

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja PETJE SRŠEN

**POSPEŠITEV PROIZVODNJE BIOPLINA IZ  
LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA Z  
DODAJANJEM ANAEROBNIH HIDROLITIČNIH  
BAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja PETJE SRŠEN

**POSPEŠITEV PROIZVODNJE BIOPLINA IZ  
LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA Z DODAJANJEM  
ANAEROBNIH HIDROLITIČNIH BAKTERIJ**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij – 2. stopnja

**ACCELERATION OF BIOGASS PRODUCTION FROM  
LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES BY THE ADDITION OF  
ANAEROBIC HIDROLYTIC BACTERIA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, del analize zgradbe mikrobne združbe pa na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo Oddelka za zootehniko.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Hrvoje PETKOVIĆ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Md  
 DK UDK 602.4:606:628.336.6:579.66(043.2)  
 KG bioplin/lignocelulozna biomasa/odpadne pivske tropine/anaerobne hidrolitične bakterije/ test biometanskega potenciala  
 AV PETJE SRŠEN Maja, dipl. mikrobiol (UN)  
 SA MARINŠEK LOGAR Romana (mentorica)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
 LI 2016  
 IN POSPEŠITEV PROIZVODNJE BIOPLINA IZ LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA Z DODAJANJEM ANAEROBNIH HIDROLITIČNIH BAKTERIJ  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
 OP X, 68, [3] str., 20 pregl., 36 sl., 2 pril., 34 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Proizvodnja bioplina iz obnovljivih virov je ena od možnosti za zmanjšanje porabe fosilnih goriv. Odpadne pivske tropine so cenen in dostopen material za proizvodnjo bioplina, vendar so zaradi kompleksne lignocelulozne zgradbe težko razgradljive. Različne predobdelave, dodajanje hidrolitičnih encimov in bioaugmentacija lahko izboljšajo anaerobno razgradnjo tropin. V tej nalogi smo se posvetili uporabi treh hidrolitičnih anaerobnih bakterij (*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Clostridium cellulovorans*) za bioaugmentacijo pri proizvodnji bioplina iz pivskih tropin. V majhnih bioreaktorjih volumna enega litra smo testirali biometanskega potenciala izbranih mikrobnih kultu. Sledili smo tudi spremembam v zgradbi bakterijske in arhejske mikrobne združbe z metodo T-RFLP. Arhejska združba se ni pomembno spremenila, medtem ko je v bakterijski mikrobni združbi prišlo do opaznih sprememb med procesom bioplinske razgradnje tropin. Rezultati meritev kemijske potrebe po kisiku in koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin med poskusom so pokazali pravilen potek anaerobne metanogene razgradnje. Bioaugmentacija s hidrolitičnimi bakterijami se je izkazala za uspešno, saj je povečala tako vsebnost metana v bioplinu kot tudi produkcijo metana v primerjavi s standardom. Bioreaktor z dodano bakterijo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> je dosegel največje povečanje produkcije metana s približno 74 % vsebnostjo metana, hkrati pa je proizvedel več kot 40 % več metana kot bioreaktor brez dodanih bakterij.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md  
DC UDC 602.4:606:628.336.6:579.66(043.2)  
CX biogas/lignocellulosic biomass/brewer's spent grain/anaerobic hydrolytic bacteria/biochemical methane potential assay  
AU PETJE SRŠEN Maja  
AA MARINŠEK LOGAR Romana (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Biotechnology  
PY 2016  
TI ACCELERATION OF BIOGASS PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES WITH THE ADDITION OF ANAEROBIC HYDROLYTIC BACTERIA  
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO X, 68, [3] p., 20 tab., 36 fig., 2 ann., 34 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The production of biogas from renewable resources presents one of the potential options for reducing consumption of fossil fuels. Brewer's spent grain represents an affordable and abundant material for the production of biogas, but because of its complex lignocellulosic structure it is not easily digestible. It therefore requires pretreatments, the addition of hydrolytic enzymes or bioaugmentation before it can become a suitable substrate for the production of biogas. In this thesis we have investigated the use of three hydrolytic anaerobic bacteria (*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 and *Clostridium cellulovorans*) for bioaugmentation in the production of biogas from brewer's spent grain. We conducted the biochemical methane potential assay in one litre bioreactors with the addition of the selected hydrolytic anaerobic bacteria. We followed the changes in the bacterial and archaeal microbial community by applying T-RFLP assay and while the archaeal community had no significant changes in structure, the bacterial community changed drastically during the course of digestion of brewer's spent grain. The results of the chemical demand for oxygen and concentration of volatile fatty acids assays indicated the correct anaerobic methanogenic degradation of the substrate. The methane concentration and production were increased, so the addition of hydrolytic bacteria was beneficial and indeed augmented the process. The best results were achieved in the bioreactor with added *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> with a methane content of approximately 74 % of biogas and more than 40 % more methane than the bioreactor without added bacteria.

## KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO SLIK	VII
	KAZALO PREGLEDNIC	XI
	KAZALO PRILOG	XII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	NAMEN MAGISTRSKEGA DELA	2
1.2	DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>4</b>
2.1	BIOPLIN	4
2.2	TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA (BMP)	5
2.3	LIGNOCELULOZNA BIOMASA	6
2.4	PREDOBDELAVA SUBSTRATA	8
2.5	POSPEŠITEV PROIZVODNJE BIOPLINA IZ LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV Z BIOAUGMENTACIJO	9
2.6	PIVSKE TROPINE KOT PRIMER LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA	10
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1	MATERIALI	12
<b>3.1.1</b>	<b>Mikroorganizmi</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Kemikalije</b>	<b>12</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Naprave in pripomočki</b>	<b>14</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Raztopine in pufri</b>	<b>15</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Gojišče</b>	<b>16</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Drugi materiali</b>	<b>17</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Shema poskusa</b>	<b>17</b>
3.2	METODE	18
<b>3.2.1</b>	<b>Test biometanskega potenciala</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Priprava vampnega soka</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Merjenje pH</b>	<b>21</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Kemijska potreba po kisiku (KPK)</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)</b>	<b>22</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Celulolitična in ksilanolitična encimska aktivnost</b>	<b>22</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Sledenje spremembam v sestavi mikrobne združbe</b>	<b>24</b>

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	27
4.1	CELULOLITIČNA IN KSILANOLITIČNA ENCIMSKA AKTIVNOST IZBRANIH HIDROLITIČNIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO	27
4.2	PRVI POSKUS BIOAUGMENTACIJE (BMP 1)	27
4.3	DRUGI POSKUS BIOAUGMENTACIJE (BMP 2)	39
4.4	SPREMEMBE V SESTAVI MIKROBNE ZDRUŽBE MED POSKUSOM BIOAUGMENTACIJE	51
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA</b>	54
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	60
<b>7</b>	<b>POVZETEK</b>	61
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	65
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Delitev biomase (Naik in sod., 2010)	6
Slika 2: Predobdelava biomase (prirejeno po Agbor in sod., 2011)	8
Slika 3: Potek poskusa bioaugmentacije	17
Slika 4: Shematski potek dela pri tehniki T-RFLP	24
Slika 5: Prikaz začetnih in končnih vrednosti pH v testu BMP 1	28
Slika 6: Redukcija KPK med testom BMP 1	28
Slika 7a: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	29
Slika 7b: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Clostridium cellulovorans</i> in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	29
Slika 7c: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	30
Slika 8a: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	31
Slika 8b: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s <i>Clostridium cellulovorans</i> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	31
Slika 8c: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata	32
Slika 9: Odstotki povečanja donosa metana na g KPK substrata glede na kontrolni bioreaktor z neinokuliranim gojiščem in tropinami pri poskusu BMP 1	33



Slika 10a: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	33
Slika 10b: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Clostridium cellulovorans</i> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	34
Slika 10c: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	34
Slika 11: Povprečni delež metana v steklenicah na dan 30 za poskus BMP 1	36
Slika 12: Koncentracije oetne, propionske in n-maslene kisline v poskusu BMP 1	38
Slika 13: Doprinos kulture h koncentracijam oetne, propionske in n-maslene kisline na dan 0 pri poskusu BMP 1	39
Slika 14: Začetni in končna pH vrednost pri poskusu bioaugmentacije BMP 2	40
Slika 15: Redukcije vrednosti KPK med poskusom bioaugmentacije BMP 2	40
Slika 16a: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	41
Slika 16b: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s <i>Clostridium cellulovorans</i> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	41
Slika 16c: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	42
Slika 17a: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s <i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata	43
Slika 17b: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s <i>Clostridium cellulovorans</i> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni	

metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata  
43

Slika 17c: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata 44

Slika 18: Odstotki povečanja donosa metana na g KPK substrata glede na kontrolni bioreaktor z neinokuliranim gojiščem in tropinami pri poskus BMP 2 45

Slika 19a: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata 45

Slika 19b: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata 46

Slika 19c: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata 46

Slika 21: Koncentracije očetne, propionske in n-maslene kisline v poskusu BMP 2 50

Slika 22: Doprinos kulture h koncentracijam očetne, propionske in n-maslene kisline kisline na dan 0 pri poskusu BMP 2 51

Slika 23: Pearsonov korelacijski dendrogram bakterijskih T-RFLP profilov najuspešnejših bioreaktorjev pri poskusu BMP 2 52

Slika 24: Pearsonov korelacijski dendrogram arhejskih T-RFLP profilov najuspešnejših bioreaktorjev pri poskusu BMP 2 53

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam kemikalij	12
Preglednica 2: Seznam naprav	14
Preglednica 3: Sestava fosfatnega pufru pH 7	15
Preglednica 4: Sestava mineralne raztopine 1	15
Preglednica 5: Sestava mineralne raztopine 2	15
Preglednica 6: Sestava raztopine za analizo KPK 1	15
Preglednica 7: Sestava raztopine za analizo KPK 2	15
Preglednica 8: Kalibracijska raztopine za merjenje kratkoverižnih maščobnih kislin	16
Preglednica 9: Sestava pufru 5xTBE pH 8,3	16
Preglednica 10: Gojišče M2	16
Preglednica 11: Zasnova poskusa	20
Preglednica 12: Sestava reagenčne mešanice PAHBAH	23
Preglednica 13: Sestava PCR mešanice	25
Preglednica 14: Temperaturni program za PCR bakterij	25
Preglednica 15: Temperaturni program za PCR arhej	25
Preglednica 16: Encimska aktivnost izbranih hidrolitičnih bakterij za bioaugmentacijo	27
Preglednica 17: Specifična produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa BMP 1	35
Preglednica 18: Donos metana glede na g KPK substrata v poskusu BMP 1	37
Preglednica 19: Specifična produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa BMP 2	47
Preglednica 20: Donos metana glede na g KPK substrata v poskusu BMP 2	49

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: S plinsko kromatografijo izmerjeni deleži metana v bioreaktorjih v poskusu BMP 1

Priloga A2: S plinsko kromatografijo izmerjeni deleži metana v bioreaktorjih v poskusu BMP 2

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BMP – test biometanskega potenciala

KMK – kratkoverižne maščobne kisline

KPK – kemijska potreba po kisiku

OS – organska snov

PAHBAH – hidrazid benzojske kisline

SS – suha snov

T-RFLP – polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov

## 1 UVOD

Prva sodobna uporaba bioplina sega v leto 1897, ko so ulične svetilke na bioplin razsvetlile mesto Exeter v Angliji (Deublein in Steinhaiser, 2008). Do druge svetovne vojne je uporaba bioplina naraščala, vendar pa je okrog leta 1955 njegova pomembnost upadla zaradi nizke cene nafte. Leta 1970 je nastopila naftna kriza in bioplin je spet postal komercialno zanimiv, danes pa njegov razvoj žene ekološka ozaveščenost in svetovne direktive po zmanjšanju izpustov toplogrednih plinov (Deublein in Steinhaiser, 2008).

Biosinteza metana je naraven proces ob razgradnji organskih snovi oziroma biomase v vlažnem okolju ob odsotnosti kisika in prisotnosti skupine mikroorganizmov, ki so sposobni tvorbe metana. V naravi se metan tvori v močvirjih, v prebavnem traktu prežvekovalcev in na poplavljenih riževih poljih (Deublein in Steinhaiser, 2008).

Bioplin sestavljata metan in ogljikov dioksid z različnimi primesmi. Uporabljamo ga lahko za ogrevanje in električno energijo, z njim lahko tudi poganjamo prilagojene avtomobile. Poleg tega ima proizvodnja in uporaba bioplina tudi druge prednosti, kot so proizvodnja iz obnovljivih virov, manjši izpusti toplogrednih plinov v atmosfero, proizvajamo ga lahko lokalno in brez odvisnosti od fosilnih goriv, pomaga pa tudi reševati problem organskih odpadkov in onesnaženja, ki ga ti povzročajo (Chandra in sod., 2012)

Biomasa predstavlja ustrezen vir obnovljive primarne energije, iz katere lahko proizvajamo alternativna goriva, hkrati pa pomaga reševati vprašanja podnebnih sprememb in globalnega segrevanja. Odpadni rastlinski material predstavlja poceni substrat za pridobivanje bioplina, vendar pa je težko razgradljiv, saj ga sestavljajo kompleksni polimeri celuloze, hemiceluloze in lignina. Da bi lahko tak material bolje izkoristili, ga je potrebno predhodno obdelati ali povečati razgradnjo v bioreaktorju z dodatkom encimov ali ustreznih mikroorganizmov. Poznamo več načinov predhodne obdelave česa?, delimo jih na fizikalne, kemijske in biološke ter kombinacije le teh. Pogosto so drage in zamudne, potekajo pa ločeno od samega procesa proizvodnje bioplina. Da bi izboljšali njihovo ekonomičnost je potrebno najti cenovno ugoden način predobdelave, ki hkrati ne proizvaja neželenih ali celo strupenih odpadkov. V interesu uporabnosti v industriji bi tudi bilo pametno proces predobdelave sklopiti s procesom proizvodnje bioplina, tako bi zmanjšali stroške proizvodnje in tudi poenostavili proizvodnjo. Anaerobna razgradnja je naravni proces, ki poteka s pomočjo mešane kulture mikroorganizmov v anaerobnem okolju. Mikroorganizmi sodelujejo pri razgradnji biomase na njene osnovne enote. Anaerobna razgradnja lignocelulozne biomase da metan, količina metana pa je odvisna od tipa biomase (Sawatdeenarunat in sod., 2015).

Odpadne pivske tropine predstavljajo največji delež odpadkov v pivovarski industriji, kar 85% vseh odpadkov ali 20 kg na 100 l piva (Mussatto in sod., 2006). V Pivovarni Laško

imajo dve varilnici z zmogljivostjo 880 000 l in 450 000 l piva dnevno (Pivovarna Laško, 2015). Glede na te podatke lahko ocenimo, da v proizvodnji piva v Pivovarni Laško nastane 266 ton odpadnih pivskih tropin dnevno, ki bi jih lahko uporabljali v svoji bioplinarni, kjer že proizvajajo bioplin iz odpadne vode in odpadnih kvasovk.

## 1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Cilj naloge je bil preučiti vplive anaerobnih hidrolitičnih bakterij na razgradnjo pivskih tropin kot modelnega lignoceluloznega substrata. Z dodatkom izbranih hidrolitičnih bakterij smo želeli povečati proizvodnjo oziroma donos metana iz tropin na račun boljšega izkoristka substrata zaradi izboljšane hidrolize kot prve stopnje v proizvodnji bioplina. Hkrati smo želeli znižati stroške predhodnega gojenja bakterij, zato jih pred dodatkom v bioproces nismo gojili v inducibilnem gojišču za izražanje hidrolitičnih encimov, v katerem sicer uporabljamo drage substrate.

Kot modelni lignocelulozni substrat za proizvodnjo bioplina smo izbrali odpadne pivske tropine, ki so cenovno ugoden substrat za industrijsko proizvodnjo bioplina. Mikrobnobio maso za proizvodnjo bioplina smo pridobili iz delujoče bioplinarne pivovarne Laško. Za pospešitev razgradnje pivskih tropin smo izbrali različne ko-kulture treh anaerobnih hidrolitičnih bakterij, in sicer *Clostridium cellulovorans*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *Fibrobacter succinogenes* S85, ki smo jih dodali v bioreaktorje na začetku bioprocasa. Za primerjavo smo v poskusu uporabili tudi avtoklavirane bakterije, da smo lahko nedvomno potrdili, da je eventualna povečana produkcija bioplina posledica delovanja hidrolitičnih encimov bakterij in ne bakterij kot dodatnega vira hranil.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze so bile sledeče:

- Dodatek anaerobnih hidrolitičnih bakterij poveča proizvodnjo bioplina in delež metana v bioplinu.
- Anaerobne hidrolitične bakterije prispevajo k povečani proizvodnji bioplina, ne da bi bile predhodno inducirane za proizvodnjo hidrolitičnih encimov.
- Anaerobne hidrolitične bakterije imajo večji vpliv na proizvodnjo bioplina kot sama sestava gojišče.

- Neaktivna biomasa bakterij ima minimalni prispevek k proizvodnji bioplina v primerjavi z živimi bakterijami, saj na proizvodnjo bioplina vpliva aktivnost dodanih bakterij.



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 BIOPLIN

Bioplin je sestavljen večinoma iz metana ( $\text{CH}_4$ ) in ogljikovega dioksida ( $\text{CO}_2$ ), vsebuje pa lahko še različne nečistoče, ki so odvisne od vrste substrata in bioplinarne. Razmerje med  $\text{CO}_2$  in  $\text{CH}_4$  je odvisno od uporabljenega organskega materiala.  $\text{CO}_2$  predstavlja 25 do 50% bioplina in zmanjša kalorično vrednost bioplina ter povzroča korozijo, če je plin moker.  $\text{H}_2\text{S}$  predstavlja 0 do 0,5% bioplina, je koroziven za plinovode in motorje, po izgorevanju pa nastajajo emisije  $\text{SO}_2$ .  $\text{NH}_3$  predstavlja 0 do 0,05% bioplina in povzroča emisije dušikovih oksidov. Vodna para predstavlja 1 do 5% bioplina, povzroča korozijo, kondenzacija povzroča škodo na instrumentih v bioplinarnah in cevovodih, predstavlja tudi nevarnost zmrzovanja.  $\text{N}_2\text{O}$  predstavlja 0 do 5% bioplina in zmanjša kalorično vrednost. Poleg tega so v bioplinu lahko prisotni še prašni delci in silicijeve spojine, ki mašijo ventile in so abrazivni. Bioplin z več kot 45% metana je vnetljiv (Deublein in Steinhauser, 2008).

Tvorba metana je kompleksen proces, ki ga lahko delimo na štiri faze: hidrolizo, acidogenezo, acetogenezo in metanogenezo. Mikroorganizmi, ki vršijo posamezne faze, so med seboj v sintrofiji (Deublein in Steinhauser, 2008).

V času procesa hidrolize poteka razgradnja makromolekul, kot so celuloza, proteini in maščobe do monomerov. Hidroliza ogljikovih hidratov poteče v nekaj urah, proteinov in lipidov v nekaj dneh, hidroliza lignoceluloze in lignina pa je počasna in nepopolna. Hidrolizo vršijo fakultativno anaerobni in anaerobni mikroorganizmi, fakultativni anaerobi porabijo v vodi raztopljen kisik in s tem ustvarijo okolje z nizkim redoks potencialom, ki ga obligatni anaerobi potrebujejo. Pri acidogenezi bakterije monomere iz hidrolize razgradijo v kratkoveržne organske kisline z enim do petimi ogljikovimi atomi, alkohole, vodik in  $\text{CO}_2$ . V acetogenezi mikroorganizmi pretvorijo produkte iz acidogene faze v acetat. Acetogene bakterije so obligatni proizvajalci vodika. Biosinteza acetata poteka pri nizkih parcialnih tlakih vodika, zato morajo biti acetogeni in metanogeni mikroorganizmi v simbiozi oz. sintrofiji. V metanogeni fazi metanogene bakterije in arheje tvorijo metan iz acetata (acetoklastična metanogeneza),  $\text{H}_2$  in  $\text{CO}_2$  (hidrogenotrofna metanogeneza) ali iz metanola (metilotrofna metanogeneza). Metanogeneza poteka v striktno anaerobnih pogojih. Dokler metanogeneza teče, se vrši acetogeneza brez težav, če pa se metanogeneza ustavi, pride do zakisanja. Svetloba zavira metanogenezo (Deublein in Steinhauser, 2008; Chandra in sod., 2012).

V celotnem procesu sodeluje mnogo različnih bakterij in arhej. V skupini hidrolitskih bakterij najdemo predstavnike rodov *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megasphaera* in *Bifidobacterium*. Skoraj vsi acidogeni

mikroorganizmi sodelujejo tudi v hidrolizi. Rodovi *Clostridium*, *Paenibacillus* in *Ruminococcus* se pojavijo v vseh štirih fazah, najpogostejši pa so v acidogenezi. V prvih dveh fazah so pogosti tudi rodovi *Cytophaga*, *Flavobacterium* in *Bacteroides*. Glavni rodovi v acetogenezi so *Desulfovibrio*, *Aminobacterium* in *Acidaminococcus*. V metanogenezi so glavni arhejski rodovi *Methanobacterium*, *Methanospirillum* (vrsta *M. hungatii*) in *Methanosarcina*, ob nizkih koncentracijah acetata ali močnejšem izpiranju pa še *Methanosaeta* (Deublein in Steinhauser, 2008).

Pogoji okolja oziroma v bioreaktorju so pri proizvodnji bioplina pomembni. Poleg ustreznih temperature je pomembno tudi ustrezno mešanje, da ne pride do nastanka žepov višje ali nižje temperature. Anaerobi so najbolj aktivni v mezofilnem in termofilnem območju. Večina metanogenih mikroorganizmov je mezofilnih in so zelo občutljivi na spremembe temperature, delujejo v temperaturnem območju 20-45 °C, maksimalna produkcija metana pa je okrog 35 °C. Vrednosti pH okolja so tudi pomembne, saj prav tako vplivajo na aktivnost mikroorganizmov. Metanogene arheje so sposobne proizvodnje metana v pH območju 6,0 do 8,5, vendar padec pH pod 6,6 negativno vpliva na metanogene arheje, pod 6,2 pa postane za njih toksičen. Acidogene bakterije so sposobne produkcije kislin do pH 4,5 do 5,0. pH sistema je odvisen od hitrosti produkcije intermediatov, kot so kisline in CO<sub>2</sub>. Optimalen pH za produkcijo metana je 7,0-7,2, vendar je produkcija zadovoljiva že v območju 6,6-7,6 (Chandra in sod., 2012).

## 2.2 TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA (BMP)

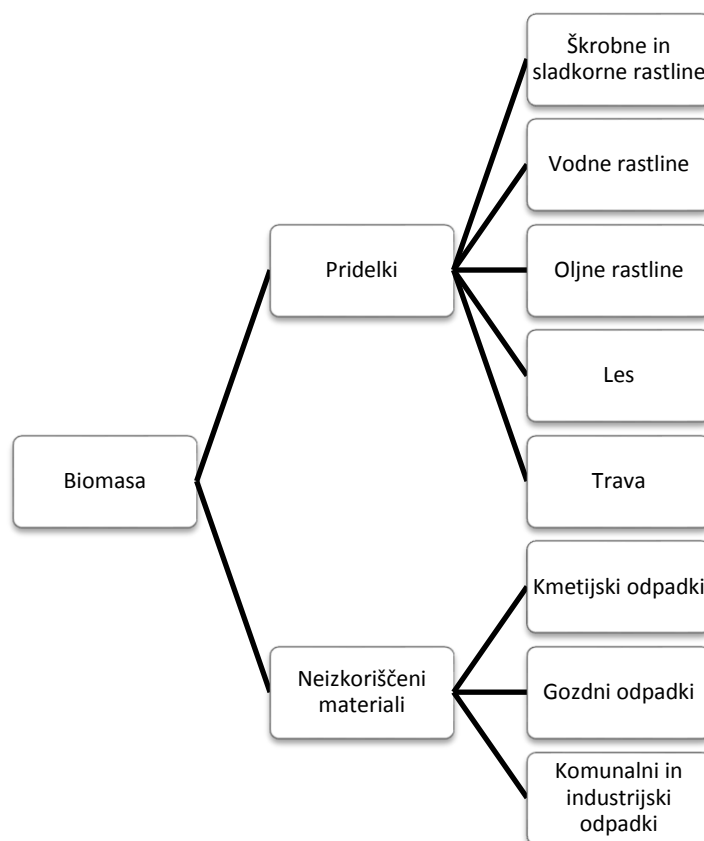
Test biometanskega potenciala uporabljamo za ugotavljanje biorazgradljivosti organskega materiala in njegovega potenciala za proizvodnjo metana v anaerobnih pogojih. Organski material zmešamo s kulturo anaerobnih bakterij, običajno iz delujoče bioplinarne, inkubiramo 30 do 60 dni pri stabilni temperaturi 37 ali 52 °C s stalnim mešanjem. Nastali bioplin merimo volumetrično ali manometrično. Ker nas zanima nastali metan, redno merimo sestavo bioplina, nekateri tudi redno odstranjujejo CO<sub>2</sub>. Vrednosti BMP predstavimo kot volumen proizvedenega metana na gram organske snovi substrata, ki pa jo lahko predstavimo s kemijsko ali biološko potrebo po kisiku. Optimalno je vsaj dvakrat toliko inokuluma kot substrata, da se izognemo negativnim učinkom nabiranja intermediatov, ki bi lahko zavirali produkcijo metana (Strömberg in sod., 2014).

Test biometanskega potenciala ali BMP je prvi opisal Owen s sodelavci leta 1979 kot merilo za biorazgradljivost vzorcev. Poskus so zasnovali v 250 ml serumskih steklenicah, z merjenjem bioplina s stekleno injekcijsko iglo in analizo sestave bioplina s plinskim kromatografom. Obremenitev so omejili na 2 g KPK (kemijske potrebe po kisiku) oz. organske snovi na 1 l mešanice, poskus pa je tekel 30 dni (Owen in sod., 1979). Dandanes se BMP izvaja različno v različnih laboratorijih, standardnega postopka trenutno še ni. Za

merjenje volumna in sestave bioplinov se najpogosteje uporabljajo volumetrične in manometrične metode ter plinska kromatografija. Delovni volumni imajo širok razpon, temperature pa se večinoma gibljejo v mezofilnem območju. Čas trajanja poskusa je odvisen od laboratorija, BMP lahko traja od dveh tednov do skoraj treh mesecev, povprečno pa se čas izvajanja giblje okrog 32 dni z različnimi načini mešanja (Raposo in sod., 2011).

