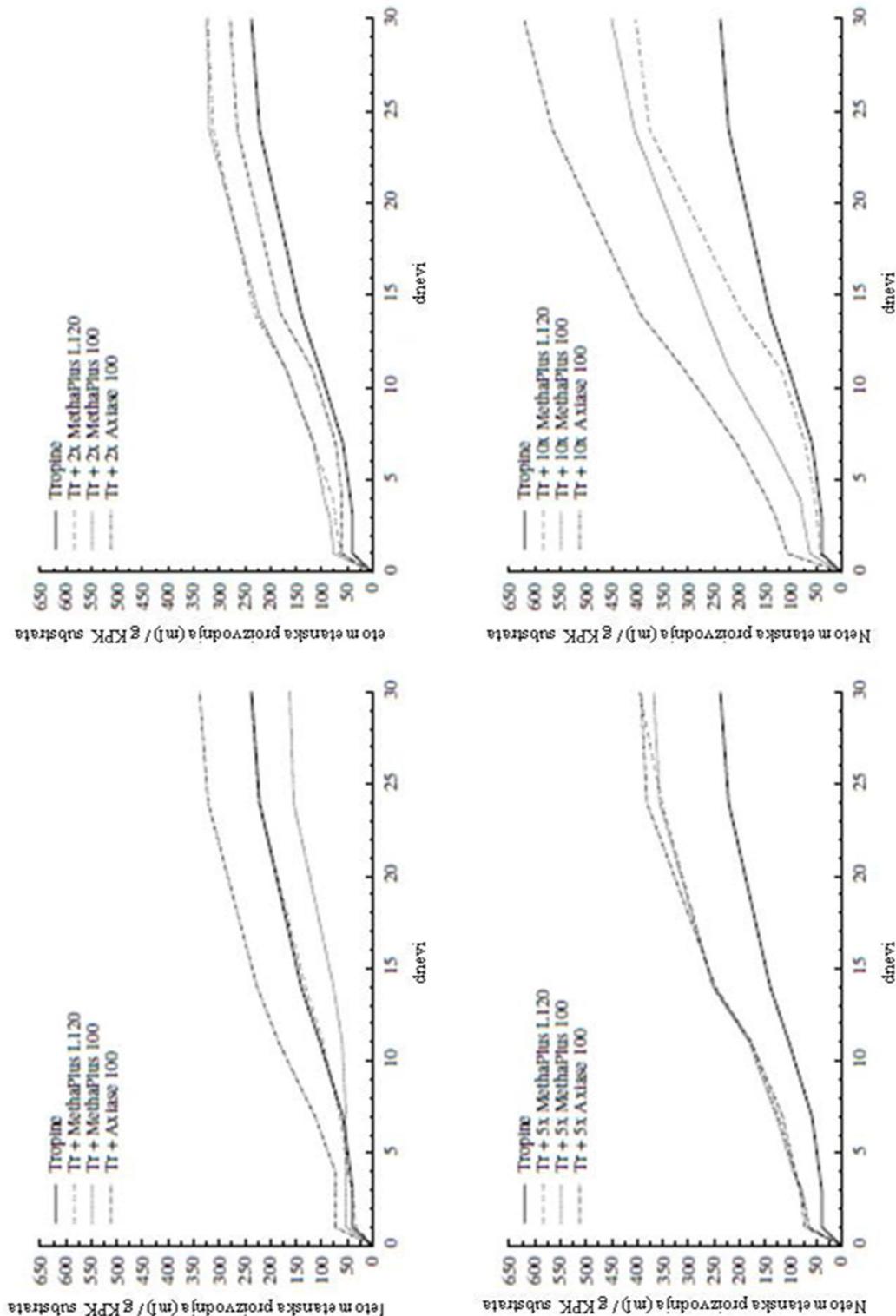
Figure 19: Combined results of the impact of the enzyme additions on the enhancement of methane production per g COD_{substrate} in comparison to a control bioreactor containing only brewery spent grain. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, I, II – replicates of BMP assay.

4.7.2 Statistična analiza rezultatov

Upoštevajoč rezultate obeh ponovitev testa BMP je, glede na kontrolni bioreaktor, prišlo do povečanja proizvodnje metana in povečane hitrosti nastajanja metana na g KPK_{substrata} v bioreaktorjih z dodanimi encimskimi mešanicami v dozah, večjih od priporočene, ter v bioreaktorjih z dodanim Axiase 100 v priporočeni dozi (Priloga D3).

Bioreaktorje smo primerjali med seboj in s kontrolnim bioreaktorjem glede na končno neto proizvodnjo metana in hitrost nastajanja metana na g KPK_{substrata}. Statistično značilne razlike ($AdjP < 0,05$) v hitrosti proizvodnje metana med kontrolnim bioreaktorjem s samimi tropinami in bioreaktorji z dodanimi encimskimi mešanicami so se pokazale le pri bioreaktorjih z dodanimi desetkratnimi dozami izbranih encimskih mešanic, pri čemer je bila hitrost pri dodanem Axiase 100 najbolj povečana (za 11 ml/dan) (Priloga D4). V medsebojni primerjavi bioreaktorjev smo zasledili naslednje statistično značilne razlike v hitrosti proizvodnje metana: med priporočeno in desetkratno dozo MethaPlus L120, med priporočeno in petkratno ter desetkratno dozo MethaPlus L100, med priporočeno in desetkratno dozo Axiase 100 ter med desetkratno in petkratno ter dvojno dozo Axiase 100.

Statistično značilne razlike ($AdjP < 0,05$) v povečani neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} med kontrolnim bioreaktorjem in bioreaktorji z dodanimi encimskimi mešanicami so se pokazale pri bioreaktorjih z dodanimi encimskimi mešanicami v povečanih dozah, ter pri Axiase 100 v priporočeni dozi (Slika 19, Priloga D5). Če primerjamo med seboj bioreaktorje z dodanimi različnimi encimskimi mešanicami v enakih dozah, najdemo dva sklopa statistično značilnih razlik: v priporočenih in v desetkratnih dozah med Axiase 100 in ostalima dvema mešanicama. V obeh sklopih je bil Axiase 100 najučinkovitejši. Pri ostalih testiranih dozah nismo zabeležili statistično značilnih razlik.



Slika 19: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK_{substrata} v bioreaktorjih z dodanimi različnimi dozami encimskih mešanic. Tr – tropine.
 Figure 19: Statistically analysed results of net methane production per g COD_{substrate} in bioreactors with added enzyme mixtures in different dosages. Tr – BSG.

4.7.3 Vrednost pH in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin

Začetni pH se je gibal med 6,9 in 7,2, končni pa med 6,9 in 7,1, kar je v optimalnem območju za izbrano mikrobnou biomaso in bioplinski proces. Večanje doziranj encimskih mešanic ni vplivalo na vrednost pH (Priloga D6).

Največ ocetne kisline (0,05 g/L) je bilo zabeležene ob začetku testa BMP, potem pa se je hitro začela porabljati v bioplinskem procesu (Prilogi D7, D8). Največ je bilo detektirane v bioreaktorjih z dodanim Axiase 100.. Propionska kislina je bila skoraj vseskozi v koncentraciji pod 0,05 g/L, le na zadnji dan testa BMP smo jo pri prvi ponovitvi testa BMP detektirali v nekoliko večjih koncentracijah v bioreaktorjih z dodanim Axiase 100 v priporočeni dozi ter v desetkratni dozi (0,32 in 0,14 g/L), kar kaže na neučinkovito izrabo kislin v drugi polovici testa BMP v teh bioreaktorjih. Preostalih kislin ni bilo zaznati.

4.7.4 Redukcija KPK

Do povečane redukcije KPK v primerjavi s kontrolnim bioreaktorjem je pri obeh ponovitvah testa BMP prišlo pri dodatkih Axiase 100 v priporočeni dozi (1,1-1,2 gKPK/L), pri drugi ponovitvi testa BMP pa tudi v primeru dvakratna doze (1,15 gKPK/L), petkratne doze (0,9 gKPK/L) in desetkratne doze Axiase 100 (0,8 gKPK/L) ter pri desetkratni dozi MethaPlus L100 (0,9 gKPK/L) (Priloga D9).

4.7.5 Rezultati analiz sestave mikrobne združbe

Z analizo bakterijske združbe s T-RFLP smo ugotovili, da se vzorci iz bioreaktorjev porazdelijo v dve gruči; dan 0 in dan 30, pri čemer v tem času pride v splošnem do 30-40 % sprememb (Priloga D10). V kontrolnem bioreaktorju brez dodanih encimskih mešanic se je bakterijska združba spremenila za povprečno 30 %. V bioreaktorjih z dodanimi različnimi dozami encimskih mešanic se je spremenila v podobni meri, izstopata le petkratna doza MethaPlus L100 s skoraj 40 % spremembo in desetkratna doza MethaPlus L120 s 55 % spremembo bakterijske združbe. Encimski mešanici MethaPlus L120 in L100 bolj vplivata na spremembo bakterijske združbe v 30 dneh testa BMP kot Axiase 100.

V času bioplinskega procesa ni prišlo do večjih sprememb v sestavi arhejske združbe, saj so vsi vzorci znotraj intervala podobnosti 90-100 % (Priloga D11).

5 RAZPRAVA

S testom BMP smo testirali, kako lahko z bioaugmentacijo z bakterijami ali dodatki encimskih mešanic povečamo proizvodnjo metana iz lignoceluloznega substrata. Bioaugmentacija z vampnimi bakterijami se pogosto uporablja za izboljšano razgradnjo lignoceluloznega substrata in povečano proizvodnjo KMK (Yue in sod., 2013), saj so poznane kot izjemno dobri celuloliti in hemiceluloliti (Fontes in Gilbert, 2010). Na podlagi izvora bakterij smo za bioaugmentacijo izbrali anaerobne vampne hidrolitske bakteriji *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* ter *C. cellulovorans* S85. *P. xylanivorans* Mz5^T velja za najboljšega ksilanolita med vampnimi ksilanolitičnimi bakterijami (Čepeljnik in sod., 2003; Kopečny in sod., 2003), *F. succinogenes* S85 pa za enega izmed najučinkovitejših vampnih celulolitov (Parawira, 2011), ki za razliko od ostalih celulolitičnih bakterij, nima celulosomov (Montgomery in sod. 1988; Suen in sod., 2011). Izredno dobra celulolitična in ksilanolitična aktivnost je izražena tudi v celulosomih *C. cellulovorans* (Doi in Tamaru, 2001).

Za hitrejši začetek hidrolize lignoceluloznega substrata v testu BMP smo bakterijam pred dodatkom v bioreaktor inducirali celulolitično in ksilanolitično aktivnost. Proizvodnjo metana na g KPK_{substrata} iz pivovarskih tropin je najbolj povečala bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T (10-28 %). Razlika v neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} med bioreaktorjem z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T in kontrolnim bioreaktorjem ter tudi med ostalimi bioaugmentacijami je statistično značilna ($p < 0,05$) (Priloga B2, Slika 14). Spremembe v dinamiki bioplinskega procesa zaradi bioaugmentacije potrjujejo tudi rezultati spremeljanja koncentracij KMK. Dinamika proizvodnje ocetne kisline v bioreaktorju z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T je bila drugačna od tiste v ostalih bioaugmentiranih bioreaktorjih. Dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T je povzročil, da je ocetna kislina v zmerni koncentraciji (do 0,06 g/L) enakoverno nastajala ves čas testa BMP (Priloga a6). Pri drugih bioaugmentacijah je bilo največ ocetne kisline zaznati le ob začetku testa BMP.

Za razliko od *F. succinogenes* S85, *P. xylanivorans* Mz5^T poleg ogljikovega dioksida in drugih metabolitov proizvaja tudi vodik (Kopečny in sod., 2003), kar smo potrdili z analizo sestave plinskih produktov čistih kultur izbranih bakterij za bioaugmentacijo (Slika 8). Vodik, ki sicer v bioplinskem bioreaktorju nastaja v fazì acetogeneze, v primeru akumulacije inhibira aktivnost acetogenih bakterij (Dong in sod., 1994). Hidrogenotrofne metanogene arheje odstranjujejo vodik iz sistema in proizvajajo metan. Vzdrževanje ravnovesja koncentracije vodika v bioreaktorju torej omogoča aktivnost acetogenih bakterij (Rivera-Salvador in sod., 2014). Vodik zato predstavlja limitirajoč faktor v anaerobni razgradnji in ozko grlo v bioplinskem procesu. S povečanjem proizvodnje vodika lahko v sistemu povečamo tudi aktivnost hidrogenotrofnih arhej in s tem proizvodnjo metana. Bagi in sod. (2007), Kovács in sod. (2013) in Ács in sod. (2015) so količino vodika v sistemu povečali z bioaugmentacijo z bakterijami, ki proizvajajo vodik

(*Enterobacter cloacae*, *Caldicellulosyruptor saccharolyticus*) in s tem povečali proizvodnjo metana. Ob dodatku *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktor je zato poleg izboljšane hidrolize lignoceluloznega substrata, zaradi več proizvedenega vodika najverjetneje prišlo tudi do povečane hidrogenotrofne metanogeneze. Zmerna in konstantna proizvodnja ocetne kisline ter pospešena hidrogenotrofna metanogenez sta najverjetneje vzrok za povečano proizvodnjo metana. *P. xylanivorans* Mz5^T ima tudi dve prednosti pred ostalimi bakterijami, izbranimi za bioaugmentacijo: a) proizvaja bakteriocine (Čepeljnik in sod., 2003), zaradi česar je bolj vzdržljiv v mešani bioplinski mikrobeni združbi in b) za razliko od ostalih izbranih striktno anaerobnih hidrolitskih bakterij je sposoben preživeti kratkotrajno izpostavljenost kisiku (Kopečny in sod., 2003).

Tudi nekatere druge bioaugmentacije so bile uspešne pri povečevanju proizvodnje metana iz pivovarskih tropin, vendar ne v tolikšni meri kot dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T. Dodatek predhodno encimsko inducirane kokulture *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 je povečal proizvodnjo metana na g KPK_{substrata} za 11-13 %, dodatek *C. cellulovorans* za 8-11 %, dodatek kokulture *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 za 4-11 % in dodatek *F. succinogenes* S85 za 3-4 %. Bakterije rodu *Clostridium* so pogosto v uporabi pri bioaugmentaciji za povečevanje biokemijskega metanskega potenciala lignoceluloznih substratov. Peng in sod. (2014) so z dodakom *C. cellulolyticum* uspeli povečati proizvodnjo metana iz pšenične slame, Lü in sod. (2013) pa so povečali proizvodnjo metana iz mikroalg z dodatkom *C. thermocellum*. Tako kot *P. xylanivorans* Mz5^T, tudi *C. cellulovorans* proizvaja vodik (Slika 8) (Sleat in sod., 1984), zaradi katerega je hidrogenotrofna metanogenez pospešena. S plinsko kromatografijo smo spremljali koncentracijo KMK v bioreaktorjih in ugotovili, da v bioreaktorjih z dodanim *C. cellulovorans* individualno ali v kokulturi z drugimi izbranimi bakterijami proizvodnja KMK, predvsem ocetne kisline, ni bila tolikšna kot pri dodatku *P. xylanivorans* Mz5^T (Priloga A6). Očitno je hidroliza pivovarskih tropin pri dodatku *C. cellulovorans* potekala manj učinkovito kot pri dodatku *P. xylanivorans* Mz5^T, zato se je, kljub sposobnosti *C. cellulovorans*, da proizvaja vodik, proizvodnja metana povečala le v manjši meri.

Dodatek mrtvih bakterijskih kultur ni povečal proizvodnje metana (Slika 13). S tem smo dokazali, da se proizvodnja metana pri bioaugmentaciji ne poveča zaradi KPK dodanih bakterijskih celic, temveč zaradi encimske aktivnosti dodanih hidrolitskih bakterij, ki pospešujejo hidrolizo lignoceluloznega substrata.

Dodatek kokulture *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, ki je v laboratorijskem bioreaktorju povečal proizvodnjo bioplina na g KPK_{substrata} v povprečju za 3-15 %, smo preizkusili tudi na pilotnem nivoju. Proizvodnja bioplina na g KPK_{substrata} je bila po 38 dneh testa BMP v pilotnem bioreaktorju ob dodatku omenjene kokulture povečana za 13 % (Preglednica 21), hitrost proizvodnje metana v prvem tednu poskusa pa pospešena kar za štirikrat. S tem smo potrdili učinkovitost dodatka te kokulture v pospeševanju hidrolize pivovarskih tropin tudi v drugačnem bioreaktorskem sistemu večjih volumnov. Za

natančnejše meritve proizvedenega metana so potrebne izboljšave uporabljenega pilotnega bioreaktorja. Zaradi zahajanja tropin v odpadno vodo, ki se je prečrpavala na dnu in zopet sproščala na vrhu bioreaktorja, je pogosto prihajalo do zamašitve šob. Ob vsakem čiščenju šob je bilo potrebno bioreaktor odpreti. Vdor zraka v anaerobno okolje in rahel padec temperature sta predstavljala spremembo atmosfere v bioreaktorju (sestave bioplina) in šok za mikroorganizme. Prišlo je do nihanja v izmerjenem deležu metana in posledično v izračunanem volumnu proizvedenega metana. Prekinitev anaerobnosti so škodovale tako bioplinski mikrobni združbi kot kokulturi *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85, ki smo jo dodali v bioreaktor v procesno tekočino (odpadna voda). Ker sta dodani bakteriji prišli v stik s substratom v predelu bioreaktorja, ki je bil nad gladino odpadne vode, je vdor zraka ogrozil preživetje dodanih obligatorno anaerobnih hidrolitskih bakterij. Znano je, da kisik inhibira rast klostridijev in drugih obligatornih anaerobov, sam proces inhibicije pa še ni natančno pojasnjen. Obstaja več hipotez in sicer, a) da kisik napade na kisik občutljive encime, kar povzroči zaustavitev metabolizma bakterije, b) da anaerobi niso sposobni razgradnje aktivnih kisikovih spojin, kar povzroči nepovratno škodo na DNA in molekulah lipidov, in c) da oksidacijski sistem NAD(P)H reagira s kisikom, kar povzroči oksidacijo donorja elektrona NAD(P)H, ki je potreben za normalen potek anaerobnega metabolizma, in bakteriji onemogoči vzdrževanje redoks ravnovesja (O'Brien in Morris, 1971; Woods in Jones, 1986; Holland in sod., 1987; Storz in sod., 1990). Verjetno bi bila proizvodnja metana zaradi dodatka te kokulture še večja, če bi odpravili vdore zraka v bioreaktor. Od razgrajujočega substrata, ki je bil nameščen na kovinski mreži nad gladino procesne brozge, je kapljala odpadna voda z razgradnimi produkti tropin proti spodnjemu delu bioreaktorja. Granulirana bioplinska mikrobna združba, ki se je večinoma nahajala v odpadni vodi, je tako dobila osnovne molekule za proizvodnjo bioplina. Ob vdoru zraka v bioreaktor se odpadna voda na dnu bioreaktorja najverjetneje ni prezračila v taki meri in tako hitro kot zgornji del bioreaktorja. Zato preživetje bioplinske mikrobne združbe ni bilo tako ogroženo in se bioplinski proces ni zaustavil. Prepričani smo, da bi z ustreznejšo modifikacijo tega bioplinskega sistema uspeli mikroorganizmom zagotoviti stabilnejše pogoje in bi tudi proizvodnja metana potekala enakomerneje. 16-krat povečana redukcija KPK v bioaugmentiranem bioreaktorju je dodaten dokaz za učinkovito povečanje proizvodnje bioplina zaradi dodanih hidrolitskih bakterij.

V drugem sklopu raziskav smo testirali, kako lahko z dodajanjem komercialnih encimskih mešanic MethaPlus L100 in L120 ter Axiase 100 povečamo proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin. Izbrane encimske mešanice so v prosti prodaji in so namenjene povečevanju bioplinske proizvodnje iz teže razgradljivih žitaric kot sta rž in ječmen in drugih lignoceluloznih ostankov v bioplarnah. Na pivovarskih tropinah te mešanice še niso bile testirane, zato nas je zanimalo, kako učinkovite bodo v primerjavi z bioaugmentacijo s hidrolitskimi bakterijami. V priporočeni dozi je proizvodnjo metana povečal le Axiase 100 (20-40 %) (Slika 19). Axiase 100 se je izkazal za najprimernejšo encimsko mešanico za hidrolizo tropin tudi v povečanih dozah, saj smo v teh bioreaktorjih

izmerili največje deleže in izplene metana (Preglednica 22). V povečanih dozah sta proizvodnjo metana povečala tudi MethaPlus L100 in L120, vendar manj kot Axiase 100. Proizvodnja metana se je s povečevanjem doze dodanih encimskih mešanic povečevala. Ker je natančna sestava encimskih mešanic poslovna skrivnost, ne moremo natančno opredeliti vzroka za boljše delovanje Axiase 100, saj so si vse tri mešanice med seboj primerljive glede na podano encimsko aktivnost. Tudi statistična analiza rezultatov je potrdila uspešnost Axiase 100, ki je bil v končni neto proizvodnji metana ter v hitrosti proizvodnje metana statistično značilno različen od ostalih testiranih encimskih mešanic (Prilogi D4, D5). Kljub temu, da Axiase 100 v priporočeni dozi podobno močno poveča proizvodnjo metana kot bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T, pa ima povečevanje proizvodnje bioplina z dodajanjem encimov številne slabosti: a) komercialni encimi so dragi, b) encime je potrebno vsakodnevno dodajati v bioreaktorje, c) obdelava substrata z encimi zahteva ostrejsi nadzor nad pogojii v bioreaktorju kot pri bioaugmentaciji z mikroorganizmi, č) na nekatere hidrolitske encime (celobiaza) deluje povratna inhibitorna zanka, saj jih lastni končni produkti inhibirajo, in d) encimska aktivnost je inhibirana ob vezavi encimov na trdni nosilec, termični denaturaciji, inaktivaciji aktivnega mesta encima ali ob izgubi kofaktorjev (Parawira, 2011).

Iz cene, ki jo ima Axiase 100 na tržišču, in rezultatov testov BMP smo izračunali koliko encimske mešanice bi bilo potrebno dodati v bioreaktor na 1 tono OS pivovarskih tropin ob predpostavki, da bi bili pogoji bioplinskega procesa in frekvenca dodajanja enaki kot v testih BMP. Za razgradnjo 1 tone OS pivovarskih tropin bi moral biti volumen procesne brozge 2472 m³. Če predpostavimo, da je proizvodnja metana v večjem merilu povečana v enaki količini kot v laboratorijskem merilu, bi za dodajanje Axiase 100 v bioreaktor v priporočeni dozi vsak drugi dan na mesec odšteli 50 € in s tem povečali proizvodnjo metana iz tropin za 20-40 %. Za še večje izplene metana pa bi morali povečati doziranje, kar bi zneslo od 250 do 500 € na mesec. Ker pa je v industrijskih bioreaktorjih zaradi zagotavljanja homogenosti večjih volumnov potrebno mešanje procesne brozge, bi to vsekakor predstavljal dodaten strošek in delno spremenilo sistem in pogoje v bioreaktorju, kar bi vsekakor vplivalo na učinkovitost obdelave substrata z encimi. Zato je verjetno, da bi se proizvodnja metana v industrijskem merilu pri dodatkih encimov povečala manj kot v laboratorijskem merilu. Najverjetnejše bi bilo potrebno dodajati več encimske mešanice in pogosteje (vsak dan, kot priporočajo proizvajalci), s čimer bi se cena obdelave tropin podvojila. Smiselno bi bilo testirati vpliv Axiase 100 in bioaugmentacije s *P. xylanivorans* Mz5^T paralelno na industrijski ravni, saj bi le tako lahko ocenili povečan obseg proizvodnje metana iz pivovarskih tropin v bioreaktorjih z dodajanjem encimov in bakterij in izračunali ekonomiko procesa.

Dodajanje bakterij ali encimov v bioreaktor lahko povzroči spremembe v bakterijski in arhejski mikrobnii združbi, ki so lahko pozitivne za proizvodnjo bioplina, lahko pa imajo tudi negativni učinek (Nielsen in sod., 2007; Dong in sod., 2011). Zato smo poleg fizikalno-kemijskih parametrov bioplinskega procesa spremljali tudi spremembe v sestavi

mikrobne združbe. Molekularna tehnika T-RFLP nam je omogočila vpogled v spremembe bakterijske in arhejske združbe pri različnih načinih povečevanja proizvodnje metana. Največje spremembe v bakterijski združbi (40-50 %) smo zaznali v bioreaktorjih z dodanim encimskim pripravkom MethaPlus L100 in L120 v pet- in desetkratni dozi (Priloga D10). V bioreaktorjih z dodanim Axiase 100, ki je najbolj povečal proizvodnjo metana, se je bakterijska združba med procesom spremenila podobno kot v kontrolnih bioreaktorjih (do 30 %), torej sam encimski pripravek ni imel vpliva na združbo. Kot kaže, encimski mešanici MethaPlus bakterijske združbe nista spremenili najbolj ugodno v smislu povečanja proizvodnje metana. Spremembe, ki se lahko pojavijo v mikrobnii združbi ob zagonu bioplinskega procesa zaradi dodatkov v bioreaktor, narekujejo nadaljnje delovanje bioreaktorja. V kolikor se mikrobnii združba v začetni fazi ne uspe stabilizirati, lahko to vodi v slabšo in neučinkovito izrabo OS v bioreaktoru in v podaljšan zagon bioplinskega procesa (Zhao in sod., 2013). Sprememb v arhejski združbi zaradi dodatkov encimskih mešanic nismo zasledili (Priloga D11).

