

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nataša KODRA

**PROIZVODNJA BIOPLINA IZ BUČNE PULPE Z
BIOAUGMENTACIJO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Nataša KODRA

**PROIZVODNJA BIOPLINA IZ BUČNE PULPE Z
BIOAUGMENTACIJO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**PRODUCTION OF BIOGAS FROM PUMPKIN PULP BY
BIOAUGMENTATION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorico viš. pred. dr. Lijano Fanedl in za recenzenta doc. dr. Roka Miheliča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: viš. pred. dr. Lijana FANEDL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Rok MIHELIC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Nataša Kodra

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK 606:628.336.6:602.3:602.42:577.152.3(043.2)
- KG bioplin/bučna pulpa/bioaugmentacija/predobdelava/*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5
- AV KODRA, Nataša, dipl. mikrobiol. (UN)
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor)/FANEDL, Lijana (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2016
- IN PROIZVODNJA BIOPLINA IZ BUČNE PULPE Z BIOAUGMENTACIJO
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP X, 44 str., 6 pregl., 14 sl., 2 pril., 36 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Pri proizvodnji bučnega olja izkoriščajo samo bučna semena, zato na poljih ostane veliko neizkoriščene organske snovi. Ostanke buč na poljih oz. bučno pulpo lahko izkoristimo tudi za proizvodnjo bioplina. Bučno pulpo med drugim sestavljajo težko razgradljive lignocelulozne komponente. Pri proizvodnji bioplina je pomembno, da je postopek čimbolj učinkovit, hiter in s čimvečjim izplenom metana. Pri uporabi lignoceluloznih substratov je ozko grlo procesa hidroliza. Z namenom pospešitve hidrolize in s tem povečanje učinkovitosti proizvodnje bioplina iz bučne pulpe, smo se odločili za dva načina biološke obdelave substrata s hidrolitskimi bakterijami. V prvem postopku smo bučno pulpo predhodno inkubirali samo s hidrolitskimi bakterijami *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 (predobdelava), ki razgrajujejo lignocelulozni material in nato nadaljevali z anaerobno razgradnjo organske snovi v bioreaktorjih s pomočjo mikrobne biomase iz Bioplinarne Ihan (Petrol d.d.). V drugem postopku pa smo v bioreaktorjih bučno pulpo sočasno inkubirali s hidrolitskimi bakterijami in mikrobno biomaso (bioaugmentacija). Ugotovili smo, da bioaugmentacija poveča proizvodnjo metana. Za najučinkovitejšo se je izkazala predobdelava substrata s hidrolitskimi bakterijami *P. xylanivorans* Mz5, ki je tudi najbolj povečala izplen metana. Proizvodnja metana se je povečala kar za 69 %.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC 606:628.336.6:602.3:602.42:577.152.3(043.2)
- CX biogas/pumpkin pulp/bioaugmentation/pretreatment/*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5
- AU KODRA, Nataša
- AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/FANEDL, Lijana (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
- PY 2016
- TI PRODUCTION OF BIOGAS FROM PUMPKIN PULP BY BIOAUGMENTATION
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO X, 44 p., 6 tab., 14 fig., 2 ann., 36 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In a pumpkin oil production, only pumpkin seeds are used, therefore a lot of unused organic matter stays on the fields. The pumpkin leftovers or the pumpkin pulp, can also be used for biogas production. Among other components, pumpkin pulp consists of hard to decompose lignocellulose components. Effectiveness of the process, speed and high methane yield are the most important things in biogas production. Bottleneck of the process, when using lignocellulose substrate, is the hydrolysis. To speed up the hydrolysis and to improve the effectiveness of biogas production from pumpkin pulp, we have decided on two procedures to treat the substrate with hydrolytic bacteria. In the first procedure, we have incubated pumpkin pulp with hydrolytic bacteria *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 (pretreatment), which decompose lignocellulose matter and went on with anaerobic decomposition of organic matter in bioreactors with help from microbe biomass from Biogas plant Ihan (Petrol d.d.). In the second procedure, we have (in bioreactors) simultaneously incubated the pumpkin pulp with hydrolytic bacteria and microbe biomass (bioaugmentation). It turned out, that bioaugmentation increases the production of methane. The pretreatment of substrate with hydrolytic bacteria *P. Xylanivorans* Mz5 has proven to be the most efficient. Methane production has increased by 69 %.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORD DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN DELA.....	1
1.3 HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 BIOPLINSKI PROCES.....	3
2.1.1 Mikrobna združba v bioplinskem procesu.....	4
2.1.2 pH in KMK v bioplinskem procesu.....	5
2.1.3 Temperatura.....	6
2.1.4 C/N razmerje.....	6
2.2 LIGNOCELULOZNI SUBSTRATI.....	7
2.2.1 Bučna pulpa kot substrat za proizvodnjo bioplina.....	8
2.3 PREDOBDELAVA LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV ZA PRODUKCIJO BIOPLINA.....	9
2.3.1 Bioaugmentacija.....	10
2.3.2 <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5.....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 KEMIČNE.....	13
3.2 PREDHODNI POSKUS – DOLOČANJE KSILANAZNE AKTIVNOSTI.....	14
3.3 POTEK POSKUSOV.....	14
3.4 SHRANJEVANJE IN GOJENJE BAKTERIJSKEGA SEVA <i>P. xylanivorans</i> Mz5.....	16
3.5 KEMIJSKA POTREBA PO KISIKU (KPK).....	16

3.6 DOLOČANJE ORGANSKE SNOVI (OS)	17
3.7 ANALIZA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN (KMK)	18
3.8 MERITVE pH	19
3.9 TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA (BMP)	19
3.9.1 Priprava mikrobne biomase za test BMP	19
3.9.2 Priprava deoksigenirane vode	19
3.9.3 Priprava fosfatnega pufra	20
3.9.4 Priprava substrata – bučna pulpa	20
3.9.5 Izračun sestave tesnih mešanic	20
3.9.6 Izvedba poskusa	22
3.9.7 Odvzem in analiza vzorcev	23
4 REZULTATI	26
4.1 ANALIZE PRED POSKUSOM	26
4.2 BIOMETANSKI POTENCIAL BUČNE PULPE Z UPORABO BIOAUGMENTACIJE	27
4.2.1 Suha in organska snov	27
4.2.2 Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)	27
4.2.3 Volumen nastalega bioplina	28
4.2.4 Skupna produkcija metana	29
4.2.5 Izplen metana	31
4.2.6 Povečanje kumulativne proizvodnje bioplina in metana	32
4.2.7 Gibanje pH vrednosti med testom BMP	32
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1 RAZPRAVA	34
5.2 SKLEPI	38
6 POVZETEK	39
7 VIRI	41
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v standardni mešanici kratkoverižnih maščobnih kislin (KR1)	19
Preglednica 2: Sestava fosfatnega pufra	20
Preglednica 3: Obremenitev biomase	21
Preglednica 4: Sestava poskusnih mešanic za test BMP	22
Preglednica 5: Povprečni deleži metana (%) v bioplinu posameznih poskusnih mešanic na zadnji dan poskusa.	30
Preglednica 6: Volumen nastalega metana na 1g KPK substrata in izplen metana.	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Anaerobna metanogena razgradnja organske snovi.	4
Slika 2: Inhibicija metanogeneze v primeru očetne kisline (Deublein in Steinhauser, 2008).	6
Slika 3: Vpliv predobdelave na lignocelulozni substrat (Hsu, 1983, cit. po Chaturvedi in Verma, 2013).	10
Slika 4: Shema poteka dela enodnevne predobdelave substrata s kulturo <i>P. xylanivorans</i> Mz5 14	14
Slika 5: Shema poteka dela pri izvedbi našega poskusa BMP 15	15
Slika 6: Kot substrat smo uporabili naribane rumene buče 20	20
Slika 7: Priprava testnih mešanic – preprihanje z dušikom. 23	23
Slika 8: Testne steklenice v testu BMP med 33 dnevno inkubacijo v temi pri 37 °C in 120 rpm. 23	23
Slika 9: Merjenje nastalega volumna bioplina z vodnim stolpcem in brizgalko. 24	24
Slika 10: Vpliv buč (levo) in otrobov (desno), ki ju uporabimo kot substrat, na ksilanazno aktivnost <i>P. xylanivorans</i> Mz5. 26	26
Slika 11: Sprememba količine organske snovi (g/L) v poskusnih mešanicah glede na prvi in zadnji dan poskusa. 27	27
Slika 12: Volumen nastalega bioplina 1 g OS substrata (mL). 29	29
Slika 13: Volumen nastalega metana (mL) na 1 g OS substrata. 31	31
Slika 14: pH vrednosti na prvi in zadnji dan poskusa pri posameznih mešanicah 33	33

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Celokupna koncentracija KMK v posameznih poskusnih mešanicah tekom poskusa.

PRILOGA B: Sprememba KPK ob koncu poskusa, glede na začetek.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

B	bučna pulpa
B+aMz5	bučna pulpa + avtoklavirana kultura <i>P. xylanivorans</i> Mz5
B+Mz5	bučna pulpa + živa kultura <i>P. xylanivorans</i> Mz5 (bioaugmentacija)
BMP	test biometanskega potenciala
KMK	kratkoverižna maščobna kislina
KPK	kemijska potreba po kisiku
NK	negativna kontrola
OD	optična gostota (angl. optical density)
OS	organska snov
P.aMz5	negativna kontrola predobdelavi z živo kulturo <i>P. xylanivorans</i> Mz5
P.Mz5	predobdelava bučne pulpe z živo kulturo <i>P. xylanivorans</i> Mz5
Sp.	vrsta (angl. species)
SS	suha snov
ST	standard

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA

Sodoben način življenja nam je prinesel probleme, ki so posledica človekovega delovanja in brezmejnega izkoriščanja narave. Bližamo se času, ko bomo dokončno izkoristili vse neobnovljive vire energije, vendar pa se potreba po energiji ne zmanjšuje, temveč le povečuje. Znanstveniki zato zadnja desetletja iščejo alternativne vire obnovljive energije, s katerimi bi lahko zagotovili popoln krog ogljika.

Eden izmed perspektivnih načinov je tudi proizvodnja bioplina. S proizvodnjo bioplina dobimo metan, ki je visokoenergetska spojina, pri tem pa izkoriščamo organski material. Sprva so v ta namen uporabljali visokoenergetske rastline, kot so koruza, oljna repica itd., vendar so se pojavili etični in ekonomski pomisleki o smiselnosti uporabe rastlin za prehrano in krmo v energetske namene (Ahring, 2003). V nasprotju z agrikulturnimi rastlinami, pa imamo skoraj neomejene količine lignoceluloznega materiala.

V naši raziskavi smo kot substrat za proizvodnjo bioplina izkoristili bučno pulpo, ki je pretežno škrobni in lignocelulozni material, in v velikih količinah ostaja na poljih, saj se za pridobivanje bučnega olja uporablja zgolj bučna semena. Problem pri uporabi lignoceluloznega materiala kot substrat, je njegova težka razgradljivost. Celuloza, hemiceluloza in lignin so povezani v trdno in za mikrobo in njihove encime težko dostopno strukturo (Zhang in sod., 2015). Pri produkciji bioplina, ki mora biti relativno hitra, ekonomična in s čimvečjimi izkoristki, se hidroliza izkaže kot ozko grlo procesa.

Obstaja več metod s katerimi povečamo stopnjo hidrolize, ena izmed njih je tudi bioaugmentacija (dodajanje hidrolitskih anaerobnih bakterij v mešano anaerobno mikrobno združbo) (Kovács in sod., 2012). Hidrolizo pa je mogoče intenzivirati z ločeno, predhodno mikrobno hidrolizno stopnjo (predobdelava). Ustrezno izbrane hidrolitske bakterije imajo esko- ali endocelularne encime, ki so sposobni razgraditi kompleksen lignocelulozni substrat na osnovne gradnike, ki jih za svojo rast izkoristi anaerobna mikrobna združba, ki je odgovorna za proizvodnjo bioplina.

1.2 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil doseči hitrejšo in učinkovitejšo metanogeno presnovo bučne pulpe v bioplin s pomočjo mikrobne predobdelave in bioaugmentacije.

Ugotavljali smo kakšen je izplen metana, če pulpo predhodno inkubiramo s hidrolitskimi bakterijami, ki razgrajujejo lignocelulozni material in nato nadaljujemo z anaerobno mikrobno razgradnjo organske snovi (proizvodnja bioplina). V poskusu bioaugmentacije

smo bučno pulpo sočasno inkubirali z dodanimi hidrolitskimi bakterijami in metanogeno mikrobnno biomaso.

Cilj je bil, ugotoviti kateri način produkcije bioplina je učinkovitejši (večji izkoristek, večja vsebnost metana v bioplinu), in bi bil posledično boljši na industrijski ravni.

1.3 HIPOTEZE

V magistrskem delu smo postavili naslednji hipotezi:

Hipoteza 1: Dodatek hidrolitskih bakterij bo v obeh primerih (predhodna fermentacija in bioaugmentacija) izboljšala produkcijo bioplina.

Hipoteza 2: Predhodna fermentacija bučne pulpe s hidrolitskimi anaerobnimi bakterijami se bo izkazala za učinkovitejši proces proizvodnje bioplina kot pa dodajanje bakterij v mešano anaerobno mikrobnno združbo.

2 PREGLED OBJAV

V zadnjih letih smo priča hitremu razvoju obnovljivih virov energije, zlasti biogoriv, v kar so nas prisilile klimatske spremembe, nezanesljivost dobave energije in izčrpavanje zalog fosilnih goriv (Yue in sod., 2013).

Vsako leto pridelamo ogromne količine odpadkov, ki predstavljajo grožnjo za okolje ter zdravje ljudi in živali. Vedno bolj pomembno je recikliranje odpadkov, pri čemer izbiramo postopke, ki so najbolj varni, imajo najmanjši vpliv na okolje in ki zagotavljajo čimmanjši odpad. Eden izmed takšnih postopkov je anaerobna biološka obdelava organskega materiala, ki ne le da je energetske nezahtevna, je običajno tudi izvor energije (Ahring, 2003). Takšen primer je proizvodnja bioplina.

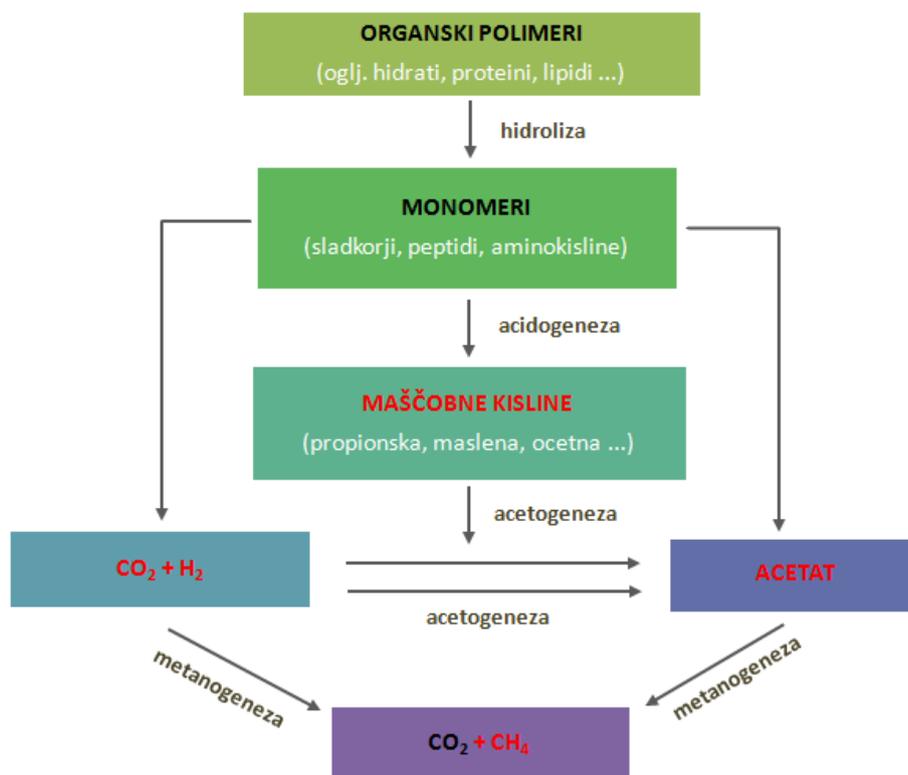
V bioplinarnah danes kot substrat uporabljajo energetske rastline, stranske živalske proizvode, gnojevko, odpadne vode, mikroalge, odpadke prehranske industrije, biološke odpadke iz gospodinjstev in komunalne odpadke (Ahring, 2003).

