UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Domen ZAVEC

FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI IN STRUKTURA MIKROBNIH ZDRUŽB OB ZAGONU INDUSTRIJSKIH BIOPLINSKIH ANAEROBNIH REAKTORJEV

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Domen ZAVEC

FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI IN STRUKTURA MIKROBNIH ZDRUŽB OB ZAGONU INDUSTRIJSKIH BIOPLINSKIH ANAEROBNIH REAKTORJEV

MAGISTRSKO DELO Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS AND MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE DURING START-UP OF INDUSTRIAL ANAEROBIC BIOGAS REACTORS

M. Sc. THESIS Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Blaža Stresa, za recenzentko prof. dr. Ines Mandić Mulec.

Mentor: doc. dr. Blaž STRES

Recenzentka: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR	
	Univerza v Ljubljani, Biotehnična fakulteta, Oddelek za zootehniko	
Član:	doc. dr. Blaž STRES	
	Univerza v Ljubljani, Biotehnična fakulteta, Oddelek za zootehniko	

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC Univerza v Ljubljani, Biotehnična fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Domen Zavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Du2
UDK 579.26:579.66:602.4(043)=163.6
bioplin/bioreaktor/zagon/mikrobne združbe/fizikalno-kemijski parametri/arheje/bakterije/anaerobna presnova/fermentor/metan
ZAVEC, Domen, dipl. mikrobiol. (UN)
STRES, Blaž (mentor)/ MANDIĆ MULEC, Ines (recenzentka)
SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
2015
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI IN STRUKTURA MIKROBNIH ZDRUŽB OB ZAGONU INDUSTRIJSKIH BIOPLINSKIH ANAEROBNIH REAKTORJEV
Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
XII, 72 str., 11 pregl., 25 sl., 8 pril., 62 vir.
SI

JI sl/en

AI

Spremljali smo bioplinsko elektrarno v Vučji vasi (4 MW) od zagona leta 2011 do leta 2014. Zagon je bil opravljen v 3 tednih vnosa biomase iz 3 donorskih reaktorjev. Vzorce smo odvzeli (i) iz 3 donorskih reaktorjev ob zagonu elektrarne (ii) v vseh časovnih točkah (n=13) iz dveh zaporednih fermentorjev (F1-F2) ter (iii) v eni časovni točki iz vseh šestih zaporednih fermentoriev Opisali (F1-F6). smo fizikalno-kemijske parametre (temperatura, pH, KPK, absorpcijski spekter in hlapne maščobne kisline) ter dinamiko mikrobnih združb bakterij in arhej s hitrimi molekularnimi tehnikami. Mikrobne združbe so se ob zagonu spreminjale hitreje kot ob kasnejših časih vzorčenja. Skoz ves čas so ohranjale funkcionalno stabilnost in proizvodnjo bioplina. Najbolj variabilni parametri so bile HMK. Profil mikrobe združbe, se je s časom oddaljil od začetnega iz donorskih reaktorjev, ker se je strukturno prilagajala novim okoljskim pritiskom. Fizikalnokemijski parametri in mikrobne združbe se med bioreaktorjema F1 in F2 v istem času nista bistveno razlikovali. S spremembami bakterijskih združb med časovnimi točkami je bila najbolj povezana vsebnost acetata, KPK in etanol, dočim arhejske združbe s slednjima parametroma kažeta najmanjšo povezavo. Dinamiki arhejske in bakterijske mikrobne združbe sta bili povezni. Reaktorji F1 do F6 kažejo ob istem času, ne glede na različen vnos hranil, majhne razlike v strukturi mikrobnih združb in fizikalno-kemijskih parametrih, razen HMK.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 579.26:579.66:602.4(043)=163.6
СХ	biogas/bioreactors/start-up/microbial communities/physio-chemical parameters/archaea/bacteria/anaerobic digestion/fermenter/methane
AU	ZAVEC, Domen
AA	STRES, Blaž (supervisor)/ MANDIĆ MULEC, Ines (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
מס	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in
PB	Microbiology
PY	2015
TI	PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS AND MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE DURING START-UP OF INDUSTRIAL ANAEROBIC BIOGAS REAKTORS
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XII, 72 p., 11 tab., 25 fig., 8 ann., 62 ref.
LA	S1
AL	sl/en
	We monitored a Biogas plant in Vučja vas (4MW) form the start-up in 2011 to 2014. The start-up was carried out in 3 weeks with the intake of biomass from 3 donor digesters. Samples were taken (i) from donor digesters at the start-up; (ii) at different time points (n=13) from 2 serial digesters (F1-F2); and (iii) at one time point form all 6 serial digesters (F1-F6). We assessed physicochemical parameters (temperature, pH, COD, absorption spectrum and volatile fatty acids) and microbial dynamics with a fast molecular profiling

technique. Changes in microbial community where more rapid at the start-up phase than later on. The microbial communities were functionally stable and produced biogas throughout the entire observed time frame. The most variable parameters were VFA. Microbial community profiles diverged from the ones observed in donor digesters, due to different environmental pressures. At the same time points there was no difference in physiochemical parameters and the microbial community composition between digesters F1 and F2. The most associated parameter whit microbial community changes between time points was acetate, COD and ethanol for bacteria, while archaea communities showed little correlation whit COD and ethanol. Archaeal and bacterial community dynamics was related. Although digesters F1 to F6 have different substrate intake they showed little differences in microbial community and physiochemical parameters at the same time-point, except for VFA.

KAZALO VSEBINE

Str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 BIOPLIN	2
2.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti bioplina	2
2.1.2 Nastanek bioplina (Metanogeneza)	4
2.2 MIKROBNA ZDRUŽBA	6
2.2.1 Bakterije	6
2.2.2 Žveplo oksidirajoče bakterije	
2.2.3 Metanogene arheje	9
2.2.4 Biokemija metanogeneze	
2.2.5 Sintrofija	15
2.3 PROCESNI PARAMETRI	16
2.3.1 Temperatura	
2.3.2 pH	
2.3.3 Kemijska potreba po kisiku (KPK)	17
2.3.4 Hlapne maščobne kisline oz. kratko verižne maščobne kisline	
2.3.5 V vodi topne organske snovi	19
2.3.6 Tipiziranje strukture mikrobnih združb	19
2.3.6 Industrijska skala anaerobnih procesov - Bioplinarna Vučja vas	

3 MATERIALI IN METODE
3.1 SHEMA EKSPERIMENTA
3.2 VZORČENJE
3.2.1 Shranjevanje in predobdelava vzorcev
3.3 IZMERJENI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI
3.3.1 Temperatura
3.3.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)
3.3.3 Določanje hlapnih maščobnih kislin
3.3.4 Molekulska masa DOM (Absorpcijski spektri) 29
3.4 TIPIZACIJA MIKROBNIH ZDRUŽB
3.4.1 Izolacija DNK
3.4.2 Tipizacija mikrobnih združb z LH-PCR
3.4.3 Kapilarna elektroforeza 33
3.4.4 Analiza podatkov LH-PCR 33
3.5 STATISTIČNE ANALIZE
3.5.1 Standardizacija in normalizacija
3.5.2 Nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS)
4 REZULTATI
4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI
4.1.1 Temperatura
4.1.2 pH
4.1.3 Koncentracija raztopljenega organskega ogljika (KPK) 40
4.1.4 Koncentracije hitro dostopnega organskega ogljika (hlapne maščobne kisline in
etanol)
4.1.5 Molekulska masa DOM 44
4.2 MULTIVARIATNA ANALIZA
4.2.1 Podobnost okoljskih parametrov med reaktorji in skozi čas
4.2.2 Analiza profilov bakterijskih mikrobnih združb v povezavi s fizikalno-
kemijskimi parametri skozi čas in med reaktorji 50
4.2.3 Analiza profilov arhejskih mikrobnih združb v povezavi s fizikalno-kemijskimi
parametri skozi čas in med reaktorji

4.2.4 Skupna analiza profilov arhejskih in bakterijskih mikrobnih združb v povezavi	
s fizikalno-kemijskimi parametri skozi čas in med reaktorji	55
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1 RAZPRAVA	57
5.2 SKLEPI	63
6 POVZETEK	64
7 VIRI	66
ZAHVALE	1
PRILOGE	2

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti metana (NIST, 2014)
Preglednica 2: Nezaželene primesi v bioplinu (Deublein in Steinhauser, 2008)
Preglednica 3: Klasifikacija metanogenih arhej (Demirel in Scherer, 2008) 10
Preglednica 4: Skupine substratov, iz katerih metanogene arheje pridobivajo metan ter
pripadajoče stehiometrične reakcije z Gibbsovo prosto energijo pri standardnih
pogojih (Demirel in Scherer, 2008; Madigan in sod., 2009)
Preglednica 5: Obratovalne lastnosti bioplinarne v Vučji vasi (Kolbl, 2014) 22
Preglednica 6: Shema vzorčenja fermentorjev bioplinske elektrarne v Vučji vasi. Stolpec
"čas" prikazuje pretekel čas v dnevih po zagonu bioplinarne. Vzorci so glede na
fermentor in obdobje odvzema barvno kodirani
Preglednica 7: Sestava kalibracijske mešanice za plinski kromatograf (Kolbl, 2014) 28
Preglednica 8: Koeficienti izračunani iz absorpcijskega spektra (Helms in sod., 2008) 29
Preglednica 9: Protokol za verižno reakcijo s polimerazo
Preglednica 10: R ² linearne regresije posameznih HMK in etanola v fermentorju 1 in
fermentorju 2
Preglednica 11: Signifikantost razlike fizikalno-kemijskih parametrov po fermentorjih in
časovnih obdobjih s tekniko permanova47

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz procesa metanogeneze (Demirel in Scherer, 2008)
Slika 2: Nekatere mikrobne vrste v anaerobnih fermentorjih razvrščene po stopnjah
metanogeneze glede na njihove znane fiziološke sposobnosti (Wirth in sod., 2012)
Slika 3: Tri metabolne poti metanogeneze s ključnimi koencimi (Madigan in sod., 2009).14
Slika 4: Shematski prikaz acetogeneze in metanogeneze s sintrofnimi reakcijami (zeleno)
ter glavne sodelujoče fiziološke skupine mikroorganizmov (Ahring, 2003;
Demirel in Scherer, 2008) 15
Slika 5: Bioplinarna Vučja vas iz zraka. Oznake F1 do F6 so fermentorji, KZ1 do KZ3 so
končni zalogovniki, MJ je mešalna jama (Kolbl, 2014)
Slika 6: Shema eksperimenta
Slika 7: Izračun reagentov za reakcijske mešanice s končnim volumnom 25µl s programom
Biometra's EXCEL tool V2.2
Slika 8: Temperature donorskih fermentorjev ter fermentorja 1 in 2 v Vučji vasi ob
vzorčenju
Slika 9: Temperatura v fermentorjih 1 do 6 v bioplinski elektrarni v Vučji vasi
Slika 10: pH vzorcev fermentacijske brozge s standardnimi odkloni
Slika 11: Primerjava pH vrednosti v fermentorju 1 in fermentorju 2 z linearno regresijo. 39
Slika 12: pH s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge iz fermentorjev 1 do 6
odvzetih dne 31.1.2014
Slika 13: Kemična potreba po kisiku s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge
odvzete ob različnih časih
Slika 14: Kemična potreba po kisiku s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge
iz fermentorjev 1 do 6 odvzetih dne 31.1.2014 41
Slika 15: Koncentracije posameznih HMK in etanola ter skupne koncentracije vseh
izmerjenih HMK in etanola v vzorcih fermentacijske brozge za fermentorja 1 in
2. *Vzorcev za fermentor 1 za 20.12.2012 in 15.01.2014 dan ni bilo 43
Slika 16: Koncentracije posameznih HMK in etanola s standardnimi odkloni, ter skupne
koncentracije vseh izmerjenih HMK in etanola v vzorcih fermentacijske brozge
za fermentorja 1 do 6 odvzete 31.1.2011

Slika 17: Vrednost Sr s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge odvzete ob
različnih časih
Slika 18: Vrednost Sr s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge iz
fermentorjev 1 do 6 odvzete dne 31.1.2011
Slika 19: Ordinacija podobnosti fizikalno-kemijskih parametrov skozi čas v reaktorjih F1
in F2 ter izvornih biomasah ob zagonu bioplinske elektrarne s tehniko
nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS)
Slika 20: Ordinacija podobnosti fizikalno-kemijskih parametrov reaktorjev F1 do F6 iz dne
31.1.2014 s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS) 49
Slika 21: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in
2, ter izvornih biomasah s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje
(NM-MDS). Uporabljeni so profili z relativnimi deleži fragmentov DNK 51
Slika 22: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in
2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje
(NM-MDS). Uporabljeni so profili s prisotnost/odsotnost fragmentov DNK 52
Slika 23: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2,
ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-
MDS). Uporabljeni so profili z relativnimi deleži fragmentov DNK 54
Slika 24: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2,
ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-
MDS). Uporabljeni so profili s prisotnost/odsotnost fragmentov DNK 55
Slika 25: Ordinacija odnosov arhejskih in bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v
fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več
dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z relativnimi
deleži fragmentov DNK

KAZALO PRILOG

Priloga A: Shema vzorčenja fermentorjev bioplinske elektrarne v Vučji vasi na časovni osi.

Priloga B: Umeritvena krivulja reakcije KPK pri valovni dolžini 415 nm.

- Priloga C: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK.
- Priloga D: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s prisotnost/odsotnost fragmentov DNK.
- Priloga E: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK.
- Priloga F: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s prisotnost/odsotnost fragmentov DNK.

Priloga G: Matrika Pearsonovih korelacij med izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri.

Priloga H: Matrika Spearmanove korelacije med izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
Вр	bazni par v dvoverižni vijačnici nukleinske kisline
CDOM	kromogena raztopljena organska snov (angl.: Chromophoric Dissolved Organic Matter)
DGGE	elektroforeza v denaturacijskme gradientu (angl.: <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOM	raztopljena organska snov (angl.: Dissolved Organic Matter)
НМК	hlapne maščobne kisline
HMW CDOM	kromogena raztopljena organska snov z molekulsko maso manjšo od 1 kDa (angl.: <i>high molecular weight CDOM</i>)
HRT	hidravlični zadrževalni čas (angl.: Hydraulic Retention Time)
КРК	kemijska potreba po kisiku
LH-PCR	PCR z dolžinsko heterogenostjo (angl.: Length Heterogeneity PCR)
LMW CDOM	kromogena raztopljena organska snov z molekulsko maso večjo od 1 kDa (angl.: <i>Low Molecular Weight CDOM</i>)
NM-MDS	Nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (angl.: <i>NonMetric</i> <i>MultiDimensional Scaling</i>)
OLR	organska obremenitev (angl.: Organic Loading Rate)
PCR	verižna reakcija z polimerazo (angl.: Polymerase Chain Reaction)
rDNK	ribosomska deoksiribonukleinska kislina
S/I	razmerje med substratom in inokulumom
S _r	razmerje med naklonom S(275nm-295nm) in S(350nm-400nm) (angl.: <i>Slope ratio</i>)
TGGE	elektroforeza v temperaturnem gradientu (angl.: <i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>)
TOC	Skupen organski ogljik (angl.: Total Organic Carbon)
T-RFLP	polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov (angl.: <i>Terminal</i> <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)

1 UVOD

Prvi evropski znanstvenik, ki se je z bioplinom dokumentirano srečal je bil italijanski fizik Alessandro Volta, ki je že pred 200 leti metan oziroma bioplin pridobival iz sedimentov močvirij in ga opisal kot vnetljiv plin (Madigan in sod., 2009). Bioplin je vse stransko uporaben obnovljiv vir energije, z njim lahko delno nadomestimo fosilna goriva, katera uporabljamo za proizvodnjo energije in toplote. Prečiščen bioplin imenovan biometan, lahko uporabimo kot gorivo za motorje z notranjim izgorevanjem, v industriji pri proizvodnji kemikalij in različnih materialov, lahko pa ga tudi vbrizgavamo v obstoječ nacionalni in nadnacionalni sistem plinovodov za zemeljski plin (Weiland, 2010; Wirth in sod., 2012). Proizvodnja bioplina poteka v anaerobnem okolju in ponuja veliko prednosti pred ostalimi oblikami biološko pridobljene energije, je ena izmed najbolj energijsko učinkovitih in okoljsko prijaznih tehnologij za proizvodnjo energije iz obnovljivih virov (Fehrenbach in sod., 2008). V primerjavi s fosilnimi viri energije zmanjšuje emisije toplogrednih plinov, vsebuje najmanjše postavke glede transporta energentov saj se uporabljajo predvsem lokalni viri surovin, nastali digestat pa lahko kot končni produkt nadomestimo mineralna gnojila (Weiland, 2010).

1.1 NAMEN DELA

Nastanek bioplina v anaerobnih reaktorjih omogočajo kompleksne mikrobne združbe bakterij in arhej (Weiland, 2010). Namen naše raziskave je bil izboljšati razumevanje dinamike mikrobne združbe v povezavi s fizikalno-kemijskimi parametri v bioreaktorju od zagona bioplinske elektrarne do njenega stabilnega delovanja. Zato smo spremljali 4 MW bioplinsko elektrarno v Vučji vasi od zagona bioplinarne leta 2011 do leta 2014. Bioplinsko elektrarno v Vučji vasi sestavlja šest fermentorjev (6x 3.931 m³ = 23,586 m³) in dva postfermentorja (2 x 5.350 m³ = 10,700 m³), v skupnem volumnu 34,286 m³. Želeli smo proučiti spremembe v strukturi mikrobnih združb bakterij in arhej ter procesnih parametrih skozi tri leta obratovanja ter najti morebitne povezave z izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri. Sledili smo vplivom pH, temperature, kemijske potrebe po kisiku, hlapnih maščobnih kislin (C2-C6) in molekularne teže

DOM oziroma razmerja med težkim in lahkim DOM na mikrobno združbo bakterij in arhej v bioreaktorjih.