### 2.3 LIGNOCELULOZNA BIOMASA

Pod pojmom biomasa razumemo materiale organskega izvora, razen fosilnih goriv, ki lahko služijo kot gorivo direktno ali po določeni obdelavi (Agbor in sod., 2011).



Slika 1: Delitev biomase (Naik in sod., 2010)

Lignocelulozni materiali so poceni, lahko dostopni in predvsem obnovljivi viri za proizvodnjo biogoriv. Sestavljeni so iz treh glavnih polimerov: celuloze, hemiceluloze in lignina. Ti polimeri so med seboj povezani v heteromatriks, ki je odvisen od vrste biomase, pogosto pa potrebujejo določeno predobdelavo, da se sprostijo gradniki celuloznih vlaken

– sladkorji. Predobdelava je vsak proces, ki spremeni zgradbo lignoceluloznega materiala iz odpornega na hidrolizo s celulazami, v takega, kjer je hidroliza s celulazami možna. Omejujoč korak pri proizvodnji biogoriv je pretvorba biomase v sladkorje (Agbor in sod., 2011).

Celuloza je najbolj razširjen polimer na svetu, je glavna sestavina celične stene rastlin, nudi ji oporo, prisotna pa je tudi pri bakterijah, glivah in algah. Celuloza je polimer  $\beta$ -D-glukopiranoznih ostankov povezanih preko  $\beta$ -(1,4) glikozidnih vezi. Ponavljajoča se enota v verigi celuloze je celobioza, ki je disaharid. Celulozne verige so povezane v mikrofibrile, te pa so povezani v fibrile. Ultrastruktura celuloze je v veliki meri odvisna od prisotnosti kovalentnih vezi, vodikovih vezi in Van der Waalsovih vezi (Agbor in sod., 2011).

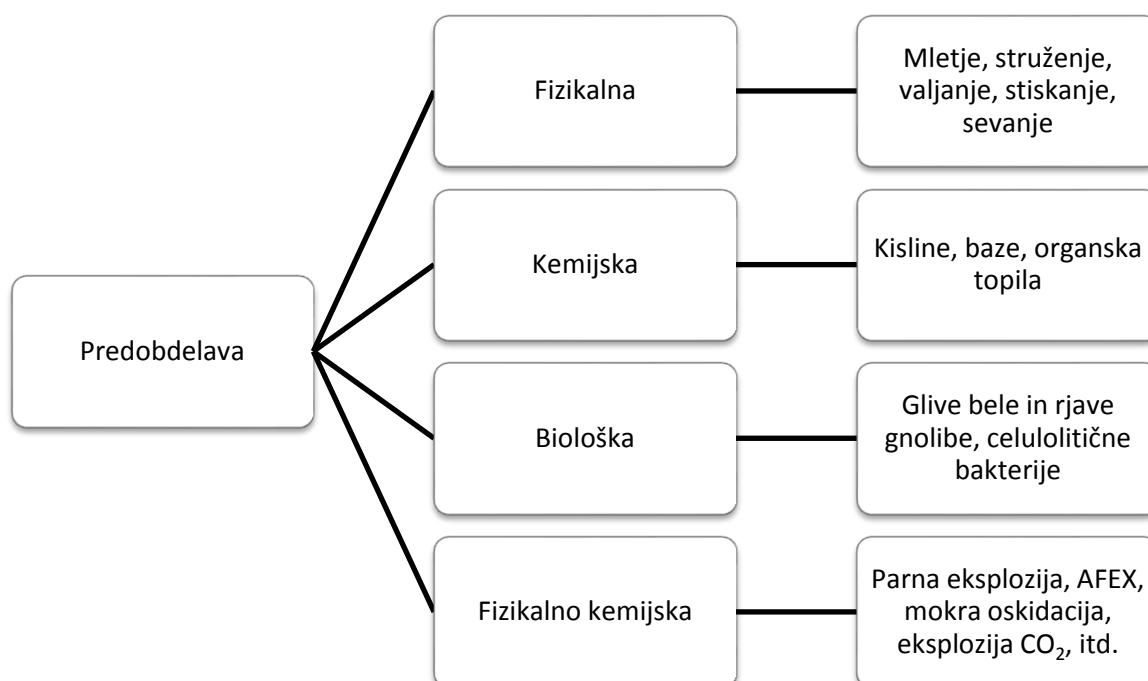
Hemiceluloza je drugi najpogostejši polimer v lignocelulozni biomasi in za razliko od celuloze ni kemijsko homogena. Hemiceluloze so razvejani heterogeni polimeri pentoz, kot sta ksiloza in arabinoza, heksoz, kot so manoza, glukoza in galaktoza, ter acetiliranih sladkorjev. Hemiceluloze imajo nižjo molekulsko maso v primerjavi s celulozo in so razvejane, s kratkimi stranskimi verigami, ki so dostopne za hidrolizo. Hemiceluloze se razlikujejo po zgradbi, v biomasi kot je slama in trava so sestavljene v glavnem iz ksilana, medtem ko so v mehkem lesu večinoma iz glukomanana. Ksilan lahko relativno lahko ekstrahiramo v kislem ali bazičnem okolju, za ekstrakcijo glukomanana pa potrebujemo močno alkalno okolje. Izmed glavnih polimerov v lignoceluloznem materialu so hemiceluloze termo-kemijsko najbolj občutljivejše. Hemiceluloza obdaja celulozo v celični steni rastlin, zato vsaj 50% razgradnja hemiceluloze poveča razgradljivost celuloze. Pri tem pa moramo biti pozorni na parametre razgradnje, da ne pride do tvorbe neželenih razgradnih produktov, kot so furfurali in hidroksimetil furfurali, ki inhibirajo fermentacijske procese, zaradi tega je predobdelava kompromis med razgradnimi produkti in pridobljenimi sladkorji (Agbor in sod., 2011).

Lignin je tretji najpogostejši polimer v naravi. Celični steni rastlin daje trdnost, neprepustnost in odpornost na mikrobní napad ter oksidativni stres. Lignin je heteropolimer iz fenilpropanovih enot, povezanih z različnimi vezmi. Lignin deluje kot lepilo, ki drži skupaj ostale komponente lignocelulozne biomase, zaradi česar je netopna v vodi, zaradi tesne povezave s celuloznimi mikrofibrilami pa tudi preprečuje encimsko razgradnjo lignocelulozne biomase. Poleg fizične ovire lignin tudi povzroča nespecifično vezave hidrolitskih encimov nase. Derivati lignina so lahko tudi toksični za mikroorganizme. Vsebnost lignina je odvisna od vrste biomase. Delignifikacija oz. odstranjevanje lignina s kemikalijami lahko povzroči napihovanje biomase, zmoti strukturo lignina, poveča notranjo površino in poveča dostopnost celuloznih vlaken celulozitičnim encimom (Agbor in sod., 2011).

Različni tipi biomase, kot so les, trava, vodne rastline, poljski pridelki in ostanki, gospodinjstvi odpadki, vsebujejo različne količine celuloze, hemiceluloz in lignina. Na splošno vsebuje rastlinska biomasa 40-50% celuloze, 20-40% hemiceluloze in 20-30% lignina. Lastnosti, kot sta vsebnost lignina in dostopnost celuloze celulazam, določajo razgradljivost biomase. K odpornosti na razgradnjo prispevajo tudi stopnja polimerizacije celuloze in njena kristaliničnost, dostopna površina, zaščita celuloze s strani lignina, obdajanje celuloze s hemicelulozo in moč vlaken. Ta variabilnost lastnosti je odgovorna za razlike v razgradljivosti biomase. Odstranjevanje lignina poveča razgradljivost biomase, naslednji omejujoč korak pa je dostopnost celuloze celulazam (Agbor in sod., 2011).

## 2.4 PREDOBDELAVA SUBSTRATA

Učinkovita predobdelava lignocelulozne biomase za proizvodnjo bioplina naj bi potrebovala majhno investicijo in nizke obratovalne stroške, učinkovita naj bi bila za širok razpon lignoceluloznih materialov, na koncu pa naj bi dobili večino komponent v uporabnih in ločenih frakcijah. Priprava na predobdelavo naj bi bila minimalna, ob predobdelavi pa naj ne bi nastali škodljivi produkti, ki bi omejevali mikrobno rast ali delovanje hidrolitičnih encimov (Agbor in sod., 2011).



Slika 2: Predobdelava biomase (prirejeno po Agbor in sod., 2011)

Predobdelavo delimo na fizično, biološko in kemijsko ter kombinacije le teh. Fizična ali fizikalna predobdelava vključuje različna mletja, struženja, stiskanja, skratka zmanjševanje velikosti delcev ter različna sevanja. Zmanjšanje velikosti delcev pripomore k razgradljivosti biomase, tako se poveča površina delcev in zmanjša stopnja polimerizacije in kristaliničnost. Zmanjšanje velikosti delcev je učinkovito do velikosti 0,4 mm, pri manjših delcih pa je učinek minimalen. Energija, potrebna za zmanjšanje velikosti delcev, je odvisna od vrste biomase, vendar pa je na ravni industrijskih obratov velika in zato neekonomična. Možna je tudi uporaba gama žarkov za cepitev  $\beta$ -1,4 glikozidnih vezi, vendar je na večji skali draga metoda, poleg tega pa je vprašljive varnosti (Agbor in sod., 2011).

Za biološko predobdelavo pogosto uporabljamo glive zmožne razgrajevati hemicelulozo, lignin in polifenole. Glive rjave gnilobe večinoma razgrajujejo celulozo, medtem ko glive bele in mehke gnilobe razgrajujejo tako lignin kot celulozo preko encimov, kot so lignin peroksidaze, polifenol oksidaze, od mangana odvisne peroksidaze in lakaze (Agbor in sod., 2011).

Kemijska predobdelava vključuje kisline, baze, organska topila in ionske tekočine, ki ugodno vplivajo na strukturo lignocelulozne biomase. Tretiranje z alkalijami, kot so NaOH, KOH,  $\text{Ca(OH)}_2$  in hidrazid, povzroči napihovanje biomase, kar poveča notranjo površino biomase, zmanjša polimerizacijo in kristaliničnost celuloze. Predobdelava z alkalijami prelomi vezi med ligninom in drugimi ogljikovimi hidrati v biomasi, reaktivnost ostalih polisaharidov se poveča, ko tako odstranimo lignin. Alkalije odstranijo tudi dele hemiceluloz, ki ovirajo dostop encimov do celuloze. Večina alkalij se tako porabi. Alkalna predobdelava je najučinkovitejša, ko je malo lignina v biomasi. Rastopine kislin (do 4%), kot so klorovodikova, žveplena in fosforna, se tudi uporabljajo, razgradijo lahko hemicelulozo do monomerov. Uporaba koncentriranih kislin ni ekonomska, če kislin po uporabi ne regeneriramo, poleg tega pa so korozivne (Agbor in sod., 2011).

Najpogostejše so kombinacije fizikalne in kemijske predobdelave. Sem spadajo predobdelava s parno eksplozijo, z vročo vodo, mokra oksidacija, AFEX in podobne metode, in druge metode. Tem metodam je skupna uporaba povišanega tlaka in temperature, pogosto je tudi predhodno zmanjšanje velikosti delcev (Agbor in sod., 2011).

## 2.5 POSPEŠENAJE PROIZVODNJE BIOPLINA IZ LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV Z BIOAUGMENTACIJO

Alternativa fizikalni, kemijski ali biološki predobdelavi lignoceluloznega substrata je bioaugmentacija z anaerobnimi celulolitičnimi in hemicelulolitičnimi bakterijami. Bioaugmentacija je dodajanje določenih mikroorganizmov v sistem, kot je bioreaktor, za

doseganje določene aktivnosti. Bioaugmentacijo lahko uporabljamo za pospeševanje odstranjevanja onesnažil iz okolja ali neželenih spojin iz bioreaktorjev, za pospeševanje bioloških procesov in za uvajanje določene mikrobne populacije v mikrobno združbo, pogosto pa se bioaugmentacijo uporablja za pospeševanje proizvodnje biometana iz različnih odpadnih materialov, kot so hlevski gnoj, perutninski iztrebki, slama, itd. (Peng in sod., 2014).

Organizmi, ki lahko razgrajujejo celulozo, so ekološko zelo pomembni. Celulozo običajno razgradijo do  $H_2O$  in  $CO_2$  v aerobnem okolju, v anaerobnem pa do  $CH_4$  in  $H_2$ . Celulolitične mikroorganizme najdemo v deblih *Thermotogae*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres* in *Bacteroidetes*, velika večina, 80%, pa jih je v deblih *Firmicutes* in *Actinobacteria* (Carere in sod., 2008).

Mikroorganizmi lahko celulozo razgrajujejo na različne načine, lahko izločajo posamezne celulaze ali večencimske izvencelične komplekse – celulosome. Celulosom je večkomponentni celulolitični izvencelični kompleks encimov, ki omogočajo povezovanje z vlakni celuloze in razgradnjo celuloze. Na bakterijski celični površini so skupki celulosomov, ki omogočajo vezavo bakterij na celulozna vlakna. Razgradnja celuloze se vrši encimsko preko endo-1,4- $\beta$ -gukanaz in ekso-1,4- $\beta$ -glukanaz. Endoglukanaze lahko razgradijo amorfno celulozo in karboksimetil celulozo, nastanejo topni oligosaharidi, ki jih  $\beta$ -glukozidaze razgradijo v celobiozo in glukozo. Celobiohidrolaze razgrajujejo celulozo s cepitvijo celobioznih enot z nereducirajočega konca celuloznega vlakna (Carere in sod., 2008).

## 2.6 PIVSKE TROPINE KOT PRIMER LIGNOCELULOZNEGA SUBSTRATA

Ječmen je eno najpomembnejših žit, za pšenico, koruzo in rižem. Seme je bogato s škrobom in proteini, sestavljeno je iz treh glavnih delov, in sicer kalčka, endosperma in semenske lupine. Slednjo lahko razdelimo na semenski ovoj, perikarp oziroma o semenje in lupino. Lupina ščiti seme, sestavljena je večinoma iz lignocelulozne, vsebuje pa tudi nekaj proteinov, taninov in smole (Mussatto in sod., 2006).

Za proizvodnjo piva ječmen najprej očistijo in ga razvrstijo po velikosti. Po obdobju mirovanja, približno 4 do 6 tednov, ječmen kalijo v treh korakih. Najprej ga namočijo v hladni vodi (5 do 18 °C) za približno 2 dni, vodo med tem menjajo na 6 do 8 ur. Nato ječmen kalijo 6 do 7 dni, pri temperaturi 15 do 21 °C, med tem časom se aktivirajo encimi v endospermu. Nakaljen ječmen nato osušijo pri 40 do 60 °C, da preprečijo rast mikrobom in za razvoj okusa. Slad nato skladiščijo 3-4 tedne, da dozori. V varilnici slad zmeljejo in zmešajo z vodo ter dvignejo na temperaturo 37 do 38 °C, tako nastane drozga. V procesu drozganja pride do razgradnje škroba do sladkorjev in proteinov do polipeptidov in aminokislin. Tekočino nato prefiltrirajo od ostalih netopnih, nerazgrajenih delcev. Tako

dobimo pivino, ki gre naprej v proizvodnjo piva, in pivske tropine (Mussatto in sod., 2006).

Pivske tropine so večinoma ostanki semen, večinoma semenske lupine in perikarpa, odvisno od načina priprave piva lahko vsebujejo še nekaj hmelja, vsebnost škroba pa je zanemarljiva. Večinske sestavine so celuloza, necelulozni polisaharidi in lignin, lahko vsebuje še nekaj proteinov in lipidov. Vsebnosti so odvisne od vrste ječmena, časa žetve in pogojev drozganja, načeloma pa vsebuje približno 20% proteinov in 70% vlaknin, ki so sestavljene iz arabinoksilana, lignina in celuloze. Vsebuje tudi minerale, vitamine in aminokislino. Minerali v odpadnih pivovarskih tropinah so kalcij, kobalt, baker, železo, magnezij, mangan, fosfor, kalij, selen, natrij in žveplo, vsi v koncentracijah pod 0,5%. Vitamini so biotin, holin, folna kislina, niacin, pantotenska kislina, riboflavin, tiamin in piridoksin. Prisotne so tudi skoraj vse aminokislino, tako v odpadnih pivovarskih tropinah najdemo levcin, valin, alanin, serin, glicin, glutaminsko kislino in asparaginsko kislino v največjih količinah, v manjših pa še tirozin, prolin, treonin, arginin, lizin, cistein, histidin, izolevcin, metionin, fenilalanin in triptofan (Mussatto in sod., 2006).

Odpadne pivske tropine se trenutno najpogosteje uporabljajo kot dodatek h krmi, običajno krav, raziskujejo pa se tudi druga področja uporabe, kot so dodatek v človeški prehrani, uporaba v papirni industriji, uporaba kot dodatek glini v opekarski industriji industriji, kot vir produktov z višjo dodano vrednostjo, kot substrat za proizvodnjo encimov ali rast mikroorganizmov, nenazadnje pa je zanimiv tudi za proizvodnjo energije, neposredno s sežigom ali za produkcijo bioplina (Mussatto in sod., 2006).



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Mikroorganizmi

Za bioaugmentacijo smo uporabili bakterije *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Clostridium cellulovorans*.

Bakterijo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> so prvi izolirali Zorec in sodelavci leta 1997 (Zorec in sod., 1997), opisana pa je bila leta 2003 (Kopečný in sod., 2003). Sev je dostopen v nemški zbirki mikroorganizmov Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) pod številko 14809, je pa tudi del laboratorijske zbirke anaerobnih bakterij in arhej na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete.

*Fibrobacter succinogenes* S85 je prvi izoliral Hungate s sodelavci leta 1950 kot *Bacteriodes succinogenes* S85, vendar ga je leta 1988 Montgomery s sodelavci na podlagi analize 16S ribosomske RNA premestil v rod *Fibrobacter*, dostopen je v ameriški zbirki mikroorganizmov American Type Culture Collection ali ATCC pod številko 19169 (Montgomery in sod., 1988).

*Clostridium cellulovorans* je prvi izoliral Sleat s sodelavci leta 1984, dostopen je v nemški zbirki DSMZ pod številko 3052 (Sleat in sod., 1984).

##### 3.1.2 Kemikalije

Preglednica 1: Seznam kemikalij

Ime	Kemijska formula	Proizvajalec	Država proizvajalca
Agar-agar	(C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub> ) <sub>n</sub>	Sigma-Aldrich	ZDA
Avicel celuloza	(C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub>	Merck	Nemčija
Bakrov sulfat pentahidrat	CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	Merck	Nemčija
Borova kislina	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck	Nemčija
Celobioza	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sigma-Aldrich	ZDA
CMC celuloza	natrijeva sol karboksimetil celuloze	Sigma-Aldrich	ZDA
Dietil eter	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	Sigma-Aldrich	ZDA

Se nadaljuje

## Nadaljevanje Preglednice 1

Ime	Kemijska formula	Proizvajalec	Država proizvajalca
Dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	Nemčija
EDTA	Etilendiaminotetraoetna kislina	Merck	Nemčija
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck	Nemčija
Etidijev bromid	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$	Sigma-Aldrich	ZDA
Folin Ciocalteu reagent		Merck	Nemčija
Glukoza	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Kemika	Hrvaška
Goveji serumski albumin		Sigma-Aldrich	ZDA
Kalcijev klorid	$\text{CaCl}_2$	Merck	Nemčija
Kalijev dihidrogen fosfat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck	Nemčija
Kalijev dikromat	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Merck	Nemčija
Ksilan	Poli( $\beta$ -D-ksilopiranoza[1 $\rightarrow$ 4])	HiMedia Laboratories	Indija
Ksiloza	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$	Sigma Chemicals	ZDA
L-cistein HCl	$\text{C}_3\text{H}_8\text{ClNO}_2 \cdot \text{S} \cdot \text{xH}_2\text{O}$	Merck	Nemčija
Natrij kalijev tartrat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck	Nemčija
Natrije klorid	$\text{NaCl}$	Merck	Nemčija
Natrijev citrat	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck	Nemčija
Natrijev hidrogenkarboant	$\text{NaHCO}_3$	Merck	Nemčija
Natrijev hidroksid	$\text{NaOH}$	Merck	Nemčija
Natrijev karbonat	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Merck	Nemčija
Natrijev sulfit	$\text{Na}_2\text{SO}_3$	Merck	Nemčija
PAHBAH	4-hidroksibenzhidrazid	Sigma-Aldrich	ZDA
Srebrov sulfat	$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	Molar chemicals KFT	Madžarska
Škrob	$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	Merck	Nemčija
Trikloroacetna kislina	$\text{CCl}_3\text{COH}$	Merck	Nemčija
Tripton	razgradek kazeina	Biolife	Italija
Tris	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Merck	Nemčija
Žveplova (VI) kislina	$\text{H}_2\text{SO}_4$	Merck	Nemčija

### 3.1.3 Naprave in pripomočki

Preglednica 2: Seznam naprav

Naprava	Proizvajalec	Država
Centrifuga TM23	Janetzki	Poljska
Kromatograf Shimadzu GC-14A s TCD detektorjem in kolono PORAPAK-Q	kromatograf Shimadzu, kolona Agilent	Japonska, ZDA
Chromatopac R-6A (integrator za GC)	Shimadzu	Japonska
Kromatograf Shimadzu GC-14A z detektorjem FID in kolono DB-WAXetr	kromatograf Shimadzu, kolona Agilent	Japonska, ZDA
Spektrofotometer Shimadzu UV-160A	Shimadzu	Japonska
Spektrofotometer Novaspec II	GE Healthcare	Velika Britanija
Centrifuga miniSpin Plus	Eppendorf	Nemčija
Nanovue	GE Healthcare	Velika Britanija
Topla kopel WB-30	Kambič d.o.o	Slovenija
Termoblok Biosan CH-100	Chemass d.o.o.	Slovenija
SuperCycler Thermal Cycler SC300T	Kyratec	Avstralija
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems	ZDA
Inkubator I-205	Kambič d.o.o	Slovenija
Stresalnik	Infors HT	Švica
Sušilnik TK/L 4105	Ehret	Nemčija
Power Pac 300	BIO-RAD	ZDA
Tehtnica Sac 51	Scaltec	Nemčija
Tehtnica ALT 220-4NM	KERN	Nemčija
Avtoklav A-21CA	Kambič d.o.o	Slovenija
pH meter pH 700	Eutech Instruments	ZDA
Centrifuga Allegra X-12R	Beckman Coulter	ZDA
PCR komora Biosan	Chemass d.o.o.	Slovenija
Homogenizator Polytron PT 1200E	Kinetamica AG	Švica
Homogenizator Ultra-Turrax TP18/2	IKA	Nemčija
ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems	ZDA
Centrifuga Avanti J-30I	Beckman Coulter	ZDA
UV kamera Chemi Genius	Syngene	Velika britanija

### 3.1.4 Raztopine in pufri

Preglednica 3: Sestava fosfatnega pufra pH 7

Sestavina	Količina
<b>Raztopina 1</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	45,06g
Destilirana voda	1000ml
<b>Raztopina 2</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	97,54g
Destilirana voda	1000ml

Raztopino 1 in 2 zmešamo v razmerju 1:1.