Pri poskusih bioaugmentacije se je bakterijska združba med bioplinskim procesom spremenila za 15-40 % tako v kontrolnih kot tudi v večini bioaugmentiranih bioreaktorjev (Priloge A8, A10). Spremembe v kontrolnih bioreaktorjih so odraz adaptacije mikrobine združbe na nov substrat. Največjo spremembo v sestavi bakterijske združbe je povzročila bioaugmentacija s kokulturo *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 (51 % razlike), ki je sicer manj povečala proizvodnjo metana kot *P. xylanivorans* Mz5^T. Očitno se je bakterijska združba v tem času prilagodila na nov substrat in na prisotnost dodanih bakterij, saj je bil bioplinski proces stabilen. Verjetno pa so bile prilagoditve bakterijske združbe funkcionalno manj ugodne kot pri bioaugmentaciji s *P. xylanivorans* Mz5^T, pri kateri smo izmerili največjo proizvodnjo metana. Dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T je namreč povzročil spremembe v sestavi bakterijske združbe (do 44 %), primerljive tistim, ki smo jih dokazali v kontrolnih bioreaktorjih (30 %) in pri večini ostalih bioaugmentacij (do 40 %). Izboljšana hidroliza zaradi dodatka *P. xylanivorans* Mz5^T je ponudila več monosaharidov za acidogene bakterije. Te so zato lahko proizvedle več substrata za acetogene bakterije in dalje za metanogene arheje, kar je možen vzrok za delno spremenjeno sestavo bakterijske združbe. Dodatek samega *F. succinogenes* S85 pa ni imel takega učinka na bakterijsko združbo kot v kokulturi s *P. xylanivorans* Mz5^T. Glede na uspešno povečano proizvodnjo metana je bila kohabitacija teh dveh bakterij relativno uspešna in učinkovita pri hidrolizi substrata ter dovolj rezistentna v kompleksni mikrobi združbi, da je povzročila večje spremembe v bakterijski združbi.

Sprememb v arhejski združbi, z izjemo bioreaktorjev z dodanim *C. cellulovorans*, nismo dokazali oziroma so bile majhne. To sovpada z dejstvom, da je arhejska združba v bioplinskem bioreaktoru mnogo manjša in manj pestra od bakterijske (Zakrzewski in sod., 2012). Arheje vršijo le metanogenezo, ki predstavlja manjši del bioplinskega procesa, in rastejo počasneje od bakterij zarad manjšega pretoka dostopne energije, kar običajno pogojuje le manjše spremembe v arhejski združbi med procesom. Bakterijska združba v

bioplinskem bioreaktorju pa je izjemno pestra in številčna in zato tudi prilagodljivejša (Cord-Ruwisch in sod., 1988). Največjo spremembo arhejske združbe po 30 dneh poskusa smo dokazali v bioreaktorju z dodanim *C. cellulovorans* (do 48 % razlike) (Prilogi A9, A11). *C. cellulovorans* proizvaja vodik, ogljikov dioksid in ocetno kislino (Sleat in sod., 1984), zaradi česar se je lahko močneje uveljavila homoacetotogena pot proizvodnje ocetne kisline iz vodika in ogljikovega dioksida pri acetogenih bakterijah (Nie in sod., 2007). Povečana ponudba ocetne kisline je posledično lahko vplivala na spremembe v arhejski združbi, predvsem v smislu povečanega deleža acetotrofnih metanogenih arhej. Drugi razlog za spremembo sestave arhejske združbe je lahko tudi tekmovanje homoacetogenih bakterij in hidrogenotrofnih arhej za vodik in ogljikov dioksid, kar lahko privede do zmanjšanega deleža hidrogenotrofnih metanogenih arhej v arhejski združbi (Khanal, 2008b).

Proizvodnja metana iz pivovarskih tropin se je zaradi bioaugmentacije z izbranimi hidrolitskimi bakterijami učinkovito povečala, zato nas je zanimalo, kako obstojne so dodane bakterije v bioreaktorju po bioaugmentaciji. Zaradi nezadostne ločljivosti tehnike T-RFLP (Fraher in sod., 2012; Čater in sod., 2013), smo za natančnejše dokazovanje prisotnosti dodanih bakterij v bioreaktorju uporabili tehniko DGGE. Z DGGE nismo mogli ločevati med specifično liso *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85, saj imata preveč podobno vsebnost GC (Kisand in Wikner, 2003). V primeru dodane kokulture *P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85 se je na gelu pojavljala le ena lisa (Slika 12). Uspeli pa smo določiti njuno prisotnost na začetku poskusa in odsotnost na zaključku poskusa. Težave so se pojavile tudi pri vzorcih, ki so vsebovali *C. cellulovorans*. Profil čiste kulture te bakterije se je pojavljjal tudi v vzorcih iz bioreaktorjev, kjer je nismo dodali. Zato menimo, da smo v sklopu metode PCR zaradi podobnega vsebujočega deleža GC med sorodnimi klostridiji (Krause in sod., 2008) dobili pomnožke tudi teh bakterij, za katere je v splošnem znano, da so prisotni v bioplinskih bioreaktorjih. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Kuo in sod. (2012), ki so sledili bakteriji *Clostridium* sp. TCW1 v bioplinskem bioreaktorju pred in po bioaugmentaciji s to bakterijo. Ker ločevanje med *C. cellulovorans*, uporabljenim za bioaugmentacijo, in ostalimi prisotnimi sorodnimi klostridiji z DGGE ni bilo možno, smo ga skušali slediti z natančnejo kvantitativno metodo qPCR.

Z analizo DGGE bakterijske združbe v vzorcih, odvzetih večkrat v prvem tednu testa BMP, smo uspeli pridobiti boljši vpogled v stabilnost dodanih bakterij pri poskusih najuspešnejše bioaugmentacije s *P. xylanivorans* Mz5^T. *P. xylanivorans* Mz5^T je glede na rezultate DGGE preživel v bioreaktorju najmanj 6 dni (Slika 16). Intenziteta lise *C. cellulovorans* se je zmanjševala od začetka poskusa do 10. dne. *P. xylanivorans* Mz5^T se je dobro prilagodil na novo mikrobnno združbo, pri čemer so mu koristile tudi prednostne lastnosti kot so zmožnost okrevanja ob kratkotrajnih aerobnih stresih ter proizvodnja bakteriocinov (Čepeljnik in sod., 2003). Ker je v bioreaktorju preživel dlje kot *C. cellulovorans*, je lahko dlje časa vršil hidrolizo lignoceluloznega substrata in s tem najbolj

povečal proizvodnjo metana. Za natančnejšo kvantifikacijo *P. xylanivorans* Mz5^T v mikrobnih združbi bioreaktorja med trajanjem testa BMP smo uporabili metodo qPCR. Za sledenje *P. xylanivorans* Mz5^T smo oblikovali specifične oligonukleotidne začetnike, ki so pomnoževali odsek gena za enolazo. Specifičnost produktov qPCR smo potrdili na podlagi analize talilnih krivulj. Pri izbiri regij za naleganje oligonukleotidnih začetnikov smo bili precej omejeni, saj so trenutno znana zaporedja le treh odsekov genskih regij *P. xylanivorans* Mz5^T. Ker celotna velikost genoma ni poznana, nismo mogli umeriti količine pomnožkov qPCR na število kopij gena ampak le na količino genomske DNA, izmerjeno s spektrofotometrom. Rezultati kažejo, da količina DNA dodanega *P. xylanivorans* Mz5^T v času po bioaugmentaciji hitro upada (Slika 17). Če privzamemo, da količina DNA *P. xylanivorans* Mz5^T, dodana v bioreaktor na dan 0, predstavlja 100 %, potem lahko trdimo, da je bilo po treh dneh prisotnega v bioreaktorju le še 55 % dodanega *P. xylanivorans* Mz5^T, po šestih dneh pa le še 11 %, medtem ko ga na 10. dan nismo mogli več natančno kvantificirati. Če te rezultate povežemo z rezultati DGGE, ugotovimo, da je natančnost DGGE zadovoljiva do vsebnosti sledene bakterije v vzorcu okrog 10 %. Pri manjših odstotnih deležih pa lise na gelu DGGE niso več dobro vidne. Na podlagi rezultatov qPCR lahko ocenimo časovni interval, ki bi bil potreben za redno dodajanje *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktor za vzdrževanje zadovoljive hidrolitske aktivnosti in povečane proizvodnje metana iz pivovarskih tropin v industrijskem merilu. Ustrezen časovni interval za kontinuirino bioaugmentacijo bioreaktorja je torej 6 dni, pri čemer količina *P. xylanivorans* Mz5^T nikoli ne bi upadla pod 10 %.

V splošnem bi bile za uspešno bioaugmentacijo najprimernejše bakterije, ki bi jih v bioreaktor dodali le enkrat, te pa bi se potem v enaki ali večji količini obdržale v sistemu in ostale aktivne. Neuspešnost bioaugmentacije je običajno povezana z nekompatibilnostjo dodane bakterije s kompleksno mikrobnim združbo bioplinskega bioreaktorja. Rezultat bioaugmentacije v smislu preživetja in aktivnosti dodane bakterije je odvisen od odnosa med dodano bakterijo in novimi biotskimi in abiotskimi pogoji v bioreaktorju. Pogosto pride do hitrega upada v velikosti populacije dodane bakterije, saj na novo vzpostavljeni odnosi v bioreaktorju za dodane bakterije niso najugodnejši in posledično pride do njihovega razredčenja ali odmrtva (El Fantroussi in Agathos, 2005). Ács in sod. (2015) so v bioplinski bioreaktor, ki je tretiral koruzno silažo, na začetku bioplinskega procesa dodali *Enterobacter cloacae* v količini 10^9 CFU/ml volumna bioreaktorja. Po šestih tednih je bila proizvodnja bioplina povečana za 20 %. S qPCR metodo so dokazali, da je količina dodane bakterije v bioreaktorju sprva nekoliko upadla, nato pa se je stabilizirala pri 6×10^7 CFU/ml in obdržala do konca poskusa. Sorodne vrste dodane acetogene bakterije *E. cloacae* so naravno prisotne v bioplinski mikrobiini združbi, zato je imel v takšnem okolju *E. cloacae* večje možnosti za preživetje in razmnoževanje. Dueholm in sod. (2015) pa so z bioaugmentacijo s *Pseudomonas monteilli* SB3078 (1 %) želeli pospešiti razgradnjo benzenov in toluenov v odpadni vodi. S kontonuirnim sistemom, retencijskim časom 24 ur in bioaugmentacijo le na začetku poskusa so v štirih dneh uspeli pospešiti razgradnjo

strupenih spojin v odpadni vodi. qPCR rezultati so potrdili izjemno hiter upad količine dodane bakterije *P. monteilli* v bioreaktorju. Število dodanih celic se je po prvih 12 urah zmanjšalo za 90 %, do konca poskusa pa je preživelilo le 3,4 % prvotne količine dodane bakterije. Hiter upad števila celic dodane bakterije pripisujejo prevelikemu odpavljanju celic iz bioreaktorja zaradi kontinuirnega sistema, kar bi lahko odpravili drugačnim bioreaktorskim sistemom z več razdelki ali membranami (bioreaktor ABR) (Barber in Stuckey, 1999) ali z imobilizacijo bakterijskih celic za bioaugmentacijo (Mohan in sod., 2005; Herrero in Stuckey, 2015). Saravanane in sod., 2001 so težavo izgubljanja dodanih mikroorganizmov po bioaugmentaciji rešili s kontinuirno bioaugmentacijo anaerobnega bioreaktorja z razširjeno plastjo mulja (angl: fluidized-bed reactor), ki so ga uporabljali za čiščenje odpadne vode iz farmacevtske industrije. Testirali so tako enkratno bioaugmentacijo kot kontinuirno (vsake dva dneva). Očiščevalna aktivnost bioreaktorja je močno upadla že po osmih dneh enkratne bioaugmentacije, medtem ko je bila pri kontinuirni bioaugmentaciji stabilna vseh 32 dni poskusa.

Rezultati te doktorske naloge potrjujejo, da je bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T perspektiven postopek za povečanje proizvodnje metana iz pivovarskih tropin in tudi konkurenčna uporabi komercialne encimske mešanice Axiase 100. Za bioreaktor z volumnom procesne brozge 500 m³ bi tako potrebovali 25000 L bakterije v gojišču (5 %) za tedensko bioaugmentacijo, kar bi zaradi potrebnih sestavin za pripravo gojišča bioplinski predstavljal velik strošek. To je tudi edina slabost aplikacije bioaugmentacije s *P. xylanivorans* Mz5^T v industrijskem merilu. Zato so vsekakor potrebna še nadaljnja testiranja bioaugmentacije s *P. xylanivorans* Mz5^T v deležu, manjšem od 5 %, s čimer bi znižali stroške postopka.

6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov testiranja bioaugmentacije z različnimi hidrolitskimi bakterijami in dodajanja izbranih encimskih mešanic za izboljšanje bioplinske proizvodnje lahko strnemo naslednje sklepe:

- Tako bioaugmentacija s hidrolitičnimi bakterijami kot dodajanje encimskih mešanic lahko povečata bioplinsko proizvodnjo iz pivovarskih tropin primerljivo z že razvitimi fizikalno-kemijskimi metodami obdelave lignoceluloznega substrata.
- Uspešnost bioaugmentacije temelji ne le sposobnosti sinteze celulolitičnih encimov, občutljivosti na kisik in drugih lastnosti dodane bakterije, temveč tudi na njeni sposobnosti na prilagajanje in preživetje v kompleksni mikrobnii združbi bioreaktorja.
- Med bioaugmentacijami je proizvodnjo metana iz pivovarskih tropin najbolj povečala bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T. Sledijo ji bioaugmentacija s *C. cellulovorans* in s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85.
- Bioaugmentacija s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 je povečala proizvodnjo bioplina tudi na pilotnem nivoju.
- V zgradbi bakterijske združbe smo zasledili večje spremembe kot v arhejski, kar se sklada z že znanim dejstvom, da je bakterijska združba številčnejša, pestrejša in izvaja večino aktivnosti v bioplinskem procesu, zato se je sposobna tudi bolje prilagoditi na nove razmere v bioreaktorju kot arheje.
- Dodane bakterije se v bioreaktorski združbi ne obdržijo dolgo. Najdlje, skoraj en teden, v kompleksni mikrobnii združbi bioreaktorja preživi *P. xylanivorans* Mz5^T. Zato bi bilo potrebno za učinkovit bioplinski proces v večjem merilu le-to bakterijo redno dodajati v bioreaktor.
- Povečevanje proizvodnje metana je premosorazmerno s povečevanjem doziranja encimskih mešanic v bioreaktor, vendar se s tem povečuje tudi strošek obdelave substrata.
- Glede na rezultate proizvodnje metana pri dodajanju izbranih encimskih mešanic v priporočenih dozah, je za hidrolizo pivovarskih tropin najprimernejši Axiase 100 v priporočeni dozi in frekvenci dodajanja vsak drugi dan.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Bioplinarne se za proizvodnjo bioplina iz lignoceluloznih substratov zaradi majhnih izplenov metana ne odločajo pogosto. Vzrok je v zapleteni zgradbi lignoceluloze, saj hemicelulozo in celulozo prekriva lignin, kar otežuje dostop hidrolitičnim encimom in ovira hidrolizo. Kljub temu pa veljajo za perspektiven substrat za bioplinsko proizvodnjo zaradi široke dostopnosti in nizke cene. Z obdelavo lahko izboljšamo njegovo razgradnjo in povečamo proizvodnjo bioplina. Obdelave lignoceluloznih substratov so lahko fizikalne, kemijske ali biološke. Slednje imajo velik potencial, saj se izogibajo agresivnim kemikalijam, so okolju prijaznejše in tudi cenejše od fizikalno-kemijskih obdelav. V našem raziskovalnem delu smo se osredotočili na bioaugmentacijo s hidrolitičnimi bakterijami ter na dodajanje komercialnih encimskih mešanic. Kot modelni lignocelulozni substrat smo uporabili pivovarske tropine, anaerobno mikrobnno biomaso iz bioreaktorja UASB Čistilne naprave Laško pa kot vir aktivnih mikroorganizmov za proizvodnjo bioplina. Iz nabora že poznanih celulolitičnih in hemicelulolitičnih anaerobnih bakterij smo izbrali dve vampni bakteriji (*P. xylanivorans* Mz5^T in *F. succinogenes* S85) in eno iz metanogenega bioreaktorja, ki je tretiral topolov les (*C. cellulovorans*). Z analizo encimske aktivnosti smo potrdili, da so izbrane bakterije odlični ksilanoliti in celuloliti. S testom biokemijskega metanskega potenciala (30 dni, 37 °C, 120 rpm, v temi) smo testirali, kako dodatek posamezne bakterije ali kokulture vpliva na povečanje proizvodnje metana. Bakterije za bioaugmentacijo smo predhodno gojili v inducibilnem gojišču M2 in s tem inducirali njihovo ksilanolitično in celulolitično aktivnost za hitrejše delovanje v bioplinskem procesu. V laboratorijske bioreaktorje volumna 1L smo jih dodajali v količini 5 % od celotnega volumna bioreaktorske mešanice. Redno smo spremljali proizveden bioplín, delež metana, pH, kemijsko potrebo po kisiku in koncentracijo kratkoverižnih maščobnih kislin. Proizvodnjo metana je najbolj povečal dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T (10-28 %) sledita dodatek *C. cellulovorans* in dodatek kokulture *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (oba približno 11 %). Proizvodnja metana je bila povečana najverjetneje zaradi izboljšane hidrolize zaradi bioaugmentacije, kar dokazujejo tudi rezultati spremeljanja koncentracije ocetne kisline v bioreaktorjih. Le-ta je bila izmerjena v največjih, a ne inhibitornih koncentracijah, v bioreaktorjih z dodanim *P. xylanivorans* Mz5^T. Z molekularnimi tehnikami smo analizirali spremembe v sestavi mikrobnne združbe v bioreaktorjih. V bakterijski združbi je prišlo do večjih sprememb, medtem ko se arhejska ni spremenjala v takem obsegu. Bakterije so v bioplinskih bioreaktorjih številčnejše od arhej in ker vršijo večino korakov bioplinskega procesa, so tudi prilagodljivejše na spremembe v mikrookolju. Z analizo T-RFLP smo dokazali, da je dodatek *P. xylanivorans* Mz5^T v bakterijski združbi povzročil večje spremembe (30-50 %) kot ostale bioaugmentacije. Močneje je vplival na arhejsko združbo le dodatek *C. cellulovorans* (do 50 %). Z DGGE smo dokazali, da je *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju preživel najdlje, skoraj en tened, zato je bil najverjetneje nauspešnejši pri povečevanju proizvodnje metana,

saj je najdlje izvajal hidrolizo substrata. *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 se v bioreaktorjih nista obdržala več kot en dan. S qPCR smo potrdili, da količina dodane genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v bioreaktorju strmo upada s časom. 3. dan od bioaugmentacije je je glede na dodano količino v bioreaktor na dan 0 prisotne še 55 %, 6. dan le še desetina, 10. dan pa je nismo več detektirali. Za še učinkovitejši bioplinski proces bi bilo potrebno *P. xylanivorans* Mz5^T dodajati v bioreaktor v količini 5 % vsakih šest dni. S tem bi dosegli popolnejšo izrabo substrata in večje izplene metana.

V drugem sklopu raziskovalnega dela nas je zanimalo, ali lahko proizvodnjo bioplina povečamo tudi z dodajanjem komercialnih encimksih mešanic MethaPlus L100 in L120 ter Axiase 100. Le-te izražajo celulolitično in ksilanolitično aktivnost in so namenjene povečevanju bioplinske proizvodnje iz lignoceluloznih substratov. Dodajali smo jih v priporočenih, dvojnih, petkratnih in desetkratnih dozah vsak drugi dan. V priporočeni dozi je proizvodnjo metana povečal le Axiase 100 (20-40 %). Z večanjem doze se je povečevala tudi proizvodnja metana. Z aplikativnega vidika pa se s tem veča tudi cena obdelave substrata. Z analizo T-RFLP smo dokazali, da se je v splošnem bakterijska združba spremenjala bolj kot arhejska, pri čemer pa Axiase 100 ni bistveno vplival na bakterijsko združbo.

Dokazali smo, da so lahko biološke obdelave lignoceluloznega substrata po učinku primerljive s fizikalno-kemijskimi in da velja bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T za izredno perspektivno. Proizvodnjo metana lahko povečamo tudi s komercialnimi encimskimi mešanicami. Za določitev optimalnega razmerja med stroškom obdelave substrata in povečanjem izplena metana za aplikacijo v bioplinarsah pa so potrebna nadaljnja testiranja na pilotnem in industrijskem nivoju.

7.2 SUMMARY

Biogas production from lignocellulosic substrates usually results in very low methane yields, therefore it is not a favourable choice of biogas plants. Lignocellulosic substrates consist of cellulose and hemicelluloses which are covered with lignin. This complex structure disables a successful hydrolysis by the hydrolytic enzymes as they cannot reach its substrate. On the other hand, worldwide availability and low price of lignocellulosic wastes make them a very perspective substrate for biogas production. There have been several reports about enhancing anaerobic degradation of lignocellulose in therefore also biogas production by applying a (pre)treatment of lignocellulosic substrate. These can be physical, chemical or biological. Lately lots of research is done on biological substrate pretreatments, which are very perspective because they do not use aggressive chemicals, are environmentally friendly and relatively cheap in contrary to physico-chemical ones.

In our research we have focused on the development of a successful biological method for lignocellulosic substrate treatment to enhance biogas production. We have divided our research into two sectors: first, we have tested several bioaugmentations with anaerobic

hydrolytic bacteria and secondly, we have tested how the additions of commercially available enzyme mixtures influence the biogas activity from lignocellulose. Brewery spent grain was used as a model lignocellulosic substrate and anaerobic microbial biomass from UASB bioreaktor from Wastewater treatment plant Laško as a source of active microorganisms. Screening of known cellulolytic and hemicellulolytic anaerobic bacteria was done before choosing two rumen bacteria (*P. xylanivorans* Mz5^T and *F. succinogenes* S85) and one from a methanogenic bioreactor treating hybrid poplar wood (*C. celulovorans*). Their xylanolytic and cellulolytic activity was measured and the results showed that selected rumen bacteria express high xylanolytic activity and a bit lower cellulolytic activity, while *C. celulovorans* showed to be more successful in degrading cellulose.

The impact of bioaugmenting individual bacteria or cocultures of bacteria on methane production from brewery spent grain was measured by a biochemical methane potential assay. Bacteria for bioaugmentation were grown in inducible M2 medium before the assays to induce their xylanases and cellulases for an accelerated start of hydrolysis in biogas bioreactor. Bacteria were added into laboratory bioreactors (1L) in the amount of 5 % of the bioreactor sludge volume. The assays were run for 30 days in dark at 37 °C and 120 rpm. During the assay we have regularly measured the newly produced biogas, content of methane, pH, chemical oxygen demand and concentration of short-chain fatty acids. The addition of *P. xylanivorans* Mz5^T resulted in best acceleratino of methane production (10-28 %), while the additions of *C. celulovorans* and coculture of *C. celulovorans* with *F. succinogenes* S85 enhanced methane production for about 11 %. Methane production was improved most probably because of the accelerated hydrolysis of the brewery spent grain due to the bioaugmentation. Measurements of acetic acid concentration prove that, as it was detected in highest, but not inhibitory concentrations in bioreactors with added *P. xylanivorans* Mz5^T during the assay.

Results of different molecular fingerprinting techniques for microbial community structure analysis showed that bacterial community changed more during the assays than archaeal. This correlates to the fact that there are a lot more bacteria in biogas bioreactor than archaea and as bacteria conduct the biggest part of the biogas process, they are more adaptable to different changes in their microenvironment than sensitive archaea. T-RFLP results showed that the addition of *P. xylanivorans* Mz5^T, which showed to be the most successful in biogas production enhancement, makes bigger changes in bacterial community in the biogas bioreactor (30-50 %) than other tested bioaugmentations. The only bioaugmentation that influenced on archaeal community was bioaugmentation with *C. celulovorans*, which resulted in up to 50 % changed archaeal community after 30 days of the assays. DGGE helped us to determine the time of survival of the added bacteria in bioreactors. *P. xylanivorans* Mz5^T survived in the bioreactors the longest, almost a week, which is obviously a reason for its successfullness in methane production acceleration. *C. celulovorans* and *F. succinogenes* S85 did not survive in bioreactors more than one day

after the bioaugmentation, which correlates to their lower impact on methane production. qPCR showed that the quantity of genomic DNA of *P. xylanivorans* Mz5^T in the bioreactor is reduced by time. After three days, there was only 55 % of *P. xylanivorans* Mz5^T left and on day 6 after the bioaugmentation only one tenth was present in the bioreactor. It was not detectable anymore on day 10. These results show that continuous addition of *P. xylanivorans* Mz5^T every six days should perform in even better brewery spent grain hydrolysis yields and accelerated methane yields.

In the second part of our research we have tested three commercially available enzyme mixtures MethaPlus L100, L120 and Axiase 100 which express cellulolytic and xylanolytic activity and are designed for acceleration of biogas production from substrates, which also contain lignocellulose. Enzyme mixtures were added in recommended, double, five-times and ten-times bigger dosage every second day. Biochemical methane potential assay results showed that only Axiase 100 is successful in a recommended dosage, accelerating methane production 20-40 %. The impact on accelerating methane production is correlated with dosage enlargements. But from the view of application of the usage of these enzyme mixtures in real biogas plants, the bigger is the dosage, the highest is the substrate pretreatment price. Microbial community analyses showed that bacterial community changed more than archaeal. The most appropriate enzyme mixture for brewery spent grain hydrolysis showed to be Axiase 100, which did not change bacterial nor archaeal community.

Our research showed that biological substrate pretreatment methods can be as successful as physico-chemical ones. Bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T showed to be a very perspective technique for enhancing methane production from brewery spent grain. For similar but relatively more expensive results also Axiase 100 can be applied. Further research at pilot and industrial level is needed for a determination of an optimal ratio between acceleration of methane production and the cost of the substrate pretreatment and its application in biogas plants.

