

# Perlit kao nosač bakterija u reaktorima za proizvodnju bioplina

---

Paladin, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:732002>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ivana Paladin

**Perlit kao nosač bakterija u reaktorima za  
proizvodnju bioplina**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Ivana Paladin

**Perlit as bacterial carrier in biogas  
producing reactors**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u dva djela koja su provedena u dva laboratorija. Prvi dio rada je izrađen u Laboratoriju za mikrobiologiju na Mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Tomislava Ivankovića. Drugi dio rada je izrađen u laboratoriju na Zavodu za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Vanje Jurišić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičko fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALA

*Najviše se zahvaljujem svom mentoru doc.dr. sc. Tomislavu Ivankoviću na prenošenju znanja, velikoj pomoći i što me strpljivo vodio kroz izradu ovog rada.*

*Zahvaljujem se i mentorici doc.dr. sc. Vanji Jurišić koja je omogućila da istraživanje dođe do svoga zaključka zadnjim eksperimentom.*

*Veliko hvala mojim roditeljima Loreni i Dejvidu te bakama Nevini i Armandi bez kojih ovo studiranjem ne bi bilo moguće te zbog njih sam danas tu gdje jesam.*

*Zadnje hvala ide mojim prijateljicama koje su mi napravile fakultet zanimljivijim, tako da osim učenja i položenih ispita bilo je puno smijeha, veselja i zabave. Te nikako ne smijem zaboraviti zahvaliti se svojem zaručniku Dariu koji me gurao i bodrio da završim fakultet te koji mi je bio najveća potpora osim mojih roditelja tijekom studiranja.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Perlit kao nosač bakterija u reaktorima za proizvodnju bioplina

Ivana Paladin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bioplin nastaje procesom anaerobne pretvorbe organskih materijala uz prisustvo anaerobnih organizama. Jedno od biotehnoloških rješenja za proizvodnju bioplina su reaktori s aktivnim muljem koji koriste poljoprivrednu energetska kulturu *Miscanthus x giganteus* kao alternativnu sirovinu kukuruznoj silaži. Cilj rada je bioaugmentirati reaktore za proizvodnju bioplina s ciljem povećanja njihove učinkovitosti. Bakterije koje smo uspjeli izolirati iz aktivnog mulja koristile su *M. giganteus* kao jedini izvor ugljika. Nakon izolacije bakterije uspješno su se imobilizirale na perlit biofilmom te tako su tvorile biočestice. Postavljanjem 9 različitih bioreaktora i njihovim praćenjem proizvodnje bioplina ukazalo se da nema značajnih razlika u proizvodnji bioplina između reaktora s biočesticama, bakterijskom suspenzijom i aktivnog mulja s dodatkom *M. giganteus*. Predlaže se daljnje i opširnije istraživanje s više replika te s različitim koncentracijama biočestica, da bi se vidjelo može li se povećati prinos bioplina u nekoj drugoj konfiguraciji, ili možda da se poveća stabilnost različitih bioreaktora.

(35 stranica, 16 slika, 2 tablica, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: bioaugmentacija, *Miscanthus x giganteus*, imobilizacija, biočestice, aktivni mulj, biofilm

Voditelj 1: Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Voditelj 2: Doc. dr.sc. Vanja Jurišić

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković,

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić,

Izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš,

Doc. dr. sc. Ivana Šola

Rad prihvaćen: 15.09.2021

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

### Perlit as bacterial carrier in biogas producing reactors

Ivana Paladin

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Biogas is produced during the process of anaerobic conversion of organic materials in the presence of anaerobic organisms. A biotechnological solution for biogas production is active sludge reactor using the agricultural energy crop *Miscanthus x giganteus* as an alternative raw material to corn silage. The aim of this paper is to bioaugment production reactors biogas in order to increase their efficiency. Successfully isolating the bacteria from activated sludge required using *M. giganteus* as the only carbon source. After isolating the bacteria, they were successfully immobilized on perlite using biofilm and subsequently formed bioparticles. Setting 9 different bioreactors and monitoring biogas production indicated that there are no significant differences in biogas production between bioparticle reactors, bacterial suspension and activated sludge with added *M. giganteus*. The recommendation is to undertake further and more extensive research with more replications and different concentrations of bioparticles, in order to ascertain whether biogas can be increased in another configuration, or perhaps increase the stability of different types of bioreactors.

(35 pages, 16 figures, 2 tables, 34 references, original in: Croatian)

The thesis has been deposited in Central Biological Library.

Keywords: bioaugmentation, *Miscanthus x giganteus*, active sludge, immobilization, bioparticles, biofilm

Supervisor 1: Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Supervisor 2: Doc. dr.sc. Vanja Jurišić

Reviewers:

Doc. dr. sc. Tomislav Ivanković,

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić,

Izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš,

Doc. dr. sc. Ivana Šola

Thesis accepted: 15.09.2021

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Bioplin.....	1
1.2. <i>Miscanthus x giganteus</i> .....	2
1.3. Aktivni mulj.....	4
1.4. Perlit kao nosač bakterija.....	5
1.5. Bioaugmentacija.....	6
1.6. Cilj istraživanja.....	7
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>8</b>
2.1. Osnovni parametri aktivnog mulja.....	8
2.2. Izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke <i>M. giganteus</i> iz aktivnog mulja.....	9
2.2.1. Priprema medija.....	9
2.2.2. Uzgoj bakterija u tekućem mediju.....	9
2.2.3. Nasađivanje bakterija na hranjivu podlogu- kontrola.....	9
2.2.4. Nasađivanje bakterija na hranjive ploče i MSM ploče s drvnom masom.....	10
2.2.5. Mikroskopski preparati.....	10
2.3. Izrada biočestica u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija.....	11
2.3.1. Priprema medija.....	11
2.3.2. Suspenzija bakterija.....	11
2.3.2.1. Suspenzija bakterija - 4K.....	11
2.3.2.2. Suspenzija bakterija – K (totalni).....	12
2.3.3. Biočestice.....	12
2.3.3.1. Uzgoj bakterija u tekućem mediju na zrcima perlita – 4K....	12
2.3.3.2. Uzgoj bakterija u tekućem mediju na zrcima perlita – K.....	14
2.3.4. Mikroskopski preparati biočestica.....	14



2.4. Dodavanje biočestica u reaktore za proizvodnju bioplina i praćenje produkcije bioplina.....	15
<b>3. REZULTATI.....</b>	<b>17</b>
3.1. Osnovni parametri aktivnog mulja.....	17
3.2. Izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke <i>M. giganteus</i> iz aktivnog mulja.....	17
3.2.1. Sustavi nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi.....	17
3.2.2. Broj bakterija na hranjivom mediju na početku samog eksperimenta i nakon inkubacije 7 dana na 22°C.....	18
3.3. Izrada biočestica u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija.....	19
3.3.1 Imobilizacija bakterija na perlit – konzorcij 4K.....	19
3.3.2. Imobilizacija bakterija na perlit – konzorcij K.....	20
3.3.3. Broj imobiliziranih bakterija na perlitu.....	21
3.4. Proizvodnja bioplina u bioreaktorima.....	21
<b>4. RASPRAVA.....</b>	<b>26</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>31</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>32</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>35</b>

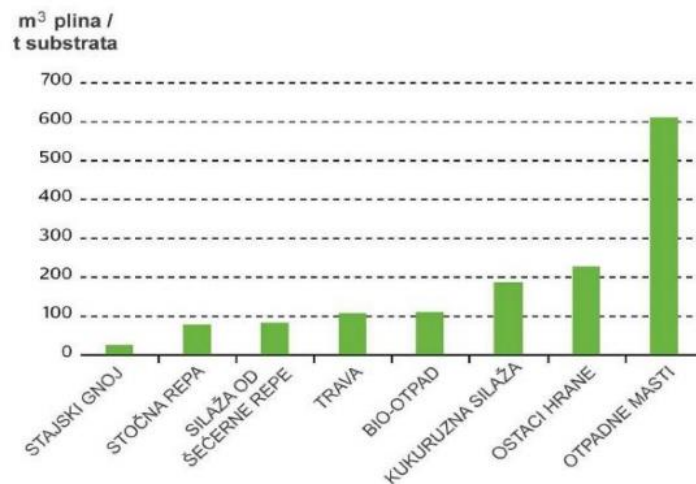
# 1. UVOD

## 1.1. Bioplin

Bioplin je smjesa plinova koja se sastoji od metana ( $\text{CH}_4$ ) i ugljičnog dioksida ( $\text{CO}_2$ ), kao dvije najzastupljenije komponente. Ostali sastojci bioplina uključuju dušik ( $\text{N}_2$ ), kisik ( $\text{O}_2$ ) i vodu ( $\text{H}_2\text{O}$ ) te u tragovima plinove poput sumporovodika ( $\text{H}_2\text{S}$ ) ili amonijaka ( $\text{NH}_3$ ). Kao što i sam njegov naziv govori, bioplin nastaje procesom anaerobne pretvorbe organskih materijala (npr. ostaci prehrambene industrije, kukuruzna silaža, poljoprivredne energetske kulture) uz prisustvo anaerobnih organizama (Vuleta, 2012). Sastav plina od različitih vrsta organskih materijala prikazuje tablica 1. Proizvodnja bioplina ovisi o vrsti i količini organskih materijala koji se koristi prilikom njegove proizvodnje te tu ovisnost prikazuje slika 1.

**Tablica 1.** Sastav bioplina  
(preuzeto od Vuleta G., 2012.)

Plin	Kućni biootpad	Bioplin iz pročišćivača otpadnih voda	Poljoprivredna biomasa
Metan ( $\text{CH}_4$ )	50 – 60 %	60 – 75 %	60 – 75 %
Ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ )	34 – 38 %	19 – 33 %	19 – 33 %
Dušik ( $\text{N}_2$ )	0 – 5 %	0 – 1 %	0 – 1 %
Kisik ( $\text{O}_2$ )	0 – 1 %	< 0,5 %	< 0,5 %
Voda ( $\text{H}_2\text{O}$ )	6 %	6 %	6 %
Sumporovodik ( $\text{H}_2\text{S}$ )	100 – 900 $\text{mg/m}^3$	1000 – 4000 $\text{mg/m}^3$	3000 – 10000 $\text{mg/m}^3$
Amonijak ( $\text{NH}_3$ )	-	-	50 – 100 $\text{mg/m}^3$



**Slika 1.** Proizvodnja bioplina ovisno o vrsti organskih materijala ( preuzeto s [http://www.eihp.hr/wp-content/uploads/2018/03/BiogasAction-ViroExpo-prezentacija\\_EIHP.pdf](http://www.eihp.hr/wp-content/uploads/2018/03/BiogasAction-ViroExpo-prezentacija_EIHP.pdf))

Bioplin je jedan od oblika obnovljivih izvora energije koji donosi brojne ekološke i energetske koristi. Zapravo, procesom anaerobne pretvorbe organskih spojeva stvara se obnovljiv izvor energije koji stvara pozitivan učinak na smanjivanje emisije stakleničkih plinova. Emisija stakleničkih plinova se reducira jer se smanjuje upotreba fosilnih goriva zbog upotrebe bioplina (Vuleta, 2012). Smanjenjem emisija metana i ugljičnog dioksida također se reducira i emisija dušikova oksida. Nadalje, bioplin je visokovrijedno organsko gnojivo te njegovom upotrebom pozitivno djelujemo na okoliš. Njegovom upotrebom smanjujemo količine otpada, samim time smanjuje se i veličina odlagališta i cijena zbrinjavanja otpada. Prilikom njegove proizvodnje koristi se mala količina vode u odnosu na ostala biogoriva te se njegovom primjenom smanjuje i potrošnja vode. Nadalje, značajno se smanjuje opasnost od zagađivanja površinskih i podzemnih vodotoka zbog odgovarajućeg zbrinjavanja biootpada (Vuleta, 2012). Obnovljivi izvori energije manje štete našoj zemlji te upravo zbog toga u zadnjih par godina se pokušava uvesti korištenje bioplina kao jednog od obnovljivog izvora energije.

## 1.2. *Miscanthus x giganteus*

Jedno od biotehnoških rješenja za proizvodnju bioplina su reaktori s aktivnim muljem koji koriste poljoprivrednu kulturu *Miscanthus x giganteus* kao alternativnu sirovinu kukuruznoj silaži. *M. giganteus* je sterilni hibrid koji u kombinaciji s drugim sirovinama tijekom anaerobne fermentacije služi za proizvodnju bioplina.