Preglednica 4: Sestava mineralne raztopine 1

Sestavina	Količina
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0g
Destilirana voda	1000ml

Preglednica 5: Sestava mineralne raztopine 2

Sestavina	Količina
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0g
NaCl	6,0g
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,7g
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,6g
Destilirana voda	1000ml

Preglednica 6: Sestava raztopine za analizo KPK 1

Sestavina	Količina za 1L raztopine
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10,216g
97% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	167 ml
Destilirana voda	do 1L

Preglednica 7: Sestava raztopine za analizo KPK 2

Sestavina	Količina za 1L raztopine
Ag <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10,120g
97% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000ml

Preglednica 8: Kalibracijska raztopine za merjenje kratkoverižnih maščobnih kislin

Kislina (100 %)	Količina na 100ml	Koncentracija
Ocetna kislina	50µl	0,525 g/l
Propionska kislina	50µl	0,495 g/l
Izo-maslena kislina	50µl	0,475 g/l
n-maslena kislina	50µl	0,48 g/l
Izo-valerenska kislina	50µl	0,465 g/l
n-valerenska kislina	50µl	0,47 g/l
n-kaprionska kislina	50µl	0,465 g/l
Krotonska kislina	100µl	1
Voda miliQ	do 100ml	

Preglednica 9: Sestava pufra 5xTBE pH 8,3

Sestavina	Količina za 1 l raztopine
Tris	54g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	27,5g
0,5M EDTA	20ml

### 3.1.5 Gojišče

Preglednica 10: Gojišče M2

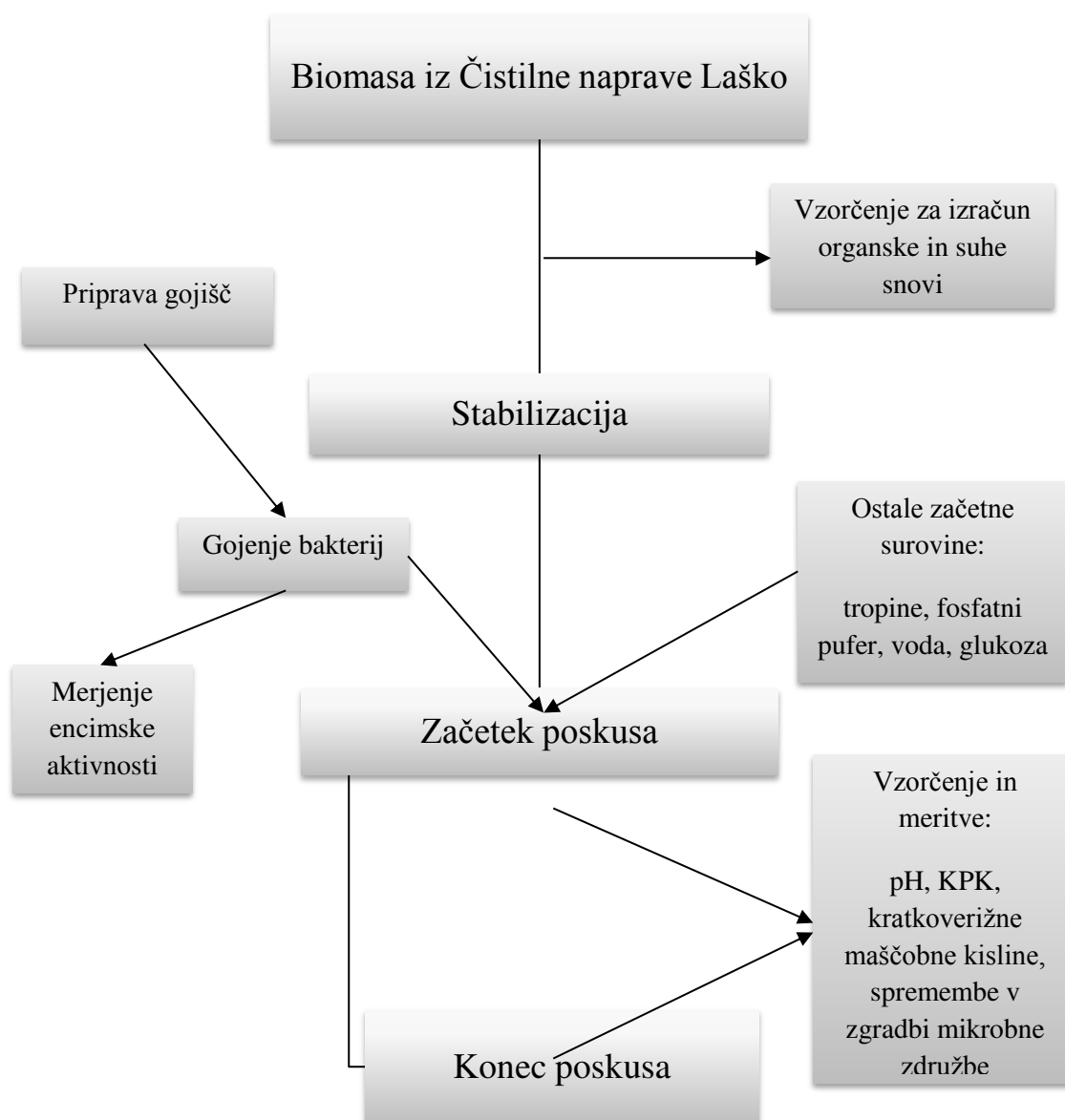
Sestavina	Količina
Tripton	1 ut%
Kvasni ekstrakt	0,25 ut%
Glukoza	0,2 ut%
Celobioza	0,2 ut%
Škrob	0,2 ut%
NaHCO <sub>3</sub>	0,4 ut%
L-cistein HCl	0,1 ut%
Mineralna raztopina 1	15,0 vol%
Mineralna raztopina 2	15,0 vol%
Vampni sok	30,0 vol%
Resazurin	0,001 ut%
Destilirana voda	40,0 vol%

Gojišče smo pred uporabo prepihali s CO<sub>2</sub> in avtoklavirali.

### 3.1.6 Drugi materiali

Mikrobna biomasa, ki smo jo uporabljali v poskusih produkcije bioplina, izvira iz UASB reaktorja Čistilne naprave Laško, ki čisti odpadno industrijsko vodo iz pivovarne, in je vsebovala povprečno 53,7 g suhe snovi/l oziroma 45,7 g organske snovi/l. Odpadne pivovarske tropine so izvirale iz Pivovarne Laško, vsebovale so 76,8 g KPK/l.

### 3.1.7 Shema Poskusa



Slika 3: Potek poskusa bioaugmentacije

## 3.2. METODE

### 3.2.1 Test biometanskega potenciala

Mikrobna biomasa s čistilne naprave Laško je predstavljala vir mikroorganizmov za proizvodnjo bioplina. V poskusih proizvodnje bioplina z in brez bioaugmentacije smo biomasi dodali substrat (pivske tropine) v primernem obsegu obremenitve, to je 0,2 g KPK substrata na g organske snovi biomase. Zato smo najprej določili suho (SS) in organsko snov (OS) biomase ter kemijsko potrebo po kisiku za substrat, ki predstavlja merilo za organsko snov v substratu.

Vsebnost SS in OS smo določali po standardnih metodah (Standard Methods..., 2006). Čiste žarilne lončke smo eno uro žarili pri 105°C, da smo odstarinili vlago, jih stehtali, v vsakega odpipetirali 10 ml biomase ter ponovno stehtali. Nato smo jih čez noč sušili pri 105°C in ponovno stehtali. Lončke smo hranili v eksikatorju med prenašanjem ali ohlajanjem, da se niso navlažili. V zadnjem koraku smo lončke žarili pri 550°C čez noč, da je ostal samo pepel, in jih ponovno stehtali. Vsebnost SS in OS smo izračunali z enačbami 1 in 2.

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

SS...suha snov (g/l)

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

$m_{lon}$ ...masa praznega lončka (g)

$V_{vz}$ ...volumen vzorca pred sušenjem (ml)

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

$m_{pož}$ ...masa lončka z vzorcem po žarjenju (g)

Vsebnost organske snovi v substratu smo določili po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.3. Biomaso smo obremenili z 0,2 g KPK substrata na 1 g organske snovi biomase.

Da smo se prepričali, da poteka proizvodnja bioplina samo na račun dodanega substrata, smo mikrobnomo biomaso en teden stabilizirali v inkubatorju pri 37 °C pred začetkom poskusa bioaugmentacije BMP.

Pripravili smo anaerobno vodo, ki smo jo segrevali do vretja, ohladili, nato pa zaprli v steklenice do uporabe pri pripravi mešanic. Fosfatni pufer smo pripravili po postopku v podpoglavju 3.1.4. (Preglednica 3).

V poskusnih mešanicah je bilo 2 g OS mikrobne biomase na liter mešanice, kar smo potem prilagodili na naš delovni volumen, kot je razvidno iz preglednice 11. Pred pripravo mešanic smo biomaso homogenizirali s homogenizatorjem Ultra-Turrax (IKA, Nemčija), da smo razbili granule in s tem sprostili mikroorganizme v suspendirano obliko.

Za bioreaktorje smo uporabili litrske steklenice z gumijastimi zamaški in kovinskimi navoji. Negativna kontrola je vsebovala samo mikrobnomo biomaso, fosfatni pufer in vodo, namenjena je bila merjenju bazalne produkcije bioplina. Pri vsakem poskusu bioaugmentacije smo spremljali tudi produkcijo bioplina iz standardnega substrata. Kot standard smo uporabljali lahko razgradljivo organsko snov – glukozo, ki smo jo dodali k osnovi, torej biomasi, pufru in vodi. Da smo preverili anaerobno razgradljivost substrata brez dodanih bakterij, smo pripravili še mešanico s tropinami, predhodno razredčenimi v razmerju 50 g tropin s 90 ml vode in homogeniziranimi, in osnovo. Pri bioaugmentaciji smo posamezne kulture bakterij dodali v deležu 5% končnega volumna testne mešanice, v primeru dodajanja kokultur smo bakterije dodajali v enakih deležih do skupnega 5% volumna testne mešanice. Za kontrolni bioreaktor smo dodali še mešanico, kjer smo dodali prazno gojišče brez bakterij. Testirali smo tudi vpliv avtoklaviranih bakterij, da smo lahko ocenili produkcijo bioplina na račun bakterijskih celic kot organskega substrata za metanogeno biomaso.

Bioreakter z negativno kontrolo (preglednica 11) je tako vseboval samo mikrobnomo biomaso in Čistilne naprave. Bioreakter s standardom je poleg mikrobne biomase vseboval glukozo kot lahko razgradljiv substrat za mikrobnomo biomaso. Bioreakter s tropinami je poleg mikrobne biomase vseboval odpadne pivovarske tropine kot substrat. Bioreakter z gojiščem s tropinami je vseboval mikrobnomo biomaso, kot njen substrat pa smo dodali tako tropine kot neuporabljeno gojišče v enakem razmerju kot kulturo bakterij, to je 5% volumna testne mešanice. Vsako različico bioreaktorja smo pripravili v dveh paralelkah, sam poskus pa smo ponovili dvakrat.



Bakterije smo predhodno gojili v gojišču M2, opisanem v podpoglavju 3.1.5 (preglednica 10), in sicer smo jih nacepili v tekoče gojišče, gojili en dan pri 37 °C, precepili v sveže gojišče in ponovno gojili en dan pri 37 °C preden smo jih uporabili v poskusu.

Preglednica 11: Zasnova poskusa

<b>Steklenica</b>	<b>Negativna kontrola</b>	<b>Standard</b>	<b>Tropine</b>	<b>Posamezna kultura</b>	<b>Mešanica dveh kultur</b>	<b>Mešanica treh kultur</b>	<b>Gojišče s tropinami</b>
Biomasa (ml)	2g OS/L	2g OS/L	2g OS/L	2g OS/L	2g OS/L	2g OS/L	2g OS/L
Glukoza (g)	-	0,2g KPK/1g OS	-	-	-	-	-
Tropine (ml)	-	-	0,2g KPK/1g OS	0,2g KPK/1g OS	0,2g KPK/1g OS	0,2g KPK/1g OS	0,2g KPK/1g OS
Fosfatni pufer (ml)	26	26	26	26	26	26	26
Kultura (ml)	-	-	-	5% vol	2,5% vol vsake	1,7% vol vsake	5% vol gojišča M2
Voda (ml)	do 650	do 650	do 650	do 650	do 650	do 650	do 650
<b>Skupaj (ml)</b>	650	650	650	650	650	650	650

Ob začetku poskusa smo vzorčili 100 ml mešanice, dodali 1 ml 50% žveplove (VI) kisline ter shranili v hladilniku za določanje kemijske potrebe po kisiku. Vzorčili smo 100 ml mešanice, centrifugirali pri 3200 obratih/minuto 5 minut, odlili supernatant, posušili čez noč pri 45°C v sušilniku ter shranili pri -20°C za namene sledenja sprememb v sestavi mikrobnih združb v času poskusa bioaugmentacije z molekularnimi tehnikami. Vzorčili smo 1,5 ml mešanice za ekstrakcijo kratkoverižnih maščobnih kislin in jih zamrznili do analiz. Mešanicam smo tudi pomerili pH.

Sestavo plinov smo merili 1., 3., 4., 7., 11., 14., 24. in 30. dan poskusa na kromatografu Shimadzu GC-14A s TCD detektorjem (Shimadzu, Japonska), s kolono PORAPAK-Q (Agilent, ZDA), priklopljenim na Shimadzu Chromatopac R-6A (Shimadzu, Japonska). Pogoji analize so bili sledeči: temperatura injektorja 50 °C, temperatura kolone 25 °C, temperatura detektorja 80 °C, tok 60 mA, nosilni plin kolone pa je bil helij. Na iste dneve smo merili tudi volumen nastalega bioplina z manometrom. Na 4., 14. in 30. dan smo vzorčili 1,5 ml mešanice za analizo kratkovrižnih maščobnih kislin. Poskus je tekkel 30 dni pri 37 °C in 120 rpm v temi, ob koncu smo ponovili vsa vzorčenja, ki smo jih opravili ob začetku poskusa.

Za lažjo primerljivost s podobnimi raziskavami smo volumne izmerjenih plinov preračunali na standardne pogoje temperature 0 °C in tlaka 1 atmosfere po enačbi 3.

$$V_0 = \frac{P_1 * V_1 * T_0}{T_1 * P_0} \quad \dots (3)$$

P0...tlak 1 atmosfera

P1...tlak v laboratoriju, podatki merilne postaje Brnik

V0...volumen plina pri standardnih pogojih

V1...volumen plina, ki smo ga izmerili med poskusom

T0...temperatura 0 °C

T1...temperatura med bioprosesom, 37 °C

### 3.2.2 Priprava vampnega soka

Vampni sok smo centrifugirali pri sobni temperaturi 30 minut pri 10 000 rpm. Po centrifugiranju smo supernatant vampnega soka odlili, ga avtoklavirali, po avtoklaviranju pa smo ob ognju prelili vsebino dveh steklenic v eno, dobro zaprli in shranili v hladilniku do uporabe.

### 3.2.3 Merjenje pH

Na začetku in koncu poskusov bioaugmentacije smo merili pH s pH-metrom pH 700 (Eutech Instruments, ZDA).

### 3.2.4 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

KPK je posredno merilo za količino organske snovi v vzorcu, ki pove, kolikšna količina kisika je potrebna za kemijsko oksidacijo organske snovi v vzorcu z močnim oksidantom, kot je kalijev dikromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Vzorec, bodisi odpadne pivovarske tropine bodisi testne mešanice pri poskusu bioaugmentacije, smo homogenizirali s homogenizatorjem Polytron PT 1200E (Kinetamica, Švica) eno minuto pri maksimalni hitrosti ter ustrezno redčili, da smo dobili vrednosti, ki se uvrstijo znotraj merilnega območja spektrofotometra. Raztopini za analizo KPK 1 in 2 smo pripravili že dan prej (Podpoglavje 3.1.4, preglednici 6 in 7). V epruveto smo odpipetirali 2,5 ml redčenega vzorca, mu dodali 1,5 ml raztopine 1, nato pa previdno po steni epruvete dodali 3,5ml raztopine 2. Inkubirali smo v termobloku pri 150 °C 2 h. Ko

so se vzorci ohladili, smo jim pomerili absorbanco pri 600 nm s spektrofotometrom Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japonska) (Standard Methods..., 2006).

### 3.2.5 Ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Ekstrakte KMK smo pripravili po delno prilagojenem postopku, ki je opisan v Anaerobe Laboratory Manual (Holdeman in sod., 1977). Vzorec smo centrifugirali tri minute pri 3000 obratih. Dodali smo 0,4 g NaCl, nato smo dodali 1 ml vzorca ter epruveto zaprli. Dodali smo 100 µl internega standarda, ki je krotionska kislina koncentracije 10 g/L, nato 200 µl 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nazadnje še 1 ml dietil etra. Vsebino epruvete smo premešali z obračanjem, nato smo jo centrifugirali na kratko do 2000 obratov, da smo ločili vodno fazo od etrske. Zgornjo etrsko fazo smo prenesli s stekleno Pasteurjevo pipeto v svežo epruveto. V prvo epruveto smo ponovno dodali 1 ml etra in ponovili ekstrakcijo – premešali, centrifugirali in prenesli etrsko fazo k prvi etrski fazi. Dodali smo eno spatulo CaCl<sub>2</sub> in dobro zaprli epruveto ter shranili v hladilniku do meritve na kromatografu Shimadzu GC-14A z detektorjem FID (Shimadzu, Japonska) in kolono DB-WAXetr (Agilent, ZDA), priključenim na Chromatopac R-6A (Shimadzu, Japonska). Pogoji analize so bili sledeči: temperatura injektorja 160 °C, temperatura detektorja 210 °C, začetna temperatura 90 °C, začetni čas 4 min, končna temperatura 160 °C, končni čas 2 min, temperaturni program 15 °C/min, nosilni plin kolone pa je bil helij.

### 3.2.6 Celulolitična in ksilanolitična encimska aktivnost

Encimsko aktivnost smo merili s kombinacijo dveh metod, z metodo redukcijskih sladkorjev (Lever, 1997) in merjenjem vsebnosti proteinov v vzorcu z metodo po Lowryju (Lowry in sod., 1951).

Ob cepitvi polisaharida nastaneta dve krajši verigi, pri tem nastane nova karbonilna skupina, ki ima sposobnost oksidacije. Na sposobnost encima, da razgrajuje določen polisaharid, sklepamo po količini nastalih karbonilnih skupin oz. redukcijskih koncev, ki reagirajo s hidrazidom benzojske kisline (PAHBAH) in dajejo obarvane produkte. Za testiranje celulolitične in ksilanolitične aktivnosti smo pripravili 1% raztopine substrata, to je brezov ksilan za testiranje ksilanazne aktivnosti ter CMC in Avicel celulozo za testiranje celulazne aktivnosti, v 50 mM fosfatnem pufru pH 6,5. 20 µl vzorca kulture smo dodali 230 µl 1% substrata, mešanico dobro premešali in inkubirali 150 minut pri 37 °C. Za kontrolo ustreznosti izvedbe testa smo pripravili tudi kontrolne vzorce, ki smo jih pred pomešanjem s substratom 15 minut segrevali pri 100 °C in s tem inaktivirali encime. Po končani inkubaciji smo ustavili delovanje encimov z dodatkom 10% trikloroacetne kisline. Pripravili smo reagenčno mešanico PAHBAH, ki je obstojna le eno uro, zato smo jo

pripravili tik pred uporabo po navodilih v spodnji preglednici 12. V epruveto smo odpipetirali 5 ml reagenčne mešanice in dodali 100 µl inkubiranih vzorcev, pomešali in 10 minut kuhamo pri 100°C, potem smo epruvete hitro ohladili v hladni vodi. Če je v vzorcih prišlo do razgradnje polisaharidov, so se pojavili rumeno obarvani produkti, absorbanco smo odčitali na spektrofotometru Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japonska) pri 420 nm. Umeritveno krivuljo smo si predhodno pripravili s ksilozo za ksilan in z glukozo za celulozo (Lever, 1977).

Preglednica 12: Sestava reagenčne mešanice PAHBAH

Reagenčna mešanica PAHBAH	
Reagent	Količina za 100 ml raztopine
1M Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	5 ml
0,5M Na citrat	5 ml
5M NaOH	5 ml
Destilirana voda	80 ml
0,2M CaCl <sub>2</sub>	5 ml
PAHBAH	1 g

Metoda po Lowryju omogoča merjenje količine proteinov v vzorcu, s tem smo zmerili količino encimov, da smo lahko ovrednotili specifično encimsko aktivnost. Pripravili smo reagent Lowry A, ki je 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Lowry B, ki je 1% NaK-tartrat in 0,5% CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O. Pred uporabo smo ju zmešali v razmerju 50:1, pred uporabo smo tudi razredčili Folin Ciocalteu-jev reagent z destilirano vodo v razmerju 1:1. Z vzorci kulture smo delali v dveh ponovitvah, pripravili smo si neredčene in redčene vzorce, in sicer v redčinah 1:10, 1:20 in 1:50. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 125 µl vzorca in mu dodali 125 µl 1M NaOH. Za ničelni vzorec smo vzeli vodo mili Q namesto vzorca. Vzorce smo dobro zaprli in kuhali pri 100 °C 5 minut. Pripravili smo si redčitve govejega serumskega albumina z vodo miliQ za umeritveno krivuljo in z njimi ravnali enako. Ko so se vzorci ohladili, smo jim dodali 625 µl mešanice reagenta Lowry A in B ter 125 µl redčenega Folin Ciocalteu-jevega reagenta ter premešali. Razvoj barve je potekal 30 minut in je bil stabilen 60 minut, v tem času smo pomerili absorbanco na spektrofotometru Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japonska) pri 700 nm (Lowry in sod., 1951).

Specifično celulolitično in ksilanolitično encimsko aktivnost smo izračunali z enačbo 4.

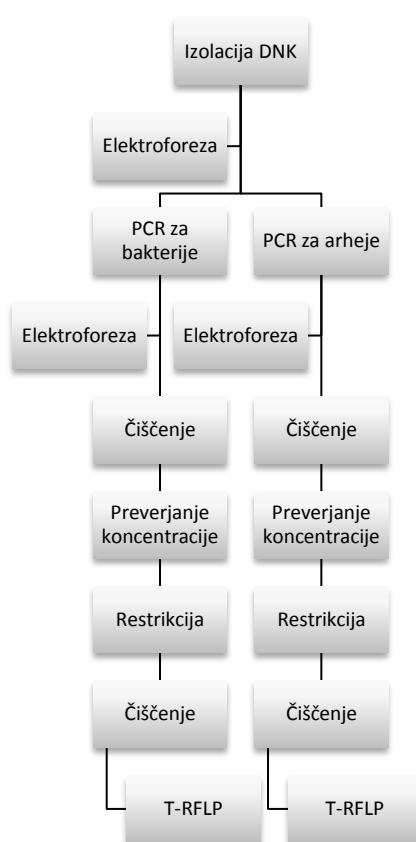
$$\text{Specifična encimska aktivnost} = (\Delta RS * 280 \mu l / 1000 / 1000) / (c_p * 0,02 \text{ ml} * 150 \text{ min}) \dots(4)$$

$\Delta$ RS .... Količina sproščenih redukcijskih sladkorjev (mmol/l)

$c_p$  ..... Koncentracija proteinov ( $\mu$ g/ml)

### 3.2.7 Sledenje spremembam v sestavi mikrobne združbe

Spremembam v sestavi mikrobne združbe smo sledili z metodo polimorfizma dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP), za to pa je bila najprej potrebna izolacija DNK iz vzorcev biomase in pomnožitve le te z verižno reakcijo s polimerazo ali PCR (slika 4).



Slika 4: Shematski potek dela pri tehniki T-RFLP

Izolacija DNA je potekala s kitom PowerSoil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories Inc., ZDA). Sledili smo postopku, ki ga predpisuje proizvajalec kita, vendar smo namesto 0,25 g vzorca uporabili samo 0,15 g vzorca zaradi boljšega izplena izolacije.

Za elektroforezo smo pripravili 1% agarozni gel iz 40 ml 5xTBE (pH 8,3) in 0,4 g agaroze. Elektroforeza je potekala pri 100 V 25 minut, sledilo je barvanje v etidijevem bromidu 10 minut in razbarvanje v destilirani vodi 15 minut. Gel smo slikali z UV kamero Chemi

Genius (Syngene, Velika britanija) z uporabo programa Gene Snap (Syngene, Velika Britanija). Za določanje ustreznosti poteka elektroforeze in ustrezne velikosti pomnožkov smo uporabljali 1 kb lestvico Gene Ruler (Fermentas, ZDA).

V PCR komori smo pripravili PCR mešanico po navodilih v preglednici 13. Pripravili smo 24  $\mu\text{l}$  mešanice za vsak vzorec v čisti komori. Izven komore smo dodali 1  $\mu\text{l}$  DNA izolirane iz naših vzorcev. Uporabili smo napravi za PCR GenAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, ZDA) ali SuperCycle Thermal Cycler AS300 T (Kyratech, Avstralija). Za PCR reakcijo smo uporabili oligonukleotidne začetnike fD1-FAM (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') in 926r (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Odlare in sod., 2011) za bakterije ter 109f-FAM (5'-AC(G/T)GCTCAGTAACACGT-3') in 915r (5'-GTGCTCCCCCGCCAATTCCT-3') za arheje (Peng in sod., 2008), oboje proizvajalca Fermentas. Uporabili smo Taq polimerazo koncentracije 5U/ $\mu\text{l}$  in mešanico posameznih nukleotidov proizvajalca Thermo Scientific, ZDA. Uporabili smo Sigma vodo proizvajalca Sigma-Aldrich, ZDA, ki je sterilno filtrirana ter brez DNaz in RNaz, ki bi vplivale na reakcijo PCR. Uporabili 10x pufer za PCR podjetja Sigma-Aldrich, ZDA.

Preglednica 13: Sestava PCR mešanice

SESTAVINA	Količina za 1 reakcijo
10x Pufer pH 8,3	2,5 $\mu\text{l}$
25mM $\text{MgCl}_2$	1,5 mM
2mM Mešanica posameznih nukleotidov	0,2 mM
10 $\mu\text{M}$ Oligonukleotidni začetnik 1	0,3 $\mu\text{M}$
10 $\mu\text{M}$ Oligonukleotidni začetnik 2	0,3 $\mu\text{M}$
Taq polimeraza (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,5U
Sigma voda	Do skupnega volumna 25 $\mu\text{l}$

Preglednica 14: Temperaturni program za PCR bakterij Preglednica 15: Temperaturni program za PCR arhej

Temperatura	Čas
95°C	5 min
95°C	<u>30 s</u>
55°C	<u>30 s</u>
72°C	<u>1 min</u>
72°C	7 min

*ponovi 25-30x*

Temperatura	Čas
95°C	5 min
95°C	<u>30 s</u>
52°C	<u>45 s</u>
72°C	<u>1,3 min</u>
72°C	7 min

*ponovi 25-30x*

Verižni reakciji pomnoževanja s polimerazo je sledila elektroforeza, ki je potekala na enak način kot elektroforeza po izolaciji DNK. Za čiščenje pomnožkov PCR smo uporabili kit High pure PCR Product Purification kit (Roche, Švica), sledili smo navodilom proizvajalca kita.

Koncentracijo DNK smo merili s spektrofotometrom Nanovue (GE Healthcare, Velika britanija), da smo ocenili koncentracijo pomnožkov DNA za izračun ustrezne sestave restrikcijske mešanice.

Za restrikcijo smo 300 ng bakterijske DNK oziroma 400 ng arhejske DNK razredčili s Sigma vodo do skupnega volumna 25,5  $\mu$ l. Pripravili smo mešanico restrikcijskega pufra (Fermentas, ZDA) in restrikcijskega encima BsuRI (Fermentas, ZDA), ki cepi na sredini zaporedja GGCC, in sicer 3  $\mu$ l restrikcijskega pufra in 1,5  $\mu$ l encima na vzorec. Vsakemu vzorcu smo dodali to mešanico in inkubirali 16 ur pri 37 °C. Temu je sledila inaktivacija encima, ki je potekala pri 83 °C 20 minut. Drugo čiščenje, po restrikciji, je potekalo enako kot prvo.

Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли do 5  $\mu$ l restrikcijske mešanice v posamezno luknjico in ji dodali mešanico formamida, 8  $\mu$ l na vzorec, in barvila Rox, 0,5  $\mu$ l na vzorec (oboje Thermo Scientific, ZDA). Uporabljali smo interni velikostni standard GeneScan<sup>TM</sup> – 500 ROX<sup>TM</sup>. Vzorce smo nato denaturirali pri 95 °C 5 minut in jih potem ohladili na ledu. Za ločevanje terminalnih restrikcijskih fragmentov smo uporabili napravo za kapilarno gelsko elektroforezo ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, ZDA).

Za obdelavo podatkov smo uporabili program BioNumerics (Applied Maths, Belgija).

