

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE
MIKROBIOLOĢIJAS UN BIOTEHNOLOĢIJAS KATEDRA

DABISKU MIKROORGANISMU ASOCIĀCIJU
IZMANTOŠANA BIOŪDENRAŽA IEGŪŠANAI NO
GLICERĪNA

Maģistra darbs

Autors: Lauma Kalniņa

Stud. apl. Nr. lk12106

Darba vadītājs: Dr. biol., asoc.prof. Vizma Nikolajeva

RĪGA 2017

SATURS

Ievads	5
1.Literatūras apskats.....	6
1.1.Bioūdeņraža iegūšana.....	6
1.2.Substrāti bioūdeņraža iegūšanai	9
1.3.Jēlglicerīna fermentācija	10
1.4.Jēlglicerīnu metabolizējošie mikroorganismi	12
2.Materiāli un metodes.....	14
2.1.Materiāli	14
2.2.Metodes	16
2.2.1.Fermentācijas eksperiments	16
2.2.2.Gāzu procentuālā sastāva noteikšana	16
2.2.3.Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana	16
2.2.4.Šķidrums hromatogrāfija	17
2.2.5.Mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību skaita noteikšana	17
2.2.6.Dominējošo sugu identifikācija	17
2.2.7.Fluorescentā <i>in situ</i> hibridizācija	18
2.2.8.Datu statistiskā apstrāde	20
3.Rezultāti un diskusija	21
3.1.Fermentācijas gāzu sastāvs	21
3.2.Mikroorganismu populāciju dinamika	23
3.3.Kultivējamo mikroorganismu skaits un dominējošās sugas	26
3.4.Ķīmiskais skābekļa patēriņš un pH	30
3.5.Šķidrums hromatogrāfijas rezultāti.....	32
3.6.Ūdeņraža iznākums	34
Secinājumi.....	36
Pateicības.....	37
Izmantotā literatūra	38

KOPSAVILKUMS

Ražojot ūdeņradi no jēlglicerīna anaerobajā fermentācijā, iegūst atjaunojamu enerģijas nesēju, kā arī lietderīgi izmanto atkritumproduktu – jēlglicerīnu.

Šajā darbā pētīta dabisku mikroorganismu asociāciju – ezera dūņu spēja izmantot jēlglicerīnu ūdeņraža producēšanai, izvērtēta 20°C un 37°C temperatūras ietekme, kā arī salīdzināta jēlglicerīna un analītiskā glicerīna ietekme uz ūdeņraža iznākumu. Ar masspektrometriju noteikts gāzu sastāvs. Izmantojot mikrobioloģiskās analīzes, noteikta populāciju dinamika un identificētas dominējošās sugas. Novērtēta organisko vielu koncentrācija un sastāvs ar šķidrums hromatogrāfiju un ar ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšanu. Noskaidrots, ka visvairāk ūdeņraža tiek iegūts 37°C, dominējot Clostridia klases baktērijām neatkarīgi no glicerīna veida.

Šajā darbā sniegts arī teorētisks ieskats par bioūdeņraža iegūšanu un izmantotajiem substrātiem, aprakstīta jēlglicerīna fermentācija un to metabolizējoši mikroorganismi.

Atsēgas vārdi: ūdeņradis, jēlglicerīns, ezera dūņas, fermentācija.

SUMMARY

Hydrogen production from glycerol by natural microbial communities

By microbiological hydrogen production from crude glycerol not only we obtain renewable energy carrier, but we also utilize waste product – crude glycerol.

In present study were analyzed the production of hydrogen from crude glycerol by natural microbial communities – lake sludge at 20°C and 37°C. Effect of crude glycerol and analytical glycerol on the outcome of hydrogen was compared. Further analysis to determine the gas composition was made using gas mass spectrometry, population dynamic was determined and the dominant species were identified using microbiological analysis. Quantity and composition of organic compounds was estimated with liquid chromatography and chemical oxygen demand. It was found that most hydrogen was produced at 37°C prevailing bacteria from class Clostridia regardless of the type of glycerol.

This work also provided a theoretical insight into bio-hydrogen production and used substrates, crude glycerol fermentation and microorganisms which metabolize glycerol were described.

Keywords: hydrogen, crude glycerol, lake sludge, fermentation.

IEVADS

Ūdeņradis tiek uzskatīts par vienu no videi draudzīgām alternatīvām fosilajiem energoresursiem. Pašlaik tiek meklēti iespējami efektīvāki, vidi nepiesārņojoši un lēti ūdeņraža iegūšanas veidi un resursi - viens no tiem ir ūdeņradi ražojošie mikroorganismi. Daudzi mikroorganismi ir spējīgi veikt tumsas fermentāciju anaerobos apstākļos un pārveidot organisko substrātu, kur kā blakusprodukts tiek izdalīta H₂ gāze. Šie metabolisma ceļi ir izpētīti un to princips ir zināms, taču limitējošais faktors ir nelielā mikroorganismu produktivitāte, kas liedz izmantot ūdeņraža gāzi plašos, rūpnieciskos apjomos. Nepieciešamas jaunas un uzlabotas metodes ūdeņraža iegūšanai no atjaunojamiem enerģijas resursiem (Hallenbeck and Ghosh 2009, Yang et al. 2012).

Pētot dažādu faktoru ietekmi uz ūdeņraža iegūšanu fermentācijā, visbiežāk lieto mikroorganismu tīrkultūras. Bet visticamāk, dažādu kompleksu substrātu fermentācijai izdevīgāk būtu izmantot dabiskas, jauktas mikroorganismu asociācijas, piemēram, ezera dūņas.

Biodīzelis ir alternatīva no naftas iegūtu degvielu aizstāšanai. No rapšiem ražotās biodegvielas ieguves procesā kā atkritumprodukts rodas glicerīns ar piemaisījumiem. Glicerīnu var pievienot biomasai anaerobās fermentācijas reaktoros ūdeņraža iegūšanai (Yazdani et al. 2007). Anaerobās fermentācijas blakusprodukts – digestāts var tikt izmantots lauksaimniecībā kā mēslojums (Makàdi et al. 2012).

Mērķis - pētīt dabisku mikroorganismu asociāciju izmantošanas iespējas ūdeņraža iegūšanai glicerīna fermentācijas procesos.

Uzdevumi

1. Novērtēt ezera dūņu ūdeņraža producēšanas spējas 20°C un 37°C temperatūrā.
2. Analizēt fermentācijas gāzu procentuālo sastāvu, jēlglicerīna un analītiskā glicerīna ietekmi uz to.
3. Novērtēt ezera dūņu spēju fermentēt glicerīnu, izmantojot šķidrums hromatogrāfiju un nosakot ķīmisko skābekļa patēriņu.
4. Noteikt populāciju dinamiku pēc FISH, kultivējamo mikroorganismu kopskaitu un izolēt un identificēt dominējošās sugas.

Darbs izstrādāts LU Bioloģijas fakultātes Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedrā un LU Cietvielu fizikas institūta Ūdeņraža enerģētikas materiālu laboratorijā laika posmā no 2015. gada novembra līdz 2017. gada maijam.

1.LITERATŪRAS APSKATS

1.1.Bioūdeņraža iegūšana

Ūdeņradi, kas radies bioloģisku procesu rezultātā, sauc par bioūdeņradi. Turklāt tā ražošanai var tikt izmantoti atjaunojamie dabas resursi, piemēram, dažādi bioloģiski sadalāmi atkritumi (Demirbas 2009). Bioūdeņraža iegūšanas metožu galvenās grupas (1. tabula): tiešā biofotolīze, netiešā biofotolīze, fotofermentācija un tumsas fermentācija (Rai 2016).

1. tabula.

Bioūdeņraža iegūšanas metodes (Nath, Das 2004).

Table 1

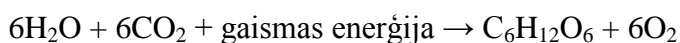
Biohydrogen production processes (Nath, Das 2004).

Bioloģiskais process	Mikroorganismi	Priekšrocības	Trūkumi
Tiešā biofotolīze	Zaļalģes	Iegūst ūdeņradi tieši no saules un ūdens Saules enerģijas izmantošana ir desmitkārtīga salīdzinot ar kokiem, graudaugiem	Nepieciešama augstas intensitātes gaismas O ₂ negatīvi ietekmē sistēmu
Netiešā biofotolīze	Cianobaktērijas	Ražo H ₂ tieši no ūdens Spēja fiksēt N ₂ no atmosfēras	Zemāka fotoķīmiskā efektivitāte Gāzu sastāvā ir aptuveni 20% O ₂ O ₂ inhibē nitrogenāzi
Fotofermentācija	Fotosintezējošās baktērijas	Var izmantot plaša spektra gaismas enerģiju Izmanto dažādus atkritumus, piemēram, spirta ražošanas notekūdeņus	Gaismas konversijas efektivitāte ir ļoti zema, tikai 1 līdz 5% O ₂ ir spēcīgs hidrogenāzes inhibitors
Tumsas fermentācija	Anaerobi fermentējošās baktērijas	Ražo H ₂ bez gaismas Oglekļa avotu daudzveidība Producē vērtīgus metabolītus Anaerobo procesu neietekmē O ₂	Relatīvi zems H ₂ iznākums No gāzu maisījuma jāatdala CO ₂

