

RAPORT ROCZNY ZA ROK 2012

z realizacji Projektu w ramach Programu „LIDER”

ZA OKRES

OD 01.01.2012

DO 31.12.2012

Podać numer roku sprawozdawczego

1. DANE O PROJEKCIE

Tytuł projektu	Opracowanie innowacyjnego biopreparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej odpadów organicznych		
Nr umowy	LIDER/24/48/I-2/10/NCBiR/2011 z dnia 09.08.2011		
Data rozpoczęcia realizacji Projektu (zgodnie z umową)	01.11.2012	Data zakończenia realizacji Projektu (zgodnie z umową)	31.10.2014
Słowa kluczowe	Biopreparat, fermentacja metanowa, mikroorganizmy, osady ścieków mleczarskich, unieszkodliwianie odpadów		
Klasyfikacja wg OECD	4.4. Biotechnologia rolnicza		

2. DANE KONTAKTOWE KIEROWNIKA PROJEKTU I JEDNOSTKI

Imię i nazwisko Kierownika Projektu	Magdalena Frąc		
Telefon	81 744 50 61 wew. 156	e-mail	m.frac@ipan.lublin.pl
Nazwa Jednostki	Instytut Agrofizyki im. B. Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk		
Adres	ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27		
Dane osoby odpowiedzialnej ze strony Jednostki za kontakty z NCBiR /podać imię i nazwisko osoby, stanowisko służbowe i nazwa komórki organizacyjnej/	Grażyna Muszyńska Zastępca Głównego Księgowego Księgowość		
Telefon	81 744 50 61 wew. 106	Fax	81 744 50 67
e-mail	g.muszynska@ipan.lublin.pl		

6. SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE – PODSUMOWANIE OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

(nie więcej niż 10 str. A4)

6.1 Sumaryczny opis rezultatów osiągniętych w Projekcie (w podziale na zadania) – od początku realizacji Projektu

Zadanie nr 1

Nazwa zadania: 1. Charakterystyka potencjalnych substratów do procesu fermentacji metanowej – odpadów z produkcji owoców oraz osadów z oczyszczalni ścieków mleczarskich

Status zadania: zakończone

Opis rezultatów

Wymienione zadanie jest zadaniem „bezkosztowym”, na które składają się 4 podzadania. W związku z powyższym w ramach wymienionego zadania zrealizowano podzadania 1.1.-1.4. wymienione i opisane poniżej, w dalszej części raportu jako zadania o numerach 2-5.

Zadanie nr 2

Nazwa zadania: 1.1. Pozyskiwanie substratu z przemysłu mleczarskiego oraz przetwórstwa owoców, w tym osadów ściekowych

Status zadania: zakończone

Opis rezultatów

Na podstawie rozeznania rynku oraz przeglądu dostępnej literatury do badań wytypowano 6 substratów, które są potencjalnie łatwo dostępnymi substratami na terenie Lubelszczyzny, jak również są dostępne w innych regionach kraju. Do badań zostały wybrane substraty główne zaplanowane w projekcie oraz potencjalne ko-substraty, które są dostępne na terenie Polski oraz stanowią odpady również w skali Europy i świata. Substraty do badań pozyskano z OSM w Krasnymstawie - osady pochodzące z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz Zakładów przetwórstwa owoców zlokalizowanych na terenie Lubelszczyzny - owocowe wyłoki poprodukcyjne. Jako ko-substraty do badań wybrane zostały: wywar gorzelniany zbożowy, kiszonka z kukurydzy oraz kiszonka z trawy. Odpady będą dostarczane przez Laboratorium Biotechnologiczne Biogaz Zeneris oraz producentów rolnych. W ramach realizacji niniejszego zadania zgromadzono również dodatkowe substraty (otręby oraz mieszanki paszowe), pochodzące z Zakładów Przetwórczych Lubella S.A., które będą mogły być wykorzystane w zadaniach nr 7 i 8, dotyczących optymalizacji procesu fermentacji metanowej. W ramach realizacji zadania, w miarę warunków laboratoryjnych, zgromadzono i zamrożono wyżej wymienione substraty i ko-substraty, natomiast w przypadku pojawienia się konieczności wprowadzenia dodatkowych substratów do badań, zostaną one pobrane z Zakładów przemysłu rolno-spożywczego funkcjonujących na terenie kraju, zwłaszcza pochodzących z terenu Lubelszczyzny, co zostało ustalone podczas rozmów z zainteresowanymi przedsiębiorcami. Laboratorium Mikrobiologii Molekularnej i Środowiskowej współpracuje z wieloma przedsiębiorstwami z zakresu przetwórstwa rolno-spożywczego, posiadając również umowy o współpracy naukowo-badawczej, co zapewni dostęp do substratów w przypadku wyczerpania zgromadzonych zapasów.

Zadanie nr 3

Nazwa zadania: 1.2. Zbadanie właściwości fizyko-chemicznych substratów

Status zadania: zakończone

Opis rezultatów:

Celem przeprowadzonych badań była ocena parametrów fizyko-chemicznych odpadów przeznaczonych do utylizacji w procesie fermentacji metanowej. W oparciu o analizę chemiczną badanych substratów w roku sprawozdawczym (tabela 1) można stwierdzić, że ich skład jest zróżnicowany, co może powodować zmienną podatność na procesy fermentacyjne lub zakłócać układ symbiotyczny ekosystemu w reaktorach.

Tabela 1 – Skład chemiczny substratów poddanych fermentacji metanowej (II rok realizacji projektu)

Oznaczenie	Jednostka	Kiszonka kukurydzy	Wywar zbożowy	Kiszonka trawy	Osad ścieków mleczarskich	Odpady owocowe
Sucha masa	%	34,6	3,9	60,6	16,4	8,1
Sucha masa org.	% s.m.	96,4	90,4	86,7	86,9	95,1
Popiół	% s.m.	3,6	9,6	13,3	13,1	5,9
ChZT	g O ₂ /kg s.m.	1,2	1,46	2,00	2,03	1,21
Azot ogólny Kjeldahla	% s.m.	1,39	7,65	1,93	7,90	2,15
Fosfor	g/kg s.m.	1,88	5,77	2,59	18,31	2,36
pH	jedn	3,89	3,38	5,59	5,91	3,09
C/N	-	30,61	10,14	16,33	3,84	21,58

Pomiędzy poszczególnymi odpadami zaobserwowano istotne różnice w zawartości suchej masy, substancji organicznej, azotu i pH. Może to wywierać istotny wpływ na procesy życiowe mikroorganizmów. Miarą zmienności substancji organicznej są znaczne różnice wskaźnika ChZT od 1,2 g O₂/kg s.m. – kiszonka z kukurydzy do 2,03 g O₂/kg s.m. – osad ścieków mleczarskich. Badane odpady charakteryzowały się znaczną zawartością azotu. Najwyższe wartości oznaczono dla osadu ścieków mleczarskich – 7,9% s.m. oraz wywaru zbożowego 7,65% s.m. Jedną z substancji, która w nadmiernych stężeniach może być toksyczna dla bakterii beztlenowych jest amoniak. Wpływ amoniaku na inhibicję procesu jest przede wszystkim związany z surowcem, jaki poddajemy procesowi fermentacji beztlenowej. W wyniku fermentacji podłoży o wysokiej zawartości białka dochodzi do uwolnienia znacznych ilości amoniaku, który w środowisku wodnym przechodzi w jon amonowy. Procentowy udział amoniaku w postaci niezdysonowanej (toksycznej) zwiększa się wraz ze wzrostem odczynu. Odczyn środowiska wpływa na wydajność i stabilność tworzenia metanu, rozpuszczalność i formy występowania zarówno organicznych, jak i nieorganicznych związków w układzie oraz decyduje o prawidłowym rozwoju mikroorganizmów wywołujących fermentację. Dla prawidłowego przebiegu procesu fermentacji metanowej stosunek węgla do azotu powinien zawierać się w zakresie 10-30. Jeżeli iloraz C:N jest zbyt wysoki to azot będzie szybko zużywany przez bakterie metanowe do zaspokajania ich białkowych potrzeb i nie będzie dostępny dla części węgla zawartego w surowcu. W efekcie produkcja gazu będzie niższa. Jeżeli iloraz C:N jest zbyt niski to azot będzie uwalniany w formie amoniaku, aż do stężenia, w którym staje się toksyczny dla bakterii metanowych. Z danych zawartych w tabeli 1 można zauważyć, że osad ścieków mleczarskich posiadał zbyt niski stosunek węgla do azotu, wynosił on jedynie 3,84. Odpad ten zawierał natomiast najwyższe stężenie fosforu - 18,31 g/kg s.m. Bakterie metanowe wymagają do wzrostu warunków obojętnych. Wartość odczynu zależy od pojemności buforowej układu. Związane jest to z obecnością kwasu octowego, fosforanów, węglanów i siarkowodoru oraz słabych zasad, np. wodorotlenku amonu. Znaczący udział w pojemności buforowej układu może mieć także amoniak wytwarzany w dużych ilościach, w komorach zasilanych odpadami zasobnymi w organiczne związki azotu. Badane substraty charakteryzowały się niskimi wartościami pH, szczególnie kiszonka kukurydzy – 3,89 oraz wywar zbożowy – 3,38.