1.2 CILJI IN HIPOTEZE

Cilj raziskave je bil preveriti ali obstajajo korelacije med fizikalno-kemijskimi parametri v reaktorju in strukturo mikrobne združbe bakterij in arhej in opredeliti, ali gre za usmerjene ali naključne spremembe v strukturi mikrobnih združb.

Postavili smo si dve ničelni hipotezi [H₀] raziskave:

1. [H₀] :Izmerjeni fizikalno-kemijski parametri se med vzorci, odvzetimi ob različnih časih, ne bodo signifikantno razlikovali.

H₁: Izmerjeni fizikalno-kemijski parametri se bodo med vzorci, odvzetimi ob različnih časih, signifikantno razlikovali.

 [H₀]: Struktura mikrobne združba se med vzorci, odvzetimi ob različnih časih, ne bo signifikantno razlikovala.

 H_{1a} : Struktura mikrobne združbe se bo s časom spreminjala kot odziv na spremenjene okoljske parametre.

 H_{1b} : Struktura mikrobne združbe se bo s časom naključno spreminjala in ne bo povezana s fizikalno-kemijskimi parametri.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLIN

2.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti bioplina

Bioplin je zmes metana in ogljikovega dioksida ter različnih z industrijskega stališča nezaželenih nečistoč. Za tehnično uporabnost mora bioplin vsebovati vsaj 45 % metana. V povprečju se vsebnost metana v bioplinu giblje med 55 % do 70 % ter 30 % do 45 % ogljikovega dioksida, preostanek so primesi in nečistoče kot so vodikov sulfid (H₂S), amonijak (NH₃), vodna para (H₂0), dušik (N₂), prah in siloksani (Deublein in

Steinhauser, 2008), kar je odvisno od sestave organskih substratov, iz katerih bioplin nastaja, ter procesnih pogojev, v katerih anaerobna razgradnja poteka.

Energetska komponenta bioplina je metan (CH₄). Metan je tudi pomembna sestavina zemeljskega plina in ga najdemo tudi v atmosferi, kjer deluje kot toplogredni plin (Khalil, 1999).

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti metana (NIST, 2014).

Molekulska masa (g/mol)	16,04
Gostota pri 15 °C, 1atm (g/L)	0,67
Energijska vrednost pri 25 °C, 1atm (kJ/mol)	890,3
Energijska vrednost pri 25 °C, 1atm (MJ/m ³)	36,5

Bioplin ima v primerjavi s čistim metanom manjšo energijsko vrednost. Energijska vrednost bioplina se giblje od 21,6 MJ/m³ do 23,4 MJ/m³, kar pa je predvsem odvisno od vsebnosti ogljikovega dioksida. (Deublein in Steinhauser, 2008).

Preglednica 2: Nezaželene primesi v bioplinu (Deublein in Steinhauser, 2008).

H ₂ S (% V/V)	do 0,5
NH ₃ (% V/V)	do 0,05
Vodna para (% V/V)	1 do 5
$Prah > 5 \mu m$	Ni podatka
N ₂ (% V/V)	do 5
Siloksani (mg/m ₃)	do 50

2.1.2 Nastanek bioplina (Metanogeneza)

Bioplin nastaja med procesom anaerobne presnove, ki ga najdemo tudi v naravnih okoljih kot so sedimenti, riževa polja, močvirja in vamp prežvekovalcev. Za delovanje tega procesa potrebujemo številčno velik in metabolno raznolik konzorcij različnih mikroorganizmov, ki v procesu anaerobne razgradnje organske snovi opravljajo zelo različne vloge (Ahring, 2003).

Razgradnjo substrata v anaerobni presnovi lahko razdelimo na 4 poglavitne stopnje (Deublein in Steinhauser, 2008; Weiland, 2010):

- 1. Hidroliza
- 2. Acidogeneza
- 3. Acetogeneza
- 4. Metanogeneza

V reaktorje, kjer poteka anaerobna razgradnja organskih snovi, vstopajo različno kompleksni substrati. Polimerni substrati spadajo med bolj kompleksne, mednje štejemo polisaharide, proteine in lipide, preprostejši za razgradnjo so oligomerni in monomerni substrati, kot so posamezne oblike sladkorjev, alkoholov ali maščobnih kislin. Kompleksne organske molekule se morajo najprej razgraditi do osnovnih monomerih gradnikov, kar poteka v prvem koraku anaerobne presnove v t.i. hidrolizi. Hidrolizo in acidogenezo vrši prva skupina mikroorganizmov. Produkt hidrolize in acidogeneze je v glavnem acetat in vodik ter različne količine hlapnih maščobnih kislin, v glavnem propionat (CH₃CH₂COO⁻) in butirat (CH₃(CH₂)₂COO⁻). Hidrolitični mikroorganizmi izločajo encime kot so celulaze, celobiaze, ksilanaze, amilaze, lipaze in proteaze. Zaradi raznolikosti v kemijskih vezeh različnih organskih substratov se je skozi evolucijo razvila velika raznolikost hidrolitičnih encimov, posledično so tudi mikrobne združbe, ki vršijo hidrolizo od vseh mikroorganizmov udeleženih v procesu anaerobne razgradnje najbolj raznolike (Weiland, 2010).



Slika 1: Shematski prikaz procesa metanogeneze (Demirel in Scherer, 2008).

Hidroliza pomeni razgradnjo višjih polimerov v monomere, acidogeneza pa nastanek kislin kot so acetat, hlapne maščobne kisline in vodik. Tretji korak anaerobne razgradnje organskih spojin je acetogeneza, kjer se hlapne maščobne kisline pretvorijo v acetat in vodik. Akumulacija vodika lahko inhibira acetogene sintrofne bakterije, zato je ohranjevanje nizkega parcialnega tlaka nujno za delovanje acetogenih bakterij (Demirel in Scherer, 2008; Weiland, 2010).

Zadnji korak v anaerobni presnovi je metanogeneza. Pri tem se tvori metan po dveh glavnih poteh, in sicer (i) hidrogenotrofno - iz vodika in ogljikovega dioksida in (ii) acetoklastično - iz acetata (Deublein in Steinhauser, 2008; Weiland, 2010).

2.2 MIKROBNA ZDRUŽBA

2.2.1 Bakterije

Bakterijske celice lahko številčno predstavljajo od 80 % do skoraj 100 % mikrobov v združbi anaerobne presnove, kar je predvsem odvisno od substrata (Sundberg in sod., 2013). Bakterijsko združbo lahko sicer razdelimo na 3 funkcionalne skupine. (i) Prva skupina so bakterije, ki vršijo hidrolizo. (ii) Druga funkcionalna skupina so acidogene bakterije. Skoraj vse acidogene bakterije sodelujejo tudi pri hidrolizi. Med acidogenimi bakterijami je rod *Clostridium* eden izmed najbolj filogenetsko in metabolno raznolikih, sposoben je razgradnje širokega spektra substratov. (iii) Tretja skupina so acetogene bakterije, ki razgrajujejo hlapne maščobne kisline do acetata. Za njihov obstoj je potrebno simbiotsko razmerje s hidrogenotrofi, zaradi nizkega energetskega izplena imajo zelo dolge generacijske čase (Deublein in Steinhauser, 2008).

Sundberg in sod. (2013) so s pomočjo pirosekvenciranja genov za 16S rRNK opisali mikrobno sestavo 21 anaerobnih fermentorjev. Fermentorji so se razlikovalni na osnovi substratov in obratovalne temperature. Sedem fermentorjev je obratovalo na osnovi blata iz čistilnih naprav, štirinajst pa na osnovi kofermentacije energetskih rastlin in gnojevke. Obratovalne temperature reaktorjev so bile mezofilne in termofilne. Tako so naredili pregled čez mikrobno združbo različnih anaerobnih fermentorjev pod različnimi pogoji skozi čas. Ugotovili so, da so bakterije iz razreda Clostridia in Bacteroidetes dominirale v vseh bioreaktorjih. Zastopanost Firmicutes je bila bistveno večja v kofermentacijskih reaktorjih (69 %) kot pa v fermentorjih blata iz čistilnih naprav (25 %). Zastopanost Bacteroidetes pa je variirala glede na temperaturo. V mezofilnih reaktorjih jih je bilo od 14 % do 15 %, v termofilnih pa samo 7 %. Actinobacteria, Proteobacteria in Spirochetes so predstavljale 4-6 % zaznanih 16S sekvenc. Verrucomicrobium, Acidobacterium in Chloroflexi pa od 0,5 % do 2 % v reaktorjih z blatom iz ČN in pod 0,8 % v reaktorjih z kofermentacijo. Thermotogae so našli predvsem v termofilnih reaktorjih. Podobno združbo so odkrili tudi Wirth in sod. (2012) s pomočjo metagenomske analize. V njihovem bioreaktorju so dokazali še prisotnost Mollicutes in Fusobacteria, ter nekoliko manjšo zastopanost Bacteroidetes.

Mikroorganizme so s pomočjo znanih fizioloških lastnosti razvrstili med različne stopnje metanogeneze (Slika 2).



Slika 2: Nekatere mikrobne vrste v anaerobnih fermentorjih razvrščene po stopnjah metanogeneze glede na njihove znane fiziološke sposobnosti (Wirth in sod., 2012).

Acetat v anaerobni presnovi lahko nastaja na dva način. Proizvedejo ga lahko obligatne H₂ proizvajajoče acetogene bakterije kot sta *Syntrophobacter wolinii*, z razgradnjo propionata (Miyamoto, 1997; Ariesyady in sod., 2007) in *Sytrophomonos wolfei*, z razgradnjo butirata (Miyamoto, 1997; Ariesyady in sod., 2007). Te bakterije uporabljajo hlapne maščobne kisline kot substrat in proizvajajo acetat, H₂ in CO₂. Drug način nastanka acetata je s pomočjo homoacetogenih bakterij kot sta *Acetobacterium woodii* in *Clostridium aceticum* (Weiland, 2010). Te bakterije kot substrat porabljajo H₂ in CO₂, enako kot hidrogenotrofne metanogene arheje. Proizvajajo pa acetat, katerega lahko porabljajo acetoklastične metanogene arheje.

2.2.2 Žveplo oksidirajoče bakterije

Iz industrijskega stališča je najbolj problematična nečistoča v bioplinu sulfid (H_2S), zaradi korozivnosti za opremo, cevovode, motorje z notranjim izgorevanjem in katalizatorje. Po izgorevanju se v atmosfero izloča kot SO₂ oziroma v primeru nepopolnega izgorevanja kot H_2S (Deublein in Steinhauser, 2008) z izrazito neprijetnim vonjem. Sulfid lahko iz bioplina odstranimo na več načinov:

- a) Dodajanje kisika/zraka med anaerobno presnovo
- b) Dodatek železovega klorida med anaerobno presnovo
- c) Adsorpcija z železovim oksidom ali železovim hidroksidom
- d) Vezava na težke kovine v substratih
- e) Membranska ločba
- f) Biološki filter
- g) Adsorpcija na aktivirano oglje

Najbolj preprost način odstranjevanja H_2S je dodajanje relativno majhnih količin kisika oziroma zraka v anaerobni reaktor. Tako pride v reaktorju do oksidacije H_2S do elementarnega žvepla S^0 s pomočjo sulfid oksidirajočih bakterij rodu *Thiobacillus*. Zrak oziroma kisik se dodaja v plinasto fazo reaktorja, kjer bakterije vršijo oksidacijo na ogrodju reaktorja. Da pride do oksidacije sulfida je potrebno imeti od 2 do 6 % kisika v plinasti fazi bioreaktorja. Na ta način se lahko zmanjša koncentracija sulfida v plinu pod 0,01 % (V/V) in dosežemo 80 % do 99 % zmanjšanje sulfida v bioplinu. Potrebna pa je previdnost pri doziranju kisika v reaktor saj previsoka koncentracija kisika v reaktorju inhibira anaerobne procese ter ogroža varnost. Bioplin, ki vsebuje 6 % do 12 % zraka, je namreč eksploziven (Ryckebosch in sod., 2011).

2.2.3 Metanogene arheje

Metanogene arheje vršijo zadnji korak anaerobne presnove v mikrobni združbi. Predstavljajo od ≈ 1 % do 20 % vseh mikrobov (Sundberg in sod., 2013). Uvrščamo jih v podskupino *Euryarchaeot*, najpomembnejša rodova sta *Methanobacterium* in *Methanosarcina*. Slednja sta tudi predstavnika hidrogenotrofnih in acetotrofnih arhej. Gre za razdelitev, ki ne temelji na filogenetskih, ampak fizioloških lastnostih.

Med *Euryarchaeot* najdemo poleg metanogenih arhej še mnoge druge, kot so ekstremni halofili, termofili in acidofili (Madigan in sod., 2009). Večina poznanih metanogenov je mezofilnih in nehalofilnih, za optimalno rast potrebujejo temperature od 32 °C do 42 °C, poznamo pa tudi nekatere ekstremofile, ki rastejo optimalno pri zelo visokih ali nizkih temperaturah, ali pa pri zelo visokih koncentracijah soli. Pomembna manjša skupina so termofilne metanogene arheje, katere za optimalno rast potrebujejo 48 °C do 55 °C. Zelo so občutljive na temperaturna nihanja, ki ne smejo znašati več kot ±2 °C, ter posledično vplive nihanja pH ter amonijskega dušika. Nekateri psihrofilni predstavniki lahko proizvajajo metan vse do ledišča (0,6 °C). Generacijski čas metanogenih arhej je v optimalnih pogojih bil ocenjen na 100 ur (Deublein in Steinhauser, 2008). Posebnost je ekstremen termofil *Methanopyrus*, ki je sposoben rasti pri temperaturah do 110 °C, optimum pa ima pri 100 °C. V optimalnih pogojih je generacijski čas samo 1 ura, kar je v primerjavi z metanogenimi arhejami izjemno hitro. Njegov naravni habitat so sedimenti ob globokomorskih hidrotermalnih vrelcih, kjer kot substrat izrablja samo vodik in ogljikov dioksid (Madigan in sod., 2009).

razred (način metanogeneze)	rod		
	Methanobacterium		
	Methanobrevibacter		
Methanobacteria (hidrogenotrofni)	Methanosphaera		
	Methanothermobacter		
	Methanothermus		
	Methanococcus		
Mathanagagi (hidroganatrafni)	Methanothermococcus		
	Methanocaldococcus		
	Methanotorris		
	Methanomicrobium		
	Methanoculleus		
	Methanofollis		
	Methanogenium		
Mathanamiarahia (hidroganatrafai)	Methanolacinia		
Methanomiciolia (indiogenotionii)	Methanoplanus		
	Methanocorpusculaceae		
	Methanocorpusculum		
	Methanospirillaceae		
	Methanospirillum		
	Methanosarcina		
	Methanococcoides		
	Methanohalobium		
Mathanasarainalas (acatatrafi in	Methanohalophilus		
Methanosarcinales (acetotrofi in	Methanolobus		
	Methanomethylovorans		
	Methanimicrococcus		
	Methanosalsum		
	Methanosaeta		

Preglednica 3: Klasifikacija metanogenih arhej (Demirel in Scherer, 2008).

V preglednici 3 je prikaz klasifikacije metanogenih arhej. Edini, acetotrofen je razred *Methanosarcinales*, čeprav je acetotrofna pot dolgo časa veljala za poglavitno pot metanogeneze. Znana predstavnika tega razreda sta *Methanosarcina* in *Methanosaeta*, ki v bioreaktorjih velikokrat tekmujeta za isti substrat, vendar imata različne fiziološke lastnosti, kar vodi v prevlado enega. Ključna je koncentracija acetata. Nižje koncentracije acetata so namreč bolj ugodne za arhejo *Methanosaeta*, ki v takšnih pogojih izpodrine arhejo *Methanosarcina*. Pri visokih koncentracijah acetata pa se zgodi ravno obratno. Razlika med njima se skriva v Michaelis–Mentenovi kinetiki. Tako ima *Methanosaeta* pa ravno obratno, visoko afiniteto do substrata in nizko koncentracijo saturacijo saturacije (Demirel in Scherer, 2008; Karakashev in sod., 2005).

Po fiziologiji so metanogene arheje obligatni anaerobi in potrebujejo striktno anoksično okolje. Glede na vrsto lahko metanogene arheje gojimo v mediju z minerali in v atmosferi z $H_2 + CH_4$ v razmerju 4:1 ali v prisotnosti acetata (Madigan in sod., 2009). Najdemo jih v različnih habitatih (Madigan in sod., 2009):

- Anoksični sedimenti: močvirja, barja, riževa polja in namočena zemlja
- Prebavila živali:
 - Vamp prežvekovalcev kot so govedo, ovce, jeleni, srne in kamele
 - V slepem črevesu živali s po želodčno fermentacijo kot so konji in kunci
 - Debelo črevo monogastričnih živali kot so človek, svinja in pes
 - Epigaster pri celulolitičnih insektih kot so termiti
- Geotermalni in hidrotermalni viri H₂ + CO₂
- Endosimbionti različnih anaerobnih protozojev
- Industrijski okoljih: Anaerobnih bioreaktorjih, naftovodih, lagunah v kmetijstvu

2.2.4 Biokemija metanogeneze

Metanogene arheje lahko koristijo 3 skupine substratov, prikazane v preglednici 4. V resnici pa je metanogeneza precej bolj kompleksen biokemičen proces, kot je razvidno iz spodnjih poenostavljenih enačb. Potrebni so namreč za metanogene arheje edinstveni encimi in koencimi.

Preglednica 4: Skupine substratov, iz katerih metanogene arheje pridobivajo metan ter pripadajoče stehiometrične reakcije z Gibbsovo prosto energijo pri standardnih pogojih (Demirel in Scherer, 2008; Madigan in sod., 2009).