Koristi fotosintetski put C4, ali se nalazi među vrstama koje su osjetljive na oštećenja pri niskim temperaturama jer zadržava visoku fotosintetsku aktivnost pri niskim temperaturama i ostaje visoko produktivan u hladnoj klimi. Može preživjeti u različitim uvjetima zahvaljujući svojoj produktivnosti te zbog toga je *M. giganteus* uspješno uzgojen od španjolske mediteranske klime do sjevera Skandinavije. Zbog svog fotosintetskog puta C4 pokazuje poboljšanu učinkovitost u uporabi dušika i vode te dovodi do veće učinkovitosti fotosintetske uporabe cjelokupnog sustava.

*M. giganteus* može se zasaditi iz rizoma ili mikro razmnoženih sadnica u travnju ili svibnju te se može prilagoditi različitim tipovima tla i uvjetima. Preporučeni pH za sadnju biljke je u rasponu od 5.5 do 8 te da to bude dobro drenirano. U prvoj godini biljka ne postigne maksimalni prinos, svoju zrelost postigne nakon dvije ili tri godine te dobiva najveću produktivnost. Zrele biljke dosežu visinu 3,5 – 4 m. Ovi hibridi fiksiraju dušik i druge hranjive tvari u korijenje i rizome, a same stabljike im omogućuju primarno sakupljanje ugljika i vodika. Njihova žetva se može provesti od studenog (poslije pojave prvih jačih mrazova) pa sve do početka novog ciklusa vegetacije (ožujak, travanj) (Bilandžija, 2015). Žetvu je najbolje provoditi kada je udio vlage ispod razine od 20% što olakšava i pospješuje skladištenje, obradu te gorivu vrijednost. Ranija i prekasna žetva mogu naštetiti uzgoju ili prouzročiti prinos slabije kvalitete.



**Slika 2.** Energetsku kulturu *Miscanthus x giganteus* (preuzeto s <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4155/bfs.10.80>)

### 1.3. Aktivni mulj

Aktivni mulj je mulj koji je podvrgnut djelovanju zraka i podvrgnut djelovanju bakterija. Čini zajednicu mikroorganizama od kojih 95% jesu bakterije, ostalo su kvasci, alge, vezane i slobodne protozoe te metazoe. Najzastupljenije su bakterije koje se hrane biorazgradivim tvarima, tj. otopljenim organskim sastojcima iz otpadne vode, većinom proteinima, ugljikohidratima, mastima (Miloloža, Janton, 2017). Ukoliko ima dovoljno hranjivih tvari bakterije ih koriste za rast i energiju. Ako je smanjena koncentracija hranjivih tvari bakterije ih koriste samo za održavanje stanica i proizvodnju energije. Većinom su prisutne Gram-negativne bakterije iz rodova *Pseudomonas*, *Zoogloea*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Bdellovibrio*, te dvije nitrificirajuće bakterije, *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* (Vuković Domanovac, 2006). U ostalih 5% aktivnog mulja spadaju protozoe, metazoe, nematode i rotifere. Protozoe obuhvaćaju amebe, bičaste i trepetiljke te su oni jednostanični organizmi. Protozoe se mogu hraniti koloidnim otpadom, bakterijama i sitnijim organizmima. Višestanični organizmi jesu metazoe, nematode i rotifere te njihova uloga je uklanjanje nefolikularnih bakterija i stvaranje pahuljica. Sastav cijele zajednice mikroorganizama odnosno aktivnog mulja zapravo ovisi o vrsti supstrata, prisutnosti toksičnih tvari, temperaturi, koncentraciji otopljenog kisika, pH-vrijednosti i C:N omjeru. Provodi se prozračivanje atmosferskim zrakom kako bi mikroorganizmi imali dovoljno kisika. Također je potrebno osigurati minimalnu koncentraciju sastojaka s ugljikom, dušikom i fosforom. Najpovoljniji omjer je C: N : P = 100 : 5 : 1 koji služi za rast i razmnožavanje mikroorganizama (Banić, 2017). Osim što sadrži mikroorganizme, može sadržavati veliku količinu organske tvari, dušik, fosfor, magnezij, kalcij, sumpor, neke teške metale i farmaceutike. Potrebno je naglasiti da je mulj koji se koristi u eksperimentu dobiven iz centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu. Pročišćavanjem otpadnih voda se kao nusprodukt stvara otpadni mulj (Lebiocka i sur, 2018). Anaerobni postupci pročišćavanja otpadnih voda predstavljaju u pravilu prvi stupanj pročišćavanja. U drugom stupnju pročišćavanja slijede aerobni procesi. Anaerobni procesi razgradnje organskih tvari odvijaju se u četiri stupnja: hidroliza, kiselinsko vrenje, vodikova i acetogena faza i metanogena faza. Primarni i sekundarni mulj stajanjem podliježe anaerobnoj razgradnji, a pri tome nastaju niže masne kiseline neugodnih mirisa, stoga se anaerobna stabilizacija mulja provodi u zatvorenim reaktorima. Rezultati anaerobne stabilizacije mulja su mulj bez neugodnih mirisa, prikladan za odlaganje, smanjenog sadržaja suhih tvari u mulju te kao glavna stavka dobiva se CH<sub>4</sub> (sastav bioplina) koji služi kao pogonsko gorivo. Zapravo bakterije koje se nalaze u mulju pročišćenih otpadnih voda anaerobnom digestijom iz biomase *M. giganteus*

proizvode bioplin. Potrebno je dovoditi toplinu za njegovo uspješno odvijanje (endotermni proces). Osnovni produkti takvih procesa su bioplin i djelomično stabiliziran organski ostatak (Miloloža, Janton, 2017).

#### **1.4. Perlit kao nosač bakterija**

Nosači bakterija su prirodni ili umjetni materijali na koje se bakterije vežu u obliku biofilma, a nosači s vezanim bakterijama se onda dodaju u razne bioreaktore. Bakterije na nosačima povećavaju učinkovitost bioreaktora zbog povećanog broja varijabilnih stanica i pojačanog metabolizma u odnosu na reaktore s nevezanim bakterijama (Polović, 2016). Perlit je jedan od materijala koji ima visoki afinitet za vezanje bakterija te bi se mogao koristiti kao nosač bakterija u biotehnološkim procesima. Perlit je prirodni alumosilikatni materijal koji nastaje zagrijavanjem i ekspanzijom vulkanskog kamena, pri čemu nastaje materijal male gustoće, visoke poroznosti i velike specifične površine (Ivanković i sur., 2010). On je po svom sastavu vulkansko staklo koji unutar sirovog materijala sadrži 2 - 5% vode. Prilikom zagrijavanja sirovog perlita preko 870 °C voda isparava i stvara mjehure te to dovodi do njihove ekspanzije. Mogu povećati svoj volumen za 15 - 20 puta u odnosu na početni volumen (Pichór i Janiec, 2009). Treba se naglasiti da se naziv perlit odnosi na ekspanzirani perlit, dok se sirovi perlit odnosi na materijal koji se zagrijava.

Imobilizacija bakterija na pogodne materijale odnosno nosače (perlit) omogućena je pomoću biofilma. Bakterije stvaraju biofilm kao posebni omotač koji bakterijama daje zaštitu od vanjskih čimbenika. Biofilm se sastoji od polisaharida, proteina, slobodnih nukleinskih kiselina i vode. Pomoću tih izvanstaničnih polimernih tvari bakterije se mogu povezivati međusobno ili za podlogu. Zapravo te izvanstanične polimerne tvari služe kao ljepilo za zaštitu bakterijskih stanica, ali i kao vezivno tkivo unutar kojeg dolazi do izmjene hranjivih tvari pa čak i genetskog materijala (Rotim, 2018).

Osim tipa nosača za imobilizaciju bakterija važna je i veličina čestica nosača. Što su čestice nosača veće, to te biti manji broj imobiliziranih bakterija i obrnuto. Hrenović i sur. (2009) naveli su da je naboj površine čestica (zeta potencijal) manje važan, a prisutnost  $Mg^{2+}$  iona na površini čestica pozitivno utječe na imobilizaciju bakterija (Ivanković i sur. 2010). Tako imobilizirane bakterije se nazivaju biočestice.



**Slika 3.** Ekspandirani perlit (preuzeto s

[https://www.euoperl.com/fileadmin/downloads/Euoperl/Allgemein/Andere\\_Sprachen/Perlite\\_Info2-hr\\_2.1\\_.pdf](https://www.euoperl.com/fileadmin/downloads/Euoperl/Allgemein/Andere_Sprachen/Perlite_Info2-hr_2.1_.pdf))

### **1.5. Bioaugmentacija**

Dodavanje ciljanih ili selektiranih mikroorganizama u biotehnoške procese radi poboljšanja učinkovitosti procesa se naziva bioaugmentacija. Dodavanje mikroorganizama služi za ubrzanje brzine razgradnje zagađivača. Organizmi koji potječu sa zagađenih područja mogu služiti za razgradnju ali je većinom to spor proces. Bioaugmentacija je vrsta bioremedijacije u kojoj je potrebno proučiti autohtone vrste na lokaciji koja je zagađena. Nakon otkrivanja autohtonih bakterija koje se nalaze na tom mjestu, te ukoliko one mogu metabolizirati zagađivače, više će se autohtonih bakterijskih sojeva implementirati na mjesto za povećanje degradacije zagađivača. Bioaugmentacijom uvodimo više arheja ili bakterijskih kultura za poboljšanje razgradnje zagađivača, dok je biostimulacija dodatak prehrani autohtonim bakterijama za poticanje metabolizma. Korištenje bioaugmentacije omogućuje napredak na području mikrobiološke ekologije i biologije, imobilizacije i dizajna bioreaktora. Koristi se najčešće za komunalne otpadne vode u svrhu bioreaktora. Kulture koje se dodaju najčešće sadrže sve potrebne mikroorganizme kao što su *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *P. polymyxa*, *B. stearothermophilus*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces* itd. Smanjenje otrovnih čestica na nekom području, poboljšanje učinkovitosti i brzine razgradnje tvari samo su neke od pozitivnih rezultata korištenja bioaugmentacije.

U novijim istraživanjima obećavajuće izgledaju mikroalge u kojima se razgradnja stanične stijenke može ubrzati bioaugmentacijom. U radu Gorinšek N. (2018) provedena je

biološka obrada i bioaugmentacija s celulolitičkom termofilnom bakterijom *Clostridium thermocellum*. Bakterija je korištena za ubrzavanje hidrolize i povećanje učinkovitosti proizvodnje bioplina iz mikroalgi. Rezultati su pokazali da je bioaugmentacija s *C. thermocellum* poboljšala proizvodnju metana iz mikroalgi odnosno bioplina te da predstavlja učinkovit način za ubrzavanje razgradnje staničnih stijenki mikroalgi.

Još jedan od novijih načina dobivanja bioplina bioaugmentacijom je iz perikarpa (mesnatog dijela) bundeve. U proizvodnji bučinog ulja koriste se samo bučine sjemenke pa ostaje na poljima puno neiskorištenih organskih tvari. Perikarp bundeve se koristi za proizvodnju bioplina, ona je izgrađena od teško razgradive lignocelulozne komponente. Da bi se povećala učinkovitost proizvodnje bioplina u perikarpu inkubira se s hidrolitičkim bakterijama *Pseudobutyrvibrio xylanivorans*. Te bakterije razgrađuju lignocelulozni materijal, a zatim nastavljaju anaerobno razlaganje organske tvari u bioreaktorima pomoću mikrobne biomase. Kao rezultat se pokazalo da se takvim načinom dobivanja bioplina proizvodnja bioplina povećala za 69% (Kodra, 2016).

## **1.6. Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je bioaugmentirati reaktore za proizvodnju bioplina s ciljem povećanja njihove učinkovitosti. Prvi specifični cilj je izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke *M. giganteus* kao jedini izvor ugljika, iz aktivnog mulja. Drugi specifični cilj je izraditi biočestice u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija. Treći specifični cilj je dodavanje biočestica u reaktore za proizvodnju bioplina i praćenje produkcije bioplina.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Osnovni parametri aktivnog mulja

Aktivni mulj dopremljen je iz entralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu (CUPOVZ). CUPOVZ rješava problem zagađenja i ugroženosti podzemnih voda, odnosno očuvanje postojećih i potencijalnih vodocrpilišta u gradu Zagrebu te na području toka rijeke Save nizvodno od Zagreba. Biološko pročišćavanje otpadnih voda s pripadajućom obradom nastalog mulja u tehničko-tehnološkom pogledu predstavlja drugi stupanj pročišćavanja otpadnih voda koji se veže na mehaničku fazu pročišćavanja.

