

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vinko HOČEVAR

**OBDELAVA LIGNOCELULOZNIH MATERIALOV Z
LESNIMI GLIVAMI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Vinko HOČEVAR

**OBDELAVA LIGNOCELULOZNIH MATERIALOV Z LESNIMI
GLIVAMI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS WITH
ROT FUNGI FOR THE BIOGAS PRODUCTION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija. Opravljeno je bilo na katedri za patologijo in zaščito lesa, Oddelek za lesarstvo, Biotehniška fakulteta.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Franca Pohlevna in za recenzenta prof. dr. Zdravka Kravanja.

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 inženirstvo,
Oddelek za kemijsko inženirstvo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga 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.

Vinko Hočevar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 602.3:579.85:582.28:628.385:620.97 (043.2)
KG piščančji gnoj/glive bele trohnobe/*Pleurotus ostreatus*/*Hypoxylon fragiforme*/obnovljivi viri energije/bioplina/lignoceluloza/anaerobna digestija
AV HOČEVAR, Vinko
SA POHLEVEN, Franc (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN OBDELAVA LIGNOCELULOZNIH MATERIALOV Z LESNIMI GLIVAMI ZA PROIZVODNJO BIOPLINA
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XIV, 64 str., 10 pregl., 41 sl., 49 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Večina energije danes temelji na izrabi fosilnih goriv. Fosilna goriva so neobnovljivi vir energije, katera se obnavlja na zelo dolgi rok. Z uporabo teh goriv pa onesnažujemo okolje in vplivamo na podnebje, saj se sproščajo toplogredni plini (TP). Številne države, prav tako pa tudi EU z zakonodajo predpisuje izrabo alternativnih virov energije. Eden izmed alternativnih virov energije je tudi bioplin. Proizvodnja bioplina z anaerobno digestijo ima številne prednosti, predvsem z vidika zmanjšanja emisij fosilnih TP. Vendar tudi pri produkciji bioplina prihaja do težav, v kolikor uporabljamo piščančji gnoj (PG). V piščančjem gnoju so tudi ostanki lesa, ki jih uporabljamo kot steljo. Lignin, kot sestavina olesenele celične stene, deluje zavirajoče na bakterije, ki sodelujejo pri nastajanju bioplina, in ga omejeno razgradijo. Glive, povzročiteljice bele trohnobe, so sposobne razgradnje lignina. V raziskavi smo piščančji gnoj pomešan z rastlinsko biomaso (koruzna silaža in slama) izpostavili delovanju gliv bele trohnobe. V nalogi smo uporabili glivi *Hypoxylon fragiforme* in *Pleurotus ostreatus*. Glivi sta preraščali substrat različno dolgo. Z glivama obdelan substrat smo uporabili v anaerobni digestiji. Rezultati o količini nastalega bioplina kažejo, da so med preraščenimi vzorci razlike. V nekaj primerih z glivami obdelanih vzorcev nastane več bioplina v primerjavi z vzorci, katerih gliva ni preraščala. Tako smo ugotovili, da pri z glivo preraščenih vzorci lahko nastane od 5 do 15 % več bioplina v primerjavi z nepreraščenimi. Pri vzorcih, kjer smo meritev opravili s 25 % raztopino KOH, nastane od 20 do 35 % manj bioplina v primerjavi z vzporednim vzorcem, kjer smo namesto KOH uporabili vodo, kar kaže na prisotnost CO₂ v bioplinu. Boljši substrat za produkcijo bioplina je mešanica silaže in PG, boljši učinek biološke obdelave pa je dosežen na mešanici slame in PG, obdelane z glivo *Pleurotus ostreatus*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 602.3:579.85:582.28:628.385:620.97 (043.2)
CX chicken manure/white rot fungi/*Pleurotus ostreatus*/*Hypoxylon fragiforme*/renewable source of energies/biogas/lignocellulose/anaerobic digestion
AU HOČEVAR, Vinko
AA POHLEVEN, Franc (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS WITH ROT FUNGI FOR THE BIOGAS PRODUCTION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIV, 64 p., 10 tab., 41 fig., 49 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The majority of energies nowadays is based on the use of the fossil fuels. These kind of fuels are non-renewable source of energy, their renewal is only long term possible. We pollute the environment and we influence the climate, for using those kind of fuels greenhouse gasses (GHG) are being released. Many countries, including the EU prescribe the use of the alternative source of energy through legislative sistem. Biogas is also one of the alternative sources of energy. The production of biogas with anaerobic digestion has many advantages, especially regarding the reduction of the emission of fossil GHG. But using the chicken manure the problems with the production of biogas may also occur. In chicken manure there are the remains of wood usally used as litter. Lignin, a part of the wooden cell walls, has a slow down effect on bacteria, that contribute to the formation of biogas, dispersing it selectly. Fungi, the cause of white decaying, are capable of degradation of the lignin. During our research the chicken manure mixed with plant biomasses (corn silage and straw) was exposed to the effect of white decaying. Two fungus, *Hypoxylon fragiforme* and *Pleurotus ostreatus* were used. Both of them overgrew the the substrate, different time each. Such fungus treatment substrates was used in anaerobic digestion. The results regarding the quantity of noticed biogas show differences among samples. The fungus treated samples produce more biogas in comparison with non fungus treated samples. In the fungus treated samples there were from 5 to 15 % more biogas to find in comparison with non treated ones. By samples of mesaurement with 25 % solution KOH less than 20 to 35 % of biogas was to be observed in comparison with paralel sample, where water was used; that shows the presence of CO₂ in the biogas. Better substrate for production of biogas is mixture of corn silage and chicken manure, even better effect of biological treatment can be reached in the mixture of straw and chicken manure, processed with fungus *Pleurotus ostreatus*.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI DELA.....	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 Bioplin.....	4
2.1.1 Nastanek bioplina.....	4
2.1.2 Sestava bioplina.....	7
2.1.3 Bioplinska naprava	8
2.2 BIOMASA	9
2.3 PIŠČANČJI GNOJ.....	9
2.4 RASTLINE KOT VIR OGLJIKA V SUBSTRATU	10
2.4.1 Koruza (koruzna silaža)	10
2.4.2 Pšenica (pšenična slama)	11
2.5 LESNA BIOMASA	12
2.5.1 Lignocelulozni material	13
2.5.2 Glive bele trohnobe in njihova uporaba	14
2.5.3 Fermentacija na trdnih substratih	16
3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 MATERIALI.....	18
3.1.1 Vrste gliv	18
3.1.1.1 <i>Trametes versicolor</i>	18
3.1.1.2 <i>Pleurotos ostreatus</i>	19
3.1.1.3 <i>Hypoxylon fragiforme</i>	20

3.1.2	Piščančji gnoj	21
3.1.3	Rastlinski material	21
3.1.4	Inokulum.....	21
3.1.5	Laboratorijska oprema	21
3.1.6	Opis aparature	22
3.2	METODE	24
3.2.1	Mletje	24
3.2.2	Priprava micelija gliv bele trohnobe	25
3.2.3	Meritve vlažnosti	26
3.2.4	Priprava mešanice.....	27
3.2.5	Polnjenje kozarcev	29
3.2.6	Avtoklaviranje.....	30
3.2.7	Inokulacija	30
3.2.8	Opazovanje rasti micelija na substratih	31
3.2.9	Odvzemanje vzorcev v različnih časovnih intervalih	32
3.2.10	Priprava anaerobne digestije	35
3.2.11	Spremljanje nastajajočega bioplina	36
3.2.12	Bioplin	36
4	REZULTATI	37
4.1	PRERAŠČANJE	37
4.2	PRODUKCIJA BIOPLINA	40
4.2.1	Vitalnost inokuluma (gnojevka)	40
4.2.2	Količina nastalega bioplina iz mešanice piščančjega gnoja in slame	40
4.2.2.1	Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG - slama preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	40
4.2.2.2	Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG - slama preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
4.2.2.3	Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG – slama preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	42
4.2.2.4	Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG - slama preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	43

4.2.2.5	Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – slama preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	44
4.2.2.6	Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih nastalega iz mešanice PG – slama preraščena z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
4.2.3	Količina bioplina nastalega iz mešanice piščančjega gnoja in silaže.....	46
4.2.3.1	Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	46
4.2.3.2	Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG – silaža preraščena z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	47
4.2.3.3	Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	48
4.2.3.4	Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	49
4.2.3.5	Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	50
4.2.3.6	Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	RAZPRAVA	53
5.2	SKLEPI	58
6	POVZETEK	59
7	VIRI.....	61
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Stopnje produkcije bioplina iz celuloze in hemiceluloze (Čater in sod., 2014: 52).	6
Slika 2: Vpliv predobdelave na strukturo lignoceluloze (Chaturvedi in sod., 2013: 417). ...	6
Slika 3: Tipična dvostopenjska bioplinarna (Weiland, 2010: 855).	8
Slika 4: Zapletena kemična struktura lignoceluloznega materiala (Tišma in sod., 2012: 21).	12
Slika 5: Celuloza predstavlja skelet, okrog katerega se prepletata lignin in hemiceluloza (Mussatto in Teixeira, 2010: 897).....	13
Slika 6: Struktura lignina (Tišma in sod., 2012: 21).	14
Slika 7: Trosnjaki pisane ploskocevke (Pohleven, 2008: 115).....	18
Slika 8: Trosnjaki bukovega ostrigarja (Humar, 2008: 353).....	19
Slika 9: Trosnjaki ogljene kroglice z značilno črno površino, po kateri je gliva dobila tudi slovensko ime (Humar, 2009: 451).....	20
Slika 10: Shematski prikaz anaerobnega digestorja povezanega z bireto za odčitavanje volumna dnevno proizvedenega bioplina (prirejeno po Nemet, 2009: 18).....	23
Slika 11: Aparatura za pridobivanje bioplina z anaerobno fermentacijo.	23
Slika 12: Križni mlin za mletje lignoceluloznega materiala.....	24
Slika 13: Mlin Retsch SM 2000 za fino mletje lignoceluloznega materiala.	25
Slika 14: Peti dan rasti micelija na komercialnem PDA gojišču glive <i>Plo5</i>	26
Slika 15: Navlažena substratna mešanica.	27
Slika 16: Pokrovček z vato.	30
Slika 17: Kozarci zloženi v avtoklavu.	30
Slika 18: Material za izvedbo inokulacije nameščen v brezprašni komori.	31
Slika 19: Preraščanje micelija (bela puhasta struktura) po substratnih mešanicah piščančjega gnoja in silaže, osmi dan po inokulaciji.	32
Slika 20: Cepiči primerne velikosti za mešanje substratne mešanice. Na sliki je micelij glive <i>Hf</i> na mešanici silaže in piščančjega gnoja, štiri dni po inokulaciji.	32
Slika 21: Izgled substrata (PG in slame) preraščenega z glivo <i>Plo5</i> , dva dni po mešanju..	33
Slika 22: Erlenmajerice s substratom in z nepovratnim ventilom za produkcijo bioplina..	35
Slika 23: Rast micelija gliv na komercialnem gojišču PDA. Micelij je preraščal 5 dni. <i>Hk</i> - hibridni <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Plo5</i> - <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Tv6</i> - <i>Trametes</i> <i>versicolor</i>	37
Slika 24: Preraščanje substratne mešanice piščančjega gnoja in slame, in sicer sedmi dan po inokulaciji. Vidna so z micelijem preraščena (bela puhasta struktura) in z micelijem nepreraščena področja (temna območja). Miceliji različnih vrst gliv na	

tež substratni mešanici preraščajo zelo različno, med micelijami pa so tudi opazne razlike.....	37
Slika 25: Preraščanje micelij glive <i>Hf</i> , na A - substratni mešanici silaže in piščančjega gnoja, ter B - na substratni mešanici slame in piščančjega gnoja, in sicer deseti dan po inokulaciji.....	38
Slika 26: Preraščanje micelij glive <i>Plo5</i> na substratni mešanici A - slame in piščančjega gnoja, B - silaže in piščančjega gnoja, in sicer sedmi dan po inokulaciji.....	39
Slika 27: Bioplinska aktivnost inokuluma v obdobju 20 dni.	40
Slika 28: Količina nastalega bioplina po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	41
Slika 29: Skupna količina nastalega bioplina po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in slame, preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	42
Slika 30: Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice slame in PG (60:40) preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i> (H4, H7, H9, H11, H14, H14-KOH) in kontrole brez glive (SLA). Gliva je preraščala substrat od 4 do 14 dni.....	43
Slika 31: Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice slame in PG (60:40) preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (P2, P4, P7, P9, P11, P13, P15, P15-KOH) in kontrole brez glive (SLA). Gliva je preraščala substrat od 2 do 15 dni.	44
Slika 32: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i> (H4, H7, H9, H11, H14, H14-KOH) in kontrole brez glive (SLA).	45
Slika 33: Primerjava volumnov bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (P2, P4, P7, P9, P11, P13, P15, P15-KOH) in kontrole brez glive (SLA).....	46
Slika 34: Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i>	47
Slika 35: Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh produkcije iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i>	48
Slika 36: Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice silaže in PG (60:40) preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i> (H3, H5, H7, H9, H11, H13, H16, H13-KOH) in kontrole brez glive (SIL). Gliva je preraščala substrat od 3 do 16 dni.	49
Slika 37: Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice silaže in PG (60:40) preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (P5, P7, P9, P11, P14, P16, P19, P16-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL). Gliva je preraščala substrat od 5 do 19 dni.	50
Slika 38: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo <i>Hypoxylon fragiforme</i> (H3, H5, H7, H9, H11, H13, H16, H13-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL)..	51

Slika 39: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo <i>Pleurotus ostreatus</i> (P5, P7, P9, P11, P14, P16, P19, P16-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL).	52
Slika 40: Spremembe v sestavi riževe slame po 24 dnevnem preraščanju z glivami bele trohnobe (Taniguchi in sod., 2005: 639).....	56
Slika 41: Vpliv različne časovne izpostavljenosti riževe slame glivi <i>P. ostreatus</i> na sestavo substrata (Taniguchi in sod., 2005: 640).....	57

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Sestava bioplina (Seadi in sod., 2010: 43).....	7
Preglednica 2: Vrednost hranil, organske snovi in vode v piščančjem gnoju v % (Leskošek, 1988: 40).	10
Preglednica 3: Načini izkoriščanja koruze za energetske namene (Čergan in sod., 2008: 152).....	11
Preglednica 4: Vsebnost vlage.....	26
Preglednica 5: Deleži posameznih substratov v mešanici.	27
Preglednica 6: Prikaz časovnega poteka dela, inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata silaže (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba <i>Hypoxylon fragiforme</i>	33
Preglednica 7: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata silaže (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba <i>Pleurotus ostreatus</i>	34
Preglednica 8: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata slame (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba <i>Hypoxylon fragiforme</i>	34
Preglednica 9: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata slame (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba <i>Pleurotus ostreatus</i>	34
Preglednica 10: Razpored vzorcev, ki so bili obdelani z glivo in drugi »kontrolni« vzorci.	35

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
AD	anaerobna digestija (razgradnja, fermentacija)
CaO	kalcijev oksid
CH ₄	metan
CO	ogljikov oksid
CO ₂	ogljikov dioksid
EU	Evropska unija
GWh	gigavatna ura
H3	3- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H4	4- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H5	5- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H7	7- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H9	9- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H11	11- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H13	13- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H13-KOH	13- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i> , za produkcijo bioplina smo uporabili 25 % raztopino KOH
H14	14- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H14-KOH	14- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i> , za produkcijo bioplina smo uporabili 25 % raztopino KOH
H16	16- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Hf</i>
H ₂ O	voda

H ₂ S	žveplovodik
Hf	<i>Hypoxylon fragiforme</i>
Hk	hibrid bukovega ostrigarja
K ₂ O	kalijev oksid
kWh	kilovatna ura
LiP	lignin peroksidaza
m(PG)	teoretična masa PG za mešanico (g)
m(SIL)	teoretična masa silaže za mešanico (g)
m(SLA)	teoretična masa slame za mešanico (g)
MgO	manganov oksid
MnP	mangan peroksidaza
N	dušik
N ₂ O	didušikov oksid
P2	2- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P ₂ O ₅	fosforjev oksid
P4	4- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P5	5- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P7	7- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P9	9- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P11	11- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P13	13- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P14	14- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P15	15- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P15-KOH	15- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i> , za produkcijo bioplina smo uporabili 25 % raztopino KOH

P16	16- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P16-KOH	16- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i> , za produkcijo bioplina smo uporabili 25 % raztopino KOH
P18	18- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
P19	19- dnevno preraščanje substrata z glivo <i>Plo5</i>
PDA	potato dextrose agar (krompirjev dekstrozni agar)
PG	piščančji gnoj
<i>Plo5</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
SIL	mešanica silaže (60 %) in piščančjega gnoja (40%) (z glivo neobdelan substrat)
SLA	mešanica slame (60%) in piščančjega gnoja (40%) (z glivo neobdelan substrat)
TP	toplogredni plin
<i>Tv6</i>	<i>Trametes versicolor</i>
W(PG)	vlažnost PG (%)
W(SIL)	vlažnost silaže (%)
W(SLA)	vlažnost slame (%)
X	dejanska masa (g)

1 UVOD

Potreba po energijski oskrbi sveta narašča iz leta v leto. Velik problem je, da velika večina oskrbe z energijo temelji na fosilnih gorivih (88 %) (Weiland, 2010).

Z uporabo fosilnih goriv, kot so lignit, premog, nafta in zemeljski plin, preoblikujemo ogljik, ki je bil milijone let shranjen v zemeljski skorji in ga izpustimo v ozračje kot ogljikov dioksid (CO_2). CO_2 v atmosferi povzroča globalno segrevanje in ga uvrščamo med toplogredne pline (TP). Pri izgorevanju bioplina se prav tako sprošča CO_2 , vendar je bil v nasprotju s fosilnimi gorivi, ta CO_2 iz atmosfere vezan s fotosintezo rastlin. Kroženje ogljika iz bioplina je tako zelo kratko (od enega do nekaj let). S proizvodnjo bioplina zmanjšujemo tudi emisije metana (CH_4) in didušikovega oksida (N_2O) iz hrambe ter uporabe živinskega gnoja. Vpliv metana na segrevanje ozračja je 21-krat, didušikovega oksida pa 310-krat večji od ogljikovega dioksida. Produkti, ki nastanejo z anaerobnim vrenjem in se sproščajo v ozračje, so škodljivi, ker predstavljajo TP. Z uporabo bioplina nadomeščamo fosilna goriva iz proizvodnje energije in goriva za transport ter tako zmanjšujemo emisije CO_2 , CH_4 in N_2O ter s tem prispevamo k ublažitvi globalnega segrevanja (Seadi in sod., 2010).

Napovedi rasti oskrbe z energijo kažejo, da se bo potreba po energiji v tem stoletju podvojila oz. potrojila. Hkrati se moramo zavedati, da se koncentracija toplogrednih plinov v atmosferi nevzdržno povečuje. Da bi čim bolj omilili posledice globalnega segrevanja in klimatske spremembe, je pomembno zmanjšati izpuste toplogrednih plinov (Weiland, 2010).

Zmanjševanje učinkov globalnega segrevanja pa je tudi ena glavnih prioritet energetske in okoljske politike EU. Evropski cilji za proizvodnjo energije iz obnovljivih virov, zmanjšanje emisij TP in trajnostno obdelavo odpadkov, temeljijo na obvezi članic EU, da sprejmejo ustrezne ukrepe za doseg te ciljev. Proizvodnja in uporaba bioplina iz anaerobne digestije lahko prispeva k izpolnitvi ciljev na vseh treh področjih. Drugi pomemben globalen poziv pa je varna oskrba z energijo. Kot vemo, je večina znanih rezerv fosilnih goriv ravno v regijah, ki so politično nestabilne. Večina evropskih držav je močno odvisna od uvoza nafte in plina, na primer iz Rusije ali Bližnjega vzhoda. Ker se bioplin proizvaja lokalno in znotraj državnih meja, lahko uporaba bioplina drastično zmanjša odvisnost od uvoženih goriv in povečuje zanesljivost energetske oskrbe (Seadi in sod., 2010).

Iz navedenih dejstev lahko sklepamo, da bo bioplin iz organskih odpadkov in ostankov (sekundarna surovina) ter energijskih rastlin pomemben v prihodnosti. Bioplin je izredno prilagodljiv vir obnovljive energije, ki ga lahko uporabljamo kot nadomestilo fosilnih goriv v t.i kogeneracijskih enotah (sočasna proizvodnja toplote in električne energije) ali kot gorivo v plinskih vozilih. Metansko obogaten bioplin pa lahko povsem nadomesti zemeljski plin in ga lahko uporabljamo v javnem plinskem omrežju.

Proizvodnja bioplina s pomočjo anerobne digestije ima številne prednosti, kot so energijska učinkovitost, okolju prijazna tehnologija, uporaba lokalno dosegljivih virov, zmanjšanje emisij toplogrednih plinov. Digestat, ki nastane po koncu produkcije, pa uporabimo kot mineralno gnojilo.

Najstarejša tehnologija za energetske namene je pretvorba biomase. Z anaerobno razgradnjo biomase se sprošča bioplín, ki ga uporabljamo kot vir energije. Z odkrivanjem novih virov energije premoga, nafte, zemeljskega plina itn. je biomasa v preteklosti izgubila na pomenu. Kmalu pa so se pokazali stranski učinki uporabe fosilnih goriv (pospešeno onesnaževanje okolja in podnebne spremembe). Svetovne zaloge fosilnih goriv so se manjšale, cene tekočih in drugih goriv na svetovnem trgu pa so pospešeno naraščale. Našteti razlogi so ponovno postavili biomaso v ospredje. V razvitih državah biomasa ponovno zaseda mesto vodilnega energenta. Energijski potencial biomase ni zanemarljiv. Rastline kopičijo energijo v obliki beljakovin, ogljikovih hidratov in rastlinskih maščob. V času poletne vegetacije v naših podnebnih razmerah rastline nakopičijo na 1 m² kmetijske površine 5 do 6 kWh energije, kar na 100 hektarjev oz. na 1 km² kmetijske površine znaša 6 GWh energije (Čergan in sod., 2008).