Skupine substratov in predstavniki	Reakcije	ΔG^0
Ogljikovem dioksidu podobni substrati		
Ogljikov dioksid, CO ₂ (z elektroni od H ₂ , piruvata	$CO_2 + 4 H_2 \rightarrow 2 H_2O$	-131 kJ
ali nekaterih alkoholov)		
Format, HCOO ⁻		
Ogljikov monoksid, CO		
Metilni substrati		
Metanol, CH ₃ OH	$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-113 kJ
Metilamin, CH ₃ NH ₄ ⁺		
Dimetilamin, (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	$4CH_{3}OH \rightarrow 3CH_{4} + CO_{2} + 2H_{2}O$	-319 kJ
Trimetilamin, (CH ₃) ₃ NH ⁺		
Metilmerkaptan, CH ₃ SH		
Dimetilsulfid, (CH ₃) ₂ S		
Acetotropični substrati		
	$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31 kJ
Acetat, CH ₃ COO ⁻		
Piruvat, CH ₃ COCOO ⁻		
	1	I

Koencime, ki so potrebni pri metanogenezi lahko razvrstimo v dve skupini (Madigan in sod., 2009):

- 1. Koencimi, ki prenašajo substrat:
 - metanofuran
 - metanopterin
 - koencim M
 - koencim F₄₃₀
 - korinoid
- 2. Koencimi, ki prenašajo elektrone, potrebni za redukcijo substrata:
 - koencim F₄₂₀
 - koencim B
 - ferodoksin

Za sintezo teh koencimov so potrebi različni mikronutrienti, kot so železo, nikelj, kobalt selen, molibden in volfram. Med njimi je nikelj še posebej pomemben saj je potreben za sintezo koencima F₄₃₀. Prav tako je od železa odvisno zelo veliko število mikroorganizmov in mora zaradi tega biti prisoten v višjih koncentracijah (1 do 10 mg/l) glede na ostale mikronutriente (do 0,06 mg/l). V primeru, ko so edini substrati energetske rastline prihaja do pomanjkanja le teh in jih je za učinkovito metanogenezo potrebno dodajati. Temu se izognemo z dodajanjem gnojevke (Chen in sod., 2008; Weiland, 2010). Na sliki 3 je shematski prikaz metanogeneze z glavnimi koencimi. Arheje lahko proizvajajo metan po treh metabolnih poteh iz treh različnih skupin substratov (Preglednica 4). ATP pridobivajo preko elektronske transportne verige, kjer se ustvarja H⁺ elektrokemični gradient. Sposobni so tudi avtotrofije, ogljikov dioksid fiksirajo preko poti acetil-koencima A (Madigan in sod., 2009). Z raziskovalnega vidika je zelo zanimiv koencim F₄₂₀. Ta namreč absorbira svetlobo pri valovni dolžini 420 nm in oddaja svetlobo v modro zelenem spektru. Te avtoflurescentne lastnosti lahko s pomočjo flurescenčnega mikroskopa uporabimo za ločevanje metanogenih arhej od ostalih mikroorganizmov v združbi pri tehnikah direktnega štetja pod mikroskopom (Madigan in sod., 2009).



Slika 3: Tri metabolne poti metanogeneze s ključnimi koencimi. Vsak začetni substrat je predstavnik ene od treh skupine substratov, ki jih metanogene arheje uporabljajo. Prikazane poti so: (rumena) hidrogenotrofna, (zelena) acetotrofna in (oranžna) metilni substrati (Madigan in sod., 2009).

Delež, ki ga posamezna pot metanogeneze doprinese k celokupni metanogenezi, je odvisna od velikega števila dejavnikov. V splošnem velja, da naj bi približno 70 % metana nastajalo po acetotrofni poti, 30 % pa po hidrogenotrofni (Ahring, 2003; Madigan in sod., 2009). Nekatere novejše raziskave pa so pokazale prevlado hidrogenotrofnih metanogenih arhej in jim pripisujejo večji pomen, kot je veljalo do sedaj (leto 2014). Pot metanogeneze, ki se vzpostavi kot primarna, precej variira od fermentorja do fermentorja, in je odvisna od substrata, navzoče združbe in okoljskih parametrov, kot so prosti amonijak, temperatura, substrat, ter čisto tehničnih omejitev molekularnih metod, ki se uporabljajo v analizah (Krause in sod., 2008; Regueiro in sod., 2012; Wirth in sod., 2012).

2.2.5 Sintrofija

Sintrofija je ključnega pomena za razgradnjo kompleksnih polimerov v anaerobnem okolju in je ključna v zadnjih dveh korakih metanogeneze. Sintrofne bakterije oziroma obligatne H₂ proizvajajoče acetogene bakterije pretvarjajo hlapne maščobne kisline, kot so propionat in butirat, ter nekatere aromatske spojine v vodik in acetat in s tem preprečujejo njihovo akumulacijo (Slika 4). Te reakcije pa so pod standardnimi pogoji termodinamsko neugodne. Potrebna je sklopitev metabolizmov sintrofnih bakterije. Te bakterije odstranjujejo višek vodika in s tem nižajo parcialni tlak do te mere, da postane razgradnja hlapnih maščobnih kislin za sintrofne bakterije termodinamsko ugodna (McInerney in sod., 2009). Sklopitev reakcij je bolj učinkovita, če je stik med sodelujočimi mikroorganizmi tesnejši. Zato se v nekaterih reaktorskih sistemih, kjer prevladujejo v vodi topni viri organske snovi, sintrofni organizmi organizirajo v granule ali flokule. To omogoča tesnejši stik in boljšo sklopitev biokemijskih reakcij, kot pa med suspendiranimi mikroorganizmi, kjer prihaja do zmanjšanega vodikovega transporta zaradi omejene difuzije (Ahring, 2003).



Slika 4: Shematski prikaz acetogeneze in metanogeneze s sintrofnimi reakcijami (zeleno) ter glavne sodelujoče fiziološke skupine mikroorganizmov (Ahring, 2003; Demirel in Scherer, 2008).

2.3 PROCESNI PARAMETRI

Mikrobni odzivi v anaerobni razgradnji na industrijski skali so odvisni od različnih, fizikalnih in kemijskih procesnih parametrov, ki jih je potrebno kontrolirati in proces uravnavati tako, da poteka optimalno. Potrebe bakterij in arhej se med seboj razlikujejo, posledično je potrebno vzpostaviti takšno okolje, da so primarno vseskozi izpolnjene potrebe metanogenih arhej, kot ključnih mikroorganizmov v procesu proizvodnje metana (Deublein in Steinhauser, 2008). Optimalno okolje predvsem pri razgradnji zelo velikega števila kemijsko raznolikih in količinsko variabilnih substratov za obe skupini mikroorganizmov lahko vzpostavimo, če ločimo posamezne stopnje fermentacije v različnih fermentorjih (Pervin in sod., 2013).

2.3.1 Temperatura

Proces metanogeneze glede na temperaturo delimo na psihrofilini (pod 20 °C), mezofilni (30 °C do 40 °C) in termofilni (50 °C do 60 °C), sicer pa se točne definicije med avtorji razlikujejo. Hitrost anaerobne presnove se z večanjem temperature od 20 °C do 60 °C povečuje. Anaerobna presnova, ki poteka pod 20 °C ali nad 60 °C pa ima v večini primerov nižje izkoristke (Ahring, 2003). Termofilne Metanogene arheje so zelo občutljive na hitre spremembe temperature, ki so večje kot ± 2 °C (Deublein in Steinhauser, 2008), mezofilne metanogene arheje pa so odporne na temperaturna nihanja do ± 3 °C (Weiland, 2010). Temperatura je eden izmed glavnih dejavnikov, ki vpliva na mikrobno združbo (Ahring, 2003; Lee in sod., 2012). Vpliva pa še na druge pomembne parametre kot so inhibicija z amonjakom, hitrost razgradnje substrata, topnost plinov itd. (Chen in sod., 2008). Vendar pa zadnje primerjave kažejo, da so koristi termofilne obdelave s stališča izplena metana zanemarljivo majhne v primerjavi z mezofilnim procesom glede na samo nestabilnost termofilnega procesa, ki ga tovrstna tehnologija prinaša.

2.3.2 pH

pH optimum za metanogenezo je od 6,7 do 7,5. Zato je kontroliranje pH v fermentorju ključno za uspešno fermentacijo, saj je pri pH 6,7 metanogeneza v večini do sedaj znanih primerov inhibirana. Posledično se začne še dodatna akumulacija organskih

kislin in padec pH, kar imenujemo acidifikacija. To lahko vodi v popolno zaustavitev procesa metanogeneze (Deublein in Steinhauser, 2008). Različni avtorji poročajo različne razpone pH, vendar so si večinoma enotni glede spodnjih mejnih vrednosti pH. Precej pa se razlikujejo zgornje inhibitorne vrednosti pH, te segajo po poročanjih nekaterih avtorjev vse do pH 8,3 -8,5 (Mshandete in sod., 2006). Do takih razlik v poročanih zgornjih inhibitornih mejah pH prihaja zaradi velikega vpliva, ki ga ima pH na inhibitorske učinke različnih spojin v mediju, predvsem amonijaka, katerega inhibitorni učinek se precej povečuje z višanjem pH in HMK katerih inhibitorni učinek se z višanjem pH znižuje (Chen in sod., 2008). Gre torej za večdimenzionalen vpliv spremembe pH na toksičnost drugih spojin.

2.3.3 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Kemijska potreba po kisiku je hitra in poceni metoda za kvantifikacijo organskih snovi v vodi, ki je v široki uporabi za spremljanje, načrtovanje, modeliranje in analiziranje obratovanja čistilnih naprav (Dubber in Gray, 2010). Določanje KPK je možno s titracijo ali kolorimetrično po metodah EPA 410.4, Hach® Method 8000 in standardni metodi 5220D.

Najbolj natančna metoda določanja vsebnosti organskega ogljika je sicer analiza skupnega organske ogljika (angl.: *Total Organic Carbon*), saj lahko s to metodo določamo vsebnost zelo kompleksnih organskih molekul, katere nastopajo v industrijskih okoljih (Dubber in Gray, 2010).

V splošnem je sprejeto, da večino organskih molekul zajamemo tudi z meritvami KPK, zaradi česar so meritve KPK tudi signifikantno korelirane z TOC (Dubber in Gray, 2010). KPK lahko izmerimo kot celokupen ali topen. Pri topnem KPK upoštevamo samo topno frakcijo organskega ogljika. To dosežemo tako, da s filtracijo ali centrifugiranjem iz vodne frakcije odstranimo suspendirane delce.

Topni KPK predstavlja ekvivalent v vodi topnih organskih snovi, ti pa predstavljajo substrat za mikroorganizme, saj so ravno topne organske snovi najbolj dostopne mikroorganizmom za razgradnjo. Od njihove koncentracije je odvisna njihova aktivnost in hitrost rasti.

2.3.4 Hlapne maščobne kisline oz. kratko verižne maščobne kisline

Maščobne kisline, ki jih uvrščamo med hlapne maščobne kisline (HMK) so topne v vodi, imajo visok parcialni tlak in posledično hlapijo že pri atmosferskem tlaku. Kemično gledano so to maščobne kisline z 1 do 6 ogljikovimi atomi (Clescerl in sod., 1999). Akumulacija hlapnih maščobnih kislin lepo ponazarja kinetiko povezave med proizvajalci kislin, (acidogenezo) in porabniki kislin (acetogeneza in metanogeneza). Veliko raziskav je povezalo procesno stabilnost s koncentracijo individualnih maščobnih kislin v reaktorju. Kljub temu pa ni smiselno določati absolutnih koncentracij HMK kot indikatorjev za stanje procesa. Različni anaerobni sistemi imajo namreč različne ravnovesne koncentracije HMK, ki so odvisne od substrata in drugih procesnih pogojev (Ahring in sod., 1995). Do neravnovesja v procesu in posledično naraščanja HMK lahko pride zaradi prevelikih koncentracij vnesenega substrata v fermentorje. V takem primeru HMK s hidrolizo in acetogenezo substrata namreč hitreje nastajajo kot se lahko z acidogenezo in metanogenezo porabljajo. Kopičenje HMK lahko povzročajo tudi inhibitorji metanogeneze, kot so različne aromatske spojine, ki nastajajo iz lignoceluloznih substratov ter tudi amonijak in težke kovine (Chen in sod., 2008). Amonijak nastaja pri razgradnji dušikovih spojin, inhibitorne učinke kaže predvsem prost amonijak (NH₃), razmerje med prostim amonijakom in ionoizrano obliko pa je predvsem odvisno od pH in temperature, višje kot sta, več imamo prostega amonijaka (El-mashad in sod. 2004; Deublein in Steinhauser, 2008). Predvsem je problematično naraščanje amonijaka v neprilagojeni združbi, to se zgodi ob nenadni prisotnosti večjih količin proteinskega substrata v bioreaktorju. Fotidis in sod. (2013) so pokazali, da pride do inhibicije z amonijakom predvsem v mikrobnih združbah, kjer metanogeneza poteka po hidrogenotrofni poti. Ob postopni aklimatizaciji na visoke koncentracije amonijaka pa se vzpostavi združba s primarno acetoklastično metanogenezo s Methanosarcinaceae spp.. Posledično je združba, pri kateri že predhodno metanogeneza temelji na acetoklastičnih arhejah, pri nenadnem povečanju amonijaka manj dovzetna za inhibicijo.

Inhibitorni učinek HMK je še posebej močen pri padcu pH. Tako so lahko koncentracije HMK precej visoke, preden pride do inhibicije, če je pH nad 7,5. Vrednost pH ima namreč vpliv na stopnjo dissociacje HMK. Nedissocirane oblike HMK imajo toksične

efekte na mikroorganizme, ker so te nenabite in lahko difundirajo skozi membrane in nižajo celični pH. Med HMK je propionat najbolj toksičen (Ahring in sod., 1995; Chen in sod., 2008).

2.3.5 V vodi topne organske snovi

Raztopljene organske snovi (DOM) so pomemben vir hrane heterotrofnim bakterijam v vodnih okoljih. Razdelimo jih lahko glede na njihovo molekularno težo s pomočjo frakcionacije. Tako imamo DOM z visoko molekulsko maso (večjo od 1kDa) in nizko molekulsko maso (majnšo od 1kDa) (Amon in Benner, 1996; Helms in sod., 2008). Večina raziskav na področju bioreaktivnosti, torej razgradljivosti DOM je bila narejena v vodnih aerobnih okoljih. Tako so Meyer in sod., (1987) ugotovili, da je frakcija DOM z molekulsko maso pod 1 kDa najbolj podpirala bakterijsko rast. Ravno nasprotne rezultate sta pokazala Amon in Benner (1996), v njunem poskusu je bila bakterijska rast hitrejša v frakciji z visoko molekulsko maso DOM. Razmerje različnih frakcij DOM ima še druge ekološke vplive. Tako je Allen (1976) poročal o različnih kapacitetah za keliranje anorganskega železa glede na velikostne frakcije in oksidacijsko stanje DOM. S tem lahko pokažemo, če se v fermentorjih preferenčno razgrajajo različno velike organske molekule, ki so vpletene v dostopnost mikronutrientov za mikroorganizme anaerobne razgradnje.

2.3.6 Tipiziranje strukture mikrobnih združb

Mikrobno združbo je možno okarakterizirati z različnimi molekularnimi metodami, ki so neodvisne od izolacije in gojenja mikroorganizmov. Metode, ki so uspešno uporabljene za enostavno profiliranje mikrobnih združb v anaerobnih bioreaktorjih so DGGE/TGGE, T-RFLP, SSCP in LH-PCR (Stres, 2006). Te metode vključno z LH-PCR omogočajo hitro profiliranje in sledenje dinamiki mikrobne združbe z enako uspešnostjo razvrščanja vzorcev po podobnosti kot tehnike globokega sekvenciranja. Enostavnost tehnik, ki pokažejo spremembe v strukturi združb, pa ima svojo ceno, saj tipizacijske tehnike ne omogočajo določanja filogenetske sestave mikrobne združbe (Mills in sod., 2007). V nasprotju s T-RFLP, ki temelji na variaciji dolžine fragmentov glede na variabilnost restrikcijskih mest izbranega gena, npr. gena za 16S rRNA, (ki pa

so odvisna od sekvence fragmenta), LH-PCR temelji na naravni variaciji dolžine gena za 16S rRNK . Slednja je odvisna samo od insercij in delecij baznih parov, torej ne vsebuje kompleksne transformacije v dolžinsko variabilne fragmente na osnovi različnih restrikcijskih mest (Mills in sod., 2007; Ritchie in sod., 2000). Po pomnoževanju variabilnih regij z fluorescentno označenimi začetnimi oligonukleotidi, dolžine fragmentov določamo z ločevanjem v kapilari sekvenatorja.

V primerjavi z DGGE in T-RFLP je LH-PCR bolj reproducibilen in hiter, uporaben je za hitro presejanje mikrobnih združb skozi čas in prostor (Mills in sod., 2007; Tiirola in sod., 2003). Pri sledenju razgradnje ogljikovodikov s talnimi mikroorganizmi v laboratorijskih bioreaktorijh so ugotovili, da je LH-PCR boljše sledil dinamiki združb kot pa T-RFLP (Mills in sod., 2003) in se kot tak uporablja za hitro tipizacijo in sledenje sprememb v strukturi mikrobnih združb. Robič (2012) so s pomočjo računalniške analize, v katero so vključili 166.945 sekvenc ugotovili, da je dolžina LH-PCR pomnožkov s parom začetnih oligonukleotidov 27f in 518r okoli 500 baznih parov, z variabilnostjo v razponu 100 bp. Zaradi podobnih ali celo enakih dolžin pomnožkov, ki lahko izvirajo iz filogenetsko zelo nesorodnih skupin, ne moremo različnim dolžinam fragmentov določiti filogenetske pripadnosti izvornega organizma in s tem ugotoviti filogenetsko raznolikost združbe (Abdo in sod., 2006; Mills in sod., 2003; Ritchie in sod., 2000; Robič, 2012; Tiirola in sod., 2003). Pri T-RFLP in LH-PCR fragmente DNK označimo z pomočjo flurokromov, ki so že predhodno vezani na začetne oligonukleotide in se med reakcijo z polimerazo (PCR) vgradijo v fragmente. Tako označene DNK fragmente s pomočjo kapilarne elektroforeze ločimo po dolžini in zaznamo s pomočjo fluorescence, ki jo zapišemo v obliki elektroferograma. V elektroferogramu so prikazani samo DNK fragmenti z vezanimi flurokromi (Abdo in sod., 2006; Mills in sod., 2007).

