

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Rok KACIJAN

**VPLIV PREDOBDELAVE SUBSTRATA S PISANO
PLOSKOCEVKO (*Trametes versicolor*) IN BUKOVIM
OSTRIGARJEM (*Pleurotus ostreatus*) NA
PRODUKCIJO BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Rok KACIJAN

**VPLIV PREDOBDELAVE SUBSTRATA S PISANO PLOSKOCEVKO
(*Trametes versicolor*) IN BUKOVIM OSTRIGARJEM (*Pleurotus
ostreatus*) NA PRODUKCIJO BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF SUBSTRATE PRETREATMENT WITH *Trametes
versicolor* AND *Pleurotus ostreatus* ON BIOGAS PRODUCTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

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

Komisija za dodpilomski študij Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Franca Pohlevna, za recenzenta pa prof. dr. Zdravka Kravanjo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Zdravko KRAVANJA
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo,
Oddelek za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora:

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

Rok Kacijan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 602.3:579.85:582.28:628.385:620.97 (043.2)
KG	<i>Pleurotus ostreatus/Trametes versicolor</i> /lignocelulozna biomasa/piščančji gnoj/anaerobna digestija/obnovljivi viri energije/bioplín
AV	KACIJAN, Rok
SA	POHLEVEN, Franc (mentor)
KZ	SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2016
IN	VPLIV PREDOBDELAVE SUBSTRATA S PISANO PLOSKOCEVKO (<i>Trametes versicolor</i>) IN BUKOVIM OSTRIGARJEM (<i>Pleurotus ostreatus</i>) NA PRODUKCIJO BIOPLINA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 58 str., 7 pregl., 23 sl., 68 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V svetu postaja naraščanje količine odpadkov vse večji problem, zato je izjemnega pomena, da preprečujemo oz. zmanjšujemo njihovo kopiranje in jih sproti izrabimo za proizvodnjo biogoriv, kot je bioplín. Na ta način zmanjšamo onesnaževanje okolja in nastajanje toplogrednih plinov ter tako prispevamo k blažitvi klimatskih sprememb. Bioplín je obnovljiv vir energije. Nastaja pri procesu anaerobne digestije, ki velja za stroškovno najučinkovitejšo biološko pretvorbo, z namenom proizvodnje električne energije in toplotne. Če v tem procesu uporabimo piščančji gnoj, pride do težav, saj so nastilju primešani lesni oblanci in žagovina. Lesni material bakterije, zaradi vsebnosti lignina, zelo težko ali pa sploh ne razgradijo. Tega pa lahko razgrajujojo lesne glive, povzročiteljice bele trohnobe. V raziskovalnem delu smo mešanico piščančjega gnoja in trstikovca različno dolgo izpostavili lesnima glivama <i>Trametes versicolor</i> in <i>Pleurotus ostreatus</i> . Z glivama preraščen substrat smo inokulirali z dvema različnima inokulum ter na osnovi sproščenega bioplina spremljali anaerobno digestijo. Rezultati kažejo, da vrsta glive in čas njenega preraščanja ter vrsta uporabljenega inokuluma vplivajo na količino proizvedenega bioplina. Najproduktivnejši je bil substrat, ki ga je prerasla pisana ploskocevka, v kombinaciji z inokulumom iz Bioplinarne Draženci. Pri tem je nastalo 28 % več bioplina, kot na substratu, ki ni bil izpostavljen lesni glivi.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 602.3:579.85:582.28:628.385:620.97 (043.2)
DX *Pleurotus ostreatus/Trametes versicolor/chicken manure/anaerobic digestion/renewable sources of energy/biogas*
AU KACIJAN, Rok
AA POHLEVEN, Franc (mentor)
PB SI 1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study program of Biotechnology
PY 2016
TI EFFECT OF SUBSTRATE PRETREATMENT WITH *Trametes versicolor* AND *Pleurotus ostreatus* ON BIOGAS PRODUCTION
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 58 p., 7 tab., 23 fig., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Globally, the ever growing volume of waste continues to pose an increasingly serious problem, which is why it is essential to prevent and decrease the accumulation of waste, making continuous efforts to exploit it for making biofuels, i.e. biogas. In this way, we would be able to decrease pollution of the environment and reduce the production of greenhouse gases, which will in turn mitigate climate changes. Biogas is a renewable energy source. It is produced in the process of anaerobic digestion – which is considered to be the most cost-efficient biological conversion – in order to generate electric power and heat. Issues might arise if chicken manure is used in this process because such litter contains wood shavings and sawdust, and bacteria have a difficult time breaking down wood matter due to the lignin content. However, it can be decomposed by wood decay fungi which cause white rot decay. In the framework of this research paper, we exposed a mixture of chicken manure and giant miscanthus for various time periods to two white rot fungi – *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. The colonized substrate was inoculated with two different inocula. We monitored anaerobic digestion based on the emitted biogas. The results indicate that the fungus type, colonization period and the type of inoculum used all influence the amount of generated biogas. The most productive substrate was the one colonized by *T. versicolor* in combination with the inoculum from the Draženci Biogas Plant. This yielded 28 % more biogas than the substrate that was not exposed to wood decay fungi.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 ANAEROBNA DIGESTIJA	4
2.1.1 Stopnje anaerobne digestije.....	5
2.1.1.1 Hidroliza	7
2.1.1.2 Acidogeneza	7
2.1.1.3 Acetogeneza.....	8
2.1.1.4 Metanogeneza.....	8
2.1.2 Vplivi na anaerobno digestijo.....	9
2.1.2.1 pH vrednost	9
2.1.2.2 Temperatura.....	9
2.1.2.3 Razmerje ogljik/dušik	10
2.1.2.4 Zadrževalni čas	10
2.1.2.5 Organska obremenitev	10
2.1.2.6 Hranila	10
2.1.2.7 Mešanje.....	10
2.1.2.8 Parcialni tlak vodika	11
2.1.2.9 Inhibitorne snovi.....	11
2.1.3 Proizvodi anaerobne digestije.....	11
2.1.3.1 Bioplín	12
2.1.3.2 Digestat.....	13

2.2 LIGNOCELULOZNA BIOMASA	14
2.2.1 Lignin.....	15
2.2.2 Celuloza	15
2.2.3 Hemiceluloza	15
2.3 PREDOBDELAVA LIGNOCELULOZNE BIOMASE	16
2.3.1 Lignocelulozni encimi.....	17
2.3.1.1 Celulitični encimi	17
2.3.1.2 Hemicelulitični encimi	18
2.3.1.3 Lignolitični encimi	18
2.4 LESNE GLIVE.....	19
2.4.1 Bukov ostrigar	19
2.4.2 Pisana ploskocevka	21
2.5 PIŠČANČJI GNOJ	22
2.6 TRSTIKOVEC	23
3 MATERIALI IN METODE	24
3.1 MATERIALI	24
3.1.1 Glivi bele trohnobe	24
3.1.2 Piščančji gnoj	24
3.1.3 Trstikovec	24
3.1.4 Inokulum	24
3.1.5 Laboratorijska oprema	24
3.1.6 Opis aparature	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Sušenje in mletje	26
3.2.2 Merjenje vlažnosti piščančjega gnoja in trstikovca.....	27
3.2.3 Priprava ustrezne mešanice	29
3.2.4 Priprava micelijev.....	30
3.2.5 Priprava in polnjenje kozarcev	30
3.2.6 Inokulacija in inkubacija	31
3.2.7 Odvzem z glivama preraščenega substrata v različnih časovnih intervalih	31
3.2.8 Priprava aparature za proces anaerobne digestije.....	32
3.2.9 Spremljanje nastalega bioplina	33
4 REZULTATI.....	36
4.1 PRODUKCIJA BIOPLINA.....	36
4.1.1 Uporaba inokuluma iz Bioplinarne Ihan	36

4.1.1.1 Vitalnost inokuluma	36
4.1.1.2 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz bioplinske naprave Farme Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
4.1.1.3 Celotna količina bioplina proizvedenega z uporabo inokuluma z Bioplinarne Ihan in substratom različno dolgo izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
4.1.1.4 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz bioplinske naprave Farme Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i>	38
4.1.1.5 Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i> ..	39
4.1.2 Uporaba inokulum z Bioplinarne Draženci	40
4.1.2.1 Vitalnost inokuluma	40
4.1.2.2 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
4.1.2.3 Celotna količina bioplina proizvedenega z uporabo inokuluma z Bioplinarne Draženci in substratom različno dolgo izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
4.1.2.4 Dinamika dnevno nastalega biplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i>	43
4.1.2.5 Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i> ..	44
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	46
5.1 RAZPRAVA.....	46
5.2 SKLEPI.....	49
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI.....	52
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Glavne stopnje anaerobne digestije (Belšak, 2015: 18)	6
Slika 2: Shema postopka pridobivanja energije, ki temelji na anaerobni digestiji (Rotar, 2014: 8)	12
Slika 3: Struktura lignoceluloze (Rotar, 2014: 3).....	14
Slika 4: Shema razdradnje lignoceluluznega materiala do biplina (Nemet, 2009: 3).	16
Slika 5: Mehanizem delovanja celulitičnih encimov (cit. po Belšak Šel, 2015: 13).....	17
Slika 6: Mehanizem delovanja hemicelulitičnih encimov (cit. po Belšak Šel, 2015: 14)...	18
Slika 7: Trosnjaki bukovega ostrigarja na štoru (foto: F. Poheven).....	20
Slika 8: Na štoru izrastli trosnjaki pisane ploskocevke (foto: F. Pohleven).....	22
Slika 9: Shematski prikaz anaerobnega digestorja, ki je povezan z bireto za odčitavanje volumna dnevno nastalega bioplina (prirejeno po Andreja Nemet, 2009: 18)..	26
Slika 10: Spiralno razporejeni noži rezalnega mlina Retsch SM2000 za fino mletje lignoceluloznega materiala (Humar, 2010: 76).....	27
Slika 11: Mešanica PG in trstikovca po enem tednu preraščanja z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
Slika 12: Mešanica PG in trstikovca po dveh tednih preraščanja z glivo <i>Trametes versicolor</i>	32
Slika 13: Laboratorijska aparatura za produkcijo bioplina in spremljanje nastale količine le-tega.....	33
Slika 14: Vitalnost (aktivnost) inokuluma iz Bioplinarne Ihan.....	36
Slika 15: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Slika 16: Količina nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
Slika 17: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i>	39

Slika 18: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i>	40
Slika 19: Aktivnost (vitalnost) inokuluma iz Bioplinarne Draženci.	41
Slika 20: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
Slika 21: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Pleurotus ostreatus</i> ..	43
Slika 22: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i>	44
Slika 23: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi <i>Trametes versicolor</i> ..	45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava bioplina (Al Seadi in sod., 2010: 43).....	13
Preglednica 2: Masni delež vode v trstikovcu	28
Preglednica 3: Masni delež vode v PG	28
Preglednica 4: Masni delež vode v mešanici PG in trstikovca.....	28
Preglednica 5: Povprečje masnih deležev vode v trstikovc, PG in njuni navlaženi mešanici.	28
Preglednica 6: Uporabljene kombinacije glive, časa izpostavitve substrata glivi in inokuluma za proces AD.....	34
Preglednica 7: Število in vrsta vzorca na posamezno serijo AD.....	35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BD	bioplinsarna Draženci, Perutnina Ptuj d.d.
BG	substrat, ki ni bil izpostavljen glivi
BI	Bioplinsarna Ihan
BT	bela trohnoba
H ₂ O	voda
Ino	inokulum
LB	lignocelulozna biomasa
LiP	lignin peroksidaza
<i>m</i> (PG)	teoretična masa piščančjega gnoja za pripravo mešanice, g
<i>m</i> (PG) _d	dejanska masa PG za pripravo mešanice, g
<i>m</i> (T)	teoretična masa trstikovca za pripravo mešanice, g
<i>m</i> (T) _d	dejanska masa trstikovca za pripravo mešanice
MnP	mangan peroksidaza
PDA	potato dextrose agar (krompirjev dekstrozní agar)
PG	piščančji gnoj
<i>Plo5</i>	bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>)
<i>Tv6</i>	pisana ploskocevka (<i>Trametes versicolor</i>)
<i>W</i> (PG)	vlažnost piščančjega gnoja
<i>W</i> (T)	vlažnost trstikovca

1 UVOD

Globalna energetska preskrba trenutno temelji na fosilnih virih (nafta, premog, lignit, zemeljski plin). So neobnovljiv vir energije in njihove zaloge sso omejene. Pričakuje se, da bo nafta vrhunec proizvodnje izkoriščanja dosegl v bližnji prihodnosti. Zato družba mora stremeti k zmanjševanju porabe fosilnih goriv, hkrati pa jih nadomeščati z obnovljivimi viri, kot je npr. bioplín. Ob rabi fosilnih goriv, se ob energiji v atmosfero sprošča ogljikov dioksid (CO_2). Le-tega uvrščamo med toplogredne pline, ki povzroča globalno segrevanje. Tudi pri izgorevanju bioplina se sprošča CO_2 , ampak je ta ogljik odvzet iz atmosfere s procesom fotosinteze rastlin. V nasprotju s fosilnimi gorivi, traja kroženje ogljika iz bioplina le eno do nekaj let (Al Seadi in sod., 2010).

Vse večji problem moderne družbe predstavlja naraščanje količine odpadkov. Zato je potrebno njihovo količino s sprotno izrabo zmanjševati. S temi ukrepi namreč zmanjšamo onesnaževanje okolja, nastajanja toplogrednih plinov in posledično pripomoremo k blaženju globalnih klimatskih sprememb.

Če je nekoč bilo običajno, da se odpadki odlagajo nenadzorovano, to danes vsekakor ni dopustno. Kljub temu, da se dandanes odpadki odlagajo na za to namenjena odlagališča ali pa se sežigajo, to nista najprimernejši rešitvi. Zato zakonodaja in standardi stremijo k rekuperaciji energije ter recikliraju organskih snovi. Rešitev za ravnanje s temi odpadki je anaerobna digestija, s katero proizvajamo bioplín. S tem postopkom ostalim odpadkom, ki niso organski, povečamo kalorično vrednost za sežig in stabilnost odlagališč, sočasno pa prispevamo k varstvu in izboljšanju okolja in naravnih virov (Al Seadi in sod., 2010). Proizvodnja bioplina predstavlja obnovljiv vir energije, saj se metan, ki je sestavni del bioplina, lahko uporabi za zamenjavo fosilnih goriv, in sicer tako za produkcijo toplotne in električne energije, tudi kot gorivo za vozila (Weiland, 2010).

Lignocelulozna biomasa (LB) predstavlja skoraj polovico rastlinskih virov, ki so proizvedeni s fotosintezo. Uporabi se le majhen del LB, ki je proizvedena kot stranski produkt v lesarstvo in kmetijstvu, saj se jo večinoma obravnava kot odpadek. LB sestavljajo celuloza, hemiceluloza in lignin. Te strukture so velika ovira pri mikrobiološki razgradnji, še posebej lignin. Tega lahko učinkovito razgradijo le glive bele trohnobe do CO_2 . To opravijo njihovi lignolitični encimi, za katere je značilna velika oksidativna aktivnost.

V Sloveniji in svetu pričenja bioplín zavzemati vse pomembnejšo vlogo pri izkoriščanju alterantivne energije. Največ se uporablja za hkratno proizvodnjo toplotne in električne energije (kogeneracija) na smetiščih, družinskih kmetijah, čistilnih napravah itd. V Avstriji in Nemčiji pa ga celo skušajo vključiti v javno plinsko mrežo ter za pogon motornih vozil. Bioplín lahko pridobivamo iz skoraj vseh organskih materialov. Pogoj je ta, da vsebujejo ustrezno razmerje med ogljikom in dušikom. Bakterije in arheje porabijo dušik iz proteinov

in ogljik iz ogljikovih hidratov. Ob koncu sedemdesetih let prejšnjega stoletja se je bioplín začel bolj masovno izkoriščati, in sicer predvsem iz živalskih fekalij. Danes se uporablajo tudi rastline (sirek, koruza, itd.), odpadki iz prehrambene in lesne industrije, komunalni odpadki, itd. (Ježič in sod., 2010). Najbolj etično primeren substrat za pridobivanje bioplina so odpadki. Če ga proizvajamo iz teh, imamo več rodovitne zemlje za pridelavo hrane, saj je ne zasedajo energetske rastline (Al Seadi in sod., 2010).

Bioplín nastane s procesom anaerobne digestije, ki ga lahko razdelimo na štiri stopnje, in sicer na: hidrolizo, acidogenezo, acetogenezo in metanogenezo. Izvajajo ga bakterije in arheje pri strogemu anaerobnem pogojih, kjer se organske snovi pretvorijo v bioplín, hranila in dodatni organski material, ostanek pa je sestavljen iz soli in nerazgrajenega organskega materiala (Belšak Šel, 2015). Bioplín, ki nastaja iz organskih odpadkov, je sestavljen iz 60 do 70 % metana, 30 do 40 % ogljikovega dioksida in <1 % dušika (Rasi, 2009). Anaerobna digestija da tudi dva uporabna stranska produkta. To sta toploplota in presnovljen substrat, ki je uporaben kot gnojilo z večjo vsebnostjo dušika v mineralizirani obliki amonijaka (Lah, 2010).

Odpadki predstavljajo obremenitev tudi za podjetje Perutnina Ptuj d.d. Eden izmed teh je piščančji gnoj, pomešan z nastiljem. Le-to je sestavljeno iz lesnih oblancev in žagovine z namenom zmanjšanja bakterijskih okužb pri vzreji piščancev (Kalan, 2010). Kot je že Zemek in sodelavci (1979) so ugotovili, da lignin, ki se nahaja v lesnih oblancih in žagovini deluje antibakterijsko. Piščančji gnoj v Perutnini Ptuj uporablja kot substrat v svoji bioplínarni v Dražencih. Težavo pri razgradnji predstavlja lignocelulozni material, saj zaradi tega nastaja manj bioplina, pa tudi ostankov je več.

1.1 NAMEN NALOGE

Cilj raziskave je ugotoviti, ali predobdelava substrata z glivama bele trohnobe *Trametes versicolor* in *Pleurotus ostreatus* pozitivno vpliva na količino nastalega bioplina. Glivi bosta preko delovanja svojih ekstracelularnih encimov odpirali strukturo celične stene, predvsem lignina, s čimer se bo povečala razpoložljiva površina substrata. Lignin bo postal bolj dostopen metanogenim bakterijam (Belšak Šel, 2015). Posledica te glivne predobdelave naj bi v procesu anaerobne digestije vodila v povečano produkcijo bioplina.

Substrat bo sestavljen iz piščančjega gnoja ter hitro rastoče rastline - trstikovca. Dodatek le-tega je nujen, saj je razmerje med ogljikom in dušikom v piščančjem gnuju neustrezno. Kalanova (2010) v svojem diplomskem delu pravi, da je optimalno masno razmerje 40 % piščančjega gnoja in 60 % trstikovca, saj v takem razmerju micelij glive substrat še dovolj dobro prerašča, hkrati pa se porabi čim večja količina piščančjega gnoja. Substrat bomo pustili, da micelij gliv prerašča en, dva ali tri tedne.

Pri procesu nastajanja bioplina bomo uporabili dva različna inokuluma. Eden bo iz bioplinske naprave Farme Ihan, drug pa iz Bioplinarne Draženci, Perutnine Ptuj d.d.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pred pričetkom dela smo si zastavili delovne hipoteze:

- pisana ploskocevka in bukov ostrigar različno preraščata substrat in s tem vplivata na delignifikacijo, posledično pa na količino nastalega bioplina,
- predobdelava substrata, v smislu izpostavitve glivam, vpliva na količino nastalega bioplina,
- trajanje izpostavitve substrata glivam vpliva na količino nastalega bioplina,
- inokulum in vrsta glive vplivata na količino nastalega bioplina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANAEROBNA DIGESTIJA

Proces anaerobne digestije (AD) je ena najstarejših tehnologij. Neuradni viri trdijo, da so bioplinski, ki je bil produkt AD, uporabljali za segrevanje vodnih kopeli v Asiriji že pred 3000 leti, trdijo neuradni viri. Po odkritjih kemijske strukture metana, vnetljivih plinov v usedlinah rek in močvirij ter temperaturnega vpliva na produkcijo le-tega v 18. in 19. stoletju, se je še v slednjem stoletju pojavil prvi anaerobni obrat za obdelavo odpadkov. To se je zgodilo leta 1859 v Bombaju v Indiji (Wellinger, 1999).