V Perutnini Ptuj d.d. predstavlja piščančji gnoj resen okoljski in krajinski problem. Pri vzreji piščancev uporabljajo za nastiljanje lesne oblance in žagovino, saj je takšna oblika stelje bolj zdrava. Lignin, kot sestavina olesenele celične stene, deluje zavirajoče na bakterije, zato je njihov razvoj otežen. Vendar pa v Perutnini Ptuj ta piščančji gnoj uporabljajo za produkcijo bioplina, zato prihaja do težav pri razgradnji oblancev, ki vsebujejo lignocelulozo. Tako na račun lignoceluloze nastane manj bioplina in veliko ostankov. S predobdelavo lignoceluloznega materiala z glivami, bi se povečal izkoristek.

Glive bele trohnobe so edini organizmi sposobni hitre in popolne razgradnje lignina. Pred samo izvedbo anaerobne digestije smo piščančji gnoj izpostavili glivam bele trohnobe. Da smo zagotoviti ustrezno razmerje med dušikom in ogljikom, smo piščančji gnoj mešali v rastlinski material, kot je slama in koruzna silaža. S tem dosežemo delignifikacijo substrata, material naredimo bolj porozen in dostopnejši za encime. S tem bi izboljšali produkcijo bioplina.

1.1 CILJI DELA

Cilj prvega dela naloge je bil izbrati dve glivi, ki najbolj preraščata substrat. Substrat (piščančji gnoj z dodatkom hitro rastočih rastlin) smo izpostavili glivam bele trohnobe (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* (navaden ter hibridni) in *Hypoxylon fragiforme*). S preraščanjem dosežemo delno razgradnjo lignina. V drugem delu pa smo substrat različno dolgo izpostavili preraščanju dvema glivama. Po določenem času preraščanja glive, smo substrat izpostavili metanogenim bakterijam pri temperaturi 42 °C (izvedli smo anaerobno digestijo) in ugotavljali produkcijo bioplina.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Zastavili smo si naslednje delovne hipoteze:

- na enakomernost preraščanja micelija na substratu vpliva mešanje,
- različne vrste gliv, različno preraščajo substrat in tudi specifično vplivajo na metanogenezo,
- predhodna izpostavitve glivam vpliva na proizvodnjo bioplina,
- trajanje izpostavitve glivam vpliva na količino nastalega bioplina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLIN

Masovna izraba bioplina se je začela ob koncu sedemdesetih let prejšnjega stoletja. Kot substrat so uporabljali predvsem živalske fekalije. Bioplin predstavlja alternativni vir energije tako v svetu kakor tudi pri nas. Za proizvodnjo bioplina se poleg fekalij uporabljajo tudi energetske rastline (koruza, sirek, itd.), komunalne odpadke (rastlinski material iz košnje javnih površin, listje itd.), odpadke predelave v prehrabni industriji in tudi odpadke iz gospodinjstev (Jejčič in sod., 2010).

S tem vplivamo na zmanjšanje emisij toplogrednih plinov in pospešujemo razvoj oskrbe z zeleno energijo. Bioplin, kot obnovljiv vir energije, je trgu izredno prilagodljiv. Lahko ga uporabimo kot substitut fosilnih goriv za generiranje toplotne in električne energije ali pa ga uporabimo kot gorivo v prevoznih sredstvih (Weiland, 2010).

Anaerobno vrenje poteka v bioplinski napravi, pri tem pa se sprošča bioplin. Je zmes različnih plinov, od katerih je najpomembnejši metan. Vrenje oz. anaerobna digestija poteka s pomočjo bakterij. Bioplin se največ izrablja v kogeneracijskih enotah, kjer hkrati proizvajamo električno in toplotno energijo. Uporabljajo ga na kmetijah, smetiščih in komunalnih čistilnih napravah (Jejčič in sod., 2010).

Bioplin čistimo po različnih postopkih. Vsebnost metana je odvisna od uporabe bioplina. Bioplin, ki vsebuje najmanj 60 % metana se uporablja za proizvodnjo toplote. Ko je bioplin povsem očiščen, lahko doseže takšno sestavo kot zemeljski plin in se ga lahko uporabi kot čisto gorivo. Bioplin, očiščen do stopnje zemeljskega plina, imenujemo biometan. Koncentracije metana nad 95 %, ki ga dosežemo z membranskimi moduli, lahko uporabimo v produkciji električne energije v izgorevalnih napravah. Za ekvivalentno energijsko vrednost goriva potrebujemo pri biometanu najmanj kmetijskih površin za pridelavo biomase, v primerjavi z bioetanolom oz. biodizlom (Jejčič in Poje, 2010; Čater in sod., 2014).

2.1.1 Nastanek bioplina

Bioplin nastane z anaerobno fermentacijo organske snovi (živalske fekalije, energetske rastline, rastlinski material, odpadki klavnic itn.). V bioplinski napravi je možno uporabljati vse organske snovi, katerih sestava se z delovanjem mikroorganizmov spremeni in ne vsebuje več kot 15 % suhe snovi (SS). Pri manj kot 5 % SS proces razgradnje še vedno poteka, vendar je nerentabilen. Zgornja meja SS predstavlja omejitev, pri kateri lahko substrat še črpamo in mešamo. Razgraditev, npr. v gnojevki, povzročajo mikroorganizmi, ki so v njej že prisotni in vanjo pridejo z živinskim blatom. Anaerobna

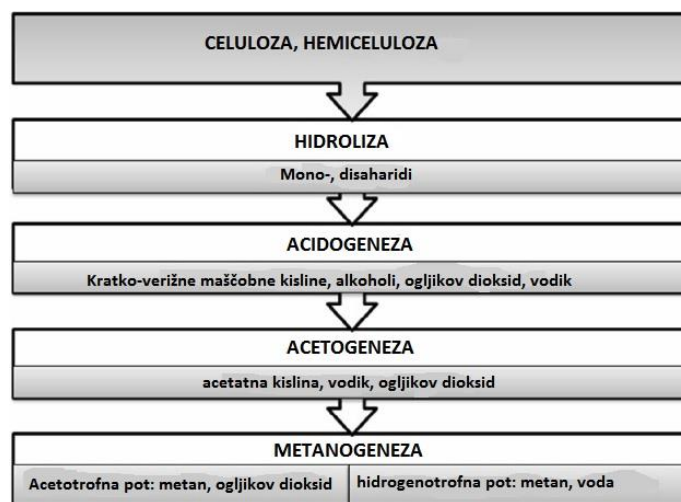
razgraditev organskih snovi temelji predvsem na biokemičnih procesih, katerih nosilci so mikroorganizmi (Garvaz in sod., 2005).

Metanska fermentacija je kompleksen proces, katerega lahko razdelimo v štiri stopnje: hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza. V posamezni degradacijski stopnji sodelujejo različne združbe mikroorganizmov, ki so v sintrofičnem odnosu. Stopnje metanske fermentacije so prikazane na sliki 1 (Čater in sod, 2014).

Hidrolizirajoči in fermentacijski organizmi so odgovorni za razgradnjo polimerov, pri tem nastanejo monomeri in vmesni produkti anaerobnega procesa kot so acetat, ogljikov dioksid, vodik in kratko verižne maščobne kisline, kot so propionat in butirat. Hidrolitični mikroorganizmi izločajo naslednje encime: celulaze, celobiaz, ksilanaze, amilaze, lipaze in proteaze. Pri tem sodelujejo obligatni anaerobi, kot so bakterije iz rodu *Bacterioides*, *Clostridia* in *Bifidobacteria*. Dolgo verižne maščobne kisline se pretvorijo v acetat in vodik s pomočjo vodik producirajočih acetogenih bakterij (*Acetobacterium woodii* in *Clostridium acetium*). Prebitek vodika lahko zaustavi metabolizem acetogenih bakterij, zato je pomembno, da je parcialni pritisk vodika nizek. Na koncu degradacijske verige je skupina metanogenih bakterij, ki iz acetata ali iz vodika in ogljikovega dioksida proizvajajo metan. Te bakterije so prav tako strogi anaerobi in za rast potrebujejo nizek redoks potencial. Znanih je samo nekaj vrst bakterij, katere so zmožne razgraditi acetat v CH_4 in CO_2 (*Methanosarcina barkeri*, *Metanococcus mazei* *Methanotrix soehngenii*) (Schink, 1997).

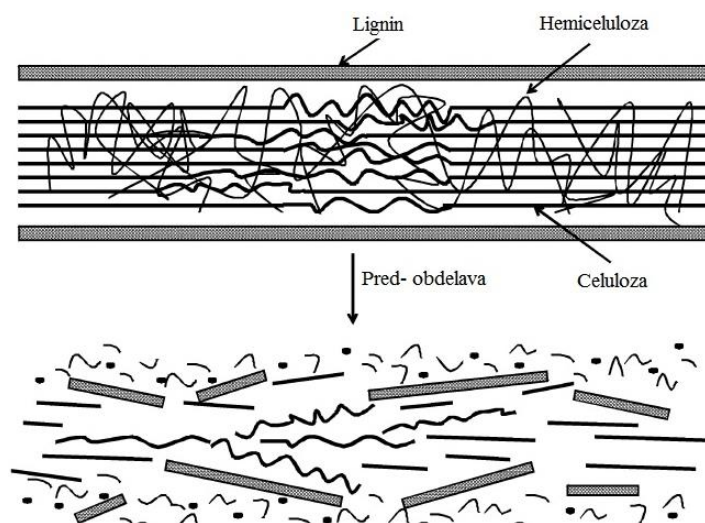
V anaerobnih digestorjih se 70 % metana proizvede po acetotrofni metanogeni poti (pretvorba acetata v CH_4 in CO_2), preostanek pa se ga proizvede po hidrogenotrofni metanogeni poti (pretvorba CO_2 in H_2 v CH_4 in H_2O) (Čater in sod., 2014).

Prva in druga skupina mikrobov, kakor tudi tretja in četrta so zelo povezani in odvisni drug od drugega. Proces anaerobne digestije zahteva, da je razmerje razgradnje v obeh stopnjah enakovredno. Če prva stopnja poteka prehitro, potem se v digestorju nakopičijo kisline, kar ima za posledico padec pH. Padec pH pod 7 inhibira metan producirajoče bakterije. Če pa druga stopnja poteka prehitro, je produkcija metana omejena s stopnjo oz. hitrostjo hidrolize (Weiland, 2010).



Slika 1: Stopnje produkcije bioplina iz celuloze in hemiceluloze (Čater in sod., 2014: 52).

Interakcije med mikrobnimi združbami so zelo kompleksne. Neravnotežje med mikrobnimi združbami vpliva na presežne reakcije, kar lahko povzroči kopičenje inhibitorjev in lahko vodi v upočasnitev anaerobne digestije. Med vsemi imajo metanogenci najpočasnejšo rast in so najbolj občutljivi na okoljske spremembe, kot so temperatura, pH in koncentracija inhibitorjev. Tako lahko smatramo, da je metanogeneza limitni korak v procesu anaerobne digestije (AD). Pri substratih, kjer je hidroliza omejena, kot je npr. lignocelulozna biomasa, je zelo pomembno predtretiranje (Slika 2), s čimer razrahljamo vezi in hidrolitičnim encimom omogočimo delovanje (Zheng in sod., 2014).



Slika 2: Vpliv predobdelave na strukturo lignoceluloze (Chaturvedi in sod., 2013: 417).

Metansko vrenje poteka v širokem območju temperatur med 5 in 65 °C. Izbrana temperatura mora biti čim bolj konstantna, saj že zelo majhne spremembe vplivajo na

hitrost nastajanja plina. Metansko vrenje lahko vodimo pri treh optimalnih temperaturnih območjih: psihrofilno (15 – 20 °C), mezofilno (32 – 42 °C) in termofilno (48 – 55 °C). Višja kot je temperatura, hitreje nastaja bioplin. Na vsakih 10 do 15 °C se hitrost nastajanja bioplina podvoji, zadrževalni čas pa se skrajša. Istočasno narašča tudi količina plina, ki se lahko pridobi iz določene količine substrata. Skozi celoten proces moramo zagotoviti konstantno temperaturo, saj nihanja negativno vplivajo na produkcijo bioplina. Termofilni anaerobni proces je bolj občutljiv na temperaturna nihanja in zahteva daljši čas prilagajanja na novo temperaturo, saj termofilne bakterije tolerirajo temperaturno nihanje zgolj ± 1 °C, mezofilne pa do ± 3 °C. Nihanje temperature vpliva na proizvodnjo bioplina, izgube pa znašajo tudi do 30 %. Pri termofilnem načinu delovanja je prav tako potrebno, zaradi boljšega prenosa mase in toplote, zagotoviti učinkovitejše mešanje, dotok substrata v digester pa mora biti enakomernejši. Zaradi težjega načina vodenja termofilnega metanskega vrenja, se bioplinarne večinoma odločajo za mezofilno vrenje (Weiland, 2010).

2.1.2 Sestava bioplina

Sestava bioplina je odvisna od substrata, ki ga uporabljamo za digestijo. Bioplin vsebuje: od 50 do 75 % metana (CH₄), od 25 do 45 % ogljikovega dioksida (CO₂), od 1 do 3 % vodika (H₂); od 0,1 – 0,5 % vodikovega sulfida (H₂S); od 0,5 – 2 % N₂ in manj kot 0,1 % CO.

Ker produkcija bioplina poteka v vodnem mediju, se težko izognemo izhlapevanju, zato bioplin vsebuje tudi vodno paro. Včasih bioplin vsebuje še siloksane, ostanke kozmetičnih sredstev ter aditivov hrani. Vodikov sulfid je zelo agresiven in koroziven plin, ki lahko poškoduje motorje z notranjim izgorevanjem. Da se temu izognemo, moramo vodikov sulfid intenzivno odstranjevati iz bioplina. Kurilna vrednost bioplina je odvisna od vsebnosti metana in znaša od 20 do 25 MJ/m³ (energijska vrednost metana je za primerjavo 35,8 MJ/m³) (Seadi in sod., 2010) (Preglednica 1).

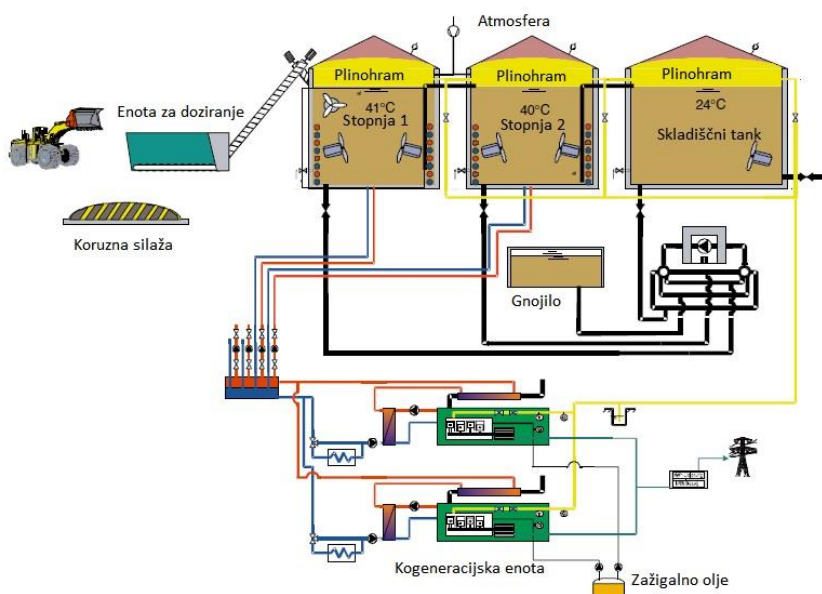
Preglednica 1: Sestava bioplina (Seadi in sod., 2010: 43)

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

Številne velike kmetije imajo dandanes tudi že bioplinsko napravo. Kot substrat uporabljajo gnoj ali gnojevko, dodajajo pa še številne kmetijske ostanke (travo, silažo, sadne olupke, odpadke pri pridelavi zelenjave). Od substrata je seveda odvisen izplen in kakovost bioplina. S pomočjo fermentacijskih dodatkov vplivamo na razmerje med ogljikom in dušikom, saj ima razmerje pomemben vpliv na reprodukcijo mikroorganizmov. Razmerje se mora gibati od 1:10 do 1:16. Ustrezno razmerje vpliva na kakovost bioplina. Cilj vsake bioplinarne je čim večji delež metana, v primerjavi z ostalimi komponentami. Presežek ogljikovih hidratov glede na beljakovine, vodi v nastanek manjše količine metana ter večjih količin vodika in ogljikovega dioksida. Maščobe dajejo največ plina z visoko vsebnostjo metana. Beljakovine in ogljikovi hidrati dajo z metanom zelo osiromašen bioplin. Iz gnojevke pri reakcijski temperaturi 32 °C nastane od 0,8 do 1,0 m³ plina na kilogram razgrajene suhe organske snovi. Do razlik prihaja, ker so mikroorganizmi nesposobni razgraditi določene organske snovi kot je lignin (Jejič in sod., 2010).

2.1.3 Bioplinska naprava

Osnova bioplinske naprave je fermentacijska posoda, imenovana tudi digestor. Če gre za izmenični proces, sta potrebni dve fermentacijski posodi. Izmenični proces je donosnejši, zaradi boljšega izkoristka in zaradi manjšega ostanka metana v digestatu. V digestorju sta mešalo in izmenjevanik toplote, ki je običajno vodni. Za zagotovitev homogenih pogojev in za preprečitev nastajanja skorje na površini, je potrebno mešanje. Del bioplinske naprave je tudi plinohram. Če se bioplin koristi kot vir električne energije, je potreben še motor z notranjim izgorevanjem, ki deluje na bioplin in žene generator električnega toka (Jejič in sod., 2010) (Slika 3).



Slika 3: Tipična dvostopenjska bioplinarna (Weiland, 2010: 855).

2.2 BIOMASA

Vse, kar zraste na Zemlji imenujemo biomasa. V biomasi se je s pomočjo fotosinteze skladiščila sončna energija. Slovenija je v Evropi po gozdnatosti na tretjem mestu, takoj za Finsko in Švedsko.

Lesnopredelovalna industrija kot osnovno surovino uporablja les. Pri predelavi lesa nastanejo številni ostanki, ki jih lahko koristno uporabimo za proizvodnjo toplotne in električne energije. Kot vir energije lahko uporabimo ostanke, ki nastanejo pri sečnji gozdov, pri obrezovanju sadovnjakov, pri urejanju parkov in vrtov, ipd.

Številni kmetijski pridelki so v manjšem deležu namenjeni kot surovina v biokemični industriji in za proizvodnjo energije. Pomembno je, da pri tem ne prihaja do namerne zlorabe pridelkov, ki so prvotno namenjeni prehrani ljudi. Rastline, ki jih imenujemo energetske rastline, uporabljamo za proizvodnjo pogonskih goriv, elektrike in toplote. V ta namen se uporabljajo trava, koruza in oljna ogrščica. Tudi koruza je namenjena prehrani in krmi, zato za energetske namene uporabljamo koruznico ali storže. V kmetijstvu nastanejo številni ostanki in odpadki, ki jih lahko uporabimo za fermentacijo, pridobljeni plin pa je vir energije.

Ker prihodnost kmetijstva ni ravno blesteča, so kmetje za svoj obstoj primorani iskati dodatne vire prihodkov. Vendar pa je prednost podeželja ravno v pridelavi zdrave hrane, surovin in energije. V ospredje zopet prihaja ekološko kmetovanje, saj z intenzivnim kmetovanjem vplivamo na degradacijo okolja posledično pa tudi na naše zdravje.

Kmetje s predelavo in izrabo biomase za pridobivanje energije izboljšujejo svoj položaj. To se odraža zlasti v razvitih državah Evropske unije, kot so Švedska, Danska, Nemčija, Avstrija in Italija (Sabol, 2007).

2.3 PIŠČANČJI GNOJ

Piščančji gnoj (PG) je zelo močno in hranljivo gnojilo za rastline, saj vsebuje od 3 do 4 krat več dušika (N) v primerjavi z hlevskim gnojem. Prav tako vsebuje od 5 do 10 krat več fosforja (P_2O_5) in od 2 do 3 krat več kalija (K_2O). Sestava in tekstura PG se spreminjata in sta odvisna od: zunanje temperature, vrste perutnine in starosti gnoja. S starostjo gnoj dozoreva, to pa vpliva na količino hranil. Pri uporabi PG je potrebno vedeti, da se poleg samih izločkov živali v gnoju nahajajo še perje, voda, krmila in nastilj. Gnoj z nastilom vsebuje več organske snovi (lignocelulozne biomase) kot gnoj izpod baterij (Kalan, 2010) (Preglednica 2).

Preglednica 2: Vrednost hranil, organske snovi in vode v piščančjem gnoju v % (Leskošek, 1988: 40).

Vrsta gnoja	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Org. snov	voda
Svež piščančji gnoj	1,70	1,60	0,90	2,00	-	35,0	56,0
Zrel piščančji gnoj	3,80	2,60	3,90	5,20	0,66	57,0	20,0

2.4 RASTLINE KOT VIR OGLJIKA V SUBSTRATU

2.4.1 Koruza (koruzna silaža)

Koruza (*Zea mays*) je enoletna žitarica, ki izvira iz srednje in južne Amerike. Nastala je iz naravno rastoče divje koruze. V Evropo jo je po odkritju Amerike prinesel Krištof Kolumb. Spada v družino trav, ljudje pa jo gojimo za prehrano in za živalsko krmo. Največje pridelovalke koruze na svetu so ZDA, v Evropi pa jo pridelujejo predvsem jugovzhodne dežele. Med žiti je koruza po razširjenosti na tretjem mestu, takoj za rižem in pšenico. Koruza je zahtevna za pridelavo, saj zahteva toplo podnebje in precej vlage (Kalan, 2010).

Koruzna silaža je nepogrešljiva krma pri tržni reji goved. Kljub veliki razširjenosti travinja in dejstvu, da je v Sloveniji več kot 70 odstotkov kmetijskih zemljišč v območjih z omejenimi dejavniki za kmetovanje, kar na 82 % kmetij za prirejo mleka živino krmijo s koruzno silažo.

Siliranje je postopek spravila krme, pri katerem z anaerobnimi razmerami in z zakisanjem preprečimo kvarjenje krme. Zakisanje je rezultat mlečnokislinskega vrenja, ki lahko poteka sam po sebi, lahko pa ga spodbudimo s posebnimi silirnimi pripravki. Zakisanje je mogoče doseči tudi z dodajanjem anorganskih ali organskih kislin.