8 VIRI

- Ács N., Kovács E., Wirth R., Bagi Z., Strang O., Herbel Z., Rákely G., Kovács K.L. 2013. Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates. *Bioresource Technology*, 131: 121–7
- Ács N., Bagi Z., Rákely G., Minárovics J., Nagy K., Kovács K.L. 2015. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. *Bioresource Technology*, 186: 286-293
- Ahring B.K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. V: *Biomethanation I*. Ahring B. K., Angelidaki I., de Macario E. C., Gavala H. N., Hofman-Bang J., Macario A. J. L., Oude Elferink S.J.W.H., Raskin L., Stams A.J.M., Westermann P., Zheng D. (eds.). Berlin, Springer: 1-30
- Ahring B.K., Ibrahim A.A., Mladenovska Z. 2001. Effect of temperature increase from 55 to 65°C on performance and microbial population dynamics of an anaerobic reactor treating cattle manure. *Water Research*, 35, 10: 2446–2452
- Ahring B.K., Schmidt J., Winther-Nielsen M., Macario A.J.L., Conway de Macario E. 1993. Effect of medium composition and sludge removal on the production, composition, and architecture of thermophilic (55°C) acetate-utilizing granules from an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 8: 2538–2545
- Akin D.E., Borneman W.S. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science*, 73, 10: 3023–3032
- Angelidaki I., Ahring B.. 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature. *Water Research*, 28, 3: 727–731
- Arantes V., Saddler J.N. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 4: 1–11
- Ariesyady H.D., Ito T., Yoshiguchi K., Okabe S. 2007. Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 3: 673–83
- Axiase 100. Application data sheet. 2012. Delft, DSM Food Specialties B.V. http://www.dsmbiogas.com/uploads/Downloads/AXIASE100_Application%20Data%20Sheet_EN.pdf (14. mar. 2015)
- Bagi Z., Ács N., Bálint B., Horváth L., Dobó K., Perei K.R., Rákely G., Kovács K.L. 2007. Biotechnological intensification of biogas production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 2: 473-482

- Bagudo B.U., Garba B., Dangoggo S.M., Hassan L.G. 2011. The qualitative evaluation of biogas samples generated from selected organic wastes. *Archives of Applied Science Research*, 3, 5: 549–555
- Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Borrusch M.S., Bongers M., Walton J.D. 2010a. Synthetic multi-component enzyme mixtures for deconstruction of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 101, 23: 9097–105
- Banerjee G., Car S., Scott-Craig J.S., Borrusch M.S., Walton J.D. 2010b. Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnology for Biofuels*, 3: 22, doi:10.1186/1754-6834-3-22: 15 str.
- Banerjee G., Scott-Craig J.S., Walton J.D. 2010c. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. *BioEnergy Research*, 3, 1: 82–92
- Barber W.P., Stuckey D.C. 1999. The use of the anaerobic baffled reactor (ABR) for wastewater treatment: a review. *Water Research*, 33, 7: 1559–1578
- Baromètre Biogaz. 2014. Paris, EurObserv'ER S.S. le journal des energies renouvelables.: 12 str.
<http://www.eurobserv-er.org/barometre-biogaz-2014/> (13. jun. 2015)
- Bayer E.A., Chanzy H., Lamed R., Shoham Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8: 548–557
- Bisaria V.S., Ghose T.K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, 3, 2: 90–104
- Blackwood C.B., Marsh T., Kim S.-H., Paul E.A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2: 926–32
- Bochiwal C., Malley C., Chong J.P.J. 2010. Biomethane as an energy source. V: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis K. N. (ed.). Berlin, Springer: 2810–2815
- Boulanger A., Pinet E., Bouix M., Bouchez T., Mansour A.A. 2012. Effect of inoculum to substrate ratio (I/S) on municipal solid waste anaerobic degradation kinetics and potential. *Waste Management*, 32, 12: 2258–2265
- Bowen E.J., Dolfing J., Davenport R.J., Read F.L., Curtis T.P. 2014. Low-temperature limitation of bioreactor sludge in anaerobic treatment of domestic wastewater. *Water Science and Technology*, 69, 5: 1004–1013

- Bruni E., Jensen A.P., Angelidaki I. 2010. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology*, 101, 22: 8713–8717
- Buffiere P., Loisel D., Bemet N., Delgenes J.P. 2006. Toward new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties. *Water Science and Technology*, 53: 233–241
- Bundhoo Z.M.A., Mudhoo A., Mohee R. 2013. Promising unconventional pretreatments for lignocellulosic biomass. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, 20: 2140–2211
- Bustin S.A. 2004. A-Z of Quantitative PCR. 1st. ed. California, International University Line: 910 str.
- Carballa M., Smits M., Etchebehere C., Boon N., Verstraete W. 2011. Correlations between molecular and operational parameters in continuous lab-scale anaerobic reactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 2: 303–14
- Carey C.M., Kirk J.L., Ojha S., Kostrzynska M. 2007. Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 5: 537–50
- Carlsson M., Lagerkvist A., Morgan-Sagastume F. 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: a review. *Waste Management*, 32: 1634–1650
- Chaiprasert P. 2011. Biogas Production from Agricultural Wastes in Thailand. *Journal of Sustainable Energy and Environment*, Special issue: 63–65
- Chandra R.P., Bura R., Mabee W.E., Berlin A., Pan X., Saddler J.N. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108: 67–93
- Collins G., Woods A., McHugh S., Carton M.W., O'Flaherty V. 2003. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, 2: 159–170
- Cord-Ruwisch R., Seitz H.-J., Conrad R. 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology*, 149, 4: 350–357
- Couteaux M.M., Bottner P., Berg B. 1995. Litter decomposition, climate and litter quality. *Tree*, 10, 2: 63–66

Čater M., Fanedl L., Malovrh Š., Marinšek Logar R. 2015. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 186: 261–269

Čater M., Fanedl L., Marinšek Logar R. 2013. Microbial community analyses in biogas reactors by molecular methods. *Acta Chimica Slovenica*, 60, 2: 243–55

Čater M., Zorec M., Marinšek - Logar R. 2014. Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation for enhanced biogas production. *Springer Science Reviews*, 2, 1-2: 51–61

Čepeljnik T. 2005. Multiple ksilanaze vampne bakterije *Pseudobutyrivibrio xylanivorans* Mz5 in možnost njene probiotske uporabe. Doktorska naloga. Biotehniška fakulteta: 103 str.

Čepeljnik T., Zorec M., Kostanjšek R., Nekrep F. V., Marinšek-Logar R. 2003. Is *Pseudobutyrivibrio xylanivorans* strain Mz5T suitable as a probiotic? An *in vitro* study. *Folia Microbiologica*, 48, 3: 339–345

Dashtban M., Schraft H., Qin W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 6: 578–595

Demirbas A. 2008. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 157: 220–229

Demirbas A. 2009. Fuels from biomass. *Biohydrogen: for future engine fuel demands (Green Energy and Technology)*. London, Springer: 43–59

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, 2: 173–190

Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from waste and renewable resources. Weinheim, Nemčija, Wiley-WCH: 578 str.

Divya D., Gopinath L.R., Merlin Christy P. 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42: 690–699

Doi R.H., Tamaru Y. 2001. The Clostridium cellulovorans cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity. *The Chemical Record*, 1: 24-32

Dong X., Plugge C.M., Stams A.J.M. 1994. Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacterium in coculture and triculture with different methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 8: 2834-2838

- Dong X., Engel M., Lopez-Ulibarri R., Schimpf U., Unmack T., Schloter M. 2011. Effects of addition of hydrolytic enzymes and substrate variation on microbial community structures in industrial anaerobic digestion process for production of biogas. V: Proceedings of the 1.st International Conference on Biogas Microbiology, Leipzig, 14.-16. September 2011. Kleinstuber S., Nikolausz M. (eds.). Leipzig, Helmholtz Centre for Environmental Research, Deutsches BiomasseForschungsZentrum gGmbH: 43
- Dressler D., Loewen A., Nelles M. 2012. Life cycle assessment of the supply and use of bioenergy: impact of regional factors on biogas production. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 17, 9: 1104–1115
- Dueholm M.S., Marques I.G., Karst S.M., D'Imperio S., Tale V.P., Lewis D., Nielsen P.H., Nielsen J.L. 2015. Survival and activity of individual bioaugmentation strains. *Bioresource Technology*, 186: 192–9
- Eggeman T., Elander R.T. 2005. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96, 18: 2019–25
- El Fantroussi S., Agathos S.N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8: 268–275
- Eldem N.O., Ozturk I., Soyer E., Calli B., Akgiray O. 2004. Ammonia and pH inhibition in anaerobic treatment of wastewaters, Part I: Experimental. *Journal of environmental science and health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 39, 9: 2405–2420
- Evans C.S., Dutton M. V, Guillen F., Veness R.G. 1994. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 2-3: 235–239
- Fang H.H.P., Liu H. 2002. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technology*, 82, 1: 87–93
- Fedorak P.M., Hrudey S.E. 1986. Anaerobic treatment of phenolic coal conversion wastewater in semicontinuous cultures. *Water Research*, 20, 1: 113–122
- Fontes C.M.G.A., Gilbert H.J. 2010. Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Reviews in Biochemistry*, 79: 655-681
- Fraher M.H., O'Toole P.W., Quigley E.M.M. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews. Gastroenterology and Hepatology*, 9, 6: 312–22

- Franke-Whittle I.H., Confalonieri A., Insam H., Schlegelmilch M., Körner I. 2014. Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Management*, 34, 3: 632–41
- Franke-Whittle I.H., Knapp B.A., Fuchs J., Kaufmann R., Insam H. 2009. Application of COMPOCHIP microarray to investigate the bacterial communities of different composts. *Microbial Ecology*, 57, 3: 510–21
- Freudenberg K., Neish A.C. 1968. Constitution and biosynthesis of lignin. 1st ed., vol. 2. Berlin, Springer: 132 str.
- Gallup J.M., Ackermann M.R. 2006. Addressing fluorogenic real-time qPCR inhibition using the novel custom Excel file system “FocusField2-6GallupqPCRSet-upTool-001” to attain consistently high fidelity qPCR reactions. *Biological Procedures Online*, 8: 87–152
- Gassanova L.G., Netrusov A.I., Teplyakov V.V., Modigell M. 2006. Fuel gases from organic wastes using membrane bioreactors. *Desalination*, 198, 1-3: 56–66
- Ghizzi D., Silva G., Couturier M., Berrin J.G., Buleon A., Rouau X. 2012. Effects of gringind processes on enzymatic degradation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 103, 1: 192–200
- Gilbride K.A., Lee D.-Y., Beaudette L.A. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 1: 1–20
- Glissman K., Chin K.-J., Casper P., Conrad R. 2004. Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: effect of temperature. *Microbial Ecology*, 48, 3: 389–99
- Goud R.K., Sarkar O., Chiranjeevi P., Venkata Mohan S. 2014. Bioaugmentation of potent acidogenic isolates: a strategy for enhancing biohydrogen production at elevated organic load. *Bioresource Technology*, 165: 223–32
- Gouveia J., Plaza F., Garralon G., Fdz-Polanco F., Peña M. 2015. Long-term operation of a pilot scale anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) for the treatment of municipal wastewater under psychrophilic conditions. *Bioresource Technology*, 185: 225–233
- Grabber J.H., Mertens D.R., Kim H., Funk C., Lu F., Ralph J. 2008. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than by lignin composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1: 122–129
- Grosskopf R., Janssen P.H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3: 960–9

- Hansen K.H., Angelidaki I., Ahring B.K. 1998. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Research*, 32, 1: 5–12
- Hansen T.L., Schmidt J.E., Angelidaki I., Marca E., Jansen J. la C., Mosbaek H., Christensen T.H. 2004. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24, 4: 393–400
- Harmsen P., Huijgen W., Bermudez L., Bakker R. 2010. Literature review of physical and chemical pretreatments processes for lignocellulosic biomass. Wageningen, Wageningen UR centre - Food and Biobased Research, Energy Research Centre of the NEtherlands, Abengoa Bioenergia Nuevas Tecnologias: 49 str. <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf> (15. feb. 2015)
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 10: 986–994
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 1: 10–18
- Henrissat B., Teeri T.T., Warren R.A.J. 1998. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*, 452, 2: 352–354
- Herrero M., Stuckey D.C. 2015. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140: 119–128
- Hobson P. 1969. Rumen bacteria. V: Methods in microbiology. 3rd ed. Norris J., Ribbons D. (eds.). New York, Academic Press: 133–149
- Holdeman L. 1977. Anaerobe laboratory manual. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University: 156 str.
- Horiuchi J., Shimizu T., Kanno T., Kobayashi M. 1999. Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemostat culture. *Biotechnology Techniques*, 13, 3: 155–157
- Hu Z.H., Yu H.Q. 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochemistry*, 40: 2371–2377
- Hu Z.H., Yu H.Q. 2006. Anaerobic digestion of cattail by rumen cultures. *Waste Management*, 26: 1222–1228
- Hu Z.H., Yue Z.B., Yu H.Q., Liu S.Y., Harada H., Li Y.Y. 2012. Mechanisms of microwave irradiation pretreatment for enhancing anaerobic digestion of cattail by rumen microorganisms. *Applied Energy*, 93: 229–236

- Huggett J.F., Novak T., Garson J.A., Green C., Morris-Jones S.D., Miller R.F., Zumla A. 2008. Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon. *BMC Research Notes*, 1, 1: 70
- Huige N.J. 1994. Brewery by-products and effluents. V: *Handbook of Brewing*. Hardwick W. A. (ed.). New York, Marcel Dekker: 501–550
- Hyeon J.E., Jeon S.D., Han S.O. 2013. Cellulosome-based, Clostridium-derived multifunctional enzyme complexes for advanced biotechnology tool development: advances and applications. *Biotechnology Advances*, 31, 6: 936–944
- Imai M., Ikari K., Suzuki I. 2004. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 2: 79–83
- Isroi I., Millati R., Syamsiah S., Miklasson C., Cahyanto M.N., Lundquist K., Taherzadeh M.J. 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*, 6, 4: 5224–5259
- Iyagba E.T., Mangibo I.A., Sayyadi Mohammad Y. 2009. The study of cow dung as co-substrate with rice husk in biogas production. *Scientific Research and Essay*, 4: 861–866
- Jaenicke S., Ander C., Bekel T., Bisdorf R., Dröge M., Gartemann K.-H., Jünemann S., Kaiser O., Krause L., Tille F., Zakrzewski M., Pühler A., Schlüter A., Goesmann A. 2011. Comparative and joint analysis of two metagenomic datasets from a biogas fermenter obtained by 454-pyrosequencing. *PLoS ONE*, 6, 1: e14519, doi: 10.1371/journal.pone.0014519: 15 str.
- Jana S.K., Ghosh V.K., Singh A. 1994. Production and hydrolytic potential of cellulase enzymes from a mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 20, 2: 233–239
- Juntarasiri P., Nijsunkij S., Buatick T., Jamkrajang E., Wacharawichanan S., Seadan M., Wasantakorn A., Suttiprueengwong S. 2011. Enhancing Biogas Production from Padauk Angsana Leave and Wastewater Feedstock through Alkaline and Enzyme Pretreatment. *Energy Procedia*, 9: 207–215
- Kampmann K., Ratering S., Baumann R., Schmidt M., Zerr W., Schnell S. 2012. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Systematic and Applied Microbiology*, 35, 6: 404–13
- Kanauchi O., Mitsuyama K., Araki Y. 2001. Development of a functional germinated barley foodstuff for brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 59: 59–62

- Karlsson A., Einarsson P., Schnurer A., Sundberg C., Ejlersson J., Svensson B.H. 2012. Impact of trace element addition on degradation efficiency of volatile fatty acids, oleic acid and phenyl acetate and on microbial populations in a biogas digester. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 4: 446–452
- Keller-Reinspach H.W. 1992. Residues and wastes from brewery plants, possibilities for recycling and disposal. *Brauwelt International*, 3: 287–293
- Khan A.A., Mehrotra I., Kazmi A.A. 2015. Sludge profiling at varied organic loadings and performance evaluation of UASB reactor treating sewage. *Biosystems Engineering*, 131: 32–40
- Khanal S.K. 2008a. Anaerobic reactor configurations for bioenergy production. V: *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. Khanal S. K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 93–114
- Khanal S.K. 2008b. Microbiology and biochemistry of anaerobic biotechnology. V: *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. Khanal S. K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 29–41
- Khemkha M., Techkarnjanaruk S., Phalakornkule C. 2015. Simultaneous treatment of raw palm oil mill effluent and biodegradation of palm fiber in a high-rate CSTR. *Bioresource Technology*, 177: 17–27
- Khidzir K.M., Noorlidah A., Agamuthu P. 2010. Brewery spent grain: chemical characteristics and utilization as an enzyme substrate. *Malaysian Journal of Science*, 29, 1: 41-51
- Kim J., Lim J., Lee C. 2013. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances*, 31: 1358–1373
- Kim J., Park C., Kim T.-H., Lee M., Kim S., Kim S.-W., Lee J. 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 3: 271–275
- Kim M., Ahn Y.-H., Speece R.. 2002. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Research*, 36, 17: 4369–4385
- Kim S.G., Matsui S., Pareek S., Shimizu Y. 1998. Biodegradation of recalcitrant organic matters under sulfate reducing and methanogenic conditions in the municipal solid waste landfill: continuous experiments. *Journal of the Japan Society of Waste Management Experts*, 9, 79-86
- Kisand V., Wikner J. 2003. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods*, 54, 2: 183–191

- Klocke M., Nettmann E., Bergmann I., Mundt K., Souidi K., Mumme J., Linke B. 2008. Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 3: 190–205
- Ko J.J., Shimizu Y., Ikeda K., Kim S.K., Park C.H., Matsui S. 2009. Biodegradation of high molecular weight lignin under sulfate reducing conditions: lignin degradability and degradation by-products. *Bioresource Technology*, 100: 1622–1628
- Kopečny J. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrivibrio xylovorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1: 201–209
- Kosugi A., Murashima K., Doi R.H. 2002. Xylanase and acetyl xylan esterase activities of XynA, a key subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome for xylan degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 12: 6399–402
- Krause L., Diaz N.N., Edwards R.A., Gartemann K.-H., Krömeke H., Neuweger H., Pühler A., Runte K.J., Schlueter A., Stoye J., Szczepanowski R., Tauch A., Goesmann A. 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-producing microbial community isolated from a biogas reactor. *Journal of biotechnology*, 136, 1-2: 91–101
- Krishania M., Vijay V.K., Chandra R. 2013. Methane fermentation and kinetics of wheat straw pretreated substrates co-digested with cattle manure in batch assay. *Energy*, 57: 359–367
- Kröber M., Bekel T., Diaz N.N., Goesmann A., Jaenicke S., Krause L., Miller D., Runte K.J., Viehöver P., Pühler A., Schlueter A. 2009. Phylogenetic characterization of a biogas plant microbial community integrating clone library 16S-rDNA sequences and metagenome sequence data obtained by 454-pyrosequencing. *Journal of Biotechnology*, 142, 1: 38–49
- Kumar R., Singh S., Singh O. V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 377–391
- Kuo W.-C., Chao Y.-C., Wang Y.-C., Cheng S.-S. 2012. Bioaugmentation strategies to improve cellulolytic and hydrogen producing characteristics in CSTR intermittent fed with vegetable kitchen waste and napiergrass. *Energy Procedia*, 29: 82-91
- Labatut R.A., Angenent L.T., Scott N.R. 2011. Biochemical methane potential and biodegradability of complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 102, 3: 2255–2264
- Lee D.H., Behera S.K., Kim J.W., Park H.-S. 2009. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab-scale study. *Waste Management*, 29, 2: 876–82

- Lee M., Hidaka T., Hagiwara W., Tsuno H. 2009. Comparative performance and microbial diversity of hyperthermophilic and thermophilic co-digestion of kitchen garbage and excess sludge. *Bioresource Technology*, 100, 2: 578–85
- Lettinga G., Hulshoff Pol L.W. 1991. UASB-process design for various types of wastewaters. *Water Science and Technology*, 24: 87-107
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analytical Biochemistry*, 81, 1: 21–27
- Lin C.-Y. 1992. Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Research*, 26, 2: 177–183
- Lissens G., Verstraete W., Albrecht T., Brunner G., Creuly C., Seon J., Dussap G., Lasseur C. 2004. Advanced anaerobic bioconversion of lignocellulosic waste for bioregenerative life support following thermal water treatment and biodegradation by *Fibrobacter succinogenes*. *Biodegradation*, 15, 3: 173-183
- Liu Y., Beer L.L., Whitman W.B. 2012. Methanogens: a window into ancient sulfur metabolism. *Trends in Microbiology*, 20, 5: 251–258
- Lopretti M.I., Mathias A.L., Rodrigues A.E. 1993. Activity of ligninase peroxidase from *Acinetobacter anitratus* and the degradation of *Pinus pinaster* lignin. *Process Biochemistry*, 28, 8: 543–547
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 1: 265–275
- Lü F., Ji J., Shao L., He P. 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 92
- Lynd L.R., Weimer P.J., Zyl W.H., S P.I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577
- Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190–212
- Mackie R.I., Bryant M.P. 1981. Metabolic Activity of Fatty Acid-Oxidizing Bacteria and the Contribution of Acetate, Propionate, Butyrate, and CO₂ to Methanogenesis in Cattle Waste at 40 and 60 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 6: 1363–1373
- Mackuľák T., Prousek J., Švorc L., Drtil M. 2012. Increase of biogas production from pretreated hay and leaves using wood-rotting fungi. *Chemical Papers*, 66, 7

- Macleod A.M. 1979. The physiology of malting. V: Brewing Science. Vol. 1. Pollock J. R. A. (ed.). New York, Academic Press: 145–232
- Madsen T., Rasmussen H.B., Nilsson L. 1995. Anaerobic biodegradation potentials in digested sludge, a freshwater swamp and a marine sediment. Chemosphere, 31, 10: 4243–4258
- Malin C., Illmer P. 2008. Ability of DNA content and DGGE analysis to reflect the performance condition of an anaerobic biowaste fermenter. Microbiological Research, 163, 5: 503–11
- Mao C., Feng Y., Wang X., Ren G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 45: 540–555
- Marinšek Logar R. 1992. Vpliv razdalje med sintrofnimi partnerji na metanogeno aktivnost v modelnih alginatnih kroglicah. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Medicinska fakulteta: 224 str.
- McGenity T.J. 2010. Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. V: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Timmis K. N. (ed.). Berlin, Springer: 665–680
- McKeown R.M., Scully C., Mahony T., Collins G., O'Flaherty V. 2009. Long-term (1,243 days), low-temperature (4–15 degrees C), anaerobic biotreatment of acidified wastewaters: bioprocess performance and physiological characteristics. Water Research, 43, 6: 1611–1620
- Menon V., Rao M. 2012. Trends in bioconversion of lignocelluloses: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Progress in Energy and Combustion Science, 38, 4: 522–550
- Merlin C.P., Gopinath L.R., Divya D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 34: 167–173
- Mes-Hartree M., Yu E.K.C., Reid I.D., Saddler J.N. 1987. Suitability of aspenwood biologically delignified with Pheblia tremellosum for fermentation of ethanol or butanediol. Applied Microbiology and Biotechnology, 26, 2: 120–125
- MethaPlus L100. Application data sheet. 2012. Delft, DSM Food Specialties B.V. http://www.dsmbiogas.com/uploads/Downloads/Methaplus%20L100_Application%20Data%20Sheet_EN.pdf (5. maj 2015)
- MethaPlus L120. Product data sheet. 2011. Delft, DSM Food Specialties B.V. http://www.dsmbiogas.com/uploads/Downloads/Methaplus%20L120_Application%20Data%20Sheet_EN.pdf (4. mar. 2015)

- Meyer A.S., Rosgaard L., Sorensen H.R. 2009. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *Journal of Cereal Science*, 50, 3: 337–344
- Mohan S.V., Rao N.C., Prasad K.K., Sarma P.N. 2005. Bioaugmentation of an anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) with immobilized sulphate reducing bacteria (SRB) for the treatment of sulphate bearing chemical wastewater. *Process Biochemistry*, 40, 8: 2849–2857
- Mok W.S., Antal M.J.J. 1992. Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 31, 4: 1157–1161
- Monlau F., Barakat A., Trably E., Dumas C., Steyer J.P., Carrère H. 2013. Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43, 3: 260–322
- Montgomery L., Flesher B., Stahl D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38: 430–435
- Morris D.D., Reeves R.A., Gibbs M.D., Saul D.J., Bergquist P.L. 1995. Correction of the b-mannanase domain of the cell C pseudogene from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and activity of the gene product on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2262–2269
- Mussatto S.I., Roberto I.C. 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 268–274
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695–700
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 1: 127–41
- Naik L., Gebreegziabher Z., Tumwesige V., Balana B.B., Mwirigi J., Austin G. 2014. Factors determining the stability and productivity of small scale anaerobic digesters. *Biomass and Bioenergy*, 70: 51–57
- Nie Y., Liu H., Du G., Chen J. 2007. Enhancement of acetate production by a novel coupled syntrophic acetogenesis with homoacetogenesis process. *Process Biochemistry*, 42: 599–605

- Nielsen B., Uellendahl H., Ahring B.K. 2007. Regulation and optimization of the biogas process: Propionate as a key parameter. *Biomass and Bioenergy*, 31, 11-12: 820–830
- Niemenmaa O. 2008. Monitoring of fungal growth and degradation of wood. Academic Dissertation. Helsinki, University of Helsinki: 73 str.
- Nizami A.S., Korres N.E., Murphy J.D. 2009. Review of the integrated process for the production of grass biomethane. *Environmental Science and Technology*, 43: 8496–8508
- O'Brien R.W., Morris J.G. 1971. Oxygen and growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of General Microbiology*, 68: 307-318
- O'Connor R.P., Woodley R., Kolstad J.J., Kean R., Glassner D.A., Mastel B., Ritzenthaler J.M., John H., Warwick J., Hettenhaus J.R., Brooks R.K. 2009. Process for fractionating lignocellulosic biomass into liquid and solid products. US patent application US20090176286: 20 str.
- Osborn A.M., Moore E.R., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39–50
- Owen W.F., Stuckey D.C., Healy J.B., Young L.Y., McCarty P.L. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13, 6: 485–492
- Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 1: 25–33
- Parawira W. 2011. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 2: 172-186
- Parawira W. 2012. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 2: 172–186
- Pareek S., Azuma J.I., Matsui S., Shimizu Y. 2001. Degradation of lignin and lignin model compound under sulfate reducing conditions. *Water Science and Technology*, 44: 351–358
- Patel P., Patel C., Madamwar D. 1999. Anaerobic Upflow Fixed-Film Bioreactor for Biomethanation of Salty Cheese Whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 76, 3: 193–202
- Patterson T., Esteves S., Dinsdale R., Guwy A. 2011. Life cycle assessment of biogas infrastructure options on a regional scale. *Bioresource Technology*, 102, 15: 7313–23