Prije samog korištenja aktivnog mulja potrebno je odrediti njegovu kvalitetu. Određuje se koncentracija suhe tvari aktivnog mulja (MLSS – mixed liquor suspended solids) i index mulja (SVI – sludge volume index). U menzuru se ulije 100 mL aktivnog mulja koji je prethodno bio aeriran. Mulj se taloži 30 minuta te se nakon toga očita razina (volumen) istaloženog mulja i vrijednost se zapiše za određivanje SVI-a. Zatim se uzorak od 100 mL aktivnog mulja pomiješa i profiltrira preko prethodno izvaganog filter papira. Filter papir s masom aktivnog mulja se stavi sušiti na 105 °C u suhi sterilizator na sat vremena. Nakon sušenja filter papir se ponovno izvaži i vrijednost se koristi za određivanje MLSS-a. Korišteni aktivni mulj označavan je kao inokulum.

*MLSS* – koncentracija suhe tvari aktivnog mulja

$$t_{1h} - \text{masa filtera poslije sušenja} = 1,226 \text{ g} = 0,001226 \text{ mg}$$

$$t_0 - \text{početna masa filtera} = 0,819 \text{ g} = 0,000819 \text{ mg}$$

$$MLSS = (t_{1h} - t_0) / \text{volumen početnog profiltriranog mulja} = 0,00407 \text{ mg L}^{-1}$$

$$SVI = \text{volumen sedimentiranog mulja u 30 min} / MLSS * 1000 = 15,233 \text{ mL g}^{-1}$$

## **2.2. Izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke *M. giganteus* iz aktivnog mulja**

### **2.2.1. Priprema medija**

Medij koji je korišten u ovom eksperimentu je MSM (eng. Mineral Salt Medium) medij koji sadrži (po 1 L destilirane vode): 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.7 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 14.0 g KHPO<sub>4</sub>, 3.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, 1.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>. Korištena je i kruta hranjiva podloga MSM, istog sastava s dodatkom agara i drvene mase (0,5 g na 100 mL).

Agar za brojanje bakterija ili hranjivi agar (eng. tryptic glucose yeast agar), sljedećeg je sastava: 2,5 g kvašičev ekstrakt, 5,0 g kazein tripton, glukoza 1,0 g, agar 20,0 g i destilirana voda 1 000 mL.

### **2.2.2. Uzgoj bakterija u tekućem mediju**

U eksperimentu je priređeno 5 bočica od 100 mL. Četiri bočice su predstavljale uzorke dok preostala je jedna bočica predstavljala kontrolu. U svakoj bočici nalazi se MSM medij i aktivni mulj (10 mL u svakom uzorku). MSM medij sadrži potrebne tvari kao što su dušik, fosfor, sumpor koji služe kao hrana za bakterije, ali ne sadrži ugljik. Zatim se u sva četiri uzorka dodaje biomasa različite veličine čestica (MXG 630, MXG 250, TV1 630 i TV1 250) po 0,2 grama, a peta bočica je kontrola bez ikakvog dodatka biomase. Biomasa *M. giganteusa* služi kao jedan jedini izvor ugljika, a ukoliko ga bakterije budu koristile moći će se razmnožavati. Napuni se MSM medijem do vrha uzorka zbog anaerobnih uvjeta te slijedi inkubacija 7 dana na sobnoj temperaturi na miješalici. Anaerobnim uvjetima bakterije pokreću fermentaciju biomase te nastaju plinovi.

### **2.2.3 Nasađivanje bakterija na hranjivu podlogu - kontrola**

Iz svih 5 bočica (dok još nije dodana drvena biomasa) uzme se 1 ml uzorka te prebaci u epruvetu s 9 mL sterilne otopine NaCl, s time da su se bočice prvotno promiješale. Naprave se decimalna razrjeđenja. Iz odgovarajućih razrjeđenja uzorak se nacijepio na hranjivi agar metodom razmaza. Ploče su prethodno naznačene s obzirom na veličinu biomase i određenog razrjeđenja. Iz svakoga razrjeđenja uzimalo se 100 mikrolitara uzorka te se nasađivalo na ploče s UBB agarom. Razmazivao se uzorak na površini skrutnutog agara pomoću trokutastog

željeznog štapića koji se prethodno namakao u 96% etanolu kako bi se sterilizirao. Isti postupak se ponovo za ostale 4 bočice s uzorcima. Namazane ploče stavljene su na inkubaciju na sobnoj temperaturi 7 dana. Nakon 7 dana narasle kolonije su prebrojane pomoću aparata za brojanje kolonija (eng. *Colony counter*) i određen je broj bakterija CFU (eng. *Colony forming unit*) metodom. CFU metodom se određuje broj kolonija formiranih po mL ili g uzorka. Sve korake je potrebno izvoditi pored Bunsenovog plamenika kako bi se izbjeglo zagađenje.

#### **2.2.4. Nasađivanje bakterija na hranjive ploče i MSM ploče s drvnom masom**

Nakon dodane drvene biomase u bočice napravila su se decimalna razrjeđenja za svaku bočicu. Iz odgovarajućih razrjeđenja uzorak se nacijepio na hranjive ploče i MSM ploče s drvnom masom metodom razmaza. Ploče su prethodno naznačene s obzirom na veličinu biomase i određenog razrjeđenja. Iz svakoga razrjeđenja uzimalo se 100 mikrolitara uzorka te nasađivalo na agare s MSM medijem i drvnom masom (svaki agar sadrži različitu veličinu drvene mase MXG 250, MXG 630, TV1 250 i TV1 630, ali jednake mase od 0,2 grama), ali i na UBB agare (1 bočica ima 5 ploča s MSM i drvnom masom i 5 ploča s hranjivim agarom). Razmazivao se uzorak na površini skrutnutog agara pomoću trokutastog željeznog štapića koji se prethodno namakao u 96% etanolu kako bi se dezinficirao. Slijedila je inkubacija 7 dana na 22 °C u inkubatoru te su zatim ponovno prebrojane pomoću aparata za brojanje kolonija i određen je broj bakterija CFU metodom. CFU metodom se određuje broj kolonija formiranih po mL ili g uzorka. Sve korake je potrebno izvoditi pored Bunsenovog plamenika kako bi se izbjeglo zagađenje.

#### **2.2.5. Mikroskopski preparati**

Radili su se mikroskopski preparati za 4 kulture: MXG 630, MXG 250, TV1 630 i TV1 250. Uzelo se predmetno stakalce, na njemu se olovkom označilo koja je kultura npr. MXG 630 te se pincetom uzelo predmetno stakalce i prošlo kroz plamen 4 - 5 puta. Prolaskom kroz plamen steriliziramo predmetno stakalce te ga pustimo da se ohladni na par sekundi. Zatim uzmemo bakteriološku ušicu (ezu), steriliziramo i stavimo 3 - 4 kapi vodovodne vode na predmetno stakalce. Ponovno steriliziramo ezu te uzmemo ploču MXG 630 s kolonijama bakterija i ohladimo ezu na dijelu gdje nema bakterija. Ezom zgrabimo dio gdje ima najviše bakterija te razmutimo u kapljicama vode na predmetnom stakalcu i razmažemo. Eza se zatim

sterilizira te predmetno stakalce pustimo sušiti na zraku. Postupak ponovimo za sve kulture. Kada su se osušili preparati, sa svakim preparatom prelazimo preko plamena 4 - 5 puta kako bismo ih fiksirali. Nakon fiksacije slijedi bojanje po Gramu. Bojanjem po gramu razlikujemo dvije velike skupine bakterija (Gram-pozitivne bakterije i Gram-negativne bakterije) koje se razlikuju u kemijskim i fizikalnim svojstvima njihove stanične stijenke. Postupak bojanja po Gramu izvodi se na sljedeći način: 1. 1 - 2 min prelijevati s kristal Violet, 2. 1 - 2 min prelijevati Lugolovom otopinom, 3. isprati s 96% etanolom, 4. isprati s vodom, 5. prelitati safraninom te pričekati 2 min, 6. isprati vodom.

Nakon što su se bakterije obojile, preparati su promatrani na mikroskopu (Olympus CX21, Japan). Gledani su pod povećanjem od 1000 puta koristeći imerzijsko ulje. Mikroskopske slike fotografirale su se pomoću mobitela (mobilni uređaj Huawei P30 Lite, 2019, 40 MP (širokokutni objektiv, otvor blende f/1.8) + 16 MP (ultra širokokutni objektiv, otvor blende f/2.2) + 8 MP (telefoto, f/2.4 otvor blende, OIS)).

## **2.3. Izrada biočestica u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija**

### **2.3.1. Priprema medija**

U ovom djelu eksperimenta korišten je tekući Luria-Bertani (LB) hranjivi medij koji se sastoji od 10 g triptona, 5 g kvašćevog ekstrakta i 5g natrijeva klorida u 1 L destilirane vode. Napravljeno je 8 bočica po 100 mL LB medija i 8 plastičnih epruveta od 50 ml LB medija koji je razrijeđen 10 puta (LB/10). Zatim je korištena i kruta LB hranjiva podloga istog sastava, ali s dodatkom 0,2 % agara.

### **2.3.2 Suspenzija bakterija**

#### **2.3.2.1. Suspenzija bakterija - 4K**

Suspenzija 4K je bila mješavina 4 različita izolata prethodno uzeta s krutih MSM medija. U ovom slučaju, pomiješane su 4 čiste kulture bakterija. Bakterijska suspenzija 4K napravljena je tako što je steriliziranom ezom uzeta bakterijska masa TV1 630 te se uroni u steriliziranu plastičnu epruvetu (tip Falcon, 15 mL), u koju je prethodno stavljeno 9 mL sterilne vode. Postupak se ponovi još tri puta prilikom uzimanja bakterijskih masa TV1 250, MXG 630 i MXG 250 gdje se pritom sve stavlja u istu plastičnu epruvetu. Ezu treba svaki puta sterilizirati prilikom uzimanja različitih bakterijskih masa. Nadalje, plastična epruveta se zatvori čepom i

bakterijska suspenzija se vorteksira (Vortex technoKartellTK 3S, Italija) dok suspenzija ne postane homogena.

### **2.3.2.2. Suspenzija bakterija – K (totalni)**

Bakterijska suspenzija (K) napravljena je na način da sadrži mješavinu ukupne biomase porasle na MSM pločama iz prethodnog dijela pokusa. Postupak pripremljanja suspenzije K izvodi se na isti način kao i pripremljanje konzorcija 4K osim što sadrži sve izolirane bakterije iz svih nasadenih MSM podloga.

### **2.3.3. Biočestice**

#### **2.3.3.1. Uzgoj bakterija u tekućem mediju na zrcima perlita – 4K**

Perlit je korišten kao nosač bakterija. Prije samog početka eksperimenta perlit je izvagan (četiri Petrijeve zdjelice s odvagom 1 g perlita i četiri zdjelice s odvagom 0,5 g perlita), ispran demineraliziranom vodom, osušen na 105 °C tijekom jednog sata i steriliziran autoklaviranjem na 121 °C 15 minuta.

Koristile su se plastične epruvete od 50 mL i bočice od 100 mL. Postavljene su četiri bočica od 100 mL od kojih su dvije sadržavale LB medij, a druge dvije sadržavale deset puta razrijeđeni LB medij (LB/10). Ponavljajuće bočice predstavljale su replike. U svaku bočicu osim medija dodan je 1 mL suspenzija bakterija 4K i 1 g perlita. Na svakoj bočici su napisane određene oznake tvari koje su sadržane unutar bočica. Napravljeni su startni brojevi bakterija iz jedne bočice s LB medijem i jedne bočice LB/10 medijem. Određen je početni broj bakterija metodom CFU kako je prethodno opisano. Nakon uzimanja uzorka suspenzije 4K za startnu kontrolu, bočice su se stavile aerirati. Svaka bočica je bila prekrivena prozirnom folijom i zategnuta (zalijepljena) selotejpom. Kroz prozirnju foliju ubacila se serološka pipeta koja se povezala s uređajem za aeraciju. Sve bočice su stavljene na stalak da ih drži na mjestu (slika 4).