Z razumevanjem procesa AD in spoznavanjem koristi sta napredovala tudi tehnika in oprema za izvedbo procesa. Pojavil se je zaprt in ogrevan reaktor, v katerem je hkrati potekalo tudi mešanje. Kitajska in Indija sta uporabljali tehnologijo z živalskim gnojem, ostale države pa večinoma za obdelavo mulja v odpadnih vodah (Monnet, 2003). Zaradi nizke cene petroleja in premoga v preteklosti proizvodnja bioplina z AD ni doživel razcveta. Interes se je, zaradi pomanjkanja fosilnih goriv, nekoliko povečal med 2. svetovno vojno, ampak je po koncu lette zamrl (Belšak, 2008). Zanimanje se je povečalo, zaradi energijskih kriz leta 1973 in 1979. Države južne Azije, Indija ter Kitajska so pričele s širjenjem tehnologije AD, za katero so se uporabljali gospodinjski, živalski in človeški odpadki, bioplinski pa so izkoriščali za električno oskrbo stanovanjskih naselij (Verma, 2002).

Ob koncu leta 2005 je na Kitajskem obratovalo cca. 17 milijonov preprostih, družinskih bioreaktorjev. Proizveden bioplinski so večinoma uporabljali za razsvetljavo in kuhanje. V ZDA, Kanadi in Evropi na kmetijah deluje že več kot 3500 digestorjev. Več tisoč bioreaktorjev se uporablja za anaerobno stabilizacijo in zgoščevanje blata iz čistilnih naprav. V Evropi najdemo več kot 600 visokotehnoloških anaerobnih bioreaktorjev, ki služijo za čiščenje procesne vode, ki je onesnažena z organskimi odpadki in je odvečen produkt mlečne, živinorejske, mesne in papirne industrije (Lah, 2010).

Substrat, ki se uporablja za produkcijo bioplina, je biorazgradljiva organska snov. Najpogosteje so to:

- kmetijski organski odpadki (živinska gnojevka in blato),
- komunalni odpadki,
- organski odpadki lesne, prehrambene, farmacevtske in druge industrije,
- energetske rastline, ki so namensko pridelane (npr. koruza oz koruzna silaža).

Idealno je, če bioplinski proizvajamo iz odpadkov. Na ta način prispevamo k reševanju okoljske problematike, saj se na ta način količina odpadkov z leti ne bo povečevala. Če kot substrat uporabljamo odpadke, je več rodovitnih površin na voljo kulturnim rastlinam in jih ne zasedajo energetske rastline. Živinska gnojevka ima prednost pred ostalimi substrati, saj vsebuje anaerobne bakterije. Njena slabost pa je, da ima nizek donos metana. Rešitev je v

mešanju z ostalimi substrati. Takšna kodigestija se največkrat izvaja v bioplarnah za proizvodnjo bioplina (Al Seadi in sod., 2010).

Potrebno je vedeti, kolikšna je vsebnost suhe trdne snovi v substratu. Glede na vsebnost tekočine ločimo mokro in suho digestijo. Kadar uporabljamo živinsko gnojevko, ki vsebuje veliko vode in ima vlogo topila za ostale sosubstrate, izvajamo mokro digestijo. Tako lažje mešamo ter dosežemo boljšo homogenost surovin, zato je tudi pogosteje uporabljana kot suha digestija. Le-ta je pododna kompostiranju, kjer moramo večje kose zmleti v manjše. Ovoiro predstavlja tudi mešanje, ki je potrebno, a je veliko težje v primerjavi z mokro digestijo (Al Seadi in sod., 2010; Zupančič in Grilc, 2011).

Proces anaerobne digestije služi pretvorbi organske snovi v odstonosti kisika v bioplín, medtem ko ostanejo soli ter nerazgrajeni organski material. Bioplín je brez barve in vonja, gori z modrim plamenom, sestavljen pa je iz 55 do 75 % metana in od 25 do 45 % ogljikovega dioksida, vodne pare in vodikovega sulfida. Sam proces AD pri strogo anaerobnih pogojih opravlja bakterije in arheje (Dugba in Zhang, 1999; Veeken in Hamelers, 2000). Pri AD gre torej za niz metabolnih reakcij, ki potekajo med različnimi združbami mikroorganizmov (Verma, 2002).

Z AD dosežemo stabilizacijo organske snovi v blatih odpadnih vod, zmanjša se vsebnost patogenov, smrad in količina trdne snovi. Na proizvodnjo bioplina vplivajo vrsta in strukturne značilnosti substrata, inokulum, vrsta bioreaktorja, pH, temperatura, zadrževalni čas, stopnja obremenitve, razmerje med ogljikom in dušikom in hlapne maščobne kisline (Christy in sod., 2014).

Poznamo dve vrsti bioreaktorjev za AD, in sicer šaržni bioreaktor in kontinuirni bioreaktor. V njih poteka obdelava odpadkov, s katero izboljšujemo kakovost okolja, hkrati pa gre za tehnologijo trajnostnega pridobivanja energije (Christy in sod., 2014).

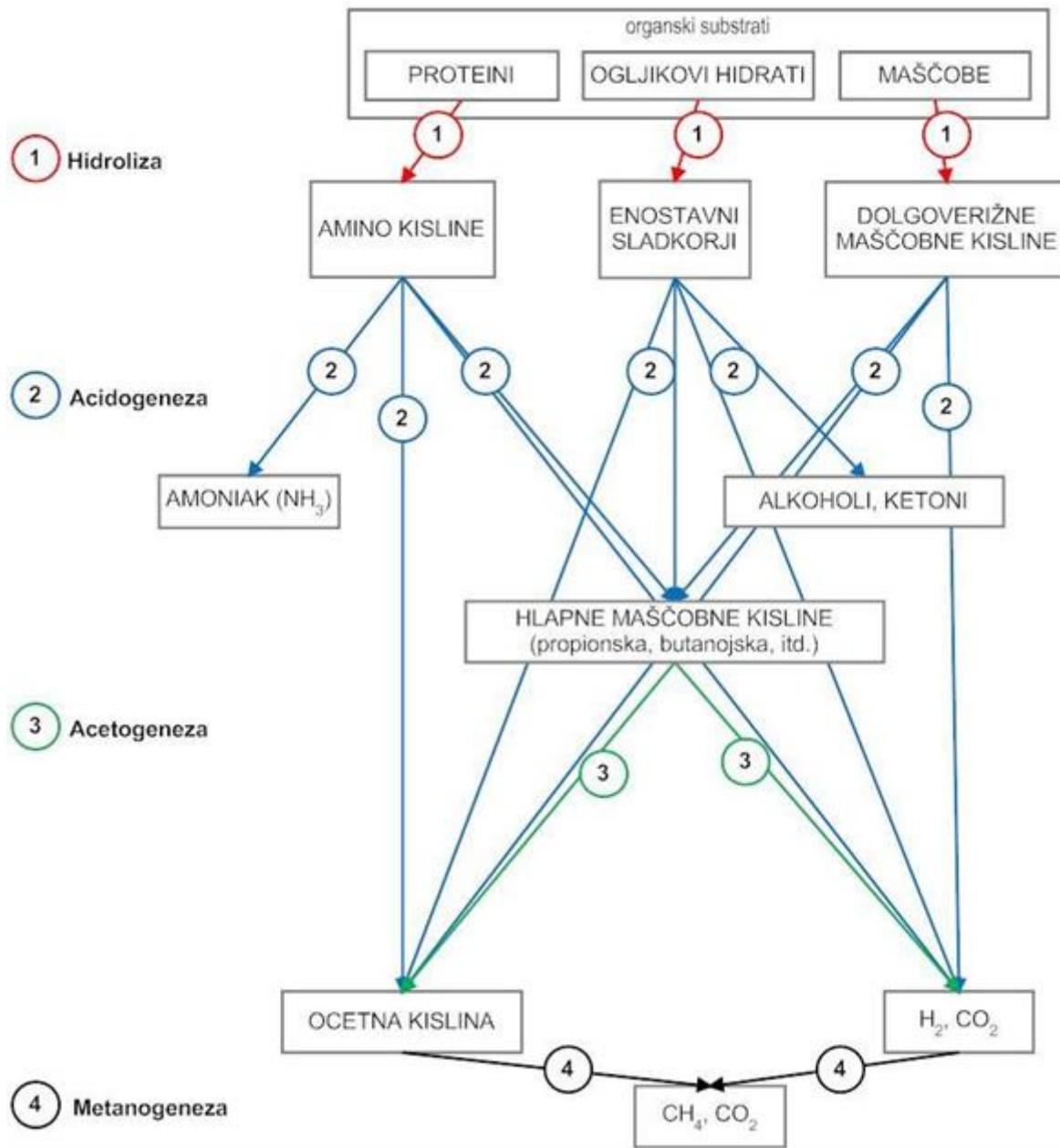
Optimizacije in modifikacije AD se lahko lotimo po različnih poteh. In sicer lahko izboljšamo spremljanje procesnih parametrov, s predobdelavo substrata omogočimo boljšo biorazgradljivost le-tega ali z mešanico dveh ali več vrst odpadkov (Muri, 2013).

2.1.1 Stopnje anaerobne digestije

Proces anaerobne fermentacije delimo na štiri glavne stopnje. To so (Belšak, 2015):

- hidroliza, pri kateri bakterije razgradijo kompleksne organske spojine v enostavne spojine,
- acidogeneza, kjer fermentacijske bakterije presnovijo enostavne organske spojine v hlapne maščobne kisline, ob hkratnem nastanku ogljikovega dioksida (CO_2) in vodika (H_2),

- acetogeneza je stopnja pretvorbe maščobnih kislin v ocetno kislino,
- metanogeneza za katero so odgovorne metanogene bakterije, ki iz H_2 in CO_2 ali acetata delajo metan (slika 1).



Slika 1: Glavne stopnje anaerobne digestije (Belšak, 2015: 18).

2.1.1.1 Hidroliza

Prva stopnja anaerobne digestije je hidroliza. V tej fazi se razgradijo netopni organski polimeri v vodotopne oligo- in monomere, ki so spodbjni prehajati celično membrano (Demirbas in sod., 2011). Ogljikovi hidrati, proteini ter maščobe pretvorijo v enostavne sladkorje, aminokisline, maščobne kisline in glicerol (Al Seadi in sod., 2010). To dosežemo s številnimi mikroorganizmi, kot so bakterije iz rodov *Micrococcus*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Vibrio* in *Bacillus* in drugi, ki izločajo hidrolitične encime: celulaze, amilaze, celobiazne, lipaze, proteaze, celobiazne. Ti ekstracelularni encimi bakterij, ki so fakultativni ali obligatni anaerobi, povzročajo hidrolitske reakcije, ki jih delimo na dva dela. V prvem hidrogenem bakterije pokrijejo površino trdnih delcev. Temu rečemo bakterijska kolonizacija. V drugem delu pa te bakterije izločijo encime, ki na površini pretvorijo kompleksne organske spojine v monomere, ki jih lahko uporabijo druge bakterije ali pa hidrolitične bakterije same (Vavilin in sod., 1996; Anderson in sod., 2003).

Trajanje hidrolize je odvisno od lastnosti substrata. Kompleksni ogljikovi hidrati razpadajo do enostavnih sladkorjev v nekaj urah, hidroliza lipidov in proteinov traja nekaj dni, lignocelulozo in lignina pa razpadata nepopolno in zelo počasi (Deublein in Steinhauser, 2008).

Hitrost AD je lahko omejena s hidrolizo v primeru, ko je substrat sestavljen iz velikih delcev z nizkim razmerjem med površino in prostornino, ker je dostopnost substrata manjša v primerjavi z manjšimi delci (Vavilin in sod., 1996).

V bioreaktorjih, kjer poteka AD, je 10^8 do 10^9 anaerobnih bakterij na mL digestata. Zraven najdemo še glive iz skupine zaprtotrosnic in prostotrosnic ter praživali, ki jih je zelo malo. Zato nimajo pomembne funkcije (Anderson in sod., 2003).

2.1.1.2 Acidogeneza

Acidogeneza je najhitrejša faza anerobne digestije. Produkti, ki so nastali po hidrolizi, prehajajo skozi celično steno mikroorganizmov, kjer steče acidogeneza ter ostale stopnje AD (Vavilin in sod., 1996). V tej fazi se produkti hidrolize pretvorijo v kratko verižne organske kisline, C1-C5 molekule, kot so ocetna kislina, maslena kislina, propionska kislina, alkohole, vodik (H_2) in ogljikov dioksid (CO_2). Količinsko največ nastane ocetna kislina (51 %), sledijo maščobne hlapne maščobne kisline in alkoholi, najmanj pa H_2 ter CO_2 (19 %) (Ahring, 2003). Delež posamezne maščobne kisline in koncentracija le-te vplivata na učinkovitost procesa AD, saj sta tako ocetna kot tudi maslena kislina pomembna predhodnika za nastajanje metana (Hwang in sod., 2001). Nezanemarljiv je tudi parcialni tlak vodika (H_2). Če je visok, namreč nastajata propionat in nekatere kratkoverižne maščobne kisline. Ko pa je nizek, to vodi v nastanek acetata in CO_2 (Khanal, 2008).

Zaradi nastanka številnih organskih kislin, pride do znižanja vrednosti pH v bioreaktorju. Pri takšnih pogojih (pH vrednosti med 4,5 in 5,5) odlično delujejo acidogene in acetogene bakterije (Demirel in Yenigün, 2002).

Acidogenezo izvajajo mikroorganizmi številnih rodov: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Desulfobacter*, *Escherichia*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Butyribacterium*, itd. Fakultativni mikroorganizmi porabljam kisik, ki je v substratu in na ta način zaščitijo na kisik občutljive metanogene arheje (Anderson in sod., 2003; Muri, 2013).

2.1.1.3 Acetogeneza

Metanogeni mikroorganizmi ne morejo direktno uporabiti acidogeneznih produktov, ampak je vmes potrebna še acetogeneza. V tej stopnji se maščobe, ki so daljše od dveh enot, alkoholi, ki so daljši od ene enote, razvezjane verige molekul in aromatske maščobne kisline oksidirajo do acetata, CO₂ in H₂, v nekaterih primerih pa tudi do formata (Schink in Stams, 2006; Belšak, 2015). Produkti so torej ocetna kislina, H₂ in CO₂.

Poznamo dva mehanizma acetogeneze, hidrogenacijo in dehidrogenacijo. O hidrogenaciji govorimo, ko s fermentacijo heksoz ali iz CO₂ in H₂ acetogeni hidrogenacijski mikroorganizmi vključujejo proizvodnjo acetata kot edinega končnega produkta. Pri dehidrogenaciji pa acetogeni dehidrogenacijski mikroorganizmi opravljajo anaerobno oksidacijo dolgo- in kratoverižnih, hlapnih maščobnih kislin (Belšak, 2015).

Acetogene bakterije so obligatni anaerobi, kateri optimalno delujejo pri pH = 6. (Shively in Barton, 1991). Predstavniki so *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei* ter bakterije iz rodov *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Acetobacterium*, *Butribacterium*, *Pelobacter* in *Clostridium* (Anderson in sod., 2003). Rastejo počasi in so zelo občutljive na spremembe okolja ter na nihanja v organski obremenitvi (Xing in sod., 1997). Pogoj za preživetje in rast teh bakterij je zelo nizki parcialni tlak vodika. V tem primeru nastajajo že omenjeni produkti: acetat, H₂ in CO₂. Če je parcialni tlak vodika visok, se sintetizirajo predvsem kapronska, butanojska, valerianska in propionska kislina ter etanol (Schink, 1997). V zadnji stopnji AD metanogeni mikroorganizmi za produkcijo metana potrebujejo visok parcialni tlak H₂. Rešitev je v simbiozi med metanogenimi in acetogenimi bakterijami. Slednje ves čas proizvajajo vodik, ki ga metanogene bakterije porabljam in na ta način ohranjajo nizek parcialni tlak vodika, ki je pogoj, da acetogene bakterije producirajo acetat, H₂ in CO₂ (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.1.1.4 Metanogeneza

V zadnji fazni nastaja metan, in sicer na dva načina. Prvi je s cepitvijo acetata v metan in CO₂ (acetoklastna metanogeneza). Pri drugem pa pride do redukcije CO₂ in H₂ v metan

(hidrogenotropna geneza) Slednja je pogosteje od acetoklastne metanogeneze in se pri njej lahko uporabi tudi format, kot glavni donor elektronov. Zanje so značilne bakterije iz rodov *Methanobacterium* in *Methanococcus*, za acetoklastno metanogeno pa *Methanosarcina* in *Methanotherrix* (Demirel in Scherer., 2008; Belšak, 2015).

Metanogeni so zelo odvisni od vrednosti pH, katera ne sme pasti pod 6, saj v tem primeru ne preživijo. Bolje uspevajo v rahlo alkalnem okolju (Belšak, 2015). V procesu AD je metanogeniza ključni in hkrati tudi najpočasnejši biomekični proces (Al Seadi in sod., 2010).

2.1.2 Vplivi na anaerobno digestijo

Kot je že Al Seadi s sodelavci (2010) zapisal, je učinkovitost anaerobne digestije odvisna od več dejavnikov. Izredno pomembno je, da anaerobnim mikroorganizmom zagotovimo primerne pogoje. Na njihovo aktivnost in rast vplivajo pH vrednost, temperatura, razmerje med ogljikom in dušikom, zadrževalni čas, organska obremenitev, mešanje itd. Zaradi občutljivosti bakterij je ključno, da ustvarimo okolje s strogo odsotnostjo kisika.

2.1.2.1 pH vrednost

Za stabilnost procesa v bioreaktorju je najpomembnejši faktor vrednost pH. Njegovo znižanje kaže na kopičenje kislin, hkrati pa to povzroči nestabilnost v bioreaktorju. Za bakterije, ki izvajajo AD, je sprejemljivo območje delovanje med pH 5,5 in 8,5. Stremeti je potrebno pa k nevtralnemu pH, saj je tam največja verjetnost, da metanogene bakterije delujejo optimalno (Chung in sod., 1999).

Verma (2002) v svojem članku navaja rešitev, da se zaradi prevelike količine hlapnih maščobnih kislin, v bioreaktor doda apno ali se spelje obtok filtrata, ki je produkt končne obdelave digestata. pH vrednost je med 7,2 in 8,2, ko je dosežena stabilizacija proizvodnje metana.

2.1.2.2 Temperatura

Kot večina drugih bioloških procesov, je tudi AD odvisna od temperature. Za proces AD obstajajo tri temperaturna območja. V psihrofilnem območju so anaerobne bakterije najbolj učinkovite pri temperaturi od 5 do 15 °C, v mezofilnem od 30 do 40 °C, v termofilnem pa od 50 do 60 °C (Yadvika in sod., 2004).

Termofilno temperaturno območje zagotavlja manj patogenih organizmov, višje stopnje obremenitve in višjo stopnjo degradacije substrata. Slabost uporabe termofilnih bakterij v industriji je, da so bolj občutljive na toksine, manj sposobne prilagoditve na temperaturne spremembe ter finančno zelo obremenjujoče, saj je potrebno digestat segrevati. Mezofilne

bakterije so bolj robustne od termofilnih in imajo večjo sposobnost prilagoditve na spremembe v okolju (Harmon in sod., 1993; Mata-Alvarez, 2003).

2.1.2.3 Razmerje ogljik/dušik

Yadvika in sodelavci (2004) navajajo, da je za učinkovito AD izjemnega pomena, da je razmerje v substratu med ogljikom in dušikom od 20:1 do 30:1. Ve se namreča, da mikroorganizmi med AD porabljamogljik 25 do 30 krat hitreje od dušika.

Če je razmerje C:N prenizko, pride do kopičenja amonijaka, kar posledično privede do zvišanja pH nad 8,5, ki pa je toksičen za metanogene bakterije. Visoko razmerje C:N pa rezultira v hitri porabi dušika, ki se kaže v nižji stopnji proizvodnje bioplina (Kangle K.M. in sod., 2012).