- Peng J., Lü Z., Rui J., Lu Y. 2008. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 9: 2894–901
- Peng X., Aragão Börner R., Achu Nges I., Liu J. 2014. Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*. *Bioresource Technology*, 152: 567-571
- Petersen S.P., Ahring B.K. 1991. Acetate oxidation in a thermophilic anaerobic sewage-sludge digestor: the importance of non-aceticlastic methanogenesis from acetate. *FEMS Microbiology Ecology*, 9, 2: 149–157
- Pind P.F., Angelidaki I., Ahring B.K., Stamatelatou K., Lyberatos G. 2003. Monitoring and control of anaerobic reactors. V: Advances in biochemical engineering/biotechnology. Scheper T. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 135–182
- Polizeli M.L.T.M., 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: 577–591
- Prates J.A.M., Tarbouriech N., Charnock S.J., Fontes C.M.G.A., Ferreira L.M.A., Davies G.J. 2001. The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition. *Structure*, 9, 12: 1183–1190
- Ramos L.P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26, 6: 863–871
- Rasi S., Veijanen A., Rintala J. 2007. Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy*, 32, 8: 1375–1380
- Rincón B., Borja R., González J.M., Portillo M.C., Sáiz-Jiménez C. 2008. Influence of organic loading rate and hydraulic retention time on the performance, stability and microbial communities of one-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid residue. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 2: 253–261
- Rivera-Slavador V., López-Cruz I.I., Espinosa-Solares T., Aranda-Barradas J.S., Huber D.H., Sharma D., Toledo J.U. 2014. Application of anaerobic digestion model No. 1 to describe the syntrophic acetate oxidation of poultry litter in thermophilic anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 167: 495-502
- Russ W., Mortel H., Meyer-Pittroff R. 2005. Application of spent grains to increase porosity in bricks. *Construction and Building Materials*, 19: 117–126
- Saha B.C. 2000. Alpha-L-arabinofuranosidases - biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 403–423

- Sanchez C. 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185–194
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2006. 22nd ed. Washington, D.C., American Public Health Association, American Water Works Association and W.E.F.
- Saravanane R., Murthy D.V., Krishnaiah K. 2001. Bioaugmentation and treatment of cephalexin drug-based pharmaceutical effluent in an upflow anaerobic fluidized bed system. *Bioresource Technology*, 76, 3: 279–281
- Schink B. 1992. Syntrophism among prokaryotes. V: The prokaryotes. Balows A., Truper H., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 276
- Schlüter A., Bekel T., Diaz N.N., Dondrup M., Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Krahn I., Krause L., Krömeke H., Kruse O., Mussgnug J.H., Neuweger H., Niehaus K., Pühler A., Runte K.J., Szczepanowski R., Tauch A., Tilker A., Viehöver P., Goesmann A. 2008. The metagenome of a biogas-producing microbial community of a production-scale biogas plant fermenter analysed by the 454-pyrosequencing technology. *Journal of Biotechnology*, 136, 1-2: 90
- Schnürer A., Houwen F., Svensson B. 1994. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Archives of Microbiology*, 162: 70-74
- Schriewer A., Wehlmann A., Wuertz S. 2011. Improving qPCR efficiency in environmental samples by selective removal of humic acids with DAX-8. *Journal of Microbiological Methods*, 85, 1: 16–21
- Sežun M. 2011. Razvoj procesa učinkovite proizvodnje bioplina iz lignoceluloznih substratov. Doktorska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 112 str.
- Sežun M., Grilc V., Zupančič G.D., Marinšek - Logar R. 2011. Anaerobic digestion of brewery spent grain in a semi-continuous bioreactor: inhibition by phenolic degradation products. *Acta Chimica Slovenica*, 58, 1: 158–166
- Sleat R., Mah R.A., Robinson R. 1984. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 1: 88–93
- Smith C.J., Osborn A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67: 6–20
- Speece R. 1996. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, Archæe Press: 416 str.

- Stewart C., Flint H. 1989. *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30: 433-439
- Storz G., Tartaglia L.A., Farr S.B., Ames B.N. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in Genetics*, 6: 363-368
- Suen G., Weimer P.J., Stevenson D.M., Aylward F.O., Boyum J., Deneke J., Drinkwater C., Ivanova N.N., Mikhailova N., Chertkov O., Goodwin L.A., Currie C.R., Mead D., Brumm P.J. 2011. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *PLoS ONE*, 6, 4: e18814, doi: 10.1371/journal.pone.0018814: 15 str.
- Sundberg C., Abu Al-Soud W., Larsson M., Svensson B., Sorensson S., Karlsson A. 2011. 454-pyrosequencing analyses of bacterial and metagenomic Archaea DNA and RNA diversity in 20 full-scale biogas digesters. V: *Proceedings of the First International Conference on Biogas Microbiology: 14–16 September 2011, Leipzig*. Kleinstreuber S., Nikolausz M. (eds.). Leipzig, UFZ Press: 47
- Sung S., Liu T. 2003. Ammonia inhibition on thermophilic anaerobic digestion. *Chemosphere*, 53, 1: 43–52
- Sunna A., Gibbs M.D., Chin C.W., Nelson P.J., Bergquist P.L. 2000. A gene encoding a novel multidomain beta-1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2: 664–70
- Take H., Andou Y., Nakamura Y., Kobayashi F., Kurimoto Y., Kuwahara M. 2006. Production of methane gas from Japanese cedar chips pretreated by various delignification methods. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 1: 30–35
- Taylor B.F., Campbell W.L., Chinoy I. 1970. Anaerobic degradation of the benzene nucleus by a facultatively anaerobic microorganism. *Journal of Bacteriology*, 102: 430–437
- Tedesco S., Marrero Barroso T., Olabi A.G. 2014. Optimization of mechanical pre-treatment of Laminariaceae spp. biomass-derived biogas. *Renewable Energy*, 62: 527–534
- Thiele J.H., Zeikus J.G. 1988. Interactions between hydrogen- and formate-producing bacteria and methanogens during anaerobic digestion. V: *Handbook on anaerobic fermentation*. Erickson L. E., Fung D. Y. (eds.). New York, Marcel Dekker: 537-595
- Thomas L., Joseph A., Gottumukkala L.D. 2014. Xylanase and cellulase systems of *Clostridium* sp.: an insight on molecular approaches for strain improvement. *Bioresource Technology*, 158: 343–50

- Thornton B., Basu C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39, 2: 145–154
- Traversi D., Villa S., Acri M., Pietrangeli B., Degan R., Gilli G. 2011. The role of different methanogen groups evaluated by Real-Time qPCR as high-efficiency bioindicators of wet anaerobic co-digestion of organic waste. *AMB Express*, 1: 28, doi:10.1186/2191-0855-1-28: 7 str.
- Traversi D., Villa S., Lorenzi E., Degan R., Gilli G. 2012. Application of real-time qPCR method to measure the methanogen concentration during anaerobic digestion as an indicator of biogas production capacity. *Journal of Environmental Management*, 111: 173–177
- Triolo J.M., Pedersen L., Qu H., Sommer S.G. 2012. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresource Technology*, 125: 226–232
- Tsavkelova E.A., Netrusov A.I. 2012. Biogas production from cellulose-containing substrates: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 5: 421–433
- Uçkun Kiran E., Trzciński A.P., Ng W.J., Liu Y. 2014. Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*, 134: 389–399
- Uellendahl H., Wang G., Moller H.B., Jorgensen U., Skiadas I. V, Gavala H.N., Ahring B.K. 2008. Energy balance and cost-benefit analysis of biogas production from perennial energy crops pretreated by wet oxidation. *Water Science and Technology*, 58: 1841–1847
- van den Berg L., Kennedy K., Samson R. 1985. Anaerobic Downflow Stationary Fixed Film Reactors: Performance Under Steady-State and Non-Steady State Conditions. *Water Science and Technology*, 17, 1: 89–102
- van Dyk J.S., Pletschke B.I. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30, 6: 1458–1480
- Vavilin V.A., Rytov S. V, Lokshina L.Y. 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*, 56, 2-3: 229–237
- Verstraete W. 2010. Biogas-based sustainable bio-economy. V: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis K. N. (ed.). Berlin, Springer: 3333–3336
- Vervaeren H., Hostyn K., Ghekiere G., Willemans B. 2010. Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renewable Energy*, 35, 9: 2089–2093

- Vivekanandan S., Kamaraj G. 2011. The study of biogas production from rice chaff (karukka) as co-substrate with cow dung. Indian Journal of Science and Technology, 4, 6: 657-659
- Volta A. 1777. Lettere del signor don Alessandro Volta ... sull'aria infiammabile nativa delle paludi. Milano, Italija, Guiseppe Marelli: 147 str.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1: 297–303
- Wang X., Lu X., Li F., Yang G. 2014. Effects of temperature and carbon-nitrogen (C/N) ratio on the performance of anaerobic co-digestion of dairy manure, chicken manure and rice straw: focusing on ammonia inhibition. PLoS ONE, 9, 5: e97265, doi: 10.1371/journal.pone.0097265: 7 str.
- Wang Y., Liu Q., Yan L., Gao Y., Wang Y., Wang W. 2013. A novel lignin degradation bacterial consortium for efficient pulping. Bioresource Technology, 139: 113–119
- Ward A.J., Hobbs P.J., Hooliman P.J., Jones D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresource Technology, 99, 17: 7928–7940
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173, 2: 697–703
- Westerholm M., Levén L., Schnürer A. 2012. Bioaugmentation of syntrophic acetate-oxidizing culture in biogas reactors exposed to increasing levels of ammonia. Applied and Environmental Microbiology, 78, 21: 7619–25
- Westermann P. 1996. Temperature regulation of anaerobic degradation of organic matter. World Journal of Microbiology and biotechnology, 12, 5: 497–503
- Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and Environmental Microbiology, 63, 10: 3741–51
- Woods D.R., Jones D.T. 1986. Physiological responses of *Bacteroides* and *Clostridium* strains to environmental stress factors. Advances in Microbial Physiology, 28: 1-64
- Worm P., Fermoso F.G., Lens P.N.L., Plugge C.M. 2009. Decreased activity of a propionate degrading community in a UASB reactor fed with synthetic medium without molybdenum, tungsten and selenium. Enzyme and Microbial Technology, 45, 2: 139–145
- Xing J., Criddle C., Hickey R. 1997. Effects of a long-term periodic substrate perturbation on an anaerobic community. Water Research, 31, 9: 2195–2204

- Xu F., Chen H., Li Z. 2001. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, 80: 149–151
- Yadava L.S., Hesse P.R. 1981. The development and use of biogas technology in rural areas of Asia (a status report 1981). Improving soil fertility through organic recycling. Rome, Food and Agriculture Organization (FAO), United Nations Development Program (UNEP)
- Yan L., Gao Y., Wang Y., Liu Q., Sun Z., Fu B., Wen X., Cui Z., Wang W. 2012. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresource Technology*, 111: 49–54
- Yue Z.-B., Li W.-W., Yu H.-Q. 2013 Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 128: 738-744
- Zakrzewski M., Goesmann A., Jaenicke S., Jünemann S., Eikmeyer F., Szczepanowski R., Al-Soud W.A., Sørensen S., Pühler A., Schlüter A. 2012. Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing. *Journal of Biotechnology*, 158, 4: 248–58
- Zeikus J.G., Wellstein A.L., Kirk T.K. 1982. Molecular basis for the biodegradative recalcitrance of lignin in anaerobic environments. *FEMS Microbiology Letters*, 15, 3: 193–197
- Zemek J., Košíková B., Augustín J., Joniak D. 1979. Antibiotic properties of lignin components. *Folia Microbiologica*, 24, 6: 483–486
- Zeshan K.O.P., Visvanathan C. 2012. Effect of C/N ratio and ammonia-N accumulation in a pilot-scale thermophilic dry anaerobic digester. *Bioresource Technology*, 113: 294–302
- Zhang P., Chen Y., Zhou Q. 2009. Waste activated sludge hydrolysis and short-chain fatty acids accumulation under mesophilic and thermophilic conditions: effect of pH. *Water Research*, 43, 15: 3735–42
- Zhang Q., Yan X., Zhang L., Tang W. 2006. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of a β -mannanase gene from *Bacillus subtilis* Z-2. *Molecular Biology*, 40, 3: 368–374
- Zhang Y.H.P., Lynd L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 7: 797–824

- Zhao H., Li J., Li J., Yuan X., Piao R., Zhu W., Li H., Wang X., Cui Z. 2013. Organic loading rate shock impact on operation and microbial communities in different anaerobic fixed-bed reactors. *Bioresouce Technology*, 140: 211–9
- Zhong W., Zhang Z., Luo Y., Sun S., Qiao W., Xiao M. 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresouce Technology*, 102, 24: 11177–82
- Zielińska M., Cydzik-Kwiatkowska A., Zieliński M., Dębowski M. 2013. Impact of temperature, microwave radiation and organic loading rate on methanogenic community and biogas production during fermentation of dairy wastewater. *Bioresouce Technology*, 129: 308–14
- Ziemiński K., Romanowska I., Kowalska M. 2012. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Management*, 32, 6: 1131–1137
- Zimmermann W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13, 2-3: 119–130
- Zinder S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens. V: Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics. Ferry J. (ed.). New York, Chapman and Hall: 128-206
- Zupančič G.D., Skrjanec I., Logar R.M. 2012. Anaerobic co-digestion of excess brewery yeast in a granular biomass reactor to enhance the production of biomethane. *Bioresouce Technology*, 124: 328–337

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar se najlepše zahvaljujem za številne diskusije ob raziskovalnem delu, pomoč pri usmerjanju raziskav in za vse spodbude pri pisanku člankov in disertacije ter na sodelovanjih na kongresih.

Hvala tehničnima sodelavcama Marti Majdič in dr. Luki Lipoglavšku, asistentkam dr. Lijani Fanedl, dr. Maši Zorec, doc. dr. Maši Vodovnik in asistentu doc. dr. Tomažu Accettu, sodelavcem dr. Katji Gorenc, Robiju Šketu, Brigit Nograšek in nenazadnje prof. dr. Gorazdu Avguštinu za priložnostne diskusije o raziskovalnih zagatah, življenjskih modrostih in prijetne trenutke ob kavi ali krofu.

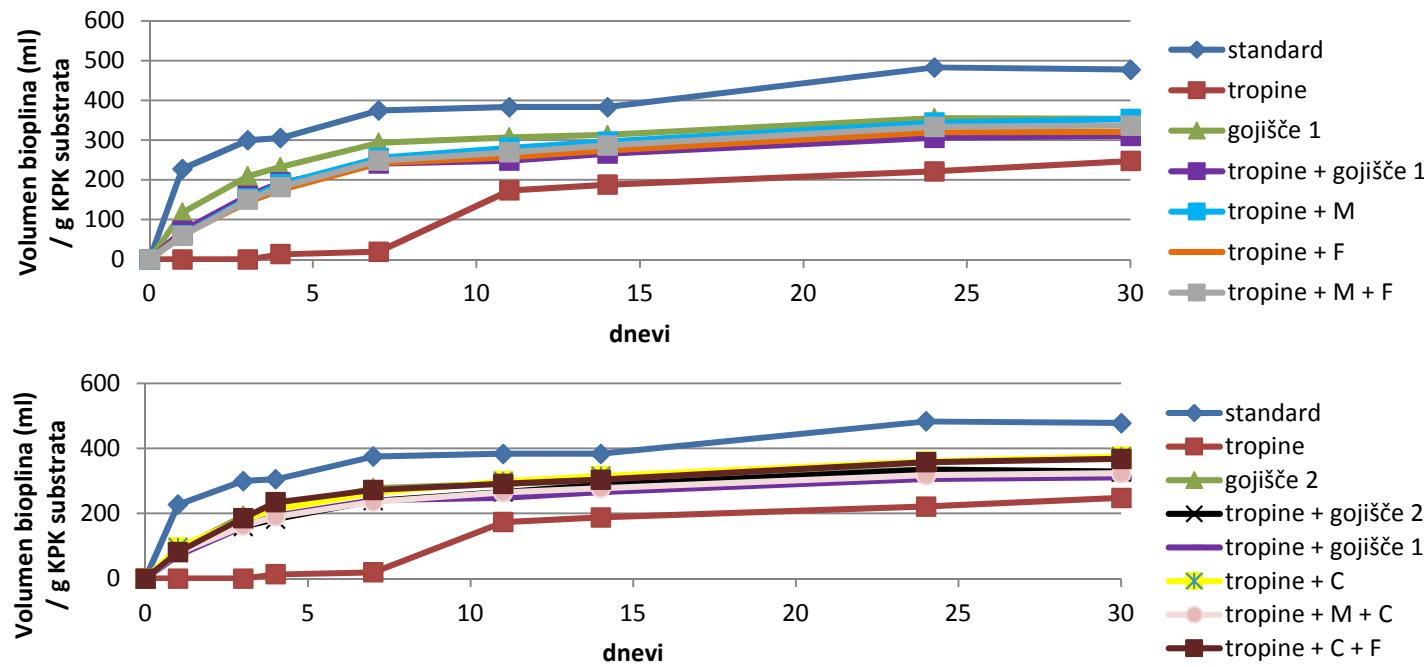
Zahvaljujem se tudi Tatjani Sivka in Jeleni Zurc, ki sta vedno ekspresno hitro obdelali podatke na sekvenatorju, in doc. dr. Špeli Malovrh za statistično obdelavo rezultatov. Maji Petje in Benjaminu Drakslarju pa se najlepše zahvaljujem za vso pomoč v laboratoriju.

Hvaležna sem prof. dr. Gregorju Zupančiču za sodelovanje in omogočeno možnost raziskovanja na pilotnem nivoju, Mladenu Franju in zaposlenim na Čistilni napravi Laško pa za tehnično pomoč.

Hvala vsem prijateljicam in prijateljem za vzpodbujanje vztrajnosti in večno podporo ter družini, ki se je z mano veselila vsakega dosežka in pomembnega dogodka. Izredno ponosna sem na sina Tomaža, ki mi je s svojo pridnostjo in razumevanjem omogočil enostavno opravljanje ne le doktorskega študija in raziskovalnega dela, ampak tudi sproščeno pisanje disertacije.

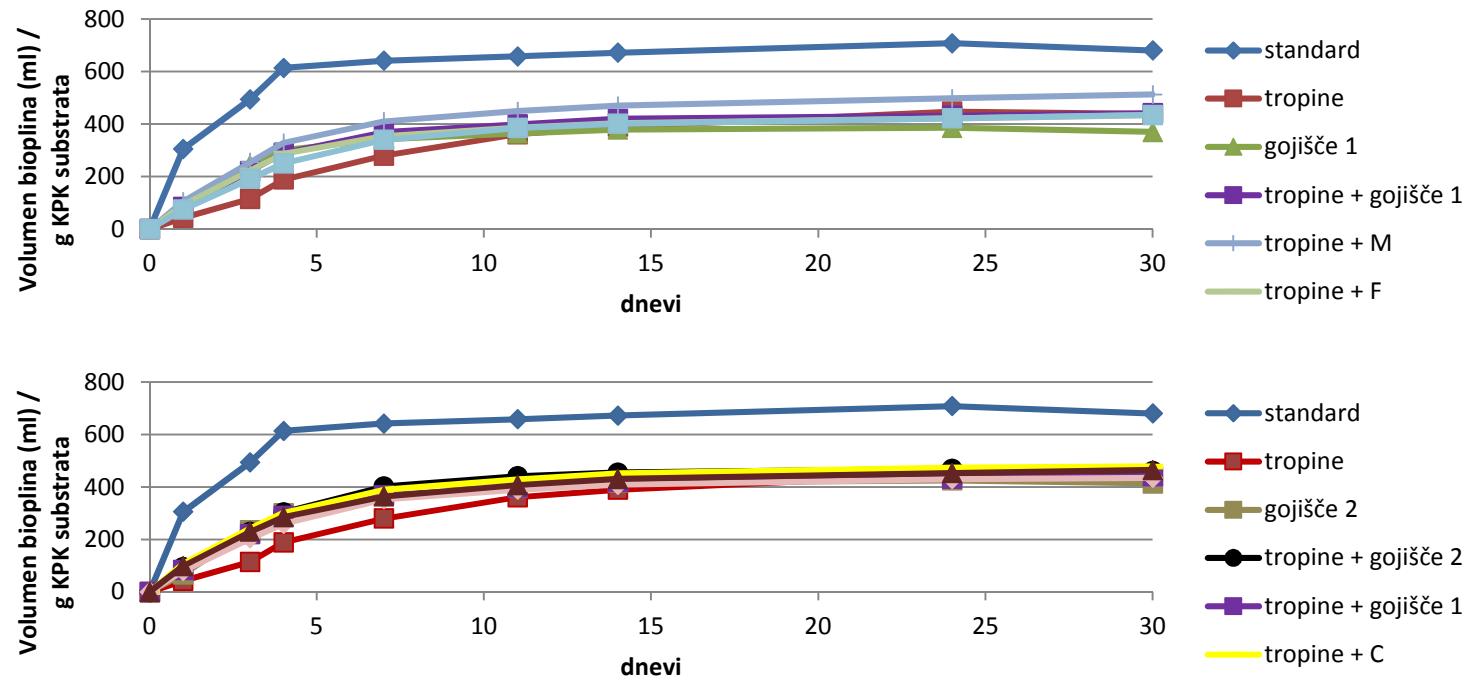
Priloga A

Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami



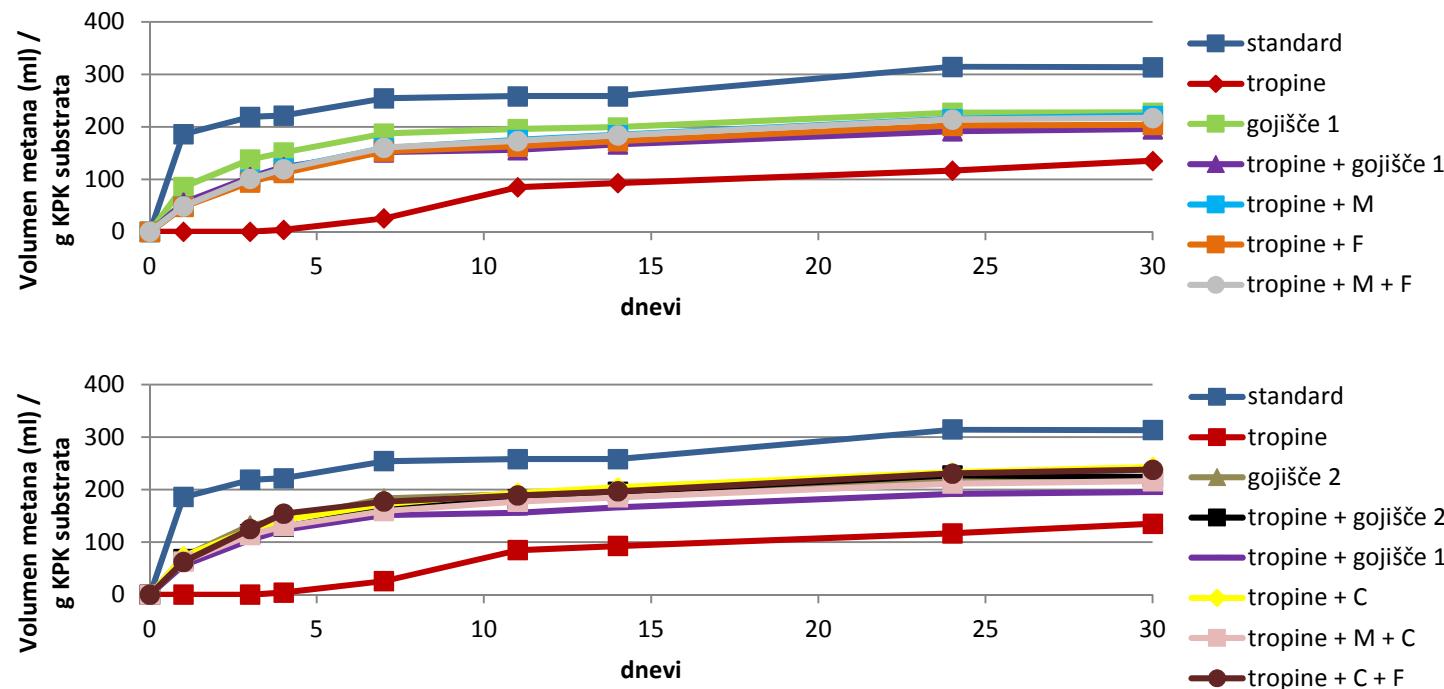
Priloga A1: Nastajanje bioplina na g KPK_{substrata} v času testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, zgoraj: bioreaktorji z gojiščem 1, spodaj: bioreaktorji z gojiščem 2 ali mešanico gojišč 1 in 2.

Annex A1: Biogas production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures– I. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, upper graph: bioreactors containing medium 1, lower graph: bioreactors containing medium 2 or a mixture of media 1 and 2.