Pri siliranju nastopajo številni mikroorganizmi. V silazah najpogosteje najdemo mlečnokislinske bakterije, klostridije, enterobakterije, kvasovke in plesni. Od teh so zelene le mlečnokislinske bakterije, vsi drugi mikroorganizmi so neželeni. Kvasovke in plesni povzročajo kvarjenje silaže, klostridiji pa povzročajo velike izgube energije in slabšajo beljakovinsko vrednost silaže. Poleg tega vsi ti mikroorganizmi z mlečnokislinskimi bakterijami tekmujejo za hranila, in s tem onemogočajo ali upočasnjujejo njihovo rast (Čergan in sod., 2008) (Preglednica 3).

Za proizvodnjo energije se lahko v največji meri uporabljajo žetveni ostanki koruze (koruznica, koruzni storži). Uporaba koruznega zrnja za energetske namene je neetično. Omenjeni žetveni ostanki se uvrščajo v rastlinske ostanke, ki se po lastnostih približno primerjajo z olesenelimi rastlinskimi ostanki. Potencial koruznice kot energenta je v

primerjavi z žetvenimi ostanki drugih poljščin v Sloveniji največji. Vse koruznice ne moremo uporabiti v energetske namene, ker se uporablja tudi v druge namene (zaoravanje, prehrana živali). Za uporabo biomase kot goriva je primerna predvsem suha biomasa in biomasa, ki se preprosto pobira (koruznica, pobrana nekaj dni po pobiranju koruze) (Čergan in sod., 2008).

Preglednica 3: Načini izkoriščanja koruze za energetske namene (Čergan in sod., 2008: 152).

Vhodni material	Tehnologije izkoriščanja
Koruznica	Sežiganje, uplinjanje, utekočinjanje
Koruzna silaža	Digestija (bioplin)
Koruzni storži (brez zrnja)	Sežiganje
Koruzno zrnje (vlažno), koruznica	Fermentacija

2.4.2 Pšenica (pšenična slama)

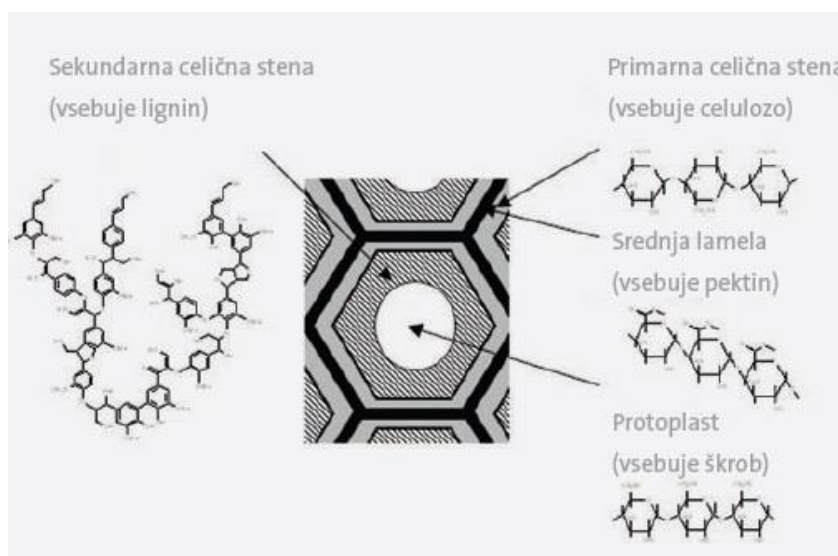
Pšenica je vrsta žita in spada v družino sladik (Poaceae). V višino zraste do 1,5 m. Je ena najstarejših kulturnih rastlin na svetu, saj so jo pridelovali že Egipčani. Izvira iz Mezopotamije, od koder se je razširila po svetu. Pšenica se je najbolj razširila v 11. stoletju, ko je na dan prišel beli kruh. Danes je pšenica pomembnejša surovina v mlinarstvu. Poznamo 27 različnih vrst pšenice. Za gospodarsko uporabo sta pomembni samo dve vrsti: *Triticum aestivum* in *Triticum durum*. Največji proizvajalci pšenice so Kitajska, Indija, ZDA in Francija. Klasje dozori julija ali avgusta, iz njega pa se izluščijo zrna, ki so v svetovnem merilu eden največjih prehrabnih virov. Pšenica služi kot sestavina enemu najpomembnejših prehrabnih proizvodov v Evropi- kruhu. Poleg kruha se iz pšenične moke dela še razne vrste peciva in testenine ter najrazličnejše druge izdelke za prehrano ljudi (Pšenica, 2008).

Pšenica je pomembna tudi za krmljenje živali. Njena drobna in zdrobljena zrna ter otrobi so pomembno močno krmilo za živino. V zelenem stanju je pšenica sama ali v mešanici s stročnicami dobra živinska krma bodisi sveža, posušena ali silirana. Pšenično slamo se uporablja za steljo, v izjemnih razmerah tudi za živinsko krmo. V živilski industriji uporabljajo pšenico za izdelovanje raznih vrst moke. Iz pšeničnega zrna pridobivajo tudi škrob, alkohol itd. Iz pšenične slame je mogoče napraviti papir in celulozo ter plesti klobuke in torbice (Todorić, 1982). V zadnjem času pa je lahko slama tudi energetska surovina, iz katere pridobivajo biogoriva po konceptu biorafinerij (Kaparaju in sod., 2009).

2.5 LESNA BIOMASA

Lesne glive v naravi pripomorejo k kroženju snovi, zlasti ogljika. Razgrajujejo les in lesno biomaso, kljub temu da ima lesni material zelo kompleksno kemijsko strukturo (slika 4) (Tišma, 2012). Razgradnja lesa oz. lignoceluloznega materiala z uporabo gliv se lahko uporablja v lesni in papirni industriji. Uporabljajo se zlasti encimi gliv (lignin peroksidaza, mangan peroksidaza) za odstranjevanje lignina v procesih beljenja. S tem pospešimo beljenje in zmanjšamo porabo kemikalij, zlasti klora. Koristi pri uporabi ksilanaz pa so tudi pri hidrolizi celuloze v sladkorje pri številnih raziskavah proizvodnje biogoriv (Tengerdy in sod., 2003; Singh in Chen, 2008). Lignocelulozno biomaso sestavljajo tri komponente, in sicer: celuloza, hemiceluloza in lignin. Največji problem vseh raziskovalcev pa je, kako premagati visoko nerazgradljivost lignoceluloze do fermentabilnih sladkorjev. V biomasi je zelo velik energijski potencial, vendar pa je pot do popolnega izkoristka tega potenciala še dolga (Lee, 2005) (Slika 4).

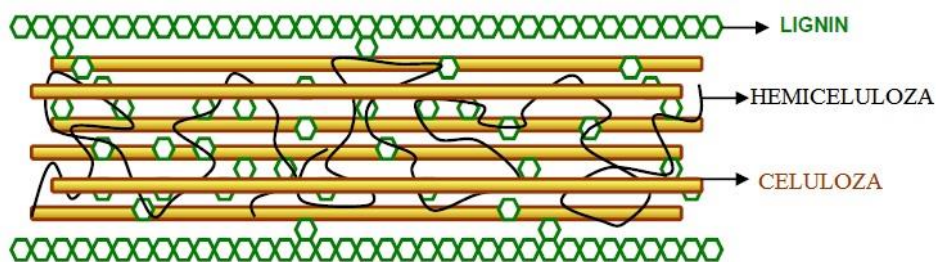
Celuloza je glavna komponenta lignoceluloznih celičnih sten. Je polisaharidni polimer, z veliko molekulsko maso, sestavljen iz ponavljajočih enot disaharida (celobioze). Celobiozo tvorita dve glukozi, ki sta povezani z β -1-4 glikozidno vezjo (Mussatto in sod., 2010).



Slika 4: Zapletena kemična struktura lignoceluloznega materiala (Tišma in sod., 2012: 21).

Hidroksilne skupine, ki so prisotne v celulozni verigi, vodijo v formacijo vodikovih vezi v isti ali bližnji verigi. Rezultat so mikrofibrile, ki so zelo raztegljive in močne. Celulozo sestavljata dve regiji: amorfna in kristalična. Kristaličnost lahko okarakteriziramo s kristaličnim indeksom. Višji kot je indeks, težavnejša je razgradnja. Celulozne mikrofibrile so druga na drugo pritrjene s hemicelulozo ali pektinom in pokrite z ligninom. Takšna ureditev omogoča celulozi odpornost pred biološko in kemijsko razgradnjo (Zheng in sod., 2014).

Hemiceluloza je linearen in razvejan heterogeni polimer sestavljen iz različnih sladkorjev: L-arabinoze, D-galaktoze, D-glukoze, D-manoze, D-ksiloze pa tudi iz nekaterih drugih komponent (ocetna, glukoronska kislina). Ogrodje verige hemiceluloze je lahko homopolimer ali heteropolimer. Glede na sladkorni ostanek v ogrodju ima hemiceluloza različne klasifikacije: ksilan, manan, glukon, glukomanan, galaktomanan, ksiloglukan, β -glukan. Molekula hemiceluloze je amorfna, kar jo naredi enostavnejšo za hidrolizo v primerjavi s celulozo (Mussatto in Teixeira, 2010) (Slika 5).



Slika 5: Celuloza predstavlja skelet, okrog katerega se prepletata lignin in hemiceluloza (Mussatto in Teixeira, 2010: 897).

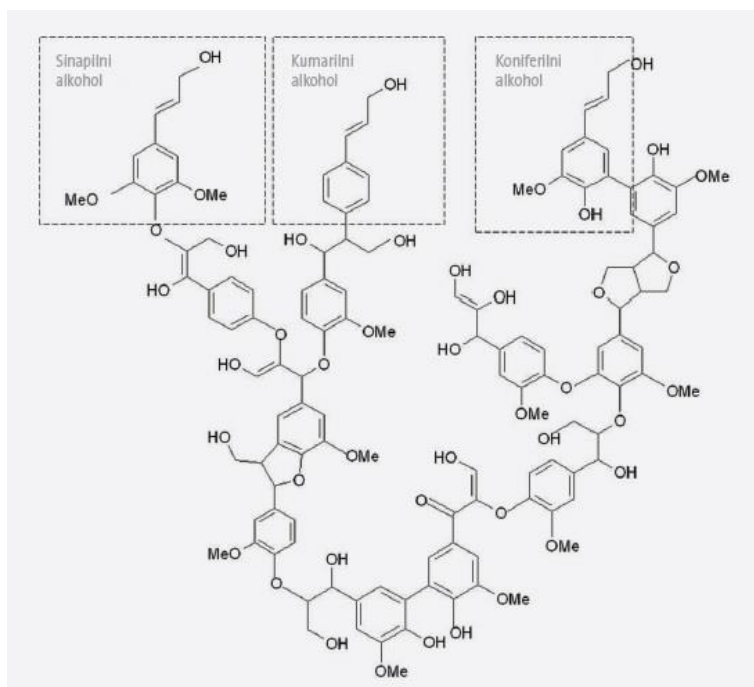
Odstranitev hemiceluloze in lignina, ki obdaja celulozo, pogosto izboljša učinkovitost razgradnje celuloze do glukoze (Singh in Chen, 2008). Glive bele trohnobe lahko razgradijo v lignoceluloznih materialih lignin do enostavnih sladkorjev, s čimer pripravijo material za nadaljnjo biotehnološko proizvodnjo- na primer za proizvodnjo alkohola (Tišma in sod., 2012).

2.5.1 Lignocelulozni material

Največ lignoceluloznih odpadkov se proizvede v lesni industriji, kmetijstvu ter industriji papirja in celuloze. Kemična struktura lignoceluloznega materiala, kateri sestavlja les, je prikazana na sliki 4 in 5. Lignin je poleg celuloze najbolj razširjena polimerna organska snov v rastlinah. Celuloza ima ponavljajočo se strukturo, medtem ko je struktura lignina kompleksna in nepravilna. Molekula lignina je sestavljena iz enot hidroksifenil propana, ki so z vezmi C-C in C-O-C povezane v tridimenzionalno strukturo. V vodi je netopen. Lignin je najbolj uporna komponenta rastlinske celice. Večje kot je razmerje lignina, večja je odpornost na kemijsko in encimatsko razgradnjo. Med ligninom in hemicelulozo ter med ligninom in celulozo obstajajo kemijske vezi (Xia in sod., 2003; Taherzadeh in Karimi, 2008) (Slika 6).

Lignin ima v primerjavi s celulozo oz. hemicelulozo drugačno (nepravilno) strukturo. Znotraj lignina ni ponavljanj vezi med monomeri, ki ga sestavljajo. Lignin nastaja z naključno sintezo iz prekurzorjev koniferilnega, p-kumarilnega in sinapilnega alkohola. Alkoholi se med seboj razlikujejo po številu metoksi skupin na aromatskem obroču.

Hemiceluloza in celuloza sta razgradljiva polimera, vendar pa, če sta prepletena z ligninom, to znatno otežuje razgradnjo. Njegova funkcija je zagotoviti togost in vezljivost celične stene. Posledica prisotnosti lignina je tudi neprepustnost ksilema (Walter in sod., 2004; Okuda in sod., 2008).



Slika 6: Struktura lignina (Tišma in sod., 2012: 21).

Biorazgradnja lignina je za raziskovalce zanimiva iz dveh razlogov. Lignin je zelo pomemben pri globalnem kroženju ogljika v naravi in hkrati je tudi izhodna spojina za številne koristne produkte (vanilin, benzen, razprševala, emulgatorji, kelatne spojine, antioksidanti) (Mussatto in sod., 2007).

2.5.2 Glive bele trohnobe in njihova uporaba

Danes je znanih okoli 90 tisoč vrst gliv, vendar jih je le nekaj sposobnih razgrajevati les. Te glive spadajo v debla Basidiomycota in Ascomycota. Glive razkrojevalke lesa lahko razvrstimo v tri skupine, in sicer: glive bele trohnobe, glive rjave trohnobe in glive mehke trohnobe. Delitev temelji na spremembi barve lesa. Poleg tega pa se lesu, ki so ga kolonizirale glive spremenijo lastnosti (izguba čvrstosti, prožnosti, les postane krhek). Lesne glive imajo pomembno vlogo v procesu kroženja snovi v naravi, saj lesno biomaso razgradijo do enostavnih produktov: ogljikovega dioksida, vode in mineralov. Z razgradnimi produkti lesa se izboljšuje struktura in kakovost humusno-akumuliranih slojev tal. Glive rjave trohnobe napadajo in razkrojijo celulozo in polioze, v ligninu pa sprožijo

samo manjše spremembe. Po razkroju ostane oksidiran lignin, ki je rjave barve. Les pri tem razpoka in izgubi vse mehanske lastnosti (Sigoillot in sod., 2012).

Mehko trohnobo povzročajo glive iz skupine Ascomycota in Deuteromycota. Glive mehke trohnobe razkrajajo zgolj lesne polisaharide. Lignina ne razkrajajo. V vlažnih razmerah je rezultat na površini vse bolj mehek les, v suhih pa les postane rjav in drobljiv. Najpogostejši organizmi, ki povzročajo površinski razkroj lesa so glive bele trohnobe. Njihova glavna značilnost je, da so sposobni razgradnje in mineralizacije lignina (Sigoillot in sod., 2012).

Za glive bele trohnobe je značilno, da se razpadajoči les obarva belo. Les je po razkroju vlažen, mehek in spužvast. Ta skupina vključuje veliko število gliv, predvsem skupino Basidiomycota. Bela trohnoba je lahko: simultana (sočasna) in selektivna. Glive simultane bele trohnobe razgrajujejo vse komponente. Pri tem sodeluje zelo veliko različnih encimov. Razgradnja celične stene poteka od lumna proti središčni lameli. Najbolj znana predstavnika te skupine sta *Trametes versicolor* in *Phanerochaete chrysosporium*, ki spadata v skupino Basidiomycota (Sigoillot in sod., 2012). Glive selektivne bele trohnobe razgrajujejo lignin, pri tem pa ostane celuloza skoraj nedotaknjena. Predstavniki te vrste trohnobe je gliva *C. subvermispora* (Tanaka in sod., 2009).

Da lahko glive bele trohnobe razkrajajo lignocelulozo (zlasti lignin), izločajo ekstracelularne lignolitične encime. Najpomembnejši encimi so peroksidaze in lakaze (Hatakka, 1994; Ander in Marzullo, 1997; Asgher in sod., 2008; Sigoillot in sod., 2012). Razgradnja lignina je oksidativen proces. Ključni encimi, ki pri tem sodelujejo, so fenol oksidaze. Najbolj raziskani so lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) in lakaze. LiP in MnP oksidirata substrat z dvema zaporednima oksidacijama (vsakokrat po en elektron) s tvorbo intermediata kationskega radikala. LiP in MnP sta bili odkriti sredi osemdesetih let, sta pravi ligninazi, zaradi njihovega visokega redoks potenciala. LiP razkrajja nefenolne enote lignina (90 % polimera), medtem ko MnP generira Mn^{3+} , ki ima vlogo oksidacijskega sredstva tako za fenolne kot za nefenolne enote. Lakaza je modra bakrova oksidaza, ki katalizira eno elektronsko oksidacijo fenolov ali drugih z elektroni bogatimi substrati. Poročajo pa tudi o nekaterih drugih encimih, ki so prav tako vključeni v razgradnjo lignina: aril alkohol oksidaza, aril alkohol dehidrogenaza, glioksal oksidaza, veratril alkohol oksidaza, oksalat dekarboksilaza, kinon reduktaza (Sanchez, 2009).

Lakaze ali LiP in MnP oksidirajo lignin, s tem pa se tvorijo aromatski radikali. Ti nastanejo v različnih neencimskih reakcijah, kot so cepitev C-4 etrske vezi, cepitev aromatskega obroča, cepitev C-C vezi, demetoksilacija. Aromatski aldehidi, ki se sprostijo po cepitvi C-C vezi lignina, so substrati za vodikov peroksid. Fenoksi radikali nastali s cepitvijo C-4 etrske vezi, lahko repolimerizirajo v lignin, če seveda niso najprej reducirani z oksidazami v fenolne komponente. Le-te pa so lahko ponovno reoksidirani z lakazami

ali peroksidazami. Fenoksi radikal je lahko tudi predmet za cepitev C-C vezi, pri čemer nastane kinon. Kinoni prispevajo k oksidaciji kisika, skupaj z kinon reduktazo, lakazami in peroksidazami. Posledica oksidacije kisika je redukcija železa, ki je prisoten v lesu. Hidroksilni radikal je zelo mobil in močan oksidant, ki lahko začne napad na lignin, v začetnih stopnjah razkroja lesa, kjer majhne pore in nepoškodovana celična stena preprečujeta penetracijo lignolitičnim encimom. Nadaljnja razgradnja lignina poteka z oksidativnim napadom encimov. Na koncu enostavni produkti iz lignina vstopijo v glivine hife in so vključeni v intracelularno katabolno pot (Sanchez, 2009).

Glive bele trohnobe so predmet številnih raziskav, med drugimi se uporabljajo za izrabo odpadkov iz kmetijske in živilske industrije ter za proizvodnjo visoko kakovostnih izdelkov. Rezultati teh raziskav so v mnogih primerih našli uporabo v industriji oziroma se tržijo (proizvodnja encimov, procesi v industriji papirja) (Tengerdy in Szakacs, 2003). Največji potencial imajo lignocelulozni odpadki kot surovine za proizvodnjo biogoriv. Cena biogoriva, proizvedenega iz lignoceluloznih materialov še ne more konkurirati ceni nafte. Za pretvorbo lignoceluloze do glukoze je potrebno najti enostaven in poceni postopek.

Raziskovalci (Sun in Cheng, 2002; Singh in Chen, 2008; Chaturvedi in Verma, 2013; Zheng in sod., 2014) so preučevali številne metode predobdelave lignoceluloznega materiala, ki jih v grobem lahko razdelimo na fizikalne (mletje, žarčenje, izpostavljanje visokim temperaturam in tlaku), kemijske (uporaba kemikalij, zlasti kislin in baz) ter biološke (obdelava z glivami in encimi). Lastnosti uspešne metode za predobdelavo :

- mora izboljšati prebavljivost substrata,
- mora preprečiti degradacijo (razgradnjo ogljikovih hidratov),
- mora preprečevati nastanek inhibitorjev,
- minimalna potreba po kemikalijah,
- nizka poraba energije,
- cenovno učinkovita in okolju prijazna metoda.

Uporaba gliv bele trohnobe v pogojih gojenja na trdnih substratih izpolnjuje vse navedene zahteve. Poleg gojenja gliv bele trohnobe na lignoceluloznih materialih so področja njihove vse pogostejše uporabe tudi odstranitev različnih umetnih barvil pri čiščenju odpadne vode, izboljšanje prebavljivosti krme za živino in bioremediacija (odstranitev ksenobiotikov).

2.5.3 Fermentacija na trdnih substratih

Z razgradnjo lignoceluloznega materiala s pomočjo gliv bele trohnobe v fermentacijskih razmerah na trdnih substratih posnemamo postopek razgradnje, ki se pojavlja v naravi, v nasprotju s procesi v tekočih substratih, ki v naravi niso običajni. Fermentacija na trdnem

substratu se izvaja v odsotnosti proste, sorpcijsko nevezane vode. Materiali, ki se pri tem uporabljajo niso topni in delujejo kot fizični nosilci. V primeru uporabe lignoceluloznih materialov, so hkrati material za podlago in vir hranilnih snovi. Ti substrati so lahko inertni (različni sintetični materiali) ali neinertni (lignocelulozni materiali) (Pandey in sod., 2008). Z glivami bele trohnobe iz PG odstranimo lignin, ki je ovira za uspešno (intenzivno) fermentacijo bakterij, ki sodelujejo pri metanogenezi. Rezultat izpostavitve glivam je večja izraba substrata, manj ostankov in več bioplina.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Za izvedbo omenjenega poskusa, smo poleg tehničnih pripomočkov potrebovali tudi žive organizme, in sicer micelije gliv.