2.1.2.4 Zadrževalni čas

Zadrževalni čas je čas, ko substrat ostane v reaktorju. Določen je na podlagi povprečnega časa, ki je potreben za razgradnjo organskega materiala. S časom zadrževanja se veča stopnja razgradnje, ampak se hkrati tudi niža intenzivnost reakcij, zato je potrebno določiti optimalni zadrževalni čas, ki naj bi omogočal čim višjo stopnjo razgradnje pri čim nižjih stroških (Kim, 2011).

2.1.2.5 Organska obremenitev

Nayono (2010) v članku organsko stopnjo obremenitve definira kot količino organskih snovi, za katero je potrebno, da je obdelana v določeni prostornini reaktorja in v določenem časovnem obdobju. Če se poveča organska obremenitev, se to lahko izraža kot povečano število acidogenih bakterij. Posledica je padec pH, kar vodi v nestabilnost sistema in kasneje tudi v ustavitev procesa AD.

2.1.2.6 Hranila

Hranila, ki jih potrebujejo mikroorganizmi za AD, so: ogljik, dušik, fosfor in žveplo. Od elementov v sledovih pa kobalt, nikelj, molibden in volfram. Poleg prisotnosti hrani, je pomembno tudi razmerje med njimi. Če le-to ni ustrezno, je AD motena, produkcija metana pa posledično zmanjšana (Mudrack in Kunst, 2003).

2.1.2.7 Mešanje

Namen mešanja digestata v reaktorju je, da omogočimo čim boljši stik mikroorganizmov s substratom, ki ga morajo razgraditi. Prav tako pa tudi zmanjšuje koncentracijske in

temperaturene gradiente v digestatu, preprečuje nastanek pene ter zmanjšuje velikost delcev substrata (Karim in sod., 2005).

2.1.2.8 Parcialni tlak vodika

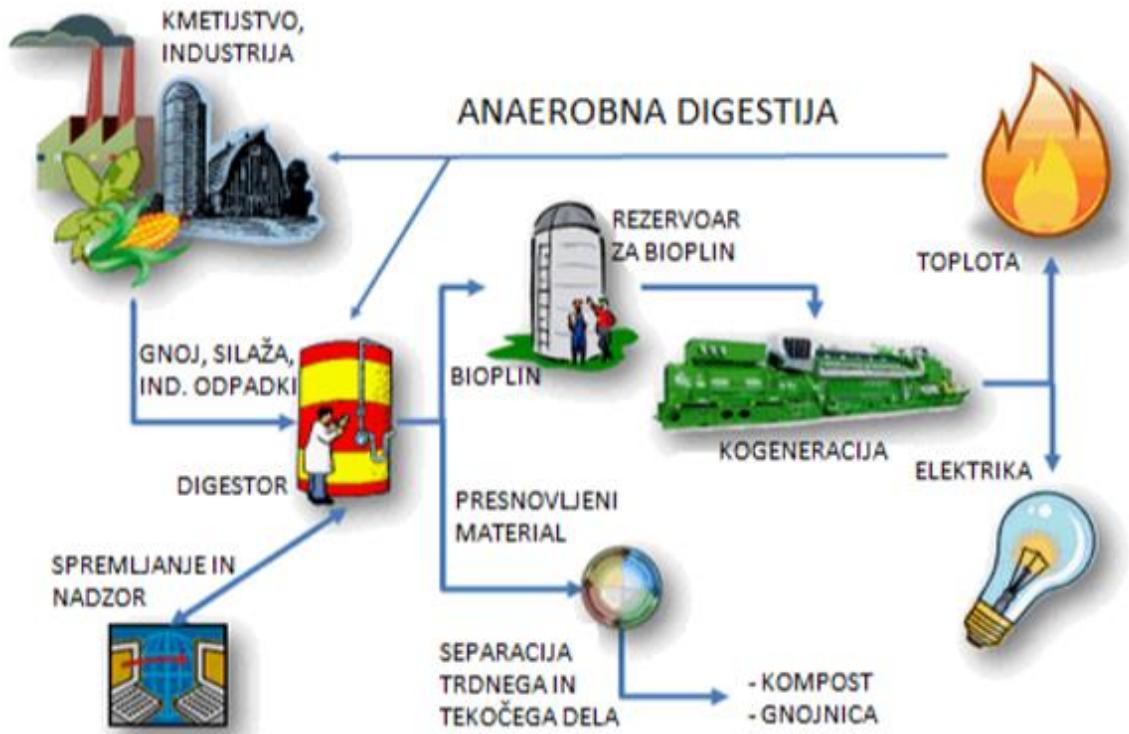
V bioreaktorju mora biti koncentracija vodika dobro uravnovežena med metanogenimi arhejami, ki vodik potrebujejo za produkcijo metana, in acetogenimi bakterijami, ki potrebujejo nizek parcialni tlak vodika. Rešitev je, da porabniki in producenti vodika živijo v sožitju. Vrsta mikrobov in substrata določata najvišji še sprejemljiv parcialni tlak vodika, pri katerem AD še normalno teče (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.1.2.9 Inhibitorne snovi

Sposobnost prilagoditve mikroorganizmov na inhibitorjev in njegova koncentracija ključno vplivata na inhibicijo AD (Deublein in Steinhauser, 2008). Kroeker s sodelavci je že leta 1979 ugotovil, da se največkrat kot inhibitorji pojavljajo kratkoverižne maščobne kisline, amoniak, sulfidic in težke kovine, ki povzročijo zmanjšano ravnovesje v produkciji metana. Kadar ima snov toksični učinek na mikroorganizme, lahko pride do popolne ustavitve metanogene aktivnosti.

2.1.3 Proizvodi anaerobne digestije

Cilj anaerobne digestije je, da iz organskih odpadkov dobimo dva uporabna produkta. Prvi je biopljin, ki se povečini koristi za proizvodnjo zelene energije, toplove ali goriva. Drugi pa je presnovljen substrat, ki mu rečemo digestat (slika 2). Uporablja se v kmetijstvu kot gnojilo (Monnet, 2003).



Slika 2: Shema postopka pridobivanja energije, ki temelji na anaerobni digestiji (Rotar, 2014: 8).

2.1.3.1 Bioplín

Med procesom anerobne digestije nastaja zmes plinov, ki jim rečemo bioplín. Holm-Nielsen in sodelavci (2009) v članku navajajo, da se bioplín lahko uporablja kot vir toplotne, hlajenja ali električne energije. Slednja se lahko trži. Uporaba kot toplotni vir je lahko npr. v industrijskih obratih za proizvodnjo pare ali segrevanje, s kogeneracijo pa v kombiniranih enotah toplotne in električne energije. Na ta način se sterilizacija digestata in njegovo segrevanje lahko opravita kar s toploto, ki jo je ta enota ustvarila.

Če bioplín želimo uporabiti kot gorivo za vozila, ga je potrebno predhodno očistiti oz. rafinirati. Potrebno je odstraniti vodikov sulfid, ki tvori korozivne žveplove kisline, ki poškodujejo pretvornike energije v kondenzatu. Priporočljiva je tudi odstranitev vode, saj lahko oteži delovanje plinskih šob (Holm-Nielsen in sod., 2009). Očiščen plin se lahko uporablja kot gorivo za motorna vozila. Vsekakor pa mora ustrezati strogim pogojem, ki velevajo, da dosega:

- konstantno sestavo brez mehanskih delcev, ki omogoča varno vožnjo in nemoteno obratovanje motorja,
- visoko kalorično vrednost, da lahko vozila prevozijo daljše razdalje,

- odpornost proti koroziji, ki bi lahko nastala, zaradi vodikovega sulfida, amonijaka in vode.

Bioplín, ki dosega te kriterije, je sestavljen iz vsaj 95 % metana, ki mora biti stisnjen. Je eno najčistejših goriv, ki ima le minimalen vpliv na okolje, zdravje ljudi in živali (Monnet, 2013).

Sestava bioplina (preglednica 1) je odvisna od (Muri, 2012):

- vsebnosti ogljikovodikovih polimerov,
- zadrževalnega časa, temperature, tlaka, vsebnosti vode v fermentorju,
- fizikalne strukture substrata,
- predobdelavo lignoceluloznega materiala.

Preglednica 1: Sestava bioplina (Al Seadi in sod., 2010: 43).

Zmes	Kemijski simbol	Vsebnost (vol.-%)
metan	CH ₄	50 - 75
ogljikov dioksid	CO ₂	25 – 45
vodna para	H ₂ O	2 (20 °C) – 7 (40 °C)
kisik	O ₂	<2
dušik	N ₂	<2
amoniak	NH ₃	<1
vodik	H ₂	<1
vodikov sulfid	H ₂ S	<1

2.1.3.2 Digestat

Po končani AD v bioplinskem obratu ostane predelan substrat, ki mu rečemo tudi digestat in ga uporabljam za gnojenje (celoten digestat ali pa samo tekoča faza). V procesu AD se je porabilo veliko ogljika, vodika in kisika. V digestatu pa so ostala pomembna mineralna rastlinska hrana. Z njegovo uporabo naredimo rodovitne površine bogatejše s hranljivimi snovmi, predvsem dušikom, fosforjem in kalijem in zmanjšamo potrebo po uporabi mineralnih gnojil. Tudi s finančnega vidika je ugodnejša pridelava, saj kvaliteto zemljišč dvignemo na višji nivo. Hrana, pridelana na takih zemljiščih, je bolj prijazna do okolja (Jejčič in Poje, 2010; Lah, 2010).

Če želimo optimalno izrabiti digestat kot gnjilo, je potrebno zadostiti zahtevam, ki veljajo tudi za neobdelan hlevski gnoj:

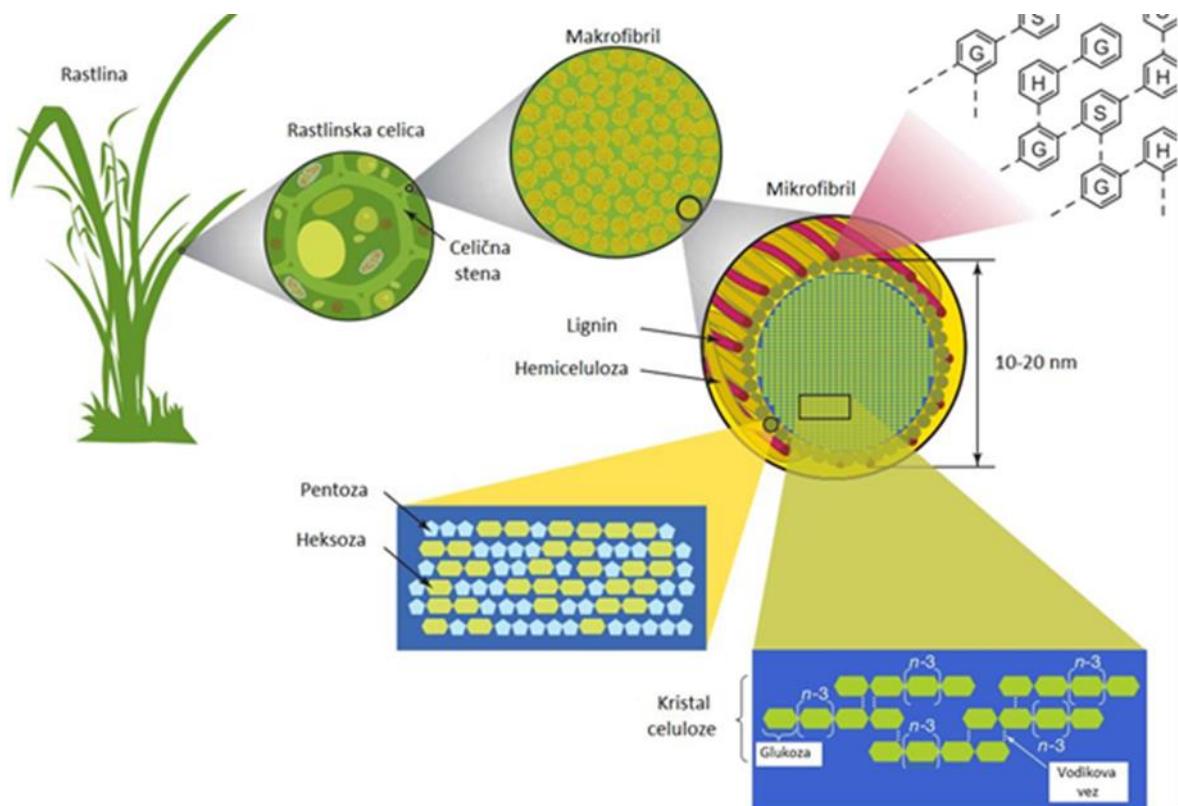
- omejena raba gnojila na sezono,
- zadostna kapaciteta skladiščenja,
- količinsko omejena raba gnojila na hektar zemlje,
- tehnika uporabe.

Najboljši čas za gnojenje z digestatom je, ko so rastline v stopnji hitre rasti. Takrat je manj možnosti za odtekanje nitratov v podatralnico, ker jih hitro porabijo rastline (Al Seadi in sod., 2010).

Jejčič s sodelavci (2010) navaja, da je za formiranje ter vzdrževanje humusa v zemlji pomembno gnojenje z digestatom. Če želimo z gnojenjem z uporabo takšnega gnojila dosegati optimalne rezultate, mora biti v čim bolj stabilnem stanju. To pa dosežemo s čim višjo stopnjo pretvorbe substrata v bioplín. Prav tako je važno, da digestat ne predstavlja nevarnosti za okužbo kmetijskih pridelkov in posledično povzroča infekcije pri ljudeh in živalih. To nevarnost znižujemo že v digestorju, kjer se med AD zaradi temperature in pH zmanjšuje število in vrsta patogenih organizmov, ki so bili v vhodnem substratu.

2.2 LIGNOCELULOZNA BIOMASA

Lignoceluloza je kompleksen material, ki ga sestavljajo celuloze, hemiceluloze in lignina. Ti polimeri so v celični steni tesno povezani in tako predstavljajo odporno rastlinsko biomaso. Celulozo obdajata lignin in hemiceluloza (slika 3).



Slika 3: Struktura lignoceluloze (Rotar, 2014: 3).

LB je težko razgradljiv, poceni obnovljiv vir energije za proizvodnjo biogoriva oz. bioplina. Lignocelulozo vsebujejo predvsem olesenele rastline. Encimi organizmov so sposobni razgradnje lignoceluloze z dehidracijo, hidrolizo in oksidacijo ogljikovih hidratov, ki so glavni gradniki. Kot ostanek jo najdemo predvsem v lesno-predelovalni in živilski industriji, gozdarstvu, kmetijstvu, itd. (Rotar, 2014).

Žal se večina lignoceluloznih ostankov odstranjuje s sežigom. LB, ki se obravnava kot odpadek, se lahko pretvarja v produkte z visoko dodano vrednostjo (Nemet, 2009). Proizvodnja bioplina, ki kot substrat uporablja LB, ni masovna. Razlog je v kompleksni strukturi rastlinskih celičnih sten, ki so odporne na mikrobiološko razgradnjo. Kljub temu pa zanimanje za proizvodnjo biometana iz LB v zadnjem obdobju narašča, saj gre za trajnostni vir substrata, ki je relativno poceni, obenem pa na voljo v precejšnjih količinah (Belšak Šel, 2015).

2.2.1 Lignin

Lignin je skupaj s celulozo najbolj zastopan naravni polimer. Najdemo ga v celičnih stenah, je neproposten in odporen proti mikrobnim okužbam in oksidativnemu stresu. Po strukturi gre za amorfni heteropolimer, ki ni vodotopen in optično ni aktiven. Sestavljen je iz enot fenilpropana, ki so med seboj povezane z različnimi vezmi. Njegova sinteza poteka s prostimi radikali, ki nastanje pri peroksidazno posredovani dehydrogenaciji kumaril alkoholasinapil alkohola ter koniferil alkohola. Slednji je glavna komponenta lesa iglavcev, ostala dva pa sta glavna gradniki lesa listavcev. Sestava lesa in količina prostega lignina v lesu je odvisna od vrste lesa, tipa celic in stopnje razvitosti vlakna. V lesu je vsebnost lignina približno od 20 do 35 % (Fan in sod., 1982; Perez in sod., 2002).

2.2.2 Celuloza

Celuloza je organski polisaharid, ki ga tvorijo D-glukozne enote. Slednje sestavljajo dolge verige, ki jih vežejo vodikove vezi in Van der Waalsove sile (Sanchez, 2009). Sestavlja 40-50 % lesne mase in predstavlja glavno sestavino lesa. Celulozo najdemo v dveh oblikah: 50 do 70 % v obstojni kristalinični obliki v oleseneli steni, ostala je v amorfni obliki. Njeni snopi gradijo skupke in na ta način oblikujejo kristalinične regije, katerim izmenično sledijo manj urejena amorfna območja. Mikrovlakna, ki so najmanjši snopi, formirajo obliko vlaken, le-ta pa gradijo celulozo, ki je netopna v večini topil in ima visoko natezno vrednost (Belšak Šel, 2015).

2.2.3 Hemiceluloza

Hemiceluloza je kompleksen polimer ogljikovih hidratov, ki jih sestavlja vrsta monomernih ogljikovih hidratov: L-arabinoza, D-manoza, D-glukoza, D-ksiloza, itd. Ti so povezani β -

1,4- glikozidnimi vezmi, redko pa z glikozidnimi vezmi. Sestavlja od 25 do 30 % suhe teže lesa (Hon in Shiraishi, 2000).

2.3 PREDOBDELAVA LIGNOCELULOZNE BIOMASE

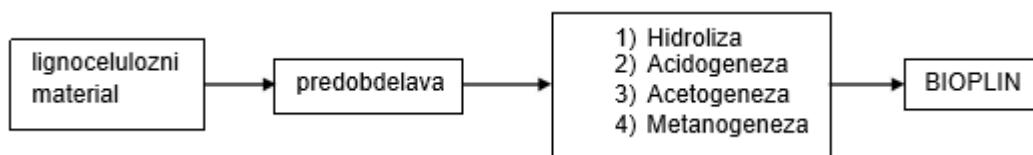
Odplake, industrijski, kmetijski in komunalni odpadki so primerni substrati za proizvodnjo bioplina. Zanje je značilno, da so po strukturi, sestavi ter kemijskih lastnostiih heterogeni. Medtem ko so ogljikovi hidrati, lipidi in beljakovine lahko razgradljivi, to ne velja za lignocelulozo, zaradi kompleksne in toge struktura (Nemet, 2009).

Tehnike, s katerimi skušamo doseči večjo poroznost substrata in s tem boljšo dostopnost, so kemijska (alkalna ali kisla obdelava), fizikalna (izpostavitev visoki temperaturi in tlaku, mletje, žarčenja) ter biološka predobdelava (izpostavitev glivam in delovanjem njihovih eksoencimov).

Uspešna predobdelava mora zadostiti čim več od naštetih pogojev (Hočevar, 2015):

- preprečiti razgradnjo ogljikovih hidratov, lipidov in beljakovin,
- izboljšati prebavljenosti substrata,
- preprečen mora biti nastanek inhibitorjev,
- raba kemikalij pri teh metodah mora biti minimalna,
- poraba energije mora biti čim nižja,
- tehnike morajo biti enostavne in okolju prijazne,
- stroški morajo biti čim nižji, da je postopek ekonomsko opravičljiv.

Ta pravila moramo upoštevati, če želimo z uporabo lignocelulozne biomase proizvajati čim več bioplina (slika 4). Cilj je namreč, da ta substrat naredimo dostopen za mikrobiološko razgradnjo. Vsem zgoraj naštetim pogojem ustrezta biološka predobdelava, natančneje gojenje gliv bele trohnobe na trdnih substratih (Hočevar, 2015). Razgradijo se polimeri v lignoceluloznem materialu, ki onemogočajo dostop mikroorganizmom ali ekstracelularnim encimom (Belšak, 2015). S to metodo pride do povečane razgradljivosti, kar vodi v večjo produkcijo bioplina (Nemet, 2009). Pazljivi pa moramo biti na to, da glive proizvajajo čim več encimov, ki jih želimo za razgradnji lignocelulozne biomase. To nam uspe s pravilno sestavo gojišča oz. substrata (Lah, 2010).



Slika 4: Shema razradnje lignoceluluznega materiala do biplina (Nemet, 2009: 3).