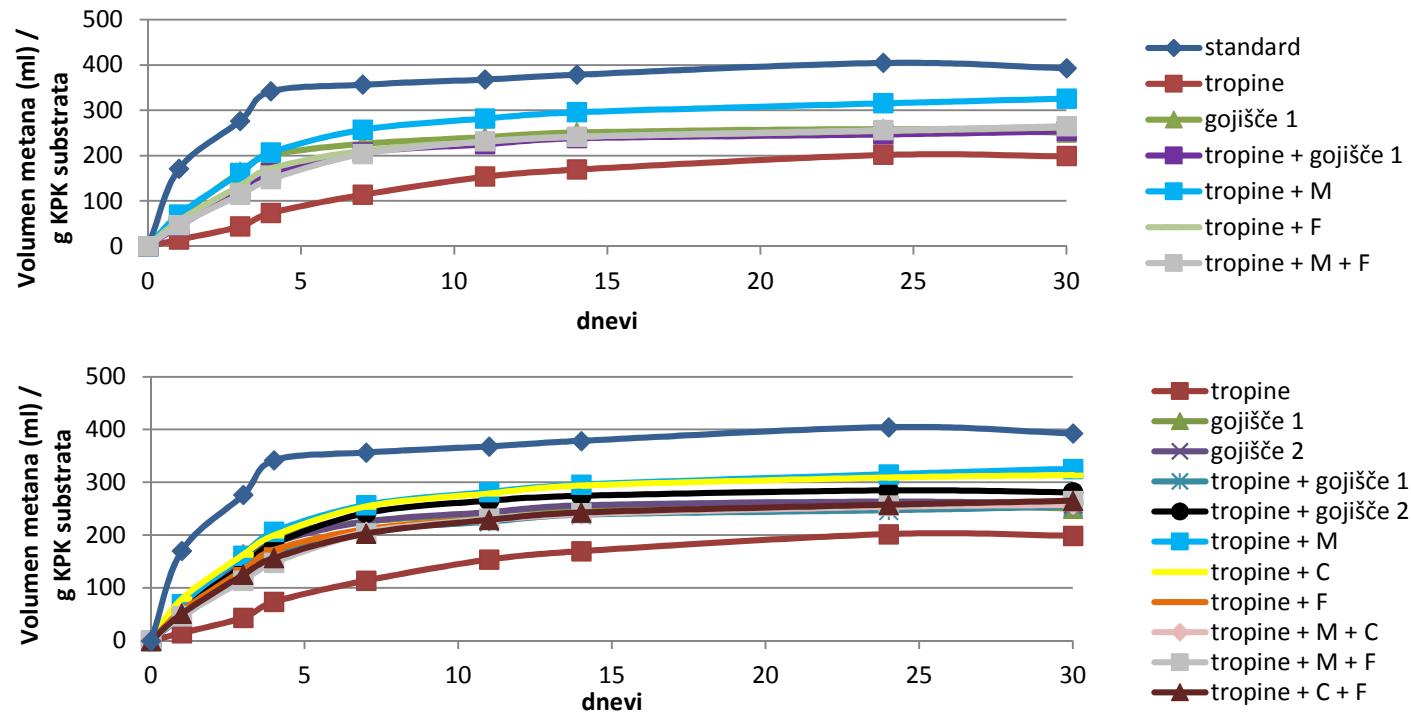
Priloga A2: Nastajanje bioplina na g KPK_{substrata} v času testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, zgoraj: bioreaktorji z gojiščem 1, spodaj: bioreaktorji z gojiščem 2 ali mešanico gojišča 1 in 2.

Annex A2: Biogas production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, upper graph: bioreactors containing medium 1, lower graph: bioreactors containing medium 2 or a mixture of medium 1 and 2.



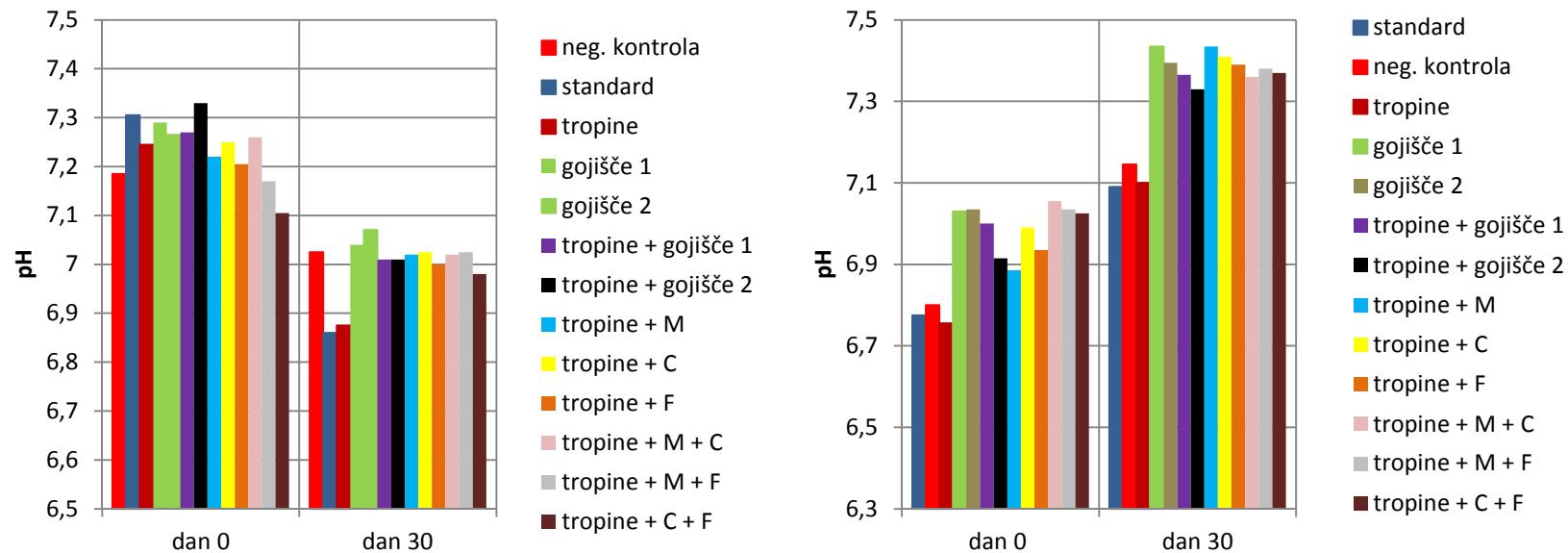
Priloga A3: Nastajanje metana na g KPK_{substrata} v času testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, zgoraj: bioreaktorji z gojiščem 1, spodaj: bioreaktorji z gojiščem 2 ali mešanico gojišč 1 in 2.

Annex A3: Methane production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – I. Upper graph: bioreactors containing medium 1, lower graph: bioreactors containing medium 2 or a mixture of media 1 and 2.

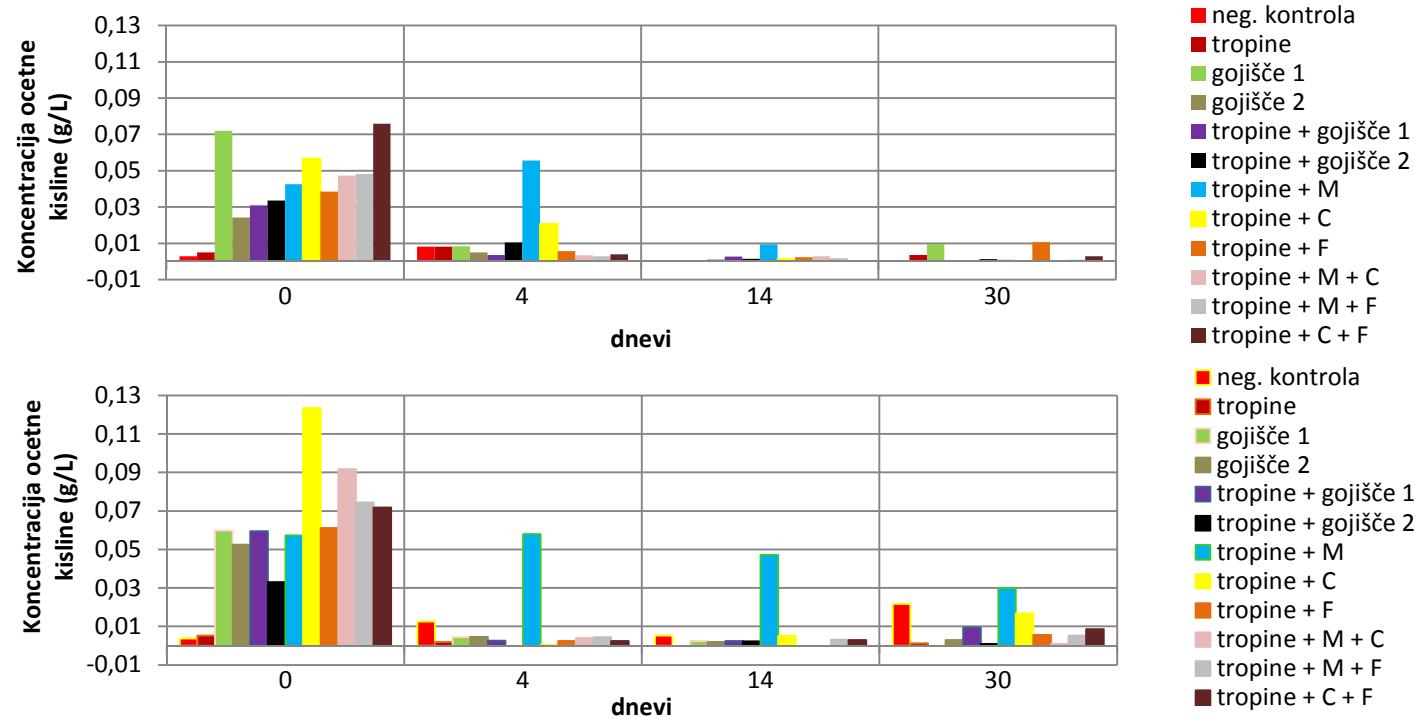


Priloga A4: Nastajanje metana na g KPK_{substrata} v času testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, zgoraj: bioreaktorji z gojiščem 1, spodaj: bioreaktorji z gojiščem 2 ali mešanico gojišč 1 in 2.

Annex A4: Methane production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – II. Upper graph: bioreactors containing medium 1, lower graph: bioreactors containing medium 2 or a mixture of media 1 and 2.

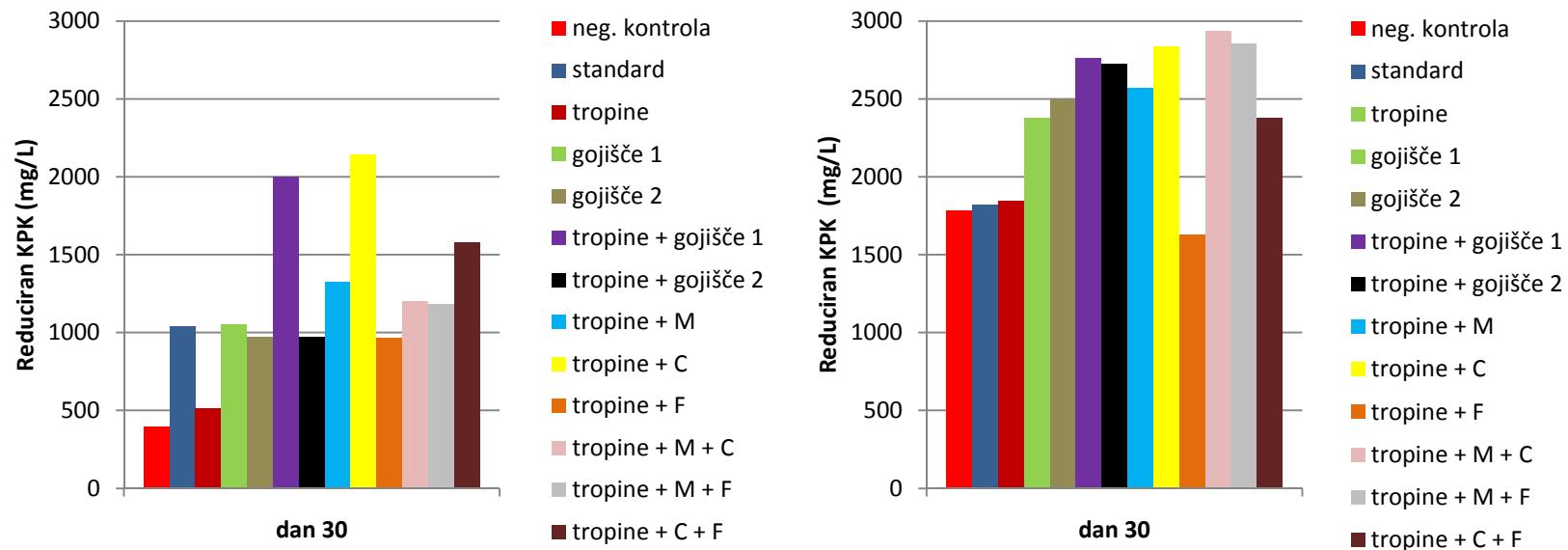


Priloga A5: Vrednost pH ob začetku in zaključku testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami. Levo – BMP I, desno – BMP II, M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*.
 Annex A5: pH in bioreactors on day 0 and 30 of the BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures. Left – BMP assay I, right – BMP assay II, M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*.



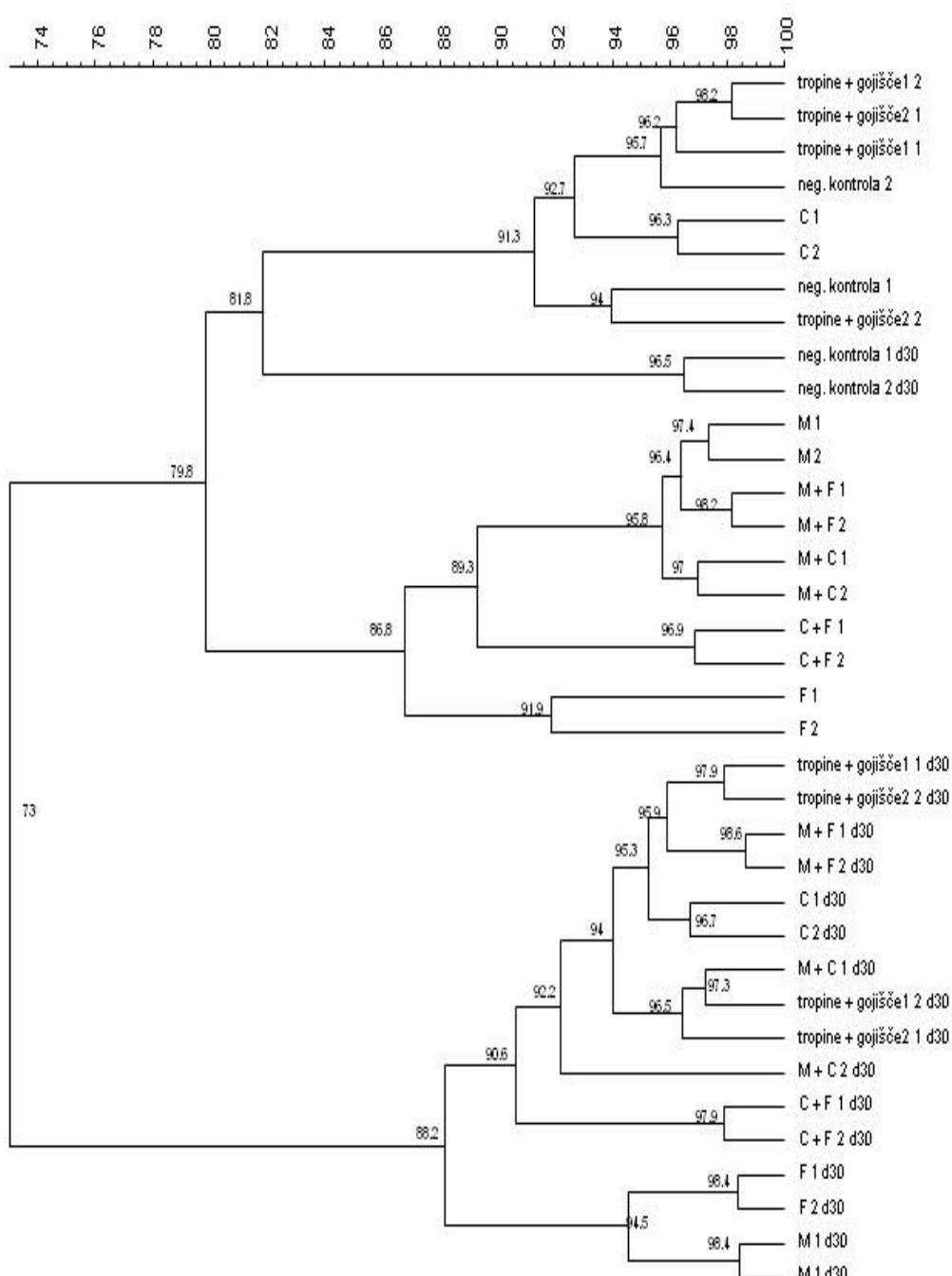
Priloga A6: Pojavljanje acetne kisline v času testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* kokulturami.
Zgoraj – BMP I, spodaj – BMP II, M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*.

Annex A6: Acetic acid concentration in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures. Upper graph – BMP assay I, lower graph – BMP assay II, M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*.

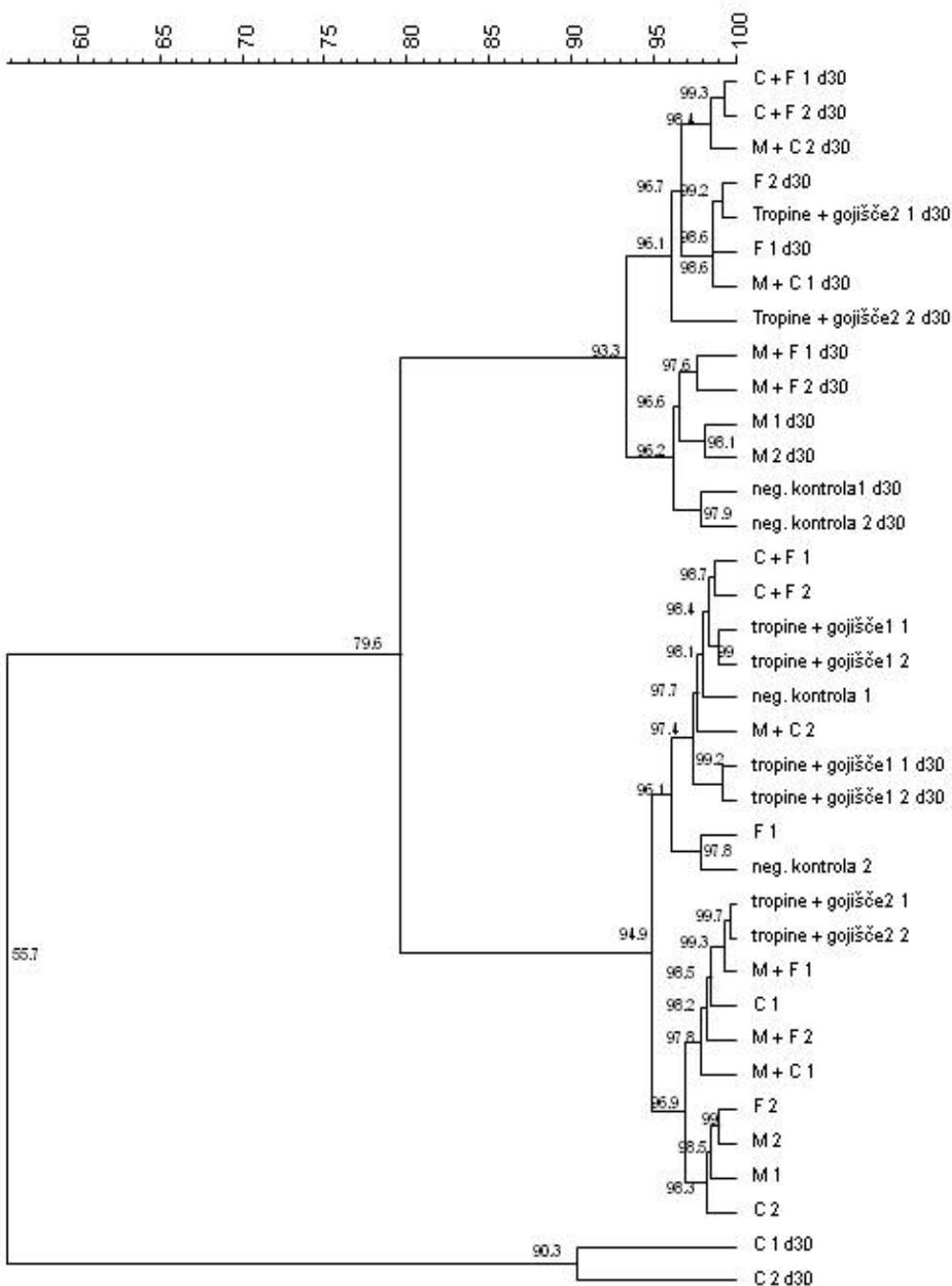


Priloga A7: Redukcija KPK v posameznih bioreaktorjih ob zaključku testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami. Levo – BMP I, desno – BMP II., M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*.

Annex A7: COD reduction in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures. Left – BMP assay I, right – BMP assay II, M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. Cellulovorans*.

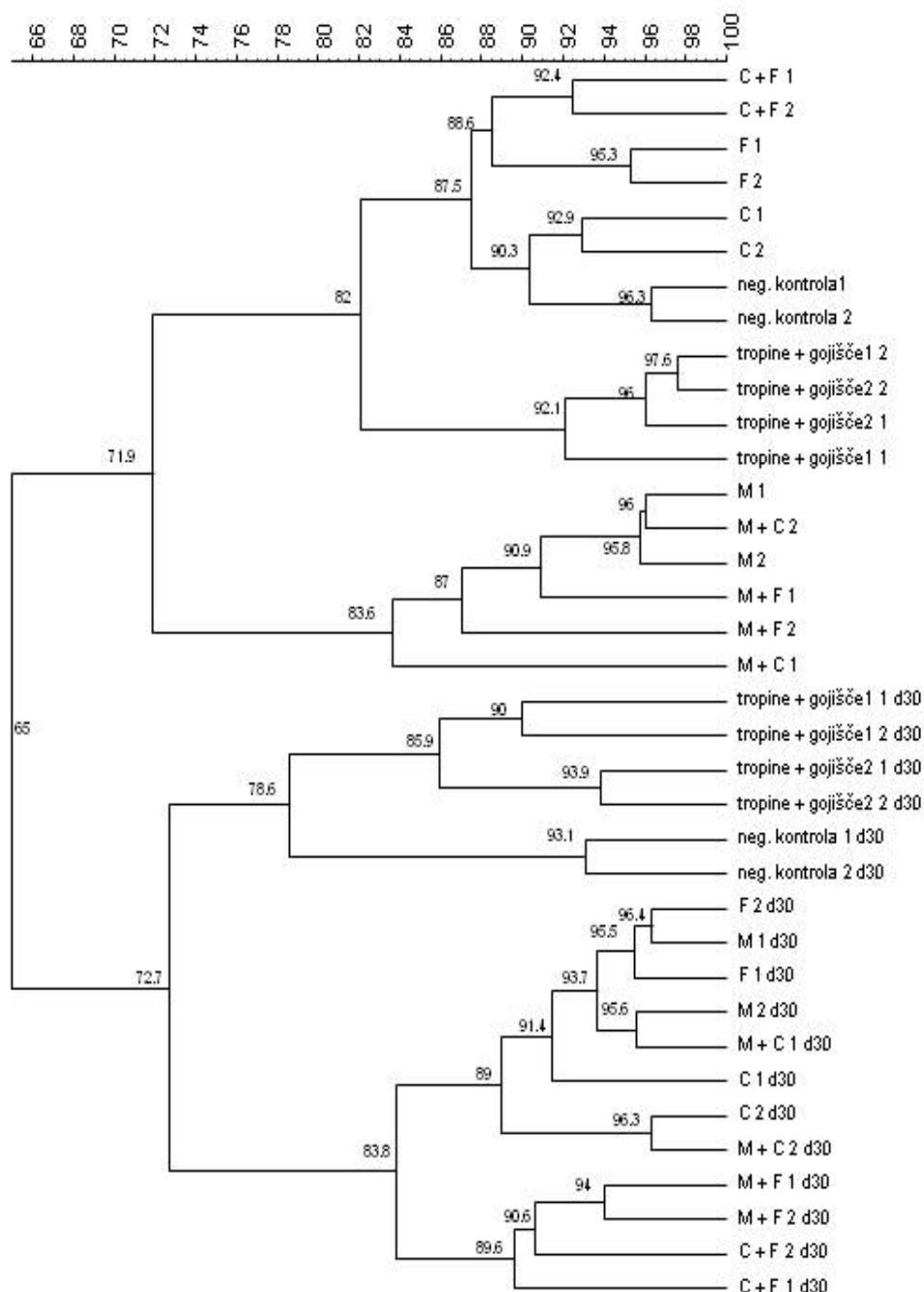


Priloga A8: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacji za bakterijsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^{TT}, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – dan 30. Annex A8: Pearson correlation coefficient dendrogram for bacterial community in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^{TT}, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – day 30.