Kot pri vseh molekularnih tipizacijskih tehnikah in tudi tehnikah globokega sekvenciranja predpostavljamo, da je množina fragmentov proporcionalna zastopanosti matrične DNK in posledično zastopanosti mikroorganizma v vzorcu (Quince in sod., 2009). Dolžine fragmentov določamo tako, da čas potovanja fragmenta primerjamo z internim standardom, ki je označen s fluorokromom druge valovne dolžine. Posledično pride do razlik v mobilnosti fragmentov in internega standarda zaradi drugačnih

kemijskih lastnosti in molekulske mase fluorokromov in DNK fragmentov, ki imajo različno vsebnost purinov. Tako lahko pride do napak v določanju dolžine fragmentov za ± 2 bp (Abdo in sod., 2006; Kaplan in Kitts, 2003; Stres, 2006). Napaka z dolžino fragmentov nelinearno narašča, zato je dolžina fragmentov okoli 500 bp zgornja meja, kjer še napaka izmerjenih dolžin ni prevelika (Kaplan in Kitts, 2003; Stres, 2006).

2.3.6 Industrijska skala anaerobnih procesov - Bioplinarna Vučja vas

Bioplinarna v Vučji vasi z nazivno močjo 4 MW proizvaja elektriko iz organske biomase (Slika 5). Substrati, ki jih večinoma uporabljajo so koruzna silaža, gnojevka, gnoj, vinjasa, micelij, oljčne tropine, koruzni šrot in tritikala (Kolbl, 2014). Substrati vstopajo v fermentorje preko mešalnih jam velikosti 235 m³, ki so zgrajene iz armiranega betona in zaščitene z neprepustnim poliestrom. Substrat se v mešalnih jamah razredči z deževnico, ki se zbira na mestu. Za potrebe mešanja sta v mešalnih jamah nameščeni dve potopni mešali. Bioplin se lahko pridobiva v vseh šestih fermentorjih, odvisno od kompleksnosti organskih substratov. Fermentorji velikosti 3931 m³ so zgrajeni iz plašča narejenega iz emajlirane pločevine debele 8 mm in osnovne plošče, ki je narejena iz armiranega betona (Kolbl, 2014).



Slika 5: Bioplinarna Vučja vas iz zraka. Oznake F1 do F6 so fermentorji, KZ1 do KZ3 so končni zalogovniki, MJ je mešalna jama (Kolbl, 2014).

V fermentorjih so za potrebe mešanja nameščena tri propelerska mešala, dve sta fiksno nameščeni na dno fermentorja, tretje je nameščeno bočno in je po višini in kotu nastavljivo. Odvodna cev za bioplin iz legiranega jekla je nameščena na zgornjem delu fermentorja. Tlak je nadzorovan z regulatorji pod in nad tlaka. Vnos substrata iz mešalne jame v fermentorje poteka skozi podzemne napeljave s pomočjo črpalk. Digestat se preko prelivov pretaka iz fermentorja 1 do fermentor 3 (linija 1) in iz fermentorja 4 do fermentor 6 (linija 2) (Slika 5). Za ogrevanje fermentorjev na mezofilne temperature so ob stenah fermentorjev nameščene cevne kače iz legiranega jekla. Kot vir toplotne energije za ogrevanje reaktorjev se uporablja odvečna toplota plinskih motorjev. Digestat se po končani fermentaciji hrani v končnih zalogovnikih. Prva dva končna zalogovnika sta zgrajena enako kot fermentorji le, da imata večjo prostornina, ki znaša 5350 m³. Na vrh končnih zalogovnikov je montiran plinohram z volumnom 1490 m³. V končnih zalogovnikih 1 in 2 (KR1 in KR2) se hrani tekoči del digestata, ki je predhodno ločen na separatorju na trdno in tekočo fazo. Trdna faza se hrani na končnem zalogovniku 3 (KR3), ki nima plinohrama (Kolbl, 2014). Obratovalne lastnosti bioplinarne Vučja vas povzema preglednica 5.

T(°C)	Volumen reaktorjev (m ³)	Nazivna moč (MW)	Priprava substratov	HRT (dan)	OLR (tOS/dan)	Vrsta substrata	S/I (kg OS/m ³)
38 ± 2	6 x 3.931 fermentorja 2 x 5.350 Post- fermentorja	4	mešanje substratov v mešalni jami in dodajanje vode iz vodnih rezervoarjev ter ogrevanje na 30 °C	100	60 - 70	kravji gnoj in gnojevka, koruzna silaža, micelij, olivne tropine, sirek, suho in mokro mleto koruzno zrnje, vinjasa	3,5 - 10

Preglednica 5: Obratovalne lastnosti bioplinarne v Vučji vasi (Kolbl, 2014).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA EKSPERIMENTA



Slika 6: Shema eksperimenta

3.2 VZORČENJE

Bioplinarno Vučja vas smo v različnih intervalih spremljali vse od zagona 18.7.2011 do 2.3.2014. V vseh časovnih točkah smo vzorčili fermentorja F1 in F2. 928 dne pa smo poleg F1 in F2 vzorčili še reaktorje F3 do F6. Ob zagonu bioplinarne smo povzorčili še donorsko fermentacijsko brozgo iz bioplinaren v Ginjevcu, Jurši in Logarovcih. Ta fermentacijska brozga se je namreč uporabila za inokulum mikrobne združbe ob zagonu bioplinarne Vučja vas. S tem smo želeli spremljati dinamiko mikrobne združbe v novem bioplinskem obratu. Točen čas odvzema posameznih vzorcev iz fermentorjev je prikazan v Preglednici 6 in v Prilogi A.
Preglednica 6: Shema vzorčenja fermentorjev bioplinske elektrarne v Vučji vasi. Stolpec "čas" prikazuje	
pretekel čas v dnevih po zagonu bioplinarne. Vzorci so glede na fermentor in obdobje odvzema barvno	
kodirani.	

	Datum	Čas	Fermentor								
	Datum	(dan)	Ginjevec	Jurša	Logarovci	F1	F2	F3	F4	F5	F6
	18.7.2011	0									
	20.7.2011	2									
	22.7.2011	4									
	25.7.2011	7									
sca	27.7.2011	9									
nese	29.7.2011	11									
2 n	1.8.2011	14									
	10.8.2011	23									
	17.8.2011	30									
	27.9.2011	71									
	4.10.2011	78									
,5 ta	20.12.2012	521									
1, le	15.1.2013	547									
et	31.1.2014	928							\cdots		\sim
,5 lé	20.2.2014	948									
6,	2.3.2014	958									

3.2.1 Shranjevanje in predobdelava vzorcev.

Pred odvzemom vzorca so bili reaktorji popolnoma premešani z inštaliranimi mešali, čez inštalacijo za vzorčenje smo pretočili 4 m³ vsebine in nato odvzeli po 40 l vsebine v štiri kanistre (Kolbl in sod., 2014). Vzorce smo do prenosa v laboratorij in nadaljnje obdelave hranili na 4 °C. Alikvote po 50 ml homogeniziranega vzorca smo centrifugirali 25 min pri 3000 obratih na minuto. Supernatant smo za nadaljnje analize shranili na -20 °C. Pelet smo preko noči pri 45 °C posušili in shranili pri -20 °C do ekstrakcije DNK.

3.3 IZMERJENI FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

3.3.1 Temperatura

Temperaturo fermentorjev smo zabeležili ob odvzemu vzorcev iz inštaliranih industrijskih merilnikov (Kolbl, 2014) z dovoljenjem operaterjev.

3.3.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Za analize KPK in spektrofotometrične meritve smo 1ml supernatanta (3.2.1 Shranjevanje in predobdelava vzorcev) dodatno centrifugirali 3 minute na 10000 obratih na minuto. Nato smo supernatan vzorcev redčili z destilirano vodo do 50 kratne razredčitve, da so bili vzorci v merilnem območju in jih do nadaljnjega shranili na -20 °C. Vse razredčitve smo naredili v treh ponovitvah.

Uporabili smo prilagojeno standardno metodo 5220D s kolorimetričnim določanjm KPK (Clescerl in sod., 1999). KPK deluje na osnovi oksidacije organskega ogljika s heksavalentim dikromatnim ionom $Cr_2O_7^{2-}$. Dikromat oddaja kisikove atome, se pri tem reducira in oksidira organski ogljik do CO₂. H₂SO₄ in Ag₂SO₄ delujeta kot katalizatorja. Prav tako je toplota ob segrevanju pomemben katalizator reakcije. Kolorimetrično določanje je možno, ker heksavalentni(VI) dikromatni ioni $Cr_2O_7^{2-}$ absorbirajo svetlobo pri drugačni valovni dolžini, kot pa oksidirani trivalentni(III) Cr³⁺ ioni. Tako reaktant dikromatni ion absorbira vidno svetlobo pri 420 nm, Cr³⁺ pa pri 600 nm do 620 nm. S spremljanjem absorpcije reakcijske mešanice pri teh dveh valovnih dolžinah je možno izvornega heksavalentnega(VI) določiti porabo nastajanje dikromata in trivalentnega(III) Cr^{3+} iona kot produkta (Clescerl in sod., 1999).

Redoks reakcija dikromata do Cr³⁺:

$$Cr_2O_7 + 14H^+ + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+} + 7H_2O$$
 $E = +1,33V$...(1)

Priprava reagentov:

Reagent R1: V 500ml destilirane vode smo raztopili 10,216g K₂Cr₂O₇ sušenega za 2 uri na 105 °C. Dodali smo 167 ml koncentrirane H₂SO₄ in dopolnili do 1000ml z destilirano vodo.

- Reagent R2: Ag₂SO₄ smo raztopili v koncentrirani H₂SO₄. Končna koncentracija Ag₂SO₄ je 10 g/l.
- Reagent KPK: Reagent R1 in R2 zmešamo v razmerju 3:7.

KPK reakcije smo izvajali v steklenih epruvetah HACH LANGE z navojem in zamaškom s teflonsko tesnilko. Vse steklene epruvete in zamaške smo pred poskusom ročno umili in zdrgnili s čistilom za ročno pranje laboratorijske steklovine Kemex® A, (Kemika d.d., Hrvaška), splaknili notranjost s 70 % etanolom ter destilirano vodo, epruvete smo potem posušili v peči na 105 °C. Vse zamaške smo preverili, da dobro tesnijo.

V epruvete HACH LANGE smo prenesli 500 µl 50 krat razredčen supernatant ter dodali 1000µl KPK reagenta, premešali in zatesnili s teflonskim zamaškom. Nato smo epruvete inkubirali na 130 °C za 2h. Po inkubaciji smo 100 µl KPK mešanice prenesli v mikrotitersko ploščico in odmerili absorpcijo pri 595 nm in 415 nm. Vse reakcije smo naredili v treh ponovitvah.

Umeritveno krivuljo smo določili s tremi ponovitvami znanih koncentracij glukoze (Priloga B). Koncentracije za umeritveno krivuljo so bile 1 g/l, 0,8 g/l, 0,6 g/l, 0,5 g/l, 0,4 g/l, 0,2 g/l, 0,1 g/l in destilirana voda. KPK reakcijo za umeritveno krivuljo smo izvajali pod enakimi pogoji z enakim volumnom reagenta in umeritvene raztopine, kot pri meritvah z vzorci.

Reakcija dikromata z glukozo:

$$C_6H_{12}O_6 + 4Cr_2O_7^{2-} + 32H^+ \rightarrow 6CO_2 + 22H_2O + 8Cr^{3+}$$
 ...(2)

Reakcija kisika z glukozo:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$
 ...(3)

Da oksidiramo 1 mol glukoze do CO_2 in H_2O potrebujemo 4 mole kalijevega dikromata oziroma 6 molov O_2 . Tako za oksidacijo 180,16 g Glukoze porabimo 192 g O_2 kar pomeni, da ima 1 g glukoze = 1,066 g kemične potrebe po kisiku.

Enačba umeritvene krivulje:

mm x 1 μ m sloj stacionarne faze. Temperatura injektorja je bila 200 °C, temperatura plamensko ionizirajočega detektorja je bila 300 °C, začetna temperatura kolone 70 °C, zadrževalni čas 1 min nato 20 °C/min do 120 °C in naprej 10 °C/min do 200 °C. Končna temperatura kolone 200 °C, zadrževalni čas pa 3 min. Nosilna plina sta bila Helij (He) 5 ml/min in dušik (N₂) 25 ml/min. Detektorska plina sta bila vodik (H₂) 30 ml/min in zrak 400 ml/min. Volumen vzorca je bil 1 μ l.

V vzorcih smo detektirali etanol, etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino. Plinski kromatograf smo umerili s kalibracijsko raztopino (Preglednica 7). S pomočjo znane koncentracije internega standarda sestavljenjega iz 10g/l krotonske kisline (2-butanojska kislina), ki smo ga dodali v vzorce pred dietiletersko ekstrakcijo, smo lahko določali koncentracije detektiranih HMK. Tako smo se izognili variacijam v koncentracijah HMK, ki nastanejo zaradi ekstrakcije (Novak in sod., 2013).

Vrsta kisline	etanol	etanojska	propanojska	butanojska	pentanojska	heksanojska
molekulska masa (g/mol)	46,07	60,05	74,08	88,11	102,13	116,16
gostota (g/l)	790	1049	993	958	939	927
koncentracija (%)	99,8	99,8	99,5	99	99	98,5
agregatno stanje	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče
koncentracija kisline (g/l)	790	1049	993	958	939	927
V1 (µl) - kislina	127	95	101	104	106	108
V2 (ml) - ultra čista voda				99,36		
koncentracija za standard (g/l)				1		

Preglednica 7: Sestava kalibracijske mešanice za plinski kromatograf (Kolbl, 2014).

3.3.4 Molekulska masa DOM (Absorpcijski spektri)

Razmerja med molekularno težo DOM smo okarakterizirati z spektrofotometričnimi meritvami po Helms in sod. (2008) in Twardowski in sod. (2004). V preglednici 8 so navedeni uporabljeni koeficienti izračunani iz absorpcijskih spektrov.

S _(275nm-295nm)	Linearna regresija z naravnim logaritmom transformiranega absorpcijskega koeficienta od 275nm do 295nm							
S _(350nm-400nm)	Linearna regresija z naravnim logaritmom transformiranega absorpcijskega koeficienta od 350nm do 400nm							
$\mathbf{S}_{\mathbf{r}}$	Razmerje med S(275nm-295nm) in S(350nm-400nm)							
E2:E3	Razmerje med absorpcijskim koeficientom 250nm in 365nm							
a ₂₅₅	Absorpcijski koeficient pri 255nm							
a ₃₀₀	Absorpcijski koeficient pri 300nm							
Total a	Integrirana absorpcija od 250nm do 450nm							
S _(300nm-700nm)	Koeficient se izračuna s prilagoditvijo enačbe							

Preglednica 8: Koeficienti izračunani iz absorpcijskega spektra (Helms in sod., 2008).

Helms in sod., (2008) povzemata,da se preko razmerja absorpcije med 250nm do 365nm (E2:E3) sledila relativnim spremembam molekulske mase DOM. Spektralni nagib $S_{(300nm-700nm)}$ pa semikvantitativno vrednoti spremembe v sestavi DOM, koreliran je z razmerjem med huminskimi in fulvičnimi kislinami in z molekulsko maso fulvičnih kislin ne pa tudi huminskih kislin (Carder in sod., 1989). Twardowski in sod., (2004) so ugotovili, da izračunani $S_{(300nm-700nm)}$ po enačbi (5) v literaturi niso med sabo primerljivi, saj prihaja do velikih razlik zaradi različnih razponov valovnih dolžin, na katerih so avtorji nagib S računali in zaradi različnih metod prileganja enačbe k eksperimentalnim podatkom.

V naši raziskavi smo izračunali nagib $S_{(300nm-700nm)}$ v območju 300nm - 700nm, kot so Helms in sod., (2008). Enačbo smo direktno prilagodili eksperimentalnim podatkom po metodi najmanjših kvadratov (Twardowski in sod., 2004). Izračunali smo tudi $S_{(275nm-295nm)}$ in $S_{(350nm-400nm)}$ tako, da smo eksperimentalne podatke predhodno logaritmirali z naravnim logaritmom in s pomočjo linearne regresije izračunali nagib. S_r je brez dimenzionalen parameter in predstavlja razmerje med $S_{(275nm-295nm)}$ in $S_{(350nm-400nm)}$. S_r kot tudi $S_{(275nm-295nm)}$ in $S_{(350nm-400nm)}$ so neodvisni od koncentracije raztopljenega ogljika in korelirajo z molekularno maso CDOM. Molekularna masa CDOM večinoma reflektira molekularno maso DOM. Tako S_r kot tudi $S_{(275nm-295nm)}$ dobro korelirata z molekularno maso CDOM in z naraščanjem težke frakcije CDOM upadata (Helms in sod., 2008). Za izmeritev absorpcijskih spektrov smo prenesli 200 µl 50 krat razredčen supernatanta v UV transparentno mikrotitersko ploščico. Izmerili smo absorpcijski spekter od 250nm do 800nm v korakih po 5 nm. Uporabljali smo čitalec mikrotiterskih ploščic znamke Multiskan[®] Spectrum Model #1500 (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA).