Tiešā biofotolīze ir ūdeņraža iegūšana tiešā gaismas klātbūtnē fotosintēzes II kompleksā, kurā no ūdens tiek atšķeltas skābekļa molekulas, bet ūdeņraža joni ar

hidrogenāzes enzīma palīdzību tiek pārveidoti stabilā H₂ formā (2H₂O→2H₂+O₂). Šis process ir bieži sastopams dažādās zaļajās. Rūpnieciskajā ieguvē ļoti svarīga nepārtraukta gāzes ražošana un ir jānodrošina zems skābekļa piesātinājums līdz pat 0,1%, jo skābeklim ir inhibējoša ietekme uz hidrogenāzes enzīma aktivitāti. Vēl nepieciešama stingra apgaismojuma kontrole un nepārtraukta gāzu aizvadīšana, lai sasniegtu nepieciešamo skābekļa piesātinājuma līmeni. Šo apstākļu dēļ tiešās biofotolīzes izmantošana, lai vairumā ražotu ūdeņraža gāzi, ir ekonomiski neizdevīga un tehnoloģiski neefektīva. Zhang et al. (2002) apraksta tiešās biofotolīzes rūpniecisku izmantojumu aļģu audzēšanai vidē ar sēra trūkumu. Sēra trūkums noved pie organisko savienojumu sintēzes apstāšanās un inhibē Kalvina ciklu, tāpēc visa liekā gaismas enerģija tiek izmantota H₂ producēšanā. Skjanes et al. (2007) apraksta variantu tiešās biofotolīzes rūpnieciskam izmantojumam aļģu audzēšanai vidē ar sēra trūkumu. Pēc šīs metodes sākotnēji aļģes tiktu audzētas dabiskos apstākļos, kad sasniegts pietiekami liels biomasas daudzums, tās tiktu pārvietotas uz vidi ar sēra trūkumu, kur notiktu aktīva H₂ sintēze un savākšana. Šis process teorētiski šķiet vienkāršs un izdevīgs atjaunojama ūdeņraža ieguves veids, taču ir daudzi neizpētīti rādītāji, kas ietekmē aļģu augšanu un produktivitāti, lai tiktu uzsākta plaša rūpnieciska darbība (Nath, Das 2004, Márquez-Reyes et al. 2015).

Netiešās biofotolīzes process atšķiras no tiešās biofotolīzes ar to, ka skābekļa un H₂ ražošana ir savstarpēji atdalītas un nenorit vienlaicīgi. Šis process sastāv no diviem secīgiem procesiem - vispirms norit fotosintēze, kuras laikā elektroni tiek izmantoti CO₂ reducēšanai, veidojot organiskus savienojumus, bet pēc tam elektroni tiek atgūti organiskā savienojuma noārdīšanas laikā un izmantoti ūdeņraža producēšanai.



Dažas zaļajās un ciānobaktērijas, piemēram, *Anabaena variabilis*, *A. azollae* un *Oscillatoria limosa*, ūdeņradi veido netiešās biofotolīzes laikā. Galvenais trūkums šim biofotolīzes veidam ir resursu daudzums, kas nepieciešams, lai uzsāktu ražošanu (Pilon, Berberoglu 2014).

Trešais veids – fotofermentācija. Tas ir process, kura laikā baktērijas, izmantojot gaismas enerģiju, anaerobos apstākļos oksidē organiskus savienojumus, veidojot ūdeņradi un ogļskābo gāzi:



Šis process ir sastopams dažādās fotosintezējošās baktērijās, piemēram, *Rhodobacter sphaeroides* (Basak, Das 2009). Fotofermentācijā ūdeņraža producēšanu katalizē enzīms nitrogenāze (Luque 2011). Šajā procesā, atšķirībā no netiešās biofotolīzes, tiek izmantoti citu organismu fotosintēzes procesā veidotie organiskie savienojumi, par elektronu donoru un

substrātu kalpo dažādas organiskās skābes, ciete un celuloze (Pilon, Berberoglu 2014). Pamatā ir gaismas enerģijas izmantošana ATP reģenerācijā un lādētu elektronu ieguvē, kas reducē ferredoksīnu. Pēc tam reducētais ferredoksīns kopā ar ATP enerģiju tiek izmantots kopā ar enzīmu nitrogenāzi, lai pārveidotu ūdeņraža jonus stabilā H₂ formā (Hallenbeck et al. 2009). Lielākais pluss šim ražošanas veidam ir tas, ka substrāts tiek pilnībā pārveidots par H₂ un CO₂ bez blakusproduktu veidošanās, taču, lai nodrošinātu enzīma nitrogenāzes darbību, ir nepieciešams relatīvi liels ATP daudzums, kas ir enerģētiski neizdevīgs process (Basak, Das 2009). Šim un iepriekš apskatītiem bioūdeņraža ieguves veidiem ir viens kopīgs trūkums – produkta iegūšanai nepieciešama gaismas intensitātes kontrole (Nath, Das 2004).

Ceturtais veids ir tumsas fermentācija. Šajā procesā ūdeņradis veidojas anaerobos apstākļos no ogļhidrātus saturoša substrāta (Levin et al. 2004). Atšķirībā no fotofermentācijas, ūdeņraža producēšanu katalizē enzīms hidrogenāze (Luque 2011). Šī fermentācija raksturīga vairākām baktērijām, piemēram, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* (Martinez-Merino et al. 2013) un *Clostridium butyricum* (Lee et al. 2012). Šīs fermentācijas lielākā priekšrocība ir tā, ka tā ir pilnībā neatkarīga no gaismas klātbūtnes un ūdeņraža ražošana var notikt nepārtraukti. Kā substrāts var tikt izmantoti dažādi ogļhidrāti, kā arī notekūdeņi un citi atkritumprodukti, kas veidojas saimnieciskā darbībā. Ar šī procesa palīdzību tie var tikt pārveidoti un izmantoti atjaunojamās enerģijas radīšanā. Taču šim fermentācijas veidam arī ir vairāki trūkumi, kas ir jāpārvar, lai iegūtu maksimālo ūdeņraža producēšanas apjomu. Tumsas fermentācijas ceļā ir iespējami relatīvi mazi H₂ iznākumi, kā arī radītā gāze nav tīrs ūdeņradis, bet gāzu maisījums, kas satur lielu daudzumu CO₂ un citas gāzes. Fermentācijā rodas ievērojams daudzums organisko skābju un/vai spirtu, ko tālāk var izmantot fotofermentējošās baktērijas, lai kopumā iegūtu lielāku H₂ iznākumu (Sinha et al. 2015).

Daudzi autori min vēl piekto bioūdeņraža iegūšanas veidu - apvienotās jeb hibrīdās sistēmas. Tumsas reakcijās izveidotie spirti un skābes tiek noārdīti līdz CO₂ un H₂ ar fotofermentējošu mikroorganismu palīdzību. Šajā procesā tiek audzētas jauktas baktēriju kultūras ar dažādiem fermentācijas tipiem. Tumsas fermentācijas fakultatīvi anaerobie organismi veido mazmolekulāras skābes, kuras pēc tam izmanto foto-fermentācijas organismi metabolisma procesos, kur tiek izdalīts CO₂ un H₂ (Yokoi et al. 1998, Manish and Banerjee 2007):

1. solis - Tumsas fermentācija $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COOH + 2CO_2 + 4H_2$
2. solis - Foto fermentācija $2CH_3COOH + 4H_2O \rightarrow 8H_2 + 4CO_2$

Šis veids ļauj pilnībā izmantot substrāta izejvielas un spēj saražot līdz par 12 mol ūdeņraža no vienas glikozes molekulas un pašlaik šim veidam ir vislielākās perspektīvas, lai

radītu lielus apjomus ekonomiski izdevīga bioūdeņraža, kā to pierādījuši dažādi eksperimenti ar jauktām baktēriju kultūrām (Kim et al. 2001).

1.2.Substrāti bioūdeņraža iegūšanai

Ūdeņraža iegūšanai tumsas fermentācijā visbiežāk izmanto cukuru saturošos substrātus - glikozi, ksilozi, saharozi - oglekļa un enerģijas avotus. Monosaharīdi fermentējošajās baktērijās tiek šķelti Embdena-Meijerhofa-Parnasa glikolīzes ceļā līdz piruvātam. Obligāti anaerobās baktērijas izmanto piruvāt-ferredoksīna oksidoreduktāzi, bet nosacīti anaerobās baktērijas izmanto formiāta hidrogēnliāzes kompleksu, lai tālāk sadalītu piruvātu par formiātu vai veidotu acetil-koenzīmu A (Hallenbeck 2005, Hallenbeck and Ghosh 2009).

Fermentācijā izmantojot ogļhidrātus saturošus atkritumus vai notekūdeņus, iespējams lietderīgi izmantot nevēlamus atkritumproduktus un iegūt H_2 . Trīs lielas fermentācijā izmantojamo atkritumu grupas: lauksaimniecības atkritumi, lopkopības atkritumi un pārtikas rūpniecības atkritumi un notekūdeņi (Kapdan and Kargi 2006). Pārtikas rūpniecības notekūdeņi un atkritumi parasti ir bagāti ar ogļhidrātiem, tie ir mikroorganismiem viegli degradējami, tāpēc tie ir piemērots substrāts ūdeņraža iegūšanai anaerobā fermentācijā (Chong et al. 2009). Rīsu pārstrādes atkritumi satur lielu ogļhidrātu, proteīnu un lipīdu koncentrāciju. *Clostridium* sp. baktērijas saražo 346 ml H_2 /g rīsu ogļhidrātus saturošā barotnē (Fang et al. 2006).

Van Ginkel et al. (2005) ieguva ūdeņradi no ābolu un kartupeļu pārstrādes atkritumiem. Šajos eksperimentos biogāze saturēja 60% ūdeņraža, turklāt neveidojās metāns. Pievienojot papildu uzturvielas, ūdeņraža produkciju izdevās palielināt līdz 0,09 l H_2 /l/h barotnes (izmantojot ābolu pārstrādes atkritumus) un 0,21 l H_2 /l/h barotnes (izmantojot kartupeļu pārstrādes atkritumus).