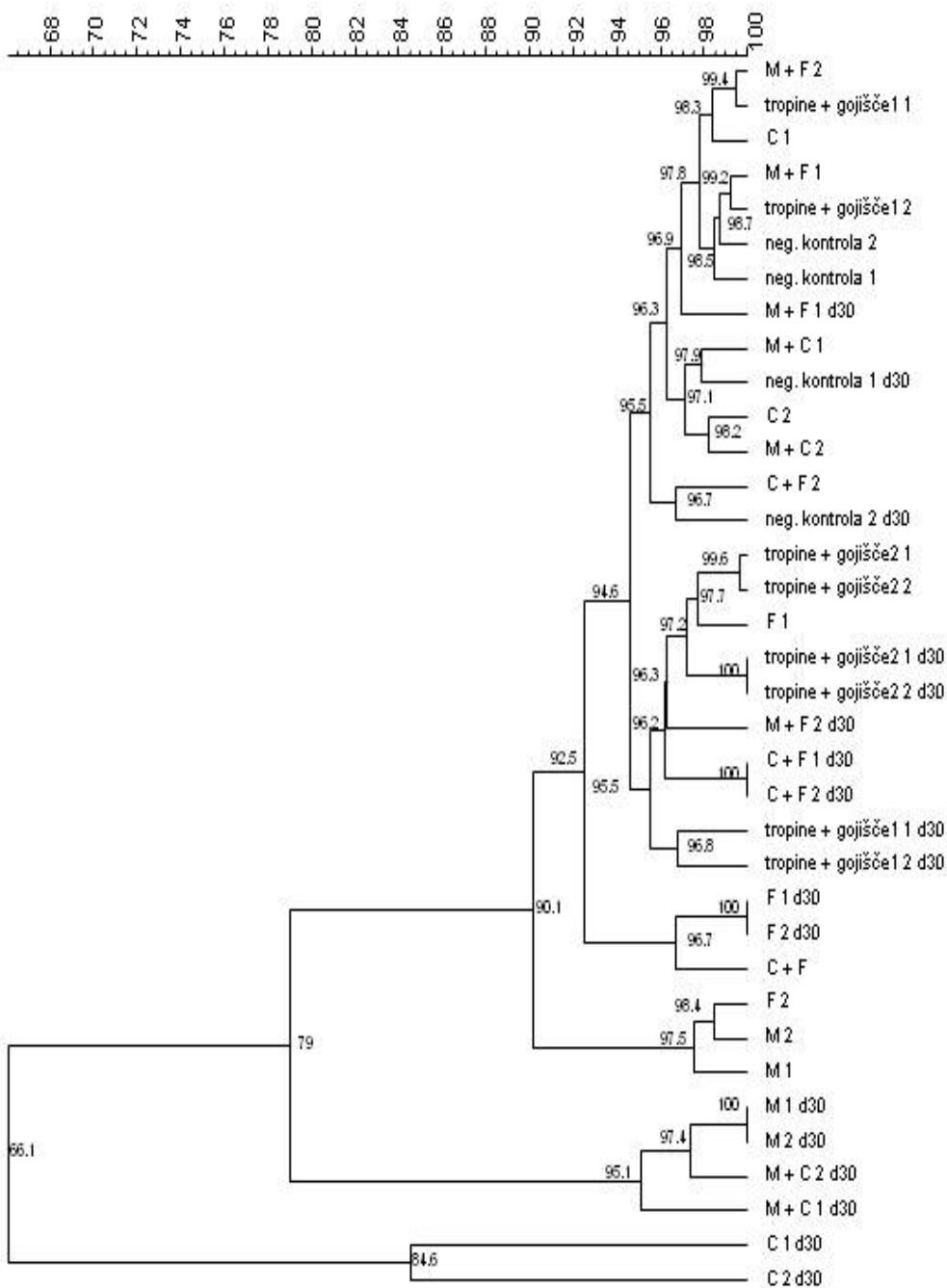


Priloga A9: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficiente korelacije za arhejsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – dan 30.

Annex A9: Pearson correlation coefficient dendrogram for archaeal community in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – I. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – day 30.



Priloga A10: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacijske za bakterijsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – dan 30.
Annex A10: Pearson correlation coefficient dendrogram for bacterial community in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – day 30.

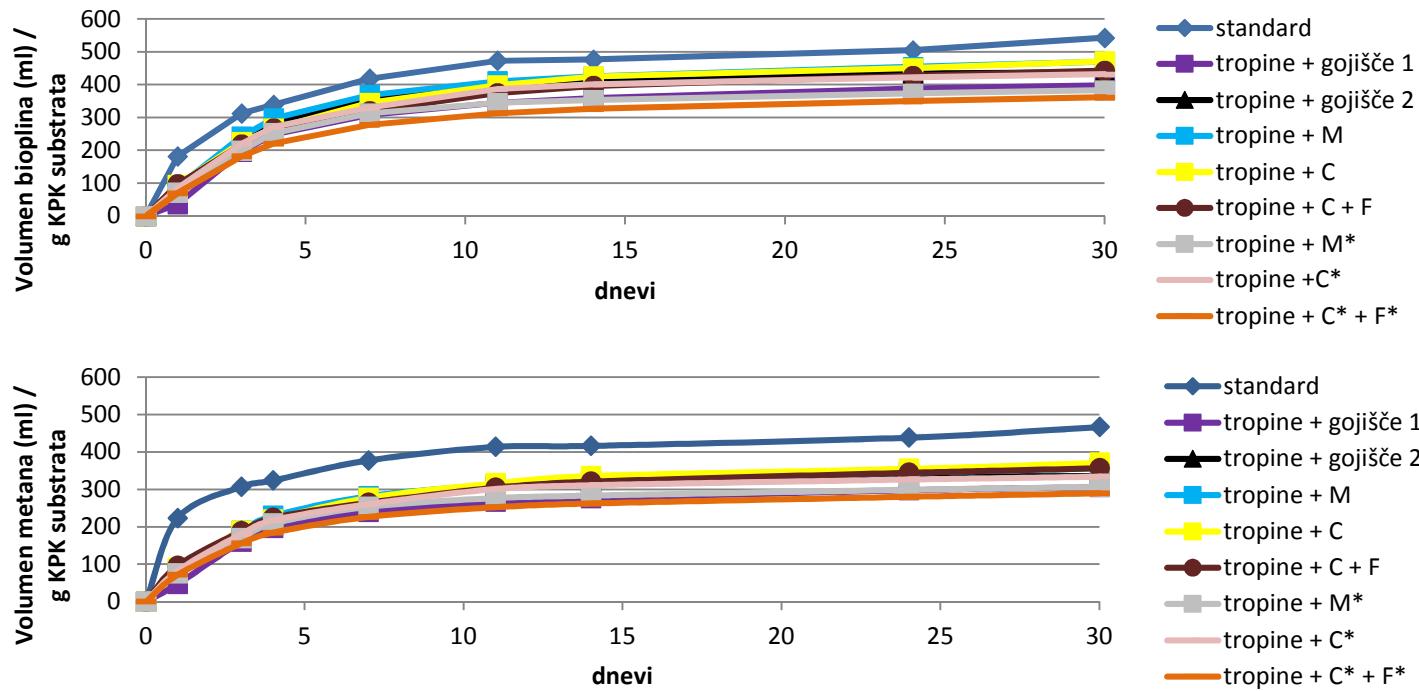


Priloga A11: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacijske za arhejsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* in kokulturami – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – dan 30.

Annex A11: Pearson correlation coefficient dendrogram for archaeal community in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *P. xylanivorans* Mz5^T, *F. succinogenes* S85, *C. cellulovorans* and cocultures – II. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, d30 – day 30.

Priloga B

Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5^T, *C. cellulovorans* ter kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85



Priloga B1: Nastajanje bioplina in metana v času testa BMP z bioaugmentacijo s *C. cellulovorans*, individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter s *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - mrtva kultura.

Annex B1: Biogas production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *C. cellulovorans*, individually and in coculture with *F. succinogenes* S85, and with *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - dead culture.

Priloga B2: Statistično analizirani rezultati neto proizvodnje metana na g KPK_{substrata} v bioreaktorjih v različnih medsebojnih primerjavah. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 1 – kontrolni bioreaktor z neinokuliranim inducibilnim gojiščem M2 z brezovim ksilanom in CMC celulozo, gojišče 2 – kontrolni bioreaktor z neinokuliranim inducibilnim gojiščem M2 z brezovim ksilanom, celobiozo in Avicel celulozo, * - statistično značilna razlika.

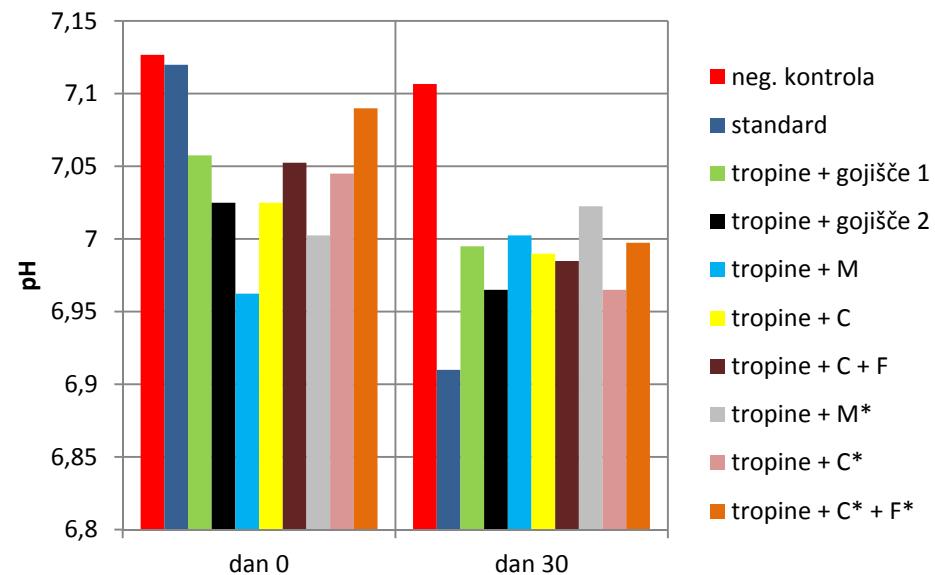
Annex B2: Statistically analysed results of net methane production per g COD_{substrate} in bioreactors in different comparisons. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 1 - control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with xylan from birchwood and CMC cellulose, gojišče 2 - control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with xylan from birchwood, cellobiose and Avicel cellulose, * - statistically significant difference.

Primerjava	Razlika v končni neto		
	proizvodnji metana na g KPK _{substrata} (ml)	Standardna napaka	p-vrednost
M / gojišče 1*	41,53	6,33	< 0,0001
mrtev M / gojišče 1	-3,21	6,31	0,6110
M / mrtev M*	44,75	6,29	< 0,0001
C / gojišče 2*	19,28	6,34	0,0026
mrtev C / gojišče 2	-8,3961	6,30	0,1837
C / mrtev C*	27,68	6,33	< 0,0001
C + F / gojišče 1+2*	18,23	5,54	0,0011
mrtva C + F / gojišče 1+2*	-40,05	5,48	< 0,0001
C + F / mrtva C + F*	58,27	6,33	< 0,0001

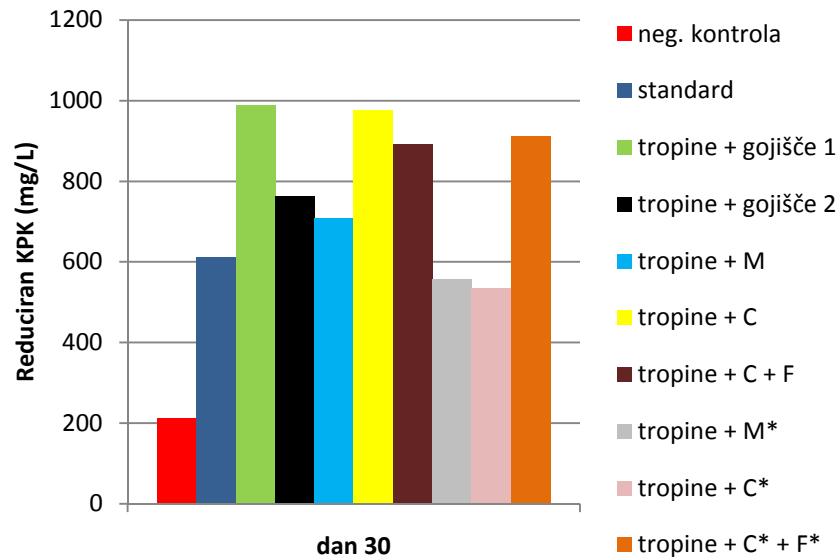
Priloga B3: Statistično analizirani rezultati hitrosti proizvodnje metana na g KPK_{substrata} v bioreaktorjih v različnih medsebojnih primerjavah. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 1 – kontrolni bioreaktor z neinokuliranim inducibilnim gojiščem M2 z brezovim ksilanom in CMC celulozo, gojišče 2 – kontrolni bioreaktor z neinokuliranim inducibilnim gojiščem M2 z brezovim ksilanom, celobiozo in Avicel celulozo, * - statistično značilna razlika.

Annex B3: Statistically analysed results of the methane production velocity per g COD_{substrate} in bioreactors in different comparisons. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, C – *C. cellulovorans*, F – *F. succinogenes* S85, gojišče 1 - control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with xylan from birchwood and CMC cellulose, gojišče 2 - control bioreactor containing brewery spent grain and non-inoculated inducible M2 medium with xylan from birchwood, cellobiose and Avicel cellulose, * - statistically significant difference.

Primerjava	Razlika v hitrosti		
	proizvodnje metana na g KPK _{substrata} (ml/dan)	Standardna napaka	p-vrednost
M / gojišče 1	0,01	0,01	0,4901
mrtev M / gojišče 1*	0,04	0,02	0,0252
M / mrtev M	-0,03	0,02	0,0933
C / gojišče 2*	-0,05	0,01	0,0005
mrtev C / gojišče 2	-0,02	0,01	0,2526
C / mrtev C	0,001	0,01	0,9649
C + F / gojišče 1+2	-0,02	0,01	0,1785
mrtva C + F / gojišče 1+2	-0,004	0,01	0,8015
C + F / mrtva C + F	-0,01	0,02	0,4034

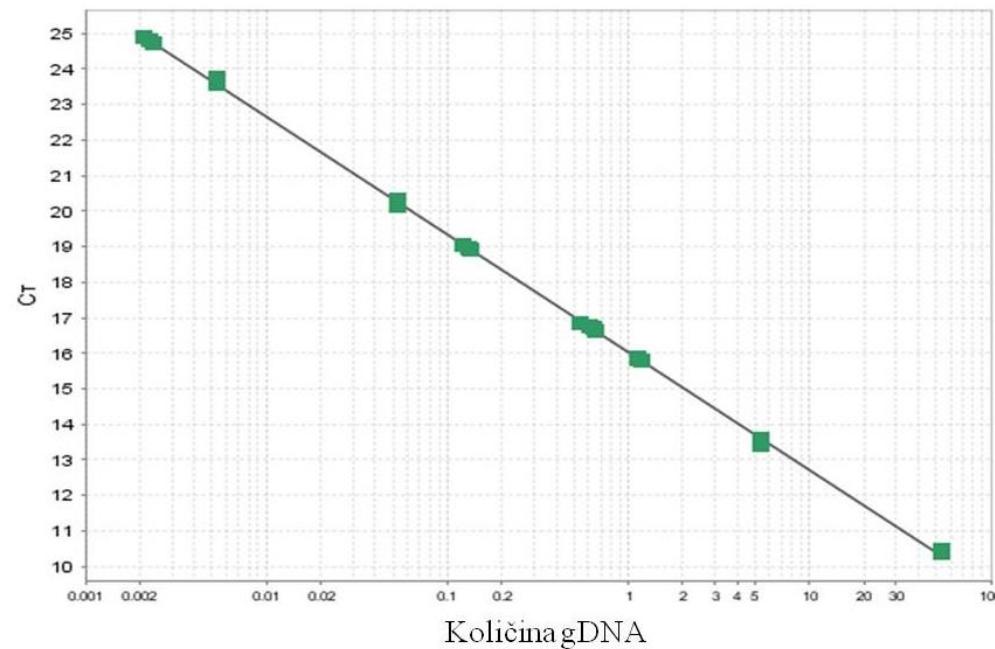


Priloga B4: Vrednosti pH ob začetku in koncu testa BMP z bioaugmentacijo s *C. cellulovorans*, individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter s *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - mrtva kultura.
Annex B4: pH in bioreactors on day 0 and 30 of the BMP assay with bioaugmentation with *C. cellulovorans*, individually and in coculture with *F. succinogenes* S85, and with *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - dead culture.

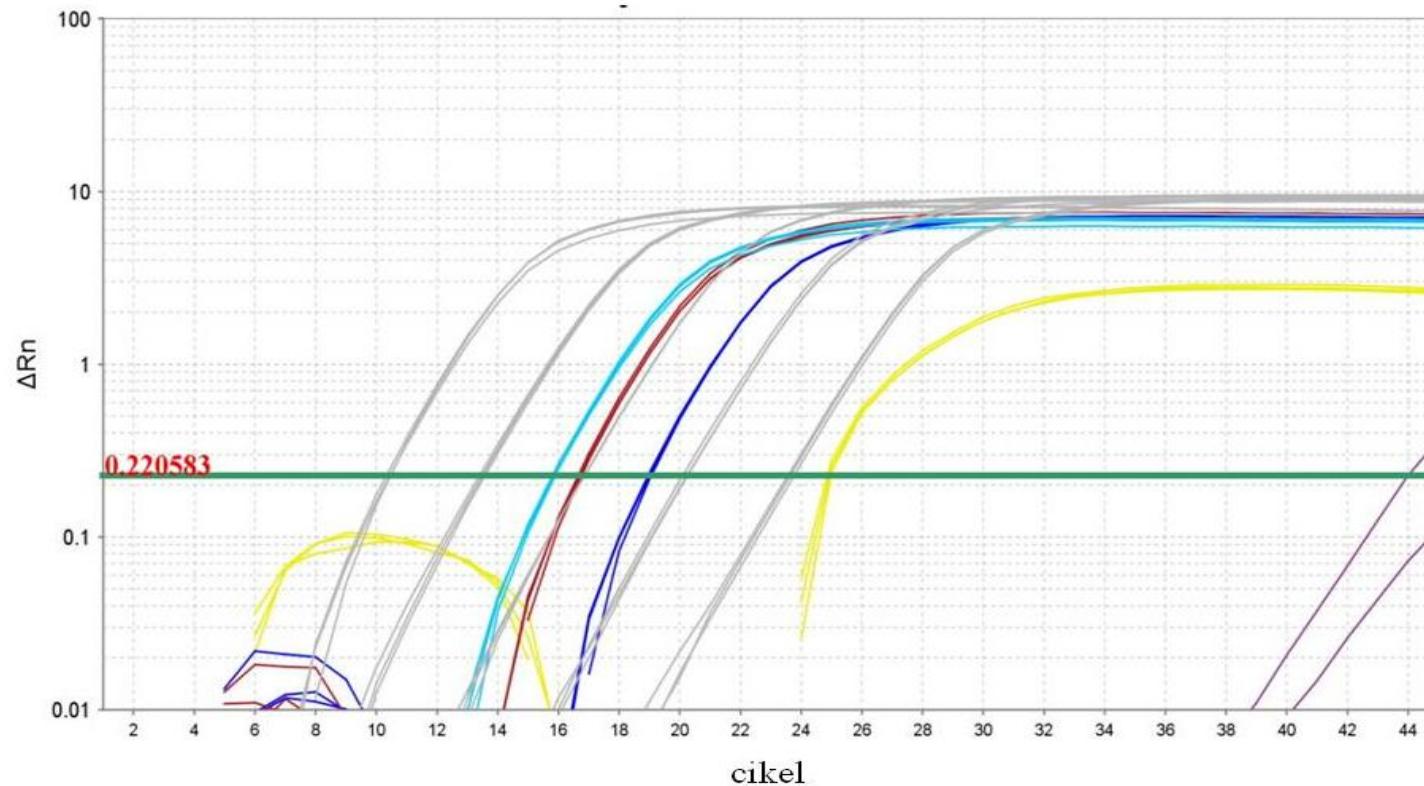


Priloga B5: Redukcija KPK v bioreaktorjih testa BMP z bioaugmentacijo s *C. cellulovorans*, individualno in v kokulturi s *F. succinogenes* S85, ter s *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - mrtva kultura.

Annex B5: COD reduction in bioreactors during BMP assay with bioaugmentation with *C. cellulovorans*, individually and in coculture with *F. succinogenes* S85, and with *P. xylanivorans* Mz5^T. M – *P. xylanivorans* Mz5^T, F – *F. succinogenes* S85, C – *C. cellulovorans*, * - dead culture.

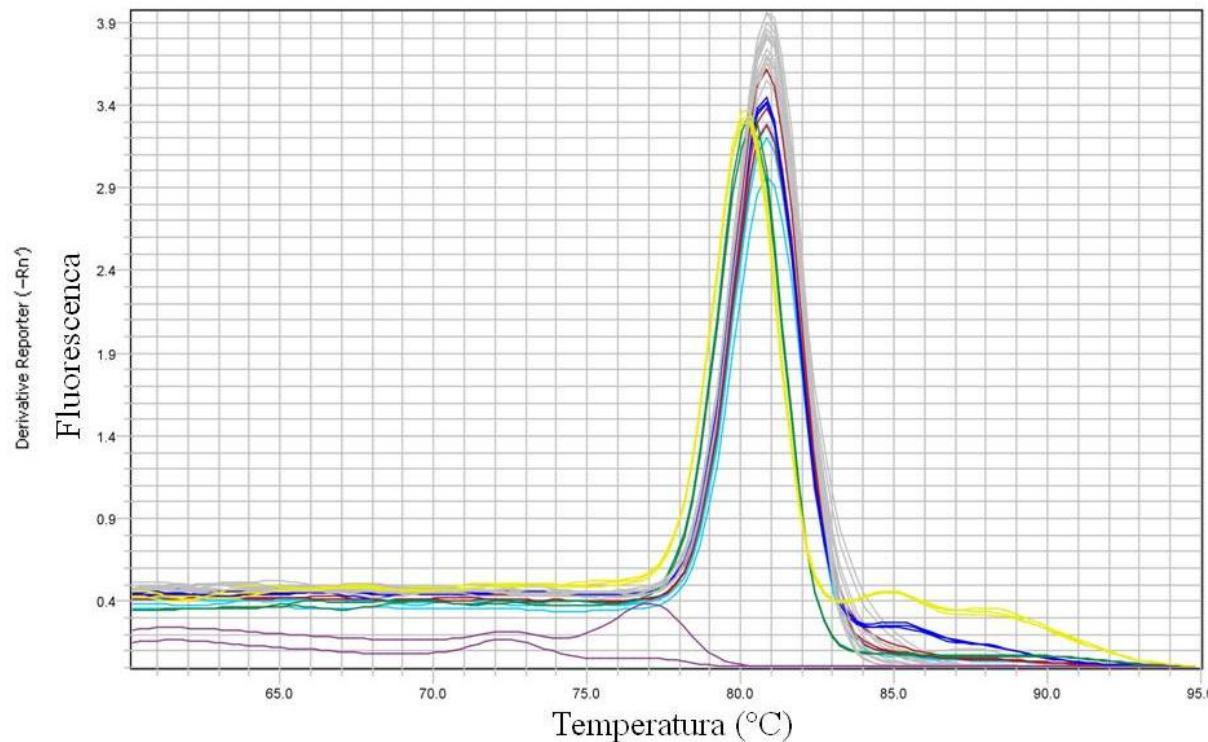


Priloga B6: Standardna krivulja, kot jo je izračunal program za qPCR na podlagi signalov redčitvene vrste izolirane DNA čiste kulture *P. xylanivorans* Mz5^T.
Annex B6: Standard curve calculated by a qPCR programme based on the signals of pure culture *P. xylanivorans* Mz5^T isolated DNA dilutions.



Priloga B7: Izmerjena fluorescensa s sistemom SYBR Green. Zelena črta predstavlja določen prag C_T , nad katerim je program beležil rezultate. Sivo so označene krivulje standarda, vijolične so negativne kontrole, ostalo so vzorci iz bioreaktorjev. Svetlo modro so označeni vzorci dneva 0, rdeče so vzorci dneva 3, temno modri so vzorci dneva 6 in rumeni so vzorci dneva 10.

Annex B7: Fluorescence, measured with SYBR Green system. Green line represents set threshold C_T , above which the programme read the results. Grey lines represent standard curves, purple lines negative controls and the rest are bioreactor samples. Light blue curves represent samples from day 0, red curves are samples from day 3, dark blue curves are samples from day 6 and yellow curves are samples from day 10.



Priloga B8: Talilne krivulje pomnožkov qPCR pri uporabi sistema SYBR Green. Vijolično so označene negativne kontrole, sivo so standardi, ostalo so vzorci iz bioreaktorjev.

Annex B8: Melting curves of the amplified qPCR products using a SYBR Green system. Purple curves represent negative controls, grey curves are standards and the rest are bioreactor samples.

Priloga B9: Rezultati kvantifikacije genomske DNA *P. xylanivorans* Mz5^T v vzorcih s qPCR. Ct – prag detekcije, T_m – talilna temperatura, SD – standardna deviacija.

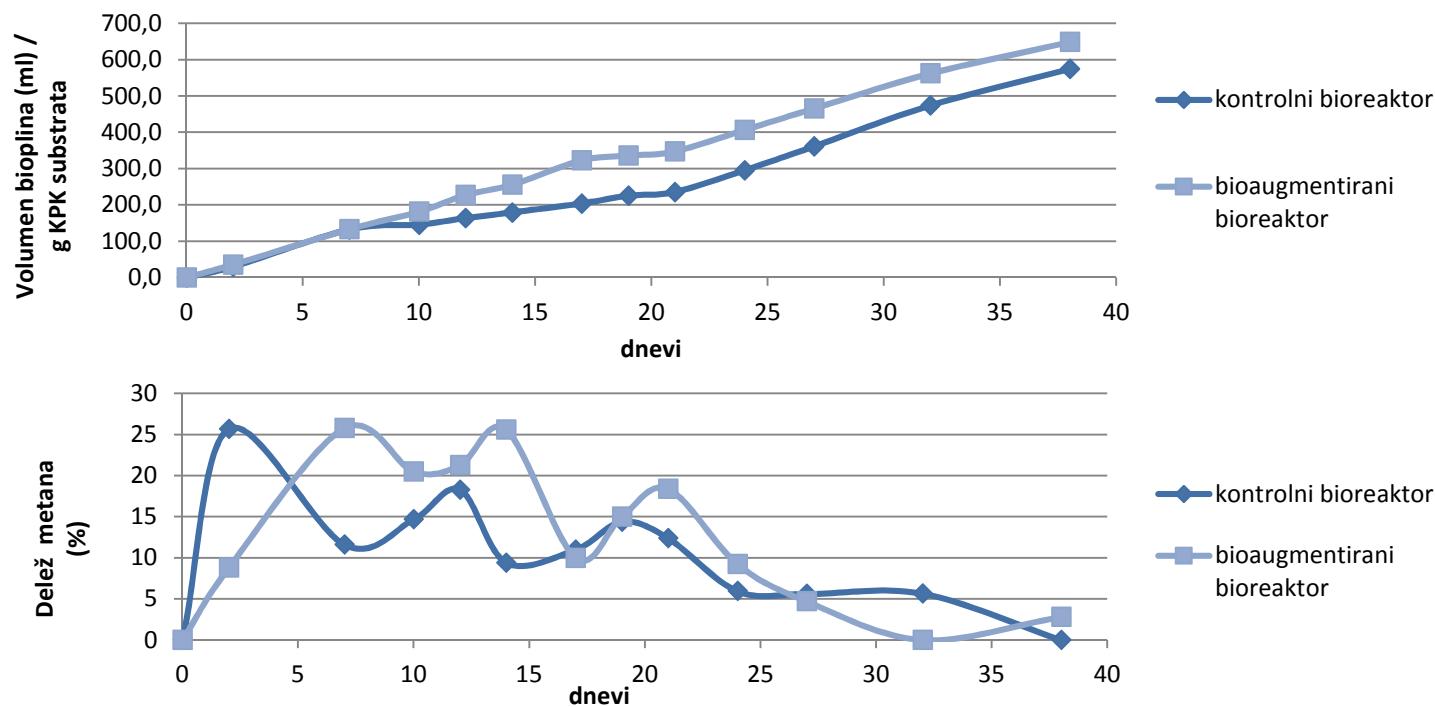
Annex B9: qPCR quantification of *P. xylanivorans* Mz5^T genomic DNA in bioreactor samples. Ct – threshold, T_m – melting temperature, SD – standard deviation.