Na podstawie danych dotyczących zawartości metali ciężkich w badanych substratach można stwierdzić, że badana biomasa zawierała przeciętną ilość metali ciężkich dla tego typu odpadów. Dlatego też, po procesie fermentacji uzyskany nawóz może być wykorzystywany do celów rolniczych. Badana biomasa może stanowić dobry substrat dla prowadzenia procesu fermentacji metanowej.

Zawartość metali ciężkich wykorzystywanej do badań biomasy, wskazuje na brak zagrożenia skażenia osadów pofermentacyjnych metalami ciężkimi i daje możliwość ich wykorzystania w celach nawozowych.

Zadanie nr 4

Nazwa zadania: 1.3. Zbadanie stanu mikrobiologicznego substratów

Status zadania: zakończone

Opis rezultatów :

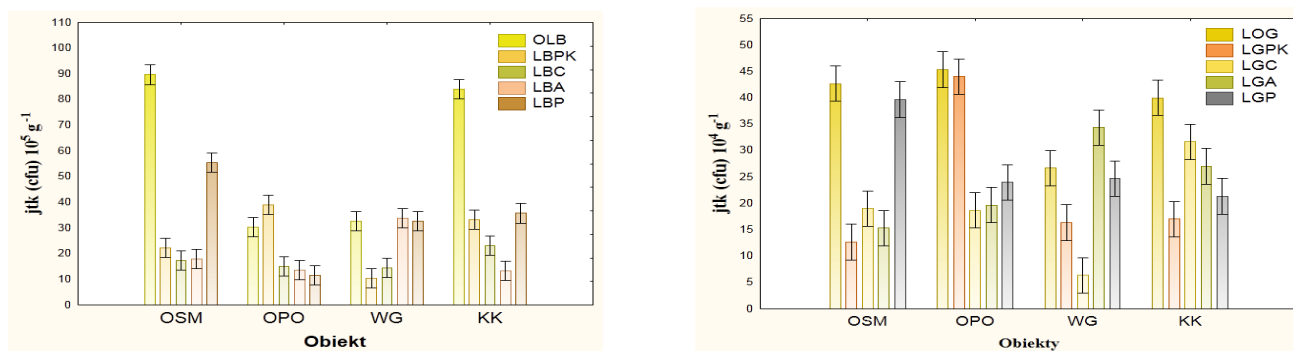
Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszego zadania była ocena jakości i parametrów mikrobiologicznych odpadów stanowiących substraty do procesu fermentacji metanowej. W okresie realizacji projektu badaniami objęto główne substraty, tj.: osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich i odpady pochodzące z przetwórstwa owoców oraz kosubstraty: wywar zbożowy, kiszonkę z trawy, kiszonkę z kukurydzy. Badania obejmowały przeprowadzenie charakterystyki mikrobiologicznej i mikologicznej odpadów i porównanie ich mikroflory. Oceniono ogólną

liczebność bakterii i grzybów oraz przeprowadzono analizę sanitarną odpadów, obejmującą określenie obecności bakterii z rodzaju *Salmonella* oraz jaj pasożytów przewodu pokarmowego *Ascaris ssp.*, *Trichuris ssp.* i *Toxocara ssp.*. Z badanych substratów wyizolowano bakterie i grzyby w celu stworzenia kolekcji mikroorganizmów, które są testowane w aspekcie ich przydatności do zastosowania w opracowaniu preparatu do optymalizacji fermentacji metanowej, zwłaszcza I fazy – hydrolitycznej tego procesu (zadanie 11). W okresie sprawozdawczym przeprowadzono identyfikację dominujących, wyodrębnionych mikroorganizmów pod względem przynależności gatunkowej oraz ocenę ich wybranych właściwości i uzdolnień katabolicznych. W okresie sprawozdawczym określono również w badanych substratach liczebność bakterii i grzybów o uzdolnieniach amylolitycznych, proteolitycznych, pektynolitycznych i celulolitycznych.

W badaniach zastosowano następujące metody mikrobiologiczne:

- oznaczenie ogólnej liczebności bakterii przeprowadzono na podłożu z K_2HPO_4 i wyciągiem przygotowanym z poszczególnych bioodpadów;
- oznaczenie ogólnej liczebności grzybów wykonano na podłożu z różem bengalskim (Biocorp), stosując dodatkowo, w celu ograniczenia wzrostu bakterii, antybiotyki: chlorotetracyklinę i streptomycynę;
- oznaczenie liczebności bakterii i grzybów o uzdolnieniach proteolitycznych, amylolitycznych, celulolitycznych i pektynolitycznych przeprowadzono na podłożach minimalnych z 2% dodatkiem odpowiednio: żelatyny, skrobi, celulozy i pektyny;
- obecność bakterii chorobotwórczych z rodzaju *Salmonella* przeprowadzono metodą hodowli na podłożach namnażających i różnicująco-selektywnych oraz potwierdzano wyniki badaniem biochemicznym z zastosowaniem testów API20E,
- obecność jaj pasożytów jelitowych oznaczano poprzez wstrząsanie oraz płukanie odpadów, z zastosowaniem wirowania, a następnie wykonywano obserwacje mikroskopowe.

Na podstawie uzyskanych wyników badań oceniono jakość mikrobiologiczną substratów oraz stworzono kolekcję kultur mikroorganizmów, wyodrębnionych z bioodpadów.



Rys. 1. Ogólna liczebność bakterii (OLB) i grzybów (OLG), liczebność bakterii i grzybów o uzdolnieniach do rozkładu pektyn (LBP, LGP), celulozy (LBC, LGC), skrobi (LBA, LGA) i białka (LBP, LGP) w wybranych bioodpadach: osadzie z oczyszczalni ścieków mleczarskich (OSM), odpadach z przetwórstwa owoców (OPO), wywarze zbożowym (WG) oraz kiszonce z kukurydzy (KK)

Z analizy danych dotyczących występowania bakterii i grzybów w badanych odpadach wynika, że najwyższą ogólną liczebnością bakterii charakteryzował się osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich ($90 \cdot 10^5 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) oraz kiszonka kukurydziana ($85 \cdot 10^5 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$). Podwyższoną, w stosunku do innych odpadów liczebność bakterii proteolitycznych stwierdzono w osadzie z oczyszczalni ścieków mleczarskich ($55 \cdot 10^5 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$), natomiast w odpadach z przetwórstwa owoców zaznaczyła się wyższa liczebność bakterii o uzdolnieniach pektynolitycznych ($38 \cdot 10^5 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$). Ogólna liczebność grzybów kształtowała się na wysokim poziomie w osadzie z oczyszczalni ścieków mleczarskich, kiszonce z kukurydzy i odpadach z przetwórstwa owoców ($45\text{-}40 \cdot 10^4 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$ odpadu). Podkreślić należy, że w odpadach owocowych, kiszonce z trawy i wywarze zbożowym dominowały szczepy drożdży, a z pozostałych odpadów w większości izolowano grzyby strzępkowe. Przebadane materiały odpadowe charakteryzowały się zróżnicowaną liczebnością badanych grup grzybów, przy czym uwagę zwraca wysoka liczebność grzybów o uzdolnieniach pektynolitycznych ($43 \cdot 10^4 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) w odpadach owocowych, grzybów amylolitycznych ($33 \cdot 10^4 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) w wywarze zbożowym oraz grzybów uzdolnionych do rozkładu celulozy ($25 \cdot 10^4 \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) w kiszonce kukurydzy.