Splošno absorpcijo smo pretvorili v napieriski absorpcijski koeficient preko enačbe:

3.4 TIPIZACIJA MIKROBNIH ZDRUŽB

3.4.1 Izolacija DNK

Iz peleta biomase smo DNK ekstrahirali s kitom za ekstrakcijo PowerFecalDNA, (MO BIO Laboratories, Inc., ZDA), po proizvajalčevih navodilih. Uspešnost izolacije smo preverili z 1 % gelsko elektroforezo.

V izogib morebitnim inhibitorjem smo izolirano DNK razredčili za faktor 100 in shranili v 30µl alikvotih pri -20 °C za nadaljnjo obdelavo.

3.4.2 Tipizacija mikrobnih združb z LH-PCR

Za tipizacijo mikrobne združbe smo uporabili univerzalne široko specifične začetne oligonukleotide za bakterijske in arhejske združbe. Začetna oligonukleotida za bakterijske (i) B27f in arheje (ii) A109f sta bila na 5' koncu označena z fluorescenčnim barvilom (i) Joe in (ii) 6FAM. Reverzna oligonukleotida B518r in A534r, ki predstavljata univerzalno prepoznavno mesto gena za 16S rRNA, pa sta bila brez oznake. Vse PCR reakcije so bile narejene v dveh ponovitvah.

a) Začetni oligonukleotidi za bakterije:

- B27f (Edwards in sod., 1989): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- B518r (Muyzer in sod., 1993): 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

b) Začetni oligonukleotidi za arheje:

- A109f (Großkopf in sod., 1998; Whitehead in Cotta, 1999): 5'-ACKGCTCAGTAACACGT-3'
- A534r (Bano in sod., 2004; Köchling in sod., 2011; Vetriani in sod., 1999): 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Predvidena dolžina PCR pomnožkov za bakterije je okrog 500 bp (Robič, 2012; Tiirola in sod., 2003) za arheje pa okoli 400bp.

Vrsta cikla	Čas	Temperatura	Število ciklov
Predcikel	5 min	94 °C	1
Denaturacija DNK	30 sek	94 °C	
Prileganje zač. Olikonuk.	45 sek	54 °C	30
Podaljševanje verige	1min 30 sek	72 °C	
Podaljšana polimerizacija	7 min	72 °C	1
Zaustavitev, ohranjanje	∞	4 °C	/

Preglednica 9: Protokol za verižno reakcijo s polimerazo.

Vse PCR mešanice so vsebovale sledeče reagente: 1x PCR pufer brez MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), 0,2mg/l BSA (Bovine Serum Albumin) (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), 0,2 µM začetnih oligonukleotidov B27f (Microsynth AG, Švica) ali A109f (Microsynth AG, Švica), 0,2 µM začetnih oligonukleotidov B518r oziroma A534r (MWG Biotech AG, Nemčija), 0,04 U/µl *Taq* DNK polimeraze (Thermo Fisher Scientific Inc., ZDA), deionizirano vodo brez prisotnih nukleaz (Sigma-Aldrich, Nemčija) do 24µl, 1µl 100-krat razredčene matrične DNK. Končni volumen reakcijske mešance je bil 25µl.



Slika 7: Izračun reagentov za reakcijske mešanice s končnim volumnom 25µl s programom Biometra's EXCEL tool V2.2.

PCR reakcijo smo izvajal na MyCycler[™] Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., ZDA) po protokolu navedenem v preglednici 9.

Po končani PCR reakciji smo uspešnost reakcije preverili na 1 % gelski elektroforezi. Vse PCR pomnožke smo do nadaljnjih analiz shranili na -20 °C.

3.4.3 Kapilarna elektroforeza

LH-PCR pomnožke smo pripravili za kapilarno elektroforezo tako, da smo 2 µl PCR pomnožkov dodali k 10 µl formamid UltraPure[™] (Applied Biosystems Inc., ZDA) in internemu standardu GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems Inc., ZDA). Mešanico smo inkubirali za 3 minute pri 94 °C v MyCycler[™] Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., ZDA), nato pa ohladili na ledu in shranili do nadaljnje analize na 4 °C. LH-PCR pomnožke smo analizirali na kapilarni elektroforezi ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., ZDA).

3.4.4 Analiza podatkov LH-PCR

Da smo lahko dosegli objektivno ločevanje pravilnih vrhov od šuma in normalizacijo dobljenih elektroferogramov smo uporabili metodo, ki so jo razvili Abdo in sod. (2006), napisano v programu R verzija 3.1.0:

 Iz normaliziranih podatkov (relativna površina vrhov) se izračuna standardna deviacija s predpostavko, da je povprečna površina enaka nič. Standardna deviacija se izračuna po enačbi 7. Metoda deluje na predpostavki, da so podatki, ki predstavljajo signal iz statističnega vidika osamelci. Signale progresivno izloča iz izvirnega elektroferograma, dokler jih več ni, izločeni signali predstavljajo relevante podatke. Preostali signali v elektroferogramu pa predstavljajo šum. Ta pristop omogoča bolj objektiven način identifikacije vrhov, kot druge dostopne metode (Abdo in sod., 2006).

Da lahko elektroferograme različnih vzorcev med seboj primerjamo, moramo DNK fragmente z zelo podobnimi dolžinami vreči v isti velikostni razred. S tem kompenziramo analitične napake pri določanju dolžine fragmentov. Za fragmente v enakem velikostnem razredu predpostavljamo, da so predstavniki istega filotipa. Fragmente, ki so v istem velikostnem razredu predstavimo z njihovo povprečno dolžino. Za nadaljnjo analizo lahko prisotnost DNK fragmentov v mikrobnem profilu podamo z relativno površino, ki določeni fragmenti zavzemajo v elektroferogramu, ali pa samo kot mikrobni profil z prisotnost/odsotnost DNK fragmentov različnih dolžin (Abdo in sod., 2006).

3.5 STATISTIČNE ANALIZE

3.5.1 Standardizacija in normalizacija

Pred analizo nemetričnega več dimenzionalnega lestvičenja (NM-MDS) smo vse okoljske parametre razen pH vrednosti normalizirali tako, da smo parametrom prišteli 1 in jih logaritmirali z desetiškim logaritmom. Vrednosti pH so v osnovi desetiški logaritem koncentracije vodikovih ionov, tako da pri tem parametru normalizacija ni potrebna. Normalizacija LH-PCR profilov je opisana v prejšnjem poglavju (3.3.4 Analiza podatkov LH-PCR). Za standardni odklon pri ločevanju šuma od signala v elektroferogramih in omejitve dolžine upoštevanih fragmentov DNK smo določili na osnovi vrednosti stress, gre za parameter, ki nam ga poda analiza NM-MDS. Za arhejske profile smo določili razpon veljavnih fragmentov DNK od 300 do 500 bp, za bakterijske profile pa 400 do 510 bp. Za odkrivanje vrhov smo izbrali dve standardni deviaciji.

3.5.2 Nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS).

Za primerjavo podobnosti mikrobnih združb in vplivov okoljskih parametrov smo uporabili nemetrično več dimenzionalno lestvičenje. NM-MDS je bil v literaturi uporabljen za primerjavo profilov T-RFLP kot tudi LH-PCR iz okolij kot so bioplinski fermentorji (Kolbl in sod., 2014; Ziganshin in sod., 2013), zemlja (Moreno in sod., 2011) in voda (Mills in sod., 2007). Uporabili smo program PAST verzija 2.17c (Hammer in sod., 2001). NM-MDS deluje tako, da vsak vzorec predstavlja točko na dvodimenzionalnem ali tridimenzionalnem grafu. Vsak vzorec je opisan z večimi parametri, iz teh parametrov se na to izračuna distančna matrica med vzorci. Razdalje v distančni matriki so v kolikor se da, prenesene na dvodimenzionalen graf. Uporabljeni parametri so lahko fizikalno-kemijski ali pa relativni deleži DNK fragmentov. Distančno matriko lahko izračunamo z različnimi indeksi, na primer Evklidski distančni indeks ali Bray-Curtis podobnostni indeks, kar je odvisno od predpostavke o porazdeljenosti vrhov T-RFLP ali LH-PCR (Schütte in sod., 2008). Bray-Curtis indeks je zaradi smiselnega upoštevanja ničel najbolj idealen za primerjavo profilov mikrobnih združb pridobljenih na osnovi tipizacijskih tehnik, skupaj z NM-MDS pa zaradi robustnosti prepoznavanja odnosov predstavlja eno izmed boljših metod za interpretacijo razlik med njimi (Schütte in sod., 2008; Stres, 2006). Za analize smo relativnimi deleži uporabili profile Z fragmentov kot tudi podatke 0 prisotnosti/odsotnosti fragmentov DNK. Relativni delež fragmentov DNK pomeni, da se posameznemu fragmentu DNK dodeli delež površine, ki jo zavzema glede na celoten signal (skupno površino pod prepoznanimi vrhovi elektroferograma). Ti potem v analizi delujejo kot uteži. Pri analizi podatkov o prisotnosti/odsotnosti fragmentov DNK, pa ne upoštevamo posameznih deležev v signalu, profile ločujemo samo glede na prisotne fragmente DNK. To pomeni, da imajo zaznani fragmenti DNK enake uteži. Oba pristopa uporabljamo zato, ker se pri ordinaciji z relativnimi deleži, fragmente DNK z nizkim deležem bistveno manj upošteva, kot tiste z velikimi deleži. Pri ordinaciji s podatki odsotnosti/prisotnosti fragmentov DNK pa lažje opazimo spremembe v profilih, ki temeljijo na pojavu ali izginotju fragmentov DNK iz profilov tudi, če so te predstavljene z zelo majhnim deležem v mikrobnem profilu.

4 REZULTATI

4.1 FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

4.1.1 Temperatura

Donorski fermentorji so delovali na enaki temperaturi kot je ciljna procesna temperatura fermentorja 1 in 2, to je 38 °C. Mikrobna združba iz donorskih fermentorjev je torej že bila povsem adaptirana na mezofilne pogoje.

Po prenosu v prazne in še hladne fermentorje bioplinske elektrarne Vučja vas je temperatura fermentacijske brozge padla. Prvih 9 dni so se fermentorji bioplinske elektrarne Vučja vas polnili in se šele segrevali na tarčno temperaturo (38 °C), pri tem je prišlo do razlik med fermentorjem 1 in 2 zaradi različne hitrosti polnjena, ki je bila posledica zaporedne vezave fermentorjev. Tako je v tem obdobju fermentor 1 imel za 5 °C višjo temperaturo od fermentorja 2, ki je kasneje dosegel procesno temperaturo. V vzorcih od 23 do 71 dne in od 928 do 958 dne sta fermentorja imela zelo podobno temperaturo, ki se je gibala v zastavljenem okviru procesa. Na 521 in 547 dan je fermentor 2 imel suboptimalno obratovalno temperaturo (Slika 8), kar je lahko posledica nižje zunanje temperature v zimskih mesecih. Na sliki 9 so temperature vseh šestih fermentorjev. Razlike v temperaturah niso signifikantne in v območju tarčne procesne temperature 38 \pm 2 °C, največjo razliko opazimo med fermentorjema 4 in 5, ki znaša samo 0,9 °C.



Slika 8: Temperature donorskih fermentorjev ter fermentorja 1 in 2 ob vzorčenju. Oranžne črte predstavljajo tarčno procesno temperaturo fermentorjev, ki znaša 38 ± 2 °C. Napaka meritve ±2 °C predstavlja dnevna nihanja temperature odčitana na inštaliranih industrijskih merilnikih.



Slika 9: Temperatura v fermentorjih 1 do 6 odvzetih na 928 dan. Napaka meritve ± 2 °C predstavlja dnevna nihanja temperature odčitana na inštaliranih industrijskih merilnikih.

4.1.2 pH

Do večjih odstopanj v pH med fermentorji 1 in 2 pride v vzorcih odvzetih 4, 78 in 958 dan (Slika 10, Slika 11). V ostalih primerih so razlike med pH fermentorjev 1 in 2 manjše od 0,13 in korelirane (Slika 11). Do razlik prihaja tudi med vzorci istega fermentorja. Tako se pri fermentorju 1 pH giblje med 7,84 do 8,40 in pri fermentorju 2 med 7,89 do 8,67. Vrednosti pH med fermentorjih 1 do 6 se zanemarljivo malo razlikujejo (Slika 12).



Slika 10: pH vzorcev fermentacijske brozge s standardnimi odkloni. Oranžni črti (--) predstavljata optimalni pH za metanogenezo med 6,7 do 7,5 po Deublein in Steinhauser (2008), rdeči črti (--) pa robne pH vrednosti za metanogenezo po Lay in sod. (1997).



Slika 11: Primerjava pH vrednosti v fermentorju 1 in fermentorju 2 z linearno regresijo (\blacklozenge). Zaradi velikih odstopanj so trije vzorci izvzeti iz linearne regresije (\blacktriangle).



Slika 12: pH s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge iz fermentorjev 1 do 6 odvzetih na 928 dan.

4.1.3 Koncentracija raztopljenega organskega ogljika (KPK)

KPK se med fermentorji 1 in 2 signifikantno razlikuje (α =0,05) le pri vzorcih odvzetih med prvimi 23 dnevi po zagonu. To so vzorci odvzeti na 2, 7, 11 in 23 dan. Kasneje se KPK razlikuje še samo med časovnimi točkami (Slika 13). KPK v fermentorjih 1 do 6 zanemarljivo malo niha. Največja razlika je med fermentorji 4 in 6, kjer je razlika v KPK 2g O₂/l. Vendar razlike niso signifikantno značilne (α =0,05) (Slika 14).



Slika 13: Kemična potreba po kisiku s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge odvzete ob različnih časih.



Slika 14: Kemična potreba po kisiku s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge iz fermentorjev 1 do 6 odvzetih dne 31.1.2014.

4.1.4 Koncentracije hitro dostopnega organskega ogljika (hlapne maščobne kisline in etanol)

Koncentracije HMK med dnevi zalo variirajo, največje razlike so opazne pri koncentracijah propanojske in ocetne kisline. Na osnovi propanojske kisline se fermentorja signifikantno razlikujeta (α =0,05) v desetih od trinajstih časovnih točk. Torej v vseh časovnih točkah od 7 dneva dalje. Že v času zagona bioplinarne je viden hiter porast propanojske kisline iz 4 na 7 dan, ki se obdrži na visoki ravni vse do vzorca odvzetega 9 dan in se potem skoraj povrne v prvotno stanje dva dni kasneje na 14 dan. Do velikega porasta glede na predhodne koncentracije ocetne kisline pride ob koncu opazovanja na 928, 948 in 958 dan. Koncentracije v fermentorju 1 so bile višje od 1800 mg/l, ob tem istem času so bile povišane tudi koncentracije propanojske kisline. Povišanje koncentracij HMK v fermentorju 1 se zaradi pretakanja v manjši meri prenašajo tudi v fermentor 2. Kar nakazuje tudi linearne korelacije (\mathbb{R}^2 vrednosti) med fermentorjema 1 in 2 za ocetno in propanojsko kislino (Preglednica 10). Pri ostalih kislinah nismo zaznali tako velikih nihanj. Fermentorja 1 in 2 se na osnovi HMK najbolj razlikujeta v vzorcih odvzetih 948 in 958 dan, kjer se signifikantno razlikujejo (α =0,05) koncentracije petih od šestih izmerjenih HMK. Pregled vseh analiziranih HMK je v preglednici 7 in prilogi I.

Preolednica 10. R	2 linearne regresije	posameznih HMK	in etanola v f	ermentoriu 1 ir) fermentoriu 2
i legicunica 10. K	. intenne regresije	posumezinii mini	in ctanola v i	ermemorju i n	i iermemorju 2.

	\mathbb{R}^2
etanol	0,40
ocetna kislina(C2:0)	0,98
propanojska kislina(C3:0)	0,83
maslena kislina(C4:0)	0,55
valerianska kislina(C5:0)	0,42
kapronska kislina(C6:0)	0,41

Na sliki 16 se vidi, da med posameznimi reaktorji, prihaja do velikih razlik v vsebnosti HMK. Najbolj se razlikujeta fermentorjema 1 in 4 v koncentraciji ocetne kisline za 1761 mg/l in propanojske kisline za 344 mg/l. Koncentraciji ocetne in propanojske kisline sta linearno korelirani (R_2 =0,91). Razlike v koncentracijah drugih HMK in etanola so bistveno manjše.



Slika 15: Koncentracije posameznih HMK in etanola ter skupne koncentracije vseh izmerjenih HMK in etanola v vzorcih fermentacijske brozge za fermentorja 1 in 2. *Vzorca za fermentor 1 za 521 in 547 dan manjkata.



Slika 16: Koncentracije posameznih HMK in etanola s standardnimi odkloni, ter skupne koncentracije vseh izmerjenih HMK in etanola v vzorcih fermentacijske brozge za fermentorja 1 do 6 odvzete 928 dan.

4.1.5 Molekulska masa DOM

Vse izmerjene vrednosti Sr so pod 0,9 (Slika 17, Slika 18). To pomeni, da je v vzorcih fermentacijske brozge predvsem več raztopljene organske materije (DOM) z visoko molekulsko maso (<1000kDa), kot z nizko (>1000kDa). Fermentorja 1 in 2 se med seboj razlikujeta samo v vzorcih odvzetih 9 in 30 dan po zagonu (α =0,05). Med fermentorji 1 do 6 na isti dan vzorčenja ni signifikantnih razlik (α =0,05) (Slika 18). Med fermentorjema nismo opazili, da bi imel eden konstanto višjo oziroma konstanto nižjo vrednost Sr, ne glede na njuno zaporedno vezavo in drugačen potek procesov razgradnje.