2.1 BIOPLINSKI PROCES

Proizvodnja bioplina je anaeroben proces razgradnje organskega materiala, katerega končen produkt sta metan in ogljikov dioksid. Kot že omenjeno, gre za obnovljiv vir energije, ki je uporabna za proizvodnjo toplote in električne energije. Proces je biološko zelo zahteven, saj je prisotnih veliko različnih mikroorganizmov z zelo različnimi vlogami. V naravi so ti mikroorganizmi prisotni v anaerobnih ekosistemih, kot so sedimenti, riževa polja, močvirnata tla in vamp prežvekovalcev (Ahring, 2003).

Proces anaerobne razgradnje (Slika 1) je sestavljen iz naslednjih faz:

1. Hidroliza: v procesu hidrolize hidrolitske bakterije razgradijo kompleksne organske polimere (ogljikovi hidrati, lipidi, proteini), ki so prisotni v odpadnem organskem materialu, v enostavnejše organske monomere (glukoza in drugi enostavni sladkorji, aminokislinae, peptidi, maščobne kisline itd.). To jim omogočajo hidrolaze. Organski monomeri so lažje dostopen vir hranil za ostale mikrobe.
2. Acidogeneza: acidogene bakterije so večinoma fakultativni anaerobi, ki z encimi pretvorijo nastale monomere v kratkoverižne maščobne kisline (KMK), kamor sodijo očetna kislina, propionska kislina, maslena kislina in druge.
3. Acetogeneza: acetogene bakterije, ki so striktni anaerobi, na tej stopnji pretvorijo kratkoverižne maščobne kisline v acetat, H_2 in CO_2 .
4. Metanogeneza: je zadnja stopnja pri proizvodnji bioplina. Metanogene arheje iz acetata po acetoklastični poti (~70 %) ali iz H_2 in CO_2 po hidrogenotrofni poti (~30 %) proizvedejo CH_4 in CO_2 (Chasnyk in sod., 2015).



Slika 1: Anaerobna metanogena razgradnja organske snovi.

Končni produkt anaerobne razgradnje je torej bioplin, ki ga sestavljajo 60 – 65 % metana in 30 – 35 % ogljikovega dioksida. V sledovih so prisotni tudi N_2 , H_2 , CO , NH_3 in H_2S (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.1.1 Mikrobna združba v bioplinskem procesu

Veliko število različnih hidrolitskih mikroorganizmov sodeluje pri razgradnji kompleksnega substrata v monomerne enote. Najpogosteje zastopani rodovi so *Clostridium*, *Micrococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* in *Streptococcus*. Hidrolitski in acidogeni mikroorganizmi rastejo kar desetkrat hitreje kot metanogeni. Acidogeneza je običajno najhitrejša reakcija v procesu anaerobne fermentacije. Acidogene bakterije (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*) tvorijo kratkoverižne maščobne kisline (KMK) in lahko hitro zakisajo okolje, v kolikor proces ne poteka optimalno in se ti vmesni produkti ne pretvarjajo dalje v acetat.

Acetogene bakterije (*Syntrophomonas wolfeii*, *Syntrophobacter wolinii*) so striktni anaerobi, saj vsebujejo encime, ki so ekstremno občutljivi na kisik. So ključne za

nadaljevanje bioplinskega procesa, saj so odgovorne za tvorbo acetata, ogljikovega dioksida in vodika.

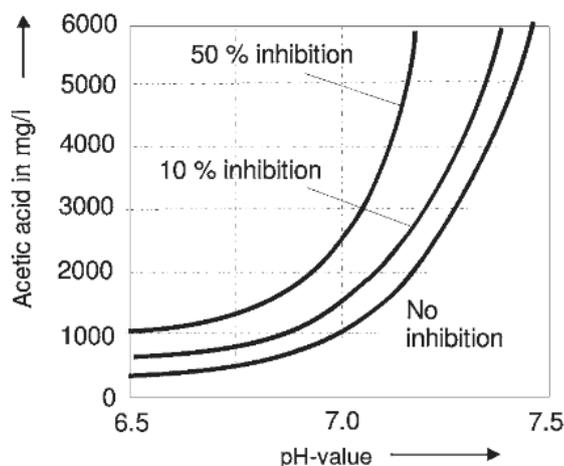
Med acetogenimi in metanogenimi mikrobi se vzpostavi sintrofična povezava, saj je za potek metanogeneze nujen nizek parcialni tlak vodika. Metan, ki je sicer najbolj zaželen energetski produkt procesa, nastaja kot stranski produkt anaerobnega metabolizma metanogenih arhej (*Methannospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales*, *Methanoculleus*). Metanogene arheje ne preživijo pH vrednosti, ki so nižje od 6 in rastejo izredno počasi. Podvojevalni čas hidrogenotrofnih metanogenih arhej znaša do 6 ur, medtem ko acetoklastične arheje potrebujejo celo 2,6 dneva (Merlin Christy in sod., 2014).

2.1.2 pH in KMK v bioplinskem procesu

Optimalen pH za proizvodnjo bioplina je med 6,7 in 7,5. Metanogene arheje so izredno občutljive na nizek pH, saj le ta zavira njihov metabolizem. Vrednosti pH se ne smejo znižati pod pH=6,5, drugače pride do zakisanja kot posledica povečane acidogeneze. Prvi znak zakisanosti je povišanje koncentracije propionske kisline v sistemu (5 mg/L že deluje inhibitorno). Znižanje pH vrednosti deluje negativno na produkcijo metana ali jo celo zaustavi (Deublein in Steinhauser, 2008).

Ogljikovi hidrati v primerjavi s proteini hitreje povzročijo zakisanost v digestorju, saj pri razgradnji le teh ne nastajajo ioni, ki bi delovali kot pufer (Deublein in Steinhauser, 2008).

KMK so običajno že naravno prisotne v substratu, vendar se razgradijo v procesu proizvodnje bioplina. Najdemo jih v dveh oblikah, v nedisocionirani obliki in v disocionirani obliki. Zlasti nedisocionirane KMK delujejo zavirajoče, saj zaradi lipofilnega značaja penetrirajo v celice in denaturirajo celične proteine (Deublein in Steinhauser, 2008). Pri dobro vodenem procesu se samo 20 do 30 % ogljika pretvori v intermediarne produkte (kratkoverižne maščobne kisline), preden se pretvorijo v metan in ogljikov dioksid (Ahring, 2003).



Slika 2: Inhibicija metanogeneze v primeru očetne kisline (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.1.3 Temperatura

Proces anaerobne razgradnje lahko poteka v mezofilnih (32-42 °C) ali termofilnih pogojih (48-55 °C). Večina metanogenih mikroorganizmov sodi med mezofile, termofilev je bistveno manj. Najdemo pa tudi mikroorganizme, ki so sposobni proizvajati bioplin oz. metan pri nizkih temperaturah (0,6-1,2 °C), in sicer na površini permafrosta (vedno zamrznjena tla). Značilnost metanogenih mikroorganizmov je, da so izredno občutljivi na spremembe temperature, še posebej termofilni mikrobi. Sprememba temperature ne sme biti večja kot ± 2 °C, drugače pride do upada aktivnosti mikrobov, tudi do 30 % (Deublein in Steinhauser, 2008). Poleg tega da ima temperatura vpliv na samo proizvodnjo metana, vpliva tudi na uspešnost razgradnje organske snovi na vmesne produkte (acetat, H₂ in CO₂) iz katerih metanogene arheje producirajo metan (Fey in Conrad, 2000).

Izbira procesa je tako odvisna od uporabljene mikrobne biomase in vrste substrata (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.1.4 C/N razmerje

Območje v katerem naj bi bilo razmerje ogljika in dušika je 16:1 do 25:1. To razmerje zagotavlja najbolj uspešno produkcijo bioplina.

V anaerobnih pogojih je zelo majhen doprinos biomase, zato je potreba po dušiku majhna. Po nekaterih podatkih tudi razmerje C:N = od 33:1 do 50:1 vodi v uspešno produkcijo metana. Prenizko C/N razmerje vodi v povišano produkcijo amonija, kar zavira produkcijo metana (NH₄⁺-N > 1500 mg/Mg). Pokazatelj, da do inhibicije prihaja zaradi amonija, je

povišana pH vrednost. Tudi previsoko razmerje zavira proces, saj mikroorganizmom primanjkuje dušika, ki je nujno potreben za sintezo proteinov.

Ravnotežje med ogljikom in dušikom je v substratu zelo pomembno in ga lahko uravnavamo z mešanjem različnih substratov med seboj (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.2 LIGNOCELULOZNI SUBSTRATI

Glavne komponente lignoceluloznega materiala so lignin (5-25 %) in polimeri ogljikovih hidratov (celuloza, 35-45 %; hemiceluloza, 25-40 %), ki so med seboj povezane na različne načine (Zhang in sod., 2015).

Lignin je nevodotopen polimer, ki je odporen na anaerobno razgradnjo in s tem ko obdaja celulozne in hemicelulozne fibrile, onemogoča razgradnjo lignoceluloznega substrata (Hendriks in Zeeman, 2009). Celuloza je najbolj zastopan polisaharid v naravi in glavna komponenta rastlinskih celičnih sten, ki lahko predstavlja 20 – 90 % suhe mase rastlinskega tkiva. V večini naravnih substratov so celulozna vlakna organizirana v kristale, vmes pa se nahajajo amorfne oblike celuloze. Celulozna vlakna so vpeta v mrežo drugih polisaharidov: pektin in hemiceluloza (ksilanoglukan, ksilan, manan, glukomanan in 1,4-b- ter 1,3-b-glukani) (Zorec in sod., 2014). Hemiceluloza je sestavljena iz različni sladkorjev (D-glukoza, D-manoza, D-galaktoza, D-ksiloza, L-arabinoza in L-ramnoza) ter uronske kisline (Hendriks in Zeeman, 2009). Med hemiceluloznimi substrati je najbolj zastopan prav ksilan (Zorec in sod., 2014). Ksilan ima zelo kompleksno strukturo, zato je za njegovo razgradnjo potrebno sinergistično delovanje različnih encimov. Mikrobi so tisti, ki običajno posedujejo cel set potrebnih encimov, z manjšimi in večjimi razlikami v katalitični regiji, kar omogoča razgradnjo številnih različic ksilana (Marone in sod., 2012; Zorec in sod., 2014). Zanimiv substrat so zlasti lignocelulozni substrati, ki jih lahko pretvorimo v etanol, butanol, iso-butanol, vodik in seveda, metan (Hendriks in Zeeman, 2009). Lignoceluloza je obnovljiv substrat, ki ga pridobimo iz dveh dejavnosti: iz kmetijstva in iz gozdarstva. Prednost lignoceluloznega substrata je dostopnost v velikih količinah in nizka cena. Po žetvi na poljih ostajajo ostanki rastlin, ki jih običajno pustimo na poljih, kljub temu da je to potencialno obnovljiv vir energije (Hu in Yu, 2005).

Glavne komponente lignocelulozne materiala so torej celuloza, hemiceluloza in lignin, ki so povezane v kompleksno in trdno strukturo, kar izredno oteži razgradnjo, vendar v naravi prihaja do njene razgradnje. To je vzbudilo zanimanje raziskovalcev po celem svetu (Hu in Yu, 2005; Yue in sod., 2007, 2013). Pogoji v katerih poteka metanogeneza načeloma ne omogočajo anaerobne razgradnje lignina (Hendriks in Zeeman, 2009). Razgradnja lignina je možna pod aerobnimi in anaerobnimi pogoji. Aerobno razgradnjo vršijo glive bele in rjave trohnobe, z encimoma lakaza in mangan peroksidaza (Chaturvedi in Verma, 2013).

Anaerobno razgradnjo vršijo mikroorganizmi z ROSi (reaktivne kisikove zvrsti), ki nastajajo pri razgradnji celuloze (Ko in sod., 2009). Prihaja pa do razgradnje celuloze in hemiceluloze, pri čemer nastanejo mono-, di- ali oligosaharidi, ki so za večino mikroorganizmov lažje dostopen substrat. Da bi dosegli večjo produkcijo metana, moramo doseči bolj učinkovito razgradnjo celuloze in hemiceluloze, kar pomeni, da moramo izboljšati prvo stopnjo v produkciji metana, hidrolizo. Pri hidrolizi se celuloza razgradi v posamezne molekule glukoze, hemiceluloza pa razpade na pentoze (ksiloza in arabinoza), heksoze (manoza, glukoza in galaktoza) in sladkorne kisline (Hendriks in Zeeman, 2009). Pentoze in heksoze, ki jih pridobimo z učinkovito hidrolizo, se lahko nadalje metabolizirajo po petih fermentacijskih poteh: acetatni, butiratni, propionatni, etanolni in laktatni poti, pri čemer nastajajo propionat, butirat, acetat, etanol, laktat in vodik (McDonald in Edwards, 1976). Najbolj zaželjena pot je acetatna pot fermentacije, saj preko nje dosežemo največjo produkcijo metana. To je razvidno iz enačbe: $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4H_2 + 2CO_2 + 2CH_3COOH$, saj so vodik, ogljikov dioksid in acetat direktni substrati za metanogene arheje za proizvodnjo metana (Slika 1). Iz tega je razvidno, da so za bioaugmentacijo bioplinskega procesa najbolj zaželjene bakterije, ki so sposobne fermentacije po acetatni poti (Zhang in sod., 2015). Zaenkrat pa je še vedno največ raziskav na področju celulitičnih in hemicelulitičnih bakterij, ki zaradi hidrolize substrata na enostavnejše sladkorje, povečajo produkcijo metana (Lü in sod., 2013; Peng in sod., 2014; Zhang in sod., 2015).

Pomemben vir mikroorganizmov za razgradnjo lignoceluloznega substrata je vamp prežvekovalcev. V vampu prisotni mikroorganizmi so sposobni razgradnje različnih lignoceluloznih substratov, vključno z agrikulturnimi ostanki, komunalnimi odplakami in vodnimi rastlinami (Hu in Yu, 2005; Yue in sod., 2007, 2013).

2.2.1 Bučna pulpa kot substrat za proizvodnjo bioplina

Substrat za proizvodnjo bioplina v našem poskusu so bile rumene oljne buče. *Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca* ali oljna buča je ekonomsko pomembna poljščina, saj se uporablja za produkcijo bučnega olja. Za izdelavo bučnega olja potrebujejo samo bučna semena, preostanek buč pa nima velike uporabne vrednosti in jih običajno pustijo na polju. Pri analizi kemijske sestave buč, so bučo razdelili na tri dele – olupek, meso in notranje, nevlaknato meso. V olupku so določili visoke vsebnosti lignina, medtem ko so bile vsebnosti lignina v mesu precej nižje (tudi v notranjem, nevlaknatem mesu). Meso, ki predstavlja 69-70 % biomase buče, vsebuje veliko pektina (~19 %) in veliko hemiceluloznih polisaharidov. V primerjavi oljne buče z navadno, so raziskave pokazale, da oljne buče vsebujejo precej več lignina, približno enako pektina, več hemiceluloze in komaj opazno več α -celuloze. Oljne buče so tako predvsem vir ne-celuloznih polisaharidov (hemiceluloza in pektin) (Košťálová in sod., 2008).