3.1.1 Vrste gliv

3.1.1.1 *Trametes versicolor*

Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*) je ena najbolj pogostih lesnih gliv pri nas in tudi v svetu. Najdemo jo na vseh kontinentih, razširjena pa je tako v listnatih kot v mešanih gozdovih. Najraje ima les listavcev, zlasti bukovino. Okužuje posekan les in poškodovana oslabljena drevesa, lahko pa tudi izdelke iz lesa, ki so v stiku z zemljo in s tem dela precejšnjo škodo. Na lesu povzroča belo trohnobo. To pomeni, da razkraja predvsem lignin, celuloza pa ostaja v prebitku. Značilnost takšnega razkroja je bela obarvanost strohnelega lesa (Pohleven, 2008) (Slika 7).



Slika 7: Trosnjaki pisane ploskocevke (Pohleven, 2008: 115).

Zaradi žilave zgradbe trosnjak ni užiten, primeren pa je za kuhanje čaja. Glivi pripisujejo številne zdravilne učinke od izboljšanja imunskega sistema in delovanja proti prehladu ter drugim virusom. Najbolj znan je njen učinek delovanja proti raku. Uporabljajo jo tudi pri odpravljanju nezaželenih stranskih učinkov po kemo- in radioterapiji. Gliva proizvaja številne nespecifične encime. Tako je zmožna razgradnje polikloriranih organskih biocidov, saj so po zgradbi podobni gradnikom lignina. Tako jo že uporabljajo pri uničevanju posebnih odpadkov, z Lindanom in pentaklorofenolom impregniran (zaščiten) les ter razstrupljanju polj, kjer so bila v preteklosti uporabljena poliklorirana organska

fitofarmacevtska sredstva, kot je na primer Atrazin. Postopek razstrupljanja odpadkov in zemlje z glivami imenujemo mikoremediacija (Pohleven, 2008).

3.1.1.2 *Pleurotus ostreatus*

Bukovega ostrigarja poznamo tudi pod imenom zimski ostrigar. Ime izvira iz ostrigam podobne oblike klobuka, kar lahko vidimo tudi na sliki 8. Prevod latinskega imena *pleurotus* (stranski) nakazuje smer izraščanja plodišč. Nekateri pa menijo, da ime ostrigar ne izvira iz oblike klobuka temveč iz okusa gobe, ki spominja na ostrige. Glivo najdemo predvsem na lesu listavcev (najpogosteje na bukovini), zelo redko tudi na iglavcih in je tipičen saprofit. Razširjen je v zmernem in subtropskem podnebnem pasu severne poloble. Navadno se ne pojavlja na konstrukcijskem lesu.

P. ostreatus povzroča tipično belo trohnobo. Optimalna temperatura rasti je okoli 27 °C ter vlažnost lesa med 60 in 80 %. Pri teh pogojih lahko micelij priraste tudi do 7,5 mm dnevno. Plodišča bukovega ostrigarja (slika 8) so zelo okusna. To je tudi razlog, da ga zelo pogosto gojijo v prehrabene namene. Okus ostrigarja je v največji meri odvisen od substrata, na katerem ga gojimo (Humar, 2008).



Slika 8: Trosnjaki bukovega ostrigarja (Humar, 2008: 353)

Ostrigarja uporabljamo še za druge namene, in sicer za mikoremediacijo, kot biokontrolni agent in v medicini. Struktura onesnažil (odpadna olja, pesticidi, biocidi) pri mikoremediaciji, je sorodna strukturi lignina. Encimi ostrigarja lahko onesnažila v določenih pogojih mineralizirajo. Pri uporabi ostrigarja kot biokontrolni agent, bi z micelijem lahko okužili sveže šore. Na ta način bi preprečili ali omejili okužbo s parazitskimi glivami (štorovka, jelov koreničnik). V zadnjem času še posebej pridobiva pomen uporabe te glive v medicinske namene. Strokovnjak s področja raziskovanja gliv (Paul Stamets, 2000) poroča, da uživanje bukovega ostrigarja deluje protivnetno, uravnava

krvni tlak, znižuje raven sladkorja in holesterola v krvi, pospešuje celjenje ran ter izboljšuje delovanje imunskega sistema (Humar, 2008).

3.1.1.3 *Hypoxylon fragiforme*

Ogljena kroglica (*Hypoxylon fragiforme*) razkraja les listavcev v Evropi in Severni Ameriki. Uvrščamo jo med saprofitske glive. Odmrle veje okuži kmalu po tem, ko se odlomijo. Trosnjaki se najpogosteje pojavljajo na lubju vej bukve, vendar pred njo niso varne niti veje jelše, breze, gabra, topola, hrasta ali lipe. Včasih napada tudi bolj eksotična drevesa, kot so palme. Gliva zelo dobro razkraja les, čeprav spada med zaprtotrosnice (Ascomycotina). Na lesu povzroča piravost, uvrščamo pa jo med glive bele trohnobe. Nekateri avtorji poročajo, da so latentni micelij ogljene kroglice zasledili tudi na živih drevesih. Gliva je zelo agresiven primarni kolonizator lesa. Na lesu se lahko zadrži tudi več let. V laboratorijskih pogojih v 16 tednih razkroji povprečno 40 % mase bukovine.

Trosnjaki ogljene kroglice so hemisferične, pogosto celo povsem sferične oblike. Med dozorevanjem trosnjaki spreminjajo barvo. Najprej so sivi, nato za kratek čas postanejo roza- rdeči, zrela plodišča pa so temno rjave barve. Ko se iz peritecijev sprostijo črne spore, površina potemni in končno stroma postane skoraj črna kot oglje (Humar, 2009) (Slika 9).



Slika 9: Trosnjaki ogljene kroglice z značilno črno površino, po kateri je gliva dobila tudi slovensko ime (Humar, 2009: 451).

Ogljena kroglica je zelo uporabna v zdravilne namene. Iz trosnjakov so že izolirali učinkovine (fragiformine), ki zavirajo napredovanje AIDS-a pri HIV pozitivnih bolnikih. Poleg tega mladi trosnjaki ogljene kroglice vsebujejo učinkovine z baktericidnim in fungicidnim delovanjem. Lignin razkraja nespecifično, zato je ogljena kroglica sposobna razkrajati tudi druga organska onesnažila. Gliva bi bila primerna za čiščenje s pesticidi onesnaženega okolja (mikoremediacija) (Humar, 2009).

3.1.2 Piščančji gnoj

Piščančji gnoj smo dobili v Bioplinarni Draženci, Perutnine Ptuj d.d. Uporabili smo zreli piščančji gnoj, kateremu so bili v steljo dodani lesni oblanci. Piščančji gnoj smo razprostrli, da se je posušil, pri tem pa smo pazili, da ni izgubil prvotne strukture.

3.1.3 Rastlinski material

Rastlinski material, in sicer pšenično slamo ter koruzno silažo, smo dobili v Bioplinarni Draženci, Perutnine Ptuj d.d. Koruzno silažo smo prav tako posušili na zraku.

3.1.4 Inokulum

Inokulum (gnojnico) z bakterijami smo dobili iz digestorja iz Bioplinarne Draženci.

3.1.5 Laboratorijska oprema

Za izvedbo poskusa smo potrebovali:

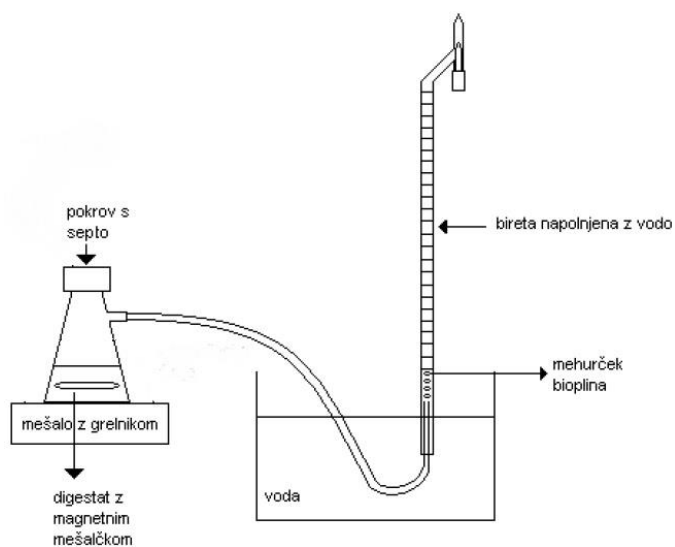
- križni mlin s siti na obodu znamke Condux,
- mlin RETSCH SM2000,
- petrijevke,
- tehtnico,
- laboratorijski sušilnik,
- eksikator,
- plastično posodo, 5 L,
- merilne valje, 50 ml, 100 ml, 500 ml,
- destilirano vodo,
- pH meter,
- steklene kozarce za vlaganje,
- preluknjane aluminjaste pokrovčke,
- sanitetno vato,
- tehnični etanol,
- avtoklav,
- laminarij,
- špiritni gorilnik,
- ezo,
- plutovrt,
- rastno komoro,

- zamrzovalnik,
- cvetlična korita,
- plastične posode različnih velikosti,
- erlenmajerice z enim stranskim izhodom in navojem ter izbočenim dnom, 250 ml,
- gumijaste zamaške,
- silikonsko cev,
- nepovratne ventile,
- mešalno-grelno ploščo IKA, RT 15 power,
- magnetne mešalčke,
- birete, 100 ml in 50 ml,
- stojala za birete,
- prižeme,
- kovinske posode,
- tekoči dušik,
- termometer in
- žogico (sesalko) za pipetiranje.

3.1.6 Opis aparature

Anaerobni digester je sestavljen iz 250 ml erlenmajerice z enim stranskim izhodom, na katerem je bila pritrjena silikonska cev z nepovratnim ventilom. Nepovratne ventile smo uporabljali zato, da bi preprečili uhajanje vode v cev, če bi se slučajno v erlenmajerici ustvaril podtlak. Silikonska cev je bila speljana v spodnji del narobe obrnjene in v vodo potopljene 100 ml birete, po kateri se je sproščal nastali bioplin in izpodrival vodo. Na vrhu erlenmajerice se je nahajal gumijast zamašek. Mešanje v erlenmajerici smo zagotovili z magnetnim mešalčkom in predhodno smo označili erlenmajerice ter odgovarjajočo bireto. Vsaka erlenmajerica je imela svojo bireto.

Štirinajst anaerobnih digesterjev smo postavili na magnetno mešalo IKA (RT 15 power) s petnajstimi mešalnimi mesti. Na petnajsto mesto smo postavili z vodo napolnjeno erlenmajerico, ki je služila kot kontrola temperature. Vsak anaerobni digester smo pred zagonom prepihali z dušikom ter vstavili cevko v bireto. Tako smo ustvarili anaerobne pogoje. Po končanem prepihanju smo vključili mešalno-grelno ploščo, ki je začela tako z mešanjem kot z gretjem vsebine anaerobnega digesterja. Mešalno-grelno ploščo smo nastavili na temperaturo 42 °C, s hitrostjo 360 obratov magnetka na minuto (Slika 11).



Slika 10: Shematski prikaz anaerobnega digestorja povezanega z bireto za odčitavanje volumna dnevno proizvedenega bioplina (prirejeno po Nemet, 2009: 18).



Slika 11: Aparatura za pridobivanje bioplina z anaerobno fermentacijo.

3.2 METODE

3.2.1 Mletje

Mletje lignoceluloznega materiala je zelo pomembno, saj s tem zmanjšamo velikost delcev in dosežemo boljšo homogenost, lažje pa je tudi rokovanje. Z mletjem se spremeni naravna ultrastruktura lignoceluloznega materiala. Poveča se dostopna površina, zmanjša se stopnja kristaličnosti celuloze in zmanjša se stopnja polimerizacije celuloze (Zhenk in sod., 2014).

Za glive bele trohnobe je bolj dostopen substrat, če imajo na razpolago večjo površino substrata. Tengerdy in Szakacs (2003) pa z inženirskega vidika menita, da je pri lignoceluloznem substratu tekom procesa pomemben prenos toplote, vsebnost vlage in masni prenos kisika. Na vse tri parametre lahko vplivamo z velikostjo delcev, kakor tudi z mešanjem.

Lignocelulozni material (slama, silaža) in PG smo najprej grobo zmleli na Katedri za lepljenje, lesne kompozite in obdelavo površin Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Pri tem mi je ustrezna navodila podal doc. dr. Sergej Medved. Uporabljen je bil križni mlin s siti na obodu (Slika 12). Fino mletje pa smo opravili v mlinu Retsch SM2000, katerega sito je imelo 1 mm velike odprtine (Slika 13).



Slika 12: Križni mlin za mletje lignoceluloznega materiala.

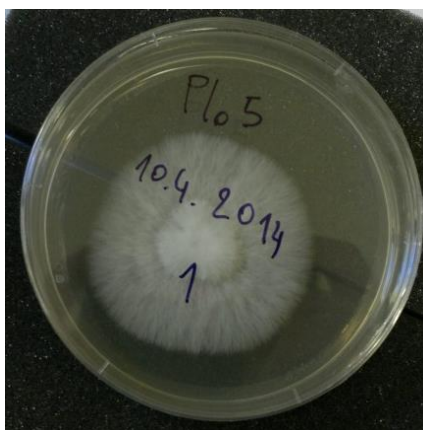


Slika 13: Mlin Retsch SM 2000 za fino mletje lignoceluloznega materiala.

3.2.2 Priprava micelija gliv bele trohnobe

Za inokulacijo substrata, katerega smo imeli v kozarcih, je potrebno vzgojiti micelije v petrijevkah na gojišču PDA (krompirjev dekstrozni agar).

Za pripravo gojišča (za približno 25 petrijev) smo zatehtali 19,5 g potato dextrose agar (PDA) gojišča in ga raztopili v 0,5 l vode. Nekaj vode smo prihranili za splakovanje čaše. Raztopino smo nato prelili v steklenico za avtoklaviranje. Gojišče smo avtoklavirali 40 minut, pri temperaturi 121°C oz. nadtlaku 1,2 bar. Ko smo iz avtoklava izpustili paro, smo steklenico prenesli v laminarij. Prav tako smo dali v laminarij celotno vrečo petrijev. Za nekaj časa smo prižgali UV luč, nato pa smo pričeli z vlivanjem gojišča tako, da je v vsaki petrijevki približno 2 do 3 mm gojišča. Ko se je gojišče ohladilo in strdilo je bilo pripravljeno za precepljanje. Rast micelija glive *Pleurotus ostreatus* (Plo5) vidimo na sliki 14. Ko je micelij glive prerasel vso petrijevko, smo ga precepili na sveže gojišče. To smo običajno naredili po treh tednih. Micelije gliv z oznakami *Hk*, *Tv6*, *Hf* in *Plo5* smo morali ohranjati v dobri kondiciji, saj smo že z cepljenjem micelija na nov substrat (dve različni mešanici PG in slama ter PG in silaža) povzročili stresni dejavnik.



Slika 14: Peti dan rasti micelija na komercialnem PDA gojišču glive *Plo5*.

3.2.3 Meritve vlažnosti

Merjenje vlažnosti piščančjega gnoja, koruzne silaže in slame smo izvedli po isti metodi. Z vsakim substratom smo napolnili po tri petrijevke, ki smo jih predhodno stehali. Petrijevke smo napolnili s svežim substratom, v vsako pa smo odtehtali 5 g substrata (na dve decimalki natančno). Petrijevke smo nato postavili v sušilnik, kjer se je material sušil 24 ur na temperaturi 103 °C. Naslednji dan smo posušene vzorce ohladili v eksikatorju in jih ponovno stehali. Od petrijevk s posušanim materialom smo odšteli maso petrijevk in tako dobili suho maso substrata. Iz dobljenih podatkov o sveži masi substratov in suhi masi substratov smo nato po formuli 1 in 2 za določitev vlažnosti izračunali masne deleže vode izražene v odstotkih (Preglednica 4).

$$W_{(trdne\ snovi)} = \frac{m_{(suhe\ snovi)}}{m_{(vlažne\ snovi)}} \quad \dots (1)$$

$$W_{(H_2O)} = 1 - W_{(trdne\ snovi)} \quad \dots (2)$$

Največ vlage vsebuje piščančji gnoj, najmanj pa pšenična slama.

Preglednica 4: Vsebnost vlage.

Substrat	Piščančji gnoj	Slama	Koruzna silaža
$W_{(H_2O)} \%$	13,1	10,7	11,6

3.2.4 Priprava mešanice

Za izvedbo poskusa smo si pripravili dve različni mešanici. Prva mešanica je bila sestavljena iz 40 % PG in 60 % pšenične slame, druga mešanica pa je bila sestavljena iz 40 % PG in 60 % koruzne silaže. To mešanico smo izbrali na podlagi preliminarne poskusov (Kalan, 2010). Pri takšnem masnem razmerju micelij še dovolj dobro prerašča, hkrati pa se porabi zadostna količina piščančjega gnoja.

Pri pripravi mešanice z ustreznim razmerjem je potrebno upoštevati vlažnost. Masna razmerja smo računali glede na trdno snov posameznega substrata. Naredili smo zalogo tako prve, kot druge mešanice. S tem smo si olajšali delo, saj smo imeli za poskus vedno na voljo substrat za cepitev, in nam ni bilo potrebno izdelovati mešanic pred vsakim poskusom. Ko smo začeli s poskusom, smo zgolj zatehtali ustrezno količino mešanice in jo do primerne vlažnosti navlažili z vodo. Vodo dodajamo postopoma in mešanico vsakokrat premešamo in preverimo vlažnost. Mešanica je dovolj vlažna takrat, ko skozi stisnjeno pest priteče kapljica vode, vendar pa je to zelo odvisno od velikosti delcev v mešanici. Ustrezno vlažnost smo preverili z meritvijo. Vlažnost je znašala med 60 in 70 % (Slika 15).



Slika 15: Navlažena substratna mešanica.

Preglednica 5: Deleži posameznih substratov v mešanici.

	PG	Slama	Silaža	PG in slama	PG in silaža
Delež	40 %	60 %	60 %	100 %	100 %
Količina [g]	460,2	672,1	678,5	1132,3	1138,7

Izračun mešanice substrata:

Ker imajo komponente (silaža, slama piščančji gnoj) različno vlažnost, je pri mešanju teh substratov potrebno to upoštevati. Če bi imeli na voljo dva substrata z enako vlažnostjo, bi ju preprosto zmešali. Tako bi za 1000 g mešanice PG in silaže zatehtali 400 g PG in 600 g silaže oz. za 1000 g mešanice PG in slame zatehtali 400 g PG in 600 g slame (Preglednica 5).

Enačba za mešanico piščančjega gnoja in slame:

- za 1000 g mešanice smo potrebovali 400 g PG in 600 g slame.

PG:

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

$$X = \frac{400 \text{ g}}{1 - 0,131} = 460,2 \text{ g}$$

$$X = 460,2 \text{ g}$$

Kjer je: $m(PG)$ - teoretična masa PG za mešanico,

$W(PG)$ - vlažnost PG.

Slama:

$$X = \frac{m(SLA)}{1 - W(SLA)} \quad \dots (4)$$

$$X = \frac{600 \text{ g}}{1 - 0,107} = 672,1 \text{ g}$$

$$X = 672,1 \text{ g}$$

Kjer je: $m(SLA)$ - teoretična masa slame za mešanico,

$W(SLA)$ - vlažnost slame,

X - dejanska masa PG in slame, potrebna za pripravo mešanice slame, in piščančjega gnoja.

Enačba za mešanico piščančjega gnoja in silaže:

- potrebujemo 1000 g mešanice 400 g PG in 600 g silaže.

PG:

$$X = \frac{m(PG)}{1 - W(PG)} \quad \dots (5)$$

$$X = \frac{400 \text{ g}}{1 - 0,131} = 460,2 \text{ g}$$

$$X = 460,2 \text{ g}$$

Kjer je: $m(\text{PG})$ - teoretična masa PG za mešanico,

$W(\text{PG})$ - vlažnost PG.

Silaža:

$$X = \frac{m(\text{SIL})}{1 - W(\text{SIL})} \quad \dots (6)$$

$$X = \frac{600 \text{ g}}{1 - 0,116} = 678,5 \text{ g}$$

$$X = 678,5 \text{ g}$$

Kjer je: $m(\text{SIL})$ - teoretična masa slame za mešanico,

$W(\text{SIL})$ - vlažnost slame,

X- dejanska masa PG in silaže, potrebna za pripravo mešanice silaže, in piščančjega gnoja.

3.2.5 Polnjenje kozarcev

Kozarce in preluknjane pokrovčke smo najprej razkužili v etanolu. Pri tem je bilo pomembno, da smo z etanolom dosegli vse površine, zato je bilo najenostavneje, če smo jih preprosto potopili v banjico z etanolom. Pokrovčke in kozarce smo zložili in pustili, da so se osušili. V luknje pokrovčkov smo vstavili sanitetno vato (Slika 16). S tem smo omogočili dostop zraka (zlasti kisika) glivam, saj je rast micelija aeroben proces. Vata pa ščiti notranjost kozarca pred okužbami. Potrebovali smo 40 kozarcev, za vsako substratno mešanico po 20 kozarcev. Na podlagi izračunov za potrebe anaerobne digestije smo v vsak kozarec dodali približno 35 g substrata.



Slika 16: Pokrovček z vato.

3.2.6 Avtoklaviranje

Z avtoklaviranjem dosežemo sterilnost. Glede na to, da je v naš poskus vključen piščančji gnoj, v katerem so prisotni številni mikroorganizmi, je avtoklaviranje zelo pomembno.

Napolnjene kozarce z ustrezno mešanico in primerno vlažnostjo smo zložili v avtoklav, kar nam prikazuje slika 17. Kozarce smo predhodno označili, da ne pride do zamenjav. Počakali smo, da je avtoklav dosegel nadtlak 1 bar oz. temperaturo 121 °C. Pri teh pogojih smo avtoklavirali pol ure. Nato smo avtoklav ugasnili in odprli ventil za spuščanje pare. Ko se je vzpostavil normalni tlak, smo ga s primerno zaščitno opremo odprli in zložili kozarce v laminarijo. Pred cepitvijo substrata smo počakali, da se substrat ohladi.



Slika 17: Kozarci zloženi v avtoklavu.