Slika 17: Vrednost S_r s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge odvzete ob različnih časih.



Slika 18: Vrednost S_r s standardnimi odkloni vzorcev fermentacijske brozge iz fermentorjev 1 do 6 odvzetih na 928 dan.

4.2 MULTIVARIATNA ANALIZA

4.2.1 Podobnost okoljskih parametrov med reaktorji in skozi čas

Eno temeljnih ekoloških vprašanj je kako fizikalno-kemijski dejavniki vplivajo na sestavo mikrobnih združb. V tej raziskavi smo spremljali fizikalno-kemijske parametre (temperatura, pH, KPK, absorpcijski spekter in HMK) v dveh zaporedno povezanih fermentorjih za proizvodnjo metana skozi čas in v 6 fermentorjih v eni časovni točki. S tehniko PERMANOVE smo ocenili, da so fizikalno-kemijski parametri v fermentorjih signifikantno različni od tistih, ki smo jih izmerili v izhodni biomasi, razen v biomasi iz fermentorja Jurša in fermentorjem 2 iz časa zagona (2 do 78 dan) (Preglednica 11). Na Sliki 19 je prikazana ordinacija fizikalno-kemijskih parametrov, opazno je prekrivanje med fermentorjem 1 in 2. Tako so vse točke fermentorja 2 zamaknjene proti desni, vzorec točk pa je med fermentor 2, tako imajo fizikalno-kemijski parametri v fermentor i v pliv na fermentor 2, spremembe se pojavljajo zaradi izrabljanja substratov, tako so razmerja hlapnih maščobnih kislin v teh dveh fermentorjih sicer podobne, vendar pa se količina le teh v fermentorju 2 zmanjša.

Slika 20 prikazuje ordinacijo fizikalno-kemijskih parametrov fermentorjev 1 do 6 vzorčene na 921 dan. Med vsemi šestimi fermentorji izstopata fermentor 1 in 4, ki se od ostalih fermentorjev precej razlikujeta. Razlog za to so predvsem razlike v hlapnih maščobnih kislinah (Slika 16). Ostali parametri se med fermentorji 1 do 6 bistveno ne razlikujejo (Slika 9, Slika 12, Slika 14, Slika 18).

Preglednica 11: Signifikantost razlik fizikalno-kemijskih parametrov po fermentorjih in časovnih obdobjih s tehniko permanova. Prikazane so P-vrednosti z Bonferroni korekcijo. Vse P vrednosti nižje od 0,05 so napisane z rdečo. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r . Uporabljen indeks je Euclidijev. Število permutacij je 9999.

	F1 (2-78)	F1 (928-958)	F2 (2-78)	F2 (521-547)	F2 (928-958)	Ginjevec	Jurša
F1 (2-78)							
F1 (928-958)	0,26						
F2 (2-78)	0,1735	0,7806					
F2 (521-547)	0,5492	0,2885	0,6921				
F2 (928-958)	0,1277	0,4422	0,8541	0,1602			
Ginjevec	0,0001	0,0057	0,0014	0,0105	0,0052		
Jurša	0,0017	0,005	0,1127	0,0117	0,0042	0,0953	
Logarovci	0,0002	0,0042	0,0053	0,0127	0,0049	0,3024	0,0977



Slika 19: Ordinacija fizikalno-kemijskih parametrov skozi čas v reaktorjih F1 in F2 ter izvornih biomasah ob zagonu bioplinske elektrarne s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r . Uporabljen indeks je Euclidijev. Shepard plot: stress=0,099 R² os1=0,74 in R² os2= 0,15. Legenda barv: fermentor 1 (**rdeča**), fermentor 2 (**modra**), donorski fermentorji Ginjevec, Jurša in Logarovci (**roza**). Črta (**--**) predstavlja smer gibanje vzorcev po ordanicijskem grafu.



Slika 20: Ordinacija fizikalno-kemijskih parametrov reaktorjev F1 do F6 iz dne 31.1.2014 s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Euclidijev. Shepard plot: stress=0,000 R² os1: 0,99 in R² os2: 0,22.

4.2.2 Analiza profilov bakterijskih mikrobnih združb v povezavi s fizikalnokemijskimi parametri skozi čas in med reaktorji

Kot že prej omenjeno se fizikalno-kemijski parametri skozi čas razlikujejo, enako pa tudi velja za bakterijske profile. Še posebej pa je zanimiva morebitna povezava med spremenjenimi fizikalno-kemijskimi parametri in mikrobnimi združbami. Na sliki 21 vidimo dinamiko bakterijske združbe fermentorja 1 in 2 skozi čas. Bakterijska združba iz donorskih biomas predstavlja veliko površino, kar nakazuje na veliko nesorodnost mikrobnih združb iz teh treh različnih bioplinskih elektrarn. V prvih 30 dneh opazovanja se bakterijska združba bistveno ne spreminja, potem pa opazimo hiter premik do 78 dne. Ta premik je povezan s povečanimi koncentracijami etanola in zmanjšanim KPK. Vzorci odvzeti po letu in pol (521 in 547 dan) so pozicionirani med izvirno združbo prvih 30 dni in združbo po treh letih. Združba je po treh letih (928 do 958 dan) najmočneje povezana z visokimi koncentracijami acetata. KPK kaže močno negativno povezavo z združbo ob koncu zagona 71 in 78 dne.

Slika 22 prikazuje isto mikrobno združbo kot tudi slika 21 vendar samo z ordinacijo podatkov pristnosti/odsotnosti DNK fragmentov. Viden je podoben vzorec, kot na sliki 21 le, da so spremembe združbe v prvih tridesetih dneh še manj izrazite, medtem ko je sprememba iz 30 na 78 dan še izrazitejša. Bakterijska združba po letu in pol (521 in 547 dan) se pozicionira bistveno bližje združbi po treh letih. Še zmeraj je najmočnejša povezava med acetatom in združbo po treh letih. Medtem ko se povezava z etanolom zmanjša se povezava z pentanojsko kislino poveča, vendar povezava z določeno združbo ni jasna. Na slikah 21 in 22, so združbe iz fermentorjev 1 in 2 precej podobne.

Bakterijske mikrobne združbe iz fermentorjev 1 do 6 vzorčene na isti dan so si med seboj zelo podobne, zaradi tega tudi ni jasnih povezav s fizikalno-kemijskimi parametri. Velikih variacij v mikrobni združbi tudi med vsemi šestimi fermentorji nismo zaznali (Priloga C, Priloga D).



Slika 21: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen Indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,095 R² os1: 0,81 in os2: 0,12. Legenda: Fermentor 1: 2 do 78 dan (**temno zelena**), 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 2 do 78 dan (**rdeča**), 521 do 547 dan (**vijolična**), 928 do 958 dan (**roza**). Izvorna biomasa iz fermentorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci (**modra**). Črta (**--**) predstavlja smer gibanje vzorcev po ordanicijskem grafu.



Slika 22: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s **prisotnost/odsotnost** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen Indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,161 R² os1: 0,70 in os2: 0,33. Legenda: Fermentor 1: 2 do 78 dan (**temno zelena**), 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 2 do 78 dan (**rdeča**), 521 do 547 dan (**vijolična**), 928 do 958 dan (**roza**). Izvorna biomasa iz fermentorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci (**modra**).

4.2.3 Analiza profilov arhejskih mikrobnih združb v povezavi s fizikalnokemijskimi parametri skozi čas in med reaktorji

Za arhejsko združbo (Slika 23) vidimo podobna razmerja kot za bakterijsko združbo (Slika 21). Prvih 30 dni je razsoj med vzorci večji kot pri bakterijski združbi in premik iz dneva 30 do 71 je manj izrazit, čeprav je opazen. Vzorci biomas donorskih reaktorjev pokrivajo bistveno manjšo površino, so torej manj raznoliki. Vzorci odvzeti po letu in pol (521 dan) so precej podobni vzorcem po treh letih (928 do 958 dan). Mikrobna združba po treh letih je precej odmaknjena od začetne mikrobne združbe. Arhejske združbe so si med fermentorjema 1 in 2 podobne, izstopa samo združba iz dneva 14 v fermentorju 2.

Na sliki 24 vidimo ordinacijo arhejskih združb na osnovi prisotnosti/odsotnosti fragmentov. Mikrobna združba prvih 78 dni izgleda praktično enaka, z izjemami vzorcev iz 23 in 7 dne za fermentor 1. Premik iz 30 na 71 dan, ki je viden na vseh ostalih slikah je tukaj odsoten. Pomeni, da v tem času v arhejski združbi s tehniko LH-PCR nismo zaznali dodatnih oziroma novih fragmentov DNK. Razlike v arhejski združbi v tem obdobju nastajajo samo zaradi spreminjanja deleža posameznih taksonomskih skupin. Okoljski parameter, ki je bil najtesneje povezan z razsojem mikrobnih združb arhej je tudi v tem primeru acetat, ki je povezan z arhejsko združbo po treh letih (928 do 958 dan). Pentanojska kislina je povezana z arhejsko združbi ob zagonu. Etanol, KPK, ostale hlapne maščobne kisline in S_r kažejo manjšo povezavo.

Arhejske mikrobne združbe vseh šestih fermentorjev vzorčene na isti dan so si zelo podobne, zaradi tega tudi ni jasnih povezav s fizikalno-kemijskimi parametri. Primerljivo velikih nihanj v strukturi arhejskih združb med vsemi šestimi fermentorji ob istem času nismo zaznali (Priloga E, Priloga F).



Slika 23: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen Indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,063 R² os1: 0,88 in os2: 0,06. Legenda: Fermentor 1: 2 do 78 dan (**temno zelena**), 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 2 do 78 dan (**rdeča**), 521 do 547 dan (**vijolična**), 928 do 958 dan (**roza**). Izvorna biomasa iz fermentorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci (**modra**).



Slika 24: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s **prisotnost/odsotnost** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,140 R² os1: 0,80 in os2: 0,28. Legenda: Fermentor 1: 2 do 78 dan (**temno zelena**), 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 2 do 78 dan (**rdeča**), 521 do 547 dan (**vijolična**), 928 do 958 dan (**roza**). Izvorna biomasa iz fermentorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci (**modra**).

4.2.4 Skupna analiza profilov arhejskih in bakterijskih mikrobnih združb v povezavi s fizikalno-kemijskimi parametri skozi čas in med reaktorji

Skupna analiza profilov arhejske in bakterijske mikrobne združbe izrazito pokaže, kako se je mikrobna združba ob zagonu odmaknila od mikrobne združbe po treh letih. Z razsojem mikrobnih združb je najbolj močno povezan parameter tudi v tem primeru



acetat (Slika 25). Prav tako je mikrobna združba po letu in pol (521 dan) bistveno bolj podobna združbi po treh letih (928 do 958 dan), kot pa združbi ob zagonu (2 do 78 dan).

Slika 25: Ordinacija odnosov arhejskih in bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter izvornih biomasah s tehniko nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,068 R² os1: 0,87 in os2: 0,05. Legenda: Fermentor 1: 2 do 78 dan (**temno zelena**), 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 2 do 78 dan (**rdeča**), 521 do 547 dan (**vijolična**), 928 do 958 dan (**roza**). Izvorna biomasa iz fermentorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci (**modra**). Črta (**--**) predstavlja smer gibanje vzorcev po ordanicijskem grafu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nastanek bioplina v anaerobnih reaktorjih omogočajo kompleksne mikrobne združbe bakterij in arhej (Weiland, 2010). Werner in sod., (2011) so odkrili, da je funkcija v anaerobni presnovi povezana s strukturo mikrobnih združb. Razumevanje kako okoljski parametri vplivajo na mikrobno združbo pa bi lahko omogočalo funkcijsko krmiljenje združb v smer boljšega izkoristka in večje stabilnosti procesa. Namen raziskave je bil izboljšati razumevanje dinamike mikrobne združbe v povezavi s fizikalno-kemijskimi parametri v industrijskem bioreaktorju. Zato smo kontinuirano opazovali strukturo mikrobne združbe in spremembe skušali povezati z izmerjenimi parametri. Naša raziskava se izogiba primerjavi različnih fermentorjev v eni časovni točki saj to predstavlja trenutno sliko stanja. Neznane so predhodne variacije parametrov, ter stopnje prilagojenosti mikrobnih združb, te so lahko stabilne ali pa sredi tranzicije. Prav tako so različni fermentorji inokulirani z različno bogatimi mikrobni združbami, kar ima vpliv na potencial prilagoditve združbe. Zato smo spremljali 4 MW bioplinsko elektrarno v Vučji vasi od zagona bioplinarne leta 2011 do leta 2014. Sledili smo pH, temperaturi, kemijski potrebi po kisiku (KPK), hlapnim maščobnim kislinam (HMK) in molekularni teži DOM oziroma razmerju med težkim in lahkim DOM ter strukturi mikrobnih združb.

Iz raziskave smo ugotovili, da se fizikalno-kemijski parametri med vzorci odvzetimi ob različnih časih razlikujejo, vendar pa so med fermentorji, ki so bili vzorčeni ob istem času podobni. Struktura mikrobne združbe bakterij in arhej se je med časovno oddaljenimi vzorci razlikovala. Tako arhejska kot bakterijska združba pokaže po treh letih (928 do 958 dan) izrazito korelacijo z visoko koncentracijo acetata.

V vseh vzorcih je pH fermentacijske brozge višji od optimalnega po Deublein in Steinhauser (2008), kar pa ne kaže vpliva na funkcionalni vidik anaerobnega procesa bioplinske elektrarne (Kolbl, 2014). Razlog za višji pH je lahko visoka količina dodane gnojevke z visoko vsebnostjo amonijaka, oziroma način vnosa različnih kombinacij substratov na bioplinski napravi. Posledica visokega pH je v splošnem povišano razmerje v prid prostega amonijaka nad amonijem, kar pa lahko inhibira metanogenezo. Po drugi strani pa višji pH zmanjšuje škodljivost visokih koncentracij HMK, ki so pri višjih vrednostih pH v deprotonirani obliki in zato manj škodljivi za proces, v kolikor pride do trenutnih nihanj v njihovih koncentracijah. Do razlik v pH med fermentorjema 1 in 2 je lahko prišlo zaradi velikega vnosa substrata v samo en od obeh sicer zaporedno vezanih reaktorjev, s čimer bi lahko prišlo tudi do razlik v mikrobni aktivnosti, kar pa se ni vedno odrazilo v koncentraciji HMK in KPK. V zadnjih treh vzorcih iz 928, 948 in 958 dne smo zaznali zelo velike koncentracije HMK (do 3500 mg/L), predvsem acetata in propionata. Vendar pa se inhibitorne koncentracije HMK pri pH nad 7,5 lahko gibljejo vse do 4500 mg/L (Ahring in sod., 1995). V naših vzorcih je najnižji izmerjen pH 7,84, kar pomeni, da kljub visokim koncentracijam HMK v vzorcih iz 928 do 958 dne, ni prišlo do funkcijske inhibicije bioplinske naprave.

Razlike v KPK med vzorci odvzetimi ob različnih časih so lahko odraz različnega režima dodajanja substratov v fermentorje, tako njihove količine kot kemijske sestave.

Rezultati spektrofotometričnih analiz in izračunanih vrednosti Sr kažejo, da imajo vsi vzorci razmerje med LMW CDOM: HMW CDOM nižje od 1. V takšnih raztopinah je torej več DOM z molekulsko maso nad 1000kDa, kar je značilno za organsko obremenjene vode. Določenega trenda med reaktorjema nismo zaznali. To ni bilo v skladu s pričakovanji, glede na to, da se fermentor 1 pretaka v fermentor 2 in s predpostavko, da bakterije preferenčno razkrajajo enega izmed velikostnih razredov DOM, LMW ali HMW (Meyer in sod., 1987; Amon in Benner, 1996).

Na sliki 25 je ordinacija združenih bakterijskih in arhejskih profilov. Vrednost *stress* je na tem grafu v primerjavi z grafom na sliki 21 nižja, kar nakazuje, da se profili bakterijske kot arhejske mikrobne združbe podobno pozicionirajo na ordinacijskem grafu. To sicer ni nepričakovano, saj bakterijske in arhejske združbe na ordinacijskih grafih tvorijo zelo podobne vzorce. Kar nakazuje na povezano dinamiko bakterijskih in arhejskih združb. Sundberg in sod., (2013) so primerjali bakterijske in arhejske združbe enaindvajsetih bioreaktorjev na osnovi pirosekvenčnih podatkov. Tudi v njihovi raziskavi je prihajalo do podobnih vzorcev bakterijskih in arhjeskih združb na PCA

ordinaciji. Zaključili so, da prihaja do kovariacije med arhejskimi in bakterijskimi združbami, kar je v skladu z našimi ugotovitvami.

V vseh grafih, ki upoštevajo profile z relativnimi deleži DNK fragmentov lahko opažamo zelo hitro spremembo arhejske in bakterijske mikrobne združbe iz 30 dne na 71 dan. Združba se je v času zagona v 41 dneh (30 do 71 dan) hitreje spremenila kot v podobno dolgem časovnem obdobju 30 dni po treh letih (928 do 958 dan). Najverjetneje se je združba v času zagona šele prilagajala in se je posledično hitreje spreminjala oziroma odmikala od začetne pozicije na ordinacijskem grafu. V prid tej hipotezi kaže dejstvo, da so donorski fermentorji iz drugačnega režima hranjenja, kot sta fermentorja 1 in 2 v Vučje vasi. Donorski fermentorji so predvsem hranjeni z agro-industrijskimi odpadki, kot je gnojevka, pa tudi z sirekom (Sorghum spp.) in koruzno silažo, medtem ko je večji delež substrata v Vučji vasi sestavljen iz energijskih rastlin, na primer koruzne silaže. Tudi fizikalno-kemijski parametri med fermentorjema 1 in 2 se signifikantno razlikujejo od parametrov v donorskih reaktorjih. Dejstvo je, da se v fermentorjih, ki so hranjeni z različnimi substrati, kot so agro-industrijski ostanki ali z energetskimi rastlinami, sestava združbe precej razlikuje. Do večjih sprememb prihaja predvsem v bakterijski združbi, manj pa v arhejski (Merlino in sod., 2012; Ziganshin in sod., 2013).