Predobdelava z glivami bele trohnobe ima tudi nekaj slabosti. To so velike izgube ogljika, dolgi zadrževalni časi in relativno nizka učinkovitost. Slednja lahko optimiziramo tako, da biološko obdelavo kombiniramo s katerim izmed drugih načinov predobdelave. Takrat govorimo o dvostopenjski predprocesni obdelavi (Lah, 2010).

2.3.1 Lignocelulozni encimi

Degradacija lignoceluloznih materialov poteka z različnim encimi, ki oksidirajo biomaso. Zaradi kompleksne zgradbe LB so potrebne najmanj tri skupine različnih encimov (odvisno od končnega produkta). Te skupine so celulitični, hemicelulitični in lignolitični encimi (Belšak Šel, 2015).

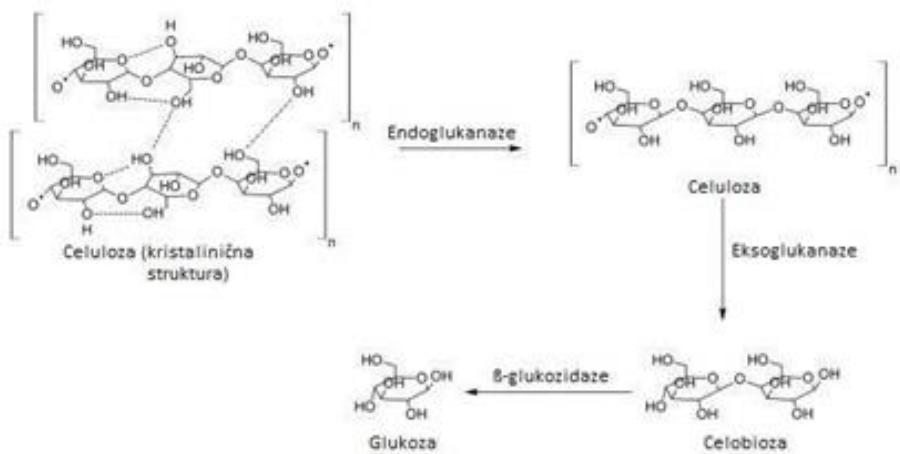
2.3.1.1 Celulitični encimi

Celulitične encime pridobivamo iz bakterij, gliv bele in rjave trohnobe. Odgovorni so za razgradnjo celuloze (cepijo β -1,4-glikozidno vez). Njihova glavna funkcija pa je hidrolitična razgradnja kristalinične celuloze v glukozo ter nadljnje produkte (slika 5). Glede področja aktivnosti, delimo celulaze v tri skupine: endoglukanaze, eksoglukanaze in β -glukozidaze.

Razgradnja celuloze poteka v treh fazah:

- adsorpcija na površino celuloze,
- razgradnja celuloze s pomočjo endo- in eksocelulaz,
- sprostitev celulaz z ostankov celuloze.

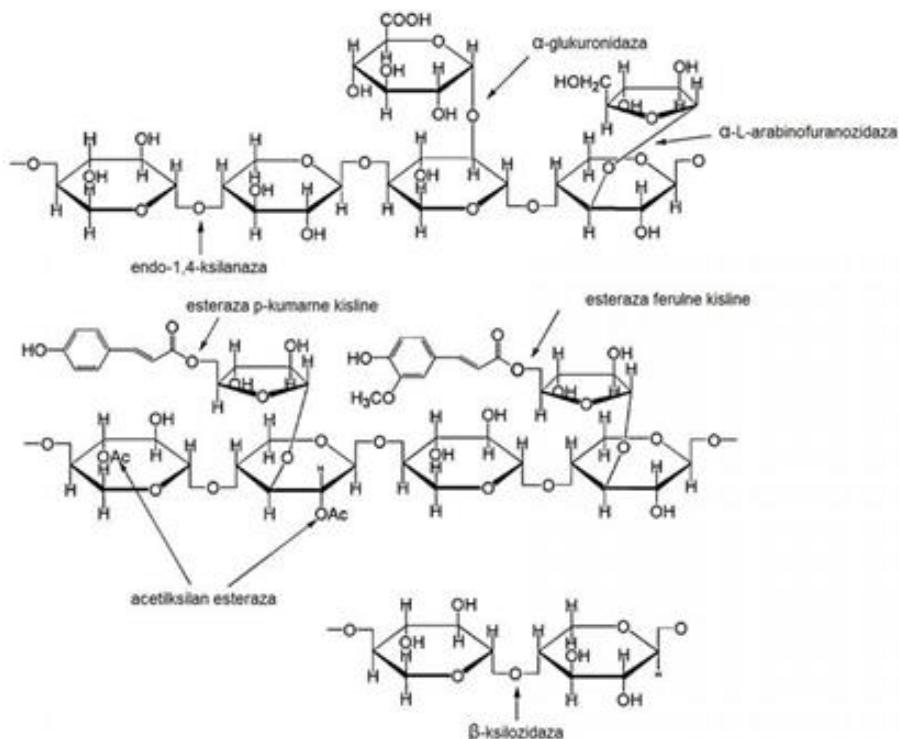
Stopnja hidrolize je odvisna od dostopnosti celulaz pri adsorpciji na celulozo. To lahko izboljšamo s predprocesnimi tehnikami, s katerimi razbijemo kristalinične elemente in vlakna (Lah, 2010).



Slika 5: Mehanizem delovanja celulitičnih encimov (cit. po Belšak Šel, 2015: 13).

2.3.1.2 Hemicelulitični encimi

Hemicelulitični encimi razgrajujejo hemicelulozo, ki je ena izmed komponent rastlinske celične stene in vsebuje predvsem β -glukan, ksilan, arabinoksilan, galakto manan, manan, ksiloglukan, galaktan, poligalakturonan in arabinan. Hemicelulosa je najbolj dostopna za razgradnjo. Poznamo dva tipa hemicelulaz: ene razgrajujejo glavno polisaharidno verigo, druge stranske verige (slika 6).



Slika 6: Mehanizem delovanja hemicelulitičnih encimov (cit. po Belšak Šel, 2015: 14).

2.3.1.3 Lignolitični encimi

Ligin je zelo kompleksno grajen, zato za popolno razgradnjo potrebuje številne oksidativne encime. To so lignolitični encimi, ki spadajo med ekstracelularne encime. Pomembni predstavniki so lakaze, mangan peroksidaze (MnP) in lignin peroksidaze (LiP). Delujejo na površino substrata, s čimer se tanjša celična stena rastline. Zaradi tega in razsloja lesnih vlaken, pride do tanjšanja stene in razgradnje substrata (Belšak Šel, 2015).

Lakaze, MnP in LiP kot oksidant nujno potrebujejo vodikov peroksid. Sinteza peroksidaz steče kadar pride do pomanjkanja dušika, ogljika in žvepla, ki se porabijo v primarnem metabolizmu. Praviloma najprej nastajajo MnP, šele kasneje LiP. Vpliv na to sintezo imajo

tudi manganovi ioni. Kadar v mediju niso prisotni, ne poteka sinteza MnP, medtem ko LiP do določene mere še nastajajo (Lah, 2010).

2.4 LESNE GLIVE

Lesne glice delimo glede na poškodbe lesa, ki jih povzročajo, na glice bele trohnobe (BT) in glice rjave trohnobe (RT).

Glice BT razgrajujo vse glavne gradnike lesa. To so celuloza, hemiceluloza in lignin. Slednji je zelo odporen na kemično in biološko razgradnjo (Ulčnik in sod., 2010).

Med glivami bele trohnobe po mikroskopskih in ultra strukturnih preiskavah ločimo dva vzorca razkroja. Kadar gliva BT razgraje celulozo, lignin in hemicelulozo sočasno, govorimo o simultani (neselektivni) delignifikaciji, ki je značilna za prostotrošnice (npr. *Trametes versicolor*, *Irpea lacteus*, *Phlebia radiata*, *Heterobasidion annosum* in *Phanerochaete chrysosporium*) in zaprtotrošnice (npr. *Xylaria hypoxylon*). Gre za postopen razpad celične stene od celičnega lumna proti srednji lameli, pri katerem ostanejo znatne količine nerazkrojenega lesa. Druga vrsta razkroja z glivami BT je selektivna delignifikacija ali zaporedni razkroi in je značilen za listavce in iglavce. V začetni fazi najprej poteka razgradnja lignina, hemiceluloza in celuloza pa se razkrojita kasneje. Tovrsten razkrok omogočajo izključno glice prostotrošnice (*Pleurotus spp*, *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phellinus spini*). Veliko vrst gliv BT povzroča obe vrsti trohnobe, tako selektivno kot tudi neselektivno. Količina lesa, ki se razkroji na en ali drug način, je odvisna od vrste glice BT, pri katerih prihaja do razlik tudi med različnimi sevi iste vrste, pa tudi od substrata (Martinez in sod., 2005; Pohleven, 2013).

Glice bele trohnobe uporabljajo dve vrsti ekstracelularnih encimskih sistemov. Eden je hidrolitični sistem, v katerega uvrščamo hidrolaze, s pomočjo katerega pride do razkroja polisaharida. Drugi je okdisativno ekstracelularno-ligninolitičen sistem, ki je odgovoren za razkrok lignina. To naredi tako, da odpre fenilni obroč (Sanchez, 2009). Predstavniki tega sistema so lignin peroksidaze (LiP), od mangana odvisne peroksidaze (MnP) in lakaze (Lac) (Ulčnik in sod., 2010).

2.4.1 Bukov ostrigar

Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) je saprofit, ki ga najdemo na severni polobli v zmernem in subtropskem pasu. Povzroča tipično belo trohnobo. Poznamo ga tudi pod imenom zimski ostrigar. Ime je dobil po ostrigam podobni obliki klobuka (slika 7). Nekateri pa trdijo, da ime izvira iz okusa, ki spominja na ostrige. Najpogosteje raste na lesu listavcev, predvsem na bukovini (*Fagus sylvatica*). Optimalno rast dosega pri 27 °C in pri vlažnosti lesa med 60 in 80 % (Humar, 2008).



Slika 7: Trosnjaki bukovega ostrigarja na štoru (foto: Pohleven F., 2016).

Pripisujejo mu številne terapevtske učinke. Lovastatin, ki ga suhi trosnjaki vsebujejo od 0,7 do 2,8 %, učinkovito znižuje raven škodljivega holesterola v krvi (Powel, 2010). Meerovich je s sodelavci (2005) ugotovil, da ekstrakti iz micelija zavirajo rast tumorjev pri miših *in vivo*. Za citotoksične, proti humanim rakavim celicam, pa so se izkazali vodni ekstrakti iz bukovega ostrigarja (Gu in sod., 2006; Pohleven in sod., 2015). Lektin, izolat iz bukovega ostrigarja, zavira rakava obolenja jeter in rast nekaterih vrst tumorjev (Wang in sod., 2000). Zelo okusni so trosnjaki bukovega ostrigarja, zato ga gojijo v prehrambene namene. Substrat, na katerem gojimo ostrigarja, odločilno vpliva na njegov okus (Humar, 2008).

Humar (2008) navaja, da se *Pleurotus ostreatus* uporablja za proces mikoremediacije, s katerim lahko razstrupljajo zemljo okuženo z odpadnimi olji, pesticidi ali biocidi. Encimi bukovega ostrigarja lahko v določenih pogojih mineralizirajo te polutante, saj imajo podobno strukturo kot lignin. Če bi z micelijem bukovega ostrigarja okužili sveže šture, bi na ta način preprečili ali pa vsaj omejili nezaželene okužbe s parazitskimi glivami (Gorjak, 2001).

Komercialne tehnike gojenja ostrigarjev so v svetu dobro razvite in enostavne, zato velja za najbolj prilagodljiv rod užitnih gob, ki je sposoben rasti na različnih lignoceluloznih materialih (Stamets, 2000). Za gojenje se po svetu uporablja različni substrati, kot so lesni ostanki in pšenična slama v Združenih državah Amerike ter Evropi, medtem ko je na Kitajskem največ riževe slame. Kot substrati se lahko pojavljajo še ostanki iz pivovarstva, pšenični ter riževi otrobi, koruzni storži, ostanki iz cvetličarstva in oljarski ostanki (Belšak Šel, 2015).

2.4.2 Pisana ploskocevka

Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) je ena izmed najbolj razširjenih lesnih gliv, tako pri nas kot tudi po svetu. Najdemo jo namreč po vseh kontinentih v listnatih in mešanih gozdovih, kjer okužuje poškodovana oslabljena drevesa in požagan les. Kadar je njen podgobje oskrbljeno z dovolj energije, iz lesa poženejo tanki klobučki v velikosti od 5 do 9 cm in imajo usnjato žilavo strukturo. Značilno je, da izraščajo v skupinah eden nad drugim. Pojavljajo se v različnih barvah od svetlo do temno rjave, okrasto rdeče do sive pa vse do črno modre barve. Pod klobučkom je trošnica, ki je bele barve in je sestavljena iz kratkih cevk, iz katerih se vsak dan sprosti na milijone trosov. Robovi klobučkov so vedno svetlejši, pri mladih gobah pa beli (slika 8). Zaradi tega so značilno pisani, kar se kaže tudi v imenu pisana ploskocevka (Pohleven, 2008; Pohleven in sod., 2015).

Tsukagoshi s sodelavci (1983) navaja, da so iz glive razvili dve zdravili PSP in PSK. Slednji deluje tako, da omili nezaželene stranske učinke radio in kemoterapije, skupaj s konvencionalnimi terapijami podaljšuje preživetveno dobo pri raku debelega črevesja, danke, maternice, želodca, požiralnika, pljuč ter nekaterih vrst raka prsi ter krepi imunski sistem. Parris (2000) povzema, da je PSP pri bolnikih z rakom želodca, pljuč, jajčnikov, požiralnika in vratu v 70 do 90 % močno okreplil imunski sistem.

Enako kot bukov ostrigar, se tudi pisana ploskocevka uporablja za mikoremediacijo. Z nespecifičnimi encimi razgrajuje ligninu podobne strukture, in sicer poliklorirane organske biocide. Sodeluje pri uničevanju posebnih odpadkov (npr. z Lindanom in pentaklorofenolom impregniran les) in razstrupljanju polj, na katerih so se uporabljala poliklorirana organska fitofarmacevtska sredstva, npr. Atrazin (Pohleven, 2008).

Zaradi že omenjene usnjate in žilave strukture, ni primerna za uživanje, ampak le za kuhanje čaja (Pohleven, 2008).



Slika 8: Na štoru izrastli trosnjaki pisane ploskocevke (foto: Pohleven F., 2016).

2.5 PIŠČANČJI GNOJ

V piščančjem gnuju najdemo živalske izločke in perje, krmila, odpadno vodo ter nastil. Potrebno je razlikovati med dvema vrstama PG. Eden je izpod baterij – to je čisti PG, drugi pa je pomešan z nastilom, ki vsebuje lognocelulozni material. Struktura in sestava PG sta odvisni od zunanje temperaure, vrste perutnine in starosti gnoja. V primerjavi z govejim hlevskim gnojem vsebuje tri do štirikrat več dušika, pet do desetkrat več fosforja (P_2O_5) in dva do trikrat več kalija (K_2O) (Kalan, 2010).

Na letni ravni nastanejo milijoni ton PG, ki jih je težko odstraniti. Povzročajo pa težave s površinskim onesnaženjem vode, kontaminiranjem podtalnice, neprijetnim vonjem, razvjem živalskih patogenov ter pojavom virusov.

PG se zaradi visoke vsebnosti dušika, kalija ter fosforja največkrat uporablja kot gnojilo. Obstaja nevarnost, da zaradi uporabe PG pride do kontaminacije z nitrati. Fosfor, ki ga rastline za rast in razvoj ne potrebujejo toliko, kot ga je v PG, pa se lahko spira v podtalnico. Da bi se temu izognili, so razvili alternativne rešitve za odstranitev PG: direktno izgorevanje, kompostiranje in fermentacijo.

Pri proizvodnji bioplina metanogene bakterije 25 do 30 krat hitreje porabljam ogljik kot dušik. Če je razmerje ogljika in dušika prenizko, ima to toksičen učinek na metanogene bakterije, kar se kaže v nižji produkciji bioplina (Kalan, 2010).

2.6 TRSTIKOVEC

Trstikovec (*Miscanthus* sp.), ki mu rečemo tudi miskant, je trajnica. Čeprav izhaja iz tropskega in subtropskega pasu, ga najdemo tudi v drugih klimatskih območjih. V Evropi se je pojavil šele okoli leta 1930. Danes poznamo veliko različnih okrasnih sort miskanta (Strgar, 1994; Lewandowski in sod., 2000).

Miskant uvrščamo med hitro rastoče rastline iz družine trav (Poaceae). Med te sodijo tiste, katerih energetski vnos (fossilna goriva, fitofarmacevtska sredstva, kultivacija) za rast in razvoj je manjši od končnega pridelka biomase (Kalan, 2010). Hitro rastoče rastline morajo učinkoviti uporabiti razpoložljivo vodo in dušik. Te rastline lahko porušijo biotsko pestrost v naravi, saj so povečini invazivne, zato moramo pri pridelovanju biti pazljivi (Heaton in sod., 2004).

Miskanti so elegantne visoke trave (do 4 metre), ki rastejo šopasto, pokončno ali rahlo povešeno. Iz šopov listov, ki so ozki z ostrimi robovi, rastejo cvetna stebla, na katerih so cvetni laski v latastih socvetjih (Strgar Satler, 2007). Miskant ne potrebuje veliko gnojil. Ko se konča rastna sezona, se namreč hranila transportirajo v rizom (prezimitveni organ), iz katerega se spomladi razvijejo poganjki. Mehansko ali kemično varstvo je potrebno v prvem letu rasti, kasneje to več ni potrebno. Škodljivci in bolezni, ki bi vplivali na proizvodnjo biomase, niso znani. Lahko se pojavijo le rumena pritlikavost, fuzarioza in *Leptosphaeria* sp. (Lewandowski in sod., 2000).

Ker je trstikovec sposoden adaptacije na klimatske razmere in ni zahteven za gojenje, kot energetska rastlina. Uporablja se kot trdo gorivo in za fermentacijo. Pridelujemo ga lahko na nerodovitnih, degradiranih in zapuščenih tleh ter na onesnaženih zemljiščih (Lewandowski in sod., 2000; Heaton in sod., 2004).

Tako kot iz vsake rastline ali organske snovi, je tudi iz trstikovca mogoče narediti gorivo. Le-to ima nekaj ključnih prednosti pred fosilnimi gorivi: rastline ne onesnažujejo zraka, saj ne vsebujejo žvepla ali drugih okolju škodljivih snovi. Lahko jih vzbujamo na lokalnem območju, s čimer postane energija dostopnejša (Kalan, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Glivi bele trohnobe

Za predobdelavo substrata smo uporabili glivi bele trohnobe:

- pisana ploskocevka – *Trametes versicolor* (Tv6) - ZIM L057 (Raspor in sod., 1995),
- bukov ostrigar – *Pleurotus ostreatus* (Plo5) – ZIM L031 (Raspor in sod., 1995).

Glivi hraniijo na Katedri za patologijo in zaščito lesa na Oddelku za lesarstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.1.2 Piščančji gnoj

Zreli piščančji gnoj, ki smo ga uporabili, je bil iz Bioplinarne Draženci, Perutnine Ptuj. Med gnojem so bili pomešani tudi lesni oblanci, ki so bili dodani v steljo.

3.1.3 Trstikovec

Trstikovec za izvedbo procesa anaerobne digestije smo dobili iz raziskovalnega poskusa na Dravskem polju.

3.1.4 Inokulum

Uporabili smo dva različna inokuluma, ki sta vedno bila sveža. Od odvzema inokuluma iz bioreaktorja v Dražencih ali Domžalah je minilo le nekaj ur, da smo ga uspeli transportirati v Ljubljano in pripraviti ter zagnati proces AD. Eden je bil iz Bioplinarne Ihan, drug pa iz Bioplinarne Draženci, Perutnine Ptuj d.d.