3.2.7 Inokulacija

Inokulacijo z glivami bele trohnobe smo izvedli v laminariji, v sterilnih pogojih. V začetni fazi smo mešanice (PG pomešanega s slamo ter PG pomešanega s silažo) inokulirali s štirimi vrstami gliv in sicer: z bukovim ostrigarjem (*Pleurotus ostreatus*- naravni *Plo5* in

hibridni- *Hk*), s pisano ploskocevko (*Trametes versicolor*- *Tv6*) in ogljeno kroglico (*Hypoxylon fragiforme*- *Hf*). Za nadaljnje poskuse pa smo uporabili bukovega ostrigarja (*Plo5*) in ogljeno kroglico (*Hf*), saj sta najhitreje in najbolj intenzivno preraščala substratne mešanice. V laminariju smo kozarce s substratom izpostavili UV luči za dodatno razkuževanje. Prinesli smo še petrijevke, v katerih je bilo gojišče preraslo z micelijem gliv. S pomočjo plutovrta smo iz petrijevke izrezali cepiče. V vsak kozarec smo z ezo vstavili po tri cepiče in jih enakomerno razporedili po površini substratne mešanice. Pred vsakim odpiranjem in zapiranjem kozarcev, smo ožgali pokrovček in vrat kozarca. S tem smo preprečili morebitne okužbe. Prav tako smo ožgali vsak delovni pripomoček. Ezo najprej pomočimo v etanol, nato pa se približamo gorilniku. Ko je etanol na ezi prenehal goreti, smo počakali, da se ohladi in nato pričeli s cepljenjem. Na vsak pokrovček smo napisali vrsto glive in datum cepljenja. Potek dela in pripomočki so prikazani na sliki 18. Inokulirane kozarce smo postavili v rastno komoro s približno 75 % zračno vlago in temperaturo 25 °C.



Slika 18: Material za izvedbo inokulacije nameščen v brezprašni komori.

3.2.8 Opazovanje rasti micelija na substratih

Iz številnih poskusov je bilo potrebno ugotoviti, kako različen substrat vpliva na posamezno glivo, in po karakteristikah preraščanja substratov izbrati dve najboljši. Hitrost preraščanja posameznih vrst gliv je razvidna s slike 19. Najbolj sta preraščali *Hf* in *Plo5*, zato smo za nadaljnje poskuse izbrali ti dve vrsti gliv.



Slika 19: Preraščanje micelija (bela puhasta struktura) po substratnih mešanicah piščančjega gnoja in silaže, osmi dan po inokulaciji.

Sprva se je micelij na substratni mešanici razraščal zgolj okrog cepiča. Tako so bila v kozarcih preraščena in nepreraščena območja. Nekateri deli substrata so bili preraščeni z micelijem že prvi oz. drugi dan inokulacije, tisti najbolj oddaljeni od cepiča, pa po dvajsetih dneh. Ta problem smo rešili tako, da smo substrat temeljito premešali. S predhodnimi preizkušnji smo prišli do ugotovitve, da je mešanje substrata najprimerneje, ko micelij okoli cepiča meri od 1 do 2 cm, kar nam nazorno prikazuje slika 20. To je med 4. in 6. dnevom po inokulaciji, glede na vrsto glive.



Slika 20: Cepiči primerne velikosti za mešanje substratne mešanice. Na sliki je micelij glive *Hf* na mešanici silaže in piščančjega gnoja, štiri dni po inokulaciji.

Preraščanje smo opazovali od premešanja pa do zamrznitve zadnjega vzorca, namenjenega produkciji bioplina.

3.2.9 Odvzemanje vzorcev v različnih časovnih intervalih

Vzorci smo odvezemali v različnih časovnih presledkih, kot je prikazano v preglednicah 6 do 9. Za odvzemanje vzorcev smo naredili načrt. Prvi odvzem vzorca posamezne glive smo opravili takoj, ko smo na celotnem substratu opazili nežno pajčevinasto strukturo, ki

jo je tvoril micelij glive (Slika 21). Naslednje vzorce smo odvezemali na dva oziroma tri dni, odvisno od dneva v tednu oz. praznikov. Tako so bili substrati različno dolgo izpostavljeni glivam bele trohnobe od 3 do 20 dni (Preglednice 6, 7, 8 in 9). Vzorce smo do izvedbe fermentacije hranili v zamrzovalniku.



Slika 21: Izgled substrata (PG in slame) preraščenega z glivo *Plo5*, dva dni po mešanju.

Preglednica 6: Prikaz časovnega poteka dela, inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata silaže (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba *Hypoxylon fragiforme*.

Oznaka	Substrat	Goba	Inokulacija	Mešanje	Odvzem	Čas preraščanja (dan)	Čas preraščanja po mešanju (dan)
H3	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	27.5.2014	7	3
H5	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	29.5.2014	9	5
H7	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	31.5.2014	11	7
H9	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	2.6.2014	13	9
H11	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	4.6.2014	15	11
H13	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	6.6.2014	17	13
H16	Silaža + PG	<i>Hf</i>	20.5.2014	24.5.2014	9.6.2014	20	16

Preglednica 7: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata silaže (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba *Pleurotus ostreatus*.

Oznaka	Substrat	Goba	Inokulacija	Mešanje	Odvzem	Čas preraščanja (dan)	Čas preraščanja po mešanju (dan)
P5	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	31.5.2014	11	5
P7	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	2.6.2014	13	7
P9	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	4.6.2014	15	9
P11	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	6.6.2014	17	11
P14	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	9.6.2014	20	14
P16	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	11.6.2014	22	16
P19	Silaža + PG	<i>Plo5</i>	20.5.2014	26.5.2014	14.6.2014	25	19

Preglednica 8: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata slame (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba *Hypoxylon fragiforme*.

Oznaka	Substrat	Goba	Inokulacija	Mešanje	Odvzem	Čas preraščanja (dan)	Čas preraščanja po mešanju (dan)
H4	Slama + PG	<i>Hf</i>	14.6.2014	19.6.2014	23.6.2014	9	4
H7	Slama + PG	<i>Hf</i>	14.6.2014	19.6.2014	26.6.2014	12	7
H9	Slama + PG	<i>Hf</i>	14.6.2014	19.6.2014	28.6.2014	14	9
H11	Slama + PG	<i>Hf</i>	14.6.2014	19.6.2014	30.6.2014	16	11
H14	Slama + PG	<i>Hf</i>	14.6.2014	19.6.2014	3.7.2014	19	14

Preglednica 9: Časovni potek dela, in sicer inokulacija, mešanje, odvzem in zamrznitev vzorca, čas po cepitvi in čas preraščanja po mešanju substrata slame (60 %) in piščančjega gnoja (40 %), ki jo je preraščala goba *Pleurotus ostreatus*.

Oznaka	Substrat	Goba	Inokulacija	Mešanje	Odvzem	Čas preraščanja (dan)	Čas preraščanja po mešanju (dan)
P2	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	21.6.2014	7	2
P4	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	23.6.2014	9	4
P7	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	26.6.2014	12	7
P9	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	28.6.2014	14	9
P11	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	30.6.2014	16	11
P13	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	2.7.2014	18	13
P15	Slama + PG	<i>Plo5</i>	14.6.2014	19.6.2014	4.7.2014	20	15

3.2.10 Priprava anaerobne digestije

Za anaerobno digestijo smo sestavili aparaturo, ki je opisana pri točki 3.1.6. Zaradi velikega števila vzorcev in pa zaradi same zasnove eksperimenta, smo izvedli štiri serije fermentacije. Razpored vzorcev v posamezni seriji je prikazan v preglednici 10.

Preglednica 10: Razpored vzorcev, ki so bili obdelani z glivo in drugi »kontrolni« vzorci.

Serijska	Substrat	Gliva, ki je preraščala	Drugi vzorci
1.	Silaža in PG	<i>Hf</i>	INO, SIL
2.	Silaža in PG	<i>Pl</i> 05	INO, SIL
3.	Slama in PG	<i>Pl</i> 05	INO, SLA
4.	Slama in PG	<i>Hf</i>	INO, SLA

En dan pred izvedbo poskusa smo iz zamrzovalnika vzeli ustrezne vzorce. Inokulum (gnojnico) smo imeli v hladilniku v veliki 10 l plastenki, kjer je uporaben mesec dni. Iz plastenke smo dan prej pretočili približno 2 l inokuluma in ga do uporabe shranili v zaprti posodi na sobni temperaturi. Inokulum smo naslednji dan očistili večjih delcev (zlasti slame), ki bi lahko motili izvedbo eksperimenta.

V erlenmajerico smo zatehtali po 4,64 g z glivo preraščenega substrata. Za vsako časovno obdobje preraščanja smo imeli po tri paralelke, prav tako smo imeli tri paralelke za mešanico nepreraščenega substrata, torej za mešanico piščančjega gnoja in slame ter za mešanico piščančjega gnoja in silaže. Ko smo zatehtali substrat, smo v vsako erlenmajerico dodali po 50 ml vode in 25 ml inokuluma. Na koncu smo dodali še magnetno palčko in erlenmajerice zaprli z gumijastim zamaškom. V vsaki seriji smo pripravili 28 anaerobnih digestorjev, ki so prikazani na sliki 22, in dve kontroli z vodo za sledenje temperature.



Slika 22: Erlenmajerice s substratom in z nepovratnim ventilom za produkcijo bioplina.

Na vsaki mešalni plošči smo imeli na voljo po 15 mešalnih mest. Na prvi plošči smo spremljali še aktivnost inokuluma.

3.2.11 Spremljanje nastajajočega bioplina

Bioplin, ki je nastajal v erlenmajerici, je potoval po cevki v bireto. Iz birete je bioplin izpodrival vodo. Odčitavanje in polnjenje birete z vodo je potekalo najprej dvakrat dnevno (zjutraj in zvečer), ko pa se je produkcija bioplina upočasnila, smo odčitavali enkrat na dan. Iz razlike v nivoju vode smo lahko določili količino nastalega bioplina. Pri tem smo morali paziti, da smo odčitavali vsak dan ob približno enakem času.

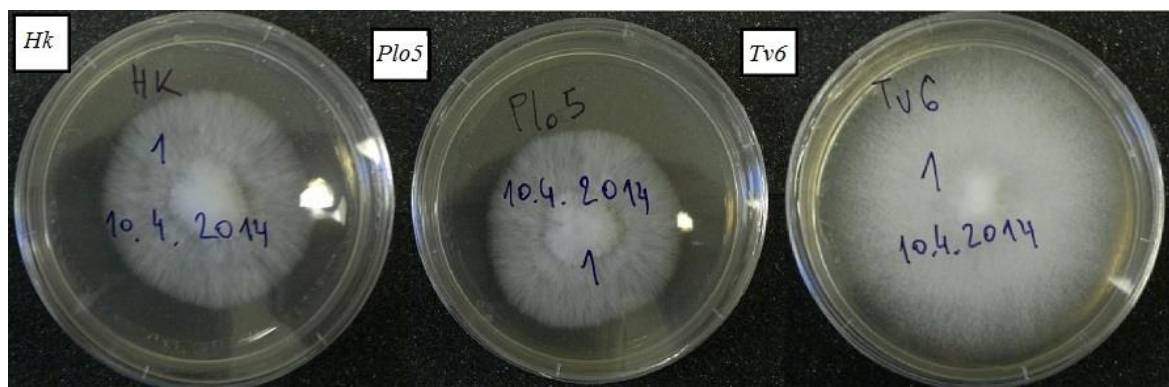
3.2.12 Bioplin

Spremljanje nastajanja bioplina je trajalo 20 dni. Ves ta čas smo rezultate zabeležili v tabelo. Za vsaki dan preraščanja smo si pripravili po tri paralelke. Rezultate smo prikazali kot povprečje vseh treh paralelk. Vzorci so bili označeni s črko in s številko. Črka H ali P označuje glivo *Hf* oziroma *Plo5*, ki je preraščala mešanico substrata PG in slame ali mešanico substrata PG in silaže. Številka zraven črke označuje število dni preraščanja substrata po mešanju. Poleg preraščenih vzorcev smo imeli še dva nepreraščena vzorca SLA in SIL. Vzorec SLA je mešanica substrata slame in piščančjega gnoja, vzorec SIL pa je mešanica silaže in piščančjega gnoja. Substrat pri vseh vzorcih je vseboval 60 % rastlinskega materiala (slama ali silaža) ter 40 % piščančjega gnoja. Priprava in sestava mešanice za anaerobno digestijo je opisana v poglavju 3.2.10. V vsaki seriji smo imeli tudi negativno kontrolo, ki predstavlja donos bioplina nastalega zgolj iz gnojnice. Vzorci so med sabo enakovredni, razlikujejo se zgolj po času izpostavitve substrata glivi. En vzorec v vsaki seriji pa je sestavljen iz substrata, ki ni bil izpostavljen glivi. Birete in podstavna korita smo imeli napolnjena z vodo. Da bi preverili delež CO₂ v bioplinu smo pri dveh vzorcih v vsaki seriji namesto vode v koritu uporabili 25 % raztopino kalijevega hidroksida (KOH). Raztopina KOH je iz bioplina vezala nastali CO₂.

4 REZULTATI

4.1 PRERAŠČANJE

Najprej smo rast spremljali v petrijevkah na komercialnem PDA gojišču in prišli do naslednjih ugotovitev. Micelija gliv *Tv6* in *Hf* sta na gojišču zelo hitro razraščala. Tako že po 5-ih dneh prerasteta celotno površino gojišča petrijevke. Na tem gojišču najpočasneje raste micelij glive *Plo5*. Micelij glive *Hf* je zelo nežen in je v primerjavi s *Plo5* rahlo bele barve. Rast micelijev treh gliv, v petrijevkah na PDA gojišču, je prikazana na sliki 23.



Slika 23: Rast micelija gliv na komercialnem gojišču PDA. Micelij je preraščal 5 dni. *Hk* - hibridni *Pleurotus ostreatus*, *Plo5* - *Pleurotus ostreatus*, *Tv6* - *Trametes versicolor*.

Pri rasti enakih micelijev na mešanicah substratov se je izkazalo, da na substratu PG - silaža najbolje uspeva micelij glive *Hf*. Zelo dobro ta substrat prerašča tudi micelij glive *Plo5*. Micelija glive *Tv6* in *Hk* preraščata manj intenzivno, zato smo ju za nadaljnje poskuse izločili. Na mešanici substrata PG - slama najbolje prerašča micelij glive *Plo5*, nekoliko manj intenzivno pa substrat preraščata micelija gliv *Hf* in *Hk*. Najslabše substrat prerašča micelij glive *Tv6* (Slika 24).



Slika 24: Preraščanje substratne mešanice piščančjega gnoja in slame, in sicer sedmi dan po inokulaciji. Vidna so z micelijem preraščena (bela puhasta struktura) in z micelijem nepreraščena področja (temna območja). Miceliji različnih vrst gliv na tej substratni mešanici preraščajo zelo različno, med miceliji pa so tudi opazne razlike.

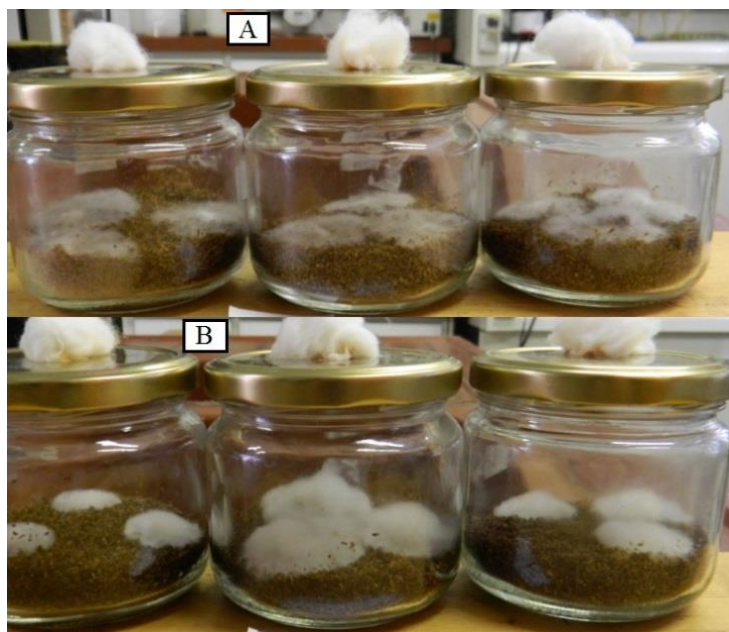
Po izboru dveh gliv, ki sta najboljše preraščala, in sicer *Hf* ter *Plo5*, smo naredili poskus tako na mešanici piščančjega gnoja in slame ter mešanici piščančjega gnoja in silaže.

Oba micelija gliv, tako *Plo5* kot *Hf*, bolje uspevata in se bolj razraščata na mešanici silaže in PG. Na sliki 25 je prikazana rast micelija glive *Hf*, na dveh različnih substratih. Na boljšo rast v začetni fazi morda vpliva silaža, ki je že delno predelana z mlečnokislinskimi bakterijami. Kasneje pa se je izkazalo, da je micelij glive *Plo5* dominanten na mešanici PG - slama, micelij glive *Hf* pa na mešanici PG - silaža (Slika 25).



Slika 25: Preraščanje micelija glive *Hf*, na A - substratni mešanici silaže in piščančjega gnoja, ter B - na substratni mešanici slame in piščančjega gnoja, in sicer deseti dan po inokulaciji. Opazna je zelo šibka rast na mešanici slame in piščančjega gnoja (B), medtem ko je rast na mešanici silaže in piščančjega gnoja zelo kompaktna (A).

Če primerjamo rast micelijev na različnih substratnih mešanicah opazimo naslednje. Prerast micelija glive *Plo5* na mešanici PG - slama je bila bolj nežna, ohlapna, micelij pa je rahlo bele barve. Prerast micelija *Plo5* na mešanici PG - silaža pa je bolj kompaktna. Micelij je zelo strjen, gosto prepleten in izrazito bele barve. Prerast micelija je po obsegu na obeh substratnih mešanicah približno enako (Slika 26).



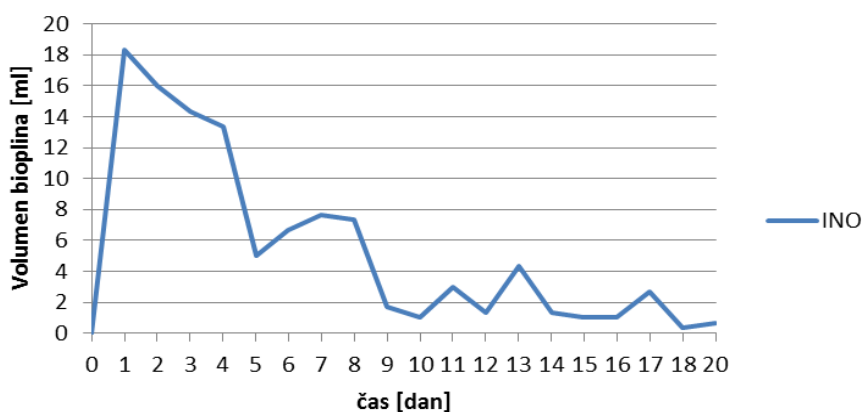
Slika 26: Preraščanje micelija glive *Plo5* na substratni mešanici A - slame in piščančjega gnoja, B - silaže in piščančjega gnoja, in sicer sedmi dan po inokulaciji.

Po inokulaciji cepičev na substratni mešanici smo počakali, da miceliji glive dobro požene. Ko je obrast cepiča dosegel od 1 do 2 cm (Slika 20), smo substrat premešali. Največje spremembe pri vseh vzorcih je zaznati v prvih nekaj dnevih po mešanju. Po mešanju smo opazovali preraščenost, in sicer bel razraščajoči micelij in substrat, ki je rjave barve. Po daljšem časovnem obdobju razraščanja, pa se na substratu opazi samo še bel micelij.

4.2 PRODUKCIJA BIOPLINA

4.2.1 Vitalnost inokuluma (gnojevka)

Pri vsaki seriji smo 20 dni spremljali vitalnost gnojevke oz. njeno aktivnost na podlagi produkcije bioplina. Največjo aktivnost inokuluma smo zaznali prvih osem dni, nato pa se volumen bioplina zniža na približno 2 ml na dan (slika 27).

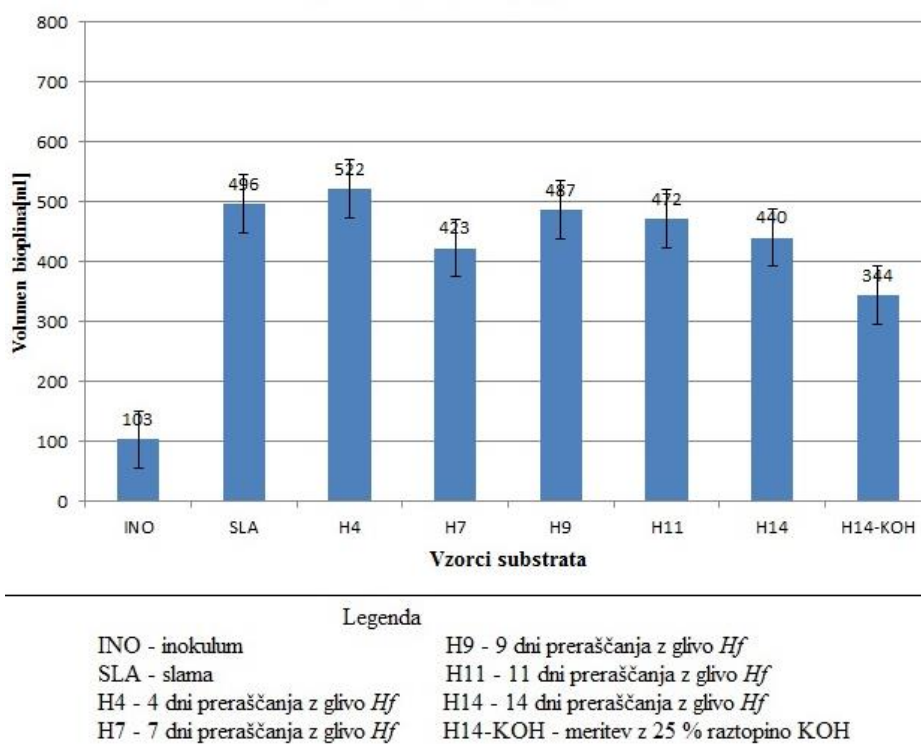


Slika 27: Bioplinska aktivnost inokuluma v obdobju 20 dni.