Velika razlika je opazna med združbami iz donorskih reaktorjev Ginjevec, Jurša, Logarovci, ki v večini primerov NM-MDS grafov tvorijo trikotnik z veliko medsebojno razdaljo. To pomeni, da so si združbe med seboj precej različne. Raznolika in bogata mikrobna združba pa ima večji potencial prilagajanja na različne okoljske parametre.

Mikrobni združbi bakterij in arhej sta po letu in pol (521 in 547 dan), kar je približno na polovici opazovanega obdobja, bolj podobni združbam po treh letih, kot pa združbi ob zagonu. To kaže, da se je združba stabilizirala in se v kasnejših fazah obratovanja ni več tako radikalno spreminjala, kot ob polnjenju reaktorjev in kasnejšem polnem funkcionalnem zagonu.
Dinamiko združbe, ki je sposobna skozi čas obdržati določeno funkcijo lahko razdelimo na tri osnovne mehanizme (Allison in Martiny, 2008):

- 1. Rezistenca (skozi čas določena funkcijska populacija ostaja dominanta, torej je rezistentna na perturbacije sistema).
- Prožnost (funkcijsko pomembna populacija je po redukciji sposobna nazaj vzpostaviti svojo prisotnost).
- Redundantnost (reducirana funkcijska populacija je nadomeščena z drugo populacijo, ki izvaja enako funkcijo).

Ko potujemo po trofičnih nivojih v anaerobni presnovi od najnižjega do najvišjega se redundantnost populacij precej manjša. Za stabilnost v nižjih trofičnih nivojih (hidroliza, acidogeneza) je najbolj pomembna redundantnost združbe, medtem ko je pri višjih trofičnih nivojih (acetogeneza, metanogeneza in sintrofija) veliko bolj pomembna rezistenca in prožnost. Še posebej je to vidno pri sintrofnih bakterijah, katerih združba se po porušenju znova vzpostavi in je zaradi tega na dolgi rok tipična za določen fermentor (Werner in sod., 2011).

Iz primerjave med mikrobnimi profili z relativnimi deleži fragmentov DNK in mikrobnimi profili s prisotnost/odsotnost fragmentov opažamo, da so si združbe v času zagona, predvsem od 2 do 30 dne precej bolj podobne, ko jih analiziramo na osnovi profilov s prisotnost/odsotnost fragmentov DNK. Pomeni, da razlike med združbami v času zagona temeljijo na različnih deležih istih fragmentov, kar lahko interpretiramo kot prisotnost istih taksonomskih skupin, katerim se med vzorci prvih 30 dni spreminja samo njihov delež v združbi. Potem pa opazimo velik premik na 71 in 78 dan, takrat je prišlo do pojava oziroma do izginotja nekaterih fragmentov DNK v profilu. Tudi mikrobne združbe po letu in pol (521 do 547 dan) so analizirane na osnovi prisotnosti/odsotnosti fragmentov DNK bistveno bližje mikrobni združbi po treh letih (928 do 958 dan), kot če jih primerjamo na osnovi relativnih deležev fragmentov DNK. Kar nakazuje, da so se že po letu in pol vzpostavile določene taksonomske skupine, katerim se je v nadaljnjem času spreminjal samo še njihov delež v združbi. To je v skladu s Werner in sod., (2011), ki so v mesečnih intervalih spremljali mikrobno združbo v devetih industrijskih fermentorjih. Ugotovili so, da imajo fermentorji stabilno

in odporno mikrobno združbo, ki se je po različnih motnjah vzpostavljala v prvotno stanje. V okviru te študije so primerjali tudi mikrobne združbe iz dveh industrijskih fermentorjev, katerih vzorci so bili odvzeti s časovno razliko 4 let. Mikrobne združbe so bile, kljub veliki časovni razliki med seboj signifikantno bolj podobne kot med ostalimi fermentorji, kar kaže na filogenetsko stabilnost oziroma prožnost mikrobnih združb na dolgi rok znotraj posameznih fermentorjev.

Mikrobna združba, ki se kontinuirano spreminja, bi morala na NM-MDS grafu potovati v določeni smeri proč od začetne točke. Pomeni, da se združba tekom časa vedno bolj oddaljuje od svojega začetnega položaja. Ko govorimo o stabilni združbi se le ta v času naključno giblje okoli povprečne točke, to pa pomeni, da se ne oddaljuje od začetne pozicije, ampak le v relativno omejenih odmikih naključno niha okoli nje (Werner in sod., 2011). V naši raziskavi lahko premikom združbe v celotnem opazovanem času pripišemo usmerjeno gibanje vstran od začetnega položaja. Vendar pa vzorci, ki so si časovno bolj blizu (pod 50 dni), kažejo premike bolj naključne narave, okoli navidezne povprečne točke. Naši podatki torej kažejo na začetno spreminjanje združbe kot posledico prilagajanja, in kasnejšo stabilizacijo, okoli katere prihaja do različnih naključnih ali pa okoljsko pogojenih variacij.

Podobno odkritje so opisali tudi Ziganshin in sod. (2013). V laboratorijskih bioreaktorjih so 2 meseca spremljali mikrobno združbo, ki je proizvajala bioplin iz različnih substratov. Ugotovili so, da so mikrobne združbe hranjene s koruzno silažo in govejo gnojevko relativno stabilne in med seboj podobne, medtem ko kurja gnojevka in temperatura procesa vodita do precej drugačne sestave mikrobne združbe. Tako kot v naši raziskavi so z metodo NM-MDS želeli poiskati korelacije med merjenimi fizikalno-kemijskimi parametri in mikrobnimi združbami. Pri bakterijski združbi so bili najbolj povezani parametri temperatura, koncentracija acetata, izobutirata, amonija in HMK. Pri arhejski združbi pa koncentracija amonija, pH, HRT, OLR, in CO₂. Za bakterijsko združbo se naše ugotovitve ujemajo predvsem s koncentracijo acetata, ki je bila v našem primeru najpomembnejši parameter, drugi močneje povezani parametri so bili še koncentracija etanola, KPK in koncentracija pentanojske kisline. Pri arhejski združbi so v naši raziskavi najbolj koreliran parameter koncentracija acetata, medtem ko so ostali merjeni parametri večinoma enakovredni, razen KPK in etanol, ki sta z arhejsko

združbo najmanj korelirana parametra. To je v nasprotju z Ziganshin in sod. (2013), ki niso ugotovili korelacije med acetatom in arhejsko združbo. Acetat je tako po naših meritvah najbolj povezan izmerjenimi parametri z arhejsko in bakterijsko mikrobno združbo tri leta po zagonu, kar kaže na pomembno sklopljenost obeh filogenetskih delov anaerobnega procesa.

Temperatura se v naši raziskavi ni bistveno spreminjala in posledično ni imela posebej močne korelacije s sestavo mikrobnih združb. To je v nasprotju z mnogimi avtorji, ki temperaturo omenjajo kot najpomembnejši faktor, ki vpliva na sestavo mikrobne združbe v anaerobni presnovi (Ahring, 2003; Shi in sod., 2013; Yu in sod., 2014; Ziganshin in sod., 2013; Pervin in sod., 2013). Razlog zato je, da smo v naši raziskavi spremljali mezofilen proces s stabilno in konstanto temperaturo. Po zagonu se namreč temperatura ni spreminjala za več kot za ±2 °C. Avtorji, ki navajajo temperaturo za najbolj pomemben dejavnik za sestavo mikrobne združbe pa primerjajo združbe iz mezofilnih in termofilnih procesov, kjer so razlike v temperaturah tudi do 20 °C. Temperatura, pri kateri proces teče, ima tudi vpliv na to, kako substrat vpliva na mikrobno združbo v bioreaktorjih. Tako ima substrat pri mezofilnih temperaturah procesa večji vpliv na sestavo mikrobne združbe, saj v tem primeru ni selekcijskega pritiska na mikrobe, ki vstopajo v proces z substratom. Nasprotno je pri termofilnem procesu, kjer je mikrobna združba reaktorja precej manj podobna mikrobni združbi iz substrata, saj so mikroorganizmi iz substrata predhodno prilagojeni na bistveno nižje temperature kot vladajo v termofilnih fermentorjih (Pervin in sod., 2013).

Na vprašanje, katera združba je najbolj optimalna iz vidika proizvodnje metana ne moremo odgovoriti. Verjetno pa obstaja kompromis med stabilnostjo in izkoristkom. Ilustrativen primer tega so razlike med mezofilnim in termofilnim procesom anaerobne razgradnje. Tako je termofilen proces hitrejši in z boljšimi izkoristki. Vendar je na visoke temperature prilagojeno precej manjše število mikrobov, posledično je bogatost mikrobih združb in redundantnost metabolnih poti zmanjšana. Zaradi tega so takšne združbe bolj dovzetne na motnje v okolju in posledično je proces majn stabilen (Ahring, 2003; Fotidis in sod., 2013; Pervin in sod., 2013).

Do natančnih ugotovitev med povezavo mikroorganizmov, okolja in funkcije, lahko pridemo samo s sistematičnim pristopom spremljanja mikrobnih združb. To lahko dosežemo v kontroliranem okolju pilotnih velikosti nad 5 litrov, s kontroliranim vnosom realnih substratov v kontinuiranih ali semikontinuiranih procesih (Kolbl in sod., 2014). Sestavo združbe je potrebno spremljati na taksonomski ravni z metodami direktnega sekvenciranja tarčnih genov ali celo metagenomov, ter preverjanjem ugotovljenih razmerij z metodami qPCR ali transkriptomov. Torej je nujen prehod iz pregledovanja in opazovanja procesa anaerobne presnove na eksperimentalno raziskovanje na merilni skali primerljivi s pogoji na industrijski ravni. Tako lahko dosežemo sistemsko razumevanje povezanosti posameznih delov procesa in končno razumevanje velikih industrijskih sistemov.

5.2 SKLEPI

- Izmerjeni fizikalno-kemijski parametri se med vzorci, odvzetimi ob različnih časih signifikantno razlikujejo.
- Struktura mikrobne združbe se s časom spreminja usmerjeno.
- Struktura mikrobne združbe se je ob zagonu hitreje spreminjala kot kasneje.
- Struktura mikrobne združbe ob koncu raziskave korelira z višjimi koncentracijami acetata.
- Spremembe arhejske in bakterijske združbe sovpadajo.

6 POVZETEK

Bioplin predstavlja pomemben del energije pridobljene iz obnovljivih virov in odpadkov. Iz njega pridobivamo okolju prijazno električno in toplotno energijo. Slovenija je v letu 2012 dosegla proizvesti 13 % energije iz obnovljivih virov. Prečiščen bioplin v biometan lahko injiciramo v sistemsko omrežje zemeljskega plina. Nastanek bioplina v anaerobnih reaktorjih omogočajo kompleksne mikrobne združbe bakterij in arhej. Namen raziskave je bil izboljšati razumevanje dinamike mikrobne združbe v povezavi z izmerljivimi fizikalno-kemijskimi parametri v bioreaktorju. V ta namen smo spremljali 4 MW bioplinsko elektrarno v Vučji vasi od zagona bioplinarne leta 2011 do leta 2014. Bioplinsko elektrarno sestavlja šest fermentorjev (6x 3.931 m3 = 23,586 m3) in dva postfermentorja (2 x 5.350 m3 = 10,700 m3), v skupnem volumnu 34,286 m3. Zagon je bil opravljen v manj kot treh tednih dnevnega vnosa biomase iz donorskih reaktorjev treh bližnjih bioplinskih elektrarn. Vzorce smo odvzeli (i) iz donorskih reaktorjev (Logarovci, Jurša, Ginjevec) ob času polnjenja in zagona elektrarne, (ii) v vseh časovnih točkah (n=13) iz dveh zaporednih fermentorjev (F1-F2), in (iii) v eni časovni točki iz šestih zaporednih fermentorjev (F1-F6). V vzorcih smo opravili meritve osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov (temperatura, pH, kemična potreba po kisiku, absorpcijski spekter in hlapne maščobne kisline). S hitrimi molekularnimi tehnikami smo opisali strukturne spremembe v profilu mikrobnih združb bakterij in arhej. Profile mikrobnih združb in rezultate meritev fizikalno-kemijskih parametrov smo analizirali z metodami nemetričnega večdimenzionalnega lestvičenja. Bakterijske in arhejske mikrobne združbe so se skozi čas spreminjale in sicer ob zagonu prve tri mesece hitreje, kot ob kasnejših časih vzorčenja. Skozi ves čas opazovanja so ohranjale celovito funkcionalno stabilnost in proizvodnjo bioplina navkljub uporabi raznolikih substratov v neenakomernih razmerjih. Fizikalno-kemijski parametri so se med vzorci odvzetimi ob različnih časih med seboj razlikovali, med fermentorji vzorčenimi v isti časovni točki pa bistvenih razlik nismo zaznali. Najbolj spreminjajoči se okoljski parametri so bile HMK. Raziskava kaže, da se mikrobna združba, tako bakterij kot arhej s časom spreminja in oddaljuje od začetne mikrobne združbe iz (i) donorskih reaktorjev iz časa zagona bioplinske elektrarne. Donorski fermentorji so imeli med seboj zelo različne mikrobne združbe. Mikrobna združba v recipientskih reaktorjih se je strukturno

prilagajala različnim okoljskim dejavnikom in substratom. (ii) Fizikalno-kemijski parametri in mikrobne združbe se med zaporednima bioreaktorjema F1 in F2 v istem času nista bistveno razlikovali. Med časovnimi točkami je s spremembo arhejskih in bakterijskih združb najbolj povezana vsebnost acetata. Bakterijske združbe so še v nasprotju z arhejskimi, precej povezane s KPK in vsebnostjo etanola. Arhejske združbe pa s tema parametroma ne kažeta povezave. Dinamika arhejske in bakterijske mikrobne združbe je bila povezana. (iii) Reaktorji F1 do F6 vzorčeni ob istem času kažejo majhne razlike v strukturi mikrobnih združb in fizikalno-kemijskih parametrih, razen HMK. Povezanosti med mikrobnimi združbami in koncentracijo acetata tukaj nismo opazili.

7 VIRI

- Abdo Z., Schuette U. M. E., Bent S. J., Williams C. J., Forney L. J., Joyce P. 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. Environmental Microbiology, 8, 5: 929-938
- Ahring B. K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. V: Biomethanation I. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Vol. 81. Ahring B. K. (ed.). Berlin, Springer: 1-30
- Ahring B. K., Sandberg M., Angelidaki I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. Applied Microbiology and Biotechnology, 43, 3: 559-565
- Allen H. L. 1976. Dissolved organic matter in lakewater: characteristics of molecular weight size-fractions and ecological implications. Oikos, 27, 1: 64-70
- Allison S. D., Martiny J. B. H. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105: 11512–11519
- Amon R. M. W., Benner R. 1996. Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. Limnology and Oceanography, 41, 1: 41-51
- Ariesyady H. D., Ito T., Okabe S. 2007. Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. Water Research, 41, 7: 1554-1568
- Bano N., Ruffin S., Ransom B., Hollibaugh J. T. 2004. Phylogenetic composition of arctic ocean archaeal assemblages and comparison with antarctic assemblages. Applied and Environmental Microbiology, 70, 2: 781-789
- Carder K. L., Steward R. G., Harvey G. R., Ortner P. B. 1989. Marine humic and fulvic acids: Their effects on remote sensing of ocean chlorophyll. Limnology and Oceanography, 34, 1: 68-81
- Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. Bioresource Technology, 99, 10: 4044-4064

- Clescerl L. S., Greenberg A. E., Eaton A. D. 1999. Standard methods for examination of water & wastewater. 20thed. Washington, DC, American Public Health Association: 1325 str.
- Demirel B., Scherer P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 7, 2: 173-190
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from waste and renewable resources: an introduction. Weinheim, Wiley-VCH: 443 str.
- Dubber D., Gray N. F. 2010. Replacement of chemical oxygen demand (COD) with total organic carbon (TOC) for monitoring wastewater treatment performance to minimize disposal of toxic analytical waste. Journal of Environmental Science and Health, 45, 12: 1595-1600
- Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17,19: 7843–7853
- El-mashad H. M., Zeeman G., van Loon W. K. P., Bot G. P. A., Lettinga G. 2004.Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. Bioresource Technology, 95, 2: 191–201
- Fehrenbach H., Giegrich J., Reinhard G., Schmitz J., Sayer U., Gretz M., Seizinge E., Lanje K. 2008. criteria for a sustainable use of bioenergy on a global scale (UBA-FB 206 41 112.). Dessau-Roßlau, Federal Environment Agency (Umweltbundesamt): 130 str.
- Fotidis I. A., Karakashev D., Kotsopoulos T. A., Martzopoulos G. G., Angelidaki I. 2013. Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. FEMS Microbiology Ecology, 83, 1: 38-48
- Groβkopf R., Janssen P. H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. Applied and Environmental Microbiology, 64, 3: 960-969