Block Type	384-Well Block	Reporter	SYBR
Chemistry	SYBR_GREEN	Quencher	none
Experiment Name	2015-04-14	Target	Mz5 ^T
Experiment Run End Time	2015-04-14 12:40:42 PM CEST	Name	Eno_1
Experiment Type	Standard Curve		
Experiment User Name	masa		
Instrument Name	Rodica		
Instrument Serial Number	278881087		
Instrument Type	ViiA 7		
Passive Reference	ROX		
Quantification Cycle Method	Ct		
Signal Smoothing On	false		
Stage/ Cycle where Analysis is performed	Stage 2, Step 2		

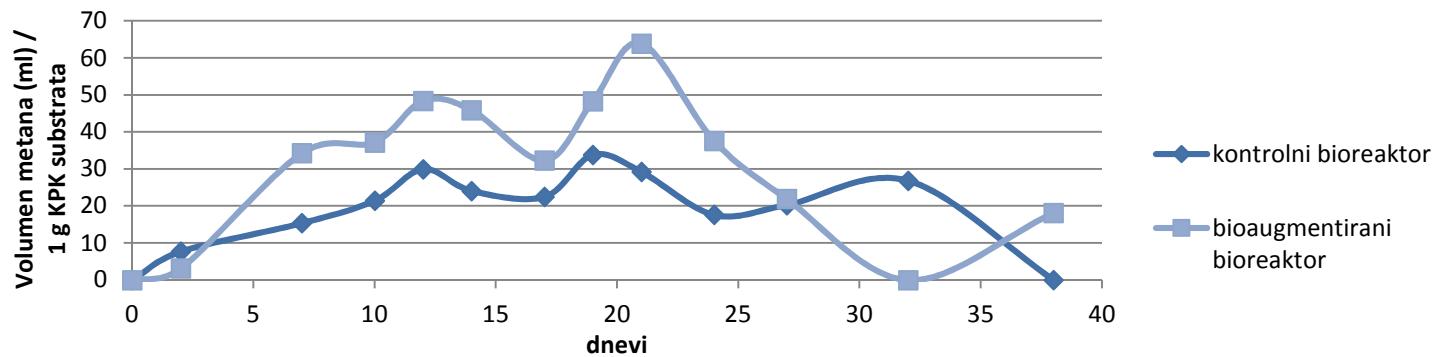
Sample Name	Task	CT	Ct		Quantity	Quantity		Ct Threshold	Ct	
			Mean	SD		Mean	SD		Tm1	Tm2
S 100x	S	10,466	10,439	0,064	53,500			0,221	80,835	
S 100x	S	10,366	10,439	0,064	53,500			0,221	80,835	
S 100x	S	10,484	10,439	0,064	53,500			0,221	80,835	
S 1000x	S	13,435	13,515	0,082	5,350			0,221	80,835	
S 1000x	S	13,599	13,515	0,082	5,350			0,221	80,835	
S 1000x	S	13,511	13,515	0,082	5,350			0,221	80,835	
S 10000x	S	16,840	16,850	0,010	0,535			0,221	80,835	
S 10000x	S	16,860	16,850	0,010	0,535			0,221	80,835	
S 10000x	S	16,849	16,850	0,010	0,535			0,221	80,835	
S 100000x	S	20,153	20,247	0,082	0,054			0,221	80,969	
S 100000x	S	20,305	20,247	0,082	0,054			0,221	80,835	
S 100000x	S	20,285	20,247	0,082	0,054			0,221	80,969	
S 1000000x	S	23,582	23,665	0,096	0,005			0,221	80,969	
S 1000000x	S	23,645	23,665	0,096	0,005			0,221	80,835	
S 1000000x	S	23,769	23,665	0,096	0,005			0,221	80,835	
N	N	neznan						0,221	72,389	61,396
N	N	43,936						0,221	77,081	72,255
Md0 10x	V	15,799	15,843	0,040	1,184	1,148	0,032	0,221	80,835	
Md0 10x	V	15,856	15,843	0,040	1,137	1,148	0,032	0,221	80,835	
Md0 10x	V	15,875	15,843	0,040	1,123	1,148	0,032	0,221	80,835	
Md3 10x	V	16,696	16,696	0,055	0,635	0,635	0,024	0,221	80,835	
Md3 10x	V	16,751	16,696	0,055	0,611	0,635	0,024	0,221	80,835	
Md3 10x	V	16,642	16,696	0,055	0,660	0,635	0,024	0,221	80,835	
Md6 10x	V	19,063	18,990	0,068	0,123	0,129	0,006	0,221	80,835	
Md6 10x	V	18,930	18,990	0,068	0,135	0,129	0,006	0,221	80,835	
Md6 10x	V	18,976	18,990	0,068	0,131	0,129	0,006	0,221	80,835	
Md10	V	24,742	24,826	0,083	0,002	0,002	0,000	0,221	80,165	
Md10	V	24,827	24,826	0,083	0,002	0,002	0,000	0,221	80,165	
Md10	V	24,909	24,826	0,083	0,002	0,002	0,000	0,221	80,165	

Priloga C

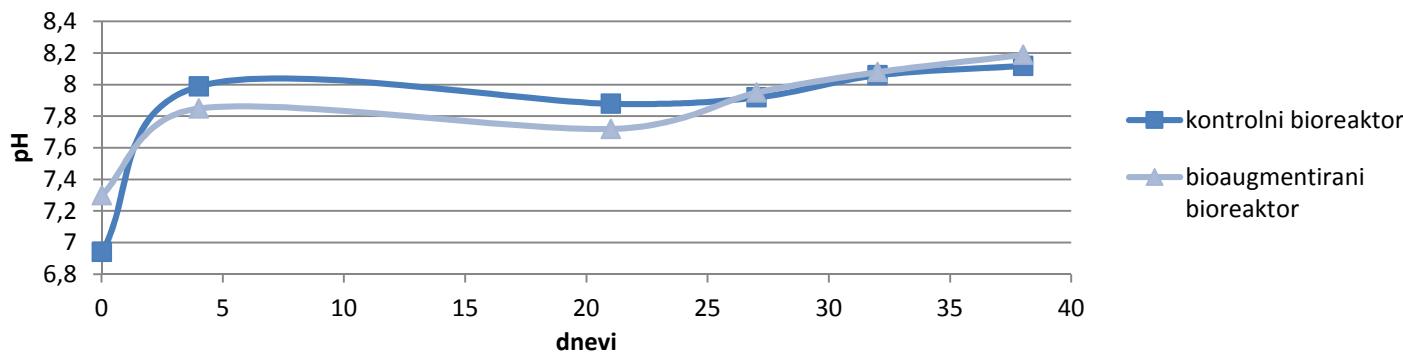
Bioaugmentacija s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 na pilotnem nivoju



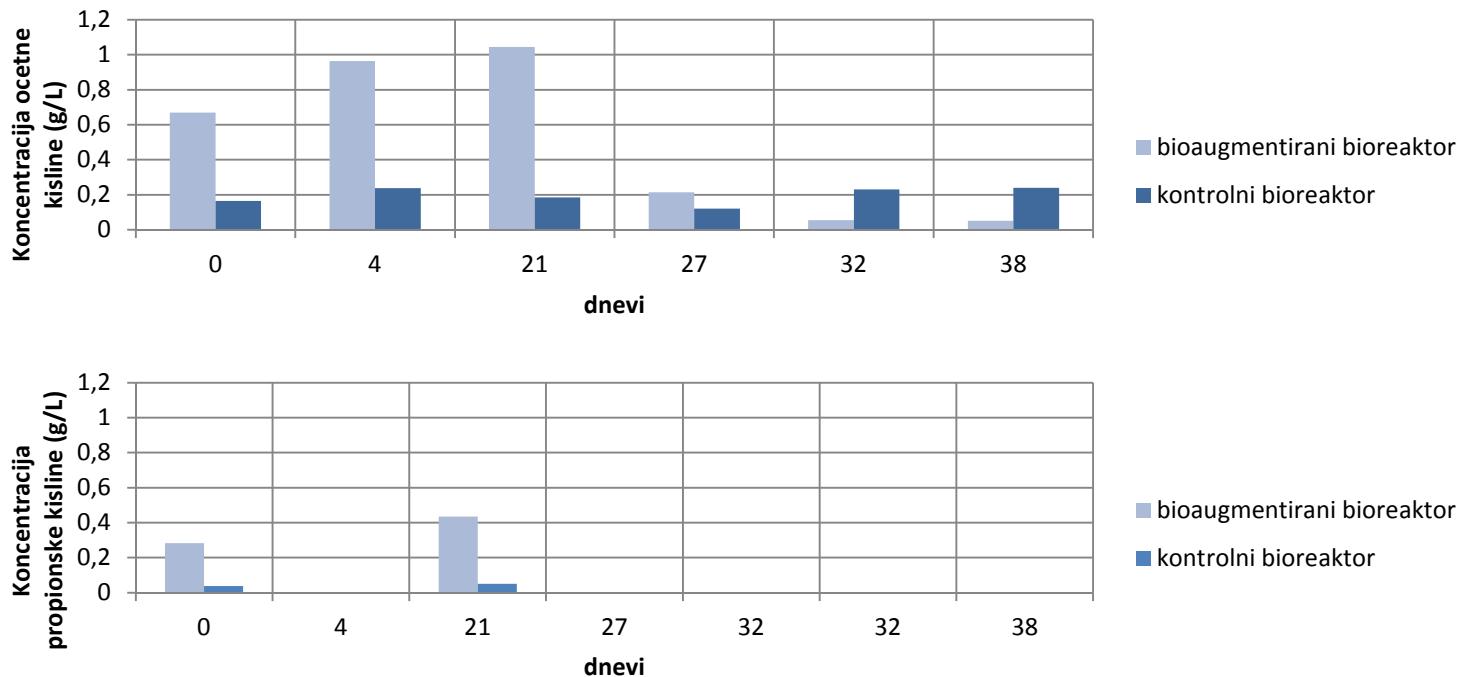
Priloga C1: Proizvodnja bioplina na g KPK_{substrata} in delež metana v njem v pilotnem bioaugmentiranem in kontrolnem bioreaktorju.
Annex C1: Biogas production per g COD_{substrate} and methane content in pilot bioaugmented bioreactor and control bioreactor.



Priloga C2: Izračunani volumen metana na g KPK_{substrata} v pilotnih bioreaktorjih v času poskusa.
Annex C2: Calculated volume of methane per g COD_{substrate} produced in pilot bioreactors during pilot BMP assay.



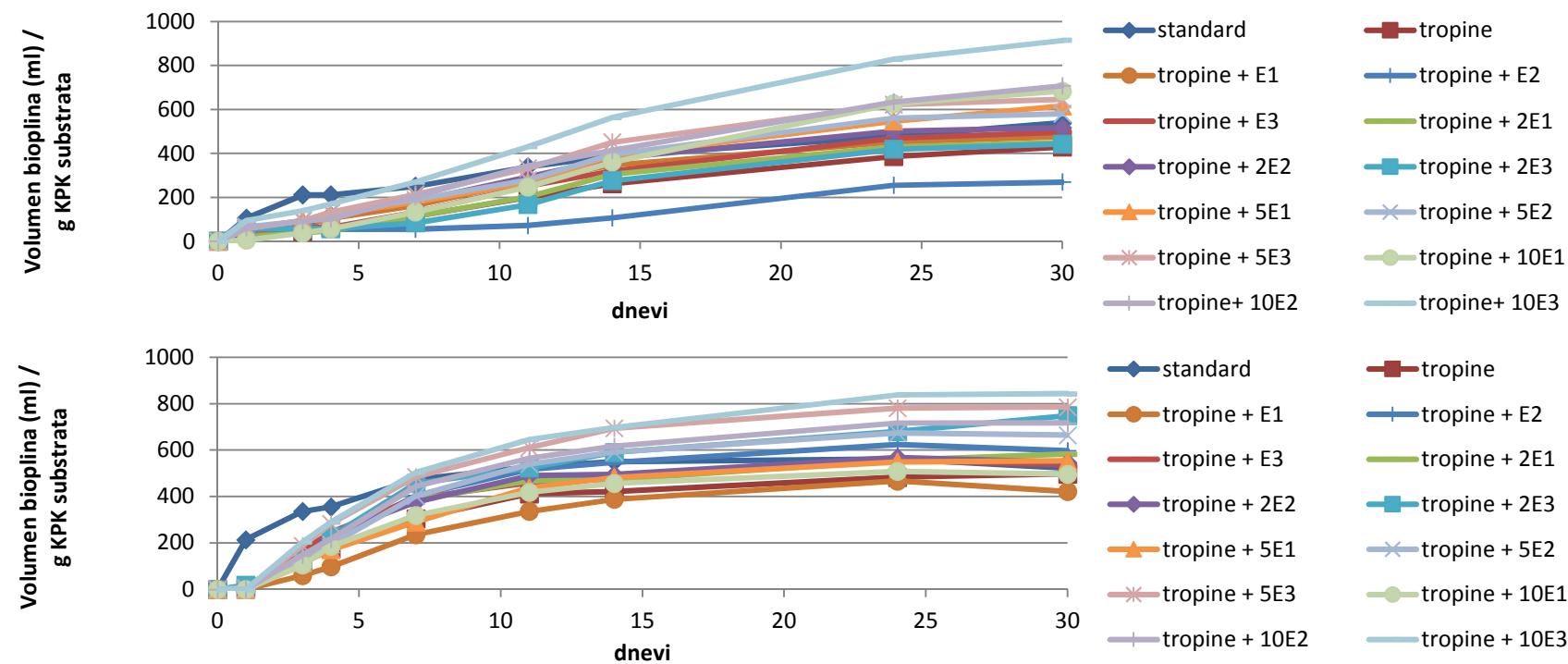
Priloga C3: Rezultati spremjanja vrednosti pH v pilotnih bioreaktorjih v času poskusa.
Annex C3: pH in pilot bioreactors during pilot BMP assay.



Priloga C4: Rezultati spremjanja koncentracij acetne in propionske kisline v pilotnih bioreaktorjih v času poskusa.
Annex C4: Acetic and propionic acid concentrations in pilot bioreactors during pilot BMP assay

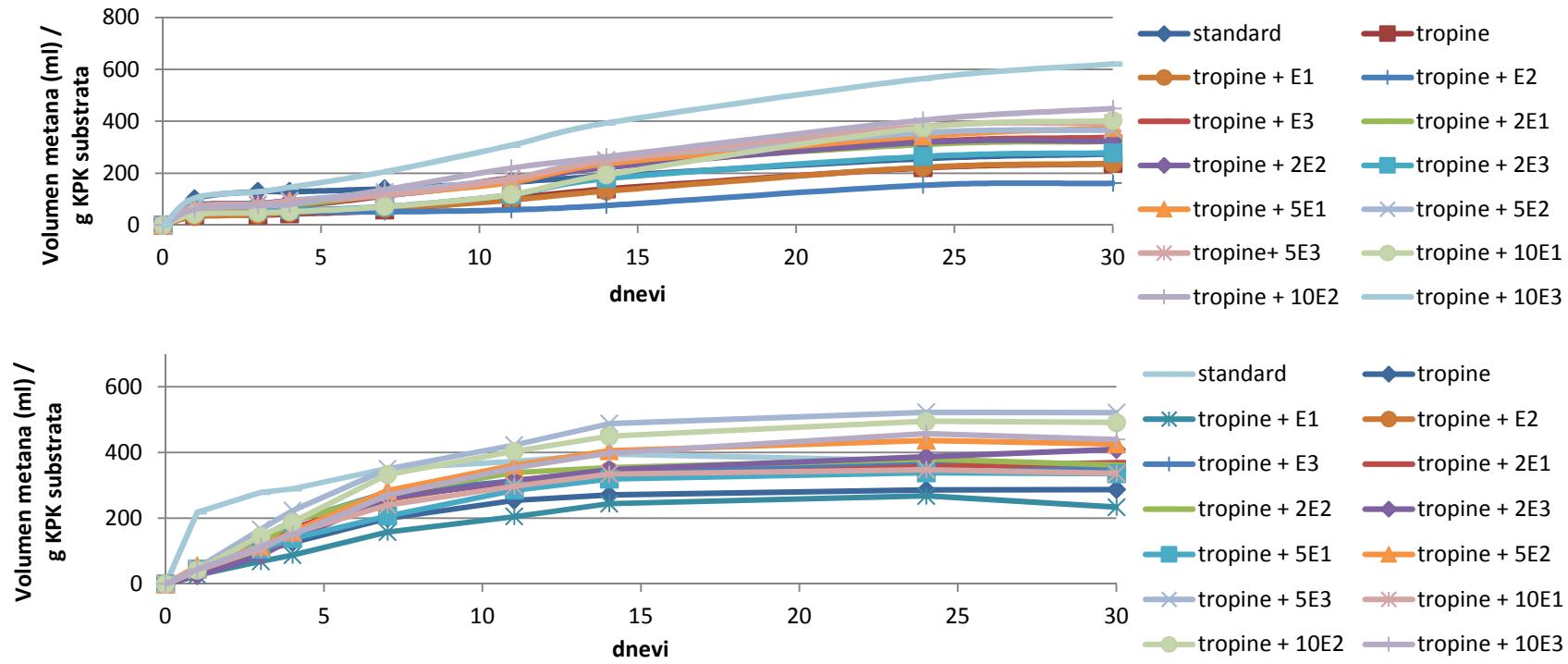
Priloga D

Rezultati testov BMP z dodajanjem MethaPlus L100, MethaPlus L120 in Axiase 100



Priloga D1: Nastajanje bioplina na g KPK_{substrata} v času testa BMP z dodajanjem komercialnih encimskih mešanic. Zgoraj – BMP I, spodaj – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100.

Annex D1: Biogas production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with enzyme additions. Upper graph – BMP I, lower graph – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100.



Priloga D2: Proizvodnja metana na g KPK substrata glede na čas testa BMP z dodajanjem MethaPlus 100, MethaPlus L120 in Axiase 100. Zgoraj – BMP I, spodaj – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 10.

Annex D2: Methane production per g COD_{substrate} in bioreactors during BMP assay with enzyme additions. Upper graph – BMP I, lower graph – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 10

Priloga D3: Povprečni neto in hitrost proizvodnje metana na g KPK_{substrata} in standardna napaka za bioreaktorje obeh ponovitev testa BMP z dodajanjem komercialnih encimskih mešanic.

Annex D3: Average velocity and net methane production per g COD_{substrate} and standard error for bioreactors in both replicates of BMP assay with the enzyme additions.

Bioreaktor	Povprečna neto proizvodnja metana na g KPK _{substrata*} (ml)	Standardna napaka	Povprečna hitrost proizvodnja metana na g KPK _{substrata} (ml/dan)	Standardna napaka
tropine	251,18		7,7281	
tropine + MethaPlus L120	250,37		7,723	
tropine + MethaPlus L100	161,76		4,3358	
tropine + Axiase 100	365,68		10,4358	
tropine + 2x MethaPlus L120	353,22		9,9982	
tropine + 2x MethaPlus L100	352,02		9,6572	
tropine + 2x Axiase 100	296,32	18,6945	8,7537	0,9031
tropine + 5x MethaPlus L120	413,80		12,1723	
tropine + 5x MethaPlus L100	400,07		11,5099	
tropine + 5x Axiase 100	422,11		12,4608	
tropine + 10x MethaPlus L120	418,56		13,9952	
tropine + 10x MethaPlus L100	474,80		14,401	
tropine + 10x Axiase 100	656,96		19,0383	

* 30. dan testa BMP

Priloga D4: Primerjava bioreaktorjev glede na hitrost proizvodnje metana v času obeh ponovitev testa BMP z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike (AdjP < 0,05). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.

Annex D4: Comparison of bioreactors based on the velocity of methane production in both replicates of BMP assay with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference (AdjP < 0,05). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

Primerjava	Razlika v hitrosti proizvodnje metana (ml/dan)	Standardna napaka	AdjP(Tukey-tip)
E1-tropine	-0,00509		1.0000
E2-tropine	-3,3923		0.8059
E3-tropine	2,7077		0.9549
2xE1-tropine	2,2702		0.9889
2xE2-tropine	1,9291		0.9975
2xE3-tropine	1,0256		1.0000
5xE1-tropine	4,4442	1,2772	0.4072
5xE2-tropine	3,7818		0.6682
5xE3-tropine	4,7327		0.3061
10xE1-tropine*	6,2671		0.0356
10xE2-tropine*	6,6729		0.0173
10xE3-tropine*	11,3102		<.0001
2xE1-E1	2,2752		0.9887

... se nadaljuje

...nadaljevanje Priloge D4: Primerjava bioreaktorjev glede na hitrost proizvodnje metana v času obeh ponovitev testa BMP z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike ($\text{AdjP} < 0,05$). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.
 Annex D4: Comparison of bioreactors based on the velocity of methane production in both replicates of BMP assay with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference ($\text{AdjP} < 0,05$). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

Primerjava	Razlika v hitrosti proizvodnje metana (ml/dan)	Standardna napaka	AdjP(Tukey-tip)
5xE1-E1	4,4493		0.4053
10xE1-E1*	6,2722		0.0353
5xE1-2xE1	2,1741		0.9924
10xE1-2xE1	3,9969		0.5832
10xE1-5xE1	1,8228		0.9985
2xE2-E2	5,3213		0.1511
5xE2-E2*	7,1741		0.0066
10xE2-E2*	10,0651		<.0001
5xE2-2xE2	1,8527	1,2772	0.9983
10xE2-2xE2	4,7438		0.3025
10xE2-5xE2	2,8911		0.9277
2xE3-E3	-1,6821		0.9993
5xE3-E3	2,025		0.9960
10xE3-E3*	8,6025		0.0003
5xE3-2xE3	3,7071		0.6967
10xE3-2xE3*	10,2846		<.0001
10xE3-5xE3*	6,5775		0,0206

Priloga D5: Primerjava bioreaktorjev glede na povprečno razliko v neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike ($\text{AdjP} < 0,05$). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.

Annex D5: Comparison of bioreactors based on the average difference in net methane production per g COD_{substrate} with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference ($\text{AdjP} < 0,05$). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

Primerjava	Povprečna razlika v neto proizvodnji metana na g KPK substrata (ml)	Standardna napaka	AdjP (Turkey tip)
tropine-E1	0,8079		1.0000
tropine-E2*	89,4201	26,438	0.0464
tropine-E3*	-114,5		0.0017
tropine-2xE1*	-102,04		0.0098

... se nadaljuje

... nadaljevanje Priloge D5: Primerjava bioreaktorjev glede na povprečno razliko v neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike (AdjP < 0,05). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.

Annex D5: Comparison of bioreactors based on the average difference in net methane production per g COD_{substrate} with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference (AdjP < 0,05). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

Primerjava	Povprečna razlika v neto proizvodnji metana na g KPK substrata (ml)	Standardna napaka	AdjP (Turkey tip)
tropine-2xE2*	-100,84		0.0115
tropine-2xE3	-45,139		0.8893
tropine-5xE1*	-162,62		<.0001
tropine-5xE2*	-148,89		<.0001
tropine-5xE3*	-170,93		<.0001
tropine-10xE1*	-167,39		<.0001
tropine-10xE2*	-223,62		<.0001
tropine-10xE3*	-405,78		<.0001
E1-E2	88,6123		0.0508
E1-E3*	-115,31		0.0015
E1-2xE1*	-102,85		0.0088
E1-2XE2*	-101,65		0.0103
E1-2XE3	-45,9469		0.8763
E1-5XE1*	-163,43		<.0001
E1-5XE2*	-149,7		<.0001
E1-5XE3*	-171,74	26,438	<.0001
E1-10XE1*	-168,19		<.0001
E1-10XE2*	-224,43		<.0001
E1-10XE3*	-406,59		<.0001
E2-E3*	-203,92		<.0001
E2-2xE1*	-191,46		<.0001
E2-2XE2*	-190,26		<.0001
E2-2XE3*	-134,56		<.0001
E2-5XE1*	-252,04		<.0001
E2-5XE2*	-238,31		<.0001
E2-5XE3*	-260,35		<.0001
E2-10XE1*	-256,81		<.0001
E2-10XE2*	-313,04		<.0001
E2-10XE3*	-495,2		<.0001
E3-2xE1	12,463		1.0000
E3-2XE2	13,6634		1.0000
E3-2XE3	69,3646		0.3041

...se nadaljuje

...nadaljevanje Priloge D5: Primerjava bioreaktorjev glede na povprečno razliko v neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike (AdjP < 0,05). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.