Kemijska sestava buč je naslednja: 7,9 % pepela, 7,6 % lignina, 19,3 % pektina (galakturonska kislina, arabinoza, galaktoza, ksiloza, ki se nahaja v ksiloglukanu, ksilanu in/ali ksilogalaktironanu), 34,1 % nevtralnih ogljikovih hidratov (hemiceluloza) in 27,4 % α -celuloze. Ksiloglukan je glavna komponenta hemiceluloze v primarni celični steni buče (Košťálová in sod., 2008).

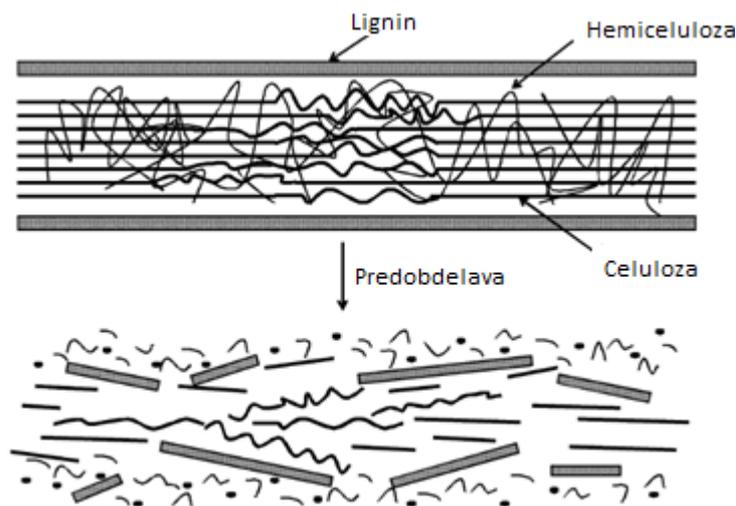
2.3 PREDOBDELAVA LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV ZA PRODUKCIJO BIOPLINA

Ozko grlo pri procesu proizvodnje bioplina iz lignoceluloznega substrata je hidroliza, prva stopnja anaerobne razgradnje (Peng in sod., 2014).

Za boljši izkoristek substrata in večji izplen metana so bili preizkušeni različni načini predobdelave hemiceluloznih substratov: različne fizikalne predobdelave (visok pritisk, visoka temperatura (nad 180 °C), homogenizacija, ultrasonifikacija, predobdelava s paro...) in kemične predobdelave (kisline, baze, oksidirajoči agensi ...) (Hendriks in Zeeman, 2009; Lü in sod., 2013). Fizikalna predobdelava pogosto ni ekonomična, saj so potrebni relativno veliki vložki energije. Lu in sod. (2011) so se lotili predobdelave pšenične slame z mikrovalovi, pri čemer so za 1 g glukoze vložili 5,5 kJ energije, medtem ko nam 1 g glukoze lahko da največ 15,8 kJ energije. Kemične predobdelave so se izkazale kot učinkovite, vendar je strošek previsok, poleg tega pa so številne kemikalije zelo agresivne in obremenjujoče za okolje (Hu in Yu, 2005; Lü in sod., 2013).

Raziskovalci zato preizkušajo biološke oz. mikrobiološke načine predobdelave substrata. Hidroliza z encimskimi mešanici se je izkazala za učinkovito metodo, vendar encimi v bioreaktorju hitro izgubijo aktivnost (Lü in sod., 2013). Dodatne raziskave so pokazale, da bi večkratno dodajanje encimov omogočilo konstantno hidrolizo in večjo uspešnost razgradnje substrata, in s tem višjo produkcijo bioplina (Čater, 2015), vendar bi s tem postopek zelo podražili (Ma in sod., 2010). Med (mikro)biološke predobdelave sodi tudi predobdelava z dodanimi ustreznimi mikroorganizmi, katerih metaboliti omogočajo razgradnjo zelenega substrata (Sindhu in sod., 2016). Na prvi pogled popolna metoda, ima kljub vsemu določene pomanjkljivosti, ki predstavljajo izziv številnim raziskovalcem. Veliko je obetala predobdelava z glivami, saj so sposobne učinkovite razgradnje lignoceluloznih substratov pri majhnem vložku energije in blagih pogojih (Yu in sod., 2009). Izkazalo se je, da je predobdelava z glivami ekonomsko neugodna, saj glive za svojo rast izkoriščajo polisaharide v substratu, poleg tega pa je kultivacija dolgotrajna. Ker je predobdelava z glivami aerobni proces, zahteva proces proizvodnje bioplina dve stopnji in s tem dva bioreaktorja, kar močno oteži in podraži postopek na industrijskem nivoju. Raziskovalci ugotavljajo, da lahko večjo učinkovitost dosežejo s kombinacijo predobdelav (kisline, encimi), kar pa predstavlja dodatni strošek in/ali tveganje za okolje (Ma in sod.,

2010). Vedno več se za predobdelavo uporabljajo ustrezne bakterije, ki so sposobne razgradnje substrata (Peng in sod., 2014) in tako olajšajo dostop do hranil mikrobnih biomasi, odgovorni za proizvodnjo bioplina.



Slika 3: Vpliv predobdelave na lignocelulozni substrat (Hsu, 1983, cit. po Chaturvedi in Verma, 2013).

2.3.1 Bioaugmentacija

Bioaugmentacija je metoda, ki se je sprva uporabljala za izboljšanje mikrobne razgradnje onesnažil v tleh oz. za čiščenje kontaminiranih tal (bioremediacija) s pomočjo dodanih specifičnih mikroorganizmov. Uspešnost bioaugmentacije je v tem primeru odvisna od biotskih in abiotskih dejavnikov. Med abiotske dejavnike sodijo kemijska struktura onesnažil, njihova koncentracija in dostopnost v tleh ter fizikalno kemične lastnosti samih tal. Najpomembnejši biotski dejavnik pa je zagotovo izbira ustreznega mikroorganizma, ki bo sposoben razgradnje onesnažil, hkrati pa bo stabilen v okolju, kar pomeni da se bo ohranil v že obstoječi mikrobni združbi (Mrozik in Piotrowska-Seget, 2010).

Enak pomen ima bioaugmentacija v proizvodnji bioplina, le da je tu cilj razgraditi kompleksen substrat na lažje razgradljive organske spojine, ki jih lahko metanogeni mikroorganizmi izkoristijo za proizvodnjo bioplina. Tudi tu se raziskovalci soočajo s podobnimi problemi; najti ustrezen mikroorganizem, ki bo uspešno razgrajeval zeleni substrat in se ohranil v že zelo natančno definiranim sistemu. Proizvodnja bioplina namreč vključuje uporabo naravne anaerobne mikrobne združbe (Kovács in sod., 2012).

Problem lignoceluloznih substratov je prav njihova razgradljivost, kar v proizvodnji bioplina pomeni oteženo prvo stopnjo, tj. hidrolizo. Vedno več poskusov zato poteka na

področju bioaugmentacije. Bioaugmentacija je obetajoča metoda za zviševanje produkcije metana in mogoče bomo prav z njo razširili uporabo lignoceluloznega materiala v bioplinski industriji (Čater in sod., 2015). Bioaugmentacijo lahko definiramo kot (mikro)biološko pospešeno razgradnjo težko razgradljivega organskega substrata, z dodanim biološkim agansom, ki ima sposobnost razgradnje kompleksnih organskih polimerov v lahko dostopne organske monomere, ki so jih kot substrat sposobni izkoriščati mikroorganizmi, ki so odgovorni za proizvodnjo bioplina. Bioaugmentacija poteka pri blagih pogojih, zahteva majhen vložek energije in je okolju prijazna metoda. Med biološke agense uvrščamo različne mikroorganizme (bakterije, glive, kvasovke) ali njihove dele (encimi) (Kovács in sod., 2012; Lü in sod., 2013; Čater in sod., 2015; Čater, 2015).

Veliko raziskav poteka na področju bioaugmentacije z različnimi bakterijami, ki jih dodajo bioplinski mešanici v začetku procesa proizvodnje bioplina (Hu in Yu, 2005; Čater in sod., 2015). Peng in sod. (2014) so s celulitično anaerobno bakterijo *Clostridium cellulolyticum* pospešili hidrolizo pšenične slame. O povišani produkciji metana poročata tudi Hu in Yu (2005), ki sta koruzne ostanke inkubirala s tekočino iz rumna kože (naravna mikrobná združba, ki je sposobna razgraditi lignocelulozo). Zhang in sod. (2015) so prav tako delali na koruzi in s pomočjo bioaugmentacije z *Acetobacteroides hydrogenigenes* uspeli povečati proizvodnjo metana.

Problem pri bioaugmentaciji z bakterijami je, kako dodani mikroorganizem obdržati v sistemu, saj se dodane bakterije pogosto obdržijo v sistemu največ teden do dva, potem pa zaradi neuspešne kompeticije z mikrobi v anaerobni mikrobní biomasí, izginejo. Tako zasledimo boljšo produkcijo metana le v prvih dneh, tednih, vendar se tak nivo produkcije ne ohranja dalj časa (Kovács in sod., 2012; Čater in sod., 2015; Martin–Ryals in sod., 2015).

2.3.2 *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5

Mikroorganizem, ki smo ga v našem poskusu uporabili za bioaugmentacijo je bil *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5 (Kopencny in sod., 2003).

Vrsta *P. xylanivorans* Mz5 izvira iz vampa goveda. Je gram negativna, gíbljiva in nesporulirajoča bakterija, ki raste v anaerobnih pogojih. Optimalna temperatura za njeno rast je 39 °C, pri temperaturah nižjih od 25 °C in višjih od 45 °C pa rasti ni več zaslediti. Kljub temu da je anaerobni mikrob in ne raste v prisotnosti kisika, preživi krajšo izpostavljenost kisiku in je sposobna regeneracije pri anaerobnih pogojih, kar je velika prednost in dobrodošla lastnost pri praktični izvedbi bioaugmentacije (Kopencny in sod., 2003). *P. xylanivorans* Mz5 je sposoben razgraditi številne monosaharidne in polisaharidne substrate, saj proizvaja alfa-galaktozidaze, alfa-arabinozidaze, ksilanaze, amilaze, beta-

endoglukanaze, pektin hidrolaze, proteinaze in DNaze (Kopencny in sod., 2003). Še posebej visoko učinkovite so ksilanaze (Kopencny in sod., 2003; Zorec in sod., 2014). Njegova ksilanolitična aktivnost je vsaj 1,6-krat večja kot pri ostalih ksilanolitičnih vrstah v vampu goveda. *P. xylanivorans* Mz5 ima namreč debel ovoj ekstracelularnih polisaharidov in prav v ta ovoj so ujete ksilanaze (Zorec in sod., 2014).

P.xylanivorans Mz5 se je v prejšnjih raziskavah na področju proizvodnje bioplina izkazal kot uspešen, saj je zaradi bioaugmentacije z njim, proizvodnja bioplina iz lignoceluloznih substratov narasla za približno 18% (Čater in sod., 2015).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE

Pri izvedbi poskusa smo uporabili naslednje kemikalije:

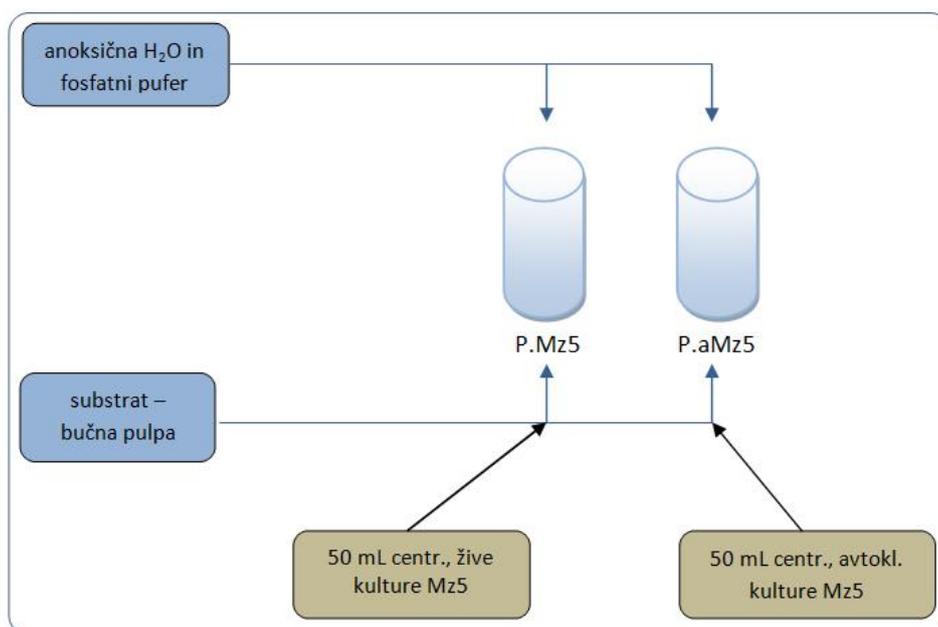
- agar (Fluka)
- amonijev sulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma)
- celobioza (Merck)
- dikalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Merck)
- dinatrijev karbonat, Na_2CO_3 (Merck)
- dinatrijevhidrogen fosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- DL-2-metil maslena kislina (Sigma)
- eter (Merck)
- glukoza (Kemika)
- hemin (Koch-Light Laboratories Ltd.)
- izo-maslena kislina (Sigma)
- izo-valerenska kislina (Sigma)
- kalcijev klorid, CaCl_2 , granuliran (Sigma)
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (Merck)
- kalijev dikromat, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck)
- klorovodikova kislina, HCl (Merck)
- kongo rdeče (Sigma)
- krotonska kislina (Merck)
- kvasni ekstrakt (Biolife)
- magnezijev sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- maltoza (Kemika)
- maslena kislina (Sigma)
- natrijev hidroksid, NaOH (Merck)
- natrijev klorid, NaCl (Merck)
- n-valerenska kislina (Sigma)
- očetna kislina (Merck)
- pepton (Biolife)
- propionska kislina (Sigma)
- resazurin (Fluka)
- srebrov sulfat, AgSO_4 (Molar)
- škrob (Sigma)
- žveplena kislina, H_2SO_4 (Merck)

3.2 PREDHODNI POSKUS – DOLOČANJE KSILANAZNE AKTIVNOSTI

S predhodnim poskusom smo preverili ali buče aktivirajo ksilanazno aktivnost seva *P. xylanivorans* Mz5. Za sev je značilno, da proizvaja veliko maslene kisline, ksilanazna aktivnost pa mora biti inducirana s substratom (Zorec in sod., 2000).