- Hammer Ø., Ryan P., Harper D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4,1: 9 str. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Helms J. R., Stubbins A., Ritchie J. D., Minor E. C., Kieber D. J., Mopper K. 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. Limnology and Oceanography, 53, 3: 955 -969
- Holdeman L. V., Moore W. E. C., Cato E. P. 1977. Anaerobe laboratory manual. 4th ed. Blacksburg, VPI: 156 str.
- Kaplan C. W., Kitts C. L. 2003. Variation between observed and true terminal restriction fragment length is dependent on true TRF length and purine content. Journal of Microbiological Methods, 54, 1: 121-125
- Karakashev D., Batstone D. J., Angelidaki I. 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. Applied and Environmental Microbiology, 71, 1: 331-338
- Khalil M. A. K. 1999. Non-CO₂ greenhouse gases in the atmosphere. Annual Review of Energy and the Environment, 24, 1: 645-661
- Köchling T., Lara-Martín P., González-Mazo E., Amils R., Sanz J. L. 2011. Microbial community composition of anoxic marine sediments in the Bay of Cádiz (Spain). International Microbiology, 14,3: 143-154
- Kolbl S. 2014. Izboljšava anaerobne presnove blata iz komunalnih čistilnih naprav in lignocelulozih substratov pri pridobivanju bioplina. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo: 206 str.
- Kolbl S., Paloczi A., Panjan J., Stres B. 2014. Addressing case specific biogas plant tasks: industry oriented methane yields derived from 5L automatic methane potential test systems in batch or semi-continuous tests using realistic inocula, substrate particle sizes and organic loading. Bioresource Technology, 153: 180-188
- Krause L., Diaz N. N., Edwards R. A., Gartemann K. H., Krömeke H., Neuweger H., Pühlerd A., Runtea K. J., Schlüterd A., Stoyea J., Szczepanowski R., Taucha A., Goesmann, A. 2008. Taxonomic composition and gene content of a methane-

producing microbial community isolated from a biogas reactor. Journal of Biotechnology, 136, 1-2: 91-101

- Lay J., Li Y., Noike T., Endo J., Ishimoto S. 1997. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solids organic waste. Water Science and Technology, 36, 6-7: 493-500
- Lee S. H., Kang H. J., Lee Y. H., Lee T. J., Han K., Choi Y., Park H. D. 2012. Monitoring bacterial community structure and variability in time scale in fullscale anaerobic digesters. Journal of Environmental Monitoring, 14, 7: 1893-1905
- Madigan M. T., Martinko J., Dunlap P., Clark D. P. 2008. Brock biology of microorganisms. 12th international ed. San Francisco, Pearson: 1168 str.
- McInerney M. J., Sieber J. R., Gunsalus R. P. 2009. Syntrophy in anaerobic global carbon cycles. Current Opinion in Biotechnology, 20, 6: 623-632
- Merlino G., Rizzi A., Villa F., Sorlini C., Brambilla M., Navarotto P., Bertazzoni B., Zagni M., Araldi 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 & Biotechnology, 87, 9: 1302-1311
- Meyer J. L., Edwards R. T., Risley R. 1987. Bacterial growth on dissolved organic carbon from a blackwater river. Microbial Ecology, 13, 1: 13-29
- Mills D. K., Entry J. A., Gillevet P. M., Mathee K. 2007. Assessing microbial community diversity using amplicon length heterogeneity polymerase chain reaction. Soil Science Society of America Journal, 71, 2: 572-578
- Mills D. K., Fitzgerald K., Litchfield C. D., Gillevet P. M. 2003. A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum-contaminated soils. Journal of Microbiological Methods, 54, 1: 57-74
- Miyamoto K. (ed.). Renewable biological systems for alternative sustainable energy production. 1997. Rome, Food & Agriculture Organization: 132 str.
- Moreno L. I., Mills D., Fetscher J., John-Williams K., Meadows-Jantz L., McCord B. 2011. The application of amplicon length heterogeneity PCR (LH-PCR) for

monitoring the dynamics of soil microbial communities associated with cadaver decomposition. Journal of Microbiological Methods, 84, 3: 388-393

- Mshandete A., Björnsson L., Kivaisi A. K., Rubindamayugi M. S. T., Mattiasson B. 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. Renewable Energy, 31, 14: 2385-2392
- Muyzer G., Waal E. C., Uitterlinden A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59,3; 695-700
- National Institute of Standards and Technology. 2014. Methane. NIST Chemistry WebBook http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=methane&Units=SI (20. jul. 2014)
- Novak D., Franke-Whittle I. H., Pirc E. T., Jerman V., Insam H., Logar R. M., Stres B. 2013. Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. Water Research, 47, 11: 3644-3653
- Pervin H. M., Dennis P. G., Lim H. J., Tyson G. W., Batstone D. J., Bond P. L. 2013. Drivers of microbial community composition in mesophilic and thermophilic temperature-phased anaerobic digestion pre-treatment reactors. Water Research, 47, 19: 7098-7108
- Quince C., Lanzén A., Curtis T. P., Davenport R. J., Hall N., Head I. M., Read L. F., Sloan W. T. 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. Nature Methods, 6, 9: 639-641
- Regueiro L., Veiga P., Figueroa M., Alonso-Gutierrez J., Stams A. J. M., Lema J. M., Carballa M. 2012. Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters. Microbiological Research, 167, 10: 581-589
- Ritchie N. J., Schutter M. E., Dick R. P., Myrold D. D. 2000. Use of length heterogeneity pcr and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4: 1668-1675

- Robič N. 2012. Analiza bakterijske združbe in sedimentov štirih nepovezanih jamskih sistemov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 88 str.
- Ryckebosch E., Drouillon M., Vervaeren H. 2011. Techniques for transformation of biogas to biomethane. Biomass and Bioenergy, 35, 5: 1633-1645
- 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
- Shi J., Wang Z., Stiverson J. A., Yu Z., Li Y. 2013. Reactor performance and microbial community dynamics during solid-state anaerobic digestion of corn stover at mesophilic and thermophilic conditions. Bioresource Technology, 136: 574-581
- Stres B. 2006. The first decade of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) in microbial ecology. Acta agriculturae Slovenica, 88: 62-73
- Sundberg C., Al-Soud W. A., Larsson M., Alm E., Yekta S. S., Svensson B. H., Sørensen S.H., Karlsson, A. 2013. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. FEMS Microbiology Ecology, 85, 3: 612-626
- Tiirola M. A., Suvilampi J. E., Kulomaa M. S., Rintala J. A. 2003. Microbial diversity in a thermophilic aerobic biofilm process: analysis by length heterogeneity PCR (LH-PCR). Water Research, 37, 10: 2259-2268
- Twardowski M. S., Boss E., Sullivan J. M., Donaghay P. L. 2004. Modeling the spectral shape of absorption by chromophoric dissolved organic matter. Marine Chemistry, 89, 1-4: 69-88
- Vetriani C., Jannasch H. W., MacGregor B. J., Stahl D. A., Reysenbach A.-L. 1999. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. Applied and Environmental Microbiology, 65, 10: 4375-4384
- Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 85, 4: 849-860
- Werner J. J., Knights D., Garcia M. L., Scalfone N. B., Smith S., Yarasheski K., Cummings T.A., Beers A.R., Knight R., Angenent L. T. 2011. Bacterial

community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108, 10: 4158-4163

- Whitehead T., Cotta M. 1999. Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits. FEMS Microbiology Letters, 179, 2: 223-226
- Wirth R., Kovács E., Maróti G., Bagi Z., Rákhely G., Kovács K. L. 2012. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnology for Biofuels, 5, 1: 41-41
- Yu D., Kurola J. M., Lähde K., Kymäläinen M., Sinkkonen A., Romantschuk M. 2014. Biogas production and methanogenic archaeal community in mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion processes. Journal of Environmental Management, 143, 54-60
- Ziganshin A. M., Liebetrau J., Pröter J., Kleinsteuber S. 2013. Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 11: 5161-5174

ZAHVALE

- doc. dr. Blažu Stresu za mentorstvo magistrskega dela in še posebej za hitro odzivnost pri težavah ter za pomoč in skrbnost, dogovarjanja za različne meritve in priskrbo laboratorijskega materiala.
- prof. dr. Gorazdu Avguštinu, predstojniku Katedre za Mikrobiologijo in Mikrobno Biotehnologijo za opravljanje naloge v laboratorijih katedre
- dr. Sabini Kolbl in podjetju Keter Invest d.o.o. za meritve Hlapnih maščobnih kislin
- dr. Domnu Novaku in dr. Vesni Jerman za začetno zbiranje in urejevanje vzorcev ter preliminarno analizo T-RFLP
- dr. Alenki Levart za viale in pokrovčke za plinski kromatograf, ko ni bilo zaloge
- prof. dr. Davidu Stoparju za dovoljenje opravljanja meritev absorpcijskih spektrov
- dr. Tjaši Danevčič in Simonu Sretenović za pomoč pri meritvah absorpcijskih spektrov
- Brigiti Nograšek, Urši Košir, Mojci Sekirnik in Robiju Šketu za pomoč in prijaznost ter popestritev dni v laboratoriju
- Svojim najbližjim:
 - Mami za trud in potrpljenje in za nešteta skuhana kosila in oprano perilo
 - Očetu za požrtvovalnost in finančno podporo ter, da mi je pokazal kaj pomeni vztrajnost

PRILOGE



Priloga A: Shema vzorčenja fermentorjev bioplinske elektrarne v Vučji vasi na časovni osi.



Priloga B: Umeritvena krivulja reakcije KPK pri valovni dolžini 415 nm.



Priloga C: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,151 R² os1: 0,77 in os2: 0,05. Legenda: Fermentor 1: 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 928 do 958 dan (**roza**). Fermentorji 3 do 6: 928 dan (**črna**).



Priloga D: Ordinacija odnosov bakterijskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s **prisotnost/odsotnost** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,128 R² os1: 0,82 in os2: 0,57. Legenda: Fermentor 1: 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 928 do 958 dan (**svetlo zelena**).



Priloga E: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili z **relativnimi deleži** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,108 R² os1: 0,88 in os2: 0,04. Legenda: Fermentor 1: 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 928 do 958 dan (**roza**). Fermentorji 3 do 6: 928 dan (**črna**).



Priloga F: Ordinacija odnosov arhejskih mikrobnih združb skozi čas v fermentorjih 1 in 2, ter fermentorjev 3 do 6 iz dne 31.1.2014 s tehniko ne metrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS). Uporabljeni so profili s **prisotnost/odsotnost** fragmentov DNK. Vključeni fizikalno-kemijski parametri so temperatura, KPK, pH, etanol, HMK (etanojsko (C2:0), propanojsko (C3:0), butanojsko (C4:0), pentanojsko (C5:0) in heksanojsko (C6:0) kislino) in S_r. Uporabljen indeks je Bryan-Curtis. Shepard plot: stress=0,249 R² os1: 0,70 in os2: 0,03. Legenda: Fermentor 1: 928 do 958 dan (**svetlo zelena**). Fermentor 2: 928 do 958 dan (**roza**). Fermentorji 3 do 6: 928 dan (**črna**).

Priloga G: Matrika Pearsonovih korelacij med izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri. V spodnji
polovici matrike je prikazan Pearsonov r, v zgornji polovici pa dvostranske p-vrednosti. Z modro so
označene p-vrednosti >0,05 z zeleno pa p-vrednosti >0,01.

	Temperatura	KPK	etanol	ocetna	propanojska	maslena	valerianska	kapronska	Hd	Sr	S(300-700)	S(275-295)	S(350-400)	E2:E3	a(255)	a(300)	TotalA (250-450)
Temperatura		0,13	0,21	0,16	0,94	0,03	0,86	0,01	0,42	0,76	0,93	0,48	0,89	0,93	0,98	0,98	0,97
КРК	-0,26		0,08	0,88	0,83	0,10	0,26	0,16	0,86	0,31	0,52	1,00	0,43	0,67	0,45	0,47	0,49
etanol	0,22	-0,30		0,17	0,51	0,40	0,34	0,52	0,01	0,24	0,22	0,28	0,17	0,23	0,22	0,24	0,25
ocetna	0,24	-0,03	0,24		0,10	0,00	0,02	0,68	0,02	0,79	0,61	0,07	0,59	0,54	0,62	0,59	0,58
propanojska	0,01	-0,04	0,12	0,28		0,54	0,13	0,68	0,25	0,20	0,13	0,17	0,13	0,18	0,12	0,13	0,13
maslena	0,36	0,29	-0,15	0,54	0,11		0,21	0,00	0,84	0,63	0,28	0,05	0,31	0,26	0,31	0,28	0,27
valerianska	0,03	-0,19	0,17	-0,39	0,26	-0,22		0,07	0,13	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
kapronska	0,43	0,24	0,11	0,07	0,07	0,64	0,31		0,36	0,14	0,07	0,06	0,08	0,08	0,11	0,10	0,09
pН	0,14	0,03	-0,43	-0,39	-0,20	-0,04	-0,26	-0,16		0,16	0,03	0,01	0,04	0,03	0,06	0,05	0,05
Sr	0,05	-0,18	-0,20	0,05	-0,22	-0,08	-0,50	-0,26	0,24		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S(300-700)	0,02	0,11	0,21	0,09	0,26	0,19	0,51	0,31	-0,36	-0,92		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S(275-295)	0,12	0,00	0,19	0,31	0,24	0,33	0,29	0,33	-0,44	-0,48	0,77		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
S(350-400)	0,02	0,14	0,24	0,09	0,26	0,18	0,48	0,30	-0,35	-0,95	0,99	0,73		0,00	0,00	0,00	0,00
E2:E3	0,02	0,07	0,21	0,11	0,23	0,20	0,49	0,30	-0,36	-0,86	0,99	0,83	0,97		0,00	0,00	0,00
a(255)	0,00	-0,13	-0,21	-0,09	-0,27	-0,18	-0,47	-0,27	0,32	0,91	-0,99	-0,75	-0,98	-0,98		0,00	0,00
a(300)	0,00	-0,13	-0,20	-0,09	-0,26	-0,19	-0,47	-0,28	0,33	0,90	-0,99	-0,77	-0,98	-0,99	1,00		0,00
TotalA (250-450)	-0,01	-0,12	-0,20	-0,10	-0,26	-0,19	-0,48	-0,29	0,33	0,90	-0,99	-0,77	-0,98	-0,99	1,00	1,00	

0					ijska		ska	ka			(00	95)	(00				()
	Temp	KPK	etanol	ocetna	propanc	maslena	valerian	kaprons	Hq	Sr	S(300-7	S(275-2	S(350-4	E2:E3	a(255)	a(300)	TotalA (250-45
Temp		0,07	0,84	0,25	0,66	0,00	0,37	0,01	0,10	0,71	0,95	0,39	0,91	0,84	0,8 8	0,9 8	0,99
КРК	- 0,31		0,28	0,87	0,75	0,55	0,67	0,98	0,49	0,07	0,16	0,66	0,12	0,33	0,1 4	0,1 6	0,17
etanol	0,04	- 0,19		0,15	0,58	0,68	0,21	0,00	0,01	0,34	0,21	0,19	0,16	0,29	0,2 0	0,1 8	0,18
ocetna	0,20	0,03	0,25		0,01	0,16	0,12	0,24	0,01	0,63	0,39	0,11	0,36	0,31	0,3 3	0,3 0	0,29
propanojsk a	0,08	- 0,06	0,10	0,45		0,44	0,12	0,32	0,16	0,19	0,14	0,11	0,16	0,14	0,1 2	0,1 6	0,16
maslena	0,53	0,10	0,07	0,24	0,13		0,11	0,02	0,78	0,48	0,37	0,02	0,31	0,34	0,3 8	0,3 3	0,31
valerianska	- 0,16	- 0,07	0,22	- 0,27	0,27	- 0,28		0,06	0,21	0,01	0,01	0,49	0,01	0,01	0,0 0	0,0 1	0,01
kapronska	0,46	- 0,01	0,54	0,20	0,17	0,40	0,32		0,09	0,08	0,06	0,05	0,05	0,11	0,0 7	0,0 7	0,07
pН	0,28	-0,12	- 0,43	- 0,41	- 0,24	- 0,05	- 0,22	- 0,29		0,18	0,08	0,05	0,06	0,10	0,0 8	0,0 8	0,08
Sr	0,07	- 0,31	- 0,17	- 0,08	- 0,23	-0,12	- 0,46	- 0,30	0,23		0,00	0,02	0,00	0,00	0,0 0	0,0 0	0,00
S(300-700)	- 0,01	0,24	0,22	0,15	0,26	0,16	0,46	0,32	- 0,30	- 0,93		0,00	0,00	0,00	0,0 0	0,0 0	0,00
S(275-295)	0,15	0,08	0,23	0,28	0,27	0,40	0,12	0,33	- 0,34	- 0,40	0,65		0,00	0,00	0,0 0	0,0 0	0,00
S(350-400)	- 0,02	0,27	0,24	0,16	0,24	0,18	0,42	0,34	- 0,32	- 0,95	0,99	0,63		0,00	0,0 0	0,0 0	0,00
E2:E3	0,03	0,17	0,18	0,18	0,25	0,17	0,42	0,28	- 0,28	- 0,86	0,97	0,75	0,95		0,0 0	0,0 0	0,00
a(255)	0,03	- 0,26	- 0,22	- 0,17	- 0,27	- 0,15	- 0,47	- 0,31	0,30	0,92	- 0,99	- 0,65	- 0,97	- 0,97		0,0 0	0,00
a(300)	0,00	- 0,24	- 0,23	- 0,18	- 0,24	- 0,17	- 0,44	- 0,31	0,30	0,89	- 0,98	- 0,68	- 0,96	- 0,98	0,9 9		0,00
TotalA (250-450)	0,00	0,24	0,23	- 0,18	- 0,24	0,18	0,43	- 0,31	0,30	0,89	- 0,98	- 0,68	- 0,96	0,98	0,9 9	1,0 0	

Priloga H: Matrika Spearmanove korelacije med izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri. V spodnji polovici matrike je prikazan Pearsonov r_s , v zgornji polovici pa dvostranske p-vrednosti. Z modro so označene p-vrednosti >0,05 z zeleno pa p-vrednosti >0,01.