## 4 REZULTATI

### 4.1 CELULOLITIČNA IN KSILANOLITIČNA ENCIMSKA AKTIVNOST IZBRANIH HIDROLITIČNIH BAKTERIJ ZA BIOAUGMENTACIJO

Merili smo ksilanolitično in celulolitično encimsko aktivnost izbranih hidrolitičnih bakterij.

Vse tri hidrolitične bakterije izražajo ksilanolitično in celulolitično encimsko aktivnost, *C. cellulovorans* ima najnižjo ksilanolitično in najvišjo celulolitično encimsko aktivnost. *F. succinogenes* S85 in *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> imata podobno ksilanolitično encimsko aktivnost, medtem ko ima *F. succinogenes* S85 najnižjo celulolitično encimsko aktivnost pri pogojih kultivacije, ki so opisani v podpoglavju 3.2.1. (Preglednica 16).

Preglednica 16: Encimska aktivnost izbranih hidrolitičnih bakterij za bioaugmentacijo

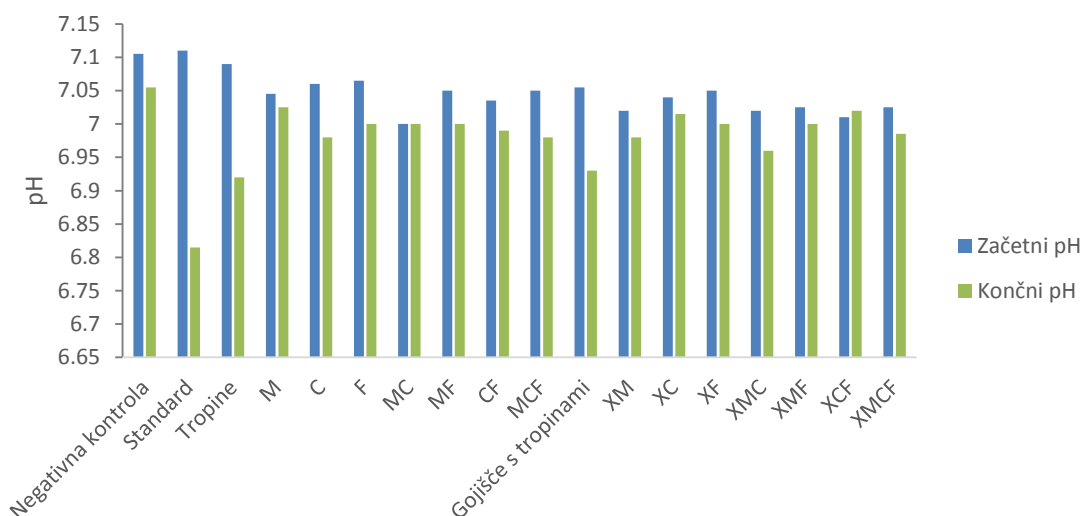
Encimska aktivnost		
Bakterijska kultura	Ksilanolitična aktivnost (mmol RS/mg/min)	Celulolitična aktivnost (mmol RS/mg/min)
<i>Clostridium cellulovorans</i>	$1,69 \cdot 10^{-7}$	$7,86 \cdot 10^{-6}$
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	$3,92 \cdot 10^{-6}$	$9,24 \cdot 10^{-7}$
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans</i> Mz5 T	$4,24 \cdot 10^{-6}$	$4,42 \cdot 10^{-6}$

RS - Redukcijski sladkorji

### 4.2 PRVI POSKUS BIOAUGMENTACIJE (BMP 1)

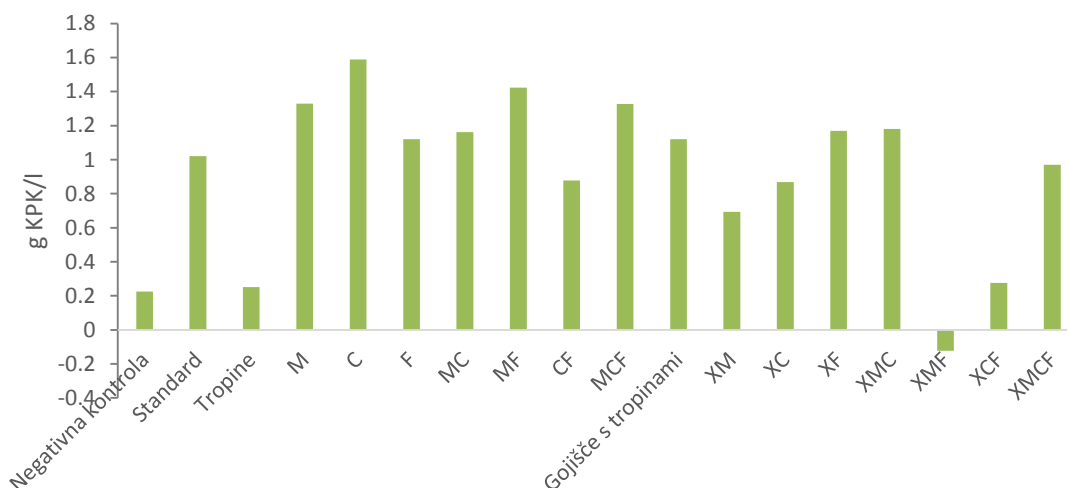
Merili smo pH v bioreaktorjih na dan 0 in dan 30 (slika 5). Pri prvem poskusu bioaugmentacije se vrednost pH med poskusom ni pomembno spremenila, v času bioprocesa se je navadno nekoliko znižala. Vrednosti pH gojiščatakoj po inokulaciji so se gibale med pH 7,00 in 7,11, po 30 dnevni inkubaciji pa se je pH vrednost nahajala med pH 6,82 in 7,06.





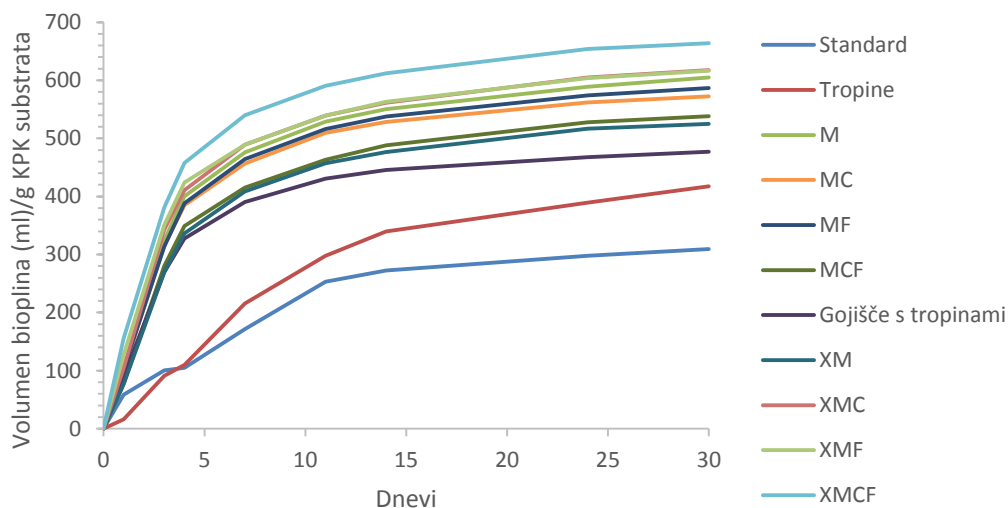
Slika 5: Prikaz začetnih in končnih vrednosti pH v testu BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Vrednosti KPK (slika 6) so se med poskusom bioaugmentacije BMP 1 znižale, razen v primeru bioreaktorja z dodano kokulturo avtoklaviranih hidrolitskih bakterij *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85. Razpon vrednosti KPK na začetku poskusa je bil med 2,0 in 3,9 g KPK/l, povprečna vrednost je bila 3,1 g KPK/l. Na koncu poskusa so bile vrednosti KPK nižje, in sicer je bil razpon KPK od 1,5 do 2,8 g KPK/l, povprečna vrednost KPK je bila 2,2 g KPK/l. Vrednosti KPK negativne kontrole in tropin so se samo malo znižale, povprečno pa so se vrednosti KPK v testnih bioreaktorjih znižale podobno kot pri standardu, povprečno za 1 g KPK/l.

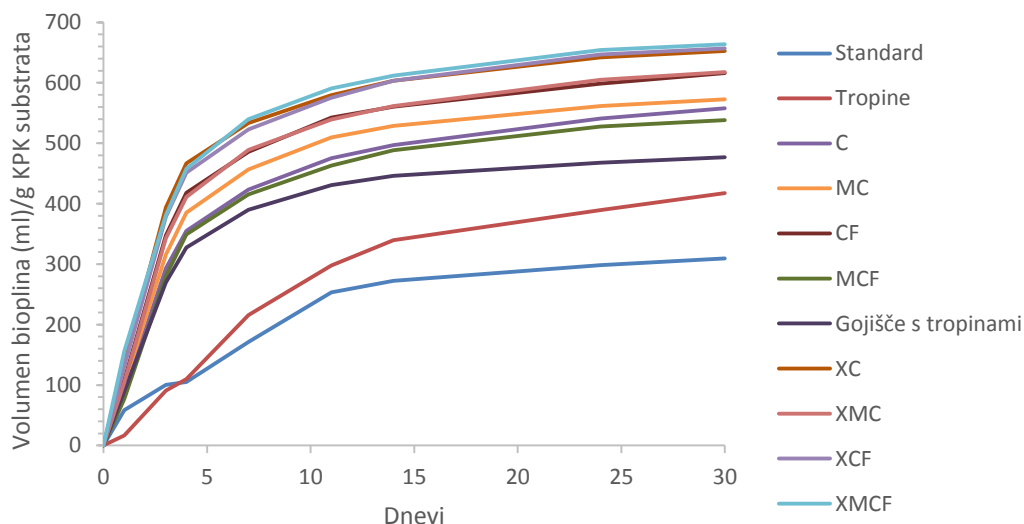


Slika 6: Redukcija KPK med testom BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

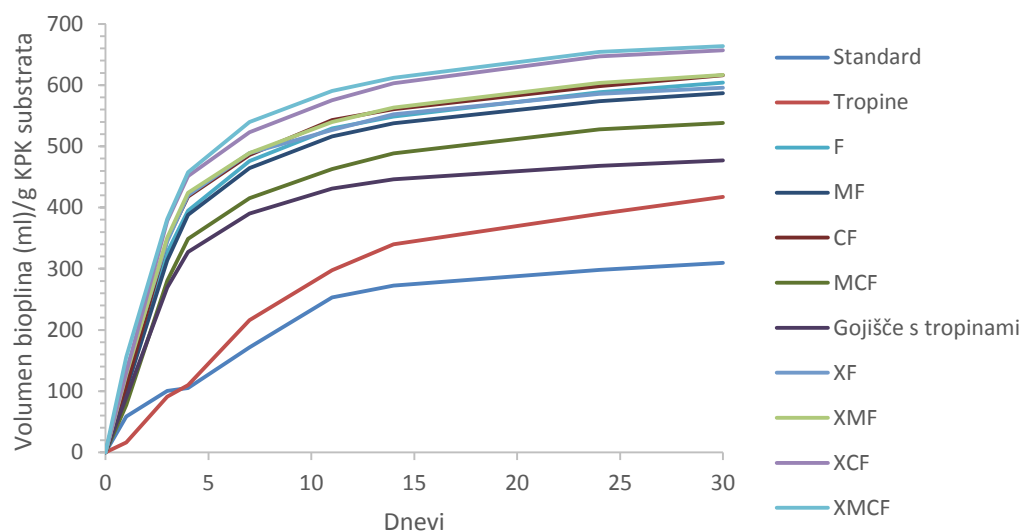
V poskusu bioaugmentacije BMP 1 smo merili produkcijo bioplina in metana, za boljšo primerjavo med bioreaktorji smo volumen bioplina preračunali na skupni imenovalec, in sicer na g KPK dodanega substrata, ter normalizirali volumne na temperaturo 0 °C in tlak 1 atmosfero, kot je opisano v podpoglavju 3.2.1 (Slike 7a, 7b in 7c).



Slika 7a: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



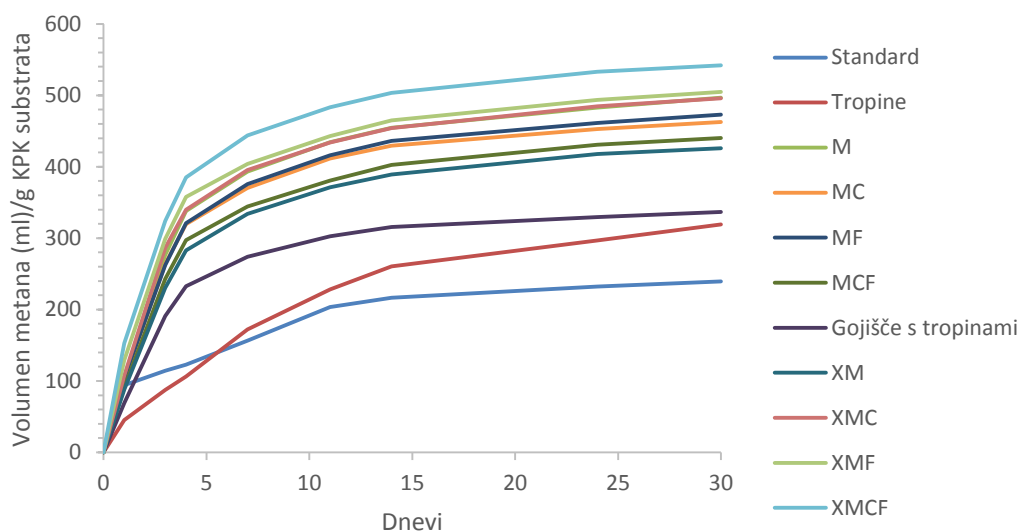
Slika 7b: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



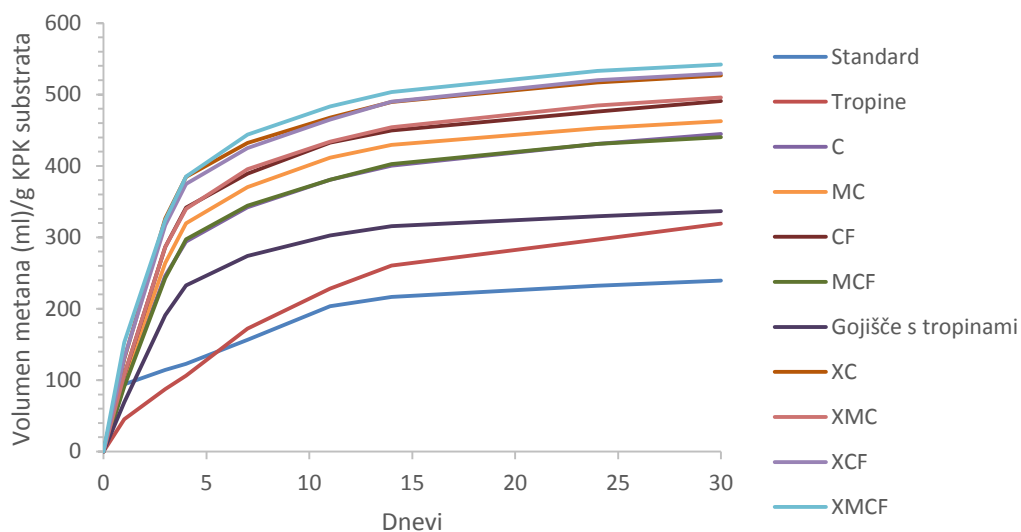
Slika 7c: Produkcija bioplina v poskusu BMP 1 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami, prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni bioplina z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Največje povečanje produkcije oziroma donosa bioplina (slike 7a, 7b in 7c) glede na bioreaktor s tropinami smo zabeležili v bioreaktorjih s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (47,6 %), kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (44,8 %) ter kulturo *F. succinogenes* S85 (44,7 %). V bioreaktorjih z dodanimi avtoklaviranimi kulturami bakterij je bila produkcija bioplina večja, največja je bila v bioreaktorjih z dodano avtoklavirano kokulturo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Clostridium cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85 (59,0 %), kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (57,3 %) in kulturo *C. cellulovorans* (56,4 %). Najnižjo produkcijo bioplina smo izmerili v bioreaktorjih z dodano kulturo *C. cellulovorans* (33,7 %), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (29,0 %) ter avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (25,8 %).

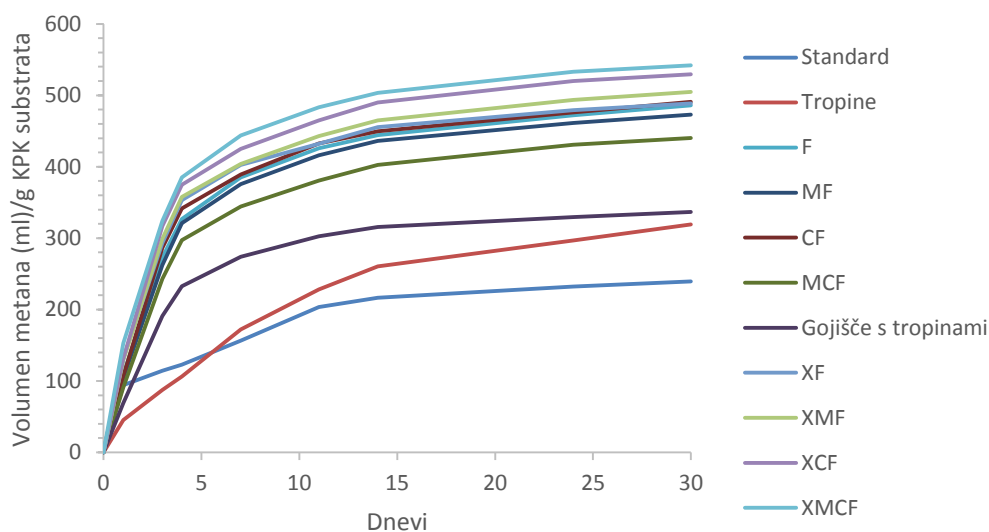
Pri produkciji bioplina smo upoštevali skupni nastali plin, katerega večinski delež predstavlja metan. S plinsko kromatografijo smo sledili deležu metana med poskusom bioaugmentacije BMP 1 (priloga A1) in iz izmerjenega deleža izračunali volumen nastalega metana. Volumen nastalega metana smo normalizirali na g KPK dodanega substrata. Normalizirani volumni metana v poskusu bioaugmentacije BMP 1 so prikazani na slikah 8a, 8b in 8c.



Slika 8a: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



Slika 8b: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

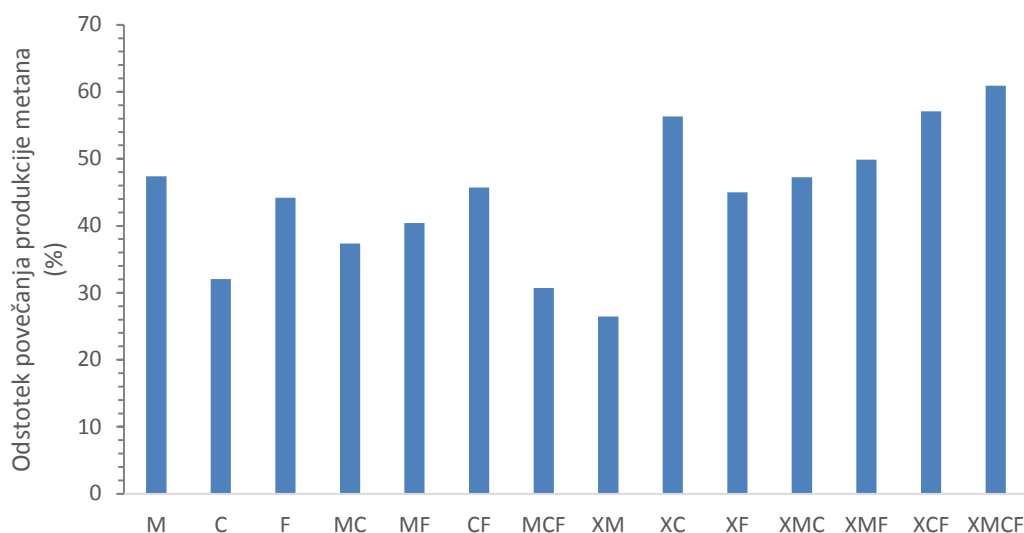


Slika 8c: Produkcija metana v poskusu BMP1 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunani na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Največjo produkcijo oziroma donos metana (slike 8a, 8b in 8c) glede na bioreaktor s tropinami smo izmerili pri bioreaktorjih z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (55,5 %), kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (53,8 %) ter kulturo *F. succinogenes* S85 (52,2 %). Primerjalno so pri dodanih avtoklaviranih kulturah imeli največjo produkcijo metana bioreaktorji z dodano avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (69,8 %), kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (65,8 %) in kulturo *C. cellulovorans* (65,0 %). Najnižji volumni metana so bili v bioreaktorjih z dodano avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (33,5 %), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (38,0 %) ter kulturo *C. cellulovorans* (39,3 %). V vseh testnih bioreaktorjih so nastali večji volumni metana kot pri tropinah in tudi kot pri tropinah z gojiščem.

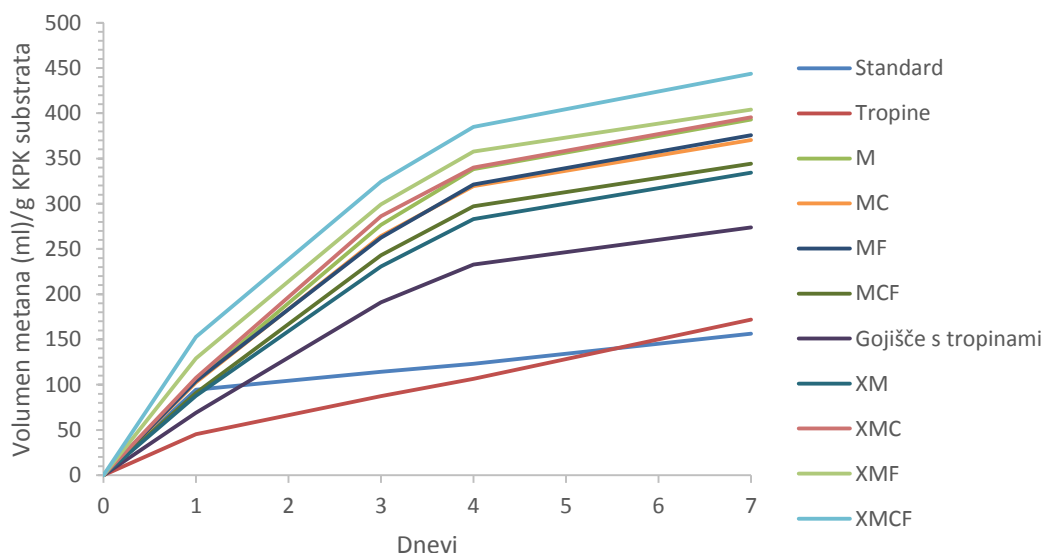
Donos metana smo med bioreaktorji primerjali tudi glede na produkcijo pri bioreaktorju z neinokuliranim gojiščem s tropinami (slika 9). Donos metana so najbolj povečale dodana kultura *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (47,38 %), kokultura *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (45,7 %) ter kultura *F. succinogenes* S85 (44,19 %). Primerjalno se je donos metana pri bioreaktorjih z avtoklaviranimi bakterijami najbolj povečal pri dodani avtoklavirani kokulturi *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (60,89 %), kokulturi *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* (57,1 %) in kulturi *C. cellulovorans* (56,32 %). Najmanj se je donos metana povečal v bioreaktorjih s kulturo *C. cellulovorans* (32,03 %).

%), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (30,7 %) ter z avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (26,46 %).

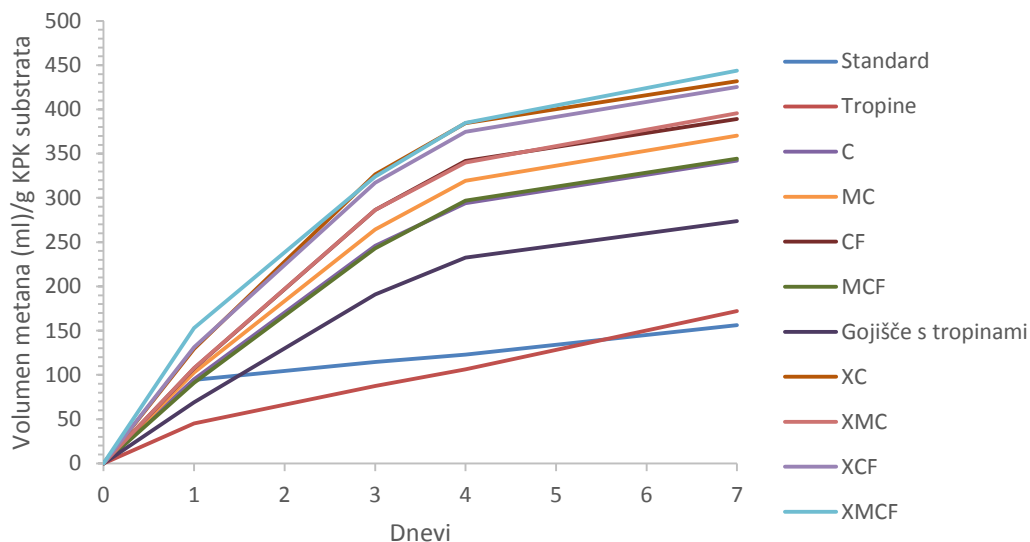


Slika 9: Odstotki povečanja donosa metana na g KPK substrata glede na kontrolni bioreaktor z neinokuliranim gojiščem in tropinami pri poskusu BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

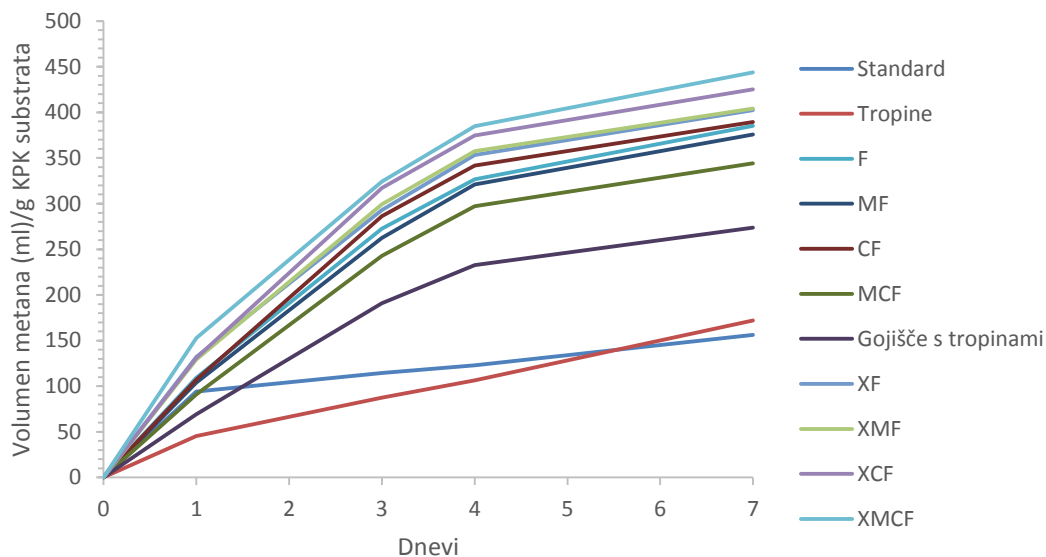
Produkcija metana je v prvem tednu zelo intenzivno naraščala, zato smo normalizirano produkcijo metna prikazali posebej samo za prvo teden poskusa (slike 10a, 10b in 10c).