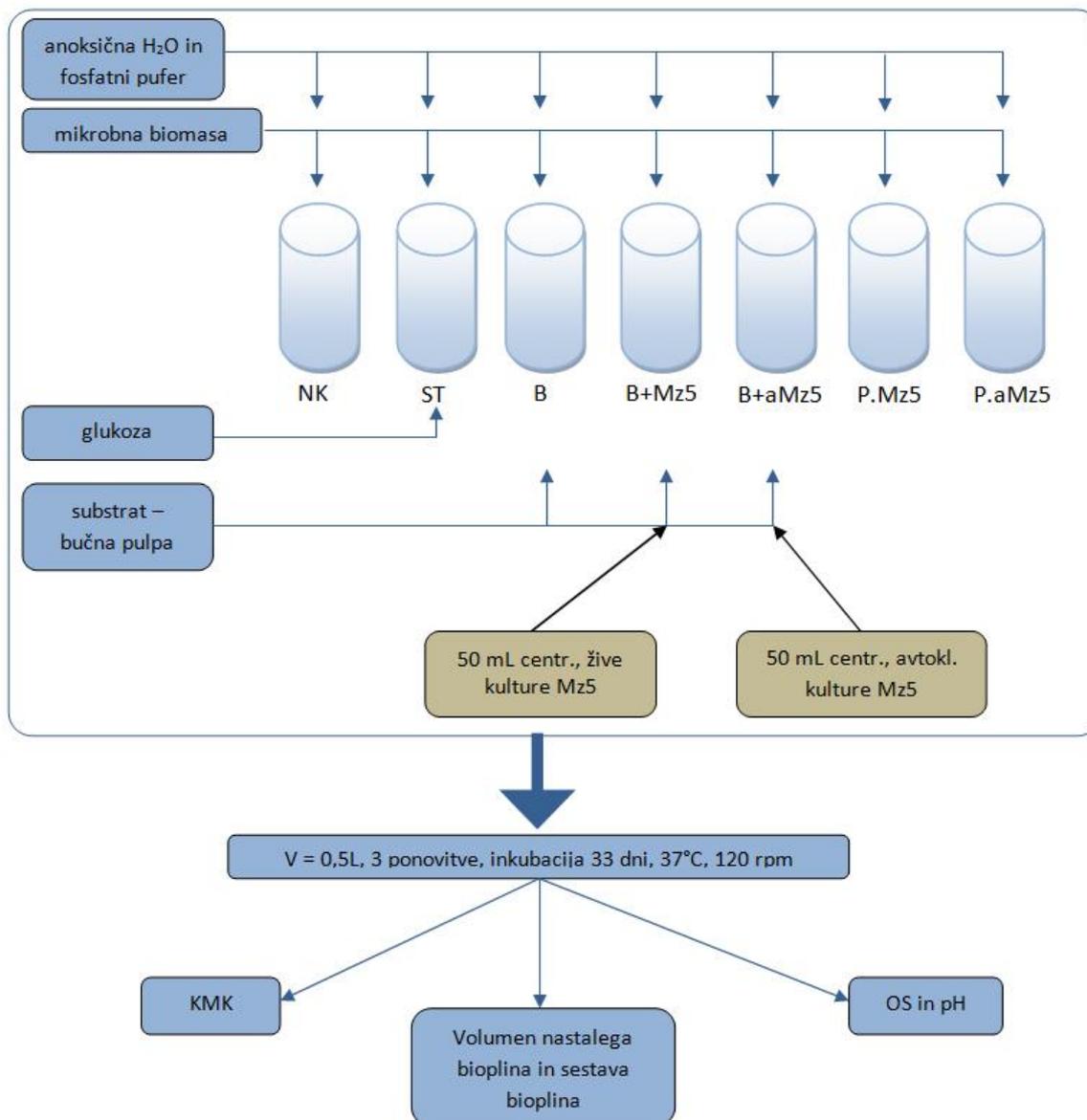
P. xylanivorans Mz5 smo preko noči inkubirali v tekočem gojišču M330 brez ksilana pri 37 °C. Pripravili smo dve steklenički z 250 mL anoksične vode in 10 mL fosfatnega pufru. V eno stekleničko smo dodali 2,5 g tropin, ki so bogat vir ksilana, v drugo pa 15 g buč. Prekonočno kulturo smo nakapljali na petrijevke s trdim gojiščem M330 in jih inkubirali 24 ur pri 37 °C. Naslednji dan smo obe plošči prelili z barvilom Kongo rdeče (5 mM NaOH, 1g/L Kongo red) in ju pustili na sobni temperaturi 60 minut. Plošči smo razbarvali v dveh urah z raztopino za razbarvanje (5 mM NaOH, 58,4 g/L NaCl). Prisotnost ksilanaz smo ugotavljali po zbitritvenih območjih na agarški plošči.

3.3 POTEK POSKUSOV



P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Slika 4: Shema poteka dela enodnevne predobdelave substrata s kulturo *P. xylanivorans* Mz5



NK = negativna kontrola, ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, KMK = kratkoverižne maščobne kisline, OS = organska snov

Slika 5: Shema poteka dela pri izvedbi našega poskusa BMP

3.4 SHRANJEVANJE IN GOJENJE BAKTERIJSKEGA SEVA *P. xylanivorans* Mz5

Za namnoževanje in shranjevanje bakterijskega seva *P. xylanivorans* Mz5 smo uporabljali gojišče M330 v sestavi: mineralna raztopina 330 v sestavi: KH₂PO₄ (6 g/L), NaCl (12 g/L), (NH₄)₂SO₄ (6 g/L), CaCl₂ (1,6 g/L), MgSO₄ x 7H₂O (2,5 g/L), destilata, K₂HPO₄ (0,3 g/L), pepton (2,0 g/L), kvasni ekstrakt (0,5 g/L), glukoza (2 g/L), maltoza (1 g/L), celobioza (1 g/L), škrob (1 g/L), hemin (1 mg/L), HMK mix v sestavi: očetna kislina (4,25 mL), propionska kislina (1,50 mL), maslena kislina (1,00 mL), n-valerenska kislina (0,25 mL), izo-maslena kislina (0,25 mL), izo-valerenska (0,25 mL), DL-2-metil maslena kislina (0,25 mL), resazurin (1 ml/L), cistein HCl (0,5 g/L), destilata (960 mL/L). Za vbodnike smo dodali še agar (7,5 g/L).

P. xylanivorans Mz5 je bil izoliran na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologije oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete iz vampa goveda in je uspešen pri razgradnji ksilana (Kopencny in sod., 2003). Sev smo gojili v anaerobnih pogojih, kot jih zagotavlja Bryantova modifikacija Hungateove tehnike (Bryant, 1972). Sev smo precepljali pod zaščitnim plinom (100% CO₂), ki smo ga vodili prek kolone z vročimi bakrovimi opilki (350 °C) in se tako znebili primesi kisika v tehničnem plinu CO₂. *P. xylanivorans* Mz5 smo shranjevali v vbodnikih pri -20 °C.

Za poskuse smo vbodnik prenesli iz -20 °C na 37 °C za 1 uro. Nato smo kulturo precepili s cepilno zanko (približno 10 µL) v epruveto s svežim gojiščem M330. Prekonočno kulturo, inkubirano pri 37 °C, smo precepili v stekleničke z enakim gojiščem (1% inokulum). Naslednji dan smo gostoto celic preverili z merjenjem optične gostote pri 600 nm. Ugotovili smo, da dobimo najbolj točne rezultate, če OD izmerimo 5 minut po tem, ko pustimo kulturo in referenčno gojišče v stiku z zrakom. Za poskuse uporabili kulturo, ki je dosegla OD približno 0,5.

3.5 KEMIJSKA POTREBA PO KISIKU (KPK)

Meritve KPK oz. COD (Chemical Oxygen Demand), smo izvedli po standardni kolorimetrični metodi (closed reflux) (Standard Methods..., 2006). Glede na rezultate meritev KPK, smo določili količino substrata, ki smo ga dodali poskusnim mešanici v testu BMP. Določili smo tudi KPK poskusnih mešanic ob začetku in koncu poskusa. Za meritve KPK smo pripravili 2 reagenti, DSh in SAR. DSh smo pripravili tako, da smo 500 mL destilirane vode dodali 10,216 g K₂Cr₂O₇ in 167 mL koncentrirane H₂SO₄. Ko se je raztopina ohladila, smo dopolnili z vodo do 1000 mL. SAR je reagent z žvepleno kislino, v sestavi: 10,120 g AgSO₄ na 1000 mL H₂SO₄. Poleg vzorcev smo pripravili tudi referenčno raztopino in negativno kontrolo, kar pomeni da smo vodi dodali oba reagenti in jo inkubirali v termobloku.

Test KPK je potekal tako, da smo v epruvete HACH odpipetirali 2,5 mL ustrezno redčenega vzorca in dodali 1,5 mL DSh. Previdno, ob notranji strani epruвет, smo dodali še 3,5 mL SAR, tako da se je ustvaril sloj kisline pod vzorcem in DSh. Epruvete smo tesno zaprli s pokrovčkom s teflonskim tesnilom in jih nekajkrat obrnili, da se je mešanica premešala. Zaradi nastanka močne eksotermne reakcije, smo epruvete prezračili in šele nato postavili v segret termoblok (Hach, ZDA) pri 150 °C, in jih 2 uri inkubirali v digestoriju. Vse vzorce smo pripravili v dveh paralelkah. Po 2 urah smo epruvete počasi ohladili na sobno temperaturo. Absorbanco smo pomerili pri 600 nm (Shimadzu UV-160A) in iz umeritvene krivulje izračunali vrednosti KPK.

Umeritveno krivuljo smo pripravili iz standardnih koncentracij glukoze, za katere lahko kemijsko potrebo po kisiku izračunamo iz enačbe za popolno kemijsko oksidacijo glukoze. Pripravili smo raztopine z različnimi koncentracijami glukoze (0 mg/L, 100 mg/L, 300 mg/L, 500 mg/L, 700 mg/L in 1000 mg/L), tako da smo glukozo raztopili v vodi. Vsem raztopinam z različnimi koncentracijami glukoze, smo pomerili absorbanco pri 600 nm. Pri tem smo upoštevali, da 1000 mg glukoze ustreza 1070 mg KPK. Pomerjenim absorbancom smo tako pripisali ustrezne vrednosti KPK.

3.6 DOLOČANJE ORGANSKE SNOVI (OS)

Pred začetkom poskusa smo določili količino organske snovi mikrobnе, saj smo na osnovi teh vrednosti določili potrebno količino za test BMP. Poleg tega smo izmerili vsebnost organske snovi v posameznih testnih mešanicah na dan 0 in 33. dan poskusa, da bi ugotovili kakšen je bil izplen metana.

Postopek je potekal v dveh korakih. Najprej smo določili suho snov (SS), nato pa še organsko snov (OS) (Standard Methods..., 2006). Lončke za določanje suhe snovi smo 1 uro sušili pri 105 °C (sušilnik Ehret, Nemčija) in jih ohladili v eksikatorju. Nato smo jih stehali na analitski tehtnici (Mettler PN163). V stehane lončke smo odpipetirali 10 mL vzorca ali 10 g vzorca in jih ponovno stehali. Sušili smo jih do konstantne teže pri 105 °C. Po končanem sušenju, smo v eksikatorju ohlajene ponovno stehali in izračunali suho snov po enačbi (1).

$$SS (g/L) = ((m_{pos} - m_{lon})/V_{vz}) * 1000 \quad \dots (1)$$

m_{pos} – masa lončka z vzorcem po sušenju (g)

m_{lon} – masa praznega lončka (g)

V_{vz} – volumen vzorca pred sušenjem (10 mL)

Lončke smo nato čez noč postavili v žarilno peč in jih žarili pri 550 °C do konstantne teže. Po sežigu je ostal samo še pepel. Pred ponovnim tehtanjem smo lončke ohladili v eksikatorju in organsko snov izračunali po enačbi (2).

$$OS (g/L) = ((m_{pos} - m_{pož})/V_{vz}) * 1000 \quad \dots (2)$$

$m_{pož}$ – masa lončka z vzorcem po žarenju (g)

3.7 ANALIZA KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN (KMK)

V vzorcih poskusnih mešanic smo določili vsebnost kratkoverižnih maščobnih na dan 0, 1, 4, 7, 16, 22 in 33. Na izbrane dni smo iz vsake steklenice s poskusno mešanico z iglo skozi gumijasti zamašek odvzeli po 3 mL vzorca. Vzorce smo do analize shranili pri -20 °C. Pred analizo KMK smo odmrznjene vzorce centrifugirali 2 minuti na 5000 rpm (Eppendorf MiniSpin, Nemčija) in izvedli etrsko ekstrakcijo po prilagojeni metodi (Adorno in sod., 2014).

V epruvete HACH smo prenesli 1 mL vzorca. Sočasno smo ekstrahirali tudi standard, kar je bila v našem primeru kalibracijska raztopina 1 (KR1) (Preglednica 1). V epruvete smo dodali 0,5g NaCl, 100µL internega standarda (1g/100mL krotanske kisline), 200µL 50% H₂SO₄ in 1mL predhodno na ledu ohlajenega etra. Vzorce smo premešali na vibracijskem mešalniku 1 minuto in jih na kratko centrifugirali do 2000 obratov (Janetzki TM23). Vzorce smo ponovno zamrznili pri -20 °C. Po najmanj pol ure je spodnja vodna faza zamrznila, zgornjo pa smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v novo epruveto HACH. Dodali smo še malo spatulo CaCl₂ in jih do meritev spravili pri -20 °C. Ves čas dela so bile epruvete tesno zaprte s pokrovčki, da smo preprečili izhlapevanje KMK.

Kratkoverižne maščobne kisline smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu 14A s plamensko-ionizacijskim detektorjem. Kot nosilni plin smo uporabili helij. Temperatura injektorja je bila 250 °C, začetna temperatura kolone je bila 80 °C, ki se je ohranjala 2 minuti, temperaturni program je bil 15 °C/minuto, končna temperatura kolone je bila 160 °C, ki pa se je ohranjala 4 min. Temperatura detektorja je bila 250 °C. Kolono smo umerili s standardno mešanico kratkoverižnih maščobnih kislin (KR1) (Preglednica 1). Analiza je potekala 12 minut. Rezultati so se izpisovali z integratorjem Chromatopac C-R6A, Shimadzu.

Preglednica 1: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v standardni mešanici kratkoverižnih maščobnih kislin (KR1)

Kratkoverižna maščobna kislina	Koncentracija (g/L)
ocetna	0,525
propionska	0,495
izo-maslena	0,475
maslena	0,480
izo-valerenska	0,465
valerenska	0,470
kapronska	0,465

3.8 MERITVE pH

pH vrednosti poskusnih mešanic smo izmerili na dan 0 in zadnji, 33. dan. Za merjenje pH smo uporabili pH-meter EUTECH 700. pH-meter smo umerili na pH med pH=6 in pH=8. Med posameznimi meritvami smo elektrodo spirali z destilirano vodo.

3.9 TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA (BMP)

3.9.1 Priprava mikrobne biomase za test BMP

V poskusu smo kot inokulum za proizvodnjo bioplina uporabili anaerobno mikrobno biomaso iz industrijskega bioreaktorja CSTR Bioplinarne Ihan (Petrol d.d.). V Bioplinarni Ihan (Petrol d.d.) kot substrat uporabljajo ostanke živilske proizvodnje, odpadna olja, organske komunalne odpadke, mulje iz čiščenja odpadne vode in druge odpadne snovi organskega izvora. Pred poskusom smo mikrobno biomaso stabilizirali 14 dni pri 37 °C in ji določili vsebnost organske snovi, kot je opisano v poglavju 3.2.5. V tem času se je porabila večina prisotnih hranil in tako smo lahko v testu BMP sledili proizvodnji bioplina le iz dodanega substrata (Standard Methods ..., 2006).

3.9.2 Priprava deoksigenirane vode

Za pripravo poskusnih mešanic smo potrebovali tudi vodo. Uporabili smo navadno vodovodno vodo, ki smo jo prekuhali, s čimer smo zmanjšali vsebnost kisika. Vodo smo shranili v litrskih steklenicah, ki smo jih še vroče neprodušno zaprli z gumijastimi in aluminijastimi zamaški. Do uporabe smo vodo hranili pri sobni temperaturi.

3.9.3 Priprava fosfatnega pufra

V testne mešanice smo dodajali fosfatni pufer in s tem poskušali zagotoviti čimmanjše nihanje pH vrednosti. Morebitna zakisanost vsebine steklenic bi povzročila inhibicijo proizvodnje bioplina in s tem metana. Fosfatni pufer smo pripravili po recepturi v Preglednici 2 in ga do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Preglednica 2: Sestava fosfatnega pufra

Raztopina 1	
KH ₂ PO ₄	45,06 g
Deionizirana voda	1000 mL
Raztopina 2	
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	97,54 g
Deionizirana voda	1000 mL
Raztopino 1 in raztopino 2 zmešamo v enakovrednih količinah.	