Izolację szczepów bakterii i grzybów przeprowadzono poprzez kilkakrotne pasażowanie na podłożu PCA (Biocorp), w przypadku bakterii oraz 2% malt extract agar (Emapol), w przypadku grzybów. Tak oczyszczone kolonie przeszczepiono na skosy agarowe z uniwersalną pożywką bulionową dla bakterii oraz skosy agarowe z pożywką ziemniaczaną (PDA – Biocorp) i brzecką agarową dla grzybów. Hodowle czystych kultur prowadzono w temperaturze 26°C przez 7-14 dni.

Z analizy sanitarnej substratów wynika, że w przebadanych bioodpadach nie stwierdzono obecności bakterii z rodzaju *Salmonella*. W odpadach z przetwórstwa owoców stwierdzono obecność jaj *Ascaris ssp.* (1 jajo w 10 g odpadu), w kiszonce kukurydzy stwierdzono natomiast aż 6 jaj *Toxocara spp.* Nie stwierdzono żywotności jaj tych pasożytów. W toku przeprowadzonych badań nie stwierdzono również obecności jaj *Trichuris ssp.* Z uwagi jednak na warunki prowadzenia procesu fermentacji beztlenowej oraz brak żywotności jaj, stwierdzone jaja pasożytów nie stanowią przeszkody do wykorzystania rolniczego osadu, który powstał po procesie fermentacji, w którym nie stwierdzono obecności jaj żadnego z wymienionych pasożytów.

Badania mikologiczne substratów posłużyły do określenia składu rodzajowego i gatunkowego zbiorowisk grzybów zasiedlających te bioodpady. Uzyskane wyniki wykazały, że zbiorowiska grzybów występujących w badanych odpadach charakteryzowały się podobnym składem rodzajowym, a obserwowane różnice dotyczyły występowania poszczególnych gatunków i miały głównie charakter ilościowy. Dominującymi gatunkami występującymi w osadzie ścieków mleczarskich były: *Aspergillus flavus*, *Penicillium camembertii*, *Trichoderma atroviride* i *Yarrowia lipolytica*. W odpadach owocowych dominowały gatunki drożdży: *Pichia anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Candida krissi*, a także *Penicillium olsonii* – przedstawiciel grzybów strzępkowych. Wywar wzbożowy zasiedlony był w większości przez drożdże *Candida krissi*, natomiast w kiszonkach stwierdzono dominację *Penicillium camembertii* i *Aspergillus versicolor* (kiszonka kukurydziana) oraz *Debaromyces hansenii* i *Candida krissi* (kiszonka z trawy). W kiszonce z trawy stwierdzono również obecność grzybów termoopornych z gatunku *Byssoschlamys nivea*, co może stanowić zagrożenie dla skażenia produktów rolniczych podczas nawozowego wykorzystania osadu pofermentacyjnego z wymienionego substratu. Stwierdzono znaczne różnice w wykorzystaniu poszczególnych substratów węglowych przez wyodrębnione mikroorganizmy. Wykazały one potencjalną aktywność w degradacji celulozy.

W badanych odpadach stwierdzono występowanie przede wszystkim mikroorganizmów saprofitycznych, nie stanowiących zagrożenia dla zdrowia. Ponadto, w procesie fermentacji metanowej stanowiące potencjalne zagrożenie dla człowieka dermatofity, giną ze względu na warunki prowadzenia procesu fermentacji, co nie stanowi zagrożenia podczas rolniczego wykorzystania odpadów pofermentacyjnych z tych substratów.

Biorąc pod uwagę wyniki analizy mikrobiologicznej badanych substratów można stwierdzić, że zasiedlające je mikroorganizmy posiadają potencjalną wartość aplikacyjną podczas wstępnej degradacji bioodpadów przeznaczonych do unieszkodliwiania w procesie fermentacji metanowej, co może wpłynąć na zwiększenie efektywności procesu i wydajności produkcji biogazu.

Zadanie nr 5

Nazwa zadania: 1.4. Przygotowanie substratów do procesu fermentacji. Badanie biogazodochodowości materiałów

Status zadania: zakończone

Opis rezultatów:

Rozpoczęte w pierwszym roku (01.11.2011-31.12.2012) badania, w ramach niniejszego zadania obejmowały ocenę biogazodochodowości odpadów, które będą unieszkodliwiane w procesie fermentacji metanowej. Celem badań było określenie podatności na rozkład beztlenowy i produktywności biogazu z substratów, takich jak odpady z przetwórstwa owoców oraz osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich. Badania obejmowały odpowiednie przygotowanie substratów poprzez ich rozdrobnienie oraz poddanie fermentacji okresowej, w celu zmierzenia maksymalnej ilości biogazu jaki można uzyskać z 1kg suchej masy organicznej danego substratu. Ponadto, oceniono skład biogazu otrzymanego w wyniku fermentacji odpadów owocowych oraz osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich. W oparciu o wyniki badań odpadów (m.in. zawartość suchej masy organicznej, pH, zawartość azotu ogólnego) dobrano początkowe obciążenie fermentora. Przeprowadzono 41 dniową fermentację tych substratów przy takim samym obciążeniu początkowym fermentora ($\text{kg s.m.o.} \cdot \text{m}^{-3}$) i temperaturze fermentacji 37°C. Parametry takie jak – objętość biogazu jaką można otrzymać z 1 kg s.m.o. oraz procentowy udział metanu w biogazie – są wartościami charakterystycznymi dla danego rodzaju substratu i ściśle zależą od jego składu chemicznego i od podatności obecnych w nim związków organicznych na rozkład w warunkach beztlenowych. W pierwszym roku badań określono uśredniony skład biogazu, w zakresie: CH_4 , CO_2 , O_2 , H_2S , i NH_3 oraz wykreślono krzywe kinetyki produkcji biogazu (krzywe biogazodochodowości) dla dwóch substratów: odpadów owocowych i osadu ścieków mleczarskich. Uzyskane wyniki badań umożliwiły określenie maksymalnej wydajności i jakości (składu) biogazu powstałego w wyniku fermentacji okresowej danego typu substratu. W przypadku wsadu owocowego 90% biogazu powstało po 9 dniach od rozpoczęcia fermentacji, a w przypadku osadu ścieków mleczarskich po 12 dniach. Przeprowadzone badania wykazały, że z 1 kilograma suchej masy organicznej obydwu analizowanych substratów można otrzymać podobne objętości (Ndm^3) biogazu, jednak nieznacznie wyższą wydajność produkcji odnotowano w przypadku odpadów owocowych. Oceniono również skład jakościowy biogazu. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że wyższą zawartością metanu w biogazie charakteryzował się osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (76% metanu) w porównaniu do wartości otrzymanych dla odpadów z przetwórstwa owoców (69% metanu). Otrzymane w I roku wyniki są częściowymi danymi uzyskanymi w ramach niniejszego zadania.

W okresie sprawozdawczym proces fermentacji metanowej bioodpadów prowadzono w układzie okresowym. Badania prowadzono w reaktorach

o obj. 0,5 dm³ w warunkach mezofilnych (temperatura 37°C). Fermentory zasilono badaną biomasa w ilości zapewniającej uzyskanie dla wszystkich prób jednakowego obciążenia substratowego. W przeliczeniu na suchą masę organiczną wynosiło ono 4,95 g/dm³. Obciążenie fermentorów substancją organiczną w przeliczeniu na wartość ChZT było zróżnicowane, najwyższe wartości odpowiednio 11,41 g O₂/dm³ oraz 11,57 g O₂/dm³ odnotowano dla kiszonki traw oraz osadu ścieków mleczarskich. Wyraźnie niższe obciążenia uzyskano zasilając fermentory kiszonką kukurydzy oraz wywarem zbożowym, wynosiły one odpowiednio 6,16 oraz 8,0 g O₂/dm³.