3.1.5 Laboratorijska oprema

Uporabili smo naslednjo opremo:

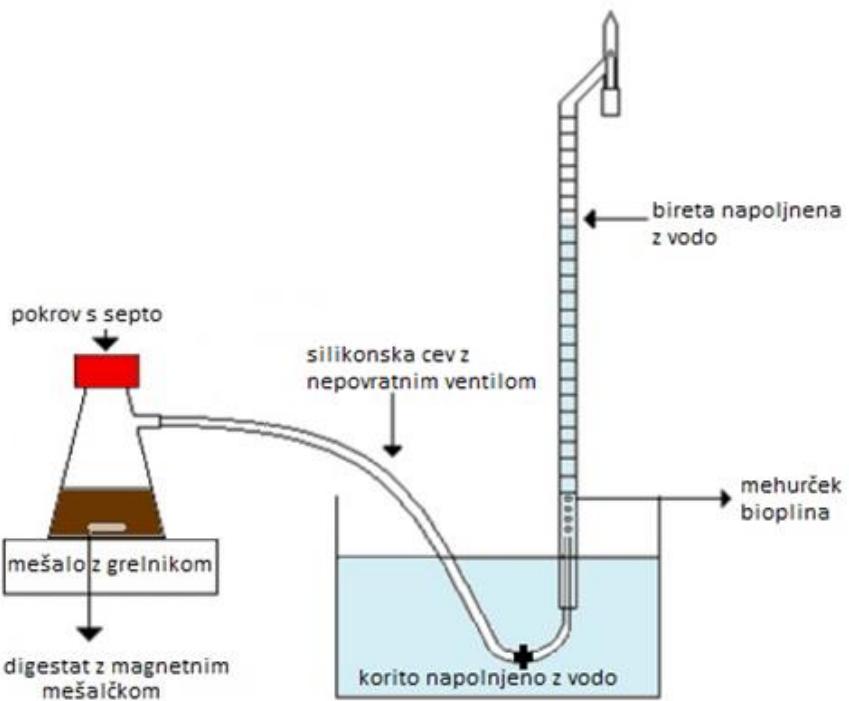
- mlin,
- tehtnica,
- petrijevke,
- laboratorijski sušilnik,
- eksikator,
- plastična posoda, 5 L,
- merilni valj, 50 in 100 mL,
- destilirana voda,

- pH meter,
- detergent za pomivanje posode,
- stekleni kozarci za vlaganje,
- preluknjani aluminjasti pokrovčki,
- sanitetna vata,
- tehnični etanol,
- avtoklav,
- laminarij,
- špiritni gorilnik,
- eza,
- plutovrt, Ø 0,5mm,
- rastna komora,
- zamrzovalnik,
- korita,
- plastične posode različnih velikosti,
- erlenmajerice z enim stranskim izhodom in navojem ter izbočenim dnom, 250 mL,
- gumijasti zamaški,
- silikonska cev,
- nepovratni ventili,
- mešalno - grelna plošča,
- magnetne palčke,
- birete, 100 mL,
- stojalo za birete,
- prižeme,
- stisnjeni argon,
- termometer in
- sesalka za pipetiranje.

3.1.6 Opis aparature

Kot anaerobni digestor smo uporabili 250 mL erlenmajerice z enim stranskim izhodom, ki so bile na vrhu neprodušno zaprte z gumijastimi zamaški. Na stranski izhod erlenmajeric smo plinotesno pritrtili silikonsko cev z nepovratnim ventilom. Ti so preprečevali uhajanje vode v cev, v primeru podtlaka v erlenmajerici. Cev je vodila v 100 mL birete, ki so bile napolnjene z vodo. Po cevi je izhajal nastali bioplín in iz birete izpodrival vodo (slika 9). Vsaka erlenmajerica je imela pripadajočo bireto, kar je bilo ustrezno označeno. Gretje in mešanje je potekalo z magnetnim mešalom, ki omogoča 15 mešalnih mest za 250 mL erlenmajerice, v katere smo dodali magnetne palčke. Eno mesto na grelno-mešalni plošči je bilo namenjeno erlenmajerici, v kateri je bila samo voda. Služila je za kontroliranje temperature. Ostalih štirinajst erlenmajeric smo pred pričetkom procesa AD prepihalo z argonom, s čemer smo ustvarili anaerobno okolje. Z mešalno-grelno ploščo smo omogočali

mešanje in gretje. AD je potekala v temperaturnem območju, $T = 38 - 41 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ter pri hitrosti magnetnega mešalčka 360 obratov na minuto.



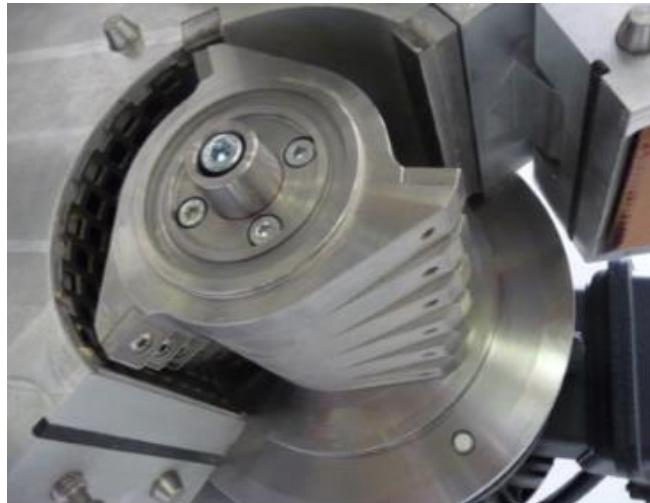
Slika 9: Shematski prikaz anaerobnega digestorja, ki je povezan z bireto za odčitavanje volumna dnevno nastalega bioplina (prirejeno po Andreja Nemet, 2009: 18).

3.2 METODE

3.2.1 Sušenje in mletje

Trstikovec smo najprej razrezali na 30 do 40 cm dolge dele, da smo jih lahko posušili v laboratorijskem sušilniku. Sušili smo 24 ur pri tempraturi $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Tudi piščančji gnoj smo sušili pri enakih pogojih.

Po sušenju smo trstikovec in piščančji gnoj vsakega posebej zmleli z mlinom Retsch SM2000. Uporabljeno je bilo sito z velikostjo odprtinici 1 mm (slika 10).



Slika 10: Spiralno razporejeni noži rezalnega mlina Retsch SM2000 za fino mletje lignoceluloznega materiala (Humar, 2010: 76).

3.2.2 Merjenje vlažnosti piščančjega gnoja in trstikovca

Z namenom, da bi mešanica, na katero bomo nacepili glivi, vsebovala prava masna razmerja, smo morali izmeriti vlažnost piščančjega gnoja in trstikovca, kasneje pa smo to izvedli še za njuno navlaženo mešanico. Za vse smo uporabili gravimetrično metodo.

Najprej smo pet petrijevk stehtali, nato pa v vsako natehtali približno 5 g trstikovca ali PG in jih dali v laboratorijski sušilnik, kjer smo jih pri temperaturi 103 °C sušili 24 ur. Po tem času smo petrijevke postavili v eksikator in počakali, da se ohladijo. Sledilo je tehtanje petrijevk. Ko smo od te vrednosti odšteli maso prazne petrijevke, smo dobili maso suhega substrata. Iz mas suhega in vlažnega substrata, pa smo po enačbi 1 lahko izračunali masni delež vode izražen v odstotkih (preglednice 2, 3 in 4).

$$W_{(H_2O)} = \frac{m_{(vlažne snovi)} - m_{(suhe snovi)}}{m_{(vlažne snovi)}} \cdot 100\% \quad \dots (1)$$

Preglednica 2: Masni delež vode v trstikovcu.

Oznaka	m (vlažne snovi) (g)	m (suhe snovi) (g)	$W_{(H2O)}$ (%)
1T	5,01	4,59	8,38
2T	5,01	4,58	8,58
3T	5,02	4,58	8,76
4T	5,00	4,56	8,80
5T	5,02	4,56	9,16

Preglednica 3: Masni delež vode v PG.

Oznaka	m (vlažne snovi) (g)	m (suhe snovi) (g)	$W_{(H2O)}$ (%)
1PG	5,10	4,56	10,59
2PG	5,01	4,48	10,58
3PG	5,06	4,55	10,08
4PG	5,02	4,50	10,36
5PG	5,02	4,50	10,36

Preglednica 4: Masni delež vode v mešanici PG in trstikovca.

Oznaka	m (vlažne snovi) (g)	m (suhe snovi) (g)	$W_{(H2O)}$ (%)
1TPG	5,01	1,66	66,87
2TPG	5,02	1,64	67,33
3TPG	5,01	1,65	67,07
4TPG	5,02	1,66	66,93
5TPG	5,02	1,65	67,13

V povprečju so masni deleži vode v trstikovcu znašali 8,74, v PG 10,39, vlažnost mešanice pa je bila 67 % (preglednica 5).

Preglednica 5: Povprečje masnih deležev vode v trstikovcu, PG in njuni navlaženi mešanici.

Substrat	trstikovec	PG	mešanica trstikovca in PG
$W(H2O)$ (%)	8,74	10,39	67,06

3.2.3 Priprava ustreznega mešanice

Želja je bila, da uporabimo čim več PG ter čim manj trstikovca. Kalanova (2010) je ugotovila, da je masno razmerje, pri katerem gliva še dovolj dobro prerašča substrat in se hkrati porabi največ PG, 40 PG in 60 % trstikovca.

Zatehtali smo količine PG in trastikovca, ki smo jih opisali v poglavju 3.2.2 ter ju skupaj vsuli v banjico in dobro premešali. Izmenično smo dodajali vodo in dobro mešali. Vmes smo prevezali, kdaj bo mešanica dovolj vlažna (60 do 70 %). To smo počeli po metodi, ki sta jo opisala Stamants in Chilton (1983). Pravita, da je mešanica dovolj vlažna takrat, ko jo stisnemo v pest in iz le-te priteče kaplica vode. Izkazalo se je, da metoda drži, saj smo naši mešanici kasneje izmerili vlažnost, ki je bila 67,06 %.

Preračunali smo, da bo za izvedbo vseh poskusov dovolj 1000 g mešanice PG in trstikovca. Ker le-ta nista enako vlažna, smo morali izračunati, koliko vsakega moramo uporabiti, da bo masno razmerje mešanice 40:60.

Izračun mase PG za pripravo mešanice (enačba 2):

$$m(\text{PG})_d = \frac{m(\text{PG})}{1-W(\text{PG})} \quad \dots (2)$$

$$m(\text{PG})_d = \frac{400 \text{ g}}{1-0,1039} = 446,4 \text{ g}$$

$$m(\text{PG})_d = 446,2 \text{ g}$$

Kjer je: $m(\text{PG})$ – teoretična masa PG za pripravo mešanice

$W(\text{PG})$ – vlažnost piščančjega gnoja

$m(\text{PG})_d$ - dejanska masa PG za pripravo mešanice

Izračun mase trstikovca za pripravo mešanice (enačba 3):

$$X(T)_d = \frac{m(T)}{1-W(T)} \quad \dots (3)$$

$$X(T)_d = \frac{600 \text{ g}}{1-0,0874} = 657,5 \text{ g}$$

$$X(T)_d = 657,5 \text{ g}$$

Kjer je: $m(T)$ - teoretična masa trstikovca za pripravo mešanice

$W(T)$ – vlažnost trstikovca

$X(T)_d$ - dejanska masa trstikovca za pripravo mešanice

3.2.4 Priprava micelijev

Micelije bukovega ostrigarja in pisane ploskocevke smo vzgojili v petrijevkah na gojišču PDA (potato dextrose agar; krompirjev dekstrozn agar). Odločili smo se, da pripravimo gojišče, ki bo zadostovalo za 25 petrijevk. Takšno količino smo pripravili, ker je v praksi lažje, kot pa če bi gojišče naredili le za dve petrijevki.

Najprej smo zatehtali 19,5 g PDA gojišča ter ga med hkratni mešanjem in segrevanjem na grelni plošči raztopili v 0,5 L vode. Ko je bil popolnoma raztopljen, smo ga nalili v steklenico za avtoklaviranje. Steklenico z gojiščem so avtoklavirali 40 min po enakem postopku, kot je že opisan v poglavju 3.2.4. Po koncu avtoklaviranja smo steklenico postavili v laminarij, v katerega smo si že pred tem pripravili sterilne plastične petrijevke. Za 5 minut smo prižgali UV luč, nato pa v vsako petrijevko nalili približno 2 do 3 mm gojišča. Ko je bilo gojišče v petrijevkah ohlajeno in strjeno, smo lahko pričeli s precepljanjem. Iz petrijevke, v kateri je že bil preraščen micelij glive, ki so ga imeli pripravljenega v Delovni skupini za patologijo in zaščito lesa na Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, cevič prenesli v svežo petrijevko. To smo naredili s pomočjo plutovrta, ki smo ga pred tem pomočili v etanol, na gorilniku ožgali in ga pustili, da se je ohladil. Nato pa narezali krožce z micelijem posamezne glive v velikosti Ø 0,5 mm. Ta krožec smo z ezo, ki je bila obdelana po enakem postopku kot plutovrт, prenesli v sredino naše petrijevke z gojiščem PDA. Obe petrijevki, tako z bukov ostrigar kot tudi za pisano ploskocevko, smo premestili v rastno komor, kjer je micelij preraščal gojišče. Približno na vsake tri tedne so celoten postopek ponovili, saj smo želeli, da je micelij, ki ga bomo uporabili za inokulacijo substrata, mlad in vitalen.

3.2.5 Priprava in polnjenje kozarcev

Kozarce za vlaganje in njihove preluknjjanje pokrovčke smo najprej umili z detrgentom za pomivanje posode ter jih temeljito splahnili pod tekočo vodo. Pustili smo jih, da se posušijo. Suhe smo potopili v banjico z etanolom, saj smo na ta način dosegli celotno površino. Spet smo pustili, da se osušijo. Da bi miceliju omogočili rast, kar je aeroben proces, in hkrati preprečili okužbo substrata, smo v pokrovčke vstavili sanitetno vato in mu s tem zagotovili dostop do zraka. Izračunali smo, koliko substrata bomo potrebovali za izvedbo AD, zato smo pripravili 25 kozarcev: 10 za inokulacijo z glivo *Pleurotus ostreatus*, 10 za inokulacijo z glivo *Trametes versicolor* in 5 za kontrolo ter jih nismo ikokulirali z micelijem gobe.

Vsak kozarec smo napolnili s 50 g ustrezno navlaženega substrata in ga zaprli s pokorovom. V PG je vrsta mikroorganizmov, ki bi lahko dodatno vplivala na rast micelija, zato smo kozarce s substratom avtoklavirali. Najprej smo preverili, ali je v avtoklavu dovolj vode, nato pa ga prižgali in vanj postavili kozarce. Ko je nadtlak narastel do 1 bar oz. temperatura dosegla 121 °C, smo kozarce avtoklavirali pol ure. Po tem smo avtoklav ugasnili in

postopoma spuščali paro. Po vzpostavitvi normalnega tlaka, smo kozarce premestili v laminarij, kjer smo jih pustili, da so se ohladili.

3.2.6 Inokulacija in inkubacija

Kozarce smo z namenom dodatnega razkužitve pustili v laminariju 5 minut pod UV lučjo, nato pa pri sterilnih pogojih pričeli z inokulacijo s pisano ploskocevko (Tv6) in bukovim ostrigarjem (Plo5). S pomočjo plutovrta in eze, katera smo opisali v poglavju 3.2.4., smo iz petrijevk narezali cevične posamezne glive v velikosti Ø 0,5 mm in jih v kozarce s substratom razporedili v obliki enakostraničnega trikotnika. Pokrovček in vrat kozarca smo ožgali pred vsakim odpiranjem in zapiranjem. Vse kozarce smo označili z datumom cepitve in vrsto glive.

Inokuliran substrat smo prestavili v rastno komoro, v kateri je bila temperatura 25 °C in 75 % relativna zračna vlažnost. Preraščanje posamezne glive je potekala en, dva in tri tedne.

3.2.7 Odvzem z glivama preraščenega substrata v različnih časovnih intervalih

Kozarce s substratom, preraščenim z micelijem gliv (Plo5 ali Tv6), smo v različnih časovnih intervalih vzeli iz rastne komore in jih do pričetka izvedbe AD shranili v zamrzovalniku (slike 11 in 12).



Slika 11: Mešanica PG in trstikovca po enim tednu preraščanja z glivo *Pleurotus ostreatus*.



Slika 12: Mešanica PG in trstikovca po dveh tednih preraščanja z glivo *Trametes versicolor*.

3.2.8 Priprava aparature za proces anaerobne digestije

Ustrezne kozarce smo en dan pred pričetkom AD vzeli iz zamrzovalnika ter jih prestavili v hladilnik. Dve uri pred pričetkom izvedbe poskusa, pa smo jih postavili na sobno temperaturo, da so se dokončno odtalili.

V erlenmajerico smo zatehtali 9,28 g substrata, preraščenega z glivo in kontrolo. Temu smo dodali 50 mL inokuluma. Pri vsaki seriji AD smo uporabljali svež inokulum, ki je bil star največ 1 dan, saj nismo želeli, da bi čas hranjenja inokuluma v hladilniku, vplival na rezultate. V naslednjem koraku smo dodali še 100 mL destilirane vode z umerjenim pH = 7. Nadaljnji postopek je že opisan v poglavju 3.1.6 (slika 13).



Slika 13: Laboratorijska aparatura za produkcijo bioplina in spremljanje nastale količine le-tega.

3.2.9 Spremljanje nastalega bioplina

Bioplín, ki je v erlenmajerici nastajal pri procesu AD, je potoval po silikonski cevki skozi z vodo napolnjenim koritom v bireto in iz nje izpodrival vodo. Iz nivoja vode v bireti smo odčitali, koliko bioplina je nastalo. V začetnih dneh je AD intenzivno potekala, zato smo morali nivo vode v bireti odčitavati dvakrat dnevno. Kasneje smo to počeli enkrat na dan ob približno enaki uri.

Skupaj smo pripravili 12 različnih kombinacij, pri katerih smo spremljali produkcijo bioplina. Oznaka vzorca je sestavljena iz vrste glive (Tv ali Plo), vrste inokuluma (Bioplínarna Ihan ali Bioplínarna v Dražencih, Perutnine Ptuj d.d.) in števila tednov, ko je preraščala substrat (en, dva ali tri) (preglednica 6).

Preglednica 6: Uporabljene kombinacije glive, časa izpostavitve substrata glivi in inokuluma za proces AD.

Oznaka	Vrsta glive	Čas preraščanja micelija	Inokulum
TvBI-1	<i>Tv6</i>	7 dni	Bioplinsarna Ihan
TvBI-2	<i>Tv6</i>	14 dni	Bioplinsarna Ihan
TvBI-3	<i>Tv6</i>	21 dni	Bioplinsarna Ihan
TvBD-1	<i>Tv6</i>	7 dni	Bioplinsarna Draženci
TvBD-2	<i>Tv6</i>	14 dni	Bioplinsarna Draženci
TvBD-3	<i>Tv6</i>	21 dni	Bioplinsarna Draženci
PloBI-1	<i>Plo5</i>	7 dni	Bioplinsarna Ihan
PloBI-2	<i>Plo5</i>	14 dni	Bioplinsarna Ihan
PloBI-3	<i>Plo5</i>	21 dni	Bioplinsarna Ihan
PloBD-1	<i>Plo5</i>	7 dni	Bioplinsarna Draženci
PloBD-2	<i>Plo5</i>	14 dni	Bioplinsarna Draženci
PloBD-3	<i>Plo5</i>	21 dni	Bioplinsarna Draženci

Kljub temu da smo imeli na voljo dve grelno-mešalni plošči, kar pomeni, da je bilo prostora za 30 erlenmajeric, to ni bilo dovolj, da bi vse kombinacije, ki smo jih uporabili za AD, opravili hkrati. Zato smo poskuse na dveh grelno-mešalnih ploščah izvedli v štirih serijah. Kot je razvidno iz preglednice 6, je samo 12 različnih kombinacij. Preostali dve kombinaciji sta bili kontrolni: mešanica PG in trstikovca brez preraščanja glive ter samo inokulum brez substrata (negativna kontrola) (preglednica 7). Nastajanje bioplina smo spremljali in beležili 21 dni.

Preglednica 7: Število in vrsta vzorca na posamezno serijo AD.