4.2.2 Količina nastalega bioplina iz mešanice piščančjega gnoja in slame

4.2.2.1 Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG - slama preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

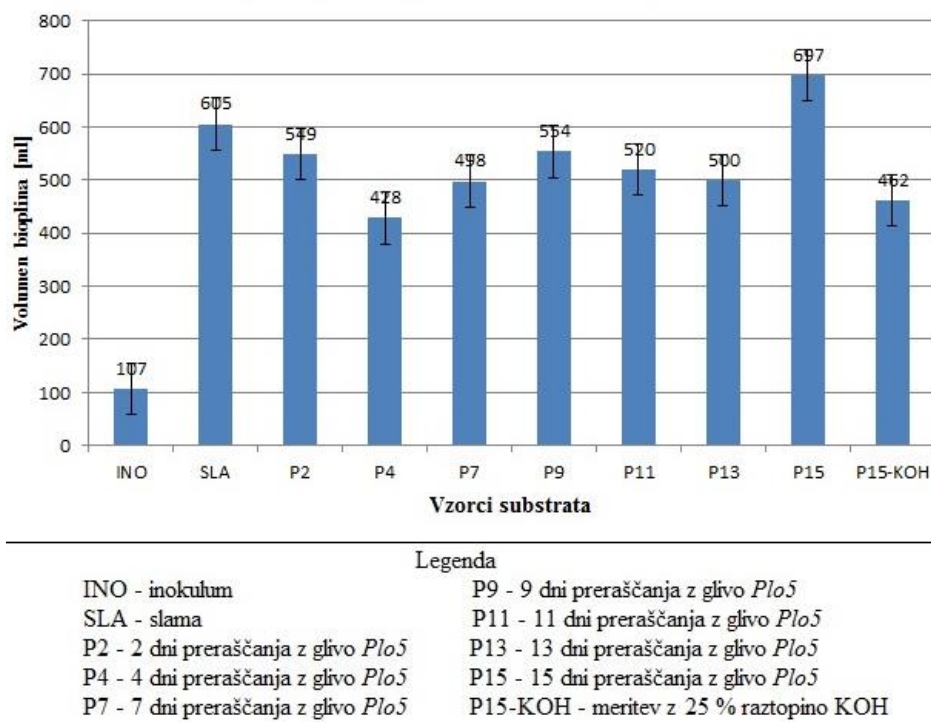
Rezultati produkcije so pokazali, da pri vzorcu, katerega je gliva *Hf* preraščala štiri dni, nastane največ bioplina, vendar pa razlika med preraščenim in nepreraščenem substratom ni velika in znaša zgolj 26 ml bioplina tekom 20 dnevne produkcije, kar je dobrih 5 % več. Pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni preraščanju micelija 7, 9, 11 in 14 dni, je bila produkcija bioplina manjša, kot pa pri kontroli (z glivo neprerasel substrat). Ugotovili smo, da se z naraščajočim časom preraščanja, količina nastalega bioplina zmanjšuje. Pri vzorcu, kjer smo CO₂ vezali, je nastalo manj bioplina (22 % manj) v primerjavi z vzporednim vzorcem, kjer smo namesto KOH uporabili vodo (Slika 28).



Slika 28: Količina nastalega bioplina po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*.

4.2.2.2 Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG - slama preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*

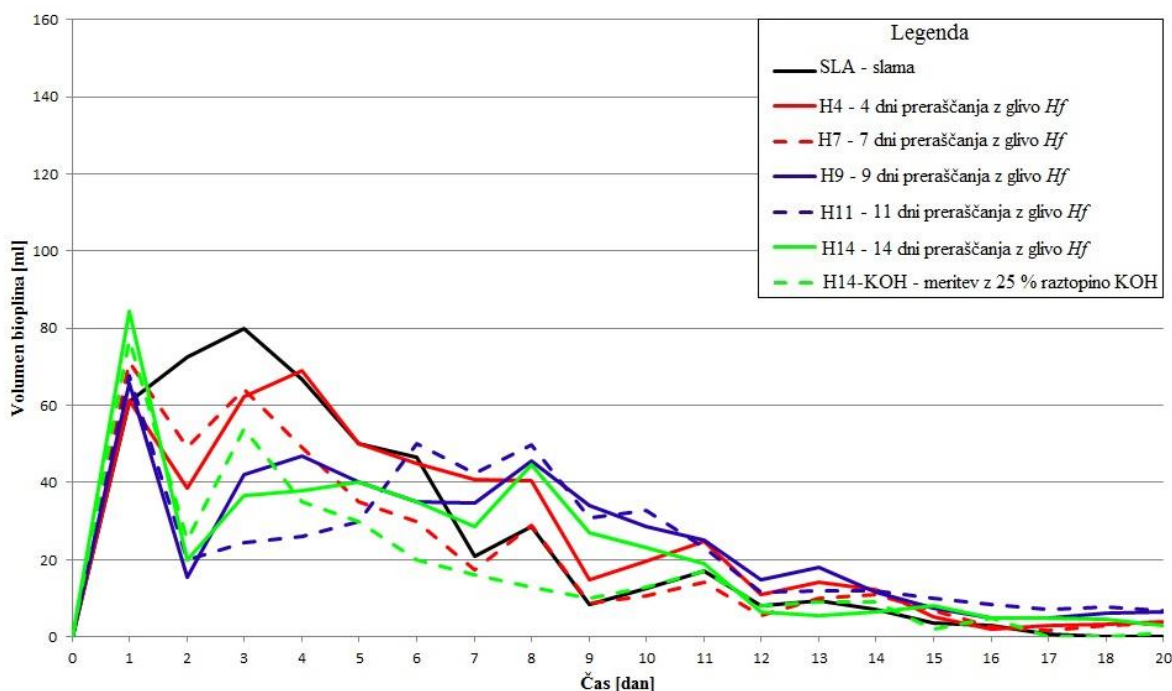
Največji volumen bioplina je bil pri 15 dnevni izpostavitvi preraščanju glive. Zanimivo je, da je količina bioplina na nepreraščenem substratu večja, kot pa na preraščenem substratu, razen pri vzorcu P15. V tem primeru nastane 92 ml več bioplina v primerjavi z nepreraščeno mešanico, kar znaša 15 % več (vzorec P15 in SLA). Pri vzorcu P15-KOH smo imeli bireto napolnjeno in potopljeno v 25 % raztopino kalijevega hidroksida. V primerjavi z vzorcem P15, je volumen bioplina zmanjšan za vrednost volumna CO₂, in sicer za 235 ml (34 %), kar kaže da je ob metanu nastajal tudi CO₂ (Slika 29).



Slika 29: Skupna količina nastalega bioplina po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in slame, preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*.

4.2.2.3 Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG – slama preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

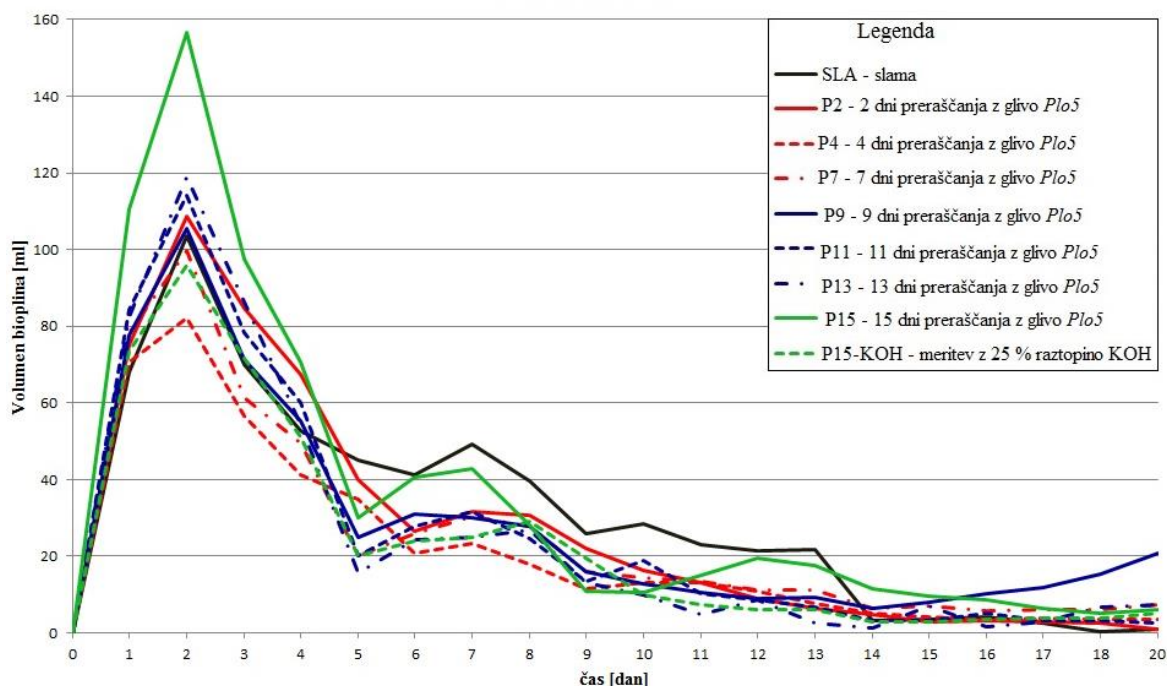
Izrazit vrh, ki je nastal prvi dan produkcije, je značilen za vse vzorce, tako izpostavljene glivi kot neizpostavljene. Če med sabo primerjamo vzorca H14 in H14-KOH ugotovimo, da je pri vzorcu H14-KOH tekom 20 dnevne produkcije dnevno nastalo manj bioplina, kot pa pri vzorcu H14. Izjema je le tretji dan produkcije. Manjša količina bioplina se je razvila, ker se je iz bioplina vezal CO₂. Najmanj bioplina je nastalo drugi dan, pri vseh vzorcih, kar bi lahko sklepali, da je prišlo do nekakšne motnje. Tretji dan se produkcija bioplina zopet vzpostavi na normalno raven. Drugi in tretji dan nastane največ bioplina pri z glivo nepreraščenem substratu. V prvih dneh je dnevna količina bioplina med 60 in 80 ml, po 11 dneh pa se proizvodnja bioplina zmanjša in pade pod 20 ml, največ pri H14 in H14-KOH (Slika 30).



Slika 30: Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice slame in PG (60:40) preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme* (H4, H7, H9, H11, H14, H14-KOH) in kontrole brez glive (SLA). Gliva je preraščala substrat od 4 do 14 dni.

4.2.2.4 Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG - slama preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*

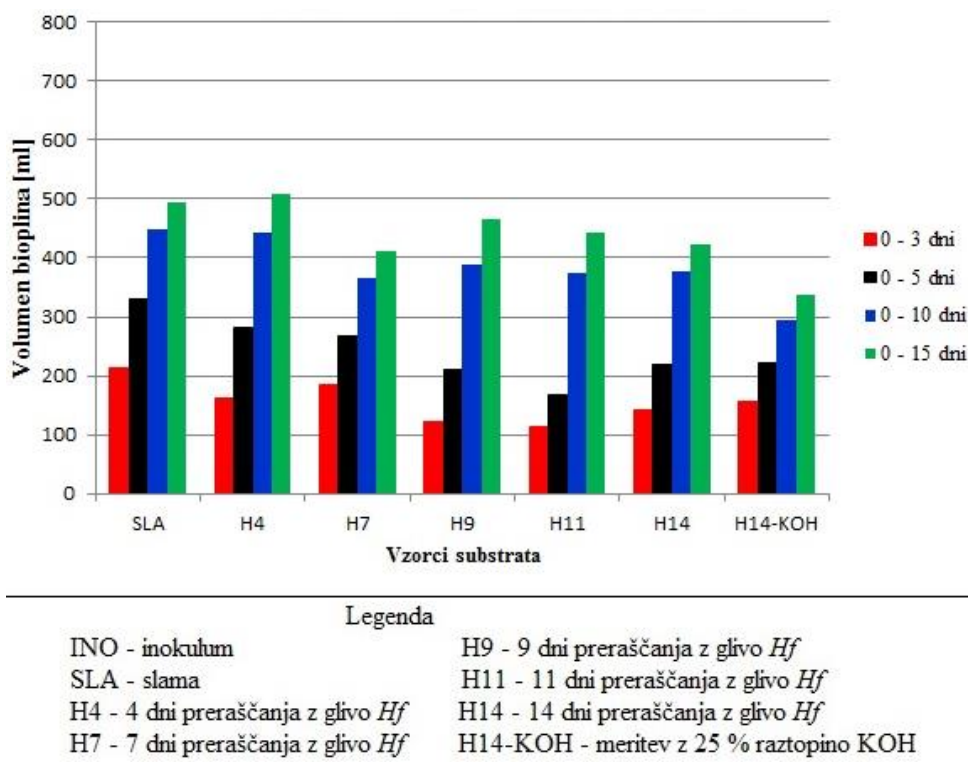
Najbolj izrazit vrh v začetni fazi proizvodnje bioplina ima vzorec P15. Če ta vzorec primerjamo z vzorcem P15-KOH ugotovimo, da velik delež bioplina predstavlja CO₂. Kot je bilo že omenjeno, bioplin vsebuje naslednje pline: metan, ogljikov dioksid, vodik, vodikov sulfid in ogljikov oksid. Najpomembnejša komponenta je seveda metan. Domnevamo lahko, da je pri vseh vzorcih nižji, če odstranimo količino nastalega CO₂. Kot je razvidno s slike 31, je višek proizvodnje bioplina drugi dan, po 11. dnevi fermentacije pa količina bioplina pade pod 20 ml (Slika 31).



Slika 31: Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice slame in PG (60:40) preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus* (P2, P4, P7, P9, P11, P13, P15, P15-KOH) in kontrole brez glive (SLA). Gliva je preraščala substrat od 2 do 15 dni.

4.2.2.5 Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – slama preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

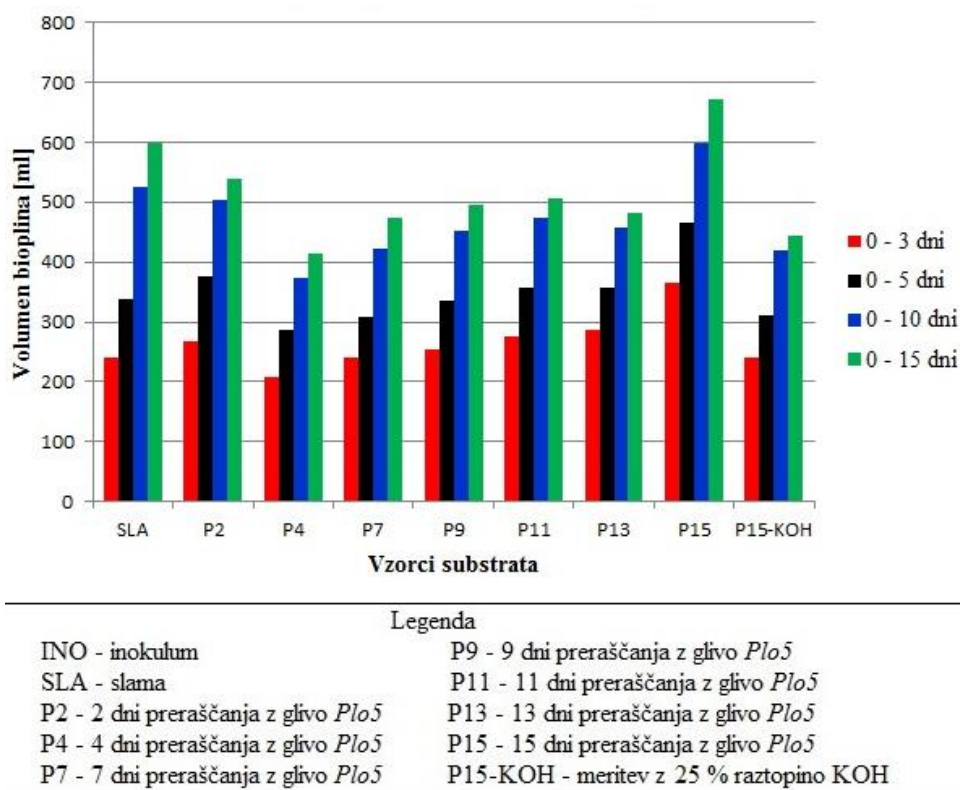
Primerjava proizvedenega bioplina na enakih mešanicah (PG in slama), ki so bile različno dolgo izpostavljene preraščanju micelija *Hypoxylon fragiforme* (4, 7, 9, 11 in 14 dni). Vsak vzorec na sliki 32 ima 4 stolpce, ki prikazujejo količino nastalega bioplina v določenem časovnem obdobju. V prvih treh dneh največja količina bioplina nastane pri vzorcu SLA, najmanjša pa pri vzorcu H11. Po 10-ih dneh fermentacije sta si vzorca SLA in H4 po količini nastalega bioplina približno enaka. Po 15 dneh največ bioplina nastane pri vzorcu H4. Pri ostalih vzorcih, kateri so bili preraščanju glive izpostavljeni dlje časa nastane manj bioplina (Slika 32).



Slika 32: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme* (H4, H7, H9, H11, H14, H14-KOH) in kontrole brez glive (SLA).

4.2.2.6 Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih nastalega iz mešanice PG – slama preraščena z glivo *Pleurotus ostreatus*

Količino nastalega bioplina pri posameznih vzorcih smo razdelili na 4 časovna obdobja. V prvih treh dneh je več bioplina nastalo pri preraščenih vzorcih, razen pri vzorcu P4. Po 5-ih dneh fermentacije več bioplina kot pri kontrolnem vzorcu nastane pri vzorcih P2, P11, P13 in pri P15. Po 10-ih oz. po 15-ih dneh pa je količina bioplina največja pri vzorcu P15. Opazna je zelo očitna razlika med vzorcema P15 in P15-KOH. Pri vzorcu P15-KOH je raztopina KOH iz bioplina vezala nastali CO₂ (Slika 33).

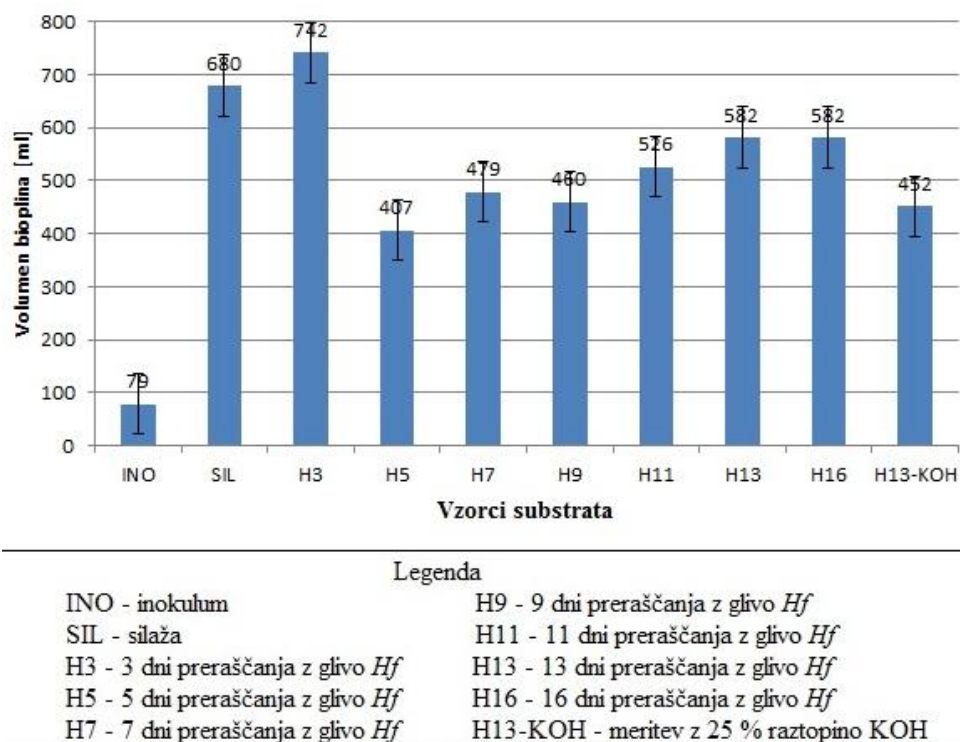


Slika 33: Primerjava volumnov bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in slame preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus* (P2, P4, P7, P9, P11, P13, P15, P15-KOH) in kontrole brez glive (SLA).

4.2.3 Količina bioplina nastalega iz mešanice piščančjega gnoja in silaže

4.2.3.1 Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

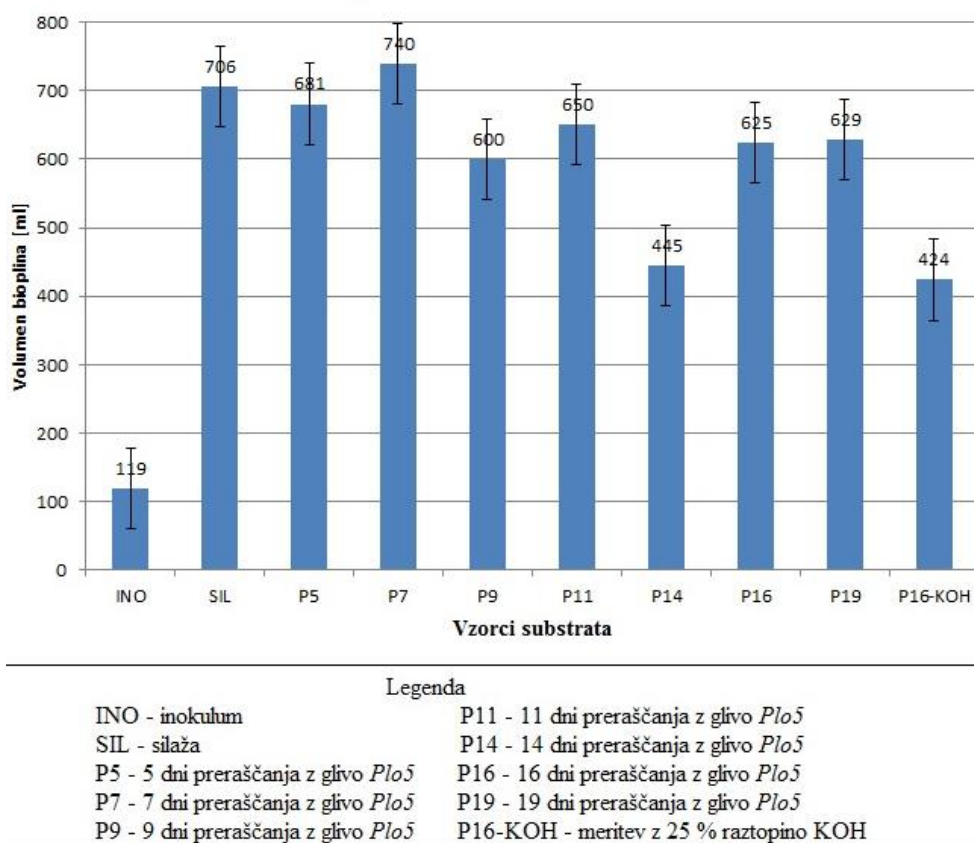
Vzorec SIL je nepreraščen substrat, ostali vzorci pa so bili različno dolgo izpostavljeni preraščanju micelija glive *Hf*. Gliva je preraščala substrat 3, 5, 7, 9, 11, 13 in 16 dni. V primerjavi z »navadnim« vzorcem H13 je pri vzorcu H13-KOH nabralo manj bioplina, saj se je nastali CO₂ vezal v raztopino KOH. Največ bioplina nastane pri vzorcu H3, katerega je micelij glive preraščal tri dni, in sicer 9 % več kot na nepreraščenem substratu. Pri vzorcu H5 je nastalo najmanj bioplina, čeprav je gliva pet dni preraščala substratno mešanico (Slika 34).