Siera sūkalas, kas ir piena pārstrādes atkritumi, satur aptuveni 5% laktozi, kuru var izmantot H_2 fermentācijai. Ferchichi et al. (2005) izmantojot *Clostridium* sp. baktērijas ieguva 2,7 mol H_2 /mol laktozes. Collet et al. (2004) arī min *Clostridium* sp. izmantošanu, konkrētāk *Clostridium thermolacticum*, no kuras var iegūt pat 3 mol H_2 / mol laktozes nepārtrauktas plūsmas reaktorā hemostatā.

No pārtikas produktu ražošanas atkritumiem iegūst lielākus H_2 iznākumus nekā no lauksaimniecības atkritumiem, taču problēmas rada tas, ka pārtikas ražošanas atkritumi ir ļoti atšķirīgi pēc to ogļhidrātu un proteīnu sastāva un koncentrācijas. Dažāda sastāva notekūdeņiem vai atkritumiem ir nepieciešama atšķirīga apstrāde un vides apstākļi (Kapdan

and Kargi 2006). Līdz ar to būtu tehnoloģiski grūti bioreaktorā izmantot no vairākiem avotiem iegūtus atkritumproduktus (Guo et al. 2010).

Lay et al. (2003) eksperimenta rezultāti parāda, ka salīdzinot ar ogļhidrātiem, proteīniem un lipīdiem bagātus organiskos atkritumus, no ogļhidrātiem iespējams iegūt līdz 20 reizu vairāk H_2 .

Lauksaimniecības atkritumi, lai arī ir grūtāk pārstrādājami un nesasniedz tik lielu ūdeņraža ieguvumu un ražošanas ātrumu, ir pieejami lielākā vairumā un mazāk atšķirīgi pēc sava sastāva. Šie atkritumi galvenokārt sastāv no lignocelulozes. Pasaulē ik gadu tiek saražots aptuveni 200 miljardu tonnu lignocelulozes atkritumu (Ren et al. 2009). Lai paaugstinātu saražotā H_2 daudzumu no lignocelulozes, ir nepieciešama substrāta priekšapstrāde, lai padarītu šo biomasu vieglāk degradējamu. Priekšapstrādes procesi ietver mehānisku smalcināšanu, apstrādi ar skābēm vai sārmiem un fizikālu apstrādi – ar karstumu, vai mikroviļņiem (Guo et al. 2010).

1.3. Jēlglicerīna fermentācija

Glicerīns (propāntriols-1,2,3) ir caurspīdīgs, bezkrāsains, viskozs šķidrums ar saldu garšu. Tas ir relatīvi maztoksisks, salīdzinot ar citiem daudzvērtīgajiem spirtiem. Glicerīns dabā ir sastopams dzīvnieku taukos, taukskābju esteru veidā. Glicerīnu lieto nitroglicerīna un polimēru iegūšanai. To pievieno šķīdumiem kā antifrīzu, kā arī izmanto vīna saldināšanai, liķiera ražošanā un parfimērijā. Glicerīnu iegūst kā ziepju ražošanas blakusproduktu, to var iegūt arī sintētiski (Neuman 2013).

Ražojot biodegvielu, kā blakusprodukts rodas jēlglicerīns – neapstrādāts glicerīns ar piemaisījumiem. Hansen et al. 2009. gadā aprakstīja jēlglicerīna ķīmisko sastāvu, minot, ka glicerīns tajā sastāda 38 – 96 %. Kā biežākie piemaisījumi minēti pelni (līdz 29 %) un metanols (vidēji 14 %). Citos autoru darbos aprakstīts nedaudz atšķirīgs procentuālais sastāvs, piemēram, neapstrādātam glicerīnam no saulespuķu eļļas ražotās biodegvielas raksturīgs šāds sastāvs: 30% glicerīna, 50% metanola, 13% ziepes, 2% ūdens, apmēram 2-3% sāļi (galvenokārt nātrijs un kālijs) un 2-3 % citi piemaisījumi (Yang et al. 2012, Tokumoto et al. 2012).

Attīstoties biodegvielas ražošanai, ir palielinājies jēlglicerīna daudzums. Yazdani et al. (2007) min, ka uz katru saražoto biodīzeļa tonnu kā blakusproduktu iegūst 100 kg glicerīna. Fountoulakis et al. (2009) – saražojot 9 kg biodīzeļa, rodas aptuveni 1 kg jēlglicerīna. 2004. gadā no biodegvielas ražošanas visā pasaulē tika iegūts 200 000 tonnu jēlglicerīna, taču 2008. gadā tā daudzums sasniedza 1,3 miljonus tonnu. Tirgū pieprasījums pēc jēlglicerīna ir

ievērojami mazāks, nekā tas tiek saražots. Mūsdienās jēlglicerīns no ražošanas blakusprodukta ir kļuvis par lielapjoma atkritumproduktu un tā utilizēšanai tiek meklēti efektīvi risinājumi (Almeida et al. 2012; Clomburg et al. 2012;).

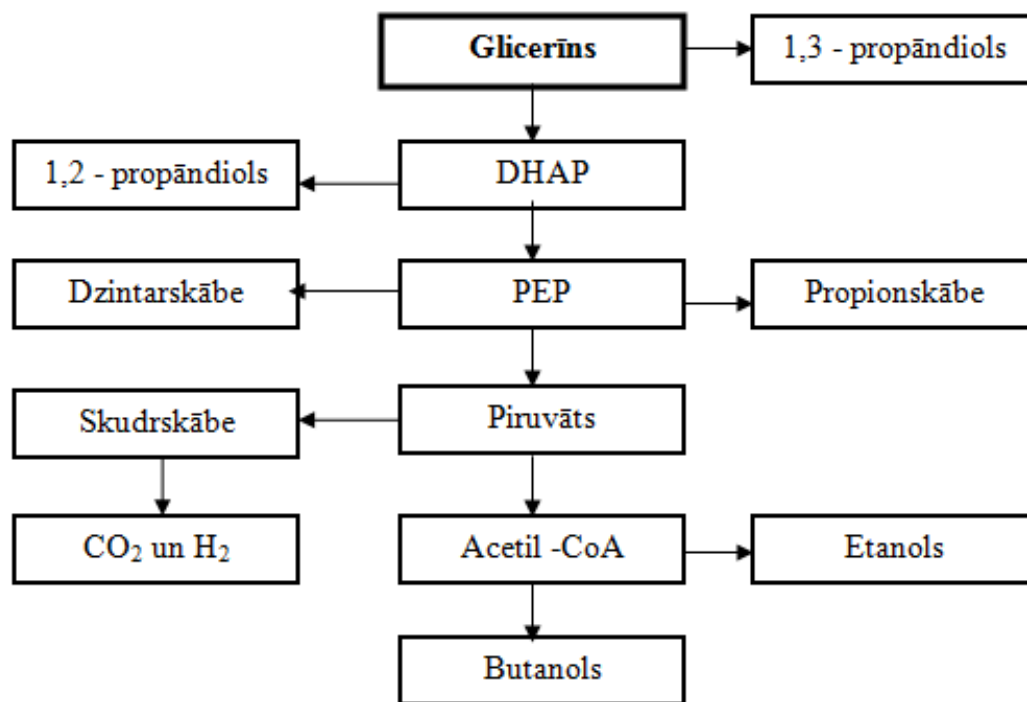
Tā kā jēlglicerīnu attīrīt, lai iegūtu medicīnā, kosmētikas ražošanā un citās nozarēs izmantojamu glicerīnu, nav ekonomiski izdevīgi, tiek meklēti citi tā pielietojumi (Sarma et al. 2012). Viens no tādiem ir jēlglicerīna izmantošana par substrātu mikroorganismiem ar mērķi iegūt vērtīgus produktus, piemēram, etanolu, 1,3-propāndiolu, kā arī bioūdeņradi (Raghunandan et al. 2014). Par vienām no produktīvākajām/ efektīvākajām bioūdeņraža ieguvei no jēlglicerīna tiek minētas baktērijas *Enterobacter aerogenes*, var izmantot arī *Escherichia coli*, kā arī *Clostridium* un citu ģinšu pārstāvjus (Ito et al. 2005).

No biodīzeļa ražošanas atkritumiem, galvenokārt no jēlglicerīna Ito et al. (2005) ieguva ūdeņradi un etanolu, izmantojot *Enterobacter aerogenes* HU-101. Sabourin-Provost et al. (2009) eksperimentāli salīdzināja tehniskā glicerīna un attīrīta glicerīna biokonversijas rezultātus ūdeņraža iegūšanā. Izmantots mikroorganisms *Rhodospseudomonas palustris*. Iegūti teicami rezultāti – 75% no teorētiski iespējamā. Glicerīnu metabolizē vairākas baktēriju grupas, taču visbiežāk tiek izmantoti *Enterobacter aerogenes* un *Clostridium* spp. celmi (Mangayil et al. 2012).

Atšķirībā no aerobā metabolisma, ir salīdzinoši maz mikroorganismu, kas spēj metabolizēt glicerīnu anaerobos apstākļos. Tomēr anaerobā fermentācija ir ekonomiski izdevīgāks process. Mikroorganismi fermentējot glicerīnu, veido tādus organiskos savienojumus kā 1,3 - propāndiolu, butanolu, skudrskābi, propionskābi, dzintarskābi un etanolu (Yazdani et al. 2007; Viana et al. 2012) (1. attēls).

No glicerīna fermentācijas ceļā arī ir spējīgi veidoties spirti (etanols, butanols), taču tādā gadījumā ūdeņraža apjomi, kas izdalās, ir mazāki. Gala produktu formu nosaka tas, kādas sugas baktērijas veic fermentācijas procesu un kāda ir enzīmu aktivitāte tajās, kā arī no citiem vides faktoriem.

Kopumā skatoties, glicerīns ir ļoti piemērots substrāts, ko izmantot lai veiktu plašu ūdeņraža ražošanu. Tas ir viegli pieejams lielos apmēros, tam ir relatīvi liels ūdeņraža atomu skaits molekulā. Baktērijām nav būtiskas problēmas reducēt to fermentācijas ceļā līdz organiskām skābēm un H₂.