Serija	Oznaka	Število digestorjev/paralelk
1.	Plo1BI	6
	Plo2BI	6
	Plo3BI	6
	BG	6
	Ino	4
2.	Tv1BI	6
	Tv2BI	6
	Tv3BI	6
	BG	5
	Ino	4
3.	Plo1BD	5
	Plo2BD	4
	Plo3BD	5
	BG	5
	Ino	6
4.	Tv1BD	4
	Tv2BD	3
	Tv3BD	5
	BG	4
	Ino	6

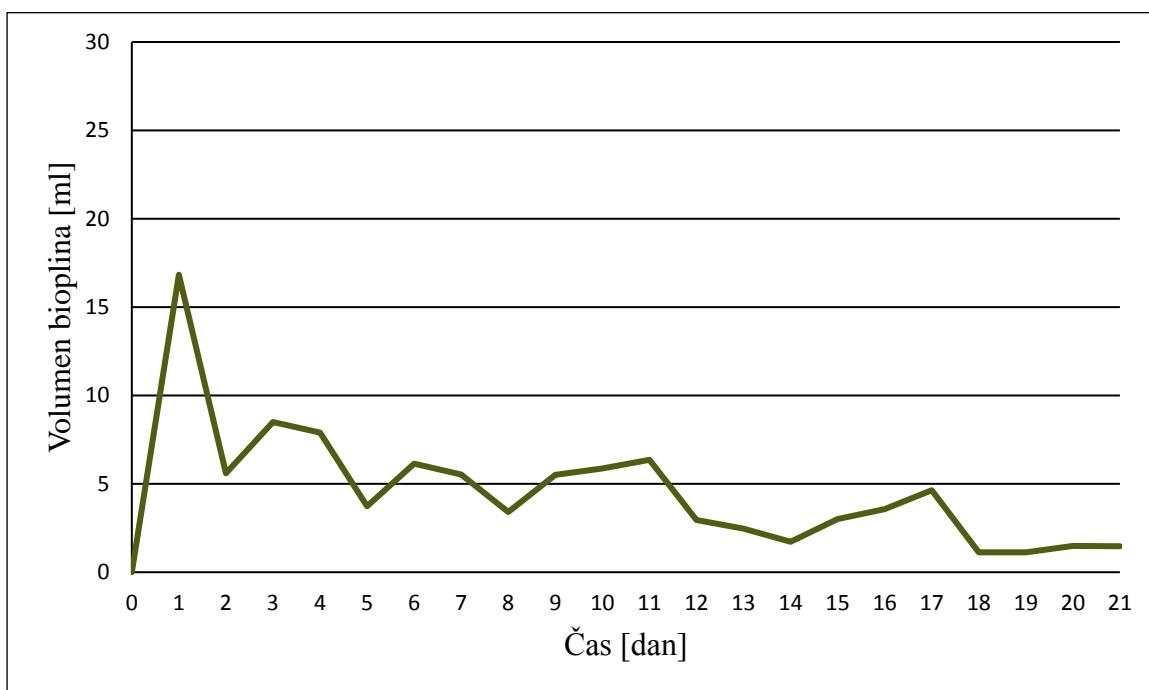
4 REZULTATI

4.1 PRODUKCIJA BIOPLINA

4.1.1 Uporaba inokuluma iz Bioplinarne Ihan

4.1.1.1 Vitalnost inokuluma

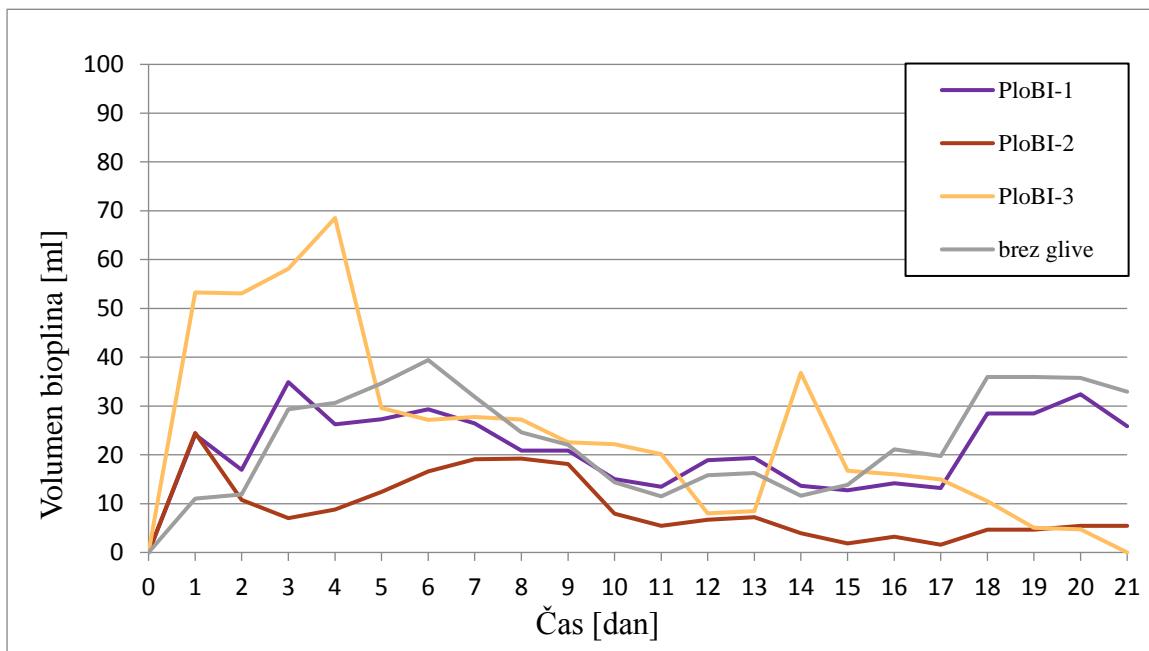
Aktivnost inokuluma (gnojevke) z Bioplinarne Ihan smo spremljali 21 dni. K skupnemu volumnu so največ prispevali prvi širje dnevi, nato pa se je produkcija, zaradi odsotnosti substrata, v naslednjih sedmih dneh zmanjšala na cca. 5 mL na dan, v zadnjih desetih dneh pa samo na približno 3 mL na dan (slika 14).



Slika 14: Vitalnost (aktivnost) inokuluma iz Bioplinarne Ihan.

4.1.1.2 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz bioplinske naprave Farme Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*

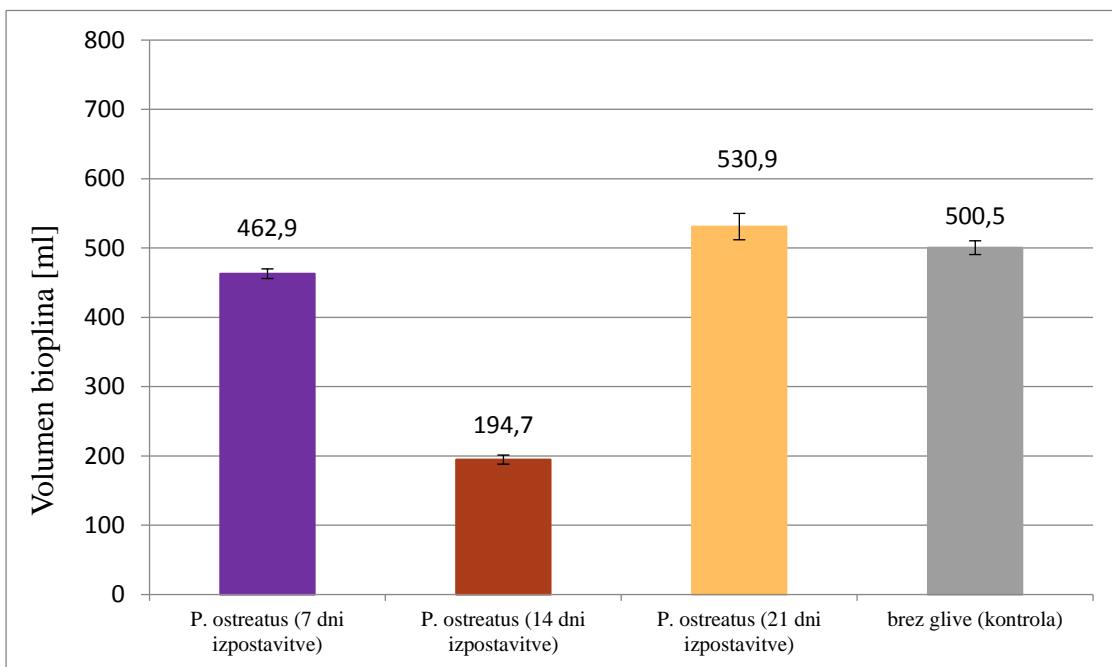
Največjo proizvodnjo bioplina smo izmerili v prvih devetih dneh fermentacije. V tem obdobju še zlasti izstopa vrh, ki predstavlja substrat, izpostavljen 21 dnevni izpostavitevi bukovemu ostrigarju (PloBI-3). V prvih štirih dneh je bila njegova produkcija večja kot skupna produkcija PloBI-2. Le-ta je bil najmanj aktiven, saj je po destem dnevu v povprečju nastajalo le 5 mL bioplina na dan. Po dinamiki nastajanja bioplina sta si zelo podobna seriji PloBI-1 in vzorec, ki ni bil izpostavljen delovanju glive. Obe seriji imata dva vrhova; prvega tretji oz. šesti dan, nakar se je obema produkcija upočasnila, nato pa spet narastla po 15. dnevu, kar se vidi po drugem vrhu med 18. in 20. dnem (slika 15).



Slika 15: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*.

4.1.1.3 Celotna količina bioplina proizvedenega z uporabo inokuluma z Bioplinarne Ihan in substratom različno dolgo izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*

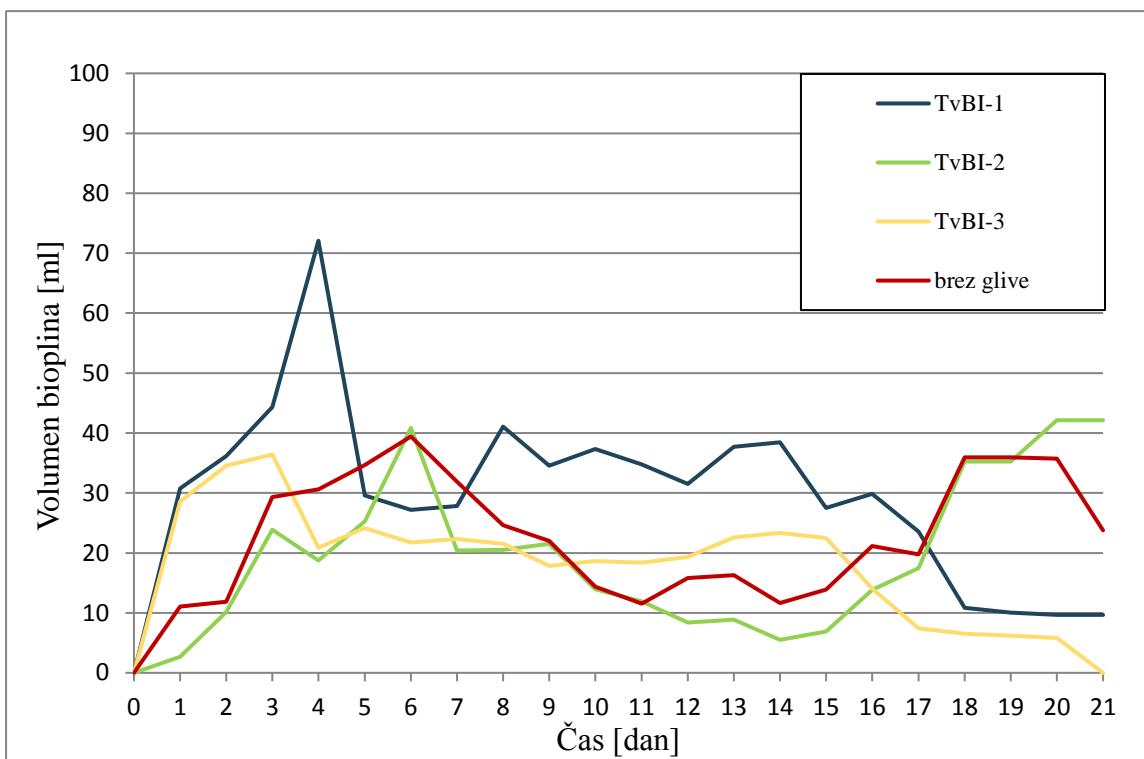
Občutno najmanjša količina bioplina je nastala pri substratu, ki ga je zimski ostrigar preraščal 14 dni, saj je dosegel le ~42 % produkcije drugega najmanjšega izkupička, ki pripada sedem dnevemu preraščanju substrata z omenjeno glivo. Kot količinsko najproduktivnejša se je izkazala 21 dnevna izpostavitev substrata glivi *Pleurotus ostreatus* (530,9 mL), ki mu sledi nepreraščen vzorec z le 30 mL manj nastalega bioplina, kar je v obdobju treh tednov zelo malo, približno 6 % (slika 16).



Slika 16: Količina nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*.

4.1.1.4 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz bioplinske naprave Farme Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*

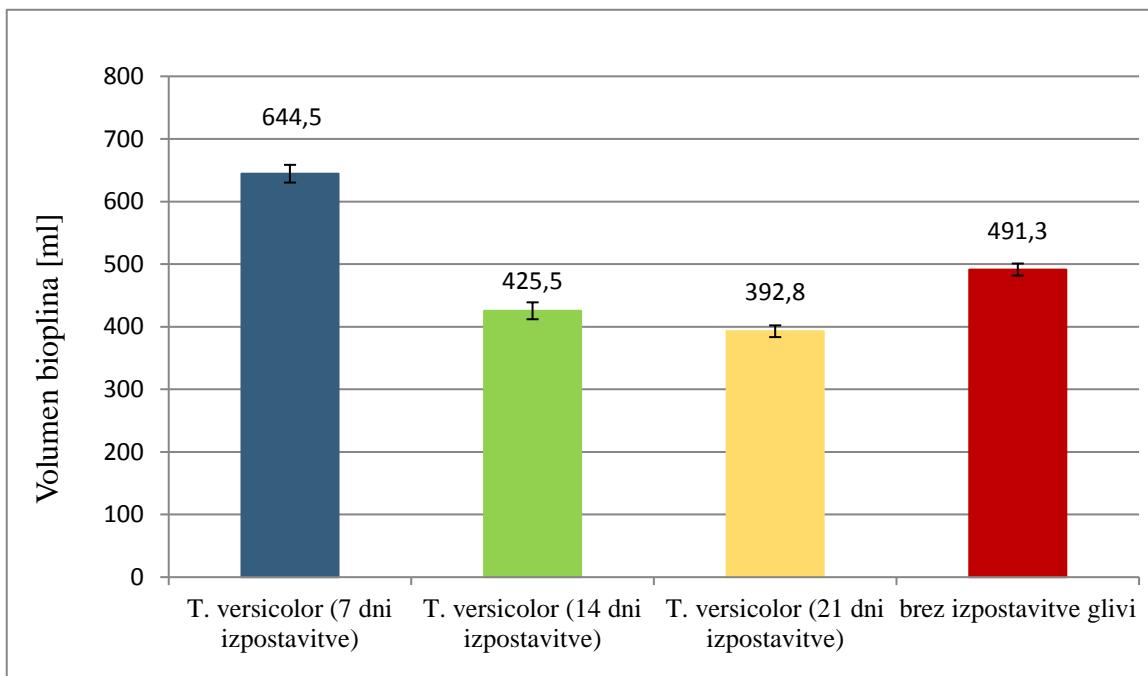
Najaktivnejše nastajanja bioplina kaže vzorec TvBI-1, ki je v četrtem dnevu dosegel več kot 70 mL nastalega bioplina. V naslednjih treh dneh je produkcija padla, nato pa spet narastla in je od 8. do 16. povprečno dosegala več kot 30 mL dnevno nastalega bioplina. Po trendu nastajanja bioplina sta si podobna vzorec TvBI-2 in nepreraščen vzorec. Oba sta prvi vrh dosegla šesti dan, sledil je padec do 14. dne, ko je produkcija spet pričela naraščati, in sicer vse do 20. dne (slika 17).



Slika 17: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*.

4.1.1.5 Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*

Kot je že na prvi pogled očitno, količina nastalega bioplina pada s časom izpostavitve glivi *Trametes versicolor*. Dlje časa kot je gliva preraščala substrat, manj bioplina nastane. Največ bioplina je tako nastalo pri vzorcu TvBI-1 (644,3 mL). Na substrat v tem vzorcu je torej gliva s svojimi eksoencimi delovala le en teden, zato je razumljivo, da je na drugem mestu, po produkciji bioplina, nepreraščen vzorec, saj sta si substrata, ki sta le malo oz. nič obdelana, relativno podobna. Presenetljiva pa je le razlika v nastalem bioplincu, saj je pri nepreraščenem vzorcu nastalo 24 % manj bioplina, kot pri enotedenskem preraščanju, kar kaže na pozitiven vpliv glive na produkcijo bioplina (slika 18).

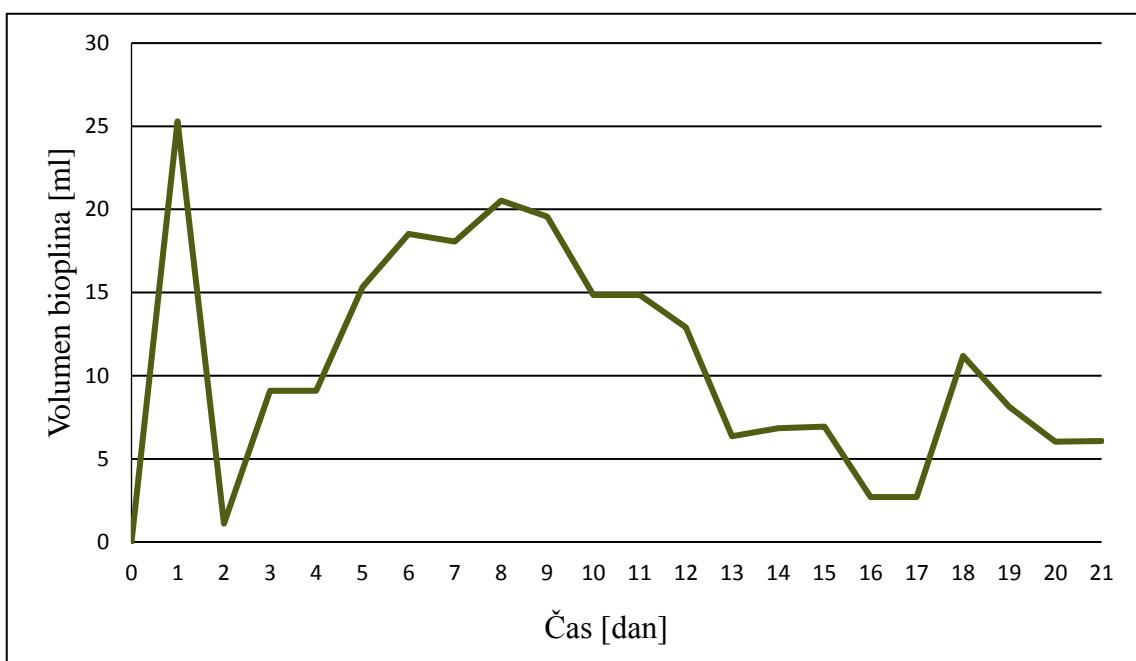


Slika 18: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*.