Annex D5: Comparison of bioreactors based on the average difference in net methane production per g COD_{substrate} with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference (AdjP < 0,05). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

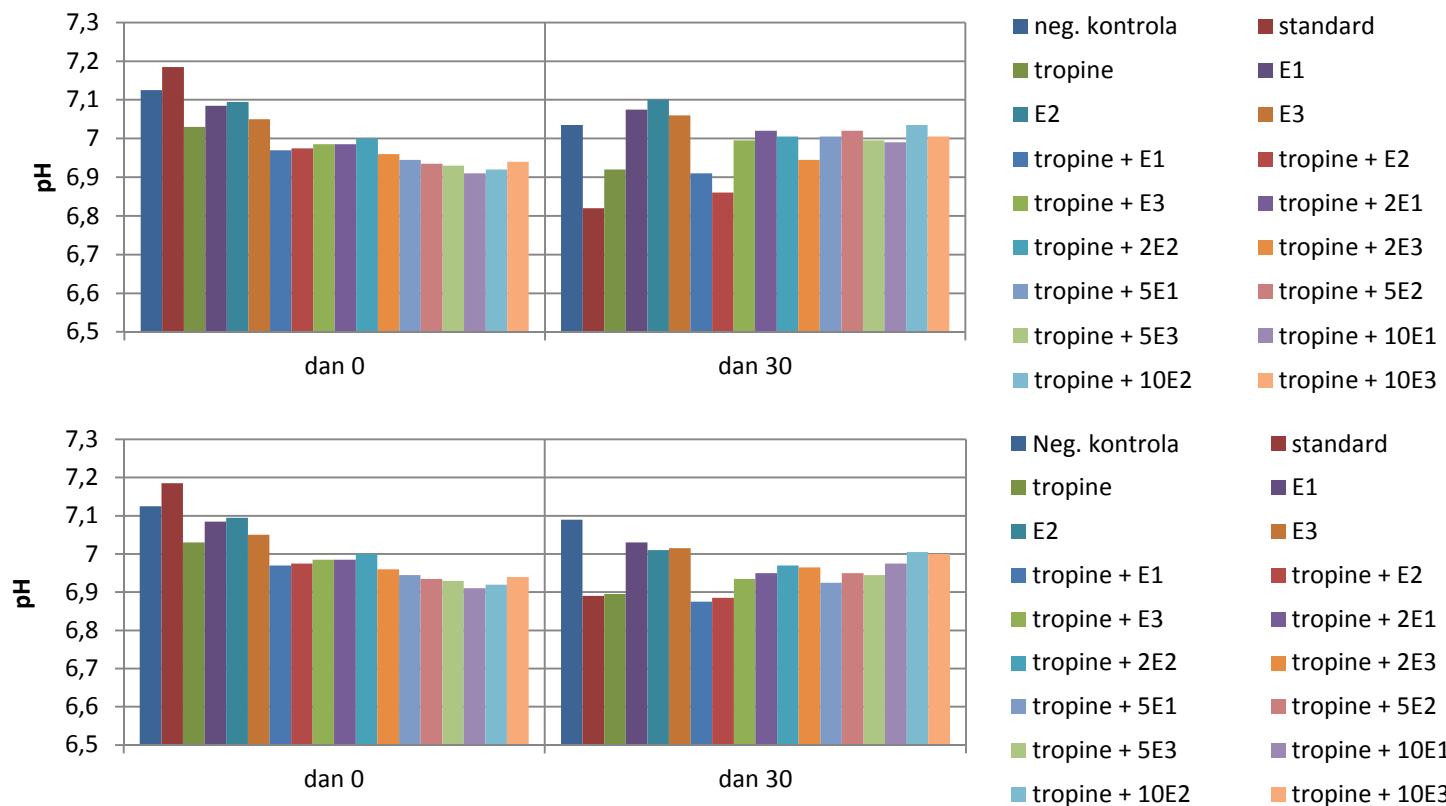
Primerjava	Povprečna razlika v neto proizvodnji metana na g KPK substrata (ml)	Standardna napaka	AdjP (Turkey tip)
E3-5XE1	-48,1196		0.8372
E3-5XE2	-34,3908		0.9852
E3-5XE3	-56,4268		0.6397
E3-10XE1	-52,8828		0.7314
E3-10XE2*	-109,12		0.0037
E3-10XE3*	-291,27		<.0001
2XE1-2XE2	1,2003		1.0000
2XE1-2XE3	56,9016		0.6269
2XE1-5XE1	-60,5826		0.5262
2XE1-5XE2	-46,8539		0.8607
2XE1-5XE3	-68,8899		0.3147
2XE1-10XE1	-65,3458		0.3997
2XE1-10XE2*	-121,58		0.0006
2XE1-10XE3*	-303,74		<.0001
2XE2-2XE3	55,7012		0.6590
2XE2-5XE1	-61,7829	26,438	0.4935
2XE2-5XE2	-48,0542		0.8384
2XE2-5XE3	-70,0902		0.2883
2XE2-10XE1	-66,5462		0.3698
2XE2-10XE2*	-122,78		0.0005
2XE2-10XE3*	-304,94		<.0001
2XE3-5XE1*	-117,48		0.0011
2XE3-5XE2*	-103,76		0.0078
2XE3-5XE3*	-125,79		0.0003
2XE3-10XE1*	-122,25		0.0005
2XE3-10XE2*	-178,48		<.0001
2XE3-10XE3*	-360,64		<.0001
5XE1-5XE2	13,7287		1.0000
5XE1-5XE3	-8,3073		1.0000
5XE1-10XE1	-4,7632		1.0000
5XE1-10XE2	-61,0001		0.5148
5XE1-10XE3*	-243,16		<.0001

... se nadaljuje

...nadaljevanje Priloge D5: Primerjava bioreaktorjev glede na povprečno razliko v neto proizvodnji metana na g KPK_{substrata} z izračunano standardno napako in prilagojeno vrednostjo P za oceno statistično značilne razlike (AdjP < 0,05). Tropine – kontrolni bioreaktor s samimi tropinami, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistično značilna razlika.

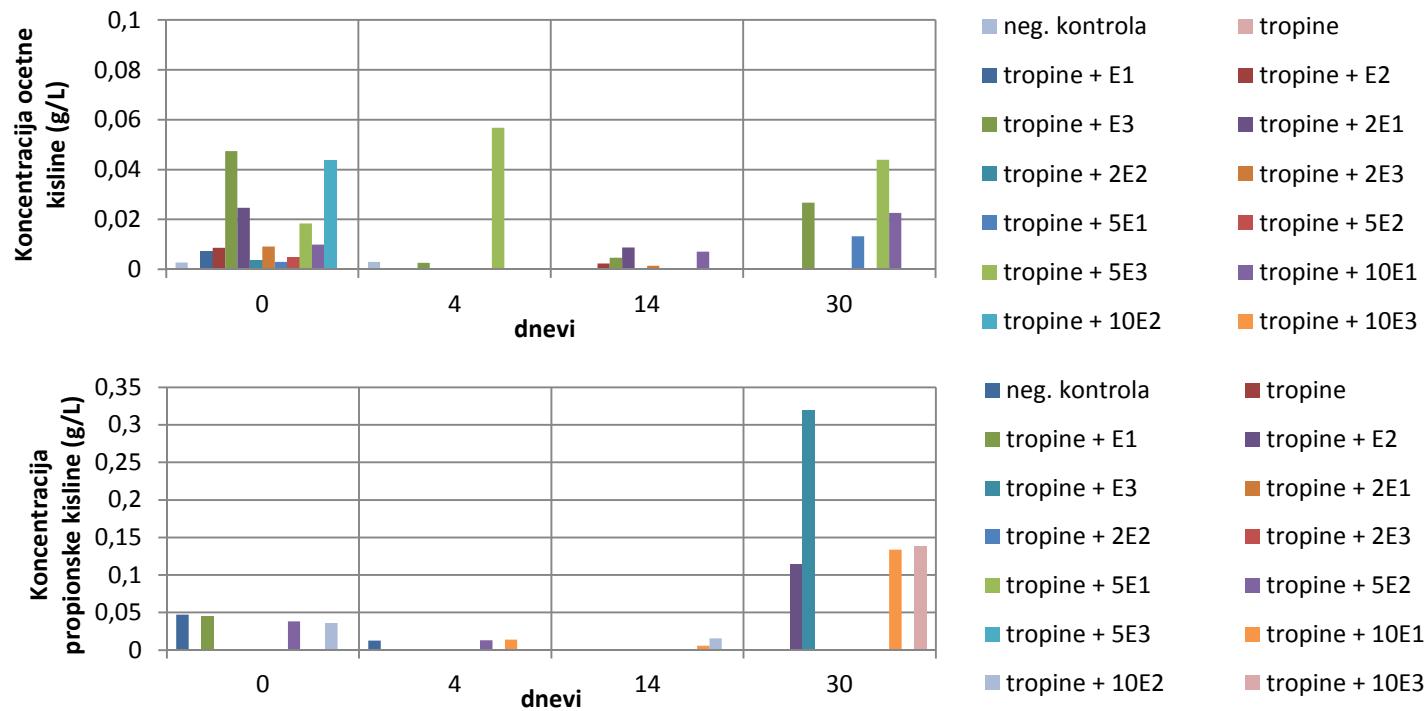
Annex D5: Comparison of bioreactors based on the average difference in net methane production per g COD_{substrate} with standard error and adjustable P value for the evaluation of the statistically significant difference (AdjP < 0,05). Tropine – control bioreactor with brewery spent grain, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, * - statistically significant difference.

Primerjava	Povprečna razlika v neto proizvodnji metana na g KPK substrata (ml)	Standardna napaka	AdjP (Turkey tip)
5XE2-5XE3	-22,036		0.9998
5XE2-10XE1	-18,492		1.0000
5XE2-10XE2	-74,7288		0.1994
5XE2-10XE3*	-256,88		<.0001
5XE3-10XE1	3,544	26,438	1.0000
5XE3-10XE2	-52,6928		0.7361
5XE3-10XE3*	-234,85		<.0001
10XE1-10XE2	-56,2369		0.6448
10XE1-10XE3*	-238,39		<.0001
10XE2-10XE3*	-182,16		<.0001



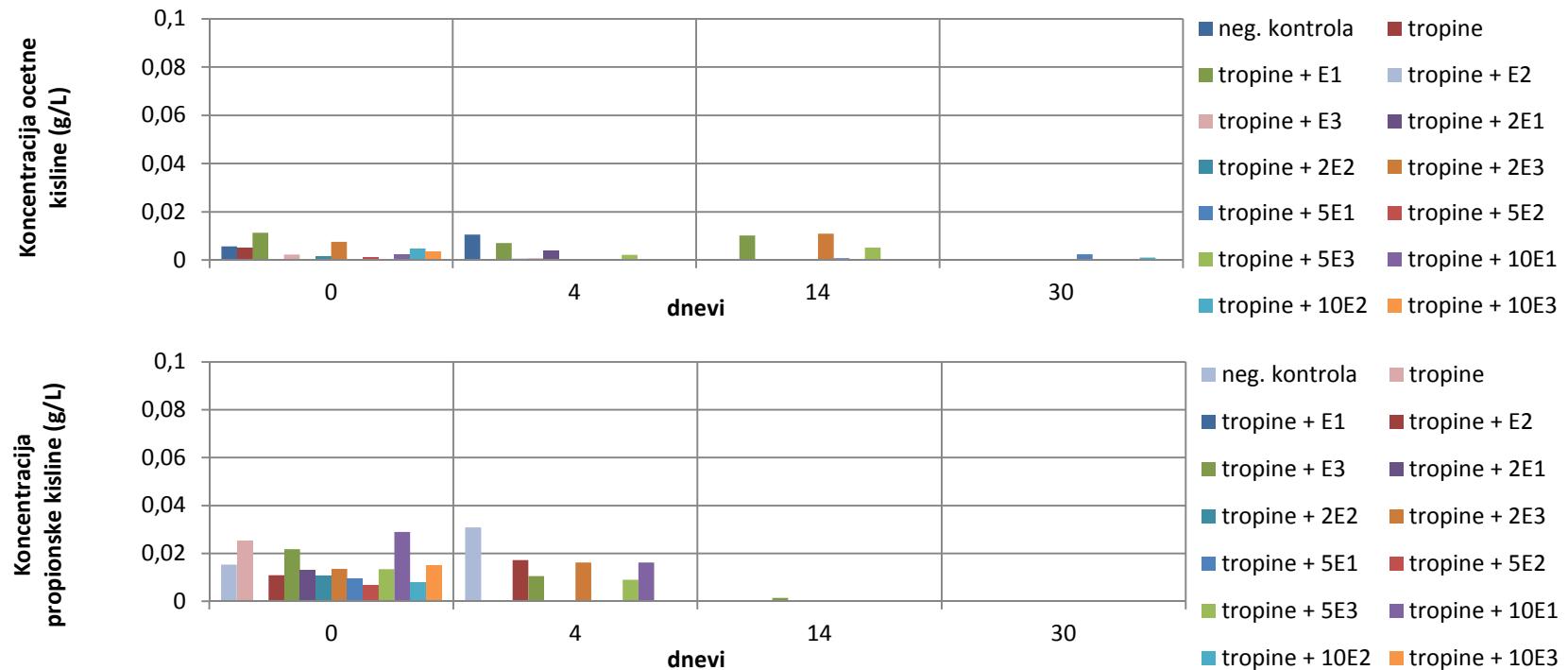
Priloga D6: Izmerjene vrednosti pH vzorcev iz laboratorijskih bioreaktorjev na dan 0 in 30 pri testu BMP z dodajanjem MethaPlus L120, Methaplus 100 in Axiasse 100. Zgoraj – BMP I, spodaj – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 100.

Annex D6: pH in bioreactors on day 0 and 30 in BMP assay with enzyme additions. Upper graph – BMP I, lower graph – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100.



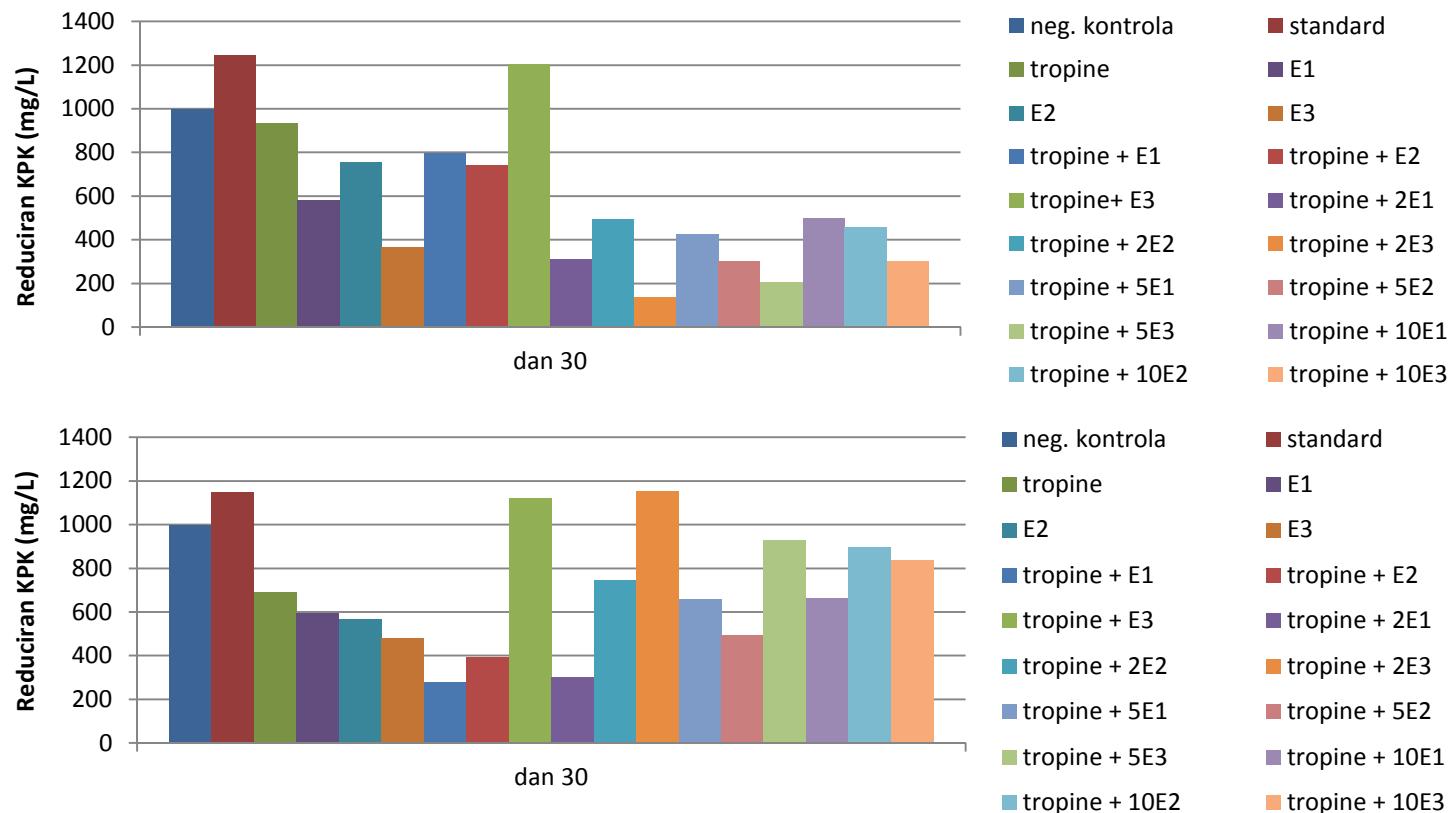
Priloga D7: Koncentracija acetne in propionske kisline v laboratorijskih bioreaktorjih v času testa BMP z dodajanjem MethaPlus 100, MethaPlus L120 in Axiasse 100 – I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiasse 100.

Annex D7: Acetic and propionic acid concentrations in bioreactors during BMP assay with enzyme additions – I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiasse 100.



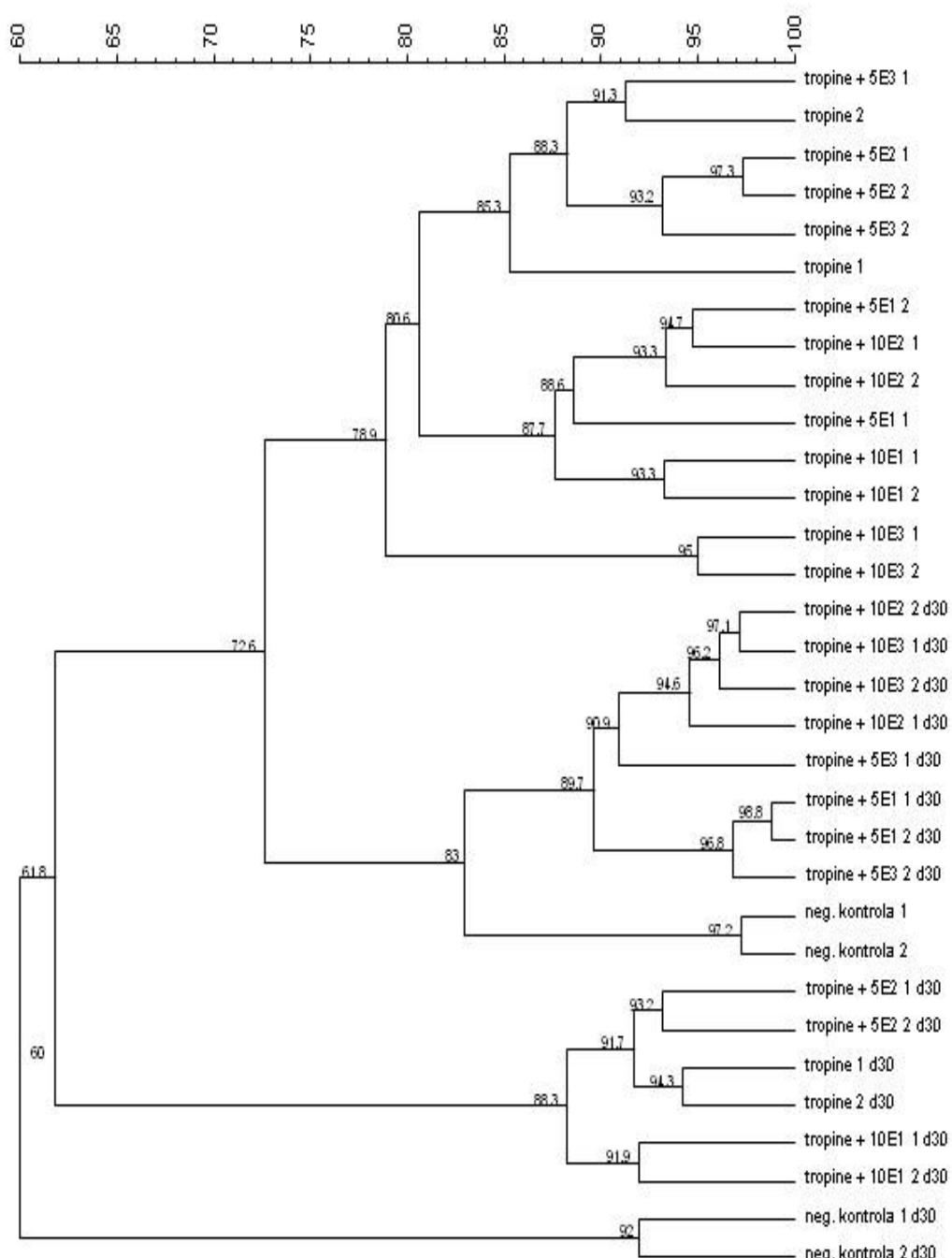
Priloga D8: Koncentracija ocetne in propionske kisline v laboratorijskih bioreaktorjih v času testa BMP z dodajanjem MethaPlus 100, MethaPlus L120 in Axiase 100 – II. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 100.

Annex D8: Acetic and propionic acid concentrations in bioreactors during BMP assay with enzyme additions – II. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 100.

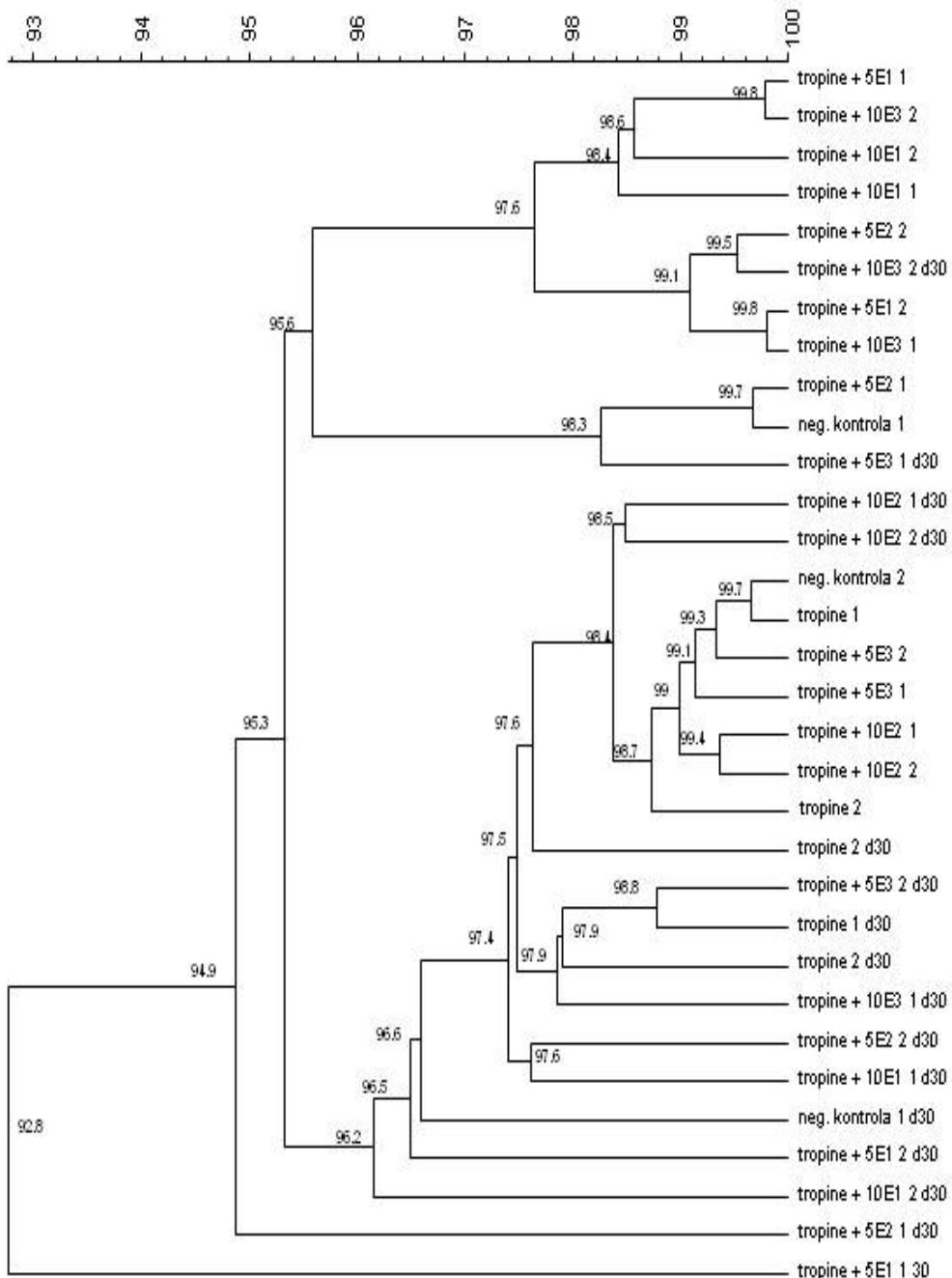


Priloga D9: Rezultati redukcije KPK za vzorce testa BMP z dodajanjem MethaPlus 100, MethaPlus L120 in Axiase 100. Zgoraj – BMP I, spodaj – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 100.

Annex D9: COD reduction in bioreactors in BMP assay with enzyme additions. Upper graph – BMP I, lower graph – BMP II, E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus 100, E3 – Axiase 100



Priloga D10: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacijske za bakterijsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z dodajanjem encimskih mešanic v različnih dozah - I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, d30 – dan 30, 2, 5, 10 – dvojnja, petkratna ali desetkratna doza.
 Annex D10: Pearson correlation coefficient dendrogram for bacterial community in bioreactors during BMP with enzyme additions in different dosages – I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, d30 – day 30, 2, 5, 10 – double, five-times and 10-times bigger dosage.



Priloga D11: Dendrogram na podlagi Pearsonovega koeficiente korelacije za arhejsko združbo v bioreaktorjih testa BMP z dodajanjem encimskih mešanic v različnih dozah - I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, d30 – dan 30, 2, 5, 10 – dvojna, petkratna ali desetkratna doza.

Annex D11: Pearson correlation coefficient dendrogram for archaeal community in bioreactors during BMP with enzyme additions in different dosages – I. E1 – MethaPlus L120, E2 – MethaPlus L100, E3 – Axiase 100, d30 – day 30, 2, 5, 10 – double, five-times and 10-times bigger dosage.