1.attēls. Glicerīna metabolisms anaerobā fermentācijā (pēc Clomburg et al. 2012).

Figure 1. Main metabolic pathways of glycerol fermentation (adapted from Clomburg et al. 2012).

Jēlglicerīna biokonversija ir ne tikai ekonomiski, bet arī enerģētiski izdevīgāka, jo tīrā glicerīnā enerģija uz vienu kilogramu ir 19 MJ, savukārt jēlglicerīnam tie ir 25,3 MJ, visticamāk, piemaisījumu dēļ (metanols, biodīzeļa atlikumi). (Sarma et al. 2012).

1.4.Jēlglicerīnu metabolizējošie mikroorganismi

Glicerīnu metabolizē vairākas baktēriju grupas, tādēļ bioūdeņraža ražošanas no neattīrīta glicerīna būtu optimāls tā izmantošanas veids. Glicerīna tumsas fermentācijā nav pieļaujama skābekļa klātbūtne. Spēja metabolizēt glicerīnu anaerobā fermentācijā piemīt šādiem mikroorganismiem: *Enterobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* un *Anaerobiospirillum* (Yazdani et al. 2007; Markov et al. 2011).

Clostridium butyricum un *Enterobacter aerogenes* ir vieni no visbiežāk pielietotajiem bioūdeņraža producentiem, par substrātiem izmantojot jēlglicerīnu un analītisko glicerīnu (Batista et al. 2014; Pachapur et al. 2016). *Clostridium butyricum* ir strikti anaerobas, endosporas veidojošas, Gram-pozitīvas nūjiņveida baktērijas. Mezofilas baktērijas ar optimālo augšanas temperatūru 10-65°C. *C.butyricum* pieder Firmicutes tipam, Clostridia klasei,

Clostridiales rindai, Clostridiaceae dzimtai, *Clostridium* ģintij. *C.butyricum* sastopamas dažādās augsnēs, ir izdalītas arī no veselu bērnu un pieaugušo fēcēm, bieži atrodamas skābpienā un sieros (Szymanowska-Powalowska 2015).

Enterobacter aerogenes ir kustīgas, Gram-negatīvas, nesporulējošas, fakultatīvi anaerobas, mezofilas, nūjiņveida baktērijas. Diametrā tās var sasniegt 1 μm, bet garumā tās sasniedz apmēram 2 μm. *E. aerogenes* pieder Proteobacteria tipam, Gammaproteobacteria klasei, Enterobacteriales rindai un Enterobacteriaceae dzimtai, *Enterobacter* ģintij (Grimont, Grimont 2006). *E. aerogenes* ir sastopamas augsnē, notekūdeņos, siltasiņu dzīvnieku zarnu trakā, kā arī citur (Madigan et al. 2010). Tās ir zināmas arī kā ūdeņraža producētājas tumsas fermentācijā (Martinez-Merino et al. 2013). Tā kā skābeklis inhibē ūdeņraža producēšanu anaerobajās baktērijās, fakultatīvi anaerobo baktēriju priekšrocība ir tā, ka tās vispirms patērē vidē esošo skābekli un tad anaerobos apstākļos producē ūdeņradi (Jo et al. 2008). Par substrātu baktērijām var izmantot glikozi, cieti, celulozi, dažādus citus organiskus savienojumus, kā arī organiskus atkritumproduktus (Nath, Das 2004). Viena no daudzsološākajām bioūdeņraža producētājām jēlglicerīna fermentācijas procesā ir *E. aerogenes* (Sarma et al. 2012). Ito et al. (2005) veica pētījumu par ūdeņraža un etanola iegūšanu no biodīzeļa ražošanas atkritumiem, izmantojot *Enterobacter aerogenes* HU-101. Eksperimenta rezultāti parādīja, ka ir nepieciešama triptona un rauga ekstrakta pievienošana, lai paātrinātu ūdeņraža iegūšanu un atšķaidītu biodīzeļa atkritumproduktiem raksturīgo lielo sāls koncentrāciju. Tika pierādīts, ka rauga ekstrakta un slāpekļa savienojumu pievienošana bija nepieciešama, lai palielinātu ūdeņraža iznākumu no jēlglicerīna (Liu et al. 2007).

Clostridium un *Enterobacter* ģints baktērijas glicerīnu metabolizē gan oksidatīvi, gan reduktīvi. Oksidatīvajā ceļā NAD^+ -atkarīgais enzīms glicerīna dehidrogenāze katalizē glicerīna pārveidošanu par dihidroksiacetonu un glikolītiskais enzīms dihidroksiacetona kināze fosforilē tālāko produkciju, kas pēc tam tiek novirzīta uz glikolīzi. Reduktīvais ceļš tiek katalizēts ar koenzīma B12-atkarīgo glicerīna dehidratāzi un saistītajām diol-dehidratāzēm, pārveidojot glicerīnu par 3-hidroksipropionaldehīdu, un ar NADH^+H^+ -atkarīgo enzīmu 1,3-propāndiola dehidrogenāzi, reducējot 3-hidroksipropionaldehīdu par 1,3-propāndiolu un reģenerējot NAD^+ . Primārie gala produkti ir 1,3-propāndiols (specifisks tikai glicerīna fermentācijai) un acetāts, savukārt, sekundārie – skudrskābe, laktāts, sukcināts, etanols, ūdeņradis, ogļskābā gāze (sekundārie metabolīti atkarīgi no kultūras audzēšanas apstākļiem) (Silva et al. 2009).

2.MATERIĀLI UN METODEDES

2.1.Materiāli

Barotņu sagatavošanai, baktēriju kultivēšanai un barotņu izpūšanai ar gāzēm un fermentācijas eksperimenta veikšanai tika izmantotas Bioloģijas fakultātes iekārtas un laboratorijas piederumi (3. tabula), gāzu sastāva mērīšana ar masspektrometru notika Latvijas Universitātes Cietvielu fizikas institūtā (L. Jēkabsons). Šķidrums hromatogrāfija veikta LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā (R. Ščerbaka). Eksperimentā izmantoto reaģentu saraksts 2. tabulā.

2.tabula.

Ķīmiskās vielas un reaģenti.

Table 2

Chemicals and reagents.

Ķīmiskā viela/reaģents	Ražotājs, ražotājvalsts
Acetonitrils	SAFC, ASV
Argons, 99,99%	SIA AGA, Latvija
Cisteīna-L-hidrochlorīds	Sigma-Aldrich, Vācija
EDTA	Sigma, Vācija
Etanols 96%	Latvija
<i>FISH</i> zondes : GAM42a / Chis150/ LGC353B/ ARC 915	Eurofins MWG Operon, Vācija
Formamīds	Alfa Aesar, Vācija
HCl (25%, 7,7M)	Stanlab, Polija
KOH	BHD Laboratory, Anglija
Kovača reaģents	Biolife, Itālija
ĶSP testa mēģenes HR	Tintometer, Vācija
NaCl	Chempur, Lietuva
NaOH	Stanlab, Polija
NH ₄ NO ₃	Реахим, Krievija
SDS	Scharlau, Spānija
TRIS	Carl ROTH, Vācija
Ūdeņraža peroksīds, 3%	Hasco-Lek, Polija
R2A agara barotne TN1297 (pH = 7.2 ± 0.2): Rauga ekstrakts 0.5 g/l Kazeīna hidrolizāts 0.5 g/l Proteozes peptons 0.5 g/l Dekstroze 0.5 g/l Ciete 0.5 g/l Dihidrogēnfosfāts 0.3 g/l Magnija sulfāts 0.024 g/l Nātrija piruvāts 0.3 g/l Agars 15 g/l	SIFIN, Vācija
Iesala agara barotne (pH = 4.7 ± 0.2): Maltoze 12.75/l g Dekstroze 2.75 g/l Glicerīns 2.35 g/l Peptons 0.78 g/l Agars 15 g/l	Becton Dickinson, ASV

Materiāli un iekārtas.

Table 3

Equipment and tools.

Iekārta/Priekšmets	Ražotājs, ražotājvalsts
Alumīnija uzgaļi, SU 860 M6	SUPELCO, ASV
Anaerobais gāzu maisiņš ar indikatoru, GasPak	Becton, Dickenson and Company, ASV
Autoklāvs, HLS – 3781L	Sanyo, Japāna
BBL Crystal Identification System	Becton, Dickenson and Company, ASV
Centrifūga 5804 R	Eppendorf, Vācija
Elektroniskie svāri, 440-33N	Kern, Vācija
Epifluorescences mikroskops Leica DM 2000	Leica Microsystems, Vācija
Fotometra sistēma MD200	Lovibond, Vācija
Gaismas mikroskops, BME	Leica, Vācija
Gāzu analizators – masspektrometrs, RGAPro 100; izšķirtspēja - 1 atommasas vienība	Hy-Energy, ASV
Gumijas korkķīši	Gotlands Gummifabrik, Zviedrija
Laminārās plūsmas skapis	Telstar Bio-11, Spānija
Mehāniskais aizvākotājs	Nav zināms
pH-metrs, AD 1405	Adrona, Vācija
PVDF filtri ar poru diametru 0,22 μm	Carl Roth GmbH, Vācija
Siltuma reaktors RD 125	Lovibond, Vācija
Sterila šļirce ar adatu 2 ml, BD Discardit	Spānija
Seruma pudelītes, 30 mL	SUPELCO, ASV
Seruma pudelītes, 50 mL	SUPELCO, ASV
Seruma pudelītes, 100 mL	SUPELCO, ASV
Termostats, Binder KB53	Vācija
UV gaismas transiluminators, 2001 Macro vue	LKG Bromma, Zviedrija
Vortex maisītājs	Biosan, Latvija

Laboratorijas trauki - Petri plates, mēģenes, ependorfa mēģenes (1,5 ml, 2 ml), mērcilindri (50 ml, 200 ml, 1000 ml), laboratorijas pudeles (1000 ml).