3.9.4 Priprava substrata – bučna pulpa

V poskusu smo kot substrat uporabili zrele rumene oljne buče, ki smo jih predhodno naribali (Slika 6) in shranili pri -20 °C. Določili smo jim vsebnost organske snovi (poglavje 3.2.5) in KPK (poglavje 3.2.4).



Slika 6: Kot substrat smo uporabili naribane rumene buče

3.9.5 Izračun sestave tesnih mešanic

Na podlagi podatkov o organski snovi in kemijski potrebi po kisiku substrata in mikrobne biomase, smo preračunali, koliko bučne pulpe in mikrobne biomase moramo dodati v posamezno poskusno mešanico za merjenje biometanskega potenciala. Bioreaktorji so bile

1L steklenice, ki smo jih neprodušno zaprli z gumijastimi in aluminjastimi zamaški, z delovnim volumnom 500 mL. Glede na predhodne teste biometanskega potenciala smo se odločili, da bomo biomaso obremenili kot je prikazano v Preglednici 3. Enako smo izbrali koncentracijo biomase, ki smo jo dodali v 500 mL mešanice. Koncentracija biomase je bila 2g OS/L mešanice.

Preglednica 3: Obremenitev biomase

Poskusna mešanica	Obremenitev (g KPK _{substrata} /1 g OS _{biomase})
Negativna kontrola	/
Standard	0,2
Mešanice	0,5

Bučam smo določili kemijsko potrebo po kisiku in vsebnost organske snovi. KPK je znašal 33g/L, OS pa 42,25g/L. V mešanicah smo 1 g OS mikrobne biomase obremenili z 0,5 g KPK buč, zato smo v mešanice dodali 15 g buč, kar predstavlja 0,64 g OS. Izmerjena vrednost OS biomase je znašala 10,25 g/L OS. Ker smo za mešanice potrebovali le 1 g OS biomase, smo jedodali 98 mL na steklenico.

Vsak test BMP je vseboval pozitivno (standard) in negativno kontrolo. V standardno mešanico smo kot substrat dodali glukozo, ki je vsem mikroorganizmom lahko dostopen vir energije. Glede na predhodne izkušnje, smo se tu odločili za obremenitev 0,2 g KPK/1 g OS. Glukoza (C₆H₁₂O₆) je substrat z znano kemijsko sestavo, zato smo lahko KPK izračunali. Za oksidacijo 1 mola glukoze (=180 g) potrebujemo 6 molov kisika (=192 g). KPK vrednost za 1 g glukoze je tako 1,07 g kisika. Za obremenitev 0,2 g KPK smo torej dodali 187 mg glukoze. Pri negativni kontroli pa substrata nismo dodali, ampak smo spremljali le osnovno aktivnost mikrobne biomase. Volumen proizvedenega bioplina negativne kontrole smo odšteli od volumna nastalega bioplina pri vseh ostalih testnih mešanicah in s tem zagotovili, da v rezultatih vrednotimo le proizvedeni bioplin iz dodanih buč.

V poskusu smo pokazali kako predobdelava buč in bioaugmentacija z dodatkom hidrolitskih bakterij učinkujeta na proizvodnjo bioplina, zato je bil poleg substrata in mikrobne biomase ključni del poskusnih mešanic tudi sev *P. xylanivorans* Mz5. V poskusne mešanice smo v vseh primerih dodali pelet, ki je ostal po centrifugiranju 50 mL kulture *P. xylanivorans* Mz5, s čimer smo se skušali izogniti povečanju KPK na račun dodanega gojišča M330. Pri izračunu sestave testnih mešanic smo volumen dodanega *P. xylanivorans* Mz5, zaradi njegove majhnosti, zanemarili. Končna sestava poskusnih mešanic je prikazana v Preglednici 4.

Preglednica 4: Sestava poskusnih mešanic za test BMP

Poskusne mešanice	Anox.H2O (mL)	Biomasa (mL)	Fosf.pufer (mL)	Glc (g)	Buče (g)	Mz5	Avtok. Mz5
NK	382	98	20				
ST	382	98	20	0,187			
B	367	98	20		15		
B+Mz5	367	98	20		15	50mL cent.k.	
B+aMz5	367	98	20		15		50mL cent.k.
P.Mz5	250+117	98	10+10		15	50mL cent.k.	
P.aMz5	250+117	98	10+10		15		50mL cent.k.

NK = negativna kontrola, ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

3.9.6 Izvedba poskusa

Priprava mešanic v litrskih bioreaktorjih je potekala dva zaporedna dneva. Prvi dan smo pripravili mešanice, v katerih je potekala predobdelava (oznake P.Mz5 in P.aMz5). Steklenice smo napolnili s polovičnim volumnom deoksigenirane vode (250 mL), polovičnim volumnom fosfatnega pufra (10 mL) in substratom (15 g buč). V vse smo dodali še pelet, ki je ostal po centrifugiranju 50 mL kulture *P. xylanivorans* Mz5, ki smo jo predhodno nagojili kot je opisano v poglavju 3.4. V steklenice P.Mz5 smo dodali živo kulturo, v steklenice z oznako P.aMz5 pa avtoklavirano kulturo kot kontrolo prvim. Vse steklenice smo 20 minut preprihovali z dušikom, s čimer smo zagotovili anaerobne pogoje. Preko noči smo jih inkubirali pri 37 °C in s stresanjem 120 rpm. Vrata inkubatorja (Unitron) smo zatemnili z aluminijasto folijo,

Naslednji dan smo v steklenice v katerih je potekala predobdelava dodali še 10 mL fosfatnega pufra, mikrobnno biomaso (98 mL) in dopolnili z deoksigenirano vodo do 500 mL. Mešanice smo ponovno preprihovali 20 minut z dušikom. Po enakem postopku smo pripravili tudi vse ostale poskusne mešanice (Preglednica 4) in jih 20 minut preprihovali z dušikom. Vse poskusne mešanice smo pripravili v treh ponovitvah. Iz vseh 21 steklenic smo vzeli 10 mL vzorca za dan 0 in pomerili pH. Naslednjih 33 dni smo steklenice inkubirali v temi pri 37 °C in z mešanjem 120 rpm.



Slika 7: Priprava testnih mešanic – prepihanje z dušikom.



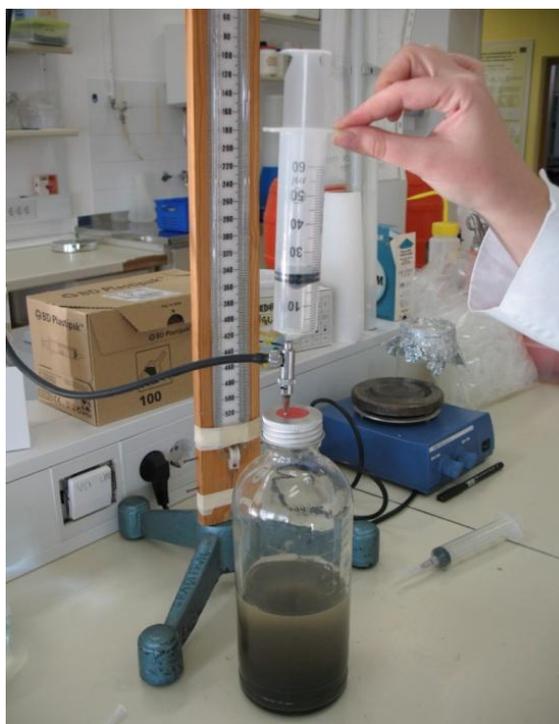
Slika 8: Testne steklenice v testu BMP med 33 dnevno inkubacijo v temi pri 37 °C in 120 rpm.

3.9.7 Odvzem in analiza vzorcev

Prvi in zadnji dan poskusa smo v vseh steklenicah pomerili pH (poglavje 3.8) in odvzeli vzorce za določitev suhe in organske snovi ter KPK. Vzorce smo do izvedbe analize shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analizirali smo jih po postopkih, ki sta opisana v poglavjih 3.5 (KPK) in 3.6 (SS in OS). Vsebnost kratkoveržnih maščobnih kislin smo določili na dan 0, 1, 4, 7, 16, 22 in 33. Postopek je natančno opisan v poglavju 3.7. Meritve količine proizvedenega bioplina in njegove sestave smo merili na dan 1, 2, 4, 7, 12, 16, 22, 28 in 33.

3.9.7.1 Merjenje volumna nastalega bioplina

Količino proizvedenega bioplina smo merili z vodnim stolpcem, glede na razliko tlaka v steklenicah (Hansen in sod., 2004). Meritev je potekala tako, da smo iglo potisnili skozi gumijasti zamašek posamezne steklenice. Iгла je bila pritrjena na plastično brizgo, ta pa na cevko vodnega stolpca. Nastali bioplin smo odvzeli z brizgo do izenačitve tlaka s pomočjo vodnega stolpca. Izmerjeni volumen bioplina smo zabeležili, nato pa smo brizgo iztaknili iz gumijastega zamaška in s cevke vodnega stolpca ter jo izpraznili. Med poskusom smo volumne novonastalega bioplina v posameznih mešanicah seštevali, da smo dobili podatke za celotni volumen proizvedenega bioplina. Ker nas je zanimala samo količina bioplina, ki je nastala na račun substrata, smo od meritev testnih mešanic odšteli meritve negativne kontrole. Volumen bioplina, ki je nastal v negativni kontroli, je nastal na osnovi zaloge organske snovi v mikrobnii biomasi.



Slika 9: Merjenje nastalega volumna bioplina z vodnim stolpcem in brizgalko.

3.9.7.2 Merjenje sestave nastalega bioplina

Sestavo nastalega bioplina smo merili s plinskim kromatografom Shimadzu 14A z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD). Ločevanje plinov je potekalo na jekleni koloni dolžine 4 metrov, premera 1/8" in s polnilom PORAPAK Q (Agilent, ZDA). Nosilni plin je bil helij, pretok pa je znašal 25 mL/min.

Temperatura injektorja je bila 50 °C, temperatura kolone 25 °C, temperatura detektorja 80 °C in temperatura detektorskega bloka 80 °C. Realni tok na detektorju je bil 60 mA. Za kalibracijo kromatografa smo uporabili standardno mešanico plinov (vbrizgano 100 µL) v sestavi: 15,7% H₂, 18,7% N₂, 20,5% CH₄ in 45,1% CO₂. Za izpis podatkov smo uporabili integrator Chromatopac C-R6A (Shimadzu, Japonska). Na dan vzorčenja smo s plinotesno brizgalko odvzeli 100 µL vzorca in ga vbrizgali v injektor.

Izmerjene koncentracije metana smo standardizirali s pomočjo splošne plinske enačbe, kar pomeni da smo upoštevali tlak in temperaturo v času merjenja.

$$CH_4 \% st. = \frac{P_x * V_x * T_0}{T_x * P_0}$$

... (3)

T₀ ... standardna temperatura (273 K)

P₀ ... standardni tlak (1013,25 hPa)

P_x ... tlak v prostoru (hPa)

T_x ... temperatura v prostoru (K)

V_x ... izmerjeni % CH₄

Podatke o povprečnem zračnem tlaku za posamezni dan smo pridobili s spletne strani Agencije Republike Slovenije za okolje (ARSO, 2015).

S pomočjo splošne plinske enačbe smo tako standardizirali izmerjene odstotke metana v bioplino. Glede na celotni volumen bioplina, smo nato odstotke metana pretvorili v mL.

3.9.7.3 Izplen metana

Izplene metana smo v našem poskusu preračunali po enačbi 4, glede na teoretični izplen metana, ki znaša 350 mL na 1 g KPK substrata (Dublein in Steinhauser, 2008).

$$CH_4 (\%) = \frac{V * 100}{350 mL}$$

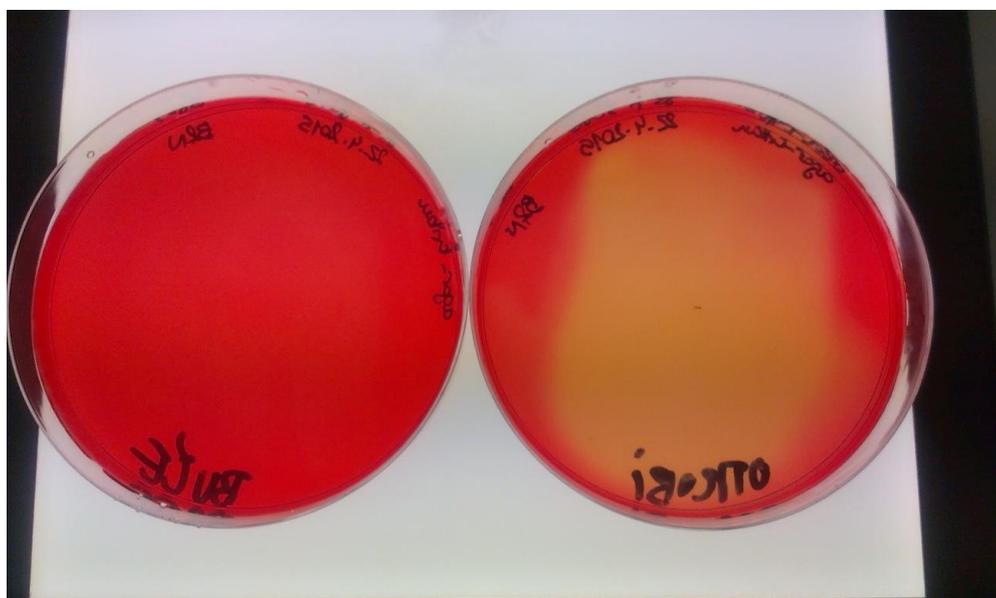
... (4)

V – volumen metana na 1 g KPK substrata (mL)

4 REZULTATI

4.1 ANALIZE PRED POSKUSOM

Z barvanjem s Kongo rdečim smo želeli pokazati, da so buče kot substrat sposobne inducirati ksilanazno aktivnost seva *P. xylanivorans* Mz5. Celice *P. xylanivorans* Mz5, ki smo jih dodali v naše poskusne mešanice, so bile vzgojene na gojišču M330, ki ne vsebuje ksilana, zato ni bilo predhodne indukcije ksilanazne aktivnosti. Rezultati barvanja s Kongo rdečim so pokazali, da buče inducirajo ksilanaze, vendar precej slabše kot otrobi, ki po sestavi vsebujejo več ksilana kot buče. Čeprav je na Sliki 10 slabo vidno, je do rahlega razbarvanja oziroma zbistritve prišlo tudi na plošči, kjer smo kot substrat uporabili bučno pulpo (levo).