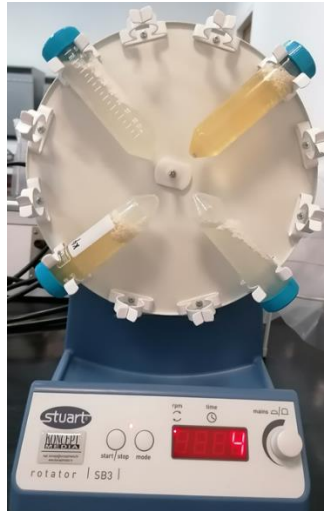


**Slika 4.** Dvije bočice od 100 mL sa suspenzijom 4K, perlitom i LB medijem (žuta tekućina) te dvije bočice od 100 mL sa suspenzijom 4K, perlitom i LB/10 medijem (prozirna tekućina) stavljene na aeraciju 24 h te pričvršćene za podlogu.

Nakon 24 sata suspenzija iz bočice (npr. s LB medijem replika) se iscijedila, pritom da se pazilo da perlit ostane u bočici. Ostali perlit u bočici se ispirao sterilnom vodom 2 puta te se prebacio u epruvetu od 15 mL (tip Falcon). Prebacivanje perlita se radilo žličicom koju se svaki puta steriliziralo na Busenovom plameniku. U epruvetu se dodalo 9 mL sterilne otopine te su se radila određena decimalna razrjeđenja. Prije razrjeđivanja epruvete su 3 min miješane na mehaničkoj miješalici (vortex) na najvećoj brzini (50 Hz). Prilikom miješanja bakterijske stanice se odvoje od čestica perlita i ostanu u supernatantu. Iz odgovarajućih razrjeđenja uzorak se nacijepio na LB ploče. Ploče su prethodno naznačene s obzirom na masu perlita, korišteni medij i određeno razrjeđenje. Postupak se ponovio za ostale tri bočice. Slijedila je inkubacija 2 dana na sobnoj temperaturi u inkubatoru te su zatim ponovno prebrojane pomoću aparata za brojanje kolonija i određen je broj bakterija CFU metodom. Perlit je bio dodan u epruvetu, prebačen je u Petrijevu zdjelicu gdje je stavljen na sterilizaciju na 105 °C na sat vremena te se ponovno vagao kako bismo dobili konačnu masu perlita koja je korištena tijekom eksperimenta. Perlit se vagao za svaku bočicu. Broj bakterija je izražen kao CFU/g perlita.

Postavljene su i četiri plastične epruvete od 50 mL od čega su dvije sadržavale LB medij u dvije epruvete, a druge dvije su sadržavale LB/10 medij. Ponavljajuće plastične epruvete predstavljale su replike. U svaku bočicu osim medija dodano je 450 mikrolitara suspenzije bakterija 4K i 0,5 g perlita. Na svakoj plastičnoj epruveti su napisane određene oznake tvari koje su sadržane unutar bočica. Napravljeni su startni brojevi bakterija iz jedne plastične epruvete s LB medijem i jedne plastične epruvete s LB/10 medijem. Određen je broj bakterija

CFU metodom. Nakon uzimanja uzorka suspenzije 4K za startnu kontrolu, plastične epruvete su se stavile rotaciju (Stuart rotator SB3, konceptmedia) po četiri okreta u minuti (slika 5).



**Slika 5.** Dvije plastične epruvete od 50 mL sa suspenzijom 4K, perlitom i LB medijem stavljene na rotaciju (Stuart rotator SB3, konceptmedia) po četiri okreta u minuti (žute epruvete). Dvije plastične epruvete od 50 mL sa suspenzijom 4K, perlitom i LB/10 medijem stavljene na rotaciju (Stuart rotator SB3, konceptmedia ) po četiri okreta u minuti (bijele epruvete).

Nakon 24 sata isti postupak se proveo kao što je prethodno opisan za ispiranje perlita te je zatim isto određen broj kolonija CFU metodom. Perlit je prebačen u Petrijevu zdjelicu gdje je stavljen na sterilizaciju na 105 °C na sat vremena te se ponovno vagao kako bismo dobili konačnu masu perlita koja je korištena tijekom eksperimenta. Perlit se vagao za svaku epruvetu.

#### **2.3.3.2. Uzgoj bakterija u tekućem mediju na zrcima perlita – K**

Isti postupak je korišten kao za suspenziju bakterija 4K samo što se koristila suspenzija K (totalni konzorcij).

#### **2.3.4. Mikroskopski preparati biočestica**

Nakon jednog dana od stavljanja bočica od 100 mL na aeraciju i plastičnih epruveta od 50 mL, napravljeni su mikroskopski preparati biočestica 4K i K. Prije samog nasađivanja na krute podloge za brojanje kolonija bakterija uzeti su uzorci iz glavnih bočica i plastičnih epruveta, a ne replika. Uzorci su stavljeni pomoću sterilne plastične pipete na predmetno stakalce. Predmetno stakalce se prethodno provukli kroz plamen Bunsenovog plamenika kako

bi se uklonile masne naslage nastale na samom stakalcu. Prebačeni su u suhi sterilizator na 105 °C te zatim fiksirani prelaskom preko plamena 4 - 5 puta. Na fiksirane preparate prelila se Karbol fuksin boja (držati 1 min) koja boji stanice te se ispralo vodom. Preparati su promatrani na mikroskopu (Olympus CX21, Japan). Gledani su pod povećanjem od 1000 puta koristeći imerzijsko ulje. Mikroskopske slike fotografirale su se pomoću mobitela (mobilni uređaj Huawei P30 Lite, 2019, 40 MP (širokokutni objektiv, otvor blende f/1.8) + 16 MP (ultra širokokutni objektiv, otvor blende f/2.2) + 8 MP (telefoto, f/2.4 otvor blende, OIS)).

#### 2.4. Dodavanje biočestica u reaktore za proizvodnju bioplina i praćenje produkcije bioplina

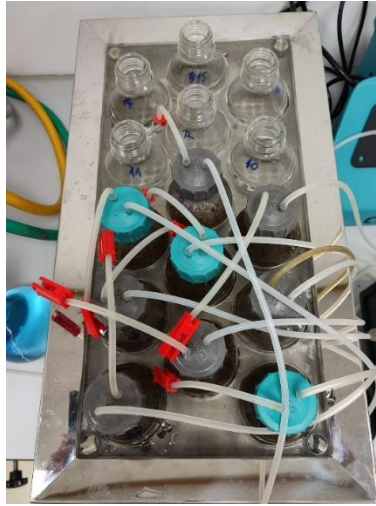
Napravljeno je 9 bioreaktora, s time da se inokulum prethodno držao u kupelji na 28 °C.

**Tablica 2. Bioreaktori s njihovim sastavom**

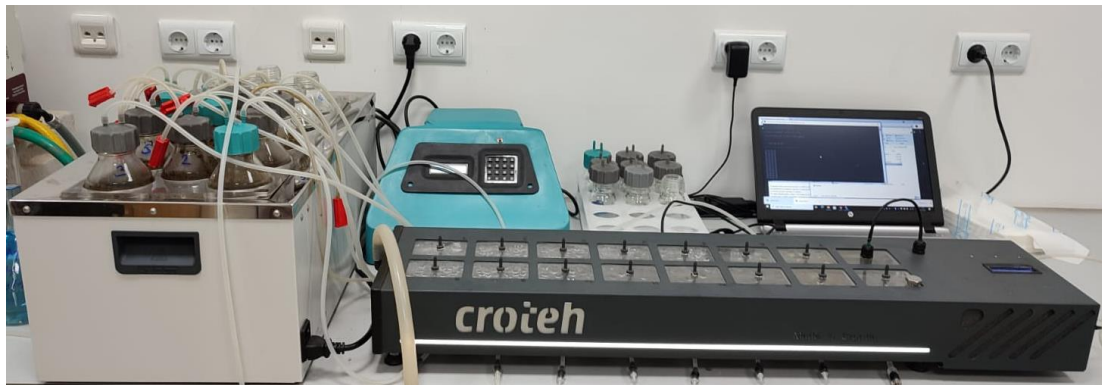
NAZIV BIOREAKTORA	SASTAV
<b>INOKULUM</b>	samo inokulum odnosno 400 mL aktivnog mulja
<b>IM</b>	400 mL inokuluma i 4,00 g <i>M. x giganteusa</i> te služi za kontrolu
<b>IM'</b>	400 mL inokuluma i 4,00 g <i>M. x giganteusa</i> te služi za kontrolu
<b>BIM</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 g biočestica (bakterije vezane na perlit)
<b>BIM'</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 g biočestica (bakterije vezane na perlit)
<b>SIM</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 mL suspenzije bakterija
<b>SIM'</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 mL suspenzije bakterija
<b>PIM</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 g perlita
<b>PIM'</b>	400 mL inokuluma, 4,0 g <i>M. x giganteusa</i> i 4,0 g perlita

Napravljeni bioreaktori zatvaraju se s plastičnim čepom koji sadrži gumu te se stavljaju se u kupku na 39 °C i spajaju se na brojač (slika 7).





**Slika 6.** Devet bioreaktora (smeđa boja zbog inokuluma) i šest boca s vodom za stabilizaciju sustava u kupki.



**Slika 7.** Bioreaktori u kupki na 39 °C spojeni na brojač.

### **3. REZULTATI**

#### **3.1. Osnovni parametri aktivnog mulja**

SVI predstavlja indeks mulja. SVI dobrog mulja je između 50 - 75 mL g<sup>-1</sup>. Kao što je izračunato SVI aktivnog mulja kojega smo koristili iznosi 15,233 mL g<sup>-1</sup> što znači da je dobra kvaliteta mulja odnosno što je SVI niži jer dobro sliježe te na taj način pogoduje razdvajanju vode od mulja u sekundarnim taložnicima.

#### **3.2. Izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke *M. giganteus* iz aktivnog mulja**

##### **3.2.1. Sustavi nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi**

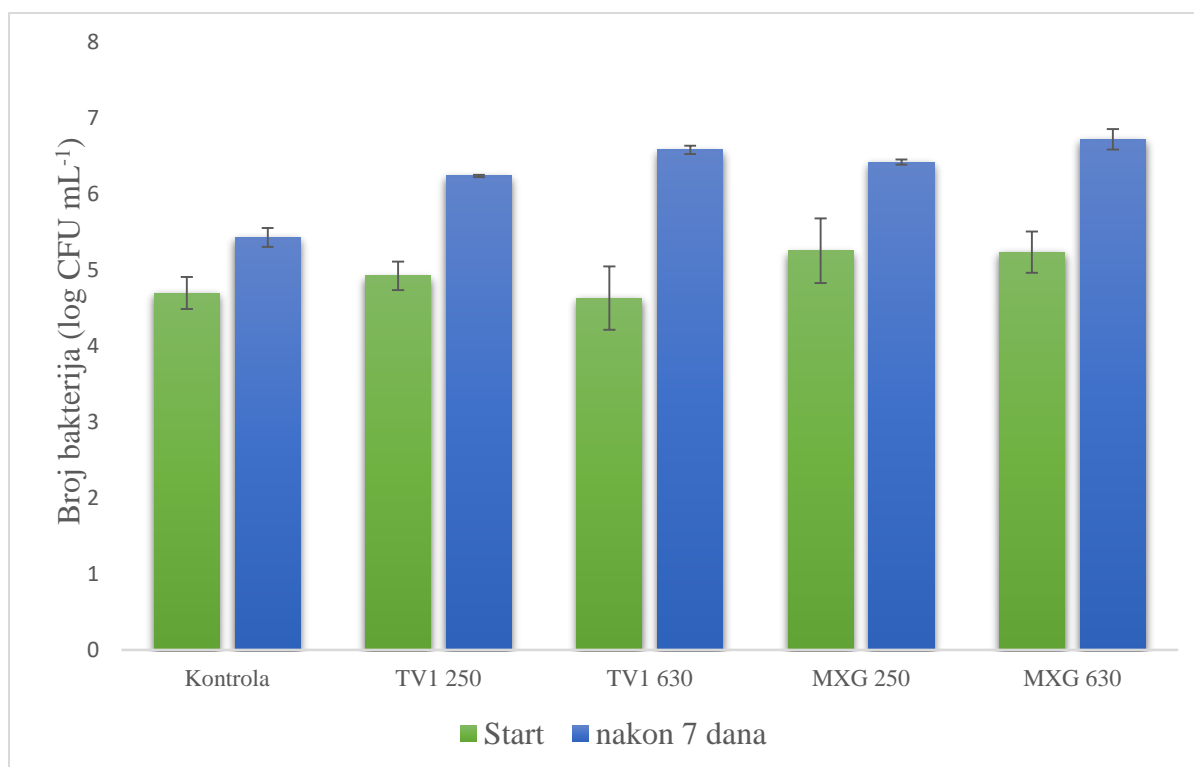
Sustavi predstavljaju bočice u kojima se nalazi se MSM medij i aktivni mulj (10 mL u svakom uzorku). Zatim se u četiri uzorka dodaje biomasa različite veličine čestica (MXG 630, MXG 250, TV1 630 i TV1 250) po 0,2 grama, a prva bočica je kontrola bez ikakvog dodatka biomase. Nakon inkubacije od 7 dana na sobnoj temperaturi vidljivo je da se odvijala reakcija. U svakoj bočici, osim bočice koja predstavlja kontrolu, vidljiv je zrak odnosno smjesa plinova između čepa bočice i samog sustava u bočicama. Mali udio smjese plinova ima sustav MXG 630 dok sustavi TV1 250 i TV1 630 imaju ponešto veći udio smjese plinova u bočicama.