Citi laboratorijas piederumi - pipetes (Finnpipette, tilpumi 200 μl, 1000 μl), pipešu uzgaļi, mikrobioloģiskās cilpas, mikrobioloģiskais špātelis, spirta lampiņa, priekšmetstikliņi.

2.2. Metodes

2.2.1. Fermentācijas eksperiments

Sagatavota pamatbarotne no peptona (1,0 g/L) un rauga ekstrakta (2,5 g/L), kas sterilizēta autoklāvā 120°C temperatūrā 15 minūtes. Vienā eksperimentā pievienots jēlglicerīns (glicerīna saturs 64 %) no SIA "Bio-Venta", otrā – analītiskais glicerīns (Stanlab, Polija) ar koncentrāciju 6,0 g/L. Kā sējmateriāls pievienotas ezera dabiskās dūņas. Eksperimentā ar analītisko glicerīnu izmantotas dūņas no Juglas ezera (Rīga), eksperimentā ar jēlglicerīnu izmantotas dūņas no Timsmāles ezera (Krustpils novads). Paraugi ievākti 1-3 m attālumā no krasta, glabāti ledusskapī līdz divām nedēļām.

Gatavā barotne tika iepildīta 100 mL seruma pudelītēs, katrā pa 70 mL. Atsevišķi tika sagatavots cisteīns. Tika pagatavots šķīdums (0,175 g cisteīna uz 1 mL destilēta ūdens), kas tika sterilizēts, filtrējot caur PVDF filtru ar poru diametru 0,22 μm; pēc tam 0,2 mL sagatavotā cisteīna šķīduma pievienots sagatavotajā barotnē (gala koncentrācija barotnē – 0,5 g/L). Kā sējmateriāls pievienots 0,2 mL ezera dabisko dūņu. Trauki tika hermētiski noslēgti ar gumijas aizbāžņiem un alumīnija vāciņiem. Inokulētās pudelītes izpūstas ar argonu, lai uzturētu tajās anaerobu vidi. Caur gumijas korķi pudelītē ievietota sterila ieejas adata ar pievienotu gumijas caurulīti no argona balona un sterila izejas adata, pa kuru izplūst atmosfēras gāzēm. Pudelītes uzglabātas termostatā 37°C temperatūrā un istabas temperatūrā (20°C). Inkubācijas laiks 2 un 6 dienas.

2.2.2. Gāzu procentuālā sastāva noteikšana

Paraugu pudelītes nogādātas LU Cietvielu fizikas institūtā gāzu spektra noteikšanai. Pudelīte ar vienreizējās lietošanas šļirci adatu un gumijas caurulīti pievienota masspektrometram RGA Pro-2500 (Hy-Energy, ASV). Gāzu spektra analīzēm izmantota programma *rga 3.0* (Stanford Research System, ASV). Nolasīti parciālo spiedienu tilpumpcenti šādām gāzēm: CH₄, CO₂, H₂, N₂, Ar, N₂, NH₃, H₂S.

2.2.3. Ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšana

Pēc katra eksperimenta paņemts 1 ml materiāla no katra parauga, uzglabāts sasaldējot. Pirms testēšanas paraugs atkausēts. Izmantotas komerciālās testēšanas mēģenes Lovibond COD Test tubes HR (0-15000 mg/L), kuru sastāvā ir visas nepieciešamās komponentes. ĶSP testēšanas mēģenē pievienots 0,2 ml parauga. Inkubēts termoreaktorā Lovibond RD 125 150 °C 2 h. Rezultāti nolasīti ar fotometru Lovibond MD 200.

2.2.4.Šķidrums hromatogrāfija

Pēc katra eksperimenta paņemts 1 ml materiāla no katra parauga, uzglabāts sasaldējot. Paraugi nogādāti LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūtā (R. Ščerbaka), kur nodoti organiskā sastāva analīzei ar augstefektīgo šķidrums hromatogrāfu Agilent 1100 (Agilent Technologies, ASV), izmantojot Shodex firmas Asahipak SH1011 kolonnu (kolonnas garums 300 mm, iekšējais diametrs 8,0 mm) ar priekškolonnu SH-G (garums 50 mm, iekšējais diametrs 6 mm), pie temperatūras 50°C. Mobilā fāze 0,01 N H₂SO₄, mobilās fāzes ātrums 0,6 mL/min, kolonnā ievadāmā parauga daudzums 5µL. Glicerīna, etanola noteikšanai tika izmantots diferenciālais refraktometrijas detektors RID G1362. Organiskās skābes noteiktas izmantojot diodu matricas detektoru (DAD) G1315B, viļņa garums 210 nm. Dati iegūti un apstrādāti ar *MassHunter* datu apstrādes sistēmu (Agilent Technologies, ASV).

2.2.5.Mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību skaita noteikšana

Agarizētās R2A barotnes pagatavošanai paredzēto maisījumu (Difco R2A Agar, Becton, Dickinson and Company, ASV) suspendēja ūdenī (18,2 gramus vienā litrā ūdens) un autoklāvēja 15 minūtes 121°C. Pēc autoklāvēšanas barotni lēja Petri platēs. Vienā platē apmēram 25 ml. Pēc atdzišanas plātes ar barotni bija gatavas lietošanai.

Pagatavota atšķaidījumu sērija no 900 µl sterila ūdens un 100 µl parauga. Izvēlēti atšķaidījumi, kuru 100 µl uzsēti uz agarizētas R2A barotnes un iesala agara barotnes sēņu noteikšanai. Aerobo mikroorganismu noteikšanai Petri plātes kultivētas istabas temperatūrā 10 dienas. Anaerobo mikroorganismu noteikšanai Petri plātes ievietotas anaerobās vides maisiņos BD GasPak™ EZ (Becton Dickinson and Company, ASV), inkubētas istabas temperatūrā 10 dienas. Rezultāti nolasīti, nosakot izaugušo koloniju skaitu katrā Petri platē. Aprēķināts mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību (kvv) skaits 1 mL fermentācijas šķidrums.

2.2.6.Dominējošo sugu identifikācija

Dominējošās sugas atkārtoti pārsētas uz R2A barotnēm, iegūstot mikroorganismu tīrkultūras, kuras tālāk tiek izmantotas noteikšanā ar BBL Crystal ID komplektu. Ar 3% KOH noteikta tīrkultūru Grama reakcija, ar Kovača reaģentu noteikta indola reakcija un ar ūdeņraža peroksīdu noteikta katalāzes reakcija. Mikroskopējot pētīta šūnu morfoloģija.

Izmantojot bakterioloģisko cilpu, svaigas baktēriju tīrkultūras tika suspendētas mēģenē ar Crystal ID uzsēšanas šķīdumu un rūpīgi samaisītas. Tad mēģenes saturs tika ieliets Crystal pamatnē un izplatīts, līdz visas iedobes ir piepildītas. Pēc tam tika ņemts vāciņš un novietots

virš pamatnes speciāli norādītājam mērķa vietām. Crystal paneļi inkubēti 20 °C temperatūrā 18-20 stundas un nolasīta informāciju, aplūkojot paneļus zem ultravioletās gaismas un salīdzinot gaismas intensitāti starp kontroles iedobi un pārējām. Paneļi aplūkoti arī redzamajā gaismā un salīdzināti ar paraugu tabulu, vai krāsas izmaiņas lauciņos ir notikušas. Rezultāti ievadīti Crystal ID E/NF (Anaerobe ID vai Gram–Positive ID) datubāzē, papildus pievienojot informāciju par baktēriju morfoloģiju, katalāzes, Grama un indola reakcijām.

2.2.7. Fluorescentā *in situ* hibridizācija

Fluorescentās *in situ* hibridizācijas vajadzībām tika paņemts paraugs, izmantojot vienreizējās lietošanas uzgaļus. Paraugs tika pārņemts uz ependorfa mēģeni, no kuras 10 µL tika uzpilināti uz priekšmetstikliņa un gaisā nožāvēti. Pēc tam paraugs fiksēts ar 4% paraformaldehīdu, kas tika iepriekš sagatavots: 50 mL PBS (130 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,4) pievienots 2 g paraformaldehīda (Alfa Aesar, Vācija), šķīdums sildīts uz plītiņas 60°C temperatūrā un vienmērīgi maisīts, neļaujot vārīties; tā kā pēc 30 minūtēm maisījums bija dzidrs, daži pilieni 1 N NaOH šķīšanas veicināšanai netika pievienoti. Iegūtā šķīduma pH atbilda vēlamajai vērtībai (pH=7) (Lomell et al. 2010). Paraugam uzpilināti 30 µL pagatavotā 4% paraformaldehīda un fiksēti 1,5 - 2 h. Pēc fiksācijas beigām tika veikta dehidratēšana ar etanolu sēriju. Paraugs dehidratēts 50% etanolā trīs minūtes, tad 80% etanolā trīs minūtes, pēc tam 96% etanolā trīs minūtes un atstāts istabas temperatūrā nožūt (Pernthaler et al. 2001, Fuchs et al. 2007).

Pēc tam tika pagatavots zondei atbilstošs hibridizācijas buferis (4. tabula). Pirms katras hibridizācijas tika pagatavots svaigs buferis.

4.tabula.

FISH hibridizācijas bufera sastāvs.

Table 4

Composition of FISH hybridization buffer.

Reaģents	Formamīda koncentrācija		Gala koncentrācija
	30%	35%	
5 M NaCl	360 µL	360 µL	0,9 M
1 M Tris/HCl	40 µL	40 µL	20 mM
Formamīds	600 µL	700 µL	5-35%
Destilēts H ₂ O	1000 µL	900 µL	0-80%
10% Na SDS	2 µL	2 µL	0,01%

Pievienotā formamīda un ūdens daudzums ir atkarīgs no izmantotās zondes, jeb precīzāk no guanīna un citozīna daudzuma zondes sekvencē (5. tabula). LGC 353B, GAM

42a un ARC 915 nepieciešams hibridizācijas buferis ar 35% formamīda koncentrāciju, Chis 150 – 30 % formamīda koncentrāciju (Siyambalapitiya et al. 2006).