Slika 34: Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo *Hypokylon fragiforme*.

4.2.3.2 Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh fermentacije iz mešanice PG – silaža preraščena z glivo *Pleurotus ostreatus*

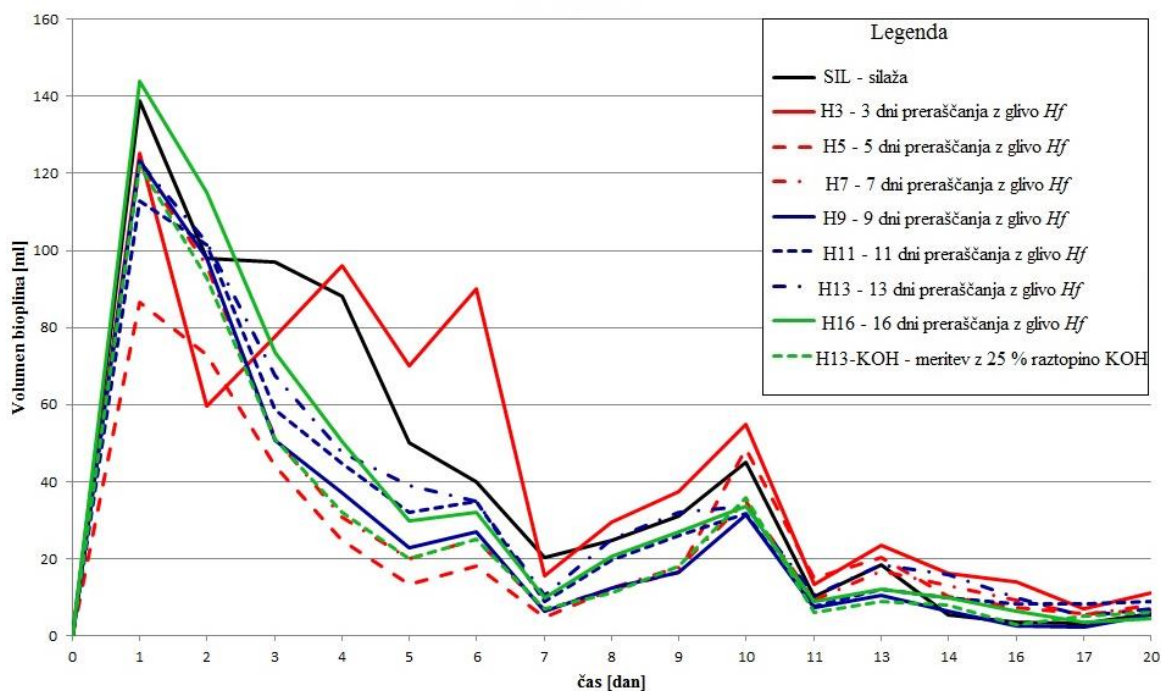
Mešanica piščančjega gnoja in silaže je bila izpostavljena preraščanju micelija glive 5, 7, 9, 11, 14, 16 in 19 dni. Največ bioplina nastane iz vzorca P7, torej iz mešanice substrata, ki je bil izpostavljen 7 dnevnu preraščanju micelija glive *Plo5*. To je za 4,8 % več kot pa pri nepreraščenem vzorcu. Zadovoljive rezultate smo dobili tudi pri vzorcu P11, pri katerem je nastalo 650 ml bioplina. Pri vzorcu P16-KOH, ki odstrani CO₂ iz bioplina, pa po 20 dnevni produkciji zabeležimo najmanjšo količino bioplina. V primerjavi z vzorcem P16 nastane za 32 % manj bioplina (Slika 35).



Slika 35: Skupna količina bioplina nastalega po 20 dneh produkcije iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*.

4.2.3.3 Količina bioplina proizvedenega v 24 urah iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

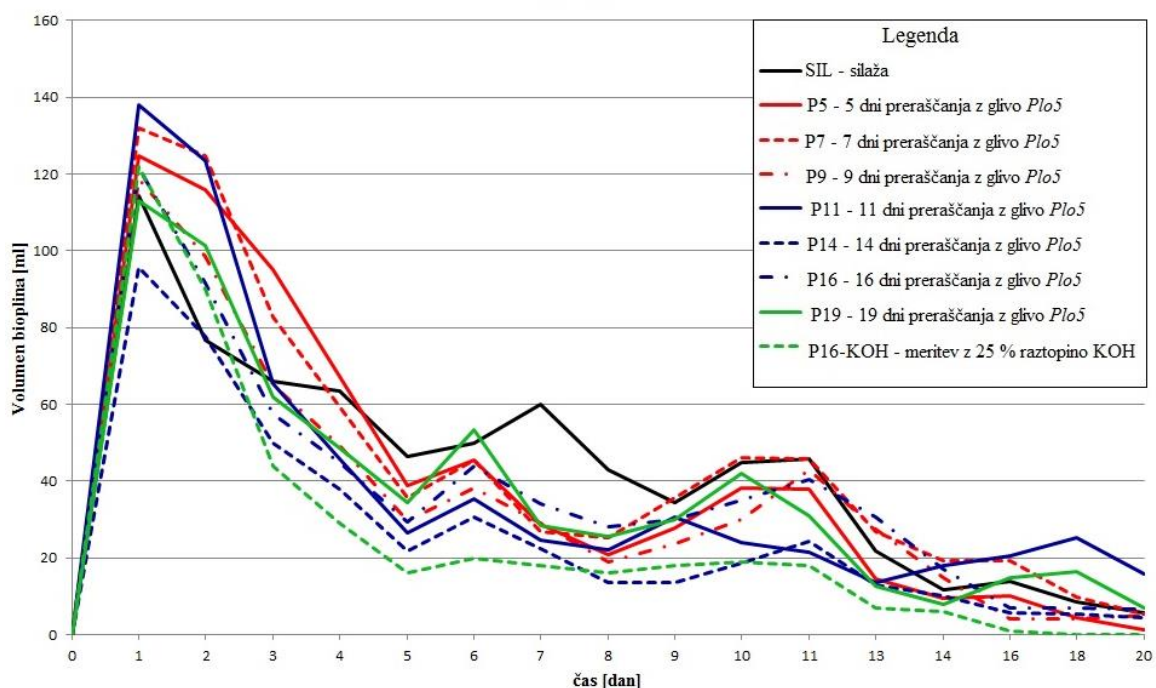
Iz primerjave s preraščenimi vzorci ugotovimo, da je prvi dan nastalo več bioplina samo pri vzorcu H16. Od 4 do 6 dneva fermentacije nastane več bioplina kot v kontroli pri vzorcu H3. Po 11 dnevih fermentacije pa se količina nastalega bioplina pri vzorcu SIL, zniža pod količina nastalega bioplina pri ostalih vzorcih. Aktivnost vzorcev se po 11 dnevih produkcije zmanjša in količina bioplina se zniža pod 20 ml (Slika 36).



Slika 36: Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice silaže in PG (60:40) preraščenega z glivo *Hypoxylon fragiforme* (H3, H5, H7, H9, H11, H13, H16, H13-KOH) in kontrole brez glive (SIL). Gliva je preraščala substrat od 3 do 16 dni.

4.2.3.4 Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*

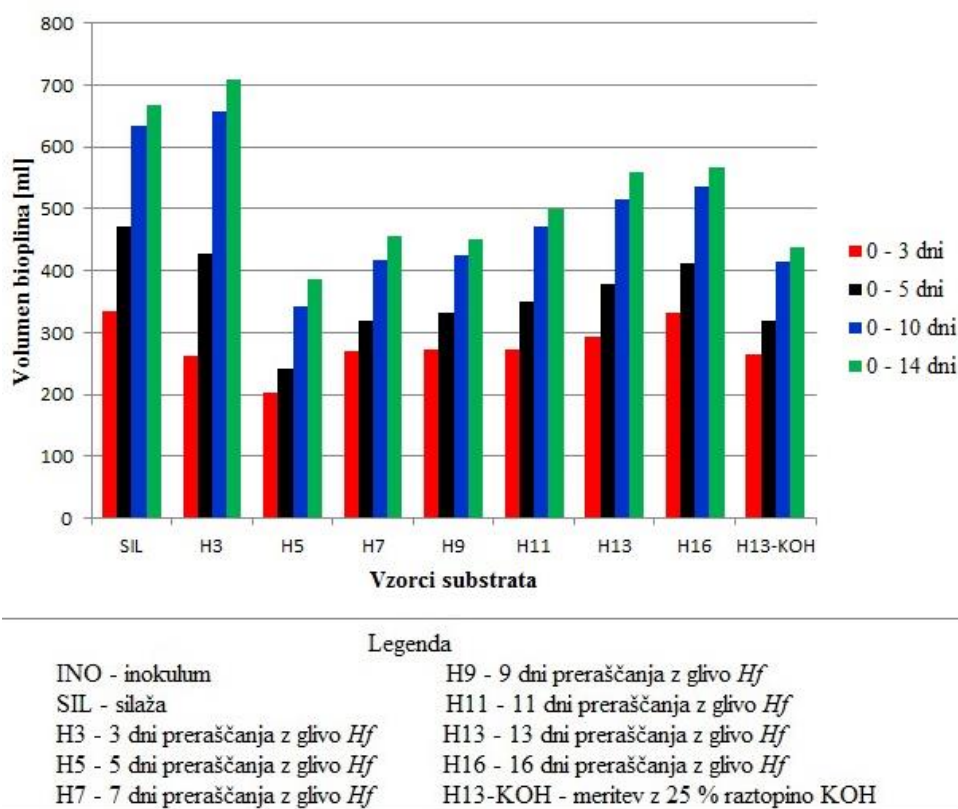
Tekom 20 dnevne fermentacije bioplina smo ugotovili, da največja količina bioplina pri vseh vzorcih nastane v prvih petih dneh. Sedmi dan fermentacije največja količina bioplina nastane pri nepreraščenem vzorcu SIL. Po 13 dnevni proizvodnji pade dvodnevna količina bioplina pod 20 ml. Proti koncu poskusa nastane največ bioplina pri vzorcu P11 in sicer 16, 18 in 20 dan produkcije (Slika 37).



Slika 37: Količina bioplina nastalega v 24 urah iz mešanice silaže in PG (60:40) preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus* (P5, P7, P9, P11, P14, P16, P19, P16-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL). Gliva je preraščala substrat od 5 do 19 dni.

4.2.3.5 Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme*

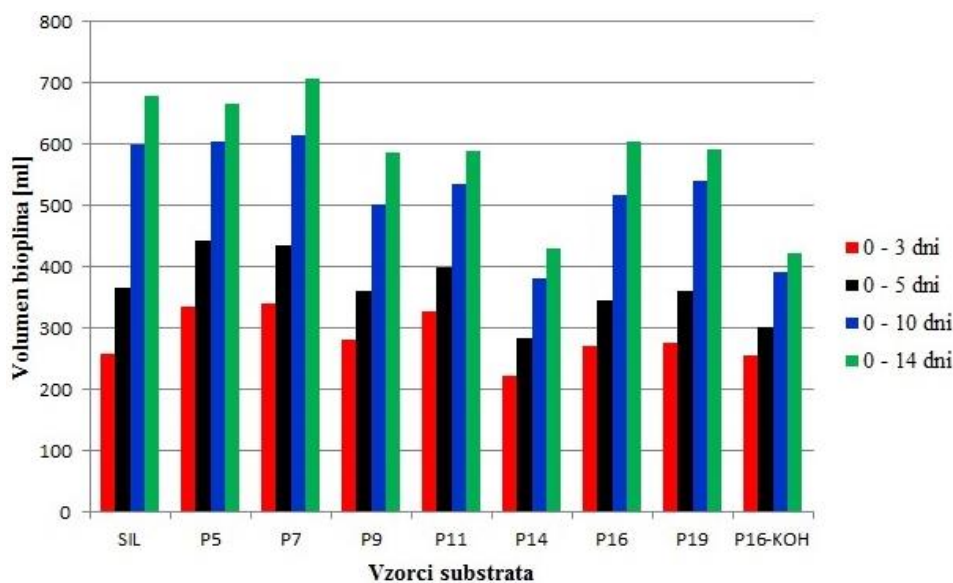
Količino nastalega bioplina iz preraščenega substrata smo primerjali z nepreraščenim substratom SIL, ki je bil izpostavljen enakim pogojem. Volumen bioplina vsakega vzorca smo razdelili na 4 časovna obdobja. Najvišja produkcija bioplina v prvih treh dneh je pri vzorcu H16. V prvih petih dneh največ bioplina nastane pri kontrolnem vzorcu. V enakem časovnem obdobju nastane več kot 400 ml bioplina še pri vzorcih H3 in H16. Po 10-ih oz. 14-ih dneh pa največ bioplina nastane pri vzorcu H3, in sicer 650 in 705 ml. Zelo intenzivna je bila produkcija bioplina pri kontrolnem vzorcu SIL, saj je volumen bioplina le malo manjši od z glivo obdelanega vzorca H3 (Slika 38).



Slika 38: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo *Hypoxylon fragiforme* (H3, H5, H7, H9, H11, H13, H16, H13-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL).

4.2.3.6 Količina bioplina proizvedenega po časovnih obdobjih iz mešanice PG – silaža preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus*

V treh dneh produkcije nastane pri vseh vzorcih več bioplina kot pri kontrolnem, razen pri vzorcu P14. Po petih dneh produkcije nastane pri vzorcih P5, P7, P11 več bioplina kot pri kontrolnem vzorcu SIL. Približno enaka količina bioplina nastane pri vzorcih P9 in P16. Po 10-ih dneh produkcije nastane 600 ml bioplina pri vzorcih SIL, P5 in P7. Najmanj bioplina po 10-ih dneh nastane pri vzorcu P14. Po 14-dneh produkcije je največ bioplina nastalo pri vzorcu P7, vendar v primerjavi z nepreraščenim vzorcem je to zgolj nekaj % več od kontrolnega vzorca (Slika 39).



Legenda	
INO - inokulum	P11 - 11 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>
SIL - silaža	P14 - 14 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>
P5 - 5 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>	P16 - 16 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>
P7 - 7 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>	P19 - 19 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>
P9 - 9 dni preraščanja z glivo <i>Plo5</i>	P16-KOH - meritev z 25 % raztopino KOH

Slika 39: Primerjava količin bioplina nastalega po časovnih obdobjih iz mešanice piščančjega gnoja in silaže preraščene z glivo *Pleurotus ostreatus* (P5, P7, P9, P11, P14, P16, P19, P16-KOH) in kontrole brez preraščanja glive (SIL).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Največjo oviro pri anaerobni razgradnji lignoceluloznih substratov predstavlja lignocelulozna celična stena, ki vsebuje težko razgradljive dele. Razgradljivost lignoceluloze je odvisna predvsem od zmogljivosti določene populacije organizmov in od okoljskih pogojev (Waldrop in sod., 2000).

Lignin je razmeroma odporen na kemično, bakterijsko in glivno razgradnjo v anaerobnih pogojih, v aerobnih pogojih pa ga razgrajujejo nekatere glive.

Že leta 1971 so se raziskovalci srečevali s problematiko biološke razgradnje lignina in ugotovili, da v zadnjih 30-ih letih ni bilo zaznati bistvenega napredka v raziskavah s področja razgradnje lignina (Sarkanen in sod., 1971).

Za doseganje boljše učinkovitosti biorazgradnje tovrstnih substratov je bila v zadnjem desetletju večina raziskav osredotočena na razgradnjo lignina. Napredek je bil dosežen s termično, mehansko in kemično predobdelavo ter z encimsko hidrolizo (Lee in sod., 1977). Razgradnja lignoceluloze je odvisna od deleža razgrajene celuloze in lignina (Reid, 1989). Biorazgradljivost lignoceluloznih substratov povečujemo z zmanjševanjem vsebnosti lignina (Fernandes in sod., 2009). S predobdelavo dosežemo zmanjšanje deleža kristalinične celuloze ter povečanje poroznosti substratov (Bjerre in sod., 1996).

V magistrskem delu smo biološko obdelali lignocelulozne materiale z glivami bele trohnobe. Z obdelavo z glivami bele trohnobe delno odstranimo lignin, material pa naredimo bolj porozen in dostopnejši za encime oz. bakterije. Naš namen je bil, da obdelani substrat uporabimo v anaerobni digestiji za produkcijo bioplina.

Delo je bilo časovno zahtevno, in je bilo sestavljeno iz obdelave substrata ter iz produkcije bioplina. Pri raziskavah smo naleteli na številne težave, ki smo jih bolj ali manj uspešno rešili. Pri preraščanju substratne mešanice smo opazili, da že v prvih nekaj dneh prihaja do preraščenih in nepreraščenih območij na substratu. Preden smo vzorce pripravili za izvedbo anaerobne digestije, smo s poskusi ugotovili, da je najprimernejša metoda za homogenizacijo premešanje. Pri tem smo imeli nekaj težav, saj mora biti micelij izrasel iz cepiča primerno velik. Če tega ne upoštevamo in premešamo prej, micelij ne prerašča, saj mu to predstavlja stres in micelij odmre.

Predno smo začeli spremljati bioplin, smo opravili številne predhodne poskuse in analizirali dnevno produkcijo. V predhodnih poskusih smo bioplin pridobivali po naslednjem protokolu:

- v erlenmajerico smo zatehtali 9, 28 g z glivo preraščenega oz. nepreraščenega substrata in

- dodali smo 100 ml vode in 50 ml inokuluma.

Vendar po tem protokolu bioplin nastaja prehitro, glede na zmogljivost birete. Kljub temu, da smo količino nastalega bioplina spremljali dvakrat dnevno, so se birete z vodo popolnoma izpraznile. Odločili smo se, da bomo za naslednje poskuse uporabili polovično količino substrata, inokuluma in vode. To je 4,64 g substrata (preraščenega ali nepreraščenega), 50 ml vode ter 25 ml inokuluma (gnojnice). S polovično količino se je spremljanje fermentacije bioplina bistveno zmanjšalo in je zadoščalo, da smo ga odčitavali dvakrat dnevno.

V vsaki seriji proizvodnje bioplina smo spremljali tudi aktivnost inokuluma. Pri tem smo dobili pričakovane rezultate, saj so se aktivnosti, oz. produkcija bioplina med posameznimi serijami razlikovale. To je posledica večih dejavnikov. Inokulum oz. gnojnico smo dobili vedno iz drugega fermentorja (F2) iz bioplinarne Draženci PP d.d. Vendar pa je bil med posameznimi serijami (zlasti med drugo in tretjo) dvomesečni časovni razmak, kar je mogoče vplivalo na spremembo inokuluma. Nenazadnje pa pri anaerobni digestiji (AD) sodelujejo živi organizmi, kjer na ponovljivost rezultatov vpliva več dejavnikov.

Količine nastalega bioplina smo prikazali na tri različne načine. Najprej smo prikazali količino bioplina, ki je nastal v 20-dnevni fermentaciji, nato smo prikazali produkcijo po dnevih ter produkcijo bioplina po časovnih obdobjih. Rezultate smo razdelili v dva sklopa, glede na uporabljeni substrat (dve različni mešanici, in sicer slama - PG ter silaža - PG). Vsak sklop pa smo razdelili še na vrsto glive, katera je preraščala substrat in sicer *Hypoxylon fragiforme* ter *Pleurotus ostreatus*.

Če najprej pogledamo celokupno količino nastalega bioplina, ki nam jo prikazujejo slike 28, 29, 34 in 35, ugotovimo naslednje. Več bioplina nastane pri uporabi mešanice piščančjega gnoja in silaže, kakor pa pri mešanici piščančjega gnoja in slame. Vendar, če pogledamo grafa 34 in 35, vidimo večjo produkcijo bioplina le pri dveh vzorcih P7 in H3. Sklepamo lahko, da gre v tem primeru za substrat, katerega so v 60 % že prej obdelale mlečnokislinske bakterije, nato pa še naše glive. Zato se količina bioplina poveča hitreje in sicer že pri treh oz. sedmih dneh preraščanja z glivo. To je lahko posledica nižje vsebnosti lignina v tem substratu. Podatki iz literature kažejo, da je vsebnost lignina v koruzi med 6 in 8 %, vsebnost lignina v pšenični slami pa je med 16 in 21 %. Vsebnost lignina v koruzni silaži pa je načeloma še nižja, saj gre za mlado še nezrelo koruzo. Če mešanico substrata piščančjega gnoja in silaže izpostavimo daljšemu časovnemu obdobju preraščanja glivama *Hf* in *Plo5*, se količina nastalega bioplina po 20 dnevih zmanjša. Predvidevamo lahko, da je to posledica osiromašenega substrata, saj gliva za svojo rast potrebuje hranila, katera bi sicer uporabile bakterije, prisotne v inokulumu, za proizvodnjo bioplina.