**Slika 8.** Bočice sa sustavima u kojima se nalazi MSM medij i aktivni mulj (10 mL u svakom uzorku). Zatim se u četiri uzorka dodaje biomasa različite veličine čestica (MXG 630, MXG 250, TV1 630 i TV1 250) po 0,2 grama, a prva bočica je kontrola bez ikakvog dodatka biomase. Rezultat bočica nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi.

### **3.2.2. Broj bakterija na hranjivom mediju na početku samog eksperimenta i nakon inkubacije 7 dana na 22 °C.**

Broj bakterija na hranjivom mediju jasno se može očitati i vidjeti iz slike 9 da je startni broj bakterija manji od broja bakterija nakon 7 dana.

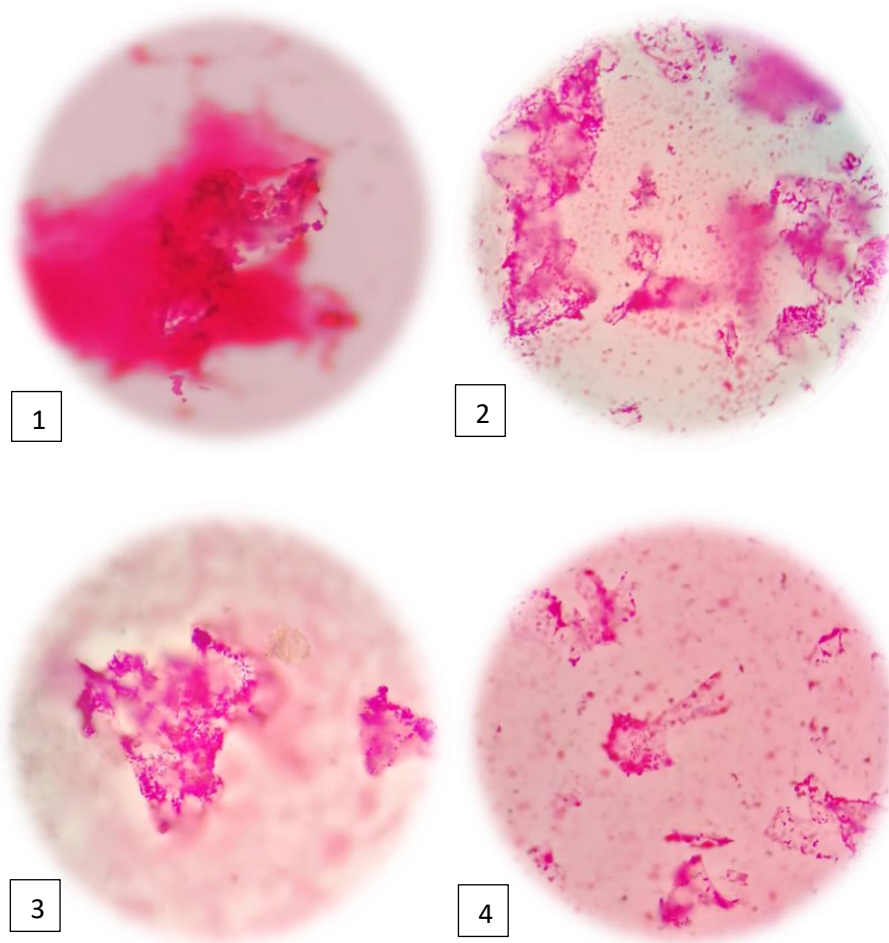


**Slika 9.** Prikazuje uzgoj bakterija u MSM mediju *M. giganteusa* i aktivnog mulja. Zeleni stupci označavaju startni broj kolonija aktivnog mulja u hranjivom mediju. Plavi stupci označavaju broj bakterija u MSM mediju nakon 7 dana inkubacije na sobnoj temperaturi. Kontrola, TV1 250, TV1 630, MXG 250, MXG 630 predstavljaju eksperimentalne sustave s različitim tipovima biomase miskantusa.

### 3.3. Izrada biočestica u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija

#### 3.3.1 Imobilizacija bakterija na perlit – konzorcij 4K

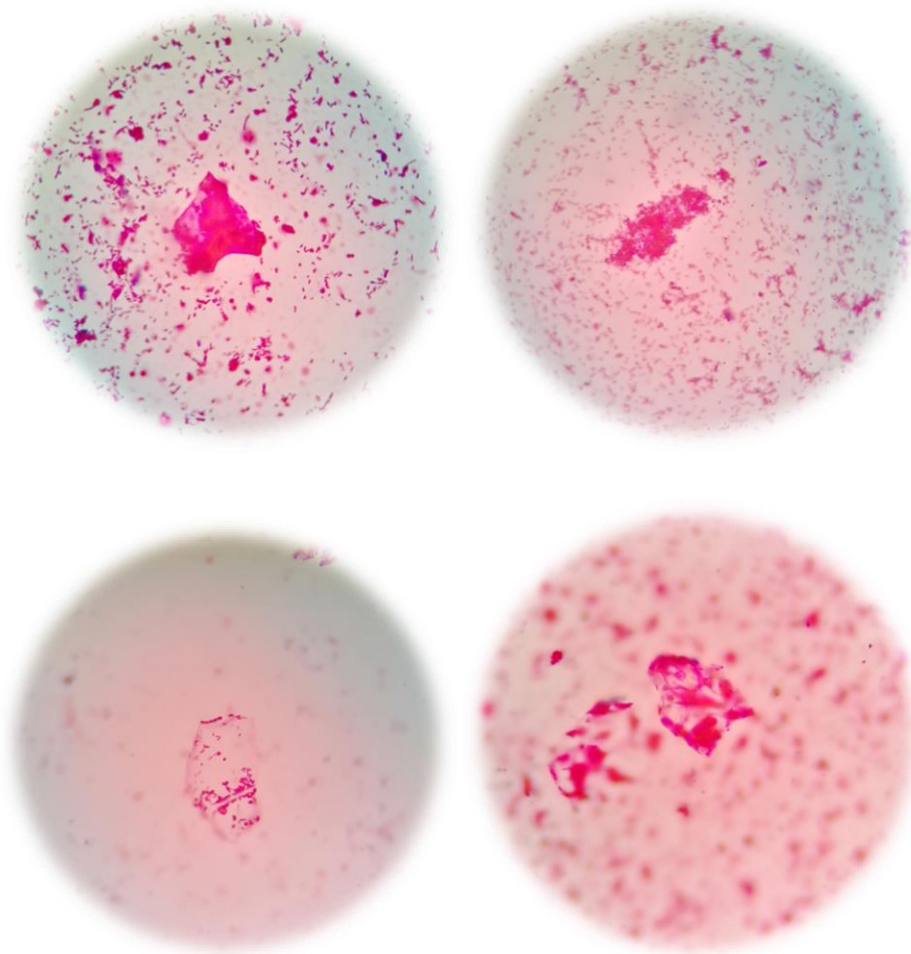
U ovim uzorcima bakterije su površinski vezane na čestice perlita u velikim nakupinama te se koncentriraju sve gušće u blizini čestica perlita. Sustavi koji su se aerirali sadržavali su naizgled veću koncentraciju bakterija vezanih na čestice perlita u odnosu na sustave koje su se rotirali (slika 10). Treba naglasiti da je vizualni pregled preparata samo kvalitativno mjerenje te su bitni pokazatelji dobiveni određivanjem brojnosti bakterija imobiliziranih na perlit.



**Slika 10.** Biočestice – imobilizirane bakterije na perlitu. 1 – 4K na aeraciji s LB medijem, 2 - 4K na rotaciji s LB medijem, 3 - 4K na aeraciji s LB/10 medijem, 4 - 4K na rotaciji s LB/10 medijem. Povećanje 1000 x na svjetlosnom mikroskopu.

### 3.3.2. Imobilizacija bakterija na perlit – konzorcij K

U ovim uzorcima bakterije su površinski vezane na čestice perlita u velikim nakupinama te se koncentriraju sve gušće u blizini čestica perlita. Isto kao i kod konzorcija 4K sustavi koji su se aerirali sadržavali su veću koncentraciju bakterija vezanih na čestice perlita u odnosu na sustave koje su se rotirali (slika 11).



**Slika 11.** Biočestice – imobilizirane bakterije na perlitu. 1 – K na rotaciji s LB medijem, 2 - K na aeraciji s LB medijem , 3 - K na aeraciji s LB/10 medijem, 4 - K na rotaciji s LB/10 medijem. Povećanje 1000 x na svjetlosnom mikroskopu.

### 3.3.3. Broj imobiliziranih bakterija na perlitu

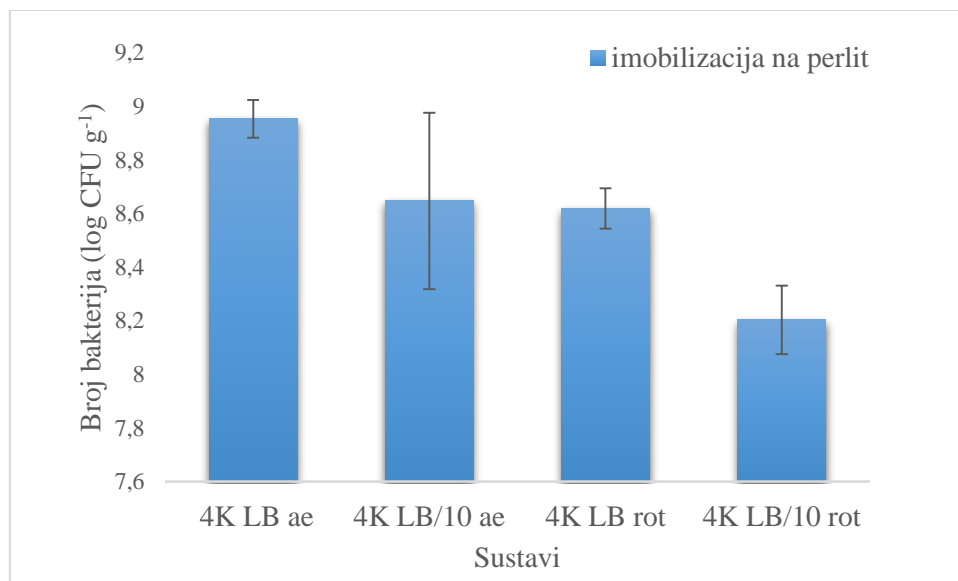
Imobilizirani broj bakterija na perlitu razlikuje se između konzorcija. Iz grafičkih prikaza (slika 12 i slika 13) vidljivo je da imobilizirani broj konzorcija K veći od konzorcija 4K. Broj imobiliziranih bakterija 4K u LB mediju s aeracijom bio je statistički značajno veći od reaktora 4K u LB mediju s rotacijom ( $p = 0,00031$ ). Broj imobiliziranih bakterija 4K u LB mediju s aeracijom bio je značajno veći od broja bakterija 4K u LB/10 mediju s rotacijom ( $p = 0,0001$ ). Broj imobiliziranih bakterija 4K u LB/10 mediju s aeracijom bio je značajno veći od broja bakterija 4K u LB/10 mediju s rotacijom ( $p = 0,0338$ ). Broj imobiliziranih bakterija 4K u LB mediju s rotacijom bio je značajno veći od broja bakterija 4K u LB/10 mediju s rotacijom ( $p = 0,00136$ ). Broj imobiliziranih bakterija K u LB mediju s aeracijom bio je značajno veći od

broja bakterija K u LB mediju s rotacijom ( $p = 0,00133$ ). Broj imobiliziranih bakterija K u LB mediju s aeracijom bio je značajno veći od broja bakterija K u LB/10 mediju s rotacijom ( $p = 0,0004$ ). Broj imobiliziranih bakterija 4K u LB mediju s aeracijom je bio značajno manji od reaktora K u LB mediju s aeracijom ( $p$ -vrijednost = 0,001).