5.tabula.

Hibridizācijas zondes.

Table 5

Hybridization probes.

Zondes nosaukums	Zondes mērķorganismi	Zondes sekvenca (5' -> 3')	GC saturs %	Literatūras avots
LGC353B	<i>Bacillus</i> spp.	GAA GAT TCC CTA CTG C	57	Felske et al. 1998
GAM42a	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	GCC TTC CCA CAT CGT TT	53	Manz et al. 1992
Chis150	<i>Clostridium</i> <i>histolyticum</i> grupa	TTA TGC GGT ATT AAT CTY CCT TT	30	Franks et al. 1998
ARC 915	<i>Archaea</i>	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	47	Stahl and Amann 1991

Tālāk pagatavots hibridizācijas bufera un zondes maisījums. Katrā paraugā 9 µL bufera pievienots 1 µL atbilstošās zondes. Tad viss sastāvs uzpildināts uz stikliņa ar fiksēto un pilnībā nožuvušo paraugu. Preparāts rūpīgi pārnest uz mitro kameru, kuru izklāj filtrpapīrs, kas ir piesūcināts pārpalikušo buferi. Kamera stingri noslēgta un ievietota termostatā 46°C, lai var norisināties paraugu hibridizācija (12 – 24 stundas).

Katrai zondei sagatavots atbilstošs mazgāšanas buferis (6.tabula). LGC 353B, GAM 42a un ARC 915 nepieciešams mazgāšanas buferis ar 35% formamīda koncentrāciju, Chis 150 – 30 % formamīda koncentrāciju.

6.tabula.

Mazgāšanas buferu sastāvs.

Table 6

Washing buffer composition.

Reāģents	Zondes	
	Chis 150	LGC 353B, GAM 42a, ARC 915
1 M Tris / HCl	100 µL	100 µL
5 M NaCl	102 µL	70 µL
0,5 M EDTA	50 µL	50 µL
Dest. H ₂ O	4 748 µL	4 780 µL
10% SDS	5 µL	5 µL

Kad hibridizācija notikusi, stikliņi izņemti no kamerām un pilnībā iegremdēti atbilstošajos mazgāšanas buferos un ievietoti termostatā uz 20 minūtēm 46°C grādu temperatūrā. Tad tie tika uzmanīgi skaloti ar destilētu ūdeni un atstāti nožūt gaisā. Paraugus atstāti tumsā, jo zondes var gaismā ātri izbalēt (Pernthaler et al. 2001).

Pēc paraugu nožūšanas, tie tika apskatīti fluorescences mikroskopā. Mikroskopēšanai tika izmantots caurejošās gaismas un fluorescences mikroskops Leica DM 2000 (Leica Microsystems, Vācija).

Visas zondes, izņemot ARC 915, 5' galā tika saistītas ar fluorescējošu krāsu Cy3. Arc 915 izmantota fluorescējoša krāsa RGR. Cy3 fluorescentajai krāsai jāizmanto zaļo ierosmi (515-560 nm). Apskatei izmantojot zaļo filtru, šūnu fluorescences sagaidāma oranžīgi dzeltenā krāsā (Crocetti et al 2002, Huang et al. 2009, Moter & Göbel 2000).

2.2.8. Datu statistiskā apstrāde

Datu apstrādei, grafiku un attēlu veidošanai izmantota datorprogramma *Microsoft Office Excel 2010*. Veikts ANOVA tests, par būtiskuma līmeni pieņemts 0,05.

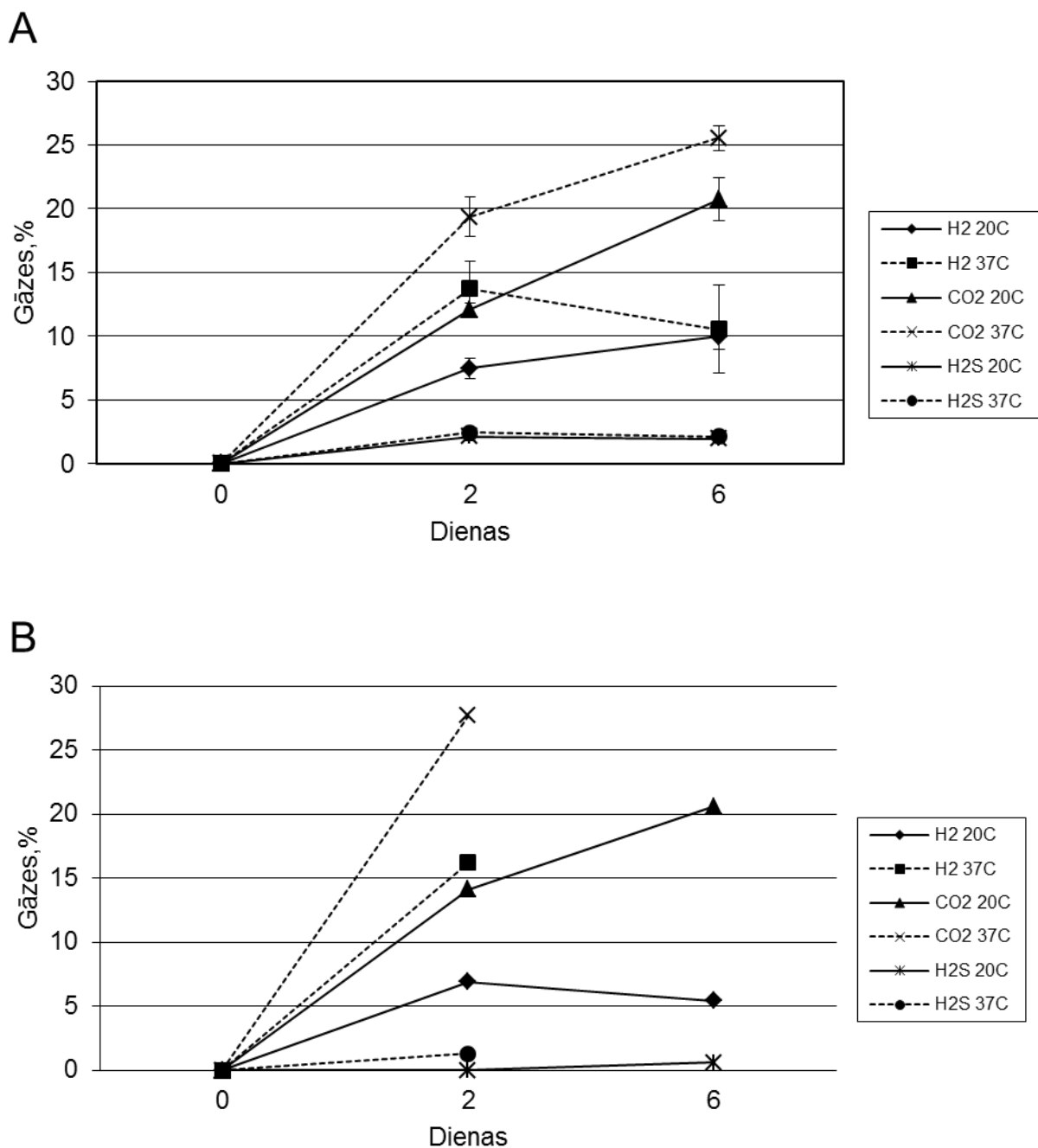
3.REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Eksperimenta sākumā noteikts barotnes pH un veiktas mikrobioloģiskas analīzes – fluorescentā *in situ* hibridizācija, mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību skaita noteikšana un identificētas dominējošās sugas dūņu paraugos, paņemti paraugi šķidrums hromatogrāfijas un ķīmiskā skābekļa patēriņa analīzēm. Pēc divām un sešām dienām atkārtotas šīs analīzes, papildus noteikts saražotās gāzes tilpums un veikta gāzu procentuālā sastāva noteikšana ar masspektrometru.

3.1.Fermentācijas gāzu sastāvs

Gāzu procentuāla sastāvā mērījumi pēc divām un sešām dienām redzami 2.attēlā. Nosakot saražoto gāzu tilpumu un sastāvu jēlglicerīna fermentācijā, konstatēts, ka vislielākais saražoto gāzu tilpums bija pēc divu dienu fermentācijas. Tas bija $25,0 \pm 1,0$ mL 37°C un $9,5 \pm 0,5$ mL 20°C . Visvairāk ražotā gāze bija CO_2 , it īpaši 37°C . Lielākais ūdeņraža tilpums bija pēc divu dienu inkubācijas 37°C , 20°C tas bija 1,6 reizes mazāks nekā 37°C . Abos eksperimenta variantos novērota H_2S izdalīšanās, kas fermentācijas laikā nedaudz palielinājās, līdz sestajā dienā 37°C H_2S koncentrācija sasniedza $2,15 \pm 0,05$ %, bet 20°C bija $1,95 \pm 0,15$ % H_2S . Tā kā pudelītes inertas vides nodrošināšanai pirms eksperimenta tika izpūstas ar argonu, arī pēc inkubācijas lielāko daļu gāzu maisījumā aizņēma argons. Vēl tika mērīta metāna izdalīšanās, kas konstatēta tikai vienā paraugā – sestajā dienā 37°C , šajā paraugā vienlaicīgi notikusi H_2 samazināšanās. Tas norāda uz metanogēnu darbību. Visdrīzāk tie ir hidrogenotrofie metanogēni. Hidrogenotrofās metanogēnās baktērijas izmanto ūdeņradi, lai oglekļa dioksīdu pārveidotu metānā (Bauer et al. 2008). 20°C metāna izdalīšanās netika novērota.