Tabela. 2 Wydajność biogazu i metanu w procesie okresowej fermentacji metanowej (II rok realizacji projektu)

Substrat	Wydajność biogazu [dm ³]		Wydajność CH ₄ [dm ³]	
	z 1kg ChZT	z 1kg s.m.o.	z 1 kg ChZT	z 1 kg s.m.o.
	wprowadzonego			
Kiszonka Kukurydzy	540,71	561,00	302,79	314,16
Wywar zbożowy	470,32	520,30	272,78	301,77
Kiszonka traw	436,44	504,2	238,94	277,31
Osad ścieków mleczarskich	333,83	383,40	186,94	214,70
Odpady owocowe	386,07	410,20	220,05	233,81

W tabeli 2 zestawiono dane dotyczące wydajności produkcji biogazu uzyskanego podczas fermentacji badanej biomasy. Należy stwierdzić, że w prowadzonych badaniach nie wykazano istotnej zależności pomiędzy wydajnością biogazu a obciążeniem fermentora substancją organiczną w przeliczeniu na ChZT. Prowadząc proces fermentacji metanowej kiszonki z kukurydzy oraz odpadów owocowych uzyskano, przy podobnych wartościach obciążeń fermentorów substancją organiczną (odpowiednio 6,16 oraz 6,36 g O₂/dm³), istotną różnicę w ilości otrzymanego biogazu. Wydajność biogazu z 1 kg s.m.o. dla kiszonki z kukurydzy wyniosła 561,00 dm³, natomiast fermentacja odpadów owocowych pozwalała na uzyskanie z 1 kg s.m.o. jedynie 410,20 dm³ biogazu. Analizując przebieg krzywych wydajności biogazu w procesie fermentacji okresowej poszczególnych bioodpadów można zauważyć, że charakterystyki przebiegu krzywych obrazujących zmiany wydajności biogazu w czasie trwania okresowej fermentacji są do siebie zbliżone. Najwyższą wydajność biogazu z 1 kg s.m.o. uzyskano we wszystkich próbach w 3 dniu fermentacji, natomiast znaczne obniżenie wydajności biogazu, uzależnione było od fermentowanego substratu i rozpoczynało się w 5 dniu prowadzenia badań.

Przeprowadzone badania wykazały, że wydajność biogazu uzyskana podczas fermentacji metanowej osadów ścieków mleczarskich oraz odpadów owocowych była wyraźnie niższa w porównaniu do innych badanych substratów. Dlatego w celu zwiększenia produkcji wysokometanowego biogazu wskazane jest opracowanie mieszanki tych odpadów z innymi ko-substratami.

Najwyższą wydajność metanu z 1 kg s.m.o. – 314,16 dm³ uzyskano poddając fermentacji metanowej kiszonkę z kukurydzy.

Zadanie nr 6

Nazwa zadania 2. Opracowanie zoptymalizowanego i zrównoważonego składu substratów do produkcji biogazu w oparciu o odpady z przetwórstwa owoców oraz osady z oczyszczalni ścieków mleczarskich

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

Wymienione zadanie jest zadaniem „bezkosztowym”, na które składa się 7 podzadań. W związku z powyższym w ramach wymienionego zadania rozpoczęto realizację podzadań 2.1.-2.7. wymienione i opisane poniżej, w dalszej części raportu jako zadania o numerach 7-13.

Zadanie nr 7

Nazwa zadania 2.1. Przeprowadzenie fermentacji metanowej w warunkach laboratoryjnych, z użyciem różnych kombinacji substratów, w różnych warunkach, z wykorzystaniem bioreaktorów

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W okresie sprawozdawczym w ramach wymienionego zadania przeprowadzono badania okresowej fermentacji metanowej mieszanin odpadów organicznych. Kofermentacja jest ogólnie uznaną metodą prowadzenia fermentacji metanowej różnych bioodpadów, mająca na celu zwiększenie wydajności procesu. Wspólna fermentacja pozwala na uzyskanie odpowiedniego uwodnienia masy fermentacyjnej, poprawę bilansu pierwiastków biogennych czy też wzrost ładunku łatwo biodegradowalnej materii. Bioodpady po ich wstępnym rozdrobieniu i ujednoczeniu mieszano w

odpowiednich proporcjach. Badaniami objęto następujące mieszanki substratów: **mieszanina 1:** odpady owocowe (25%) + osad ścieków mleczarskich (25%) + kiszonka kukurydziana (12%) + wywar zbożowy (38%); **mieszanina 2:** odpady owocowe (30%) + osad ścieków mleczarskich (35%) + kiszonka kukurydziana (8%) + wywar zbożowy (27%); **mieszanina 3:** odpady owocowe (25%) + osad ścieków mleczarskich (25%) + kiszonka z trawy (15%) + wywar zbożowy (35%).

Analizując uzyskane dane można zauważyć, że wartość uwodnienia, jak i zawartość materii organicznej w skomponowanych mieszaninach była do siebie zbliżona. Uzyskano również ujednoczenie, we wszystkich trzech stosowanych mieszaninach, stosunku C/N. Wynosił on od 26,36 dla mieszaniny 2 do 38,17 dla mieszaniny 3. Podwyższeniu, w porównaniu do pojedynczych substratów wykorzystywanych w zadaniu 3 i 5, uległa wartość pH i wynosiła od 4,36 – mieszanina 1 do 4,69 – mieszanina 3.

Proces fermentacji prowadzono analogicznie, jak dla pojedynczych substratów, w temperaturze 37°C oraz w fermentorach o objętości 0,5 dm³. Ilość wprowadzonej biomasy do reaktora zapewniała uzyskanie w każdym z wariantów doświadczenia zbliżonych wartości obciążenia s.m.o., która wynosiła ok. 4,95 g s.m.o./dm³. Podobnie jak w serii 1 badań, również i tutaj obserwowano zmienne wartości obciążenia fermentorów substancją organiczną wyrażoną jako ChZT. Wynosiło ono od 6,17 g O₂/dm³ – mieszanina 3 do 9,13 g O₂/dm³ – mieszanina 2.

Przeprowadzone badania wykazały, że intensywność wydzielania biogazu była zróżnicowana i uzależniona od składu mieszanin poddawanych fermentacji. Najwyższą wydajność biogazu z 1 kg s.m.o. – 629,4 dm³, uzyskano poddając fermentacji mieszaninę 1. Dla tej mieszaniny uzyskano również najlepszą, w porównaniu z badanymi mieszaninami wydajność metanu z 1 kg s.m.o. – 402,81 dm³. Analizując dobowe zmiany wydajności biogazu można zauważyć, że wszystkie analizowane próby wykazały najwyższą wydajność biogazu w 3 dobie trwania fermentacji, po tym czasie wydajność biogazu we wszystkich próbach systematycznie malała aż do 35 doby, w której zakończono proces. Można zauważyć, że istotna poprawa stosunku C/N w badanych mieszaninach wieloskładnikowych w stosunku do pojedynczych badanych substratów (zadanie 3 i 5), jak również poprawa ilości biodegradowalnej substancji organicznej, spowodowała wzrost ilości produkowanego biogazu. Uwagę zwraca skład mieszanin 1 oraz 2. Przy podobnym stosunku C/N dla obu mieszanin (ok. 27), w mieszaninie 1 wyższy udział kiszonki z kukurydzy oraz wywaru zbożowego spowodował, że uzyskano dla niej najlepsze efekty biodegradacji. W porównaniu do kiszonki z kukurydzy (zadanie 5) odnotowano wyższą wydajność biogazu z 1 kg s.m.o. (o ok. 12%), natomiast wydajność metanu z 1 kg s.m.o. była wyższa aż o 28%.

Analizując uzyskane wyniki można zauważyć, że stosowana w badaniach mieszanina odpadów nie spowodowała istotnych zmian stężeń analizowanych metali ciężkich. Uzyskane wartości są porównywalne do stwierdzonych w pojedynczych substratach (zadanie 3).

Modyfikacja składu substratu w porównaniu do pojedynczych odpadów badanych w zadaniu 3 i 5, spowodowała poprawę uwodnienia masy fermentacyjnej oraz bilans pierwiastków biogennych.

Fermentacja metanowa mieszaniny wieloskładnikowej spowodowała wyraźny wzrost ilości produkowanego biogazu w odniesieniu do pojedynczych substratów.