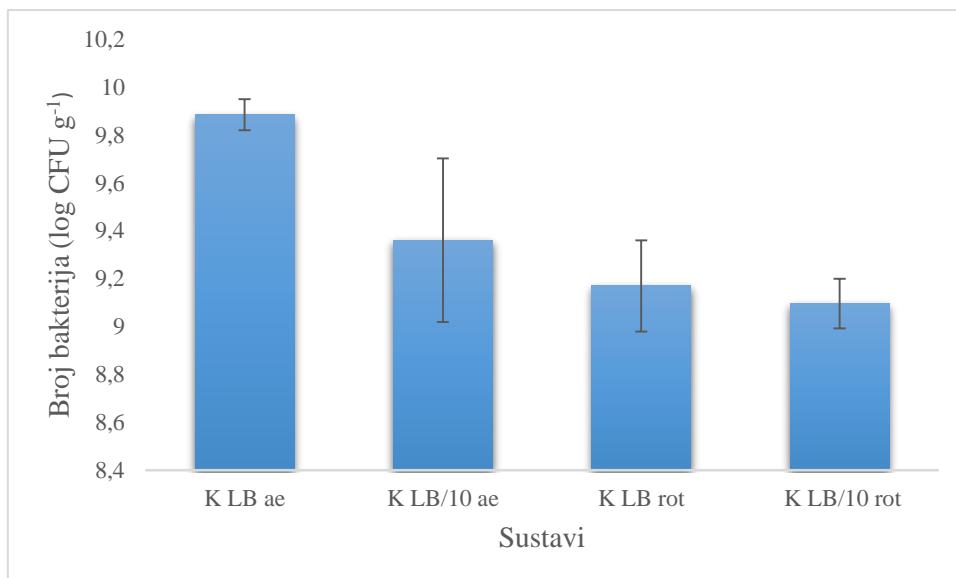
Rezultati su prikazali da u oba slučaja i kod konzorcija K i 4K više imobiliziranih bakterija imamo u sustavima koji su aerirani, dok u sustavima koji su bili samo na rotaciji bez aeriranja imamo manji broj imobiliziranih bakterija.

Iz grafova je vidljivo da bakterijama pogoduje aeracija što je ukazalo na veći broj razmnoženih bakterija u odnosu na sustave s rotacijom.

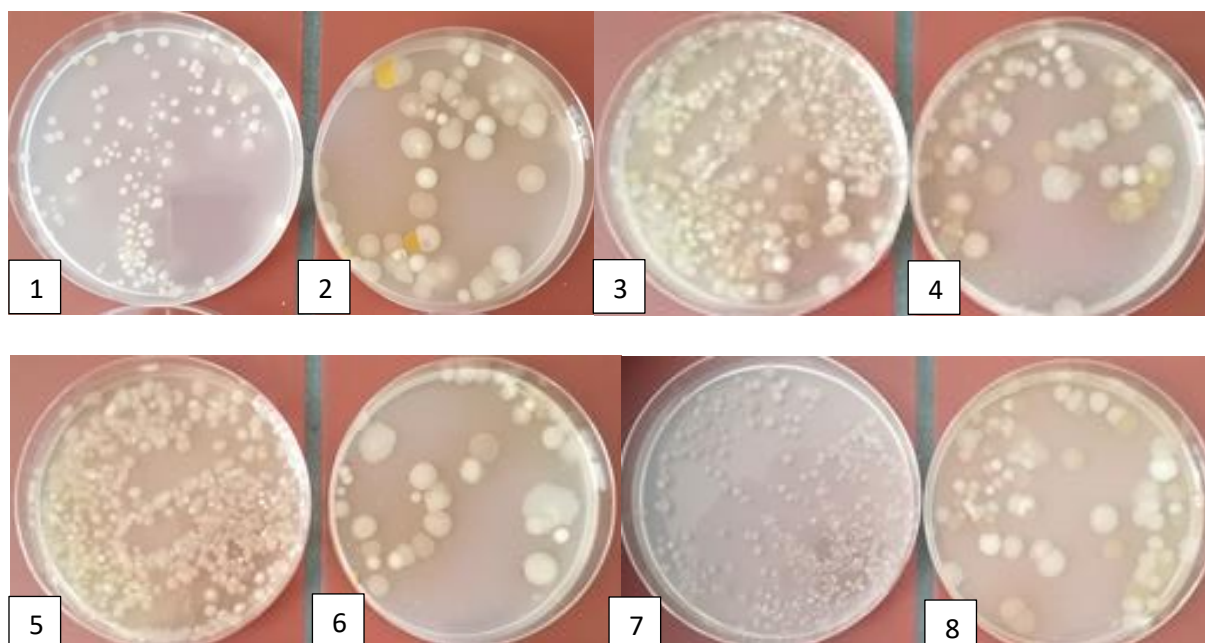
Slika 14 prikazuje vizualnu usporedbu imobiliziranih bakterija na konzorciju K pri razrjeđenju  $10^{-7}$  u različitim sustavima (ploče s hranjivim agarom s poraslim bakterijskom kolonijama nakon inkubacije).



**Slika 12.** Imobilizacija CFU konzorcija 4K. **Ae** označava aeraciju sustava, a **rot** označava rotaciju sustava. Prikazane su srednje vrijednosti od dvaju mjerenja te standardne devijacije.



**Slika 13.** Imobilizacija CFU konzorcija K. **Ae** označava aeraciju sustava, a **rot** označava rotaciju sustava. Prikazane su srednje vrijednosti od dvaju mjerenja te standardne devijacije.



**Slika 14.** Usporedba imobiliziranih bakterija na konzorciju K pri razrjeđenju  $10^7$ . 1 – K na aeraciji s LB/10 medijem, 2 - K na rotaciji s LB/10 medijem, 3 - K na aeraciji s LB/10 medijem (replika) 4 - K na rotaciji s LB medijem, 5 - K na aeraciji s LB medijem , 6 - K na rotaciji s LB/10 medijem (replika), 7 - K na aeraciji s LB medijem (replika) i 8 - K na rotaciji s LB medijem (replika).



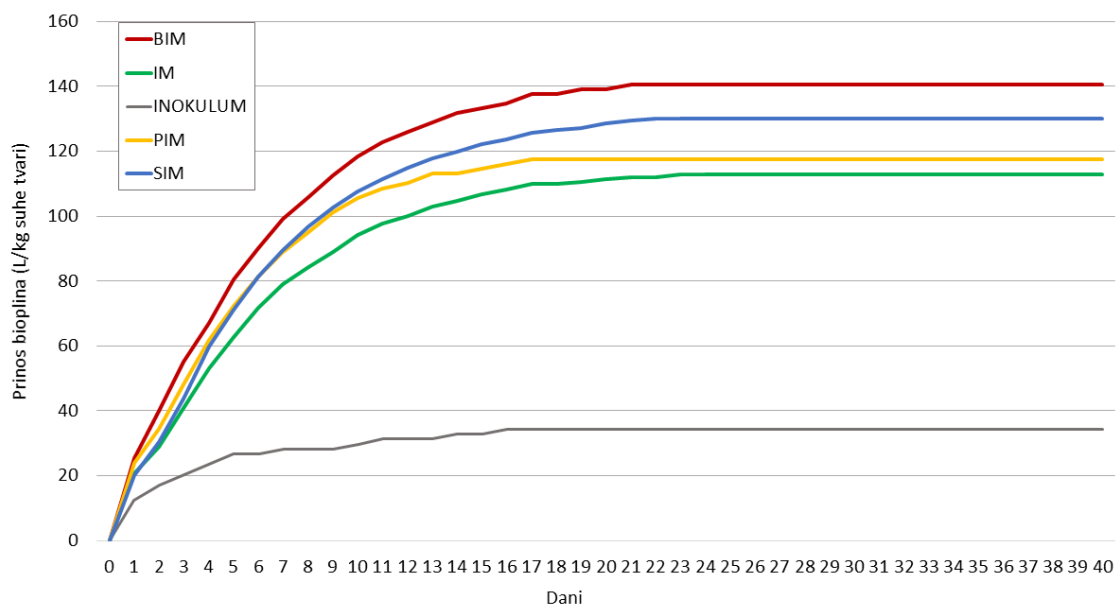
### 3.4. Proizvodnja bioplina u bioreaktorima

Slika 15 grafički prikazuje rezultate bioreaktora koji su se pratili 40 dana, pratio se prinos bioplina u pojedinim bioreaktorima. Rezultati prikazuju da su najveći prinos bioplina imali bioreaktori koji sadržavaju biočestice (BIM).

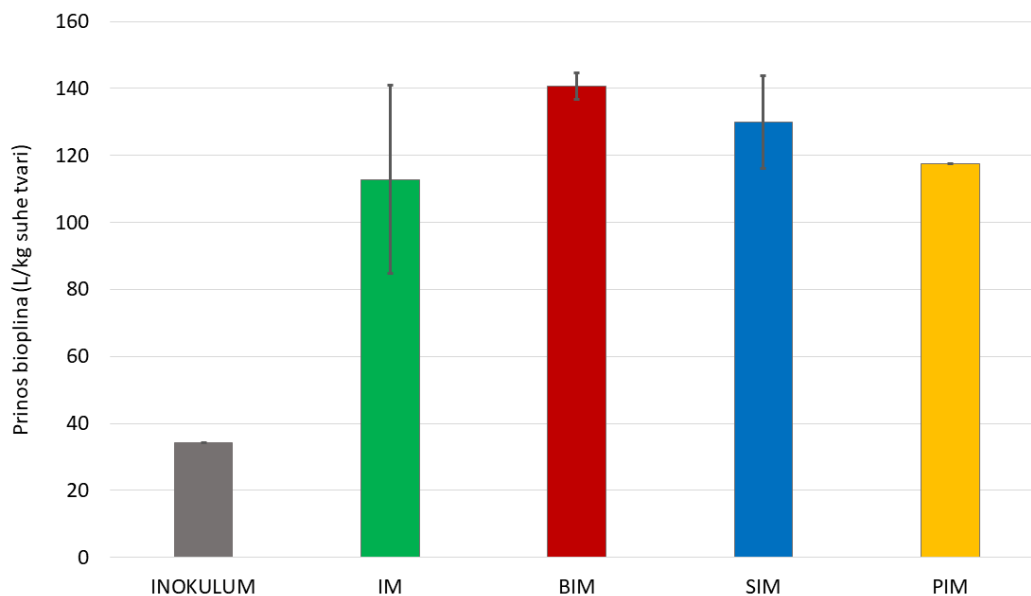
Tijekom eksperimenta došlo je do pucanja čepova kojima su bili zatvoreni bioreaktori i koji moraju biti hermetički zatvoreni pa je bioplin curio izvan čepova te se nije mogao izmjeriti. Tako nemamo mjerenja za bioreaktore u kojima je bio samo inokulum (INOKULUM) i perlit (BIM) te nismo mogli statistički usporediti.

Statistički gledano nema značajne razlike u bioreaktorima BIM, PIM, SIM i IM ( $p > 0.05$ ). Ono što možemo vidjeti iz slike 16 je da u bioreaktoru IM i bioreaktoru SIM imamo velika odstupanja što može značiti da smo u dva ponavljanja imali različite vrijednosti prinosa plina te ukazuje na moguću nestabilnost samog sustava za proizvodnju bioplina. Za razliku od bioreaktora BIM gdje imamo malo odstupanje jer su obje replike bioreaktora na kraju vrlo slične vrijednosti prinosa bioplina. Različite vrijednost na slici 16 prikazane su kao velike devijacije.

Nadalje, na temelju ovih rezultata vidljivo je da biočestice ne pomažu znatnije u proizvodnji bioplina. Predlaže se daljnje i opširnije istraživanje s više replika te različitim koncentracijama biočesticama, da bi se vidjelo može li se povećati prinos bioplina u nekoj drugoj konfiguraciji, ili možda da se poveća stabilnost različitih bioreaktora.



**Slika 15.** Praćenje kumulativnog prinosa bioplina tijekom 40 dana. Prikazana je srednja vrijednost dvaju mjerenja.



**Slika 16.** Kumulativni prinos bioplina u pojedinim bioreaktorima nakon 40 dana pokusa. Prikazana je srednja vrijednost dvaju mjerenja te standardna devijacija.