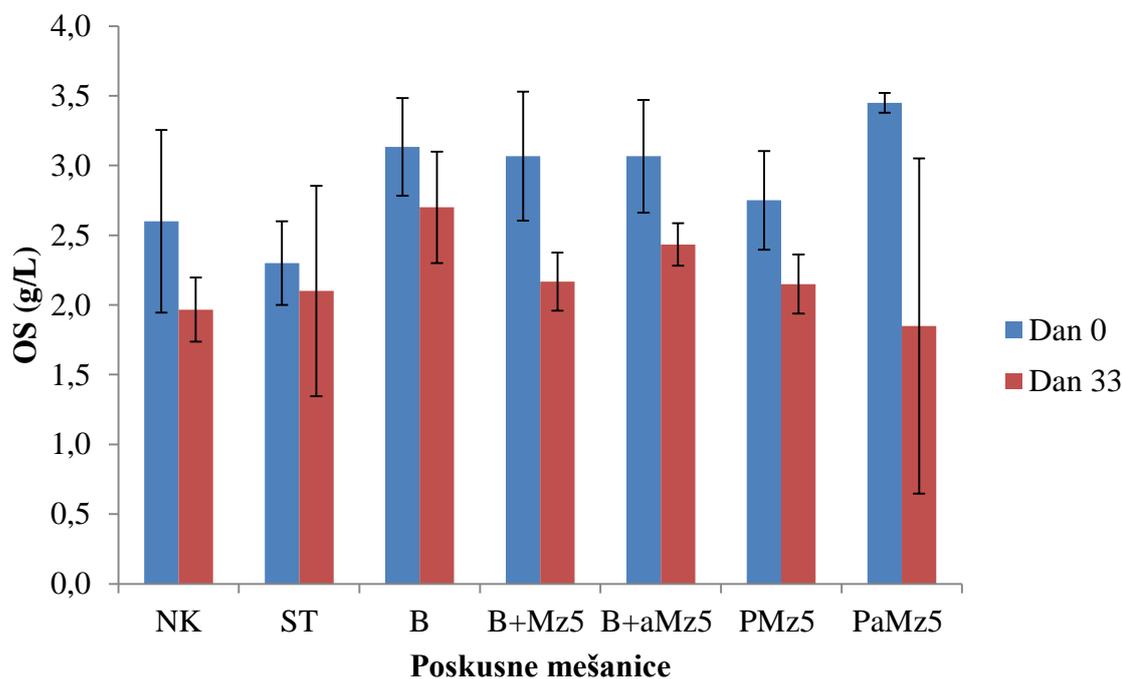


Slika 10: Vpliv buč (levo) in otrobov (desno), ki ju uporabimo kot substrat, na ksilanazno aktivnost *P. xylanivorans* Mz5.

4.2 BIOMETANSKI POTENCIAL BUČNE PULPE Z UPORABO BIOAUGMENTACIJE

4.2.1 Suha in organska snov

Vsebnost OS smo v poskusnih mešanicah določili na začetku (dan 0) in na koncu poskusa (dan 33) (Slika 11). Ugotovili smo, da se je v vseh poskusnih mešanicah količina OS zmanjšala.



NK = negativna kontrola, ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Slika 11: Sprememba količine organske snovi (g/L) v poskusnih mešanicah glede na prvi in zadnji dan poskusa.

4.2.2 Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)

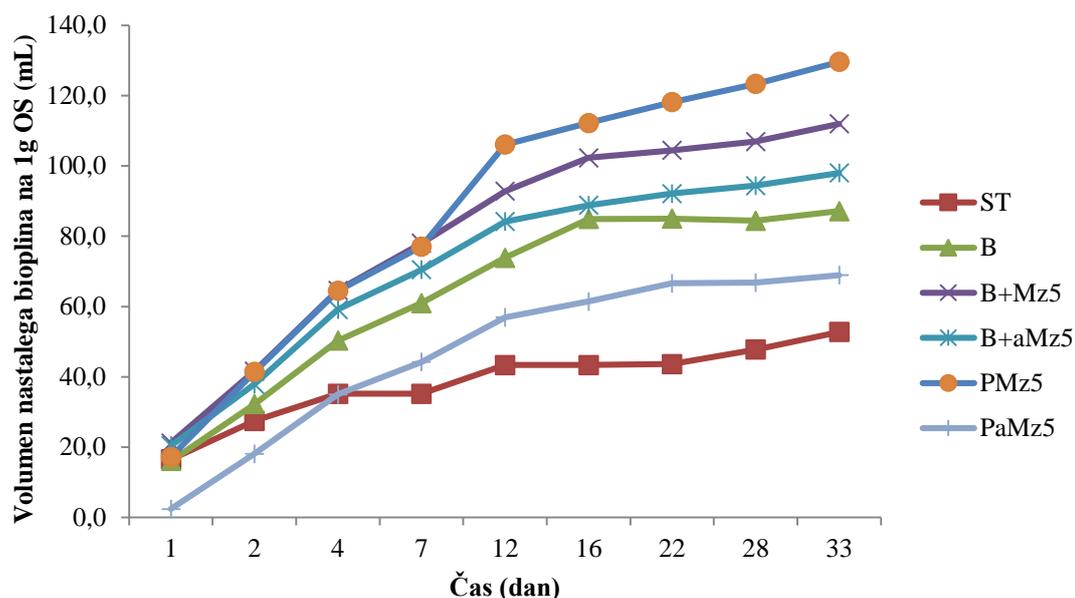
Z določanjem koncentracij kratkoverižnih maščobnih kislin, ki so vmesni produkt anaerobne razgradnje, smo med poskusom spremljali potek anaerobne fermentacije. V vzorcih smo največkrat zaznali očetno kislino, ki je tudi najbolj zastopana kratkoverižna maščobna kislina. Proti koncu poskusa se je koncentracija očetne kisline in celokupna koncentracija KMK v mešanicah zmanjševala.

V poskusu smo na dan začetka poskusa (dan 0) izmerili največ 332 mg/L KMK v mešanicah oz. največ 159 mg/L očetne kisline. Zadnji dan poskusa (dan 33) je bila najvišja vrednost celokupnih KMK le še 50mg/L, najvišja vrednost očetne kisline v mešanicah pa le 32 mg/L. Poleg očetne kisline so se v posameznih vzorcih in le na posamezne dneve pojavile tudi druge KMK (propionska, maslena, izo-maslena, valerenska, izo-valerenska, kapronska kislina), vendar v nižjih koncentracijah kot očetna kislina. Le izjemoma se je pojavila višja koncentracija propionske kisline. V povprečju pa ni nobena druga kislina preseгла koncentracije 50 mg/L.

Koncentracije KMK so bile nizke že ob začetku poskusa in se tekom poskusa niso kopičile, kar dokazuje, da ni prišlo do inhibicije procesa. Koncentracije KMK so zanemarljivo majhne, zato so podatki prikazani v Prilogi A.

4.2.3 Volumen nastalega bioplina

Proizvodnja bioplina je bila najbolj intenzivna v prvih 12-ih (Slika 12) dneh poskusa, nato pa je počasi naraščala do 33. dne, ko smo poskus zaključili. Najmanj bioplina je proizvedla standardna mešanica (ST) (53 mL na 1 g OS), največ pa mešanica, kjer smo bučno pulpo predobdelali z dodanim živim sevom *P. xylanivorans* Mz5 (PMz5) (130 mL na 1 g OS). Poskusne mešanice se gibljejo v intervalu 53 – 130 mL bioplina na 1 g organske snovi. Med poskusnimi mešanicami je najmanj bioplina proizvedla negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5 (PaMz5).



ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Slika 12: Volumen nastalega bioplina 1 g OS substrata (mL).

4.2.4 Skupna produkcija metana

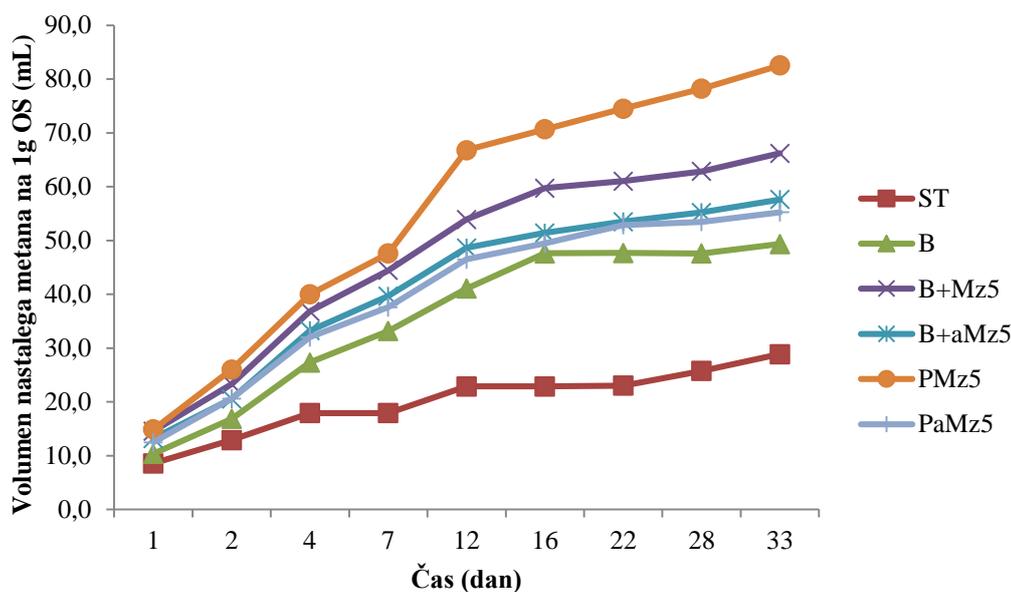
Enako kot pri proizvodnji bioplina, je bila proizvodnja metana največja v prvih 12-ih dneh, nato je počasi naraščala do 33. dne oz. do konca poskusa (Slika 13). Poleg volumna nastalega metana na 1 g OS substrata, je pomemben delež metana v bioplinu. Proces poteka optimalno, kadar je ta delež okrog 60 – 65 %. V našem poskusu je bil zadnji dan povprečni delež metana v bioplinu 69,4 % (Preglednica 5).

Preglednica 5: Povprečni deleži metana (%) v bioplinu posameznih poskusnih mešanic na zadnji dan poskusa.

Poskusne mešanice	Povprečni deleži metana v bioplinu (%)
ST	67,7
B	68,1
B+Mz5	69,9
B+aMz5	69,8
P.Mz5	72,5
P.aMz5	74,2

ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Proizvodnja je bila najnižja v standardni mešanici (ST), kjer je skupno nastalo 29 mL metana na 1 g OS substrata, vendar je bila v standardni mešanici tudi obremenitev nižja, in sicer 0,2 g KPK/1 g OS substrata (Poglavje 3.9.5). Med testnimi mešanicami je najmanj metana nastalo pri samih bučah (49 mL metana na 1 g OS substrata). Največ proizvedenega metana, in sicer 83 mL metana na 1 g OS substrata, smo izmerili v poskusni mešanici, kjer smo substrat predobdelali z živim sevom *P. xylanivorans* Mz5 (PMz5). V negativni kontroli predobdelave z živim sevom *P. xylanivorans* Mz5 (PaMz5) je nastalo samo 55 mL metana na 1 g OS substrata. V poskusni mešanici, kjer je potekala bioaugmentacija (B+Mz5) je nastalo 66 mL metana na 1 g OS substrata, medtem ko v njeni kontroli (B+aMz5) 58 mL metana na 1 g OS substrata. Trend proizvodnje metana je bil enak v vseh poskusnih mešanicah.



ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelavi z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Slika 13: Volumen nastalega metana (mL) na 1 g OS substrata.

Preračunali smo tudi, koliko metana bi pridobili iz 1 kg oz. iz 1 tone buč. Pri tem smo upoštevali rezultate predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, kjer je bila produkcija metana največja (83 mL/1 g OS). V steklenice smo zatehtali po 15 g buč oz. 0,64 g OS, 1 g OS bi predstavljal 23,4 g buč. Iz tega lahko izračunamo, da bi iz 1 kg bučne pulpe lahko proizvedli približno 3,5 L metana. Iz 1 tone buč pa bi proizvedli 3547 L oz. 3,5 m³ metana.

4.2.5 Izplen metana

Izplen metana se računa glede na KPK dodanega substrata. Z upoštevanjem KPK dodanega substrata, smo izračunali koliko metana je nastalo na 1 g KPK substrata. Standardno mešanico smo obremenili z 0,2 g KPK substrata na 1 g OS biomase, preostale poskusne mešanice pa z 0,5 g KPK substrata na 1 g OS biomase. Pri tem smo upoštevali še KPK, ki ga je v mešanico prispevalo 50 mL centrifugirane kulture *P. xylanivorans* Mz5. Pri izračunu smo upoštevali teoretično vrednost za KPK mikroorganizmov, ki znaša 1,22g KPK/g mikroorganizmov. V našem primeru je bil doprinos mikroba 0,0195 g KPK. Pri izračunu izplena metana smo upoštevali teoretično vrednost, da iz 1 g KPK nastane 350 mL metana (Deublein in Steinhauser, 2008). Rezultati so prikazani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Volumen nastalega metana na 1 g KPK substrata in izplen metana.

Mešanica	g KPK substrata/1 g OS biomase	V CH ₄ skupen (mL)	V CH ₄ na 1 g KPK (mL)	Izplen CH ₄ (%)*
ST	0,2	64	318	91
B	0,5	156	313	89
B+Mz5	0,5195	203	391	112
B+aMz5	0,5195	176	339	97
P.Mz5	0,5195	189	363	104
P.aMz5	0,5195	209	402	115
Teoretičen			350	100

*Izplen metana izračunan glede na dejansko proizvodnjo metana na 1 g KPK substrata v bioreaktorjih 33. dan in teoretično maksimalno možno proizvodnjo metana.

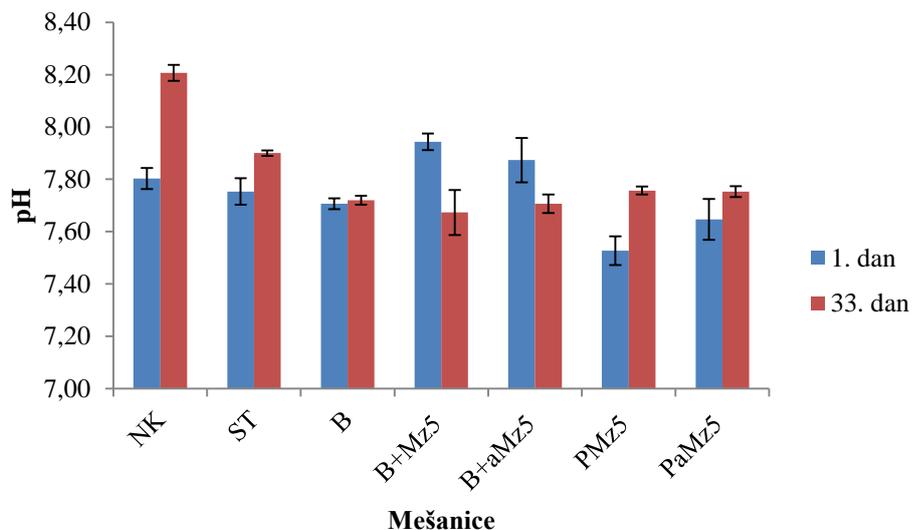
ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

4.2.6 Povečanje kumulativne proizvodnje bioplina in metana

Rezultati predstavljeni v poglavju 4.2.4 kažejo, da tako bioaugmentacija kot predobdelava z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5 pozitivno vplivata na proizvodnjo bioplina in metana. Glede na poskusno mešanico, ki je vsebovala samo buče, se je kumulativna produkcija bioplina v poskusnih mešanicah, kjer je potekala bioaugmentacija z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5 povečala za 29 %. V poskusnih mešanicah, kjer je potekala predobdelava z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, pa se je kumulativna produkcija bioplina povečala za 49 %. Komulativna produkcija metana pa se je pri bioaugmentaciji s *P. xylanivorans* Mz5 povečala za 35 % in za kar 69 % pri predobdelavi s *P. xylanivorans* Mz5.

4.2.7 Gibanje pH vrednosti med testom BMP

Tekom poskusa so bile vrednosti pH v optimalnem območju in se niso spreminjale. V začetku poskusa smo izmerili pH vrednosti med 7,63 in 7,94, ob koncu poskusa pa so se vrednosti gibale med 7,71 in 8,21 (Slika 14). Vrednosti kažejo, da do zakisanosti, ki bi zavirala proizvodnjo bioplina, ni prišlo.



NK = negativna kontrola, ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelave z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5

Slika 14: pH vrednosti na prvi in zadnji dan poskusa pri posameznih mešanicah .