Stężenie metali ciężkich w mieszaninie odpadów nie stanowi zagrożenia podczas rolniczego zagospodarowania odpadów, co umożliwiło wykorzystanie przefermentowanej biomasy do celów nawozowych.

Zadanie jest w trakcie realizacji, dlatego też sformułowane wnioski są częściowe. W kolejnych etapach badań przeprowadzona zostanie fermentacja metanowa w warunkach termofilnych, wybranej mieszaniny odpadów. Planowane są również dalsze badania nad substratami (m.in. otręby i mieszanki paszowe), które mogłyby być wykorzystane jako ko-substraty dla odpadów takich jak osady z oczyszczalni ścieków mleczarskich i odpady z przetwórstwa owoców.

Zadanie nr 8

Nazwa zadania: 2.2. Opracowanie optymalnych parametrów procesu fermentacji odpadów i osadów – monitoring parametrów fizykochemicznych procesu fermentacji

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W ramach realizacji zadania przeprowadzono badania ciągłej fermentacji wybranych substratów (osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich oraz odpadów owocowych) oraz mieszaniny 1, która wykazała najlepszą wydajność produkcji biogazu w procesie fermentacji okresowej. W badaniach tych starano się określić wpływ zróżnicowanego czasu retencji (a tym samym różnego obciążenia reaktorów substancją organiczną) na przebieg fermentacji. Fermentację prowadzono w reaktorach o objętości 2 dm³, w temperaturze 37°C. Analizując wyniki należy podkreślić niekorzystny stosunek C/N oznaczony w osadach ścieków mleczarskich. Z wyników badań mieszaniny 1, w których ustalono zależność między czasem retencji, obciążeniem fermentora a efektami oczyszczania wynika, że stosunkowo wysoką wydajność biogazu wydzieloną z 1 dm³ objętości komory (ok. 0,45 dm³/d) można uzyskać przy niskim obciążeniu komory substancją organiczną 2,83 kg s.m.o./m³/d oraz wynikającym z tego czasem retencji wynoszącym 39 d. Skracanie czasu retencji do 21 dni spowodowało systematyczne pogarszanie efektów fermentacji, co skutkowało obniżeniem

metanu w biogazie od wartości 62% (czas retencji 39 d) do 44% (czas retencji 21 d). W korelacji z tymi zmianami obserwowano wzrost stężenia kwasów lotnych oraz azotu amonowego. Fermentacja mieszaniny 1 przebiegała stabilnie jeżeli obciążenie fermentora substancją organiczną nie przekroczyło wartości 2,83 kg s.m.o./m³/d. Po przekroczeniu tej wartości obserwowano znaczący wzrost stężenia kwasów lotnych i azotu amonowego, co w powiązaniu z dość wysoką oznaczaną wartością pH może powodować dodatkowy czynnik pogarszający efekt fermentacji.

Analizując uzyskane dane, dotyczące fermentacji osadu ścieków mleczarskich można stwierdzić, że osad ten trudno ulega procesowi fermentacji. Prowadzenie procesu przy niskim obciążeniu fermentora substancją organiczną 2,52 kg s.m.o./m³/d oraz wynikającym z tego czasem retencji, który wyniósł 57 d, spowodowało uzyskanie w ciągu doby z 1 dm³ objętości komory jedynie 0,17 dm³ biogazu o zawartości metanu 52%. Dalsze skracanie czasu retencji powodowało wzrost zarówno LKT, jak i azotu amonowego do wartości odpowiednio 7898 oraz 6064 mg/dm³ dla czasu retencji 29 dni.

Wyniki fermentacji odpadów owocowych wskazują, że substrat ten składem chemicznym zbliżony był do mieszaniny 1, jednak zawierał mniejszą ilość pierwiastków biogenych (azot, fosfor) i był też bardziej uwodniony. Analiza danych wskazuje, że wraz ze wzrostem obciążenia fermentora substancją organiczną obniżała się wydajność biogazu oraz pogarszały się istotne wskaźniki przebiegu procesu. Zadawalającą wydajność biogazu 0,42 dm³/d uzyskano przy czasie retencji 31 dni i obciążeniu fermentora wynoszącym 2,5 kg s.m.o./m³/d. Skracanie czasu retencji oraz wzrost obciążenia fermentora substancją organiczną spowodowało drastyczny spadek ilości wytwarzanego biogazu oraz zawartości w nim metanu. Dla czasu retencji 19 dni i obciążeniu fermentora 5,7 kg s.m.o./m³/d uzyskano z 1 dm³ objętości reaktora jedynie 0,24 dm³/d biogazu, przy zawartości w nim metanu 45%. Biogaz o takiej zawartości metanu nie nadaje się do energetycznego wykorzystania. Również dla tego obciążenia odnotowano drastyczny wzrost stężenia kwasów lotnych do wartości 6408 mg/dm³ oraz spadek wartości pH 4,7.

Badane substraty charakteryzowały się zmienną podatnością na proces fermentacji metanowej. Znaczącą wydajność biogazu można uzyskać jedynie przy długim czasie retencji wynoszącym od 29 dni – mieszanina 1 do 31 dni odpady owocowe.

W miarę skracania czasu retencji od 133 do 19 dni, a tym samym istotnym zwiększeniu obciążenia reaktora substancją organiczną efekt fermentacji systematycznie obniżał się.

Najlepsze wyniki uzyskano podczas fermentacji mieszaniny 1. Wysoką wydajność biogazu dla tej mieszanki substratów, wydzieloną z 1 dm³ objętości komory (ok. 0,45 dm³/d) można uzyskać przy niskim obciążeniu komory substancją organiczną 2,83 kg s.m.o./m³/d oraz wynikającym z tego czasem retencji wynoszącym 39 d. Przy tych parametrach procesu stężenie metanu w biogazie było zbliżone do wartości uzyskiwanych podczas prób okresowych i wynosiło 62%.

Zadanie nr 9

Nazwa zadania: 2.3. Ocena składu konsorcjum mikroorganizmów przeprowadzających poszczególne etapy procesu fermentacji metanowej – identyfikacja mikroorganizmów w masie fermentacyjnej

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W okresie sprawozdawczym podjęto badania oceny sanitarnej masy fermentacyjnej oraz dokonano oceny występowania w tym materiale bakterii i grzybów, wraz z dokonaniem identyfikacji mikroorganizmów z wykorzystaniem technik klasycznych i molekularnych. Badaniami objęto 3 mieszaniny bioodpadów, o następującym składzie: mieszaniny 1: odpady z przetwórstwa owoców (25%) + osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (25%) + kiszonka kukurydziana (12%) + wywar zbożowy (38%); mieszaniny 2: odpady z przetwórstwa owoców (30%) + osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (35%) + kiszonka kukurydziana (8%) + wywar zbożowy (27%); mieszaniny 3: odpady z przetwórstwa owoców (25%) + osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (25%) + kiszonka z trawy (15%) + wywar zbożowy (35%). W masie fermentacyjnej nie stwierdzono obecności jaj pasożytów przewodu pokarmowego oraz bakterii z rodzaju *Salmonella*. W roku sprawozdawczym dokonano identyfikacji bakterii i grzybów wyodrębnionych z masy fermentacyjnej. W tym celu zastosowano test MicroSEQ, oparty na analizie genu 16S rDNA, w przypadku bakterii oraz D2 LSU w przypadku grzybów. Po wyizolowaniu DNA z czystych kultur mikroorganizmów przeprowadzono amplifikację genów z zastosowaniem uniwersalnych starterów dla badanych mikroorganizmów, a następnie przeprowadzono procedurę sekwencjonowania uzyskanych amplikonów. Analiza występowania bakterii w poszczególnych mieszaninach substratów wykazała, że największym zróżnicowaniem gatunkowym charakteryzowała się mieszanina 3, podczas gdy z mieszaniny 1 wyodrębniono tylko 4 gatunki bakterii: *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus amylophilus*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces albidoflavus*. W masie fermentacyjnej 1 dominował *Paenibacillus amylophilus*, natomiast w mieszance 2 *Bacillus circulans*. W mieszaninie 3 dominującym gatunkiem bakterii okazał się *Bacillus mycoides*, charakteryzujący się uodolnieniami proteolitycznymi. W badanej masie fermentacyjnej (we wszystkich 3 mieszankach), wśród dominantów grzybowych, stwierdzono gatunek *Candida krissi*. W mieszaninie 1 stwierdzono również dominujący rozwój gatunku *Penicillium glabrum*, a w 3 *Penicillium camembertii*. Wyodrębnione szczepy bakterii i grzybów zostały zdeponowane w mikrobankach lub są przechowywane na skosach. Uzyskane sekwencje

nukleotydowe wszystkich gatunków są przygotowywane do zdeponowania w GenBanku (NCBI).