#### 4. RASPRAVA

Cilj ovog eksperimentalnog rada je bio bioaugmentirati reaktore za proizvodnju bioplina s ciljem povećanja njihove učinkovitosti. Za postizanje ovog cilja trebali smo postaviti podciljeve kako bismo do toga došli. Prvi specifični podcilj je bio izolacija bakterija koje su sposobne koristiti biomasu biljke *M. giganteus* kao jedini izvor ugljika, iz aktivnog mulja. Aktivni mulj je mulj koji je podvrgnut djelovanju zraka i podvrgnut djelovanju bakterija. Miloža i Janton (2017) naglasili su da su bakterije najzastupljenije u aktivnom mulju te da se hrane biorazgradivim tvarima, tj. otopljenim organskim sastojcima iz otpadne vode, većinom proteinima, ugljikohidratima, mastima. Ukoliko ima dovoljno hranjivih tvari, bakterije ih koriste za rast i energiju. U rezultatima se pokazalo da su bakterije već nakon 7 dana proizvele plinove što se može vidjeti na slici 7. Bočice sa sustavima u kojima se nalazi MSM medij i aktivni mulj te je dodana biomasa različitih veličine čestica (MXG 630, MXG 250, TV1 630 i TV1 250) sadrže dio smjese plinova unutar bočica. Iz toga se može zaključiti da su bakterije iz aktivnog mulja koristile biomasu *M. giganteusa* kao jedinog izvora ugljika. One su zapravo anaerobnom digestijom iz biomase *M. giganteus* proizvodile bioplin. Na mikroskopskim preparatima utvrđeno je da kulture bakterija sadrže različite vrste bakterija koje su koristile biomasu kako bi preživjele. Zapravo smo dobili kulture bakterije koje su sposobne koristiti biomasu kao jedini izvor ugljika. Izolacijom tih bakterija napravili smo konzorcije (4K i K) gdje smo ih stavljali u sustave s perlitom.

Drugi specifični cilj je izraditi biočestice u kojima će perlit poslužiti kao nosač prethodno izoliranih bakterija. Polović (2016) je utvrdio da bakterije na nosačima povećavaju učinkovitost bioreaktora zbog povećanog broja varijabilnih stanica i pojačanog metabolizma u odnosu na reaktore s nevezanim bakterijama. Nosači bakterija mogu sadržavati jednu kulturu bakterija ili više kultura bakterija s različitim metaboličkim sposobnostima. Prednost korištenja konzorcija s različitim kulturama bakterija je da otrovan međuprodukt koji stvara jedna kultura može razgraditi druge kulture u konzorciju (Garbisu i sur., 2017). Kulture bakterija koje se koriste za bioaugmentaciju ovise o njihovom kataboličkom potencijalu, ali i o njihovoj sposobnosti preživljavanja u određenim uvjetima (Michalska i sur., 2020). Na temelju rezultata ovog rada se može i vidjeti da su bakterije koje su preživjele one koje su koristile biomasu miskantusa te smo mikroskopiranjem vidjeli da su u različitim sustavima sadržane bakterije različitih oblika i veličina. Različiti oblici i veličine bakterije ukazuju da je na perlit vezano više kultura bakterija. Utvrdili smo i kakav je konzorcij bolji je za imobilizaciju na perlit. Između konzorcija 4K i K na temelju njihovih vrijednosti bolja opcija se pokazala konzorcij K.

Konzorcij K sadrži sve kulture bakterija te kao rezultat tome imamo veći broj imobiliziranih bakterija kao što je to opisali Garbisu i sur. (2017).

Dobar nosač za imobilizaciju trebao bi biti netopiv, netoksičan, lako dostupan, jeftin, stabilan i prikladan za regeneraciju te ukoliko se koriste u bioaugmentaciji, trebali bi biti lako biorazgradivi. U procesima pročišćavanja otpadnih voda nosač bi trebao imati visoku mehaničku otpornost jer može biti izložen različitim vrstama fizičkih sila. Nosači su klasificirani kao organski i anorganski ili prirodni ili sintetički. Prirodni organski nosači imaju mnogo funkcionalnih skupina koje stabiliziraju biokatalizatore. U organske nosače spadaju: alginat, K-karagenan, hitozan, piljevina, slama, drveni ugljen, biljna vlakna, kukuruzno zrno, riža, ljuske sjemenki suncokreta, dijamin i micelij. Prirodni organski nosači su hidrofilni, biorazgradivi, biokompatibilni i jeftini jer su uglavnom otpad iz prehrambene industrije. Međutim, mogućnost njihove primjene u procesu bioremedijacije je ograničena jer su niske otpornosti na biorazgradnju, osjetljivosti na organska otapala i stabilnosti u uskom rasponu pH vrijednosti. Sintetički organski nosači imaju brojne funkcionalne skupine s raznolikim obilježjima te ovdje spadaju: polipropilen, polivinil klorid, polistiren, poliuretanska pjena, poliakrilonitril i polivinil alkohol. Tijekom njihove sinteze može doći do poroznosti, promjera pora, polariteta i hidrofobnosti nosača. Anorganski nosači (prirodni i sintetički) imaju visoku kemijsku, fizičku i biološku otpornost. U anorganske nosače spadaju magnetit, vulkanske stijene, vermikulit, porozno staklo, materijali na bazi silicija, keramika i nanočestice. Njihov nedostatak je mali broj funkcionalnih skupina te zbog toga koriste u stvaranju hibrida, kombinirajući prirodne polimere i sintetičke nanočestice. Veća učinkovitost biorazgradnje uočena je nakon uporabe imobiliziranih mikroorganizama u odnosu na slobodne. Promjene u mikrokruženju nakon imobilizacije mogu dovesti do promjena u morfologiji stanica, fiziologiji i metaboličkoj aktivnosti. Dzionek i suradnici (2016) u svom istraživanju navode zanimanje za organske nosače, no ne isključuju dobar materijal za imobilizaciju tezontle i ekspanzirani perlit zbog dobrog apsorpcijskog svojstva i visoke mehaničke otpornosti. Jesu li nam osnovna svojstva i vrste nosača dovoljna informacija da možemo zaključiti zašto smo koristili perlit kao nosač u eksperimentu. On spada u anorganske prirodne nosače, odnosno on je mineral koji bakterije ne mogu razgraditi što je ključno u eksperimentu jer ukoliko dođe do razgradnje više nemamo nosača. On je prirodni nosač te to uvelike pomaže pri njegovom odlaganju jer, primjerice, sintetičke nosače trebamo odložiti da ne zagađuju okoliš. Nakon eksperimenta ga možemo odložiti u prirodu jer se on inače koristi u agronomiji kao dodatak za bolji i povoljniji odnos zraka i vode pri ukorjenjivanju biljaka. Ukoliko ga bacamo u okoliš, ne

zagađujemo prirodu već prirodi pomažemo. Za razliku od drugih nosača njega je lako nabaviti te je jeftin materijal, što dodatno pojednostavljuje eksperiment zahvaljujući njegovoj troškovnoj učinkovitosti.

Kowalska i suradnici (2017) su proveli istraživanje gdje je svrha bila procijeniti utjecaj parametara inkubacije za učinkovitost adhezije bakterija na površini od tri čvrsta, mineralna porozna nosača. Bakterija koju su imobilizirali je *Lactobacillus casei* koja je služila u bioreaktorima za veću proizvodnju mliječne kiseline. Rezultati istraživanja su pokazali da najveća proizvodnja mliječne kiseline postignuta imobilizacijom bakterija na nosače („pumica stone“) nakon 48 h. Sličnost s našim eksperimentom potvrdila je Kowalska i sur. koji su koristili vulkanski kamen „pumica stone“ koji je po svojstvima sličan perlitu jer je perlit mineral koji se dobiva od vulkanskog kamena. U našem rezultatima pokazalo se da je imobilizacija bakterija uspješna već nakon 24 h dok je kod istraživanja Kowalske i sur. trebalo 48 h što isto pokazuje dobar odabir nosača za bakterije te kontrolirane uvjete. Drugo istraživanje koje su proveli Foroughi i suradnici (2018) pokazalo je sposobnost imobiliziranih stanica na zncima perlita za detoksikaciju mlijeka kontaminiranog AFM1 bez ikakvih nuspojava na njegova fizikalno-kemijska svojstva. U ovom istraživanju kvasci su se imobilizirali na perlit 24 h i 48 h, a najbolje vrijeme imobilizacije je postignuto nakon 48 h. Ponovno se vraćamo na poveznicu s našim eksperimentom gdje imamo perlit ali na koji su imobilizirane bakterije gdje se već nakon 24 h sata vide imobilizirane čestice. Samim mikroskopiranjem nakon 24 h je bilo sasvim dovoljno vremena i utvrđeno kako su čestice perlita pune imobiliziranih bakterija. Još jedno istraživanje koje uključuje perlit u svoj eksperimentalni dio proveli su Darmayati i sur. (2021). U ovom istraživanju koriste se 4 različita nosača (perlit, sicilij, zeolit i vermikulit) na kojih se pokušava imobilizirati umjetni bakterijski konzorcij koji će trajati duže razdoblje. Rezultati su pokazali da perlit, zeolit i vermikulit jesu dobri kandidati za imobilizaciju, no umjetna kultura nije se pokazala dobra jer nije dugotrajno održiva. Važna stavaka je kakvi su nosači, ali i u kakvom će reaktoru biti sadržan konzorcij. Upravo zbog toga njima se istraživanje nije pokazalo dobrim jer su koristili umjetni (kupljeni) bakterijski konzorcij dok se u našem istraživanju koristio konzorcij bakterija koje su izolirane iz aktivnog mulja sa sposobnošću da se hrane miskantusom kako bi preživjele. Miskantus im je bio izvor ugljika te su one bile bolje prilagođene uvjetima. Miskantus je dodan u sve reaktore kako bi se konzorcij bakterija hranio i razmnožavao te anaerobnim vrenjem zatim stvarao bioplin.

Treći specifični cilj je dodavanje biočestica u reaktore za proizvodnju bioplina i praćenje produkcije bioplina. Tehnologije proizvodnje bioplina obično uključuju uporabu prirodnih

anaerobnih konzorcija mikroorganizama. Kovacs i suradnici (2012) su istražili važnost vodika u laboratorijskim reaktorima za bioplin. Koristili su čiste kulture koje proizvode vodik *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* i *Enterobacter doacae* u termofilnim i mezofilnim prirodnim zajednicama koje proizvode bioplin. Ključ njihovog istraživanja bio je parametar fermentacije u održavanju izmijenjene ravnoteže bakterija te stopa punjenja organskim krutima, a rezultati su pokazali povećanu produktivnost bioplina povezanu s povećanom količinom proizvodnje vodika. Sukladno ovom istraživanju možemo reći kako su se koristile organske krutine vjerojatno kao hrana, a tako smo mi koristili miskantus kao izvor energije za rast i razmnožavanje. No, ne smijemo zaboraviti da su biočestice s miskantusom dale najveći doprinos proizvodnji bioplina u odnosu na ostale bioreaktore. Miskantus je služio za duže održavanje konzorcija kako bismo imali veći prinos bioplina te zato je korišten u svakom biorektoru.

Postoji nekoliko metoda koje su predložene za povećanje produktivnosti bioplina, npr. olakšavanje razgradnje biomase pomoću različitih predtretmana, izmjena sastava mikroorganizama ili provođenje različite faze anaerobne probave (AP) u odvojenim reaktorima. Vodik ( $H_2$ ) igra važnu regulatornu ulogu u AP. Primijenjen je eksperimentalni pristup u kojem je zajednici koja proizvodi bioplin dodana čista kultura bakterija koje proizvode vodik u mezofilnim ili termofilnim uvjetima, a povećanje procesa opaženo je u AP uz upotrebu različitih izvora biomase (Acs i sur., 2015). Dodavanjem *E. Cloacae* je trebalo pojačati proizvodnju bioplina ako je lokalna koncentracija  $H_2$  faktor koji ograničava brzinu. Podaci istraživanja su potvrdili da je to doista bio slučaj, barem u određenoj mjeri te se i broj stanica *E. cloacae* stabilizirao prema PCR-u u stvarnom vremenu nakon dva tjedna. Povlačeći poveznicu na naše istraživanje možemo naglasiti da su bakterije koje su korištene u eksperimentu prilagođene uvjetima u kojima se nalaze u odnosu na bakterije koje su se ubacivale u njihovom istraživanju. Naravno, i u našem slučaju prinos bioplina je bio veći u odnosu na inokulum odnosno biorektor koji sadržavao samo aktivni mulj. Sa slike 16 se može vidjeti da se prinos bioplina stabilizirao nakon otprilike 21 dan što je 7 dana više u odnosu na bakterije koje proizvode vodik.