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Oljne buče gojijo predvsem za proizvodnjo bučnih semen za prehrano ljudi in bučnega olja. Bučna pulpa se lahko v zreli fazi uporablja tudi v prehrani živali, predvsem v prehrani prašičev. S prehranskega vidika je konzumacija bučne pulpe lahko problematična, saj se proces oksidacije in s tem kvarljivosti prične že po nekaj urah. Tako preostanek buč po proizvodnji bučnega olja predstavlja kar 97 % odpadnega organskega materiala, ki večinoma obleži na poljih, kjer se počasi razgradi. Ena izmed rešitev koristne uporabe odpadnih buč je njihova uporaba kot surovina za proizvodnjo bioplina.

Bučno pulpo, poleg preostalih, lažje dostopnih ogljikovih hidratov, sestavljajo tudi lignocelulozne komponente, ki so težko razgradljive in zato posledično pogosto ostanejo neizkoriščene. Za boljši izkoristek je tako potrebno razgraditi lignocelulozo na enostavnejše komponente, ki so vir hranil za mikrobnou združbo in s tem substrat za proizvodnjo bioplina. Na voljo je veliko postopkov predobdelav in obdelav lignoceluloznih substratov. Najpogostejše so fizikalno-kemijske in biološke. Le redke so se razvile v tehnološko uporabne procese. Tako govorimo o različnih metodah predobdelave in bioaugmentaciji.

Bioaugmentacija je med raziskovalci vse pogosteje uporabljena metoda. Peng in sod. (2014) so s celulitično anaerobno bakterijo *Clostridium cellulolyticum* pospešili hidrolizo pšenične slame in s tem izboljšali proizvodnjo metana do 13 %. O povišani proizvodnji metana poročata tudi Hu in Yu (2005), ki sta koruzne ostanke inkubirala s suspenzijo iz vampa kože (naravna mikrobnou združba, ki je sposobna razgraditi lignocelulozo). Zhang in sod. (2015), ki so prav tako delali na koruzi, so s pomočjo bioaugmentacije z *Acetobacteroides hydrogenigenes* uspeli povečati proizvodnjo metana za 19 – 23 %.

V našem primeru smo se odločili za bioaugmentacijo s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5, ki je uspešen pri razgradnji več različnih polisaharidov, še posebej pri razgradnji ksilana (Kopencny in sod., 2003; Zorec in sod., 2014). Odločili smo se na podlagi sestave buč, saj je v bučah ksiloglukan glavna komponenta hemiceluloze v primarni celični steni (Košťálová in sod., 2008). Poleg tega je velika prednost *P. xylanivorans* Mz5, da krajša izpostavljenost kisiku ne vpliva nanj in je v anaerobnih razmerah sposoben popolne regeneracije (Kopencny in sod., 2003).

Ksilanazne so inducibilni encimi in se izražajo v prisotnosti ksilana, zato smo morali ugotoviti ali so buče substrat, ki inducira ksilanazno aktivnost pri *P. xylanivorans* Mz5. Izvedli smo predhodno analizo, kjer smo gojili *P. xylanivorans* Mz5 na pšeničnih otrobih, ki zagotovo vsebujejo dovolj ksilana za indukcijo, in na bučni pulpi. Po barvanju s Kongo

rdečim in razbarvanju, smo ugotovili, da tudi bučna pulpa inducira ksilanaze, vendar precej slabše kot pšenični otrobi (Slika 11).

Iz predhodnih raziskav (Čater, 2015) izhaja, da je obstojnost *P. xylanivorans* Mz5 v nekaterih poskusnih mešanicah za proizvodnjo bioplina relativno slaba. Z metodo qPCR oz. z izračuni količine genomske DNA so v teh eksperimentih dokazali, da količina vnesene bakterije *P. xylanivorans* Mz5 v prvih treh dneh upade skoraj za polovico, po šestih dneh je prisotna le še desetina vnesene kulture, deseti dan pa je že ni več moč dokazati (Čater, 2015). Volumen *P. xylanivorans* Mz5, ki ga dodamo v poskusne mešanice je relativno majhen glede na dodano mikrobnno biomaso, ki je odgovorna za proizvodnjo bioplina. V tako definirani mikrobnni združbi je *P. xylanivorans* Mz5 kot tujek izpostavljen veliki kompeticiji in ni presenetljivo, da verjetno zaradi nekonkurenčnosti po določene času izgine. Da bi kar najbolje izkoristili njegov potencial, smo mu dali časovno prednost. To pomeni, da smo poleg bioaugmentacije, kjer smo substrat, mikrobnno biomaso in sev *P. xylanivorans* Mz5 inkubirali istočasno, pripravili tudi poskusne mešanice za predobdelavo. Predobdelavo substrata smo izvedli tako, da smo dan pred začetkom bioplinske produkcije skupaj inkubirali le bučno pulpo in sev *P. xylanivorans* Mz5. S tem smo *P. xylanivorans* Mz5 za 24 ur zagotovili nekompetitivno okolje, kar mu je omogočilo rast in razmnoževanje na bučni pulpi in njeno potencialno hidrolizo.

Med pregledom znanstvene literature smo zasledili samo eno podobno raziskavo. Peng in sod. (2014) so preverili vpliv bioaugmentacije na proizvodnjo bioplina iz pšenične slame. V svoji raziskavi so uporabili *Clostridium cellulolyticum* na dva načina: Strategija 1 in Strategija 2. V Strategiji 1 so izbrano bakterijo 24 ur gojili na definiranim gojišču s celobiozo kot virom ogljika. Kulturo so nato dodali pšenični slami (substrat) in metanogenemu mikrobnemu inokulumu za izvedbo testa BMP. Pri Strategiji 2 so 60 ur *C. cellulolyticum* gojili na podobnem gojišču, le da je bila tokrat vir ogljika pšenična slama. Vse skupaj so nato dodali preostalemu inokulumu za test BMP. V večini raziskovalci pri tovrstnih raziskavah preverjajo le eno izmed strategij. Naša raziskava pa je vključevala obe strategiji. Na istem substratu smo preverili vpliv *P. xylanivorans* Mz5, ko ga dodamo sočasno z metanogeno mikrobnno biomaso ter vpliv predobdelave bučne pulpe s *P. xylanivorans* Mz5 na produkcijo bioplina.

Dokazali smo, da bakterija *P. xylanivorans* Mz5 poveča produkcijo bioplina oz. metana (Slika 12, Slika 13). Najbolj je produkcijo bioplina povečala predobdelava bučne pulpe s *P. xylanivorans* Mz5 (P.Mz5) in sicer za 49 %. Rezultati dokazujejo, da je bakterija *P. xylanivorans* Mz5 v fazi predobdelave hidrolizirala določeno količino hemiceluloze in celuloze v bučni pulpi. S tem je bil zagotovljen lažji dostop do hranil metanogeni združbi, kar se kaže v povečani proizvodnji bioplina. Tudi bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5 (B+Mz5), je povečala proizvodnjo bioplina, vendar manj kot predobdelava bučne pulpe

(povečanje za 29 %). Ti rezultati dokazujejo, da *P. xylanivorans* Mz5 pozitivno vpliva na proizvodnjo bioplina iz bučne pulpe, zlasti kadar ni izpostavljen kompeticiji.

Pri proizvodnji bioplina je pomemben odstotek metana, saj ima višjo kalorično vrednost (Deublein in Steinhauser, 2008). V naši raziskavi se je izkazalo, da je predobdelava bučne pulpe s *P. xylanivorans* Mz5 povzročila za kar 69 % večjo produkcijo metana v primerjavi s produkcijo metana iz neobdelane bučne pulpe. Bioaugmentacija s *P. xylanivorans* Mz5 je povzročila 35 % večjo proizvodnjo metana v primerjavi s proizvodnjo metana iz neobdelane bučne pulpe. Poskusne mešanice z dodanimi avtoklaviranimi bakterijami, so proizvedle nekoliko več metana (12 – 18 %) kot poskusne mešanice, ki so vsebovale zgolj buče, kar je najverjetneje posledica razpadlih avtoklaviranih celic, ki so postale substrat za proizvodnjo bioplina.

Znanstveni viri, ki smo jih navedli v začetku razprave (Peng in sod. (2014), Hu in Yu (2005), Zhang in sod. (2015)) poročajo o okoli 20 % višji proizvodnji metana v primeru bioaugmentacije, vendar je razlika v tem, da so bile te raziskave narejene na izrazito lignoceluloznih substratih. Zelo malo raziskav zasledimo na substratih, ki so po sestavi podobni bučam, torej da prevladujeta pektin in hemiceluloza. Weiß in sod. (2009) pa so se v svojih raziskavah osredotočili prav na hemicelulozo (ksilan) in dodajanje hemicelulolitičnih bakterij (mešana združba: *Bacteroides* sp., *Clostridium* sp., *Azospira* sp.), s čimer so dosegli od 60 do 70 % višjo proizvodnjo bioplina. *P. xylanivorans* Mz5, ki smo ga uporabili mi, s svojo visoko ksilanazno aktivnostjo sodi med hemicelulolitične bakterije, kar se po vsej verjetnosti odraža v visoki stopnji hidrolize bučne pulpe in posledično v 69 % višji produkciji metana. V raziskavi Peng in sod. (2014) so prav tako potrdili pozitiven vpliv bioaugmentacije na proizvodnjo metana, povečala se je za okoli 13 %. Raziskave so pokazale, da je *C. cellulolyticum* ena izmed 40 najpogosteje dokazanih bakterijskih vrst v metanogeni mikrobnih biomasah. Verjetno je dodatek *C. cellulolyticum* v začetku poskusa, močno povečal gostoto te bakterije in je s tem postala ena najbolj zastopanih vrst v združbi, kljub temu pa se produkcija metana ni povečala za toliko kot v naši raziskavi z bakterijo *P. xylanivorans* Mz5.

Na stabilnost bioplinskega procesa vplivajo številni parametri, zato smo med drugim med poskusom spremljali proizvodnjo kratkoveržnih maščobnih kislin, ki so vmesni produkti anaerobne fermentacije. Vsako kopičenje KMK kaže na neuravnoteženost procesa in lahko vodi v inhibicijo procesa (Adorno in sod., 2014; Chasnyk in sod., 2015). V vzorcih je bilo prisotne največ očetne kisline, vendar pa se je med poskusom njena koncentracija zniževala, kot tudi celokupna koncentracija KMK (Priloga A). Iz tega lahko sklepamo, da je proces potekal optimalno. Kopičenje KMK se neposredno odraža v pH vrednostih. V kolikor bi acidogeneza potekala hitreje kot metanogeneza, bi prišlo do kopičenja KMK (Slika 1). Več ko je prisotnih kislin, nižji je pH, kar deluje zavirajoče na metanogene mikroorganizme, zato se proces ustavi. Optimalen pH se giblje od 6,7 do 7,5 (Deublein in

Steinhauser, 2008). V našem poskusu so se pH vrednosti gibale med 7 in 8, kar kaže na stabilne pogoje za proizvodnjo bioplina (Slika 14).

Rezultati poskusov na laboratorijskem nivoju običajno niso direktno prenosljivi na pilotni in industrijski nivo. Pri večjih volumnih se srečujemo s težavi kot so visoki tlaki, viskoznost, neustrezno mešanje ... (Zhang in sod., 2011). V naši raziskavi smo poskušali zagotoviti razmere, ki bi bile kar se da dober približek industrijskim razmeram. V industrijskem merilu bi v bioreaktorje dali bučno pulpo v obliki večjih kosov, zato smo se odločili, da bomo buče v laboratorijski raziskavi zgolj naribali in ne zmleli. Kasneje se je to izkazalo kot ovira pri vzorčenju oz. pri analizah KPK in določanju OS, saj rezultati niso bili vedno pokazatelji realnega stanja v poskusnih mešanicah in so otežili pravilen izračun nekaterih bioplinskih parametrov.

Z upoštevanjem KPK vrednosti substrata (bučne pulpe), smo izračunali praktični izplen metana v različnih poskusnih variantah naše raziskave. Pri tem smo upoštevali, da teoretično iz 1 g KPK nastane 350 mL metana, če bioplinski proces teče optimalno (Deublein in Steinhauser, 2008). Naši rezultati kažejo na dober potek procesa, saj se volumni metana, ki so nastali na 1 g KPK gibljejo med 313 in 402 mL (Preglednica 6). Izplen metana se med mešanicami ne razlikuje pomembno (89 – 115%). Rezultati, ki so višji od 100 % so najverjetneje posledica eksperimentalnih napak. Rezultati raziskave kažejo na to, da so buče odličen substrat za proizvodnjo bioplina, z bioaugmentacijo s *P. xylanivorans* Mz5 in biološko predobdelavo pa smo še povečali izplen bioplina oz. metana iz tega substrata. S tem smo najverjetneje izkoristili potencial bučne pulpe za proizvodnjo bioplina. Vendar pa je prenos te metode na industrijski nivo potrebno tudi ekonomsko upravičiti.

Gojišče M330 na katerem smo gojili *P. xylanivorans* Mz5 namreč vsebuje kvasni ekstrakt, celobiozo in druga hranila, ki predstavljajo velik strošek, enako velja za avtoklaviranje gojišča. Dodaten bioreaktor bi prav tako podražil postopek (Peng in sod., 2014). Drugi problem je neobstojnost *P. xylanivorans* Mz5 v bioreaktorju, kar bi morda lahko rešili v večkratno inokulacijo. Martin–Ryals in sod. (2015) so s svojo raziskavo uspeli dokazati, da večkratno dodajanje hidrolitske bakterije izboljša hidrolizo substrata in poveča produkcijo metana. Zaradi večje produkcije metana in manjše količine odpada (stroški odvoza in uničenja), naj bi bil tak postopek ugoden tudi s finančnega vidika.

5.2 SKLEPI

- Bioaugmentacija bučne pulpe s *P. xylanivorans* Mz5 je uspešna metoda za boljšo produkcijo bioplina in večji izplen metana.
- Bioaugmentacija poveča proizvodnjo bioplina do 29 % in proizvodnjo metana do 35 %.
- Predobdelava bučne pulpe s hidrolitskimi bakterijami *P. xylanivorans* Mz5 je še bolj povečala proizvodnjo bioplina oz. metana kot bioaugmentacija.
- Predobdelava je povečala proizvodnjo bioplina do 49 % in proizvodnjo metana do 69 %.

6 POVZETEK

V zadnjih letih potreba po alternativnih virih energije intenzivno narašča, saj so neobnovljivi viri energije vse bolj izčrpani, pogosto pa tudi glavni izvor onesnažil. Vir alternativne energije je tudi bioplin. Bioplin med drugim sestavlja tudi metan, ki je visokoenergetska spojina in nam s tem omogoča sproizvodnjo toplotne, hladilne in električne energije. Ni presenetljivo, da se zadnja leta vse več raziskovalcev posveča proizvodnji bioplina, optimizaciji procesa in povišanju izkoristkov.

Substrat za proizvodnjo bioplina je organski material. V ta namen izkoriščajo tudi visokoenergetske rastline, vse bolj pa se usmerjajo k uporabi odpadnega materiala in lignoceluloznih substratov, ki pa so težko razgradljivi. V našem poskusu smo kot substrat uporabili bučno pulpo, ki ostaja na poljih, saj se za pridobivanje bučnega olja izkoriščajo zgolj bučna semena. Buče vsebujejo veliko pektina in hemiceluloznih polisaharidov, prisotna pa sta tudi lignin in celuloza.

Bioplin nastaja v procesu anaerobne fermentacije, ki jo vrši kompleksna mikrobná združba. Ozko grlo tega kompleksnega sistema je zelo pogosto hidroliza oz. razgradnja kompleksnih substratov do lažje dostopnih hranil. Da bi substrate čimbolj izkoristili jih lahko fizikalno, kemično ali biološko obdelamo. Fizikalna in kemična predobdelava sta energetsko zahtevni in pogosto škodljivi za okolje, zato je vedno več pozornosti deležna biološka predobdelava in bioaugmentacija.