Slika 10a: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



Slika 10b: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



Slika 10c: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 1 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Iz podatkov o produkciji metana v prvem tednu poskusa bioaugmentacije smo izračunali specifično produktivnost metana v prvih treh dneh na liter bioreaktorske mešanice, podatki so v preglednici 17. Najintenzivnejša produkcija metana v prvih dneh je bila opazna v bioreaktorjih z dodano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (212,2 ml/l dan), kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (204,9 ml/l dan) in kulturo *F. succinogenes* S85 (202,1 ml/l dan), vsi bioreaktorji z dodanimi kulturama pa so imeli večjo specifično produktivnost kot je bila v bioreaktorju s tropinami z gojiščem (141,4 ml/l dan). Primerjalno so avtoklavirane kontrole dosegle večjo specifično produktivnost metana, razen v primeru bioreaktorja z avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (170,7 ml/l dan). Največje specifične produktivnosti metana pri bioreaktorjih z dodanimi avtoklaviranimi kulturami so dosegli bioreaktorji z avtoklavirano kulturo *C. cellulovorans* (241,8 ml/l dan), avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (240,2 ml/l dan) ter avtoklavirano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (234,9 ml/l dan).

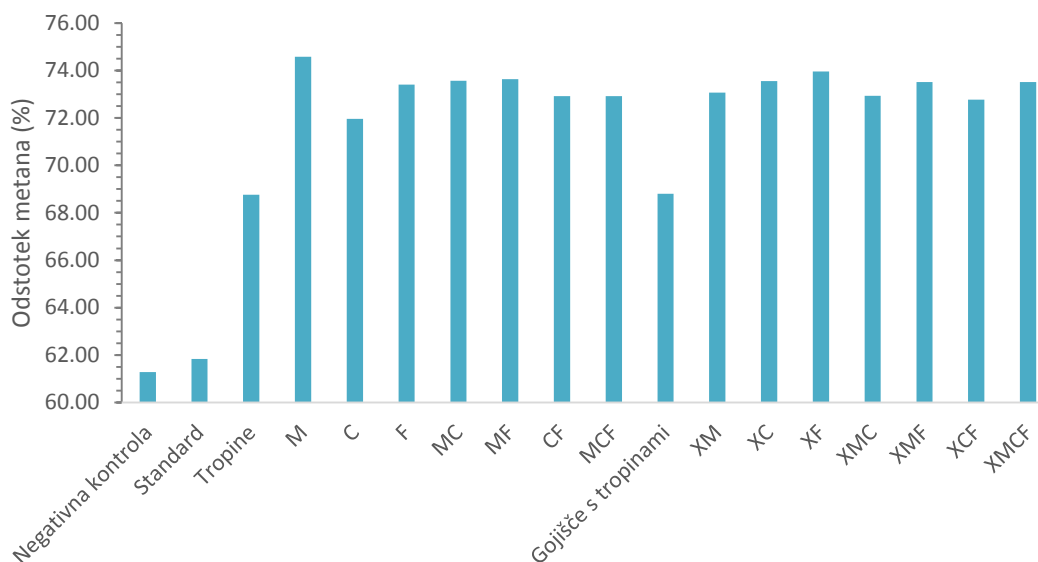
Preglednica 17: Specifična produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa BMP 1

Bioreaktor	Specifična produktivnost (ml/l dan)
Standard	84,8
Tropine	64,8
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	204,9
<i>C. cellulovorans</i>	182,2
<i>F. succinogenes</i> S85	202,1
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	195,7
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	194,3
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	212,2
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	180,0
Gojišče s tropinami	141,4
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	170,7
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	241,8
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	217,0
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	212,1
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	221,6
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	234,9
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	240,2

Iz meritev na zadnji dan poskusa smo izračunali tudi deleže metana v posameznih bioreaktorjih ob koncu poskusa (slika 11). Deleža metana negativne kontrole (61 %) in standarda (62 %) sta približno enaka, deleža pri tropinah in neinokuliranem gojišču s



tropinami sta tudi približno enaka, 69 %, deleži metana v vzorcih pa so nekoliko višji, povprečno 73 %. Najvišjo vsebnost metana ima bioreaktor z bakterijo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, in sicer 74,6 % metana.



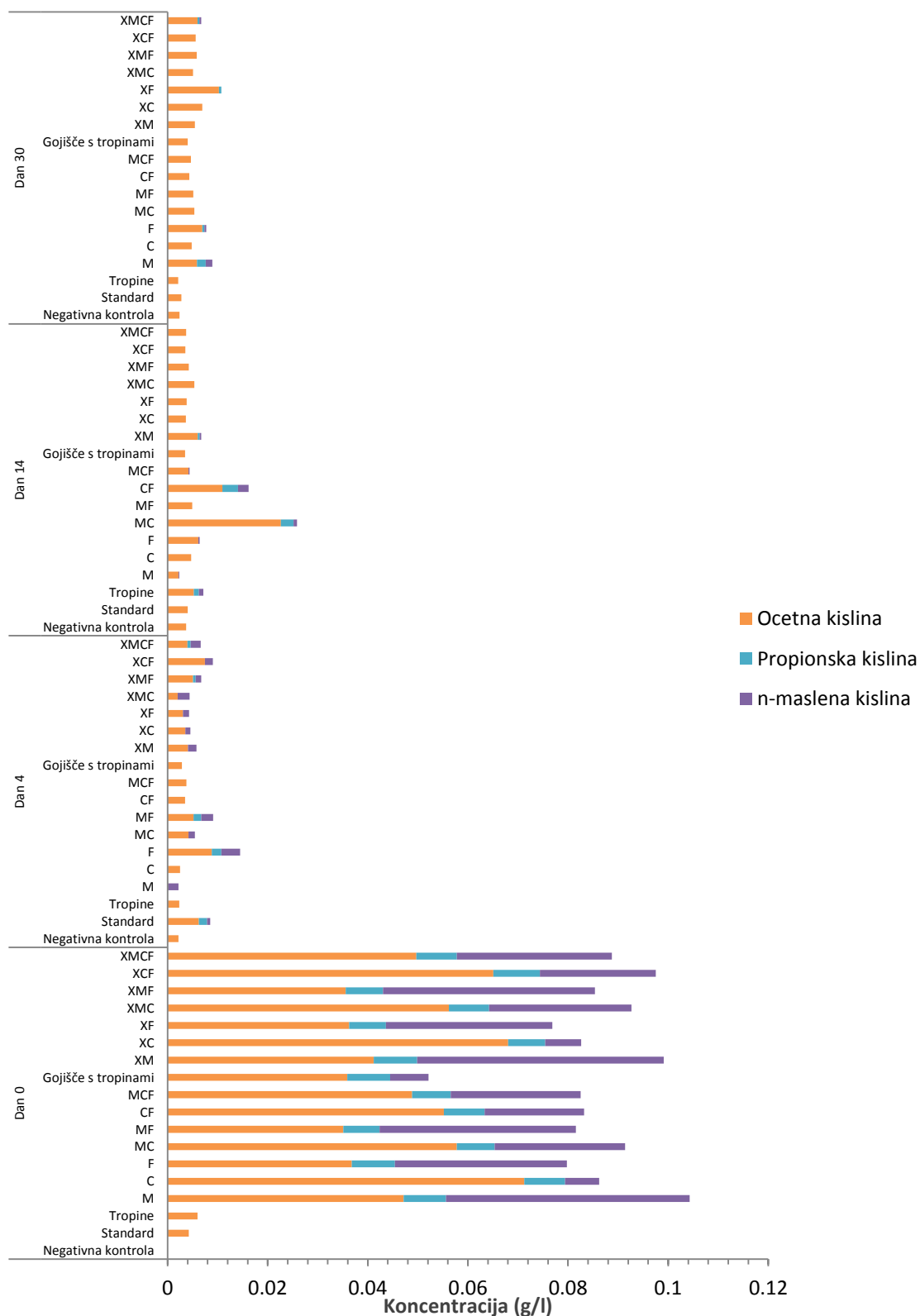
Slika 11: Povprečni delež metana v steklenicah na dan 30 za poskus BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Pridobljene rezultate smo želeli primerjati tudi z drugimi raziskavami, zato smo podatke uredili še v obliki donosa metana na g dodane organske snovi, to je na g KPK dodanega substrata (Preglednica 18). Največji donos metana smo dosegli z dodanimi avtoklaviranimi bakterijami, in sicer s kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S 85 (542 ml metana/g KPK), kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (529,3 ml metana/g KPK) ter kulturo *C. cellulovorans* (526,6 ml metana/g KPK). V bioreaktorjih, kjer so bile dodane žive bakterije, se je donos metana najbolj povečal s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (496,5 ml metana/g KPK), kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (490,9 ml metana/g KPK) ter kulturo *F. succinogenes* S85 (485,8 ml metana/g KPK). V vseh primerih je bil donos metana večji od 400 ml metana/g KPK substrata, bioreaktorji z avtoklaviranimi bakterijami pa so presegli donos 500 ml metana /g KPK substrata. Najmanj metana na g KPK substrata so proizvedli bioreaktorji s kulturo *C. cellulovorans* (444,8 ml metana/g KPK), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (440,3 ml metana/g KPK) ter avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (426,0 ml metana/g KPK).

Preglednica 18: Donos metana glede na g KPK substrata v poskusu BMP 1

<b>Bioreaktor</b>	<b>ml metana/g KPK</b>
Standard	239,6
Tropine	319,2
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	496,5
<i>C. cellulovorans</i>	444,8
<i>F. succinogenes</i> S85	485,8
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	462,7
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	473,0
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	490,9
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	440,3
Gojišče s tropinami	336,9
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	426,0
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	526,6
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	488,5
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	496,1
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	504,9
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	529,3
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	542,0

Med poskusom smo merili tudi koncentracijo kratkoverižnih maščobnih kislin, kot pomembnih vmesnih produktov anaerobne razgradnje, in sicer smo sledili koncentracijam očetne, propionske, izo-maslene, n-maslene, izo-valerenske, n-valerenske in n-kaprnske kisline (slika 12).

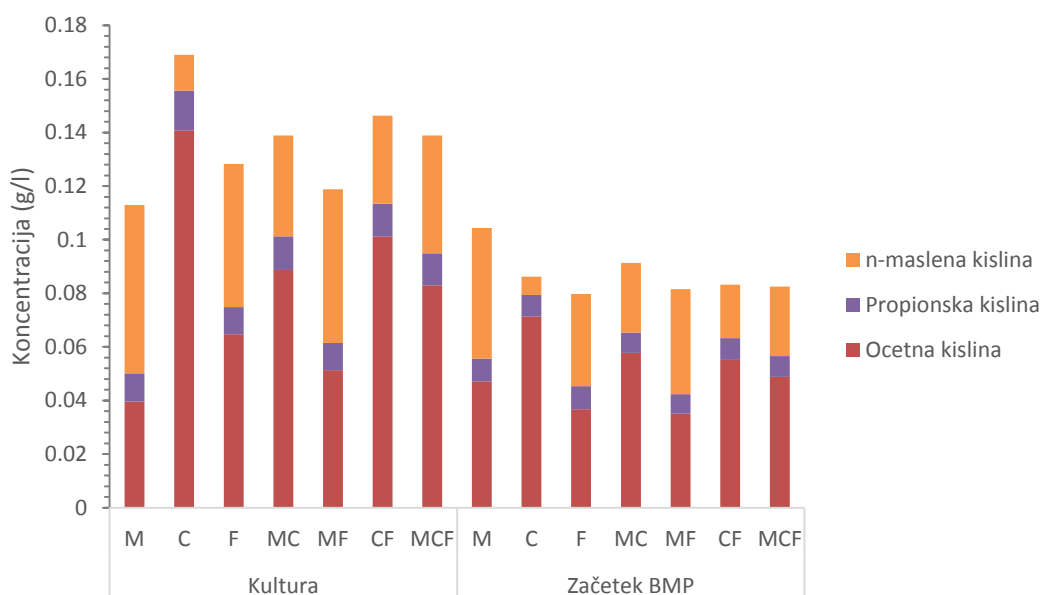


Slika 12: Koncentracije očetne, propionske in n-maslene kisline v poskusu BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin so bile najvišje ob začetku poskusa, najvišje koncentracije so dosegle očetna, propionska in n-maslenska kislina. Koncentracija očetne kisline se je gibala v območju od 0,042 g/l do 0,0052 g/l. Koncentracija n-maslene kisline je bila nekoliko manjša, gibala se je v območju od 0,024 g/l do meje našega zaznavanja. Koncentracija propionske kisline se je gibala od začetne 0,0067 g/l do točke, ko je v večini bioreaktorjev nismo več zaznali.

Ostale kisline so bile prisotne, vendar so bile njihove koncentracije vseskozi pod 0,009 g/l.

Del kratkoverižnih maščobnih kislin prispeva dodana kultura hidrolitskih bakterij, prispevek smo merili pri treh kratkoverižnih maščobnih kislinah, ki so prisotne v najvišjih koncentracijah v vzorcih, to so očetna, propionska in n-maslenska kislina. Izraz kultura označuje čiste kulture bakterij, začetek BMP pa stanje v bioreaktorjih ob začetku poskusa. Kot je razvidno iz slike 13, so bile koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v kulturi bakterij višje kot v bioreaktorjih.

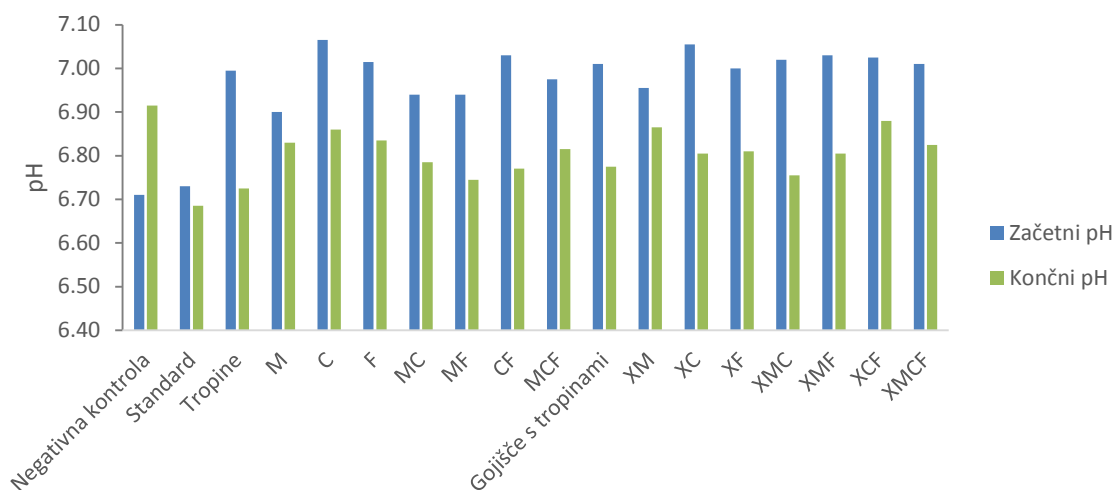


Slika 13: Doprinos kulture h koncentracijam očetne, propionske in n-maslene kisline na dan 0 pri poskusu BMP 1; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

#### 4.3 DRUGI POSKUS BIOAUGMENTACIJE (BMP 2)

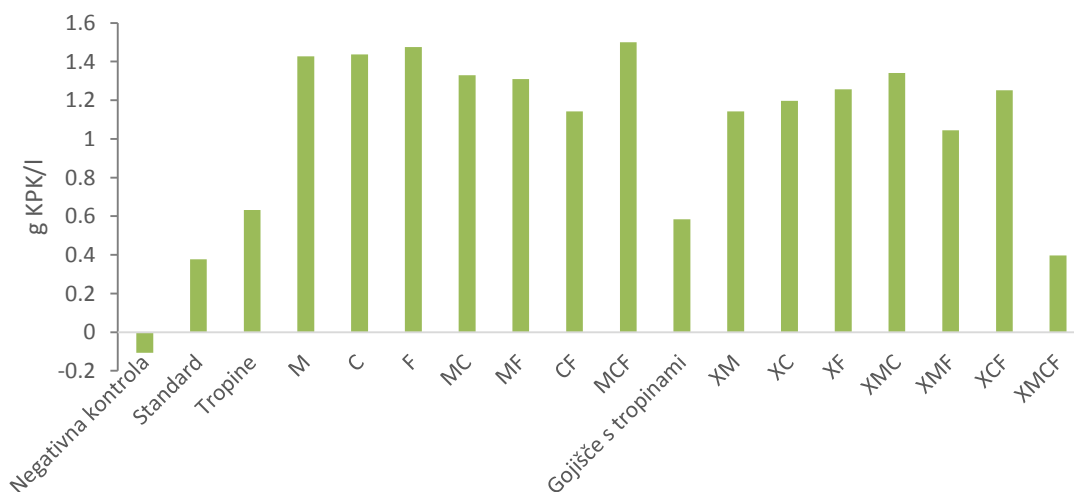
Pri drugem poskusu bioaugmentacije smo tudi merili pH bioreaktorske vsebine na prvi in zadnji dan poskusa (slika 14), pH vrednosti na dan 0 so bile med 6,71 in 7,07, na dan 30 pa

so bile vrednosti med pH 6,69 in 6,92. Vrednosti so se sicer rahlo znižale med poskusom, vendar pa ni prišlo do pomembne spremembe.



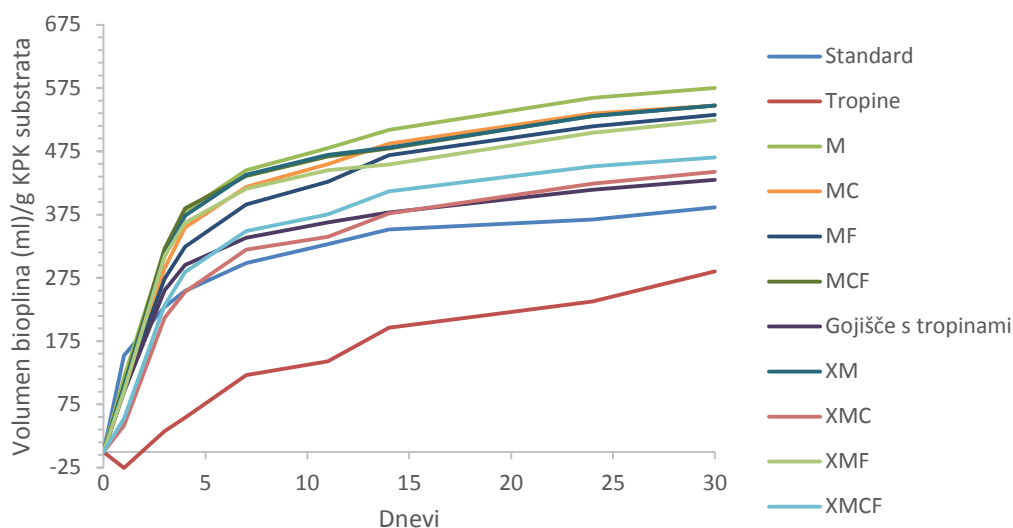
Slika 14: Začetni in končna pH vrednost pri poskusu bioaugmentacije BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Vrednosti KPK (slika 15) v posameznih bioreaktorjih so se med testom BMP 2 znižale v vseh bioreaktorjih, razen pri negativni kontroli. Začetne vrednosti KPK so se gibale med 1,4 in 3,4 g KPK/l, povprečna vrednost je bila 2,8 g KPK/l. Na koncu poskusa so bile vrednosti KPK v območju med 1,4 in 2,2 g KPK/l, povprečna vrednost je bila 1,8 g KPK/l. Vrednosti KPK so se tekom poksusa znižale za povprečno 1,2 g KPK/l.

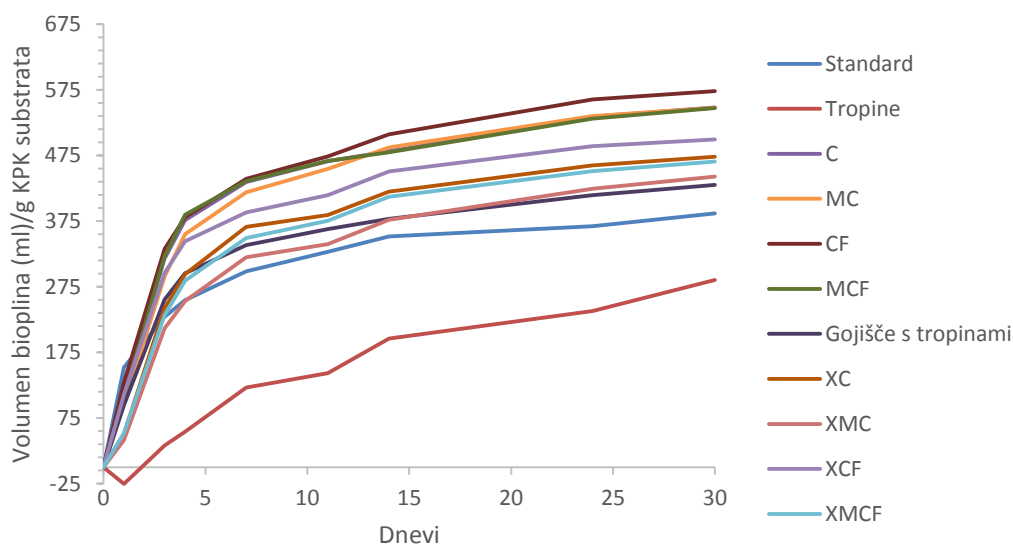


Slika 15: Redukcije vrednosti KPK med poskusom bioaugmentacije BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

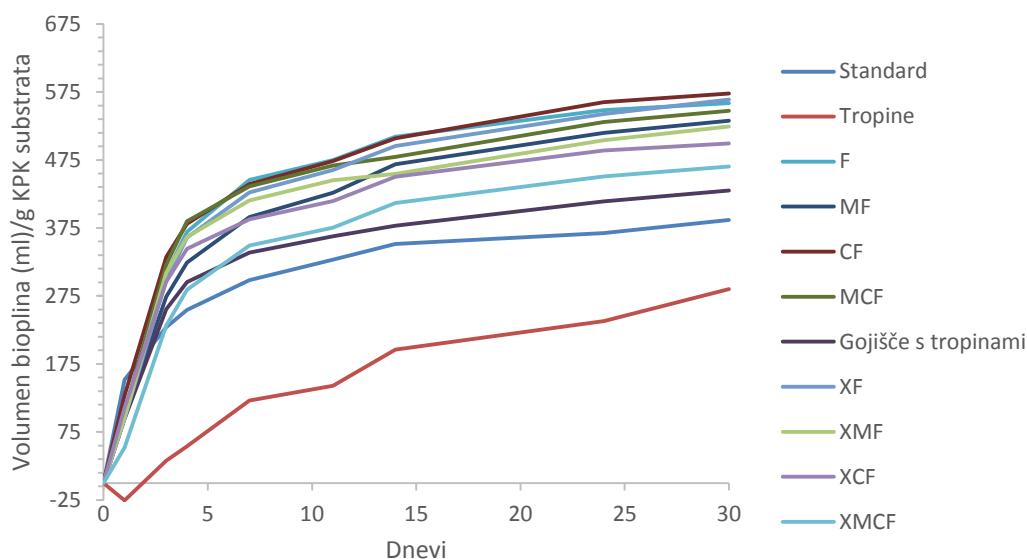
Kot pri prvem testu, smo tudi pri drugem testu merili nastajanje bioplina, vrednosti pa smo preračunali na g KPK dodanega substrata (slike 16a, 16b in 16c).