Po przeprowadzeniu izolacji DNA z wykorzystaniem metody mechaniczno-biochemicznej (FastPrep) oraz metody opartej na kulkach magnetycznych (MagMAX), nie stwierdzono jednoznacznej przydatności tych metod do ekstrakcji DNA z badanych odpadów. W zależności od odpadu poddawanego ekstrakcji uzyskiwano zróżnicowane stężenie wyizolowanego DNA. Metody te wymagają jeszcze dalszej optymalizacji.

Do dalszych badań nad występowaniem mikroorganizmów w kolejnych fazach fermentacji metanowej wyselekcjonowano wstępnie kilka pożywek, zwłaszcza do hodowli mikroorganizmów beztlenowych, które posłużą do oceny konsorcjum drobnoustrojów zasiedlających masę fermentacyjną: LPBM z resazuryną, mikroelementami i roztworem witamin do hodowli bakterii metanogennych z rodzaju *Methanobacterium*, podłoże LPBM z metanolem do hodowli bakterii *Methanosarcina* oraz podłoże LPBM z mrówczanem sodu do hodowli bakterii *Methanococcus*.

Zadanie jest w trakcie realizacji i będzie kontynuowane. W kolejnych latach trwania projektu badaniami objęta zostanie masa fermentacyjna nie tylko w początkowej fazie fermentacji, ale również w kolejnych etapach prowadzenia procesu. Zgromadzona kolekcja szczepów posłuży do wyselekcjonowania z nich mikroorganizmów o potencjalnych uzdolnieniach do rozkładu celulozy, które zostaną wykorzystane podczas dalszych prac nad opracowaniem biopreparatu.

Zadanie nr 10

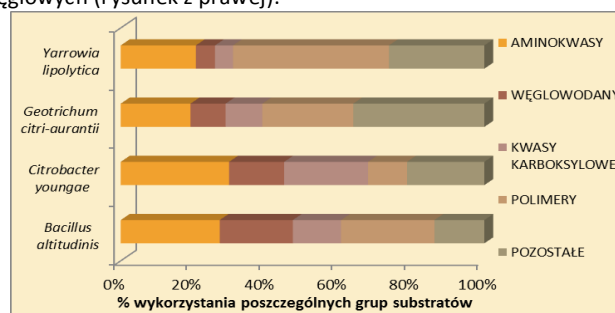
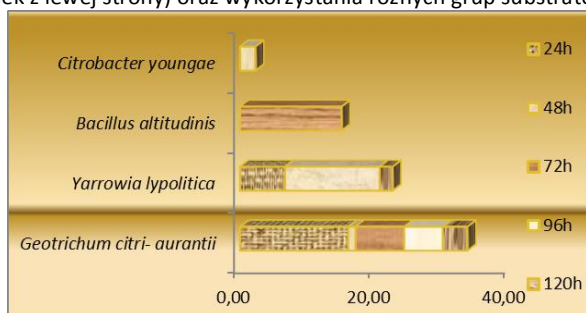
Nazwa zadania: 2.4. Określenie właściwości drobnoustrojów pozyskanych lub wyodrębnionych z masy fermentacyjnej wraz z określeniem ich wpływu na przebieg procesu fermentacji

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W okresie sprawozdawczym przeprowadzono badania wyodrębnionych z masy fermentacyjnej substratów oraz mieszanek bioodpadów bakterii i grzybów w kierunku uzdolnień do rozkładu białka, tłuszczu, skrobi i celulozy. Przeprowadzone badania wykazały, że spośród wyodrębnionych szczepów bakterii aktywność pektynolityczną wykazały: *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus malodoratus*, *Lactobacillus vaccinoferus*, *Paenibacillus amyloliticus* i *Enterococcus durans*. Pozytywne wyniki w stosunku do rozkładu celulozy na testach płytkowych wykazały natomiast szczepy zaklasyfikowane do gatunków: *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus amyloliticus* oraz *Paenibacillus pabuli* oraz dwa niezidentyfikowane szczepy bakterii. Wśród grzybów aktywność celulolityczną wykazały m.in. *Penicillium camembertii*, *Epicoecum nigrum*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma atroviride* oraz 3 niezidentyfikowane szczepy.

Poniżej zaprezentowano wyniki badań dla wybranych szczepów wyodrębnionych z masy fermentacyjnej, dotyczące uzdolnień do rozkładu celulozy (rysunek z lewej strony) oraz wykorzystania różnych grup substratów węglowych (rysunek z prawej).



Wyodrębnione szczepy zidentyfikowano jako: *Bacillus altitudinis*, *Citrobacter youngae*, *Geotrichum citri-aurantii* i *Yarrowia lipolytica*. Stwierdzono znaczne różnice w wykorzystaniu poszczególnych substratów węglowych przez badane mikroorganizmy. Wykazały one potencjalną aktywność w degradacji celulozy, zwłaszcza szczep *Geotrichum citri-aurantii*.

Na podstawie analizy właściwości mikroorganizmów wyodrębnionych z masy fermentacyjnej stwierdzono potencjalną wartość aplikacyjną niektórych izolatów w degradacji złożonych związków organicznych (polisacharydów, białek i tłuszczu). Wyodrębnione mikroorganizmy wykorzystywały proste związki organiczne z grupy aminokwasów i polimerów jako źródła C i energii. Przeprowadzone badania wskazują na potencjalną przydatność badanych szczepów w degradacji złożonych związków organicznych, jednak konieczne są jeszcze dalsze badania nad możliwością ich praktycznego wykorzystania w opracowaniu biopreparatu.

Zadanie jest w trakcie realizacji i będzie kontynuowane w dalszych etapach realizacji projektu. Uzyskane wyniki wykorzystywane są w optymalizacji składu pożywek indukcyjnych. Na podstawie analizy wykorzystania substratów węglowych z poszczególnych grup: aminokwasów, węglowodanów, kwasów karboksylowych, polimerów oraz amin i amidów zostaną zoptymalizowane podłoża do syntezy pożądaných enzymów, które zostaną wykorzystane w opracowywanym biopreparacie.

Zadanie nr 11

Nazwa zadania 2.5. Opracowanie innowacyjnego biopreparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

Jednym z głównych składników biomasy roślinnej, w tym bioodpadów, jest celuloza. Mikroorganizmy, ze względu na rozbudowany kompleks enzymatyczny pełnią ważną rolę w biokonwersji złożonych połączeń organicznych, w tym celulozowych, do cukrów redukujących. Rozkład celulozy jest jednym z kluczowych etapów podczas procesu fermentacji metanowej, ponieważ jest ona substratem wysokoenergetycznym, a brak rozkładu celulozy ogranicza produkcję metanu. Wysoki stopień hydrolizy celulozy występującej w bioodpadach wymagany jest do zwiększenia wydajności produkcji biogazu. Dlatego też poszukiwanie szczepów bakterii i grzybów, posiadających uzdolnienia do degradacji tego polimeru jest elementem strategicznym procesu fermentacji metanowej. Celuloza jest biopolimerem, w rozkładzie którego uczestniczy efektywny układ enzymatyczny, złożony z hydrolaz typu endo- i egzoglukanaz oraz β -glukozydazy. Badania skринingowe szczepów mikroorganizmów wyodrębnionych z substratów oraz masy fermentacyjnej, miały na celu wyselekcjonowanie efektywnych producentów celulaz, które będą wykorzystane do opracowania preparatu do optymalizacji procesu fermentacji metanowej. Uzyskane wstępne wyniki badań wykazały, że wszystkie badane szczepy bakterii i grzybów, wykazały najwyższe aktywności celulolityczne na wzbogaconym podłożu płynnym (CELU1), zawierającym celulozę oraz inne komponenty (m.in. mąkę sojową, laktozę oraz mikroelementy). W wyniku analiz stwierdzono, że podłoże mineralne z celulozą (MA) nie nadaje się do produkcji celulaz przez badane szczepy mikroorganizmów. Większość przebadanych szczepów nie wykazała aktywności podczas hodowli na wymienionym podłożu. Na podstawie wstępnych wyników badań, w przypadku szczepów grzybowych należy rozważyć wykorzystanie podłoża stałego (SSF) do syntezy celulaz. Użycie tego wariantu podłoża może przyczynić się do redukcji kosztów podczas produkcji preparatu. Przeprowadzone badania wykazały, że większość badanych szczepów wykazała największą aktywność pomiędzy 3 a 6 dniem hodowli. Na podstawie przeprowadzonych badań do dalszych testów zostaną wykorzystane następujące szczepy grzybów: GOK-1/11, G110/11, G49/11 oraz następujące szczepy bakterii: B23/11, B45/11, B51/11, B69/11 oraz B71/11.