V našem primeru smo se odločili za biološko predobdelavo in bioaugmentacijo z anaerobno bakterijo *P. xylanivorans* Mz5, ki ima visoko ksilanolitično aktivnost in preživi krajšo izpostavljenost kisiku. S testom BMP smo ugotavljali, kako predobdelava in bioaugmentacija vplivata na povečanje proizvodnje bioplina. Pri predobdelavi smo bučno pulpo in *P. xylanivorans* Mz5 inkubirali 24 ur in potem dodali še mikrobnó biomaso. V drugem načinu pa smo mikrobnó biomaso z dodanim substratom na dan začetka poskusa bioaugmentirali s *P. xylanivorans* Mz5. Pripravili smo tudi ustrezne kontrole z avtoklaviranim *P. xylanivorans* Mz5. Vse poskusne mešanice smo obremenili z 0,5 g KPK/1 g OS biomase.

Na začetku in na koncu poskusa smo izmerili pH vrednost in vsebnost KPK ter OS. Med poskusom smo redno merili volumen nastalega bioplina, delež nastalega metana in vsebnost KMK. Rezultati kažejo, da je naš poskus tekel optimalno, saj so bile koncentracije KMK zanemarljivo majhne, pH vrednosti pa so se v začetku in koncu poskusa gibale med 7 in 8.

Glede na izmerjene volumne bioplina in metana, se je izkazalo, da je bioaugmentacija bučne pulpe s *P. xylanivorans* Mz5 povečala produkcijo in izplen bioplina (do 35 % večja

produkcija). Zlasti učinkovita je bila predobdelava (do 69 % povečan izplen metana), saj smo v tem primeru *P. xylanivorans* Mz5 za 24 ur zagotovili nekompetitivno okolje. V poskusnih mešanicah, kjer ni potekala predobdelava, smo namreč dodali majhen delež *P. xylanivorans* Mz5 (5 vol %) v kompleksno in strogo definirano mikrobno združbo. V takem okolju se sev ni bil sposoben obdržati dlje časa. Predhodne raziskave kažejo, da po prvih treh dneh njegova koncentracija pade za polovico, deseti dan pa sev praktično ni več prisoten.

Vsekakor pa je prenos te metode potrebno tudi ekonomsko upravičiti. Gojenje *P. xylanivorans* Mz5 na definiranem gojišču, avtoklaviranje in dodaten bioreaktor predstavljajo dodaten strošek v proizvodnji bioplina.

7 VIRI

- Adorno M. A. T., Hirasawa S. J., Varesche M. B. A. 2014. Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry*, 5: 406-414
- Ahring K. B. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 81: 1-30
- ARSO. 2015. Arhiv - opazovani in merjeni meterološki podatki po Sloveniji. <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive> (maj-avgust, 2015)
- Bryant M. P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324–1328
- Chasnyk O., Solowski G., Shkarupa O. 2015. Historical, technical and economic aspects of biogas development: Case of Poland and Ukraine. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52: 227-239
- 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. 2015. Optimizacija proizvodnje bioplina iz lignoceluloznega substrata z granulirano anaerobno biomaso iz UASB bioreaktorja. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 156 str.
- Čater M., Fanel L., Malovrh Š., Marinšek-Logar R. 2015. Biogas production from brewery spent grain enhanced by bioaugmentation with hydrolytic anaerobic bacteria. *Bioresource Technology*, 186: 261-269
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from waste and renewable resources: An introduction. Weinheim, Wiley: 443 str.
- Fey A. in Conra, A. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow on the archeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4790–4797

- Hansen T. L., Schmidt J. E., Angelidaki I., Marca E., Jansen J., Mosback H., Christensen T. H. 2004. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Management*, 24: 393-400
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100: 10-18
- Hu Z., Yu H. 2005. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. *Process Biochemistry*, 40: 2371-2377
- Ko J.J., Shimizu Y., Ikeda K., Kim S.K., Park C.H., Matsui S. 2009. Biodegradation of high molecular weight lignin under sulfate reducing conditions: lignin degradability and degradation by-products. *Bioresource Technology*, 100: 1622–1628
- Kopečný J., Zorec M., Mrázek J., Kobayashi Y., Marinšek-Logar R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 201-209
- Koštalová Z., Hromádková Z., Ebringerová A. 2008. Chemical evaluation of seeded fruit biomass of oil pumpkin (*Cucurbita pepo* L. var. *Styriaca*). *Chemical Papers*, 63, (4): 406-413
- Kovács K. L., Ács N., Kovács E., Wirth R., Rákhely G., Strang O., Herbel Z., Bagi Z. 2012. Improvement of biogas production by bioaugmentation. *BioMed Research International*, 2013, ID 482653, doi:10.1155/2013/482653:7 str.
- Lü F., Jiaqi J., Liming S., Pinjing H. 2013. Bacterial bioaugmentation for improving methane and hydrogen production from microalgae. *Biotechnology for Biofuels*, 6: 92
- Lu X., Xi B., Zhang Y., Angelidaki I. 2011. Microwave pretreatment of rape straw for bioethanol production: Focus on energy efficiency. *Bioresource Technology*, 102: 7937–7940
- Ma F., Yang N., Xu C., Yu H., Wu J., Zhang X. 2010. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. *Bioresource Technology*, 101: 9600-9604

- Marone A., Massini G., Patriarca C., Signorini A., Varrone C., Izzo G. 2013. Hydrogen production from vegetable waste by bioaugmentation of indigenous fermentative communities. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 5612-5622
- Martin-Ryals A., Schideman L., Li P., Wilkinson H., Wagner R. 2015. Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresource Technology*, 189: 62-70
- McDonald P., Edwards R. A. 1976. The influence of conservation methods on digestion and utilization of forages by ruminants. *Proceeding of the Nutrition Society*, 35: 201-211
- Merlin Christy P., Gopinath L. R., Divya D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34: 167–173
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z. 2010. Biougmentation as strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165: 363-375
- Peng X., Börner R. A., Nges I.A., Liu J. 2014. Impact of bioaugmentation on biochemical methane potential for wheat straw with addition of *Clostridium cellulolyticum*. *Bioresource Technology*, 152: 567-571
- Sindhu R., Binod P., Pandey A. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, 199: 76-82
- Standard methods for the examination of water and wastewater. 2006. 22nd ed. Washington, D.C., American Public Health Association, American Water Works Association and W.E.F. <https://www.standardmethods.org/> (maj-avgust 2015)
- Weiß S., Tauber M., Somitsch W., Meincke R., Müller H., Berg G., Guebitz G. M. 2009. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. *Water Research*, 44, 6:1970-1980
- Yu H., Guo G., Zhang X., Yan K., Xu C. 2009. The effect of biological pretreatment with the selective white-rot fungus *Echinodontium taxodii* on enzymatic hydrolysis of softwoods and hardwoods. *Bioresource Technology*, 100: 5170-5175
- Yue Z., Li W., Yu H. 2013. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 128: 738-744

- Yue Z., Yu H., Harada H., Li Y. 2007. Optimization of anaerobic acidogenesis of an aquatic plant *Canna indica* L., by rumen cultures. *Water Research*, 41: 2361-2370
- Zhang J., Guo R., Qiu Y., Qiao J., Yuan X., Shi X., Wang C. 2015. Bioaugmentation with an acetate – type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179: 306–313
- Zhang L., Zhao H., Gan M., Jin Y., Gao X., Chen Q., Guan J., Wang Z. 2011. Application of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from viscosity reducing of raw sweet potato for bioethanol production at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 102: 4573-4579
- Zorec M., Marinšek-Logar R., Čepeljnik T., Nekrep V.F. 2000. The influence of substrate concentration and growth phase on expression of *Butyvirbio* sp. Mz5 endoxylanases. *Zbornik biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 76: 199-206
- Zorec M., Vodovnik M., Marinšek-Logar R. 2014. Potential of selected rumen bacteria for cellulose and hemicellulose degradation. *Food Technology and Biotechnology*, 52, 2: 210-221

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Romani Marinšek Logar, ker me je vzela pod svoje okrilje in mi omogočila opravljati magistrsko nalogo na področju, ki me zanima. Zahvaljujem se ji za vso strokovno pomoč in nasvete tekom opravljanja naloge ter za vse vzpodbudne besede in prijaznost. Najlepše se ji zahvaljujem za hiter pregled in organizacijo zagovora. Poleg tega sem hvaležna za vse kvalitetne pedagoške ure tekom študija, pri katerih sem pridobila znanja in razumevanje izbrane tematike.

Najlepše se zahvaljujem somentorici dr. Lijani Fanel, za vso njeno pomoč in nasvete pri izvedbi laboratorijskega dela in pri pisanju magistrske naloge. Za pomoč se zahvaljujem tudi dr. Maši Zorec. Obema najlepša hvala za potrpljenje, prijaznost in vzpodbudo.

Hvala doc. dr. Roku Miheliču za hitro recenzijo naloge.

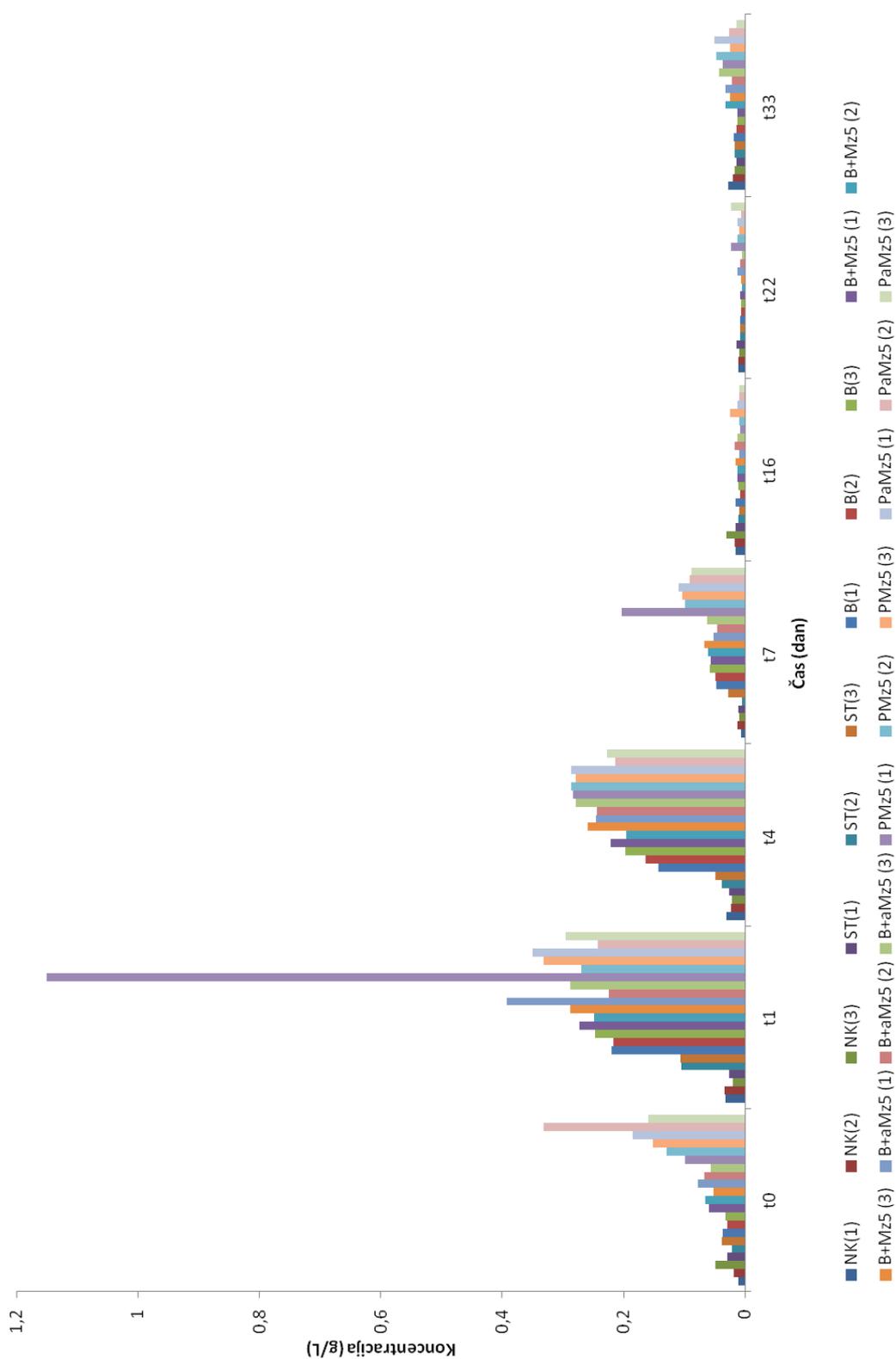
Za prijetno delovno ozračje in sproščene odmore se zahvaljujem celotnemu kolektivu Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo na Rodici.

Kolegici Beti Vidmar se zahvaljujem za vso nesebično pomoč. Delo v laboratoriju je bilo tako še bolj prijetno; hvala za vse salve smeha in bridke solze, skozi katere sva šli skupaj.

Nenazadnje pa hvala še vsem mojim domačim, fantu Petru in prijateljem, ki so me spremljali in mi stali ob strani vsa leta šolanja. Vsem, ki so verjeli vame, tudi ko sama nisem. Predvsem pa mami in očiju, ki sta vsak po svoje, z mano prehodila celotno pot.

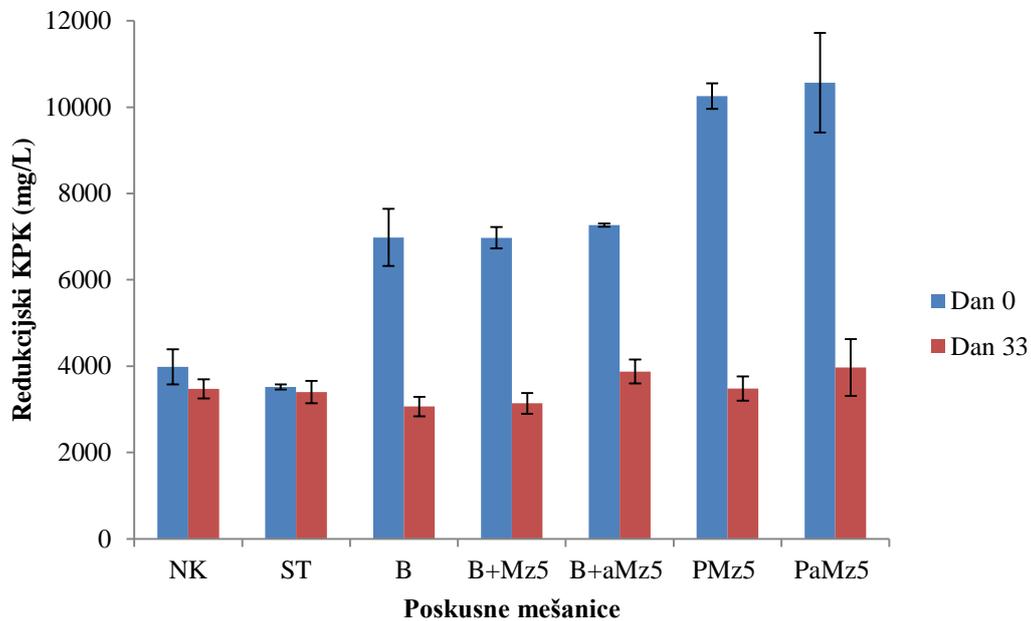
PRILOGA A

Celokupna koncentracija KMK v posameznih poskusnih mešanicah tekom poskusa.



PRILOGA B

Sprememba KPK ob koncu poskusa, glede na začetek.



NK = negativna kontrola, ST = standard, B = bučna pulpa, B+Mz5 = bučna pulpa + živa kultura *P. xylanivorans* Mz5 (bioaugmentacija), B+aMz5 = bučna pulpa + avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5, P.Mz5 = predobdelava bučne pulpe z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5, P.aMz5 = negativna kontrola predobdelavi z živo kulturo *P. xylanivorans* Mz5