Nadalje, Lebiocka i suradnici (2018) su ispitali utjecaj bioaugmentacije na učinkovitost anaerobne probave mulja otpadnih voda iz komunalnog postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Istraživanje je uključivalo korištenje mješavine divljih bakterija i arheja za bioaugmentaciju. Zapravo bioaugmentacija s mješavinom mikroorganizama (bakterija i arheja) primijenjena je za poboljšanje anaerobne probave mulja iz kanalizacije. Rezultati su pokazali

da se bioaugmentacijom mulja iz kanalizacije poboljšala fermentacija i omogućilo zadovoljavajuće stanje prinosa bioplina. Štoviše, u smislu proizvodnje bioplina, konstanta brzine  $k$  povećala se s 0,071 h na 0,087 h s dozama smjese za bioaugmentiranje. Te vrijednosti povećane su u usporedbi s vrijednostima od 0,066 h i 0,069 gdje je zadržan samo mulj iz kanalizacije bez divljih bakterija (Lebiocka i sur., 2018). Gledajući njihovo istraživanje možemo reći da imamo korišten isti aktivni mulj odnosno mulj iz otpadnih voda. Nadalje, korištenjem divljih bakterija povećala se proizvodnja bioplina. Uspoređujući da smo mi koristili bakterije iz samog mulja uz dodatak miskanutsa, proizvodnja bioplina se povećala u odnosu na inokulum (bioreaktor koji je sadržavao samo aktivni mulj). Brzina proizvodnje aktivnog mulja je bila najveća u prvih 10-ak dana te je nakon toga postala konstanta na nekoj vrijednosti (slika 15.)

Zatim su Castaneda-Casasola i suradnici (2018) u svom istraživanju pratili fermentaciju u čvrstom stanju (SSF) i podvodnu fermentaciju (SmF). One međusobno pokazuju razlike u fiziologiji rasta i metabolizmu mikroorganizama. Proučavan je učinak uvjeta kulture (SSF i SmF) i vrste inertne podloge (poliuretanska pjena, perlit i vulkanski kamen) u produkciji ksilanaze uz *Aspergillus fumigatus*. Enzimska aktivnost proizvedena s perlita (54,08 U/gdm) i PUF-a (17,42 U/gdm) bila je veća od proizvedene u SmF-u (2,06 U/ml). Nadalje, SSF koji koristi perlitnu produktivnost bio je 18 puta veći od onog dobivenog u SmF-u. Usporedbom kinetičkih parametara, SSF koji koristi perlit kao inertni nosač stvara bolju alternativu za dobivanje ksilanolitičke aktivnosti iz *A. fumigatus*. Uspoređujući naše postavljene bioreaktore vidimo da imamo veću proizvodnju bioplina u biorektoru s perlitom odnosno biočesticama. Najveći odraz proizvodnje bioplina se vidi iz razlike s inokulom i svim ostalim bioreaktorima. No, na temelju ovih rezultata čini se da biočestice ne pomažu znatnije u proizvodnji bioplina. Predlaže se daljnje i opširnije istraživanje s više replika te različitim koncentracijama biočestica da bi se vidjelo može li se povećati prinos bioplina u nekoj drugoj konfiguraciji, ili da se možda poveća stabilnost različitih bioreaktora.

## 5. ZAKLJUČAK

- Bakterije koje smo uspjeli izolirati iz aktivnog mulja koristile su *M. giganteus* kao jedini izvor ugljika te su tako dalje rasle i razmnožavale se. Osim što smo ih izolirali, te bakterije su bile prilagođene uvjetima u kojima će se nalaziti.
- Nakon izolacije bakterije su se uspješno imobilizirale na perlit biofilmom te smo tako napravili biočestice.
- Postavljanjem bioreaktora i njihovim praćenjem proizvodnje bioplina ukazalo se da nema značajnih razlika u proizvodnji bioplina između bioreaktora IM, SIM, BIM i PIM. No, velika odstupanja dvaju paralelnih bioreaktora (replike) u proizvodnji bioplina u sustavu gdje je aktivni mulj i biomasa miskantusa ukazuje na moguću nestabilnost samog sustava. U dva reaktora gdje su bile dodane biočestice odstupanja su bila vrlo mala što ukazuje na mogućnost stabilizacije samog sustava dodavanjem bakterija vezanih na perlit.
- Predlažu se daljnja istraživanja s više ponavljanja te različitim koncentracijama biočestica u reaktorima.



## 6. POPIS LITERATURE

1. Acs N., Bagi Z., Rakhely G., Minarovics J., Nagy K., Kovacs K.L, Bioaugmentation od biogas production by a hydrogen-producing bacterium, ScienceDirect, Bioresource Technology 186 (2015.), 286-293
2. Anderson E., Arundale R., Maughan M., Oladeinde A., Wycislo A. & Voigt T. (2011) Growth and agronomy of *Miscanthus x giganteus* for biomass production, Biofuels, 2:1, 71-87
3. Banić I., Obrada i zbrinjavanje mulja s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, Završni rad, kolegij: Elektrotehnika, Pula, 2017. 28
4. Basić Jelena, Preživljavanje bakterije *Acinetobacter junii* imobilizirane na zeolit pri nepovoljnim vrijednostima ph, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, 2019. godina
5. Bilandžija N. Potencijal vrste *Miscanthus x giganteus* kao energetske kulture u različitim tehnološkim i agroekološkim uvjetima, 2015., doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb, 1.
6. Cadoux S. , Riche A. B. , Yates N.E., Machet J-M.: Nutrient requirements of *Miscanthus x giganteus*: Conclusions from a review of published studies; Biomass and Bioenergy, Volume 38, March 2012, 14-22
7. Castaneda-Casasola C., Arana-Cuenca A., Favela-Torres E., Anducho-Reyes M.A., Gonzalez A.E., Tellez-Jurado A., Xylanase enzymes production by *Aspergillus fumigatus* in solid state fermentation and submerge fermentation, Revista Mexicana de Ingenieria Quimica, Vol. 17, No. 1 (2018) 47-61
8. Darmayati Y., Wiranata Y., Afianti N.F, Manurung B. Comparison of Viability and Efficacy of an Immobilized Bacterial Consortium in Four Different Carriers to Degrade Oil, International Conference on the Ocean and Earth Sciences, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 789 (2021.) 012016, 1-12
9. Daza A., SantamarõÁa C., RodrõÁiguez-Navarro D.N., Camacho M., Orive R., Temprano F., Perlite as a carrier for bacterial inoculants, Soil Biology & Biochemistry 32 (2000), 567-572
10. Dzionek A, Wojcieszynska D, Guzik U., Natural carriers in bioremediation: A review, Electronic Journal of Biotechnology, *versiõn On-line* ISSN 0717-3458, Electron. J. Biotechnol. vol.19 no.5 Valparaíso set. 2016

11. Foroughi M., Sarabi Jamab M., Javad Keramat J., Foroughi M., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on Perlite Beads for the Decontamination of Aflatoxin M1 in milk, Journal of Food Science, Vol. 83, Iss 7, 2018, 2008-2013
12. Gorinšek N., Influence of biological pretreatment and bioaugmentation with *Clostridium thermocellum* on biogas production from algae biomass m. sc. thesis, Univerza v Ljubljani Biotehniška fakulteta študij mikrobiologije, Ljubljana, 2018, 3-4.
13. Hrenović, J., Ivanković, T., Tibljaš, D. (2009): The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization. J. Haz. Mat. 166, str. 1377-1382.
14. <https://beeco.hr/miscanthus-x-giganteus/sadnja-i-zetva/> (preuzeto: 9.8.2021, 17:15)
15. <https://hr2.wiki/wiki/Bioaugmentation> (preuzeto: 13.8.2021., 15:35)
16. <https://researchportal.bath.ac.uk/en/publications/application-of-perlite-as-encapsulation-carrier-for-bacteria-in-t>
17. [http://www.eihp.hr/wp-content/uploads/2018/03/BiogasAction-ViroExpozencija\\_EIHP.pdf](http://www.eihp.hr/wp-content/uploads/2018/03/BiogasAction-ViroExpozencija_EIHP.pdf) - (preuzeto: slajd 14 , 8.8.2021., 12:38)
18. [https://www.hdki.hr/\\_download/repository/Procesi\\_prociscavanja-4.pdf](https://www.hdki.hr/_download/repository/Procesi_prociscavanja-4.pdf) (preuzeto 8.9.2021)
19. <https://www.zagreb.hr/cupovz/34184> (preuzeto 5.9.2021., 13:05)
20. Ivanković, Tomislav, Alumosilikatni materijali kao nosači fosfat-uklanjajućih bakterija u obradi otpadnih voda, 2012., doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 12 - 25
21. Ivanković T., Hrenovic J., Sekovanic L. Influence of the degree of perlite expansion on immobilization of *Acetobacter junii*. Biochem. Eng. J. 51 (2010) 117-123.
22. Jajčinović I, Karakterizacija otpadnog mulja nastalog biološkom obradom farmaceutskih otpadnih voda, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015., 7-8
23. Kodra N., Production of biogas from pumpkin pulp by bioaugmentation, m. sc. Thesis Master Study Programmes, Univerza v Ljubljani biotehniška fakulteta študij biotehnologije, Ljubljana, 2016, 3-4.
24. Kovacs K.I, Acs N., Kovacs E., Wirth R., Rakhely G. Strang O., Herbel Z., Bagl Z., Improvement of Biogas Production by Bioaugmentation, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Vol. 2013, Article ID 482653, 1-7
25. Kowalska U., Mizielińska M., Łopusiewicz L., Bartkowiak A.: *Lactobacillus casei* cell immobilization on mineral carriers for continuous lactic acid production, Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, West Pomeranian University

of Technology, Klemensa Janickiego 35, 71-450 Szczecin, Poland, WSN 90 (2017) 62-76

26. Lebiocka M., Montusiewicz A., Cydzik-Kwiatkowska A., Effect of Bioaugmentation on Biogas Yields and Kinetics in Anaerobic Digestion of Sewage Sludge, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, 15, 1717; doi:10.3390, 1-16
27. Miloloža M., Janton N., Potencijal izoliranih bakterijskih kultura u stvaranju aktivnog mulja za bioremedijaciju farmaceutske otpadne vode, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski rad, , Zagreb, 2017., 9-15.
28. Montusiewicz A. Szaja A., Musielewicz I., Cydzik-Kwiatkowska A., Lebiocka M., Effect of bioaugmentation on digestate metal concentrations in anaerobic digestion of sewage sludge, research article PLOS ONE (2020.) 1-16
29. Nye, J. V., W. F. Guerin and S. A. Boyd. 1994. Heterotrophic activity of microorganisms in soils treated with quaternary ammonium compounds. *Environ. Sci. Technol.* 28:944-951.
30. Polović., Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski rad, Zeoliti kao nosači bakterija u funkciji pročišćavanja otpadnih voda, Zagreb, 2016., 3-4
31. Pichór W., Janiec A. (2009). Thermal stability of expanded perlite modified by mullite, *Ceramics Int.* 35, 527-530.
32. Rotim Katarina, Model rasta bakterijskog biofilma u stacionarnim uvjetima, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2018., 1
33. Vuleta G., Fakultet strojarstva i brodogradnje, Sveučilište u Zagrebu, Diplomski rad, Supervision of MSC EQ thesis, Zagreb, 2012., 24-25
34. Vuković Domanovac, M., Analiza procesa nastajanja aktivnog mulja pri obradi otpadnih voda, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2006., 70-74

## 7. ŽIVOTOPIS

### OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ivana Paladin

Datum i mjesto rođenja: 7.10.1996., Rijeka, Hrvatska

E-mail adresa: [ivanapaladin@gmail.com](mailto:ivanapaladin@gmail.com)

### OBRAZOVANJE:

2011. – 2015. Opća gimnazija Buzet

2015. – 2021. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek,  
integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij Biologija i kemija

### VJEŠTINE:

Poznavanje jezika: engleski

Kompjuterski programi: MS Office, Excel, Power Point

Vozačka dozvola: B kategorija