Eksperimentā ar analītisko glicerīnu novērots līdzīgs gāzu procentuālais sastāvs. Eksperimentā neizdevās gāzu procentuālais mērījums sestajā dienā 37°C , taču pēc divām dienām 37°C ūdeņraža koncentrācija bija $16,2$ % un CO_2 – $27,7$ %. Nedaudz bija palielinājies H_2S daudzums. 20°C visvairāk ražotā gāze bija CO_2 , ūdeņradis sestajā dienā bija $5,4$ % no kopējā gāzu sastāva. H_2S izdalīšanās konstatēta tikai sestajā dienā, otrajā tā vēl netika novērota. Kopējais saražoto gāzu tilpums 37°C bija 2,3 reizes lielāks nekā 20°C otrajā dienā un 1,6 reizes sestajā dienā.



2.attēls. Gāzu procentuālais sastāvs jēlglicerīna fermentācijā (A) un analītiskā glicerīna fermentācijā (B).

Figure 2. The percentage of gas in crude glycerol fermentation (A) and analytical glycerol fermentation (B).

Salīdzinot jēlglicerīna un analītiskā glicerīna ietekmi uz izdalītā ūdeņraža daudzumu noskaidrots, ka pēc divām dienām 37°C analītiskā glicerīna fermentācijā ūdeņradis bija par 2,45% vairāk nekā jēlglicerīna fermentācijā. 20°C šī starpība bija tikai 0,6%. Kā minēts,

eksperimentos izmantoti atšķirīgi sējmateriāli, kas varēja ietekmēt skaitliskos rādītājus, taču tas nebija noteicošais fermentācijas procesu norisē.

Ūdeņradis literatūrā minēts kā perspektīvs videi draudzīgs enerģijas nesējs, kurš varētu aizstāt naftas produktus, kurus izmantojot rodas liels daudzums CO₂ (Sarma et al. 2012). Tomēr jāmin, ka tumsas fermentācijas procesā, lai iegūtu šo videi draudzīgo bioūdeņradi, rodas ogļskābā gāze. Tā kā, lai tumsas fermentācijā iegūto ūdeņradi varētu uzskatīt par pilnībā videi draudzīgu, būtu jānodrošina fermentācijā radušās ogļskābās gāzes izmantošana. Piemēram, to varētu novadīt aļģu biomasas audzēšanai, jo arī no tām var iegūt vērtīgus produktus, turklāt aļģu audzēšanai tiek meklēti ogļskābās gāzes avoti (Mortensen, Gislerød 2015). Latvijas gadījumā gan, iespējams, būtu jāmeklē klimatiskajiem apstākļiem piemērotākas realizācijas iespējas, jo aļģu audzēšana šajā Eiropas daļā netiek atzīta par ekonomiski izdevīgu (Skarka 2012).

Eksperimentos glicerīns pievienots ar koncentrāciju 6 g/L. Literatūrā minētas dažādas jēlglicerīna koncentrācijas, kas piemērotas anaerobai fermentācijai. Fountoulakis et al. (2010) par piemērotu koncentrāciju min 1 g/L, bet Amon et al. (2004) 3-6%. Paiders et al. (2017) salīdzinot vietējā ražotāja jēlglicerīna dažādas koncentrācijas secināja, ka optimāla glicerīna koncentrācija ir 6 g/L.

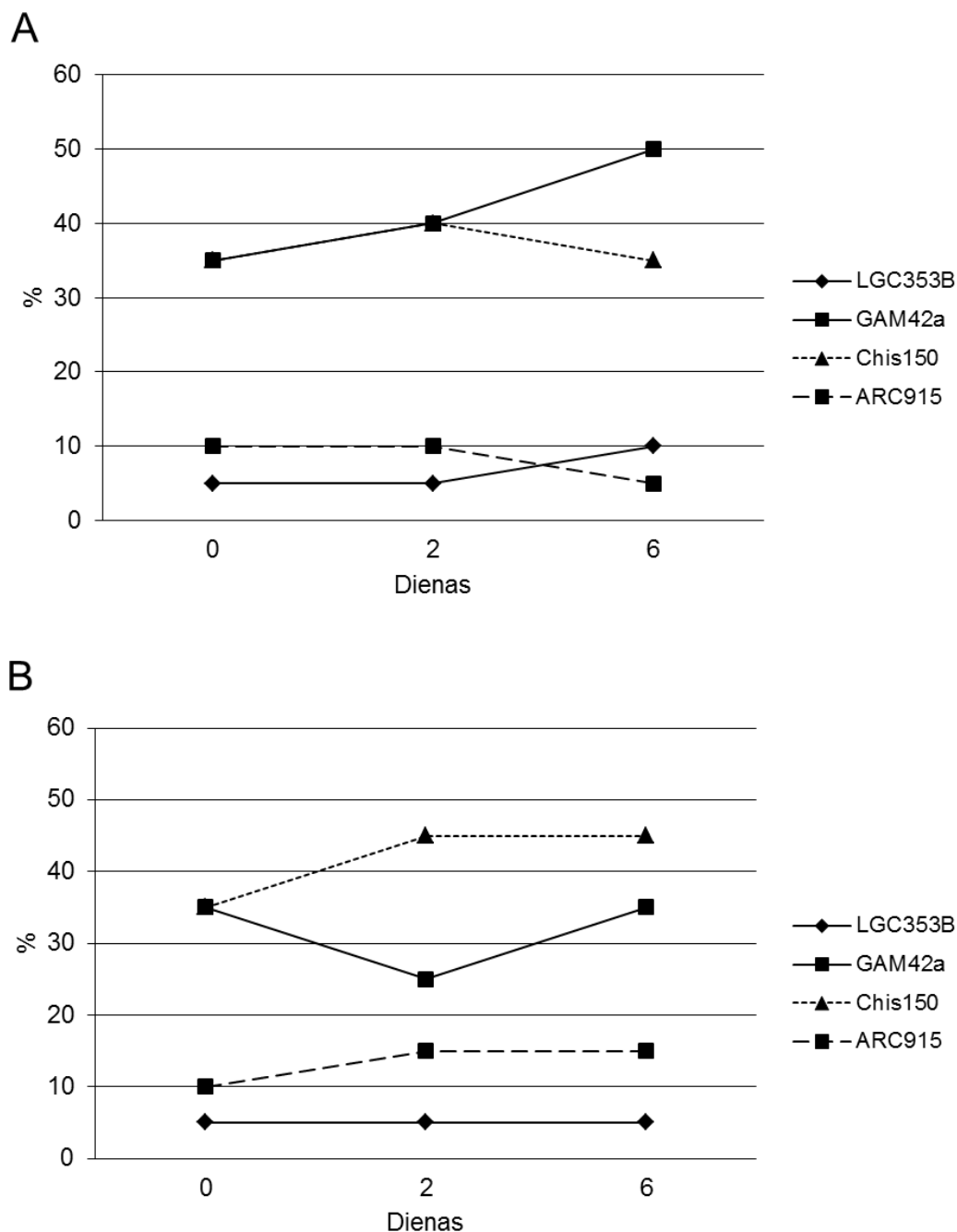
3.2. Mikroorganismu populāciju dinamika

Aplūkota prokariotu populāciju dinamika, izmantojot fluorescento *in situ* hibridizāciju. Visas zondes, izņemot ARC 915, 5' galā tika saistītas ar fluorescējošu krāsu Cy3. Arc 915 izmantota fluorescējoša krāsa RGR. Cy3 fluorescentajai krāsai izmantota zaļā ierosme (515-560 nm). Apskatei izmantojot zaļo filtru, šūnu fluorescence novērota oranžīgi dzeltenā krāsā (Moter & Göbel 2000).

Jēlglicerīna fermentācijā gan 20°C, gan 37°C paraugos dominēja Gamma-Proteobacteria un Clostridia (3.attēls). Sējmateriālā, kas nācis no Timsmāles ezera dūņām, jau pirms fermentācijas šīs baktēriju klases bija lielā pārkumā. Klostrīdiu daudzums 20°C bija samazinājies fermentācijas laikā, taču 37°C palielinājies. 37°C pēc sešām dienām bija palielinājies arheju daudzums, kas sakrīt ar to, ka tika novērota metāna izdalīšanās. *Bacillus* spp. abos variantos nepārsniedza 10 % robežu.