Slika 16a: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



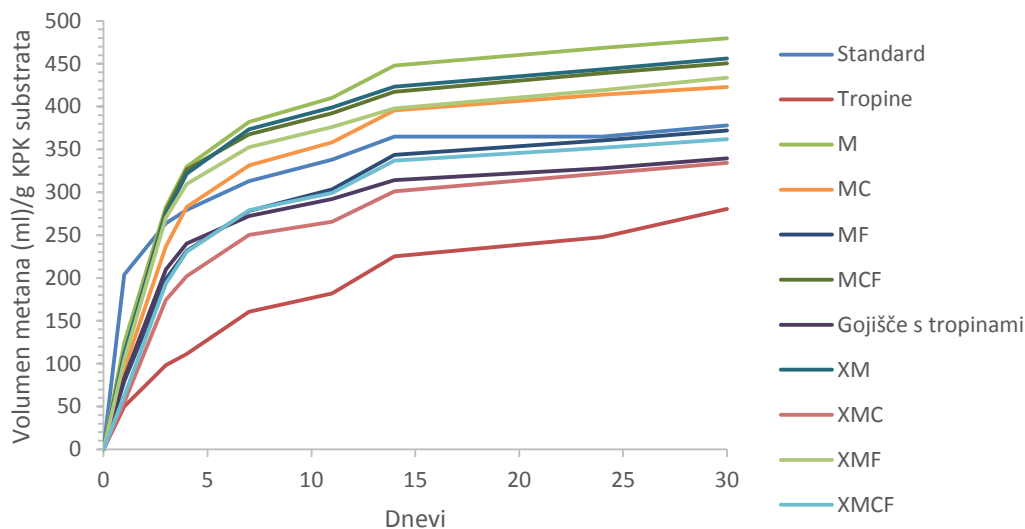
Slika 16b: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



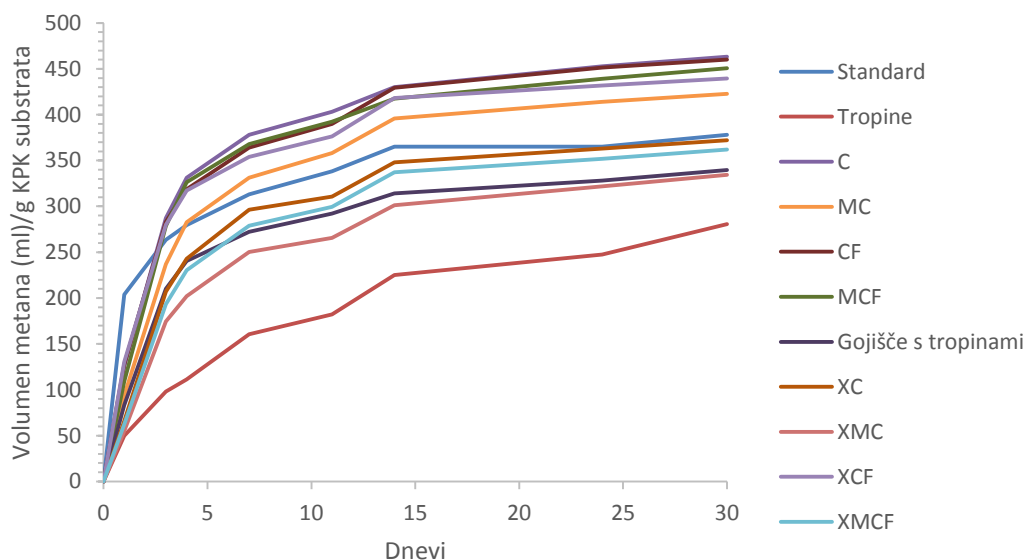
Slika 16c: Produkcija bioplina v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

V drugem poskusu je produkcijo bioplina (slike 16a, 16b in 16c) glede na bioreaktor s tropinami najbolj povečala bioaugmentacija s kulturo *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (101,6 %), s kokulturo *Clostridium cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85 (100,9 %) ter s kulturo *F. succinogenes* S85 (96,0 %). Tudi dodatek avtoklaviranih bakterij je povečal produkcijo bioplina, in sicer je najbolj dvignil produkcijo bioplina dodatek kulture *F. succinogenes* S85 (97,7 %), kulture *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (91,9 %) ter kokulture *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 (83,8 %). V bioreaktorjih z dodanimi avtoklaviranimi kulturami *C. cellulovorans* (65,9 %), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (63,2 %) ter kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *C. cellulovorans* (55,2 %) se je produkcija bioplina najmanj povečala.

Glede na plinsko-kromatografske meritve deleža metana (priloga A2) smo izračunali produkcijo metana iz produkcije bioplina in jo preračunali na g KPK dodanega substrata (slike 17a, 17b in 17c).

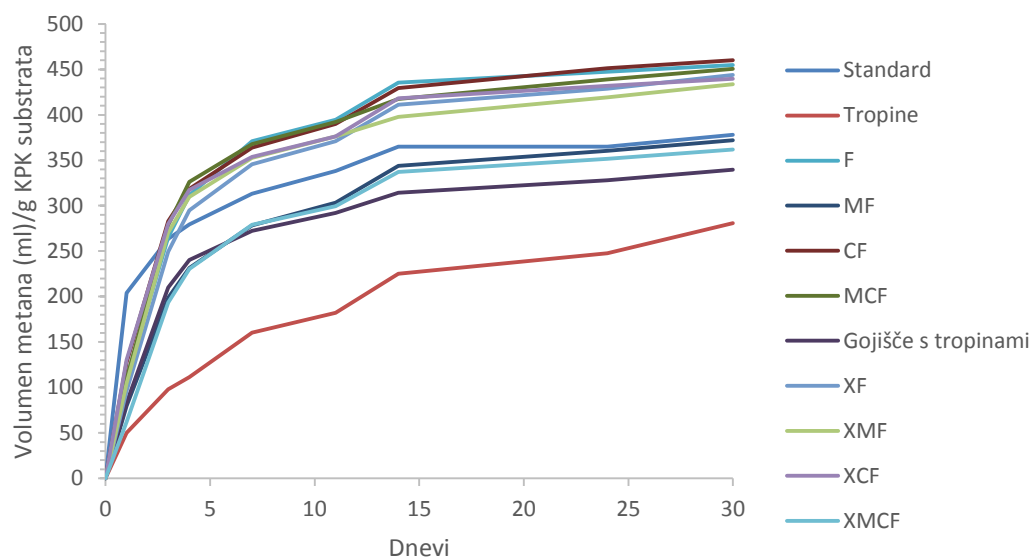


Slika 17a: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



Slika 17b: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



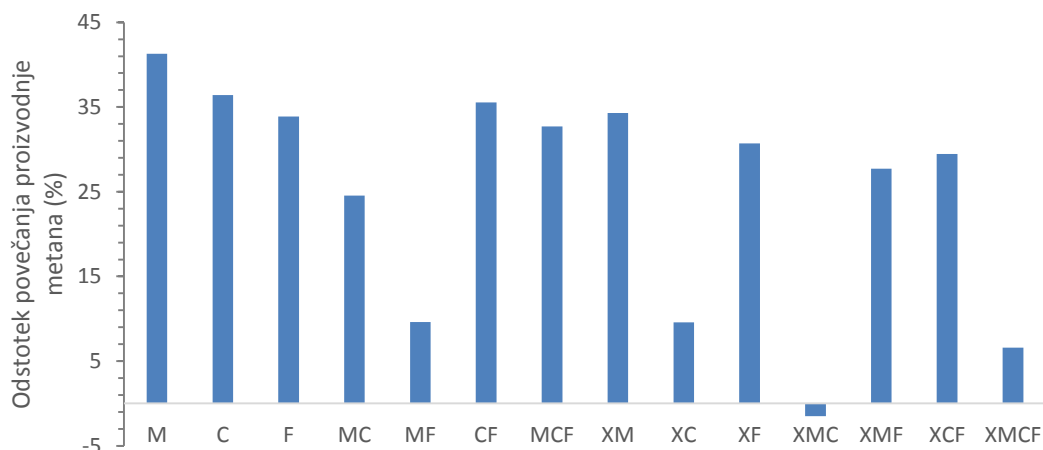


Slika 17c: Produkcija metana v poskusu BMP 2 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

V drugem poskusu bioaugmentacije (slike 17a, 17b in 17c) smo v primerjavi z bioreaktorjem s tropinami največje povečanje metana dosegli v bioreaktorjih s dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (70,9 %), kulturo *C. cellulovorans* (65,0 %) in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (64,0 %). Primerjalno so bila največja povečanja produkcije metana v primerjavi z bioreaktorjem s tropinami pri avtoklaviranih bakterijah opazna pri bioreaktorju z avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (62,5 %), kulturo *F. succinogenes* S85 (58,2 %) ter kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (56,6 %). Najnižje povečanje produkcije metana je bilo opazno v bioreaktorju z dodano avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *C. cellulovorans* (19,2 %), sledita še bioreaktorja z avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (29,0 %) ter avtoklavirano kulturo *C. cellulovorans* (32,6 %).

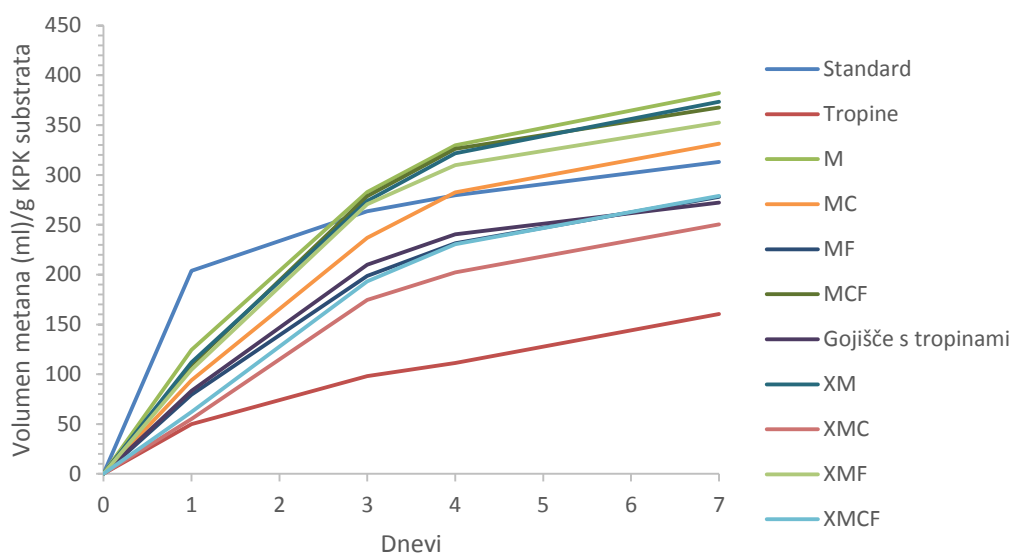
Za oceno uspešnosti bioaugmentacije smo izračunali produkcijo metana v posameznih bioreaktorjih glede na bioreaktor z neinkuliranim gojiščem s tropinami (slika 18). Donos metana je najbolj povečala bioaugmentacija s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (41,29 %), kulturo *C. cellulovorans* (36,41 %) in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (35,54 %). Tudi dodatek avtoklaviranih bakterij je povečal donos metana, in sicer najbolj avtoklavirana kultura *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (34,29 %), sledi kultura *F. succinogenes* S85 (3,69 %) ter kokultura *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (29,47 %). Najmanj se je donos metana povečal v bioreaktorjih z dodano avtoklavirano kulturo *C. cellulovorans*

(9,59 %) ter avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5T, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (6,58 %), pri avtoklavirani kokulturi *P. xylanivorans* Mz5T in *C. cellulovorans* pa je bila produkcija metana v primerjavi z gojiščem s tropinami celo manjša.

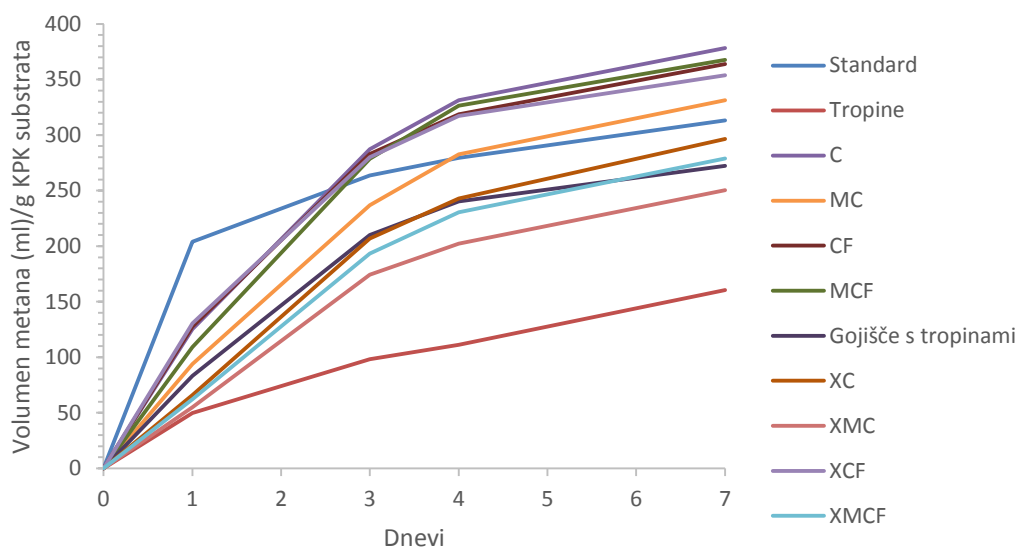


Slika 18: Odstotki povečanja donosa metana na g KPK substrata glede na kontrolni bioreaktor z neinokuliranim gojiščem in tropinami pri poskusu BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

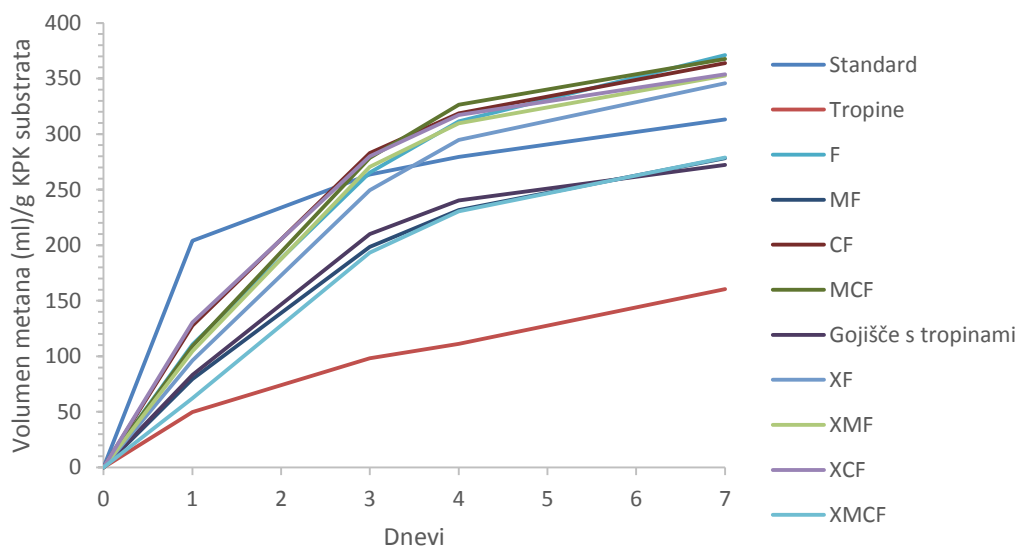
Ker je intenzivnost proizvodnje metana največja v prvem tednu, smo ločeno prikazali še proizvodnjo metana za prvi teden (slike 19a, 19b in 19c).



Slika 19a: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



Slika 19b: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Clostridium cellulovorans* in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije



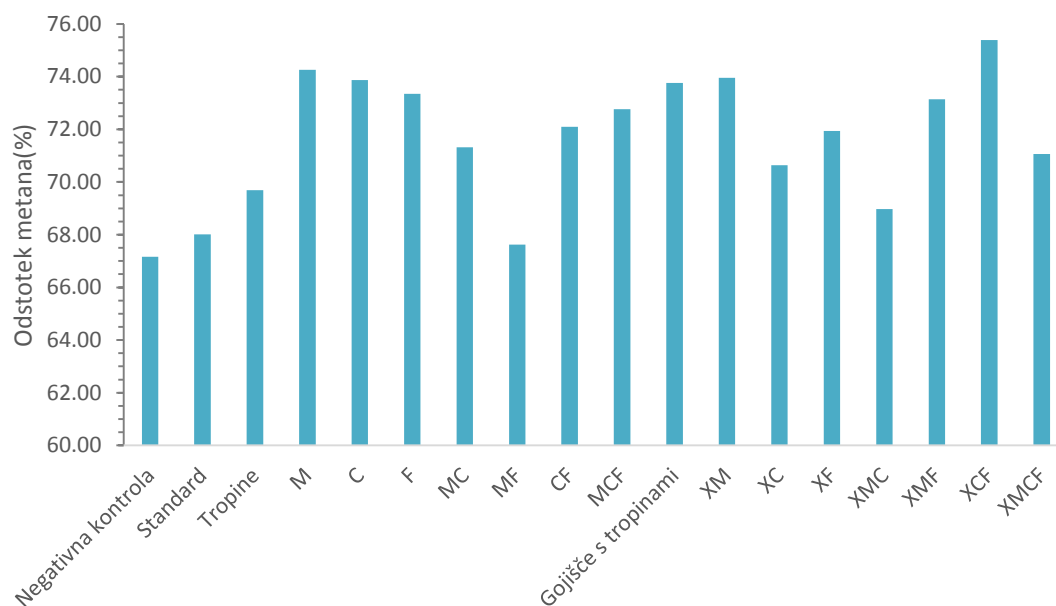
Slika 19c: Produkcija metana v prvem tednu poskusa BMP 2 v bioreaktorjih s *Fibrobacter succinogenes* S85 in njenimi kombinacijami prikazana s povprečnimi normaliziranimi volumni metana z odšteto negativno kontrolo preračunano na g KPK substrata; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Iz teh podatkov smo nato izračunali specifično produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa bioaugmentacije, podatki so v preglednici 19. Največjo specifično produktivnost je imel bioreaktor z dodano kulturo *C. cellulovorans* (212,9 ml/l dan), sledila sta mu bioreaktorja s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (209,6 ml/l dan) in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (209,7 ml/l dan). Najmanjše specifične produktivnosti so bile v bioreaktorjih z avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *C. cellulovorans* (129,2 ml/l dan), z avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (143,2 ml/l dan) ter v bioreaktroju s kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 (147,1 ml/l dan).

Preglednica 19: Specifična produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa BMP 2

Bioreaktor	Specifična produktivnost (ml/l dan)
Standard	195,3
Tropine	72,7
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	209,6
<i>C. cellulovorans</i>	212,9
<i>F. succinogenes</i> S85	196,6
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	175,5
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	147,1
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	209,7
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	206,4
Gojišče s tropinami	155,6
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	202,9
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	153,3
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	184,9
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	129,2
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	200,4
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	207,4
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	143,2

Izmerili smo delež metana v bioreaktorjih na zadnji dan poskusa. Negativna kontrola (67 %) in standard (68 %) imata približno enak odstotek metana, bioreaktorji z dodanimi bakterijami imajo približno 72% metana, največ ga ima bioreaktor z bakterijo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, in sicer 74,3 % (slika 20).



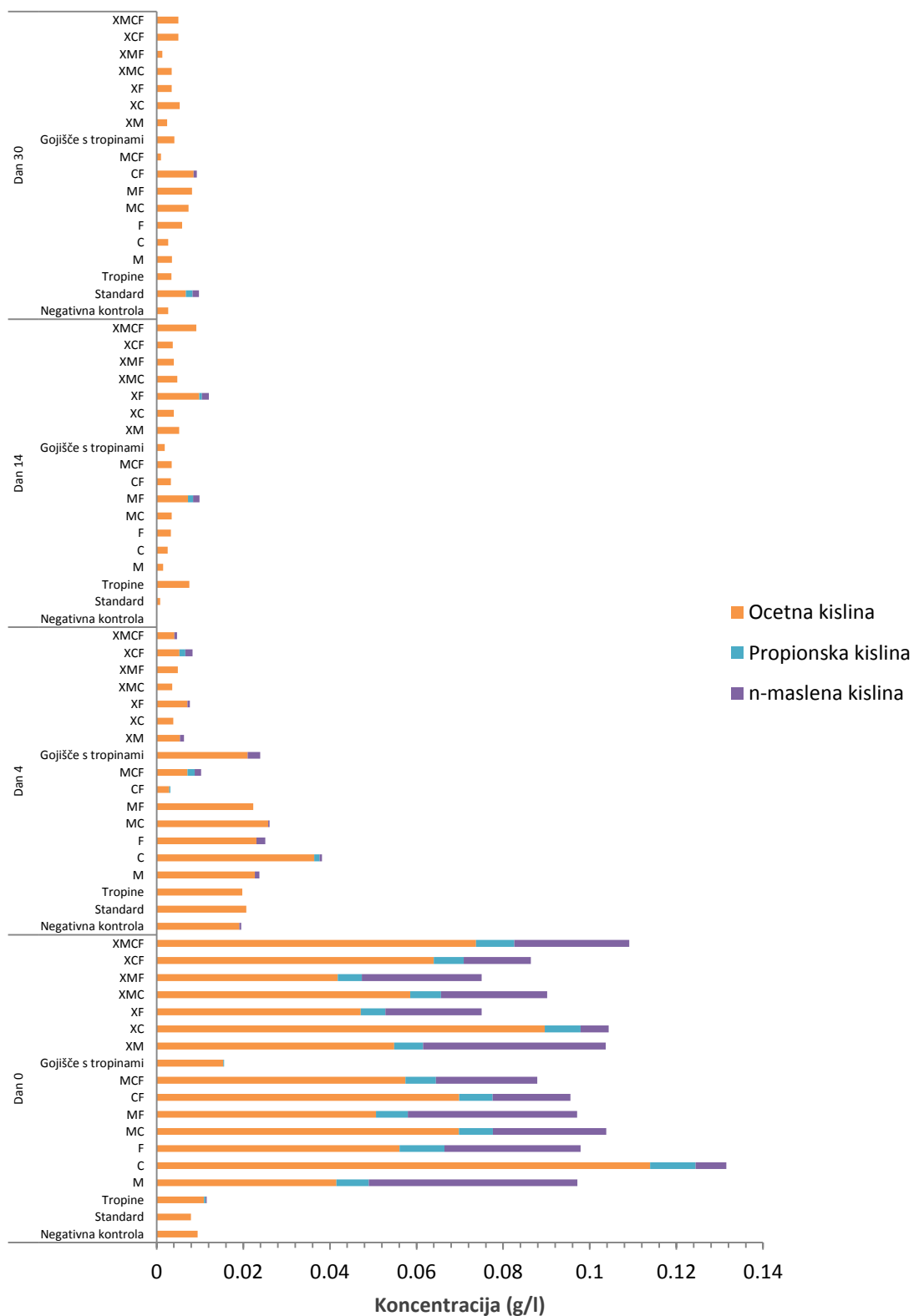
Slika 20: Povprečni deleža metana v steklenicah ob zaključku poskusa BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

V poskusu BMP2 je najboljši donos metana na g KPK substrata (preglednica 20) omogočila bioaugmentacija s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (479,7 ml metana/g KPK), sledi bioaugmentacija s kulturo *C. cellulovorans* (463,2 ml metana/g KPK) in s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (460,2 ml metana/g KPK). Povečanje donosa metana je bilo najnižje v bioreaktorjih z avtoklaviranimi kulturami, in sicer s kulturo *C. cellulovorans* (372,1 ml metana/g KPK), kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 (361,9 ml metana/g KPK) ter kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *C. cellulovorans* (334,5 ml metana/g KPK).

Preglednica 20: Donos metana glede na g KPK substrata v poskusu BMP 2

<b>Bioreaktor</b>	<b>ml metana/g KPK</b>
Standard	377,9
Tropine	280,6
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	479,7
<i>C. cellulovorans</i>	463,2
<i>F. succinogenes</i> S85	454,6
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	422,8
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	372,2
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	460,2
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	450,6
Gojišče s tropinami	339,6
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup>	456,0
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	372,1
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	443,8
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>C. cellulovorans</i>	334,5
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> in <i>F. succinogenes</i> S85	433,7
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	439,6
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5 <sup>T</sup> , <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	361,9

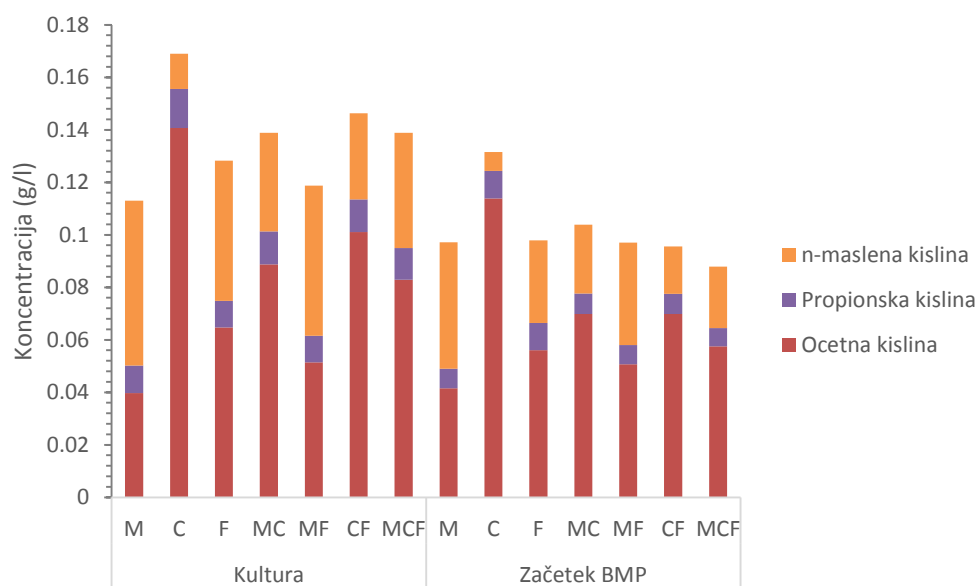
Med poskusom smo merili tudi koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin. Kot pri prvem poskusu so bile tudi v drugem poskusu bioaugmentacije BMP 2 v najvišjih koncentracijah prisotne očetna, propionska in n-maslenska kislina (slika 21). Koncentracija očetne kisline je bila med poskusom najvišja gibala se je od 0,052 g/l do 0,0045 g/l. Propionske kisline je bilo skoraj deset-krat manj kot očetne, ob začetku poskusa je bila povprečna koncentracija 0,0060 g/l, ob koncu poskusa pa je ni bilo več mogoče zaznati. Povprečna koncentracija n-maslenske kisline ob začetku poskusa je bila 0,020 g/l, ob koncu je ni bilo mogoče več zaznati.



Slika 21: Koncentracije očetne, propionske in n-maslene kisline v poskusu BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5T; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

Koncentracije ostalih kislin so bile vseskozi pod 0,01 g/l, zato niso prikazane na slikah.

Del kratkoverižnih maščobnih kislin izhaja iz dodane kulture, zato smo tudi tu preverili doprinos samih kultur hidrolitičnih bakterij. Izraz kultura označuje čiste kulture bakterij, začetek BMP pa stanje v bioreaktorju ob začetku poskusa. Najvišje koncentracije so imele očetna, propionska in n-maslena kislina, koncentracije kislin pa so bile višje v čisti kulturi bakterij kot pa v bioreaktorjih na dan 0 (slika 22).