Przeprowadzone badania dotyczące oceny aktywności celulolitycznej szczepów grzybów pozyskanych z kolekcji ŁOCK 105: *Cheatomium globosum*: ŁOCK 0472 oraz 0477, *Aspergillus oryzae* ŁOCK 0445, *Trichoderma viride* ŁOCK 0570, *Trichoderma lignorum* ŁOCK 0567, *Streptomyces* sp. ŁOCK 0894, *Strptomycetes roseochromogenes* ŁOCK 0892 nie potwierdziły aktywności celulolitycznej w/w szczepów na zastosowanych podłożach indukcyjnych (SSF, MA, CELU1).

Ze względu na fakt, że drożdże *Y. lipolytica* wyróżniają się wysoką aktywnością proteolityczną i są zdolne do syntezy i wydzielania proteaz zewnątrzkomórkowych: serynowej i aspartylowej w roku sprawozdawczym przeprowadzono ocenę aktywności proteolitycznej dwóch szczepów tych mikroorganizmów wyodrębnionych z osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich. Ponadto, drożdże *Y. lipolytica* wykazują zdolności do wykorzystywania triacylogliceroli jako źródła węgla. Syntetyzują lipazy zewnątrzkomórkowe, związane ze ścianą komórkową oraz wewnątrzkomórkowe. Dlatego też przeprowadzone badania obejmowały określenie aktywności lipolitycznej w/w szczepów drożdży *Y. lipolytica*. Najwyższe aktywności proteolityczne już po 24h hodowli wykazywały płyny pohodowlane uzyskane w wyniku hodowli drożdży na podłożu KP, zawierającym kazeinę i produkty odpadowe przemysłu tłuszczowego zawieszane w wodzie. Po 48h hodowli wyższą aktywność proteolityczną odnotowano również w hodowłach prowadzonych na podłożu KP w pH 7,5. Aktywności lipolityczne pozostawały na bardzo niskim poziomie.

Spośród enzymów hydrolizujących, syntetyzowanych przez grzyby strzępkowe, na szczególną uwagę zasługują enzymy pektynolityczne. Ich stosowanie ułatwia i przyspiesza degradację produktów odpadowych, zwłaszcza pochodzących z przetwórstwa owocowego, ułatwiając rozwój bakterii metanogennych w masie fermentacyjnej. Szczepy *Aspergillus* sp. są jednymi z najlepiej poznanych i szeroko opisanych producentów enzymów pektynolitycznych. Praktyczne zastosowanie pektynolitycznych enzymów grzybowych wymaga jednak znacznej intensyfikacji procesów biosyntezy, które są bezpośrednio związane z warunkami hodowli, a przede wszystkim ze składem podłoża hodowlanego. W związku z tym w ramach projektu podjęto próbę oceny wpływu składu podłoża hodowlanego na biosyntezę enzymów pektynolitycznych przez wybrane, środowiskowe szczepy grzybów z rodzaju *Aspergillus*, pochodzące z kolekcji mikroorganizmów ZPOW „PEKTOWIN”. Otrzymane wyniki wykazały, że aktywności enzymów pektynolitycznych (poligalakturonazy i pektynoesterazy) wyizolowanych szczepów zależne były od rodzaju zastosowanego podłoża. W przypadku obu badanych enzymów najwyższe aktywności uzyskano stosując podłoże stałe. Najlepszym producentem pektynoesterazy okazał się szczep 375-1, natomiast najwyższe wartości poligalakturonazy wykazał szczep 304-1. Najwyższe wartości enzymatyczne dla powyższych grzybów uzyskano odpowiednio: czwartego i trzeciego dnia hodowli. Otrzymane wyniki mogą stanowić podstawę do praktycznego zastosowania badanych mikroorganizmów w procesie degradacji odpadów pektynowych.

W okresie sprawozdawczym przeprowadzono również badania obejmujące określenie i porównanie aktywności proteolitycznej i celulolitycznej wybranych, naturalnych izolatów grzybowych z rodzaju *Aspergillus*, pochodzących z kolekcji mikroorganizmów ZPOW „PEKTOWIN”. W hodowłach

przewodzonych w systemie SSF (Solid-State Fermentation) z udziałem grzybów *Aspergillus* sp. najwyższą aktywność proteolityczną i celulozową wykazał szczep 377-4. Wzrost aktywności hydrolitycznych obu badanych enzymów zaobserwowano odpowiednio: w 96 i 72 godzinie hodowli. W trakcie hodowli w wszystkich analizowanych mikroorganizmach aktywność celulozowa pozostawała jednak na niskim poziomie. Badane szczepy wykazały potencjalną wartość aplikacyjną w odniesieniu do syntezy proteaz grzybowych.

Przeprowadzone badania będą kontynuowane w kolejnych latach realizacji projektu, w celu wyodrębnienia najbardziej aktywnych izolatów bakterii i grzybów, które zostaną wykorzystane do opracowania bardziej efektywnego biopreparatu. Badania obejmą również optymalizację hodowli potencjalnych producentów enzymów oraz optymalizację warunków działania opracowanego preparatu.

Zadanie nr 12

Nazwa zadania: 2.6. Określenie wpływu biopreparatu na przebieg procesu fermentacji metanowej wybranych substratów

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

Realizacja zadania rozpoczęła się pod koniec roku 2012, dlatego też dotyczyła w głównej mierze doboru oraz dopracowania metodyki badawczej, w celu określenia oddziaływania biopreparatu na pierwszy etap procesu fermentacji metanowej – etap hydrolizy. Przegląd dostępnej literatury oraz wstępne badania umożliwiły dokonanie wyboru metod badawczych, które będą następujące podczas dalszych etapów realizacji zadania: określenie zawartości suchej masy, substancji organicznej, zawartości lotnych kwasów tłuszczowych, azotu amonowego i jonów fosforanowych w próbkach kontrolnych masy fermentacyjnej oraz próbkach tej samej masy poddanej działaniu preparatu. Do oceny zawartości cukrów redukujących, zastosowano metodą z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS), celulozy – oznaczenie polegające na rozpuszczeniu lignin i hemiceluloz w kwasie azotowym i zasadzie sodowej, a następnie na wagowym określeniu udziału procentowego uzyskanej celulozy w suchej masie materiału, lignin i hemiceluloz na podstawie ich scukrzenia do cukrów prostych i ich oznaczeniu oraz pektyn metodą wagową. W roku sprawozdawczym założony został eksperyment, w którym zastosowano mieszaninę 1, o następującym składzie bioodpadów: odpady z przetwórstwa owoców (25%) + osad z oczyszczalni ścieków mleczarskich (25%) + kiszonka kukurydziana (12%) + wywar zbożowy (38%). Mieszaninę odpadów poddano działaniu preparatu o aktywności celulozowej pozyskanego ze szczepu grzyba z rodzaju *Trichoderma*, wyodrębnionego z masy fermentacyjnej osadu z oczyszczalni ścieków mleczarskich. Obiekt kontrolny stanowiły odpady nie poddane działaniu preparatu. W ramach wymienionego eksperymentu zostaną zbadane omówione wyżej parametry.