4.1.2 Uporaba inokulum z Bioplinarne Draženci

4.1.2.1 Vitalnost inokuluma

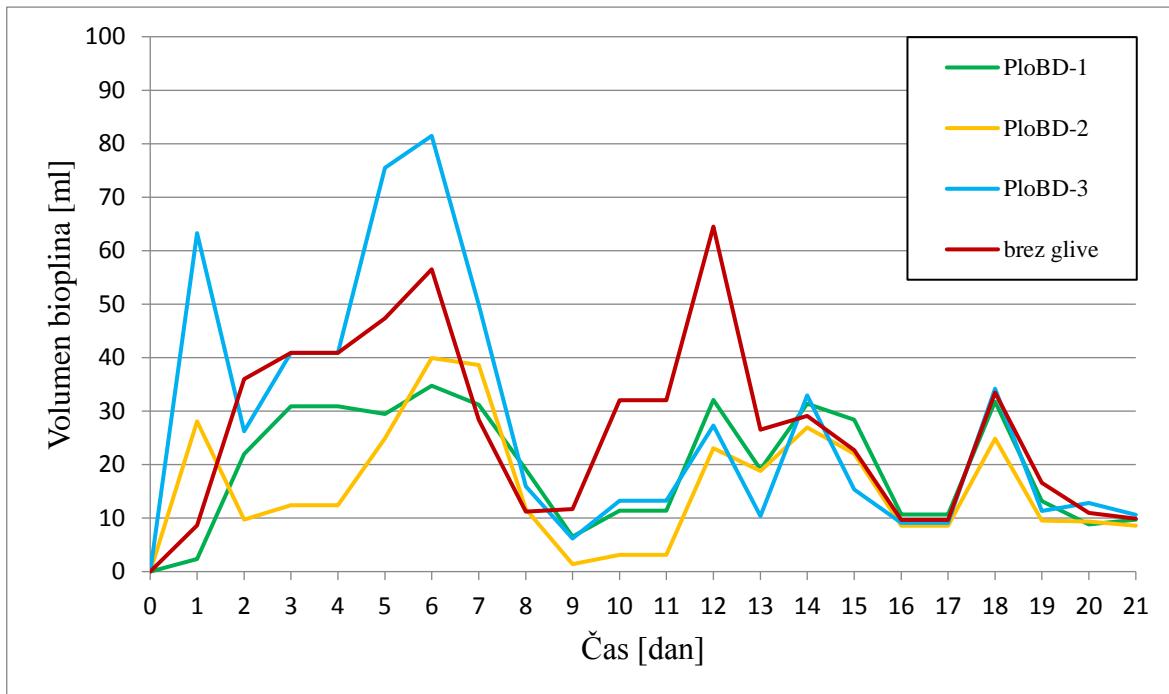
Graf inokuluma iz Bioplinarne Draženci, katerega aktivnost smo spremljali 21 dni, kaže tri vrhove. Prvi in najvišji vrh je po prvem dnevnu fermentacije, drugi je osmi dan, kar je na sredini najbolj produktivnega območja med 2. in 16. dnem, zadnji, tretji pa 18. dan, po katerem proizvodnja bioplina do konca pada, saj so izrabili vsa hranila v inokulumu (slika 19).



Slika 19: Aktivnost (vitalnost) inokuluma iz Bioplinarne Draženci.

4.1.2.2 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*

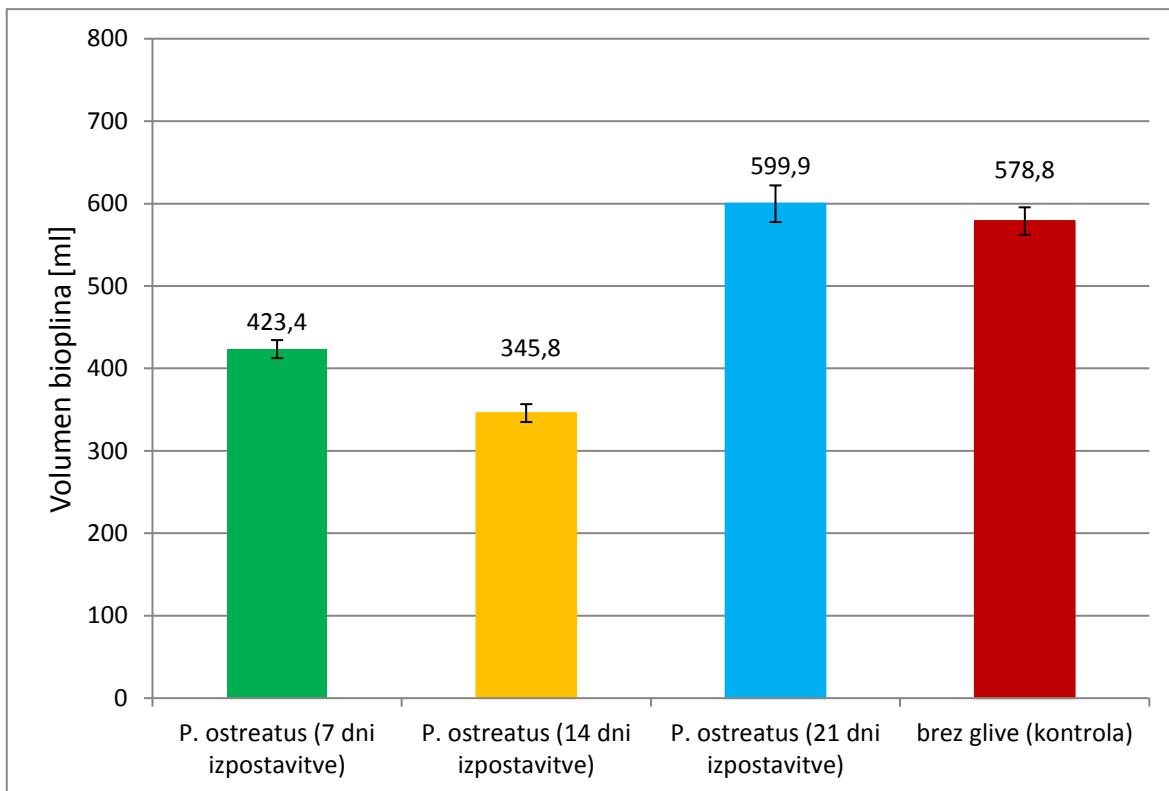
Vsi vzorci imajo podobnost. Pri vseh se v procesu anaerobne digestije pojavljajo trije vrhovi. To se zgodi na začetku (šesti dan), na sredini (12. dan) in pri koncu (18. dan), po katerem količine padajo in nastaja le še okoli 10 mL bioplina dnevno. Od vseh najbolj izstopa vzorec PloBD-3, ki je šesti dan dosegel najvišjo dnevno vrednost – več kot 81 mL dnevno nastalega bioplina. Nepreraščen substrat je za razliko od ostalih vzorcev, ki so bili najbolj produktivni do sedmega dne, največjo aktivnost pokazal med 9. in 16. dnem z vrhom, ki je presegel 60 mL na dan proizvedenega bioplina (slika 20).



Slika 20: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*.

4.1.2.3 Celotna količina bioplina proizvedenega z uporabo inokuluma z Bioplinarne Draženci in substratom različno dolgo izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*

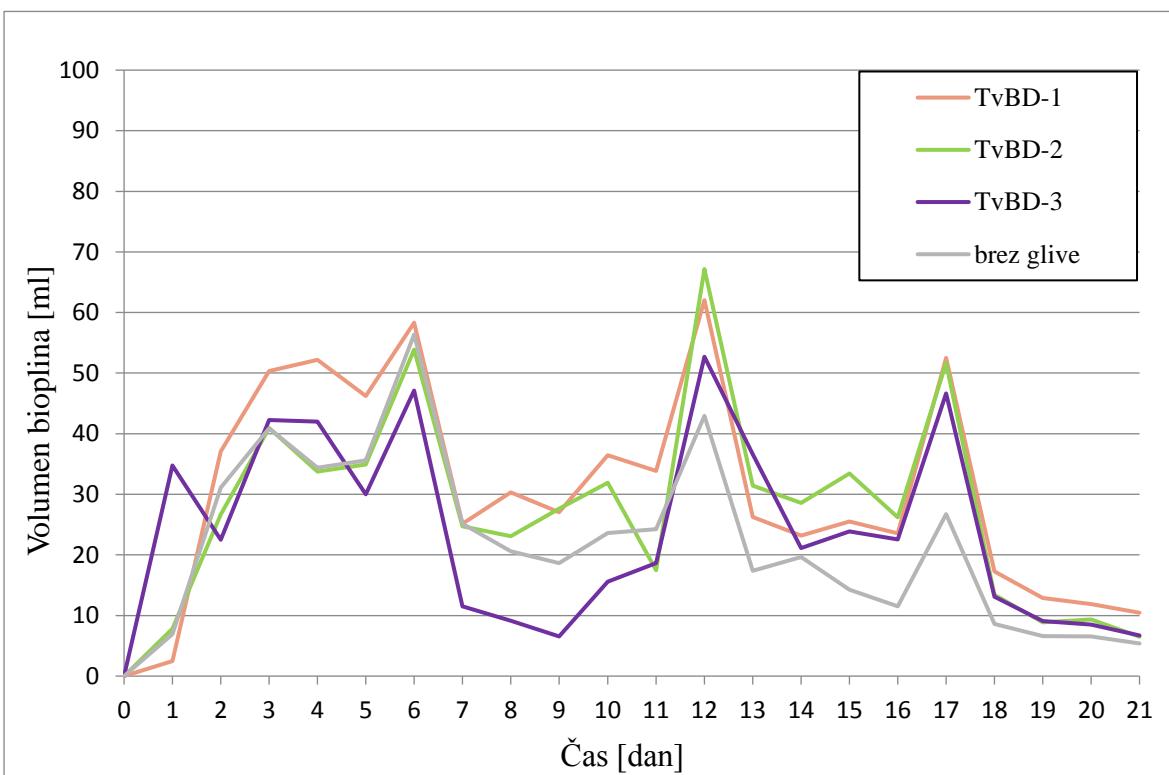
Za najbolj produktivnega se je izkazal vzorec, ki je bil najdlje (21 dni) izpostavljen delovanju bukovemu ostrigarju, saj je v 21 dneh fermentacije nastalo skoraj 600 mL bioplina. Le malo manj (3,5 %) bioplina je nastalo z uporabo nepreraščenega substrata. Kvantitativno sta bila manj uspešna vzorca, ki ju je micelij glive preraščal 7 oz. 14 dni, saj je na njun račun nastalo 30 oz. kar 42 % manj bioplina, kot pri tritedenski izpostavitvi glivi (slika 21).



Slika 21: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Pleurotus ostreatus*.

4.1.2.4 Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*

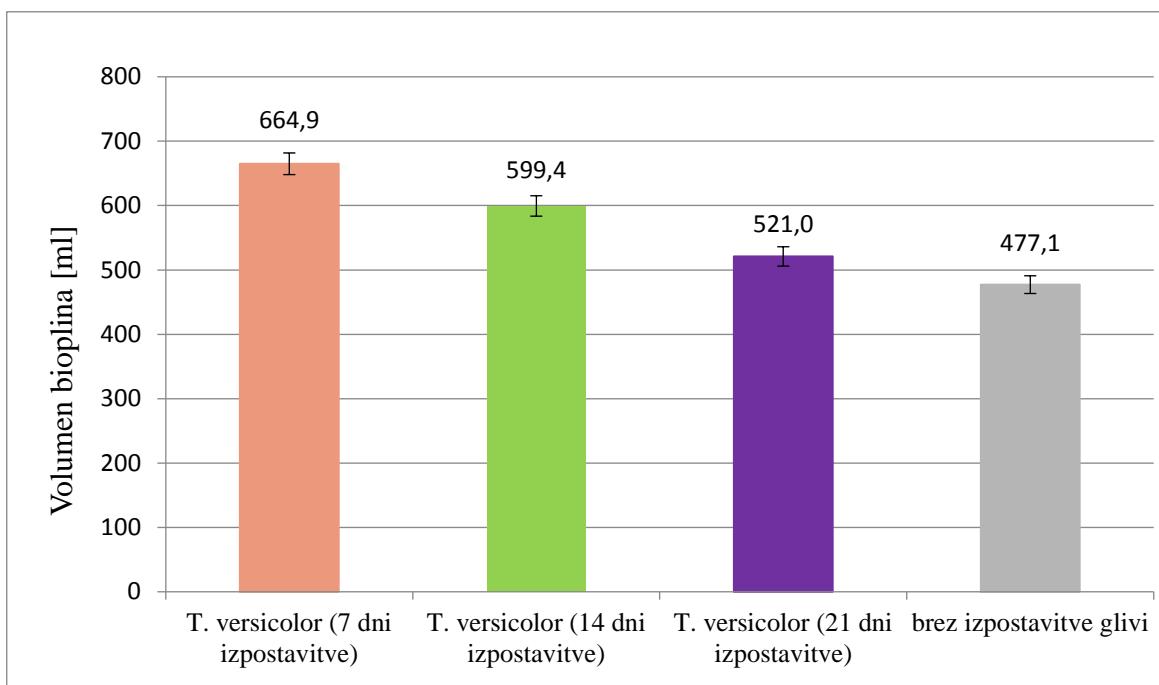
Podobno kot na sliki 20, se tudi tukaj kažejo trije vrhovi, ki so še izrazitejši. Vsi vzorci sledijo enakemu trendu – do 6. dne se kaže naraščanje dnevno nastalega bioplina, nato do 9. dne pada in najvišjo aktivnost doseže 12. dan, potem pride do ponovnega zmanjšanja proizvedenega bioplina ter 17. dan znova porast in na koncu umiritev procesa z le 10 mL bioplina na dan. Malo izstopa le krivulja, ki prikazuje nepreraščen substrat, saj so njeni vrhovi nižji od ostalih, kar kaže na pozitiven vpliv glive *T. versicolor* na nastajanje bioplina (slika 22).



Slika 22: Dinamika dnevno nastalega bioplina z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*.

4.1.2.5 Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*

Največ bioplina je bilo proizvedenega kot posledica sedem dnevne izpostavitev pisani ploskocevki. 65 mL manj bioplina je nastalo, ko je omenjena gliva substrat preraščala dva tedna, še dodatnih 70 mL manj pa, ko je bil substrat glivi izpostavljen tri tedne. Enak vzorec – količina proizvedenega bioplina pada s časom izpostavitev glivi – se je pojavil pri tej glivi z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Ihan (slika 18). Najmanj produktiven za nastajanje bioplina je bil nepreraščen substrat (slika 23).



Slika 23: Celotna količina bioplina proizvedenega v 21 dneh z uporabo inokuluma iz Bioplinarne Draženci in substratom izpostavljenim glivi *Trametes versicolor*.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Evropska komisija je določila, da mora do leta 2020 od porabljene energije biti 20 % iz obnovljivih virov. Eden izmed the obnovljivih virov je tudi bioplín, v katerem je med 55 in 65 % metana. Kljub moderni tehnologiji, pa sta lignocelulozna biomasa in biorazgradnja področji, na katerih potrebujemo številne izboljšave, če želimo, da bo proizvodnja bioplina ekonomsko sprejemljivejša. Predvsem LB ima v Sloveniji veliko potenciala, saj le-ti veljajo za relativno neizkoriščen vir. Zelo visoko je globalno ocenjen potencial biomase, ki je primerna kot vir energije. Ocenjujejo, da je izkoriščen samo delež tega potenciala, kar pomeni, da bi lahko proizvodnjo energije, ki izvira iz biomase, občutno povečali (Al Seadi in sod., 2010; Belšak Šel, 2015).

Lignocelulozna biomasa je težko razgradljiva. Težavna je predvsem kompleksna struktura lignina in njegovi razgradni produkti, ki nastajajo med anaerobno digestijo. Da bi med procesom AD dosegli čim večji izkoristek substrata, uporabljamo različne tehnike predobdelave (Hočevar, 2015).

V diplomskem delu smo se ukvarjali s tem, kakšen vpliv ima biološka predobdelava lignoceluloznega materiala z lesnimi glivami na produkcijo bioplina. S predobdelavo smo žeeli razrahlati strukturo lignina in tako doseči boljšo dostopnost encimov do substrata ter ga narediti poroznejšega.

Pri preraščanju mešanice piščančjega gnoja in trstikovca smo opazili, da je prirast micelija bukovega ostrigarja hitrejši v primerjavi s pisano ploskocevko. Prišlo je približno do enotedenskega zamika. Preraščenost, ki jo je pisana ploskocevka dosegla po štirinajstih dneh, je zimski ostrigar dosegel že po tednu dni, kar je razvidno iz slik 11 in 12. Opazili smo, da preraščanje ni enakomerno – nekatera območja so zelo preraščena, druga pa skoraj nič. To bi lahko izboljšali tako, da bi kozarce s preraščenim substratom temeljito pretresli in tako z micelijem inokulirali celoten substrat. Paziti bi morali, da bi to naredili v pravem trenutku. Če bi cepič z micelijem premalo prerastel substrat in bi ga že premešali, bi mu to predstavljalo prevelik stres in bi najverjetneje odmrl.

Rezultate smo prikazali v dveh sklopih, glede na uporabljen inokulum. V prvem sklopu so rezultati inokuluma iz Bioplinarne Ihan, s katerim smo izvajali AD na substratih sestavljenih iz piščančjega gnoja in trstikovca v razmerju 40:60. Z glivama *T. versicolor* in *P. ostreatus* in so bili predobdelani en, dva ali tri tedne bodisi z glivo *T. versicolor* bodisi *P. ostreatus*. Za vsako od dvanajstih kombinacij smo prikazali dinamiko nastajanja bioplina in skupni volumen le-tega po 21 dneh fermentacije.

Da so rezultati aktivnosti procesa anaerobne digestije, res posledica predobdelave substrata z glivama bele trohnobe in vrste inokuluma, samo pri vsaki seriji AD aktivnost inokuluma odšteli od posameznih vzorcev. Pri vseh serijah smo uporabili svež inokulum. V kolikor bi enkrat uporabili svež inokulum, drugič pa v hladilniku hrانjenega, več tednov starega, bi to lahko vplivalo na rezultate, saj vsebuje različne združbe mikroorganizmov, glede na spremembe temperatur. Shranjevanje v hladilniku pa zanje predstavlja stres in od zahteva adaptacijo na nove pogoje, posledično pa bi to lahko imelo vpliv na produkcijo bioplina.

Opazili smo, da se, ne glede na inokulum, vrsto glivo in časa preraščanja pri vseh krivuljah dinamike v začetnih dneh fermentacije pojavi značilnen vrh. To kaže na to, da je nastajanje bioplina najintenzivnejše ravno na začetku, medtem ko proti koncu ne zaznavamo več tako visokih vrhov. Iz literature je znana sestava bioplina: metana je 50–75 %, ogljikovega dioksida od 25 do 45 %, vodne pare od 2 do 7 %, kisika, dušika, amoniaka, vodika in vodikovega sulfida pa vsakega manj kot 2 % (Al Seadi in sod., 2010). Mi sestave nismo določali, zato ne moremo navesti, v kateri fazi je nastal določen plin. To so naredili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Mariboru, kjer je Nemetova (2009) s plinskim kromatografom spremljala sestavo proizvedenga bioplina. Ugotovila je, da je v začetku več CO₂, s časom trajanja fermentacije pa se povečuje delež metana. Razlog, da se v začetku pojavi ta izrazit vrh, bil lahko bil ogljikov dioksid. Če nismo dobro prepihalo digestorjev, je v njih ostalo nekaj kisika, ki so ga porabile glive bele trohnobe, ki so aerobi, posledično pa je nastajal ogljikov dioksid. Temu bi se lahko izognili tako, da bi namesto vode v koritih uporabili kalijev hidroksid, ki bi vezal CO₂, in tako ne bi imel vpliva na količino nastalega bioplina, ki smo ga odčitavali v bireti.

Pri vzorcih, kjer smo uporabili gnojevko iz Bioplinarne Ihan, lahko po začetni visoki aktivnosti zasledimo upad proizvodnje bioplina. Vrhovi niso uskaljeni (slika 15 in 17), saj pri nekaterih vzorcih hitro pride do dnevnega upada proizvedenega bioplina na dan (TvBI-1, TvBI-3, PloBI-3), pri drugih pa se to zgodi počasneje (PloBI-1, PloBI-3, TvBI-2, brez glive). V nadaljevanju procesa AD pride pri vseh vzorcih do ponovnega povečanja dnevno nastalega bioplina; pri enih se to zgodi prej, pri drugih pa proti koncu 21-dnevne fermentacije. Inokulum iz Bioplinarne Draženci, s katerim smo izvajali anaerobno digestijo, pri vseh vzorcih kaže zelo podobno dinamiko nastajanja bioplina. Okrog šestega dne opazimo prvi vrh, dvanajsti dan drugi vrh, zadnjega pa 17. oz. 18. dan. Padcu nastajanja bioplina med vrhovi bi se poskušali izogniti tako, da bi intenzivneje mešali ali pa bi uporabili drugačno mešalo. Magnetna palčka ni mogla zagotoviti enakomerne razporeditve komponent po celotnem digestatu, zato je prišlo do inhibicije, saj bakterijam intermediati AD verjetno niso bili dovolj dostopni.