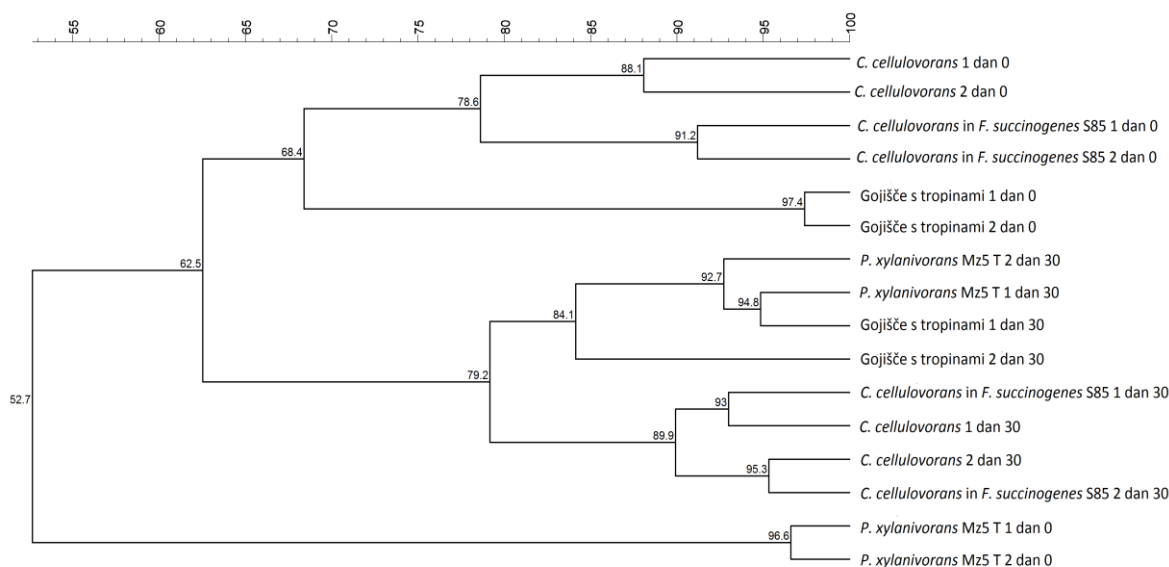


Slika 22: Doprinos kulture h koncentracijam očetne, propionske in n-maslene kisline na dan 0 pri poskusu BMP 2; M=*Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>; C=*Clostridium cellulovorans*; F=*Fibrobacter succinogenes* S85; X=Avtoklavirane hidrolitične bakterije

#### 4.4 SPREMEMBE V SESTAVI MIKROBNE ZDRUŽBE MED POSKUSOM BIOAUGMENTACIJE

Sledili smo spremembam v sestavi mikrobne združbe bioreaktorjev v drugem poskusu bioaugmentacije, kjer smo dosegli največje povečanje produkcije metana, to so bili bioreaktorji z dodanimi kulturami bakterij *Clostridium cellulovorans*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> ter kokulturo *C. cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85. Primerjali smo sestavo mikrobne združbe na začetku in koncu poskusa, za kontrolo smo vključili še bioreaktor z neinokuliranim gojiščem in tropinami. Za večjo natančnost smo uporabili paralelke vzorcev, mejo za podobnost med paralelkama pa postavili na 90%, če imata dva vzorca torej 90 % ali večjo podobnost, predpostavljamo, da gre za vzorec z enako sestavo mikrobne združbe.





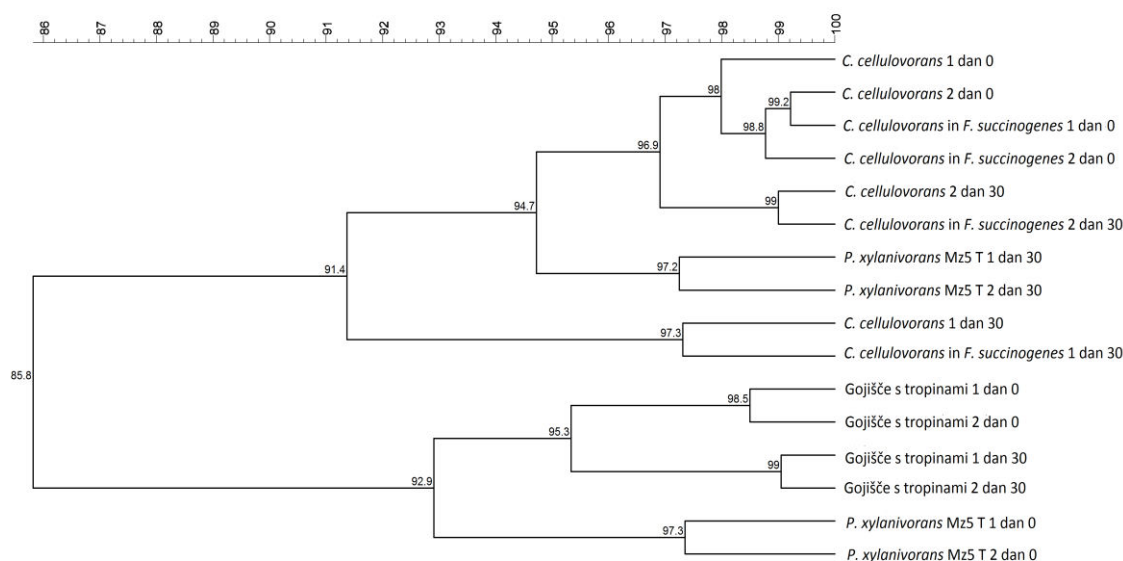
Slika 23: Pearsonov korelacijski dendrogram bakterijskih T-RFLP profilov najuspešnejših bioreaktorjev pri poskusu BMP 2

Vzorci (slika 23) so se porazdelili v gruče glede na začetek (dan 0) in konec poskusa (dan 30) z izjemo bioreaktorja z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> na dan 0, ki leži izven obeh gruč. Podobnost med paralelkami je več kot 90 %, razen pri profilu bioreaktorja z dodano kulturo *C. cellulovorans* na dan 0 in neinokuliranim gojiščem s tropinami dan 30.

Na začetku poskusa (dan 0) je bila podobnost med profilom bioreaktorja s kulturo *C. cellulovorans* in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 78,6 %, skupaj pa imata 68,4 % podobnosti s profilom bioreaktorja z neinokuliranim gojiščem s tropinami.

Ob koncu poskusa (dan 30) je podobnost med profilom bioreaktorja s kulturo *C. cellulovorans* in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 veliko večja, 89,9 %. Podobnost njunega profila s profilom bioreaktorja z neinokuliranim gojiščem s tropinami je tudi nekoliko večja, 79,2 %. Profil bioreaktorja s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> ima največ skupnih značilnosti s profilom bioreaktorja z neinokuliranim gojiščem s tropinami, 84,1 %, hkrati pa ima 79,2 % podobnost z ostalimi člani gruče ob koncu poskusa. Podobnost profilov med seboj je za 10,8 % večja na koncu kot na začetku poskusa.

Podobnost med profili bioreaktorjev na začetku in koncu poskusa je 62,5 %.



Slika 24: Pearsonov korelacijski dendrogram arhejskih T-RFLP profilov najuspešnejših bioreaktorjev pri poskusu BMP 2

Spremembe v zgradbi arhejske združbe so prikazane na sliki 24. Podobnosti med profili paralelk so nad 90 %. Porazdelitev v gruče glede na začetek in konec poskusa ni jasna kot pri spremembah v bakterijski združbi. Profili bioreaktorja z neinokuliranim gojiščem s tropinami ter bioreaktorja s *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 0 so v ločeni gruči s 85,8 % podobnostjo z ostalimi profili. Znotraj te gruče imata profila z neinokuliranim gojiščem s tropinami ob začetku in koncu poskusa 95,3 % podobnost, njuna podobnost s profilom bioreaktorja s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 0 pa je 92,9 %. Med profili ostalih bioreaktorjev je 91,4 % podobnosti.

Na začetku poskusa (dan 0) je podobnost med profilom bioreaktorja s kulturo *C. cellulovorans* in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 98 %. Ob koncu poskusa je podobnost profila teh bioreaktorjev nekoliko manjša, po ena paralelka vsakega ima 96,9 % podobnost s profilom z začetka poskusa, druga paralelka pa 91,4 %. Profil bioreaktorja s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 30 ima 94,7 % podobnost s profili bioreaktorjev s kulturo *C. cellulovorans* in kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 z začetka poskusa in po eno paralelko obeh s konca poskusa, z drugo paralelko s konca poskusa pa ima 91,4 % podobnost. Profili bioreaktorjev z dodanimi kulturami imajo med seboj 91,4 % podobnosti z izjemo profila bioreaktorja s *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 0, ki ima z njimi 85,8 % podobnost.

## 5 RAZPRAVA

Namen magistrske raziskave je bil proizvesti bioplin iz odpadnih pivskih tropin na laboratorijski ravni s pomočjo anaerobnih hidrolitičnih bakterij. Pri razgradnji lignoceluloze v pivskih tropinah je bilo potrebno proces pospešiti, saj je razgradnja počasna in tako zavira proizvodnjo bioplina. Odločili smo se za bioaugmentacijo, to je dodajanje bakterij v proces za razgradnjo substrata sočasno s proizvodnjo bioplina. Razgradnja lignocelulozega substrata je omejujoč korak pri proizvodnji bioplina, bakterije z ustrezno encimsko aktivnostjo pa lahko ta korak pospešijo, posledično je donos bioplina večji. Izbrali smo bakterije *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Clostridium cellulovorans*, ki imajo ksilanolitično in celulolitično encimsko aktivnost. *F. succinogenes* S85 in *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> imata primerljivo ksilanolitično aktivnost, *C. cellulovorans* ima nekoliko nižjo ksilanolitično aktivnost, ima pa zato najvišjo celulolitično aktivnost (preglednica 16). Ksilanolitično in Celulolitično encimsko aktivnost smo izbrali, ker sta pomembni za pospešitev prve stopnje v anaerobni razgradnji izbranega modelnega substrata, odpadnih pivskih tropin.

Med obema poskusoma bioaugmentacije smo spremljali različne parametre. Vrednosti pH (sliki 5 in 14) so se med obema poskusoma rahlo znižale, ni pa prišlo do bistvenih sprememb, kar pomeni, da je bioproces ustrezno potekal. Če bi prišlo do zaustavitve metanogeneze, bi se po pričakovanju nakopičile kisline in bi prišlo do zakisanja in posledično znatno nižjega končnega pH od začetnega. V dveh primerih je prišlo do rahlega dviga pH, in sicer v bioreaktorjih z dodano avtoklavirano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 pri poskusu bioaugmentacije BMP 1 ter v bioreaktorju z negativno kontrolo pri poskusu bioaugmentacije BMP 2, vendar dvig pH ni bil signifikanten. Vrednosti KPK (sliki 6 in 15) so se med obema poskusoma približno enako znižale. Dva vzorca sta imela višje vrednosti KPK, in sicer bioreaktor z avtoklavirano kokulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> in *F. succinogenes* S85 pri poskusu bioaugmentacije BMP 1 in bioreaktor z negativno kontrolo pri poskusu bioaugmentacije BMP 2, vendar je to verjetno posledica napak pri izvajanju meritev KPK. Med poskusom se organske snovi porabijo, tako da znižanje vrednosti KPK nakazuje ustrezen potek bioprocesa. Vrednosti pH in KPK smo merili na začetku in koncu poskusa bioaugmentacije, tekom poskusa pa smo merili tudi vsebnosti kratkoverižnih maščobnih kislin (sliki 12 in 21). V večjih količinah so bile prisotne samo tri izmed merjenih kratkoverižnih maščobnih kislin, očetna, propionska in n-maslena kislina. Očetna kislina je bila prisotna v najvišjih koncentracijah v obeh poskusih, pri poskusu bioaugmentacije BMP 2 je bila koncentracija očetne kisline višja kot pri BMP 1. Pri obeh je bila koncentracija najvišja prvi dan meritev, ostale dni pa so bile koncentracije v primerjavi s prvim dnevom zanemarljive. Taka slika se ponovi tudi pri propionski in n-masleni kislini, prvi dan so najvišje vrednosti, v drugi polovici poskusa pa so v primerjavi s prvim dnevom zanemarljive. Med poskusoma pa so bile koncentracije propionski in n-masleni kislini med poskusoma primerljivejše kot pa pri očetni kislini.

Koncentracija kislin je obratno sorazmerna z nastajanjem metana, saj se za produkcijo metana kisline porabijo. Merili smo tudi vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin v kulturah hidrolitičnih bakterij (sliki 13 in 22), rezultati so pokazali, da je vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin višja v čistih kulturah bakterij kot v bioreaktorjih ob začetku poskusa. V čisti kulturi se kratkoverižne maščobne kisline niso porabile, temveč so se kopičile, v bioreaktorju, kjer je bila mešana anaerobna kultura, pa so se porabile tekom acetogeneze. Glede na vse te rezultate sta poskusa potekala pravilno in brez zapletov.

Nastajanje metana poteka sprva eksponentno, potek je približno enak v obeh poskusih (slike 10a, 10b in 10c ter 19a, 19b in 19c). Proizvodnja metana je najhitrejša v prvem tednu, ko je na voljo največ substrata, tekom naslednjih treh tednov pa se je umirila. Specifična produktivnost metana v prvih treh dneh poskusa (preglednici 17 in 19) je primerljiva med poskusoma med dodanimi kulturami, pri dodanih avtoklaviranih kulturah pa je specifična produktivnost metana v drugem poskusu nekoliko manjša kot v prvem. Na koncu poskusa je proizvodnja metana minimalna, zato daljše obdobje analitskega spremljanja poskusa ne bi bilo smiselno. V prvem poskusu bioaugmentacije BMP 1 smo najbolj intenzivno produkcijo metana zaznali v bioreaktorjih z avtoklaviranimi bakterijami. Tu torej ni šlo za bioaugmentacijo, ampak so bakterije služile kot dodaten substrat in se je produkcija metana povečala na račun dodatnega substrata, ne pa večje razgradnje odpadnih pivskih tropin. Prvi poskus je bil tako neuspešen. V drugem poskusu bioaugmentacije BMP 2 smo dosegli povečanje produkcije metana z dodatkom živih bakterij, saj je bil donos metana večji v bioreaktorjih z dodanimi kulturami kot pa v bioreaktorjih z avtoklaviranimi kulturami.

V znanstveni literaturi se vrednosti za količino metana, ki jo je možno pridobiti iz določene biomase, zelo razlikujejo. Chandra in sodelavi so izračunali povprečne vrednosti iz različnih virov, in sicer so ugotovili, da je iz koruznice možno pridobiti 338 ml metana/g dodane OS, iz pšenične slame 290 ml metana /g dodane OS, iz riževe slame 302 ml metana/g dodanih OS in 278 ml metana/g dodanih OS iz ostankov sladkornega trsa (Chandra in sod., 2012). Deublin in Steinhauser sta ocenila, da je iz slame večine žit možno proizvesti med 200 in 500 ml metana/g OS (Deublin in Steinhauser, 2008). Weiland je podal podatke o potencialu za proizvodnjo bioplina iz več poljščin, kot so sladkorna repa, koruza, pšenica, trava, črna detelja, sončnice, sirek in tritikala, ki imajo potencial za proizvodnjo od 420 do 800 Nm<sup>3</sup>/t OS bioplina z vsebnostjo metana med 52 % in 56 % (Weiland, 2010). V poskusu bioaugmentacije BMP 1 smo v bioreaktorju s tropinami dosegli proizvodnjo 281 ml metana/g KPK, v poskusu BMP 2 pa 319 ml metana/g KPK, torej povprečno 300 ml metana/g KPK (preglednici 18 in 20), kar pade znotraj ocene, ki sta jo podala Deublein in Steinhauser, primerljiva pa je tudi s podatki Chandre in sodelavcev (Deublin in Steinhauser, 2008; Chandra in sod, 2012). Vsebnost metana v bioreaktorju s tropinami ob koncu poskusa BMP 1 je bila približno 69 %, ob koncu BMP 2 pa 70 % (sliki 11 in 20), kar presega ocene, ki jih je podal Weiland

(Weiland, 2010). Čeprav so odpadne pivske tropine kompleksen substrat, je iz njih vseeno mogoče proizvajati primerljivo količino metana kot iz odpadkov najpogostejših poljščin.

Peng in sodelavci so se lotili bioaugmentacije z bakterijo *Clostridium cellulolyticum*. Kot substrat v BMP so uporabili slamo, bakterijo pa so gojili na dva načina, v prvem s celobiozo kot edinim virom ogljika v gojišču, v drugem pa so kot vir ogljika v gojišče dodali slamo, posledično pa so podaljšali čas gojenja. Z bioaugmentacijo s *C. cellulolyticum* so dosegli povečano produkcijo metana, in sicer 13,0 % povečanje v prvem in 7,6 % povečanje v drugem primeru, to je 342,6 in 326,3 ml metana/g OS v primerjavi s 303,2 ml metana/g OS v primeru brez bioaugmentacije. Pri drugem načinu gojenja so naredili še različico, kjer so po gojenju bakterije inaktivirali in jih potem dodali poskusu BMP, rezultati pa so bili podobni kot pri živih bakterijah, 322,9 ml metana/g OS (Peng in sod., 2014). Zhang in sodelavci so za bioaugmentacijo proizvodnje metana iz koruznice izbrali bakterijo *Acetobacteroides hydrogenigenes*, ki razgrajuje širok spekter pentoz, heksoz in polioz v acetat in vodik. Z bioaugmentacijo so dosegli 19-23% povečanje produkcije metana, odvisno od velikosti inokuluma, največje povečanje so dosegli z 10 % inokulumom, in sicer 258,1 ml metana/g koruznice. Za primerjavo, kontrola je proizvedla 209,3 ml metana/g koruznice (Zhang in sod., 2015). Martin-Ryals in sodelavci so izbrali dvostopenjsko anaerobno razgradnjo koruznice, za bioaugmentacijo pa mešanico celulozitičnih mikroorganizmov podjetja Microbial Energy Systems Inc, ZDA, ki je vseboval večinoma bakterije rodu *Clostridium*. Primerjali so enkratno in dnevno dodajanje mešanice mikroorganizmov, po uspešnem laboratorijskem poskusu pa so se odločili za daljši kontinuirani pilotni poskus, ki je trajal 10 mesecev. Na laboratorijski skali je imela dnevna bioaugmentacije 15 % več metana kumulativno kot enkratna bioaugmentacija in 65 % več metana kot kontrola brez bioaugmentacije. Na pilotni skali je vsakodnevna bioaugmentacija izboljšala proizvodnjo metana za 56 % v primerjav s kontrolo, izkupiček metana pa je bil 168 in 151 ml metana/g OS za ponovitvi vsakodnevne bioaugmentacije in 108 ml metana/g OS za kontrolo (Martin-Ryals in sod., 2015). Bagi in sodelavci so proizvajali bioplin iz odpadne vode, posušene biomase topinamburja in iztrebkov prašičev. Za mezofilni potek poskusa so izbrali bakterijo *Enterobacter cloacae*, za termofilni pa *Caldicellulosyruptor saccharolyticus* za bioaugmentacijo. Na laboratorijski skali sta obe bakteriji povzročili povečano produkcijo bioplina, vendar je bila *C. saccharolyticus* uspešnejša, zato so jo sklenili preizkusiti tudi v večjem bioreaktorju. V pilotnem semikontinuirnem bioreaktorju velikosti 5 m<sup>3</sup> je bakterija *C. saccharolyticus* povzročila do 70 % povečanje dnevne produkcije bioplina, hkrati pa se je obdržala v bioreaktorju več mesecev (Bagi in sod., 2007).

V naših poskusih smo največje povečanje proizvodnje metana dokazali v bioreaktorju z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, bioreaktor je bil zelo primerljiv med poskusoma, v prvem poskusu smo iz njega dobili 497 ml metana/g KPK substrata, v drugem poskusu pa 480 ml metana/g KPK substrata. V primerjavi z drugimi raziskavami o bioaugmentaciji pri

proizvodnji bioplina smo dosegli višje vrednosti metana/g OS, vendar velja pripomniti, da je naše vrednosti KPK težko enačiti z njihovimi vrednostmi dodanih organskih snovi. Zato smo preverili tudi povečanje proizvodnje metana, da bi rezultate primerjali še na drug način.

Primerjava za povečanje donosa metana je bila donos metana v bioreaktorju z neinokuliranim gojiščem in tropinami, saj smo vanj vnesli primerljivo količino substrata kot v bioreaktorje s hidrolitičnimi bakterijami, a brez hidrolitičnih bakterij, ki bi vplivale na donos metana z razgradnjo tropin (sliki 9 in 18). Avtoklavirane oz. inaktivirane hidrolitične bakterije tudi predstavljajo substrat za mikrobnno biomaso, zato lahko z njimi ugotavljamo produkcijo metana na račun delovanja živih bakterij, saj lahko z avtoklaviranimi ocenimo doprinos k donosu metana na račun hidrolitičnih bakterij kot dodatnega substrata in ne kot pomočnika pri razgradnji lignoceluloznega substrata oziroma tropin. Največji donos metana v drugem poskusu bioaugmentacije je dosegel bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>. Bioreaktor s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> je imel tudi največji donos med hidrolitičnimi bakterijami v prvem poskusu in je bil tudi edini, kjer različica z avtoklaviranimi bakterijami ni imela večjega donosa metana kot različica z živimi hidrolitičnimi bakterijami. V prvem poskusu je bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dosegel 47,4 % povečanje donosa metana v primerjavi s samim gojiščem s tropinami, v drugem pa 41,3 %. V drugem poskusu bioaugmentacije smo večje donose metana dosegli tudi v bioreaktorju z dodano kulturo *C. cellulovorans* s 36,4 % povečanjem donosa metana v primerjavi z bioreaktorjem z neinokuliranim gojiščem in tropinami ter v bioreaktorju z dodano kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 s 35,5 % povečanjem donosa metana. V prvem poskusu bioaugmentacije smo v bioreaktorjih z avtoklaviranimi bakterijami proizvedli več metana kot v bioreaktorjih z živimi hidrolitičnimi bakterijami, razen v primeru kulture *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>. Kljub temu smo v bioreaktorju s kulturo *C. cellulovorans* dosegli 32,0 % povečanje donosa metana v primerjavi z bioreaktorjem z neinokuliranim gojiščem in tropinami, s kokulturo *C. cellulovorans* in *F. succinogenes* S85 pa 45,7 % povečanje donosa metana v primerjavi z bioreaktorjem z neinokuliranim gojiščem s tropinami.

Kot že omenjeno je do največjega donosa metana v prvem poskusu prišlo v bioreaktorjih z dodanimi avtoklaviranimi kulturami bakterij, izjema je bil le bioreaktor z dodano hidrolitično kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, hkrati je ta bioreaktor proizvedel največ metana tudi drugem poskusu, zato smo mu namenili največ pozornosti. Bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> je v obeh poskusih povprečno dosegel 44,3 % povečanje donosa metana v primerjavi z neinokuliranim gojiščem s tropinami, zanimalo pa nas je, kako je to primerljivo z bioreaktorjem z avtoklavirano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>. Če tako odštejemo produkcijo metana na račun avtoklaviranih bakterij, je bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dosegel 14 % povečanje donosa metana, kar je primerljivo z

rezultati, ki jih je dosegel Peng s sodelavci (13 %) ter malo slabše od rezultatov, ki jih je dosegel Zhang s sodelavci (23 %) (Peng in sod., 2014; Zhang in sod., 2015).

Ob koncu poskusa bioaugmentacije na dan 30 smo primerjali tudi odstotke metana v bioplinu pri različnih bioreaktorjih. Negativna kontrola in standard sta imela nižjo vsebnost metana kot ostali bioreaktorji. V prvem poskusu je bilo v bioreaktorju z negativno kontrolo 61,3 % metana, v bioreaktorju s standardom pa 61,8 % metana. V drugem poskusu je bilo v bioreaktorju z negativno kontrolo 67,2 % metana, v bioreaktorju s standardom pa 68,0 % metana. V bioreaktorju s tropinami je bilo v prvem poskusu 68,8 % metana, v drugem pa 69,7 %. V bioreaktorju z neinokuliranim gojiščem in tropinami je bilo v prvem poskusu 68,8 % metana, v drugem pa 73,8 %. Povprečni delež metana v plinski fazi v bioreaktorjih z dodanimi hidrolitičnimi bakterijami je bil v prvem poskusu bioaugmentacije 73 %, v drugem 72 %, vrednosti sta primerljivi, saj je razlika samo v eni odstotni točki. Prav tako ima v obeh poskusih najvišjo vsebnost metana bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, v prvem poskusu ima 74,6 % metana in v drugem 74,3 % metana (sliki 11 in 20). To so višje vrednosti, kot jih navaja Weiland (52 - 56 %) (Weiland, 2010).

Sledili smo spremembam v mikrobni združbi bioreaktorjev z največjim donosom metana v poskusu bioaugmentacije BMP 2, to so bili bioreaktorji z dodanim kulturami bakterij *Clostridium cellulovorans*, *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> ter kokulturo *C. cellulovorans* in *Fibrobacter succinogenes* S85. Metoda T-RFLP je učinkovita in dobro ponovljiva metoda za analizo sestave mikrobne združbe in sledenje spremembam v sestavi mikrobne združbe (Osborn in sod., 2000). Nocker in sodelavci so tudi mnenja, da lahko metodo T-RFLP uporabimo za primerjavo kompleksnih mikrobnih združb in sledenje spremembam v teh združbah (Nocker in sod., 2007). Na podlagi tega smo se odločili uporabiti to metodo za primerjavo sestave mikrobne združbe na začetku in koncu poskusa. Z uporabo T-RFLP profilov bioreaktorjev smo naredili Pearsonov korelacijski dendrogram, s katerim smo želeli pokazati podobnost oziroma različnost sestav mikrobnih združb v posameznih bioreaktorjih.