Zadanie jest w trakcie realizacji i będzie kontynuowane w kolejnych latach realizacji projektu. Ze względu na rozpoczęcie realizacji zadania w IV kwartale 2012 roku, na podstawie wstępnych badań, nie można sformułować jeszcze wniosków nad oddziaływaniem biopreparatu na proces fermentacji metanowej.

Zadanie nr 13

Nazwa zadania: 2.7. Zbadanie składu chemicznego biogazu

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W ramach wymienionego zadania w okresie sprawozdawczym zbadano skład biogazu pojedynczych substratów, które poddawane były mezofilnej fermentacji okresowej. Fermentacja beztlenowa odpadowej biomasy wykazała, że skład biogazu pod względem zawartości metanu we wszystkich badanych próbach był zbliżony, a jego wartość wynosiła ok. 56%. Na uwagę zasługuje stwierdzona w biogazie, otrzymanym w wyniku fermentacji wywaru zbożowego, znacząca zawartość siarkowodoru – wynosiła ona 839 ppm, co wymusza konieczność jego odsiarczenia w przypadku energetycznego wykorzystania. Spośród badanych substratów (osad ścieków mleczarskich, odpady owocowe, kiszonka kukurydziana, kiszonka z trawy, wywar zbożowy) najwyższą wydajność metanu z 1 kg s.m.o. – 314,16, dm³, uzyskano poddając fermentacji metanowej kiszonkę z kukurydzy.

W ramach niniejszego zadania określono również skład biogazu uzyskanego z trzech mieszanin substratów (skład mieszanin – zadanie 7), poddanych okresowej fermentacji beztlenowej. Najlepszą w porównaniu z badanymi mieszaninami wydajność metanu z 1 kg s.m.o. – 402,81 dm³, uzyskano poddając fermentacji mieszaninę 1. Dla tej mieszaniny stwierdzono również najwyższe stężenie metanu w biogazie – 64%. Analizując dobowe zmiany wydajności biogazu można zauważyć, że wszystkie analizowane próby wykazały najwyższą wydajność biogazu w 3 dobie trwania fermentacji, po tym czasie wydajność biogazu we wszystkich próbach systematycznie malała, aż do 35 doby, w której zakończono proces. Fermentacja metanowa mieszaniny 1 pozwalała uzyskać wartość metanu wyższą o ok. 28% od uzyskanej podczas fermentacji kiszonki z kukurydzy.

Przedstawione wyniki są wstępnymi rezultatami, otrzymanymi w ramach niniejszego zadania i będą kontynuowane w kolejnych latach jego realizacji. Podkreślić należy, że skład biogazu uzależniony jest nie tylko od rodzaju fermentowanych substratów, ale również zależy od składu i

jednorodności poszczególnych partii surowca.

Zadanie nr 17

Nazwa zadania: 4. Opracowanie wyników i przygotowanie publikacji

Status zadania: w trakcie realizacji

Opis rezultatów:

W okresie sprawozdawczym zostały opracowane i opublikowane dwie prace przeglądowe, dotyczące wykorzystania procesu fermentacji metanowej w unieszkodliwianiu odpadów organicznych. Ponadto, opracowano wyniki badań dotyczące kompleksowej charakterystyki mikrobiologicznej i chemicznej substratów przeznaczonych do unieszkodliwienia w procesie fermentacji metanowej. Opracowano też częściowe wyniki dotyczące charakterystyki metabolicznej bakterii i grzybów wyodrębnionych z odpadów i masy fermentacyjnej. Ponadto, w okresie sprawozdawczym rozpoczęto opracowywanie wstępnych wyników badań, dotyczących opracowania biopreparatu. W okresie sprawozdawczym zostały opracowane cząstkowe sprawozdania z przeprowadzonych analiz w ramach w/w zadań badawczych.

6.2 Spis publikacji powstałych w ramach Projektu (tytuł, autorzy, wydawnictwo – nazwa, tom , rok)

1. Ziemiński K., Frąc M., 2012, Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. African Journal of Biotechnology, 11, 18: 4127-4139. (15 pkt.) – IF 0,570
2. Frąc M., Ziemiński K., 2012, Methane fermentation process for utilisation of organic waste: a review. International Agrophysics. 26, 1: 317-330. (20 pkt.) – IF 1,574

6.3 Inne formy upowszechniania wyników badań (np. udział w konferencjach, sympozjach, wdrożenia), rok

1. Frąc M., Oszust K., Siczek A., Szarlip P., 2012, Methane fermentation process for utilization of organic waste: biogas-profitability study for chosen substrates. 1st International World Congress, 14-15.02.2012. Dubai, U.A.E. (Prezentująca: M. Frąc).
2. Frąc M., Oszust K., Siczek A., 2012, Charakterystyka mikrobiologiczna wybranych odpadów organicznych, 46. Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Mikrobiologia w ochronie zdrowia człowieka i środowiska”, Bydgoszcz, 3-6.06.2012: 50-51.
3. Frąc M., Oszust K., Siczek A., Pastor M., 2012, Isolation, identification and screening of cellulolytic microorganisms from soil and organic waste. 4th International Congress EUROSIL 2012, 2-6.07. 2012, Bari, Włochy, str. 2145.
4. Frąc M., Pawlik A., Oszust K., Gryta A., 2012, Ocena aktywności pektynolitycznej środowiskowych szczepów *Aspergillus* sp. na wybranych podłożach indukcyjnych. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Odpady organiczne – problemy i sposoby zagospodarowania”, Falenty 20-21 września 2012, str. 33.
5. Oszust K., Frąc M., Siczek A., 2012, Biochemical potential and molecular identification of microorganisms isolated from soil and different organic wastes. 4th International Congress EUROSIL 2012, 2-6.07. 2012, Bari, Włochy, str.2131.
6. Pawlik A., Frąc M., Oszust K., Siczek A., 2012, Dynamika zmian aktywności proteolitycznej i celulolitycznej szczepów *Aspergillus* sp. na podłożu zawierającym produkty odpadowe przemysłu spożywczego. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Odpady organiczne – problemy i sposoby zagospodarowania”, Falenty 20-21 września 2012, str. 55.

6.4 Informacja o patentach, zgłoszeniach patentowych, licencjach, czy wdrożeniach będących wynikiem projektu, rok

-

6.5 Informacja o działaniach promocyjnych zgodnie z umową na wykonanie projektu

(dotyczy: informowania opinii publicznej o tym, że realizacja Projektu została sfinansowana przez Centrum – podać datę i miejsce zamieszczenia informacji, sposób informowania)

W ramach działań promocyjnych ukazały się następujące informacje:

- 16.07.2012 r. - strona internetowa <http://www.naukawpolsce.pap.pl> – Grzyby pomogą w degradacji odpadów - informacja o badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu realizowanego, w Programie LIDER i finansowaniu projektu przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

-16.07.2012 r. – Ekologia i Rynek (<http://ekologiairynek.pl>) – Grzyby pomogą w degradacji odpadów - informacja o badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu realizowanego, w Programie LIDER i finansowaniu projektu przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

-18.07.2012 r. – MNiSW (<http://www.nauka.gov.pl/nauka/sukcesy-uczonych/sukcesy-uczonych/arttykul/grzyby-pomoga-w-degradacji-odpadow/>) – Grzyby pomogą w degradacji odpadów - informacja o badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu realizowanego, w Programie LIDER i finansowaniu projektu przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

-20.07.2012 r. – strona internetowa <http://www.podyplomowe-studia.edu.pl> – informacja o realizacji projektu i badaniach w ramach programu LIDER, finansowanego przez NCBiR

-20.07.2012 r. – strona internetowa – Nasza Ziemia: <http://www.naszaziemia.pl> – informacja o realizacji projektu i badaniach w ramach programu LIDER, finansowanego przez NCBiR

-21.10.2012 r. – Dziennik wschodni - Oni wymyślą, my skorzystamy. Wynalazki lubelskich naukowców – informacja o badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu wraz z podaniem źródła finansowania badań: NCBiR, Program LIDER

-03.11.2012 r. – Dziennik wschodni - Nad czym będą pracować lubelscy naukowcy? – informacja o badaniach realizowanych w ramach niniejszego projektu

-31.12.2012 r. – Odpady i Środowisko – Grzyby skuteczne w degradacji odpadów – wywiad na temat badań prowadzonych w ramach niniejszego projektu