Če primerjamo celotne količine nastalega bioplina za vse vzorce in upoštevamo hitrost preraščanja substrata z miceliji obeh gliv, kjer ima pisana ploskocevka enotedenski zamik rasti, opazimo podobnost. Tako ugotavljamo podobost med *P. ostreatus* (7 dni izpostavitve)

in *T. versicolor* (14 dni izpostavitve) ter *P. ostreatus* (14 dni izpostavitve) in *T. versicolor* (21 dni izpostavitve). Pri krajšem času preraščanja je nastalo več bioplina, kot pri daljšem, nato pa pride do veliko večje produkcije pri *P. ostreatus* (21 dni izpostavitve). Če bi substrat izpostavili delovanju glive *T. versicolor* za 28 dni, bi dobili največjo skupno količino nastalega bioplina tudi pri tej vrsti glive. Po skupni količini nastalega bioplina v 21 dneh fermentacije se je pri uporabi obeh inokulumov kot bolj produktiven izkazal substrat, ki je bil preraščen z glivo *T. versicolor*. Še zlasti velik izkupiček bioplina je ta substrat dal v kombinaciji z inokulumom iz Bioplinarne Draženci. Z glivo *T. versicolor* predobdelan substrat je zagotovo izkazal večjo produkcijo bioplina. Na podlagi tega lahko rečemo, da glivna predobdelava substrata pozitivno vpliva na količino nastalega bioplina. Čas preraščanja pa mora biti ravno pravi, da gliva nekoliko razgradi lignin in s tem bakterijam, ki sodelujejo pri anaerobni digestiji, omogoči dostop do hranil (pektin, celuloza...). Če je ta čas predolgov, gliva porabi hranila iz substrata in ga na ta način tako osiromaši, da zmanjka nutrientov za bakterije, kar se kaže v zmanjšani produkciji bioplina. Da je zelo pomemben čas izpostavitve delovanja gliv, priča tudi raziskava, ki so je leta 2000 opravili Cheng in sodelavci. Ugotovili so, da lignin iz lesa listavcev inhibitorno vpliva na metanogenezo.

Vpliv na proizvodnjo bioplina bi lahko imelo tudi trajanje zamrznitve vzorcev. Ene smo za fermentacijo uporabili takoj, nekateri pa so bili več tednov zamrznjeni. Da bi se tej dilemi izognili, bi morali opraviti poskuse, kjer bi vzorce pustili različno dolgo zamrznjene, potem pa bi ugotavliali, kakšen vpliv ima čas zamrzovanja na dinamiko nastajanja bioplina in njegovo skupno količino.

Glede na to, da je predobdelava LB z glivami bele trohnobe učinkovita, bi bilo smiselno razmisljiti o združitvi dveh digestornih postopkov, ki bi delovala zaporedno. Prvi del bi bila proizvodnja gob za prodajo, ki bi jih lahko gojili na mešanici piščančjega gnoja in hitro rastoče rastline. Izrabljeno mešanico pa bi nato, enako kot v tem diplomskem delu, uporabili kot substrat v proizvodnji bioplina. Ob večjem izkoristku bioplina, bi nastalo manj digestata, ki bi ga izkoristili za gnojenje. Sicer je osiromašen za ogljikom, vodikom in kisikom, vsebuje pa dušik, fosfor in kalij, ki ga rastline nujno potrebujejo za rast in razvoj.

5.2 SKLEPI

Glivi *T. versicolor* in *P. ostreatus* sta različno hitro preraščali substrat, ki je bil sestavljen iz piščančjega gnoja in trstikovca v razmerju 40:60. V primerjavi s *P. ostreatus* je bila gliva *T. versicolor* en teden počasnejša.

Z glivno predobdelavo substrata z izpostavljenostjo glivama smo vplivali na nastanek bioplina. Kot rezultat delovanja gliv bele trohnobe je prišlo do razgradnje celuloze, delignifikacije in večje poroznosti lignocelulognega materiala, kar je imelo za posledico več nastalega bioplina.

Trajanje preraščanja micelijev gliv *T. versicolor* in *P. ostreatus* ter delovanja njunih eksoencimov je vplivalo na dnevno dinamiko in končno količino bioplina.

Prav tako je imel vpliv na volumen nastalega bioplina uporabljen inkokulum. Učinkovitejši je bil iz Bioplinarne Draženci, Perutnine Ptuj d.d.

6 POVZETEK

Vse večji problem moderne družbe predstavlja naraščanje količine odlaganih deponiranih odpadkov. Zato je potrebno njihovo odlagano količino s sprotno izrabo zmanjševati. S temi ukrepi namreč zmanjšamo onesnaževanje okolja, nastajanja toplogrednih plinov in posledično pripomoremo k blaženju globalnih klimatskih sprememb. Odpadki predstavljajo obremenitev tudi za podjetje Perutnina Ptuj d.d. Eden izmed teh je piščančji gnoj, pomešan z nastiljem. Ta predstavlja težavo z ekonomskega in okoljskega vidika. Ker tako velikih količin ne zmorejo porabiti, ga je potrebno odvažati, kar pomeni strošek za podjetje, hkrati pa je breme za depoje. LB je težko razgradljiv, saj je sestavljen iz lignina, celuloze in hemiceluloze. Zaradi te kompleksne strukture celičnih sten, predstavlja veliko oviro pri mikrobiološki razgradnji. Za optimizacijo produkcije bioplina iz LB je potrebna predobdelava ligninske komponente, ki zmanjšuje dostopnost mikroorganizmov in encimov do hemiceluloze in celuloze. Predobdelava je lahko termična, mehanska, kemična ali biološka. Slednja lahko poteka z glivami bele trohnobe, ki imajo sposobnost razgradnje vseh glavnih gradnikov olesenele celične stene. Anaerobna digestija predstavlja stroškovno učinkovito biološko pretvorbo z namenom proizvodnje toplove, električne energije in bioplina. Najbolje je, če za substart uporabimo odpadke, ker na ta način hitro rastoče rastline, iz katerih bi lahko proizvajali bioplín, ne zavzemajo rodovitnih površin in so le-te na voljo za kulturne rastline. Bistvena prednost proizvodnje bioplina z AD pa je ta, da rešujemo okoljske probleme, ki jih povzročajo deponije piščančjega gnoja, obenem pa proizvajamo »zeleno« energijo. Uporaben je tudi predelan substrat, v katerem so mineralna rastlinska hranila. Z njegovo uporabo naredimo rodovitne površine bogatejše s hranljivimi snovmi, predvsem dušikom, fosforjem in kalijem ter tako zmanjšamo potrebo po uporabi mineralnih gnojil.

V diplomskem delu smo želeli ugotoviti, ali ima biološka predobdelava lignoceluloznega materiala z glivama *T. versicolor* in *P. ostreatus* vpliv na produkcijo bioplina. S predobdelavo substrata z izpostavljenostjo glivama smo vplivali na nastanek bioplina. Kot rezultat delovanja obeh gliv bele trohnobe je prišlo do razgradnje celuloze, delignifikacije in večje poroznosti lignoceluloznega materiala.

Prvi del je bil namenjen predobdelavi substrata z glivama bele trohnobe, z namenom razgraditve lignina in s tem doseči boljšo dostopnost mikroorganizmom do materiala ter ga narediti poroznejšega. Kot substart smo uporabili mešanico piščančjega gnoja, v kateri so bili tudi lesni oblanci in hitro rastoča rastlina trstikovec v razmerju 40:60. Pri tem razmerju gliva substrat še vedno dobro prerašča, hkrati pa smo uporabili dovolj piščančjega gnoja. Vlažnost substrata je bila med 60 in 70 %. Nanj smo nacepili dve vrsti gliv bele trohnobe: *Pleurotus ostreatus* in *Trametes versicolor*. Substrat smo pustili izpostavljen delovanju gliv en, dva ali tri tedne. Različno preraščene vzorce smo do digestije shranili v zamrzovalniku.

Lesni glivi sta substrat različno hitro preraščali. Počasnejša je bila pisana ploskocevka, ki je preraščenost, ki jo je bukov ostrigar dosegel v enem tednu, uspela doseči po dveh tednih.

V drugem delu smo se posvetili anaerobni digestiji, ki smo jo izvajali 21 dni. Substrat, ki smo ga uporabili za ta proces, so bili nepreraščeni in preraščeni vzorci z micelijem pisane ploskocevke in bukovega ostrigarja, inokulum pa sta bila iz Bioplinarne Ihan in Bioplinarne Draženci, Perutnina Ptuj d.d. Kot negativno kontrolo smo uporabili inokulum, kateremu nismo dodali substrata, saj smo želeli vedeti, koliko bioplina nastane samo na njegov račun. AD je potekala pri temperaturi med 38 in 41 °C in hitrosti magnetne palčke 360 obratov na minuto. Ker je v začetku AD proizvodnja bioplina potekala zelo intenzivno, smo količino nastalega bioplina spremljali dvakrat na dan, kasneje pa enkrat.

Čas preraščanja micelijev pisane ploskocevke in zimskega ostrigarja ter delovanja njunih eksoencimov je vplivalo na količino proizvedenega bioplina, saj je s časom izpostavitve glivi naraščala dostopnost delno razgrajene LB mikroorganizmom. Prav tako je imel vpliv na volumen nastalega bioplina uporabljen inokulum. Učinkovitejši je bil iz Bioplinarne Draženci, Perutnine Ptuj d.d. Rezultati so pokazali, da predobdelava substrata z glivami bele trohnobe ima pozitiven učinek na količino proizvedenega bioplina. Najproduktivnejši je bil substrat, ki ga je prerasla pisana ploskocevka, v kombinaciji z inokulumom iz Bioplinarne Draženci. Pri tem je nastalo 28 % več bioplina, kot na substratu, ki ni bil izpostavljen lesni glivi.

7 VIRI

- Ahring B.K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. *Advances in Biochemical engineering/biotechnology*, 81: 1-30
- Al Seadi T. A., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S., Janssen R., Grmek M. 2010. Priročnik o bioplinu. Ljubljana, Agencija za prestrukturiranje energetike: 144 str.
- Anderson K., Sallis P., Uyanik S. 2003. Anaerobic treatment processes. V: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Mara D., Horan N. (eds.). London, Academic press: 391-426
- Belšak N. 2008. Anaerobna digestija biomase v trdnem stanju za proizvodnjo bioplina. Diplomska naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 64 str.
- Belšak Šel N. 2015. Razgradnja lignocelulozne biomase z glivo *Pleurotus ostreatus* pred procesom anaerobne fermentacije v trdnem stanju. Doktorska disertacija. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 105 str.
- Cheng-Ri Y., Dong-II S., Myung-Kyun K., Sung-Taik L. 2000. Inhibitory effect of hardwood lignin on acetate-utilizing methanogens in anaerobic digester sludge. *Biotechnology Letters*, 22: 1531–1535
- Christy P. M., 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
- Chugh S., Chynoweth D.P., Clarke W., Pullammanappallil P., Rudolph V. 1991. Degradation of unsorted municipal solid waste by a leach-bed process. *Bioresource Technology*, 69, 2: 103–115
- Demirbas M.F., Balat M., Balat H. 2011. Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*, 52: 1815-1828
- Demirel B., Yenigün O. 2002. Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 7: 743–755
- Demirel B., Scherer P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Environmental Science and Biotechnology*, 7: 173-190

Deublein D., Steinhauser, A. 2008. Biogas from waste and renewable resources: An introduction. Weinheim, DE, Wiley-VCH, Verlag GmbH &Co, KGaA: 429 str.

Dugba P.N., Zhang R. 1999. Treatment of dairy wastewater with two-stage anaerobic sequencing batch reactor systems — thermophilic versus mesophilic operations. *Bioresource Technology*, 68, 3: 225–233

Fan L.T., Lee Y-H., Gharpuray M.M. 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. V: Microbial reactions. Berlin, Springer Heidelberg: 157–187

Gorjak S. 2001. Poizkus gojenja ostrigarja (*Pleurotus* sp.) na substratih iglavcev za biološko zatiranje patogenih gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire: 64 str.

Gu Y.H., Sivam G. 2006. Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Journal of Medicinal Food*, 9: 196-204

Harmon J.L., Svoronos S.A., Lyberatos G., Chynoweth D. 1993. Adaptive temperature optimization of continuous anaerobic digesters. *Biomass Bioenergy*, 5, 3-4: 279–288

Heaton E.A., Clifton-Brown J., Voigt T.B., Jones M.B., Long S.P. 2004. Miscanthus for renewable energy generation: European union experience and projections for Illinois. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9: 433-451

Hočevar V. 2015. Obdelava lignoceluloznih materialov z lesnimi glivami za proizvodnjo bioplina. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 64 str.

Holm-Nielsen J.B., Al Seadi T., Oleskowicz-Popiel P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 100: 5478–5484

Hon D. N.-S., Shiraishi N. 2000. Wood and cellulosic chemistry, Second edition, Revised and expanded., CRC Press: 930 str.

Humar M. 2010. Rezalni mlin in ekstrakcijski sistem Soxhlet - novi produbitvi. Les, 62, 2: 76-77

Humar M. 2008. Bukov ostrigar - užitna goba, ki jo lahko gojimo tudi doma. Les 60, 9: 353

- Hwang S., Lee Y., Yang K. 2001. Maximization of acetic acid production in partial acidogenesis of swine wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 5: 521–529
- Jejčič V., Poje T., Orešek A. 2010. Uvod v pridobivanje in čiščenje bioplina do faze biometana ter možnosti njegove uporabe. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 18 str.
- Kalan Ž. 2010. Ugotavljanje primernosti mešanice piščančjega gnoja in biomase hitro rastih rastlin za rast micelija lesnih gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij agronomije: 40 str.
- Kangle K.M., Kore S.V., Kore V.S., Kulkarni G.S. 2012. Recent trends in anaerobic codigestion; A review. *Universal Journal of Environmental Eesearch and Technology*, 2: 210–219
- Karim K., Klasson T., Hoffmann R., Drescher S.R., DePaoli D.W., Al-Dahhan H. 2005. Anaerobic digestion of animal waste: Effect of mixing. *Bioresource Technology*, 96: 1607–1612
- Khanal S.K.. 2008. Microbiology and biochemistry of anaerobic biotechnology. V: *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. Khanal S.K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons: 29-41
- Kim D.H., Oh S.E. 2011. Continuous high-solids anaerobic co-digestion of organic solid wastes under mesophilic conditions. *Waste Management*, 31, 9-10: 1943–1948
- Kroeker E.J., Schulte D.D., Sparling A.B., Lapp H.M. 1979. Anaerobic treatment process Stability. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 51, 4: 718-727
- Lah B. 2010. Uporaba glive *Trichoderma reesei* za razgradnjo lignocelulozne biomase. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Študij Kemijo inženirstvo: 92 str.
- Lewandowski I., Clifton-Brown J.C., Scurlock J.M.O., Huisman H. 2000. Miscanthus: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*, 19: 209-227
- Mata-Alvarez J. 2003. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA Publishing: 323 str.

Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M.J., Gutiérres A., del Río J.C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. International Microbiology, 8: 195-204

Meerovich I.G., Yang M., Jiang P., Hoffman R.M., Gerasimena V.P., Orlov A.E., Savitsky A.P., Popov V.V. 2005. Study of action of cyclophosphamide and extract of mycelium of *Pleurotus ostreatus* in vivo on mice, bearing melanoma B16-F0-GFP. V: SPIE, Genetically engineered and optical probes for biomedical applications III, San Jose, California, ZDA, 5704: 214-221

Monnet F. 2003. An introduction to anaerobic digestion of organic wastes. Edinburgh, Remade Scotland: 47 str.

Mudrack K., Kunst S. 2003. Biologie der Abwasserreinigung. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag: 206 str.

Muri P. 2013. Biometanski potencial trdnega odpadka iz ekstrakcije plodov šipka (*Rosa canina* L.) s sočasno razgradnjo dodatnega dušika. Diplomsko delo. Nova Gorica, Fakulteta za znanost o okolju: 48 str.

Nayono S.E. 2010. Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production. Karlsruher Institut für Technologie: 152 str.

Nemet A. 2009. Anaerobna digestija mešanic japonskega dresnovca (*Polygonum cuspidatum*) in piščančjega gnoja obdelanih z glivo *Pleurotus ostreatus*. Diplomska naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Kemijska tehnologija: 67 str.

Parris K. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. Alternative Medicine Review, 5, 1: 4-27

Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Journal of the Spanish Society for Microbiology: 5, 2: 53–63

Pohleven F. 2008. Pisana ploskocevka: najbolj pogosta lesna goba. Les, 60, 3: 115

Pohleven F. 2013. Gobje bogastvo Bele krajine. V: Štangelj, M (ur.), idr. Narava Bele krajine. Metlika, Belokranjski muzej, 88-93

Pohleven J., Korošec T., Gregori A. 2015. Zdravilne gobe. Podkoren: MycoMedica, 52 str.

Powell M. 2010. Medicinal mushrooms - A clinical guide. Mycology press, East Sussex, U.K., 128 str.

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

Rotar J. 2014. Anaerobna digestija lignoceluloznih materialov s predobdelavo z glivami lesne trohnobe. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Študij kemijske tehnologije: 52 str.

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

Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. Microbiology and Molecular Biology Reviews: 262-280

Schink B., Stams A.J.M. 2006. The prokaryotes. V: Syntrophism among prokaryotes. Springer: 309-335

Shively J.M., Barton L.L. 1991. Variations in autotrophic life. San Diego: Academic: 346 str.

Smole J. 2015. Submerzna kultivacija glive *Trametes versicolor* v mešalnem bioreaktorju. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 68 str.

Stamets P., Chilton J. 1983. The mushroom cultivator: A Practical guide for growing mushrooms at home. Olympia, Washington, Agarikon Press: 415 str.

Stamets P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Berkeley, California, USA, Ten Speed Press: 80 str.

Strgar J. 1994. Opis trajnic. V: Trajnici v vrtu in parku. Ljubljana, Kmečki glas: 42-206

Strgar Satler B. 2007. Miscanthus. V: Sto trajnic na Slovenskem. 1. izdaja. Ljubljana, Prešernova družba: 152-153

Tsukagoshi S., Hashimoto Y., Fujii G., Kobayashi H., Nomoto K., Orita K. 1984. Krestin (PSK). Cancer Treatment Review, 11, 2: 131-155

Ulčnik A., Zupančič-Kralj L., Tavzes Č., Pohleven F. 2010. Mikoremediacija lindana v tekočih kulturah gliv *Pleurotus ostreatus* in *Hypoxylon Fragiforme*. Les, 62: 3-4

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: 229-237

Veeken A.H., Hamelers B.V. 2000. Effect of substrate-seed mixing and leachate recirculation on solid state digestion of biowaste. Water Science and Technology, 41, 3: 255–262

Verma S. 2002. Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes. Department of earth & environmental engineering (Henry Krumb School of Mines) Fu foundation school of engineering & applied science, Columbia University, USA: 50 str.

Wang H., Gao J., Ng T.B. 2000. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Biochemical Biophysical Research Communications, 275: 810-816

Wellinger A. 1999. Process design of agricultural digesters. Ettenhausen, Nova Energie GmbH: 28 str.

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

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

Zupančič G. D., Grilc V. Potencial, ki še zdaleč ni izkoriščen. EOL, 58: 33-35

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Francu Pohlevenu za nasvete, pomoč pri praktičnem delu in za vašo pripravljenost, da mi vedno pomagate. Nikoli ne bom pozabil, da ste mi tudi ob nedeljah priskočili na pomoč, da sem lahko odčital rezultate. Gospod profesor, hvala vam za vse.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Zdravku Kravanji za pregled, predloge in recenzijo diplomskega dela.

Zahvala gre tudi celotnemu osebju na Katedri za patologijo in zaščito lesa, ki so mi pomagali premagati marsikatero prepreko.

Nastasija, buš, hvala ti, da si bila vedno ob meni, me bodrila in tudi večkrat pobrala, ko sem bil na tleh. Pa hvala tudi za gobice!

Mama in papi, podpirala sta me na vse možne načine, mi zaupala in verjela vame za kar vama bom vedno hvaležen.

Ajša, ti itak veš, da si najboljša.

Brigita, someday...