Boljši učinek obdelave je dosežen na mešanici piščančjega gnoja in slame. To nam še bolj nazorno prikazuje slika 29. Če mešanico PG in slame izpostavimo 15 - dnevnu preraščanju micelija glive *Pleurotus ostreatus*, se količina bioplina v 20 dnevni produkciji

poveča za skoraj 100 ml, v primerjavi z neobdelanim substratom. Pričakovali bi, da iz substrata, ki ga gliva prerašča dalj časa in razkroji več lignina nastane več bioplina. Če primerjamo nastalo količino pri vzorcu P2 z vzorcem P4, je pri vzorcu P4 nastalo manj bioplina kot pri vzorcu P2. Pri vzorcu P7 je nastalo več bioplina kot pri vzorcu P4. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko predpostavimo, da glive razgrajujejo le določena območja lignina. Razgrajujejo toliko časa, da pridejo do celuloze in hemiceluloze. Da se vsebnost lignina spreminja s časom in pri tem kaže nihajoče trende, so predpostavljali tudi v raziskavah na Mariborski fakulteti, in sicer v diplomski Anaerobna digestija lignoceluloznih materialov za proizvodnjo bioplina (Radojkovič, 2013). Torej, ko smo substrat, katerega je preraščala gliva, zamrznili, ne vemo v kateri fazi razgradnje lignina smo ga ustavili. Če so glive že razgradile lignin, potem smo bakterijam pri anaerobni digestiji (AD) ponudili dodatno hrano (celulozo, pektin,...) in nastalo je več bioplina, če pa so glive ravno dobro začele razgrajevati lignin, pa nastane manj bioplina.

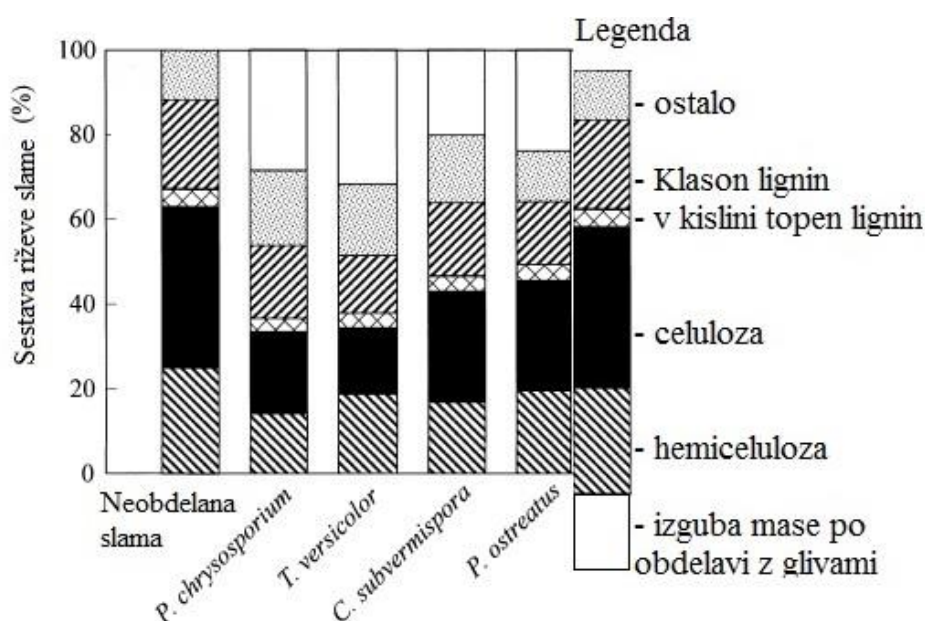
Potrebno bi bilo narediti še tekočo analizo vsebnosti lignina in celuloze pred izpostavitvijo glivi in v dneh obdelave z glivo ter analizo vsebnosti lignina pred anaerobno digestijo in po njej. S tem bi dobili podatke, kako se spreminja vsebnost lignina in če bakterije vplivajo na razgradnjo lignina, še zlasti pri silaži.

Pri volumnih nastalega bioplina v 24 urah smo opazili značilen trend, torej zelo visoke vrhove na začetku, ko je produkcija bioplina intenzivna, in zelo majhne vrhove, ko se približujemo koncu produkcije. Iz številnih raziskav je znano, da se prvih nekaj dni sprošča tudi plin, katerega smo uporabili pri prepihanju erlenmajeric, s čimer smo ustvarili anaerobne pogoje. Pri nastajanju bioplina nismo spremljali njegove sestave, kar pa bi bilo zelo priporočljivo, saj bi vedeli, kako se z biološko obdelavo substrata spreminja sestava bioplina. Pri enem vzorcu iz vsake serije smo z raztopino KOH iz bioplina vezali CO₂. Glive bele trohnobe so namreč aerobi, energijo pridobivajo z dihanjem, pri tem pa se sprošča CO₂. Na sliki 31 je zelo lepo razvidno, koliko bioplina nastane in koliko bioplina nastane, če izločimo CO₂ za enak vzorec. Dnevna količina nastalega bioplina se po 20 dneh zmanjša in pade pod 20 oz. pod 10 ml. Ne vemo pa ali je to posledica izrabljenega substrata, ali pa se je proces anaerobne razgradnje zaključil zaradi znižanja pH. Iz literature in raziskav Mariborske univerze (Nemet, 2009; Radojkovič, 2013; Rotar, 2014) lahko razberemo, da se sestava bioplina tekom procesa spreminja. Vsebnost metana se s trajanjem procesa povečuje, kljub zmanjšani proizvodnji bioplina. Razlog, da produkcija metana pride bolj do izraza v poznejših dneh, je v kompleksnosti procesa fermentacije. Torej proizvodnja metana je v zadnji stopnji anaerobne digestije.

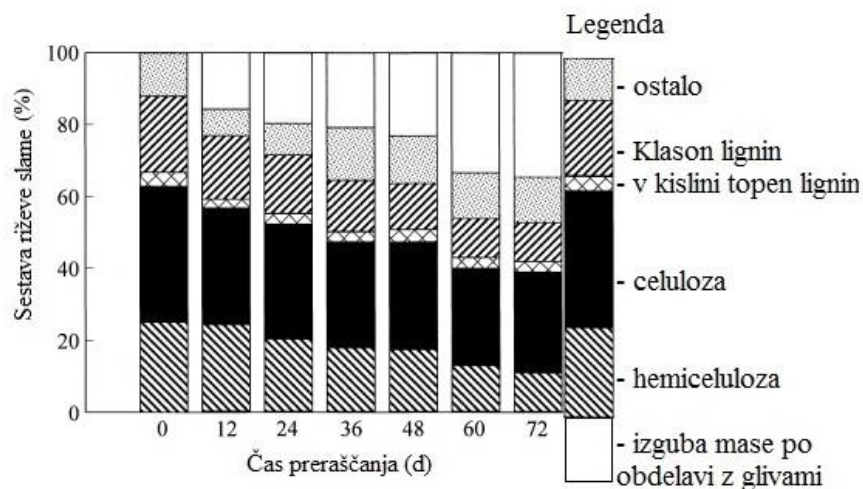
Številni avtorji člankov se ukvarjajo s problemom odstranitve lignina iz lignoceluloznih materialov. Tako je tudi Taniguchi (2005) obdelal riževo slamo.

Riževo slamo je izpostavil štirim glivam bele trohnobe: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* in *Pleurotus ostreatus*. Ugotovil je, da *Pleurotus ostreatus* selektivno razkroja lignin. Ko so riževo slamo (60 % vlažnost) 60 dni

tretirali z *Pleurotus ostreatus*, je prišlo do 25 % izgube celotne mase ter 41 % izgube Klason lignina. Njihove izsledke prikazujeta sliki 40 in 41. Slika 41 prikazuje vpliv različne časovne izpostavljenosti glive *Pleurotus ostreatus* na riževi slami. Vse komponente in masa substrata padajo postopoma z naraščajočim časom tretiranja. *Ceriporiopsis subvermisporea* je poznana kot ena najbolj učinkovitih gliv za selektivno odstranjevanje lignina iz lesnih materialov. Pri tretiranju slame s to glivo se izgubi 20 % celotne teže, pri tem pa se odstrani zgolj 18 % Klason lignina. Ta nizka sposobnost razgradnje lignina je lahko posledica drugačne sestave lignina v riževi slami. Iz tega lahko sklepamo, da ne moremo uporabiti vsako glivo na vsakem lignoceluloznem materialu. Vedno je potrebno testirati več gliv in potem uporabiti najboljšo (Slika 41). Do podobnih rezultatov smo prišli tudi z našimi raziskavami.



Slika 40: Spremembe v sestavi riževe slame po 24 dnevnem preraščanju z glivami bele trohnobe (Taniguchi in sod., 2005: 639).



Slika 41: Vpliv različne časovne izpostavljenosti riževe slame glivi *P. ostreatus* na sestavo substrata (Taniguchi in sod., 2005: 640).

Morda bi naše raziskave kombinirali z gojenjem gob oz. t.i. »gobjo farmo« skupaj z bioplinarno. Proizvajali bi gobe za prodajo, izrabljen substrat z encimi pa uporabili za razgradnjo lignoceluloznih substratov in s tem izboljšali izkoristek proizvodnje bioplina. S tem bi zmanjšali količino nerazgradljivih ostankov, ki se večinoma kopičijo v obliki lignina. Prav tako pa bi pospešili kroženje ogljika v naravi. Predelan substrat z manj lignina iz bioplinarn bi bil primernejši za gnojenje. Z njim bi nadomestili mineralna gnojila. Pri tem je pomembno, da je gnojevka v čim bolj stabilnem stanju. Predelani ostanki bioplinarne ne vsebujejo bioloških organizmov, ki bi lahko okužili kmetijske pridelke in posledično ogrožali zdravje ljudi in živali.

V Sloveniji je zelo malo naravnih bogastev v obliki fosilnih goriv (lignit, zemeljski plin), zato bi morali več pozornosti usmeriti izrabi alternativnih virov energije. Pri tem bi morali gnoj in organske odpadke uporabiti za proizvodnjo bioplina. Ker pa je Slovenija industrijska država, imamo tudi nekaj kontaminirane zemlje z onesnažili. Tudi na tem področju se kaže potencial, in sicer v produkciji biomase na teh področjih za produkcijo bioplina.

5.2 SKLEPI

V naši raziskavi smo ugotovili sledeče:

- micelij glive *Pleurotus ostreatus* na komercialnem gojišču PDA raste v primerjavi z ostalimi glivami (*Trametes versicolor*, *Hypoxylon fragiforme*) najslabše, medtem ko na mešanici substrata, sestavljenega iz 60 % slame in 40 % piščančjega gnoja, najhitreje;
- z mešanjem vplivamo na enakomernost preraščanja micelija na substratih;
- različne vrste gliv različno preraščajo substrat in tudi specifično vplivajo na metanogenezo;
- s predhodno obdelavo substratnih mešanic z glivami bele trohnobe smo povzročili delignifikacijo, večjo poroznost materiala in delno razgradnjo kristalinične celuloze, s čimer prav tako vplivamo na produkcijo bioplina;
- s primerjavo z glivo obdelanih in z glivo neobdelanih vzorcev lahko zaključimo, da je bil donos bioplina v nekaterih primerih nekoliko višji pri vzorcih, ki so bili obdelani z glivo.

6 POVZETEK

Slovenija ima obilje surovin v obliki lignoceluloznega materiala, tako v gozdu kot tudi v mnogih ostankih (kmetijstvo, ostanki iz lesno-predelovalne industrije, komunalni organski odpadki).

Lignocelulozni substrati so izredno primeren substrat v procesu pridobivanja bioplina. Glede na njihove karakteristike so težko razgradljivi. Problematičnost pripisujemo kompleksni strukturi lignina in razgradnim produktom lignina, kateri se pojavijo med procesom anaerobne razgradnje. Pri lignoceluloznih substratih se poslužujemo številnih tehnik predobdelav, s katerimi odpravljamo težave in tako omogočimo čimboljši izkoristek substrata.

V magistrskem delu smo biološko obdelali lignocelulozni material z glivami bele trohnobe. Naš namen je bil ugotoviti, kako različna časovna izpostavljenost glivam vpliva na količino bioplina, pridobljenega v procesu fermentacije. Piščančji gnoj, ki je vseboval ostanke lesa, smo mešali z rastlinsko biomaso, zato da smo zagotovili ustrezno razmerje dušika in ogljika in omogočili rast glivam bele trohnobe. Dve različni substratni mešanici (PG – slama in PG – silaža) smo izpostavili dvema vrstama gliv, in sicer: *Pleurotus ostreatus* in *Hypoxylon fragiforme*. Zelo pomembno je, da je substratna mešanica pred cepljenjem z glivo ustrezno navlažena. Vlažnost mora biti med 60 in 70 %.

Ko je bil izrast okrog cepiča primerne velikosti (od 1 do 2 cm), smo substrat premešali. S premešanjem smo zagotovili homogene pogoje in enakomernost rasti. Glive so na substratnih mešanicah preraščale različno dolgo. S predhodno obdelavo substratnih mešanic z glivami bele trohnobe smo povzročili delignifikacijo, večjo poroznost materiala in delno razgradnjo kristalinične celuloze, s čimer vplivamo na produkcijo bioplina. Preraščene vzorce smo shranili v zamrzovalniku. Preraščene in nepreraščene vzorce ter inokulum smo nato uporabili v fermentaciji. Spremljali smo količino nastalega bioplina pri vzorcih, ki so bili različno dolgo izpostavljeni delovanju gliv bele trohnobe, in jih primerjali med seboj.

Meritve bioplina smo izvajali na dva načina. Prvi način je bil ta, da smo imeli korita in birete napolnjene z vodo, drugi pa, da smo imeli korita napolnjena s 25 % raztopino KOH. Raztopina je iz bioplina vezala CO₂.

Rezultati produkcije bioplina so pokazali, da pri nekaterih z glivo preraščenih vzorcih nastane od 5 do 15 % več bioplina v primerjavi z nepreraščenimi. Pri vzorcih, kjer smo meritev opravili z 25 % raztopino KOH nastane od 20 do 35 % manj bioplina v primerjavi z vzporednim vzorcem, kjer smo namesto KOH uporabili vodo.

Metanska fermentacija je kompleksen proces, katerega lahko razdelimo v štiri stopnje: hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza. Vzorce je zaradi tega težko primerjati med seboj, namreč ne vemo, na kateri stopnji se je AD končala. Metanogeneza je izredno občutljiva na padec pH. Možno je, da se je proces AD predčasno zaključil zaradi padca pH, ker so se kopičile maščobne kisline in alkoholi. V prihodnje bi bilo potrebno pri fermentaciji spremljati vrednost pH in narediti tekočo analizo vsebnosti lignina in celuloze pred izpostavitvijo glivi in v dneh obdelave z glivo ter analizo vsebnosti lignina pred anaerobno digestijo in po njej. S tem bi dobili podatke, kako se spreminja vsebnost lignina in če bakterije vplivajo na razgradnjo lignina, še zlasti pri silaži.

7 VIRI

- Ander P., Marzullo L. 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *Journal of Biotechnology*, 53: 115-131
- Asgher M., Bhatti H. N., Ashraf M., Legge R. L. 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19: 771-783
- Bjerre A.B., Olesen A. B., Fernqvist T. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 568-577
- Chaturvedi V., Verma P. 2013. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *Biotechnology*, 3: 415-431
- Čater M., Zorec M., Logar M. R. 2014. Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation for enhanced biogas production. *Springer Science Reviews*, 2: 51-61
- Čergan Z., Jejčič V., Knapič M., Modic Š., Moljk B., Poje T., Simončič A., Sušin J., Urek G., Verbič J., Vrščaj B., Žerjav M. 2008. *Koruza*. Ljubljana, Kmečki glas: 314 str.
- Fernandes T. V., Klaasse Bos G. J. Zeeman G. 2009. Effects of thermo- chemical pretreatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 9: 2575-2579
- Garvaz J., Butala V. 2005. Viri in tehnologije za pridobivanje zelene električne energije. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za strojništvo, Ljubljana, 10. November 2005. Ljubljana, Fakulteta za strojništvo: 8 str.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *Microbiological Reviews*, 13: 125-135
- Humar M. 2008. Bukov ostrigar- užitna goba, ki jo lahko gojimo tudi doma. *Les*, 60, 9: 353
- Humar M. 2009. Ogljena kroglica ali jagodasti skorjeder. *Les*, 61, 11-12: 451
- Jejčič V., Poje T. 2010. Bioplin v kmetijstvu. Informacije za proizvodnjo bioplina v Sloveniji. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 6 str
- 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.

http://arhiv.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/MEH/Biomethane/D_4.3.1_Publikacija_PRI DOBIVANJE_IN_CISCENJE_BIOPLINA_IN_BIOMETANA_TER_NJEGOVA_U PORABA.pdf (15.2.2015)

- Kalan Ž. 2010. Ugotavljanje primernosti mešanice piščančjega gnoja in biomase hitro rastočih rastlin za rast micelija lesnih gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij agronomije: 40 str.
- Kaparaju P., Serrano M., Thomsen B.A., Kongjan P., Angelidaki I. 2009. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorafinery concept. *Bioresource technology*, 100: 2562-2568
- Lee C. L. Paul J. L., Hackett W. P. 1977. Promotion of rooting in stem cuttings of several ornamental plants by pretreatment with acid or base. *Horticultural Science*, 12: 41-42
- Lee M. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96: 1959–1966.
- Leskošek M. 1988. Organska Gnojila. V: Gnojila in gnojenje. Ljubljana, Kmečki glas: 34-51
- Mussatto S.I., Teixeira. 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 897-907
- Mussatto S.I. Fernandes M., Roberto IC. 2007. Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydrate Polymers*, 70: 218-223
- Nemet A. 2009. Anaerobna digestija mešanic japonskega dresnovca (*Polygonum cuspidatum*) in piščančjega gnoja obdelanih z glivo *Pleurotus ostreatus*. Diplomaska naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Kemijska tehnologija: 67 str.
- Okuda K., Ohara S., Umetsu M., Takami S., Adschiri T. 2008. Disassembly of lignin and chemical recovery in supercritical water and p- cresol mixture, *Studies on lignin model compounds. Bioresource technology*, 99: 1846-1852
- Pandey A. 2003. Solid- state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84
- Pandey A., Soccol C.R., Larroche C. 2008. Current development in solid- state fermentation. *Asiatech Publishers Incorporation, New Delhi, Indija*.
- Pohleven F. 2008. Pisana ploskocevka: najbolj pogosta lesna goba. *Les*, 60, 3: 115
- Pšenica. Kmetijske surovine. Surovine. si. 2008.
(<http://www.surovine.si/psenica.php>, 17.4.2015)

- Radojkovič V. 2013. Anaerobna digestija lignoceluloznih materialov za proizvodnjo bioplina. Diplomsko delo. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Študij kemijske tehnologije: 65 str.
- Reid I. D. 1989. Solid- state fermentations for biological delignification. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: 786-802
- 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.
- Sabol Š. M. 2007. Biomasa: vir energije za Slovenijo. V: Bioplin, tehnologija in okolje. Mednarodni simpozij, Rakičan 29. november 2007. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo, Univerza v Mariboru: 17-19
- Sanchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194
- Sarkanen K. V., Ludwig C. H. 1971. Lignins: occurrence, formation structure and reactions. New York, Wiley: 916 str.
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61: 262-280
- 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
- Sigoillot J-C., Berrin J-G., Bey M., Lesage-Meessen L., Levasseur A., Lomascolo A., Record E., Uzan-Boukhris E. 2012. Fungal strategies for lignin degradation. *Advances in Botanical Research*, 61: 263-308
- Singh D., Chen S. 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 399-417
- Stamets P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3rd ed. Berkeley, Ten Speeds Press: 586 str.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11
- Taherzadeh M. J., Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 1621-1651

- Tanaka H., Koike K., Itakura S., Enoki A. 2009. Degradation of wood and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Enzyme and Microbial Technology*, 45: 384-390
- Taniguchi M., Suzuki H., Watanabe D., Sakai K., Hoshino K., Tanaka. T. 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 6: 637-643
- Tengerdy R.P., Szakacs G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 169-179
- Tišma M., Pranjičko M., Zelić B., Velić N. 2012. Razgradnja lignoceluloznega materiala s pomočjo gliv bele trohnobe. *Ekolist*, 10: 20-24
- Todorić I. 1982. Specialno poljedelstvo. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 159 str.
- Waldrop M. P., Balser T. C., Firestone M. K. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 1837-1846
- Walter M., Boul L., Chong R., Ford C. 2004. Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand whiterot fungi. *Journal of Environmental Management*, 71: 361-369
- Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 849-860
- Xia Z., Yoshida T., Funaoka M. 2003. Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols). *European Polymer Journal*, 39: 909-914
- Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y. 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*, 42: 35-53

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Francu Pohlevnu za mentorstvo, pregled dela, pomoč pri spremljanju dnevne količine nastalega bioplina in številne koristne nasvete tako pri izvedbi eksperimentalnega dela kot tudi pri sami izdelavi magistrskega dela, zlasti pri prikazu rezultatov v obliki grafov.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Zdravku Kravanji za pregled in recenzijo magistrskega dela.

Iskrena zahvala je namenjena celotnemu osebju Katedre za patologijo in zaščito lesa. Andreji Žagar za pomoč pri pripravi gojišč, Nejc Thalerju za nasvete in pomoč pri avtoklaviranju, Boštjanu Lesarju za potrpljenje in izvedbo proizvodnje bioplina v njegovi pisarni, doc. dr. Mihi Humarju se zahvaljujem za predlagane spremembe pri proizvodnji bioplina.

Zahvaljujem se Katedri za lepljenje, lesne kompozite in obdelavo površin, oddelka za lesarstvo, še posebno doc. dr. Sergeju Medvedu, ki mi je omogočil mletje slame in piščančjega gnoja.

Zahvaljujem se dr. Karmen Stopar, zaposleni v INDOK službi, za pomoč pri urejanju dela, da je dobilo končno obliko.

Zahvaljujem se Bojanu Pahorju iz Perutnine Ptuj za voden ogled bioplinarne Draženci, in za premagovanje logističnih težav pri dostavi gnojevke oz. inokuluma.

Družini, bratoma, predvsem pa mami Tini in puncu Alenki se zahvaljujem za moralno podporo in pomoč pri nastajanju magistrskega dela ter za številne lepe, vzpodbudne besede. Alenka hvala ti za vso pomoč in ves trud.