Pri bakterijskem T-RFLP profilu (slika 23) je vidna razlika v sestavi bakterijske združbe na začetku (dan 0) in na koncu poskusa (dan 30), izjema je bioreaktor z dodanim *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 0, ki leži izven obeh gruč. To je verjetno posledica napake pri pripravi ali analizi vzorca, saj leži profil vzorca bioreaktorja s *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 30 v gruči za konec poskusa, poleg tega je malo verjetno, da bi se ta vzorec tako močno razlikoval od drugih, posebno glede na to, da je bila v vseh bioreaktorjih dodana enaka biomasa. Med gručama za začetek in konec je samo 62,5 % podobnosti, zato lahko trdimo, da se med poskusom BMP bakterijska združba znatno spremeni zaradi prilagajanja substratu ali pa zaradi dodatka anaerobnih hidrolitičnih bakterij. Znotraj gruče za konec poskusa je stopnja podobnosti med profili bioreaktorjev večja, 79,2 %, kot znotraj gruče za začetek poskusa, kjer je 68,4 %. Tekom poskusa je torej mikrobna združba v bioreaktorjih

postala med seboj podobnejša, saj je razlika med T-RFLP profili bioreaktorjev manjša, kar bi lahko podprlo hipotezo, da je razlika med bioreaktorji na začetku poskusa večja zaradi dodatka različnih hidrolitskih bakterij, ki pa med poskusom odmrejo in se razgradijo, zato razlike med profili bioreaktorjev izginjajo. Nasprotno so Bagi in sodelavci ugotovili, da se *C. saccharolyticus* obdrži v bioreaktorju več mesecev, vendar je v njihovem primeru šlo za semikontinuiran proces v bioreaktorju volumna 5 m<sup>3</sup> (Bagi in sod., 2007). Merlino in sodelavci so v svoji raziskavi spremljali spremembe v bakterijski in arhejski združbi med poskusom biometanskega potenciala z različnimi substrati. Ugotovili so, da so znatne spremembe v zgradbi bakterijske in tudi arhejske združbe odziv oziroma prilagajanje na substrat (Merlino in sod., 2012). Na podlag tega lahko sklepamo tudi, da je večja podobnost bakterijskih profilov bioreaktorjev ob koncu poskusa posledica prilagajanja na enak substrat.

Pri arhejskem T-RFLP profilu (slika 24) razporeditev v gruči za začetek in konec poskusa ni jasna kot pri bakterijskem profilu. Med profiloma bioreaktorja z gojiščem s tropinami dan 0 in dan 30 je 95,3 % podobnost, kar je nad 90 % mejo za podobnost med paralelkama. Glede na tako veliko podobnost med profiloma lahko trdimo, da se sestava arhejske mikrobne združbe v bioreaktorju z gojiščem s tropinami med poskusom ne spremeni in ostane enaka. *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dan 0 je ponovno ločen od ostalih bioreaktorjev z dodanimi bakterijami. Med T-RFLP profili bioreaktorjev z dodanim hidrolitičnimi bakterijami so med začetkom in koncem poskusa spremembe v sestavi arhejske mikrobne združbe majhne, saj je podobnost med vsemi vzorci 91,4 %, kar je spet nad mejo za podobnost med paralelkami. Merlino in sodelavci so v svoji raziskavi ugotovili, da so bile spremembe v zgradbi arhejske združbe manjše kot v bakterijski, manjše spremembe v arhejski združbi pa so bile prisotne tudi v poskusih BMP z boljšimi donosi metana (Merlino in sod., 2012). Iz tega lahko zaključimo, da majhna sprememba sestave arhejske združbe ni nenavadna, dodatek hidrolitskih bakterij na njo ni bistveno vplival.



## 6 SKLEPI

Z dobljenimi rezultati smo potrdili tri delovne hipoteze, in sicer

- Da dodatek anaerobnih hidrolitičnih bakterij *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Clostridium cellulovorans* v bioreaktor poveča produkcijo bioplina in tudi delež metana pri razgradnji odpadnih pivskih tropin.
- Da hidrolitičnih encimskih aktivnosti bakterij, ki jih uporabimo za bioaugmentacijo, ni potrebno predhodno inducirati.
- Da imajo dodane anaerobe hidrolitične bakterije, ki smo jih uporabili za bioaugmentacijo, večji prispevek k proizvodnji metana kot pa dodano gojišče in organska snov, ki pripada dodani avtoklavirani bakterijski biomasi.

Zadnje hipoteze ne moremo nedvomno potrditi, saj prvi poskus bioaugmentacije ovrže to hipotezo, drugi pa jo potrdi.

Hkrati pa lahko iz rezultatov pridemo še do drugih sklepov

- Da je možno iz odpadnih pivskih tropin proizvesti primerljive količine metana kot iz drugih pogostejših odpadnih rastlinskih substratov, z bioaugmentacijo pa smo donos metana še povečali.
- Največji donos metana v drugem poskusu bioaugmentacije smo dosegli pri bioreaktorju z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, kjer je bil tudi največji donos metana v prvem poskusu. Hkrati smo v tem bioreaktorju izmerili najvišji končni delež metana v obeh poskusih.
- Čeprav so vse tri anaerobne bakterije posamično in v različnih kombinacijah prispevale k povečanju proizvodnje in deleža metana v vzorcu, se je kot najboljša za najvišji donos metana izkazala *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, ki je dala najbolj ponovljive meritve.
- Spremembe v sestavi arhejske mikrobne združbe med bioaugmentacijo so bile minimalne.
- Spremembe v sestavi bakterijske mikrobne združbe med bioaugmentacijo so bile znatne med začetkom in koncem poskusa. Premiki v bakterijski združbi so verjetno posledica dodanih bakterij in prilagajanja združbe na substrat.

## 7 POVZETEK

### 7.1 POVZETEK

Bioplin sestavljata metan in ogljikov dioksid s primesmi, uporabljamo ga lahko namesto zemeljskega plina. Proizvajamo ga lahko iz obnovljivih virov, kar je ena izmed njegovih prednosti. Lignocelulozna biomasa je idealen vir obnovljive energije, sestavljena je iz celuloze, hemiceluloz in lignina. Od vrste biomase je odvisna točna sestava, načeloma pa vsebuje 40 – 50 % celuloze, 20 – 40 % hemiceluloz in 20 – 30 % lignina. Za modelen lignocelulozni substrat smo si izbrali odpadne pivske tropine, ki so ostanek ječmenovih semen po drozganju.

V tej nalogi smo želeli uporabiti odpadne pivske tropine za proizvodnjo bioplina. Ker so večinoma sestavljene iz lignoceluloze, smo potrebovali predobdelavo, ki bi tropine razgradila na manjše, dostopnejše dele. Odločili smo se za uporabo anaerobnih hidrolitičnih bakterij *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Clostridium cellulovorans*, s testom encimske aktivnosti smo potrdili, da imajo vse tri bakterije tako ksilanolitično kot celulolitično encimsko aktivnost in so zato primerne za naš postopek. Bakterij predhodno nismo gojili v inducibilnem gojišču, saj je to gojišče drago. Namesto tega smo jih gojili v gojišču M2 in jih dodali v bioreaktorje sočasno z začetkom poskusa bioaugmentacije. Predpostavljali smo, da bodo bakterije pripomogle k razgradnji pivskih tropin in posledično povišanju deleža in donosa metana, in to navkljub temu, da njihove hidrolitične encimske aktivnosti niso bile predhodno inducirane. Uporabili smo tudi avtoklavirane bakterije, da bi dokazali, da dodane bakterije resnično pomagajo pri razgradnji tropin in niso samo dodaten substrat za proizvodnjo bioplina.

Naše glavno orodje je bil test biometanskega potenciala ali BMP, saj z njim določamo anaerobno razgradljivost in primernost substrata za produkcijo bioplina. Uporabljali smo litrske steklenice kot majhne bioreaktorje in redno tekom poskusa merili volumen in sestavo plinov. Iz teh podatkov smo preračunali delež metana v nastalem bioplinu in posledično donos metana.

Ob začetku in koncu poskusa smo merili pH vrednost bioreaktorjev, ta se tekom poskusa ni bistveno spremenila, bila je v nevtralnem območju večinoma malo pod pH 7. Ob začetku in koncu poskusa smo merili tudi kemijsko potrebo po kisiku (KPK), ki je merilo za vsebnost organske snovi v vzorcu. Teoretično bi se morala količina organske snovi tekom poskusa zmanjšati, saj jo mikroorganizmi porabijo za rast in proizvodnjo bioplina, kar smo tudi potrdili.

Kratkoverižne maščobne kisline so vmesni produkt v poti proizvodnje bioplina, njihovo koncentracijo smo merili s pomočjo etrskih ekstraktij vzorcev in kromatografa. Njihova koncentracija je bila najvišja ob začetku poskusa, potem pa je upadla na zanemarljivo.

Produkcija bioplina je bila eksponentna v prvem tednu, nato se je postopoma manjšala, v zadnjem tednu pa je bila zelo majhna, tako da poskusa ne bi bilo smiselno podaljšati na več kot 30 dni. V poskusu bioaugmentacije BMP 1 so imeli največje povečanje donosa metana bioreaktorji z dodaniki avtoklaviranimi bakterijami, vendar je imel najvišji deček metana v plinski fazi bioreaktor s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, in sicer 74,6 %. V poskusu bioaugmentacije BMP 2 smo izmerili največje povečanje donosa metana v bioreaktorjih z dodanimi kulturami bakterijami, tako v povečanju donosa kot v končni vsebnosti metana je bioreaktor z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dosegel največji donos. Končni odstotki metana v plinski fazi so bili med obema poskusoma primerljivi, v prvem poskusu bioaugmentacije je bilo povprečno 73 % metana v bioplinu v bioreaktorjih ob koncu poskusa, v drugem pa 72 %. Povečanje donosa metana je bilo med poskusoma manj primerljivo, v prvem so prevladovali večji donosi v bioreaktorjih z dodanimi avtoklaviranimi bakterijami, v drugem poskusu pa so bili donosi večji v bioreaktorjih z dodanimi živimi kulturami bakterij. Med dodanimi živimi hidrolitičnimi bakterijami v prvem poskusu je bioreaktor s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> dosegel največji donos s 47,4 % povišanjem produkcije metana glede na bioreaktor z dodanim neinkuliranim gojiščem s tropinami. V drugem poskusu je imel bioreaktor s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> 41,3 % povečanje donosa metana. Povprečno smo izmerili 44,3 % povečanje donosa metana v bioreaktorju s kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> v primerjavi z bioreaktorjem z neinkuliranim gojiščem in tropinami. Če pa smo ga primerjali z različico z avtoklaviranim kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, pa je dosegel 14 % povečanje donosa metana.

Spremembam v zgradbi mikrobne združbe smo sledili z molekularnimi metodami in sicer z metodo T-RFLP. Sestava arhejske združbe se ni spremenila tekom poskusa, njihova združba je torej stabilna, dodane bakterije pa nanjo ne vplivajo. Do večjih sprememb v sestavi pa je prišlo v bakterijski združbi, med začetkom in koncem poskusa je bila opazna razlika, saj je bila podobnost med profili z začetka in konca poskusa samo 62,5 %.

Zaključili smo, da je smo največji donos metana dosegli z dodano kulturo *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, potrdili pa smo tudi tri delovne hipoteze. Dodatek anaerobnih hidrolitičnih bakterij je povečal produkcijo in odstotek metana v plinski fazi bioplina, bakterij ni bilo potrebno predhodno inducirati za celulolitično in ksilanolitično encimsko aktivnost, z bioreaktorji z dodanimi kulturami bakterij pa smo dosegli večji donos metana kot z bioreaktorjem z neinkuliranim gojiščem s tropinami. Zadnje delovne hipoteze pa nismo mogli potrditi ali ovreči zaradi nasprotujočih si rezultatov poskusov, tako da ne moremo trditi, da imajo avtoklavirane bakterije večji ali manjši vpliv na donos metana kot žive kulture.

## 7.2 SUMMARY

Biogas is comprised of methane and carbon dioxide with different impurities, its use is the same as natural gas. It is possible to produce it from renewable resources and that is one of its greatest advantages. Lignocellulosic biomass is an ideal source of renewable energy, it is comprised of cellulose, hemicelluloses and lignin. Depending on the type of biomass, it contains 40 – 50 % cellulose, 20 – 40 % hemicellulose and 20 – 30 % lignin. For our model lignocellulose substrate we have chosen brewer's spent grain, which is the remains of barley after mashing.

In this thesis we used brewer's spent grain for the production of biogas. Since its main component is lignocellulose, we needed an appropriate pretreatment method to turn it into smaller more easily degradable units. We decided on the use of anaerobic hydrolytic bacteria *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* Mz5<sup>T</sup>, *Fibrobacter succinogenes* S85 and *Clostridium cellulovorans*. The enzyme activity assay was a way for us to confirm the appropriateness of the selected bacteria for our experiment, we measured the cellulolytic and xylanolytic enzyme activity of all three bacteria. We decided against the use of inducible mediums as they are costly. Instead we used M2 medium and added them to the bioreactors concurrently with the beginning of the biochemical methane potential assay. We presumed the bacteria would contribute to the increased production and content of methane and do so even without preconditioning. We also used autoclaved bacteria to prove that the addition of bacteria aids the digestion of brewer's spent grain and does not just provide an extra substrate for the production of biogas.

Our main tool was the biochemical methane potential assay or BMP. It is an excellent assay for determining the anaerobic digestibility and appropriateness of a substrate for the production of biogas. We used one liter glass bottles as small bioreactors and measured the volume and content of the gases being produced. From the data we calculated the amount of methane in the biogas.

We measured the pH values in the bioreactors at the beginning and end of the BMP assay and found they did not change much during the assay, staying in a neutral pH range just below pH 7 on average. We also measured the chemical demand for oxygen or COD by which we can judge the quantity of organic matter in a sample. The COD values should theoretically decrease during the assay as organic matter is used up by the various microorganisms, and our results confirmed that.

Short chained fatty acids are an intermediate product in the production of biogas. We measured their concentration with the aid of ether extractions and gas chromatography. Their concentrations were highest at the beginning of the assay and decreased during the assay to negligible amounts by the end of the assay, which correlates to them being used up for the production of methane.

The production of biogas was greatest in the first week of the bioaugmentation assay, it then proceeded to decline to minimal amounts by the end of the assay. In the first assay the addition of autoclaved bacteria caused a greater yield of methane than live bacteria, but the highest percentage of methane was in the bioreactor with *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> (74,6 %). In the second assay the bioreactors with the addition of live bacteria yielded the greatest quantities of methane. The bioreactor with the greatest increase in methane production in the second assay was the one with *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> with a 41,3 % increase in methane yield and a methane content of 74,3 %. In the first assay the bioreactor with *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> also showed the highest increase of methane yield, 47,4 %, a 44,3 % increase in methane yield on average when compared with the methane yield in the bioreactor with uninoculated medium and brewer's spent grain. Compared with its autoclaved counterpart it reached a 14 % increase in methane yield. In both assays the contents of methane were similar, 73 % and 72 % on average respectively, but the increases in methane yield varied between the two assays.

Using the T-RFLP technique we tracked the changes in the microbial community. The profile of the archaeal community did not change significantly, we can therefore presume it is stable and not affected by the addition of the anaerobic hydrolytic bacteria. The bacterial community experienced greater changes, grouping into two distinctive groups for the first and last day, owing to natural changes and shifts in the community and the addition of the bacteria.

We have concluded that the addition of *P. xylanivorans* Mz5<sup>T</sup> caused the greatest increase to methane production and concentration. We have also verified three of our hypotheses as the addition of anaerobic hydrolytic bacteria did increase both the production and the content of methane, the bacteria did not need to be preconditioned and they also caused a greater increase to the production and content of methane than the medium itself. We can neither confirm nor contradict our last hypothesis of living bacteria having a greater influence on the production and content of methane than dead bacteria as the data gathered is very contradictory.

## 8 VIRI

- Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29, 6: 675-685
- Bagi Z., Ács N., Bálint B., Horváth L., Dobó K., Perei K.R., Rákhely G., Kovács K.L. 2007. Biotechnological intensification of biogas production. *Environmental Biotechnology*, 76, 2: 473-482
- Carere C.R., Sparling R., Cicek N., Levin D.B. 2008. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 7: 1342-1360
- Chandra R., Takeuchi H., Hasegawa T. 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3: 1462-1476
- Chandra R., Takeuchi H., Hasegawa T. 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. . *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3: 1462-1476
- Čater M., Zorec M., Marinšek Logar R. 2014. Methods for improving anaerobic lignocellulosic substrates degradation for enhanced biogas production. *Springer Science Reviews*, 2, 1: 51-61
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. *Biogas from waste and renewable resources: An Introduction*. 1st edition. Weinheim, Wiley-VCH: 472 str.
- Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 1: 10-18
- Holdeman L. V., Cato E.P., Moore W.E.C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*, 4th edition. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute and State University: 156 str.
- Kopecný 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, 1: 201-209
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Analitical Biochemistry*, 81: 21-27

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275  
<http://devbio.wustl.edu/InfoSource/ISPDFs/Lowry%201951.pdf> (10. jan 2015)
- Martin-Ryals A., Schideman L., Peng L., Wilkinson H., Wagner R. 2015. Improving anaerobic digestion of a cellulosic waste via routine bioaugmentation with cellulolytic microorganisms. *Bioresource Technology*, 189, 62-70
- Merlino G., Rizzi A., Villa F., Sorlini C., Brambilla M., Navarotto P., Bertazzoni B., Zagni M., Arladi F., Daffonchio D. 2012. Shifts of microbial community structure during anaerobic digestion of agro-industrial energetic crops and food industry byproducts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 9: 1302-1311
- Montgomery L., Flesher B., Stahl, D. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen.nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38, 4: 430-435
- Moody L., Burns R., Wu-Haan W., Spajić R. 2009. Use of biochemical methane potential (BMP) assays for predicting and enhancing anaerobic digester performance. V: Zbornik Radova 44. Hrvatski i 4. Međunarodni Simpozij Agronoma. Opatija, Hrvaška, 16-20 feb 2009. Florijančić T, Lužaić R (ur.). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Poljoprivredni fakultet u Osijeku: 930-934
- Mussatto S. I., Dragone G., Roberto I. C. 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43, 1: 1-14
- Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 2: 578-597
- Nocker A., Burr M., Camper A.K. 2007. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology*, 54, 2: 276-289
- Odlare M., Arthurson V., Pell M., Svensson K., Nehrenheim E., Abubaker J. 2011. Land application of organic waste – Effects on the soil ecosystem. *Applied Energy*, 88, 6: 2210-2218
- Osborn M.A., Moore E.R.B., Timmis K.N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39-50

- Owen W.F., Stuckey D.C., Healy Jr. J.B., Young L.Y., McCarty P.L. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13, 6: 485-492
- Peng J., Lü Z., Rui J., Lu Y. 2008. Dynamics of the methanogenic archaeal community during plant residue decomposition in an anoxic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 9: 2894-2901
- 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
- Pivoravna Laško. Kako nastane pivo.  
<http://www.pivo-lasko.si/blagovne-znamke/o-pivu/kako-nastane-pivo/> (22. jun 2015)
- Raposo F., Fernández-Cegrí V., De la Rubia M.A., Borja R., Béline F., Cavinato C., Demirer G., Fernández B., Fernández-Polanco M., Frigon J.C., Ganesh R., Kaparaju P., Koubova J., Méndez R., Menin G., Peene A., Scherer P., Torrijos M., Uellendahl H., Wienrinck I., de Wilde V. 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, 8: 1088-1098
- Sawatdeenarunat C., Surendra K.C., Takara D., Oechsner H., Khanal S.K. 2015. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass: Challenges and opportunities. *Bioresource Technology*, 178: 178-186
- Schütte U. M. E., Abdo Z., Bent S. J., Shyu C., Williams C. J., Pierson J. D., Forney L. J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 3: 365-380
- Sleat. R., Mah R.A., Robinson R. 1984. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 48, 1: 88-93
- 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: 1496 str.



Strömberg S., Nistor M., Liu J. 2014. Towards eliminating systematic errors caused by the experimental conditions in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*, 34, 11: 1939-1948

Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 4: 849-860

Zhang J., Guo R.B., Qiu Y.L., Qiao J.T., Yuan X.Z., Shi X.S., Wang C.S. 2015. Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179: 306-313

Zorec M., Marinšek-Logar R., Avguštin G. 1997. Isolation of butyric acid producing xylanolytic bacteria from the rumen. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika*, 70: 21-29

## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila:

Mentorici prod. dr. Romani Marinšek Logar za njen čas, pomoč in vodstvo pri izvedbi celotne naloge.

Asistentkama dr. Lijani Fanedl in dr. Maši Zorec, Maši Čater in tehničnima sodelavkama Marti Majdič in Jeleni Zurc za svetovanje in pomoč pri izvedbi tehničnega dela naloge.

Prof. dr. Hrvoju Petkoviću za recenzijo naloge.

## PRILOGA A

### Rezultati plinske kromatografije v poskusih bioaugmentacije BMP

Priloga A1: S plinsko kromatografijo izmerjeni deleži metana v bioreaktorjih v poskusu BMP 1

Bioreaktor	Dan							
	1	3	4	7	11	14	24	30
Negativna kontrola	0,17 0	0,40 8	0,50 8	0,86 0	2,08 3	2,83 3	4,52 0	5,83 4
Standard	2,93 0	4,34 9	4,88 9	6,94 4	9,54 2	10,5 64	11,8 64	13,7 14
Tropine	0,63 5	3,71 8	4,89 9	7,95 5	10,5 93	12,4 51	14,1 11	16,1 09
<i>P. xylanivorans</i> Mz5	6,56 1	22,6 40	27,4 28	31,4 72	33,2 70	36,7 81	35,6 63	38,2 79
<i>C. cellulovorans</i>	7,46 4	22,4 65	24,7 74	29,0 10	31,1 20	34,3 09	33,6 38	36,7 52
<i>F. succinogenes</i> S85	7,36 2	23,7 86	27,1 12	31,5 03	33,4 17	37,0 84	35,2 07	38,3 82
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 in <i>C. cellulovorans</i>	6,87 8	22,9 98	25,1 56	29,8 20	32,0 52	34,9 86	33,6 32	36,4 35
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 in <i>F. succinogenes</i> S85	6,86 7	22,0 32	25,5 51	30,0 17	32,5 67	34,7 98	34,2 82	37,1 06
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	7,52 8	24,4 19	26,5 39	31,0 98	33,7 05	36,4 51	35,3 77	38,5 77
<i>P. xylanivorans</i> Mz5, <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	7,39 1	22,4 29	24,6 64	28,8 40	31,7 65	34,4 78	33,9 48	36,5 09
Gojišče s tropinami	6,52 5	21,9 43	25,0 57	28,3 67	30,9 91	32,9 77	32,3 91	35,3 06
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T	6,75 5	20,4 71	24,7 60	26,7 12	31,2 19	33,2 04	33,2 95	35,9 56
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	8,34 5	26,4 31	28,5 81	30,8 26	34,3 93	37,3 17	36,9 74	39,3 64
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	8,72 4	24,8 06	28,2 36	30,3 97	34,2 59	36,4 38	35,8 16	38,6 43
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T in <i>C. cellulovorans</i>	7,98 0	24,4 19	27,1 58	30,2 24	33,7 30	36,0 12	35,0 93	37,3 84
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T in <i>F. succinogenes</i> S85	8,77 6	23,5 37	27,0 00	29,2 22	32,8 62	35,4 99	35,0 34	38,1 68
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	9,40 8	25,6 53	28,0 53	30,8 90	33,8 66	36,1 27	36,0 05	38,4 92
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5, <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	10,5 13	25,7 92	28,9 55	31,7 94	35,2 95	36,8 14	36,3 17	40,1 21

Priloga A2: S plinsko kromatografijo izmerjeni deleži metana v bioreaktorjih v poskusu BMP 2

Bioreaktor	Dan							
	1	3	4	7	11	14	24	30
Negativna kontrola	0,23 1	0,53 1	0,78 8	1,68 4	2,77 3	3,61 5	5,47 6	8,23 4
Standard	6,18 2	8,33 0	8,19 7	9,63 5	11,2 07	11,5 93	13,2 64	17,4 57
Tropine	0,87 0	5,00 0	5,48 3	8,41 3	10,5 16	11,9 59	14,3 54	19,1 96
<i>P. xylanivorans</i> Mz5	9,84 2	23,8 28	24,9 38	29,2 59	31,5 67	33,3 58	33,9 65	40,0 64
<i>C. cellulovorans</i>	10,2 99	23,7 68	25,8 63	29,2 32	32,3 83	33,4 11	34,6 41	38,2 95
<i>F. succinogenes</i> S85	8,96 3	23,6 07	25,9 32	29,0 26	32,5 07	33,6 14	35,3 69	39,7 79
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 in <i>C. cellulovorans</i>	8,64 7	23,3 87	25,3 26	28,3 60	31,0 97	32,7 60	33,5 83	39,1 26
<i>P. xylanivorans</i> Mz5 in <i>F. succinogenes</i> S85	8,26 3	20,3 36	22,6 33	26,1 18	27,8 26	29,9 67	32,5 07	36,7 82
<i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	10,0 83	25,1 02	26,0 26	28,9 92	30,9 92	32,1 08	34,3 39	38,9 66
<i>P. xylanivorans</i> Mz5, <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	8,52 1	24,8 24	26,1 96	28,8 90	31,2 38	32,9 23	34,9 64	38,7 16
Gojišče s tropinami	11,9 96	23,8 28	24,9 38	27,8 46	31,5 67	32,2 02	35,0 27	40,9 41
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T	8,72 7	24,1 59	25,1 40	29,3 85	32,0 27	33,7 04	35,0 83	39,0 99
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i>	7,85 1	22,3 02	23,7 74	26,7 29	29,4 20	30,8 64	32,7 71	37,0 39
Avtoklaviran <i>F. succinogenes</i> S85	8,45 0	24,6 84	25,5 75	29,5 94	31,7 56	33,7 82	35,3 83	39,6 59
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T in <i>C. cellulovorans</i>	7,00 4	19,8 76	21,7 00	25,3 40	27,5 52	29,5 85	32,1 04	36,9 16
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5T in <i>F. succinogenes</i> S85	9,00 7	24,1 88	25,0 96	27,9 39	30,2 73	31,2 37	32,8 86	38,3 79
Avtoklaviran <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	10,7 25	23,4 32	24,9 07	27,5 76	30,2 82	32,0 60	34,1 45	37,0 83
Avtoklaviran <i>P. xylanivorans</i> Mz5, <i>C. cellulovorans</i> in <i>F. succinogenes</i> S85	6,51 7	20,8 37	22,4 65	27,0 39	29,0 21	32,1 52	33,3 18	35,6 81