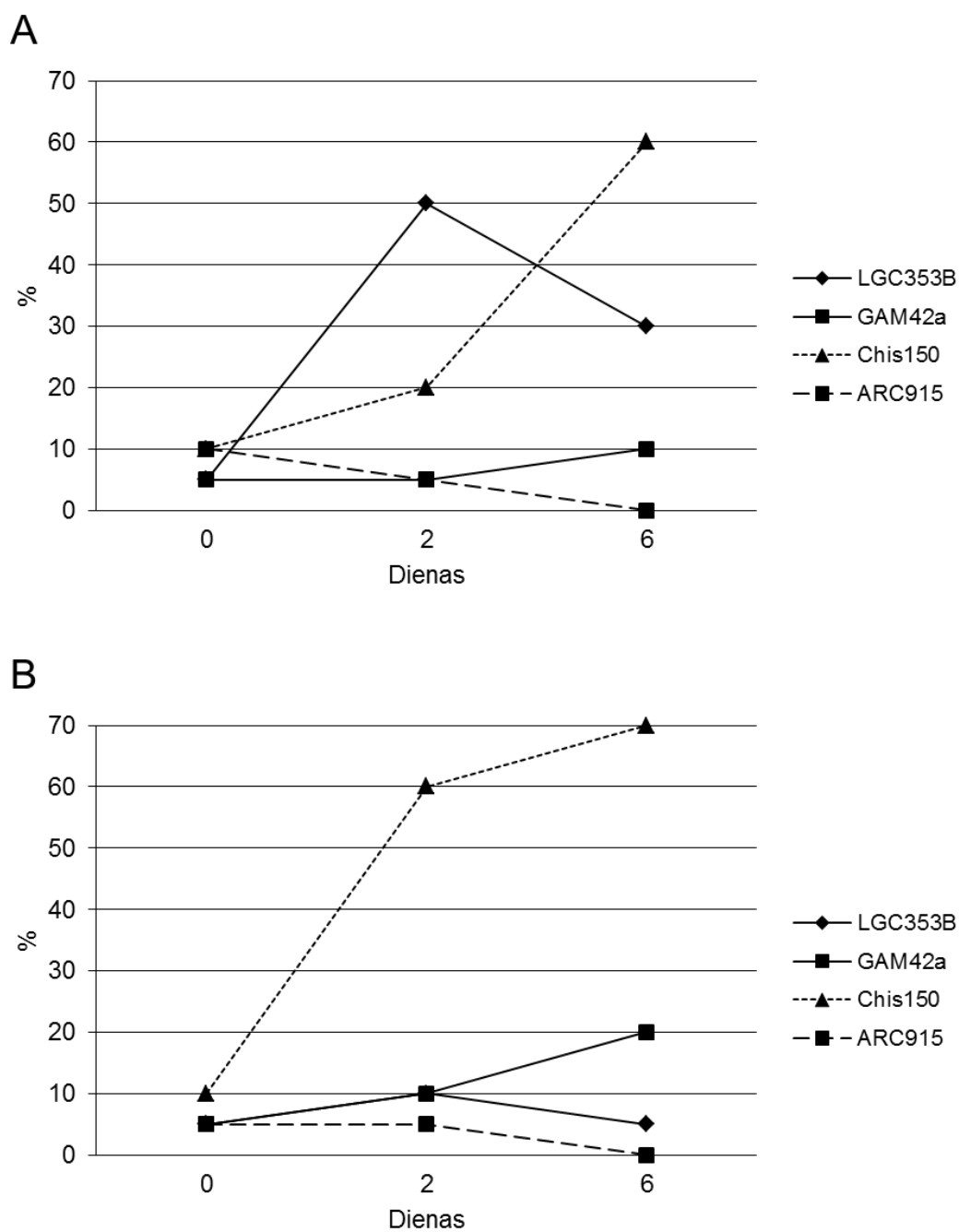
Apskatot analītiskā glicerīna fermentācijas mikroorganismu populāciju dinamiku pēc FISH, izteikti dominē klostrīdijas, it sevišķi 37°C (4.attēls). Pēc 2 dienu fermentācijas 37°C Clostridia sastāda 60 %, bet pēc sešām dienām pat 70 % no mikroorganismu populācijas

paraugā. Pārējās grupas nepārsniedza 10 % sliekšni pēc divām dienām un tikai pēc sešām dienām Gamma-Proteobacteria sasniedza 20 %. 20°C pēc divu dienu inkubācijas lielā pārākumā bija *Bacillus*, taču sestajā dienā to daudzums samazinājās un Clostridia daudzums bija izteikti pieaudzis – no 20 % otrajā dienā līdz 60 % sestajā dienā.



3.attēls. Populāciju dinamika pēc FISH jēlglicerīna fermentācijā 20°C (A) un 37°C (B).

Figure 3. Bacterial groups determined by FISH in crude glycerol fermentation at 20°C (A) and 37°C (B).



4.attēls. Populāciju dinamika pēc FISH analītiskā glicerīna fermentācijā 20°C (A) un 37°C (B).

Figure 4. Bacterial groups determined by FISH in analytical glycerol fermentation at 20°C (A) and 37°C (B).

Jēlglicerīna fermentācijā izmantotas Timsmāles ezera dūņas, bet analītiskā glicerīna fermentācijā sējmateriāls bija no Juglas ezera dūņām. Salīdzinot FISH rezultātus pirms fermentācijas, lielākās atšķirības novērotas Clostridia un Gamma-Proteobacteria grupās. Timsmāles ezera dūņās jau pirms fermentācijas Clostridia un Gamma-Proteobacteria bija

aptuveni 35% no populācijas, taču Juglas ezera dūņās neviena no pētītajām baktēriju grupām nepārsniedza 10%. Salīdzinot rezultātus abu eksperimentu 37°C variantos redzams, ka pirms fermentācijas mikroorganismu populācijas sastāvs bija atšķirīgs, taču fermentācijas laikā varēja saskatīt līdzības. Abos esperimentos jau otrajā dienā strauji palielinājās Clostridia daudzums, sestajā dienā Gamma-Proteobacteria un abas pārējās baktēriju grupas nepārsniedza 15% robežu. 20°C variantā ar analītisko glicerīnu bija liels *Bacillus* spp. daudzums, taču eksperimentā ar jēlglicerīnu 20°C *Bacillus* spp. bija nelielā daudzumā. Gamma-Proteobacteria grupai novērota pretēja sakarība – jēlglicerīna fermentācijā to bija daudz, analītiskā glicerīna fermentācijā ievērojami mazāk. *Bacillus* spp. piemīt spēja metabolizēt tīru glicerīnu, tomēr par labākiem jēlglicerīnu fermentējošiem mikroorganismiem tiek saukti *Clostridium*, kas pārstāv Clostridia klasi, un *Enterobacter* ģints baktērijas, kas ir Gamma-Proteobacteria klases mikroorganismi (Batista et al. 2014, Yazdani et al. 2007).

3.3. Kultivējamo mikroorganismu skaits un dominējošās sugas

Izolētas un identificētas dominējošās kultivējamo mikroorganismu sugas. Jēlglicerīna fermentācijas sākumā novērojama liela sugu daudzveidība, izolēta arī *Penicillium* ģints sēne 1 kvv/mL, kas pēc fermentācijas vairs netika atrasta. Literatūrā minētas tikai atsevišķas sēņu sugas, kas ir piemērotas anaerobai fermentācijai, piemēram, sēnes, kas pieder pie *Neocallimastigales* kārtas, tās ir anaerobi mikroorganismi un parasti atrodami zālēdāju gremošanas traktā (Dollhofer et al., 2015). Pēc divu dienu inkubācijas dominēja Clostridia un Gamma-Proteobacteria, kas atbilst iegūtajiem FISH rezultātiem. Izolētas *Clostridium butyricum* un *C. hastiforme* no Clostridia klases un *Pantoea agglomerans* un *Serratia plymuthica* no Gammaproteobacteria klases (7. tabula). Lai gan pēc FISH rezultātiem *Bacillus* sugas nepārsniedza 10% no kopējās mikroorganismu populācijas, visu fermentācijas laiku bija atrodams *Bacillus licheniformis*. *B. licheniformis* ir fakultatīvi anaeroba, bieži sastopama baktērija, kas izmanto glicerīnu un reducē nitrātus par nitrītiem (Logan & De Vos, 2015). Jau Kalia et al. (1994) un Porwal et al. (2008) izolēja ūdeņradi producējošus *B. licheniformis* celmus no liellopu kūtsmēsliem un Porwal et al. (2008) arī no piesārņotas pārtikas.

Jēlglicerīna fermentācijas sestajā dienā neatkarīgi no temperatūras izdalītas vismaz ar bioķīmiskām metodēm neidentificētas *Clostridium* sugas. Mikroorganismu metagenoma analizēs biogāzes reaktoru paraugos parasti atrod lielu skaitu neidentificētu mikroorganismu, norādot, ka anaerobās fermentācijas procesu var veikt līdz šim vēl nezināmas sugas (Rademacher et al., 2012).

7.tabula.

Dominējošās kultivējamo mikroorganismu sugas un klases jēlglicerīna fermentācijā.

Table 7

Predominant species and class of cultivable microorganisms isolated from crude glycerol fermentation liquids.

Sugas	Klase	0 dianas	2 dianas 20°C	2 dianas 37°C	6 dianas 20°C	6 dianas 37°C
<i>Agrobacterium</i> sp.	Alphaproteobacteria	X				
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	X				
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bacilli	X	X	X	X	X
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli			X		
<i>Burkholderia cepacia</i>	Betaproteobacteria	X		X	X	X
<i>Clostridium butyricum</i>	Clostridia	X	X	X		
<i>Clostridium hastiforme</i>	Clostridia	X				
<i>Clostridium</i> spp.	Clostridia				X	X
<i>Hafnia alvei</i>	Gammaproteobacteria				X	X
<i>Pantoea agglomerans</i>	Gammaproteobacteria	X				
<i>Penicillium</i> sp.	Eurotiomycetes	X				
<i>Serratia fonticola</i>	Gammaproteobacteria		X			
<i>Serratia plymuthica</i>	Gammaproteobacteria	X				
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Sphingobacteria	X				
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Alphaproteobacteria	X				

Analītiskā glicerīna fermentācijā dominējošo sugu identifikācija apstiprināja FISH rezultātus, kas parādīja klostrīdiju pārkumu, it sevišķi 37°C (8. tabula). Tāpat arī redzams, ka *Bacillus* sugas bija starp dominējošiem mikroorganismiem 20°C pēc divām dienām, bet pēc sešām dienām 20°C *Bacillus* sugu daudzveidība samazinājās.

Aplūkojot abus eksperimentus kopumā, tika novērota liela sugu daudzveidība pirms eksperimenta, taču fermentācijas apstākļos izteikti dominēja Clostridia klases baktērijas, kas bija kopīga iezīme abos eksperimentos, it īpaši 37°C. Jēlglicerīna fermentācijā sastopamas Gamma-Proteobacteria un Bacilli, turpretī analītiskā glicerīna fermentācijā – Bacilli klase

sastopama tikai 20°C. Bacilli jēlglicerīna fermentācijā tika atrasti visa eksperimenta garumā. *Bacillus* spp. ir aerobi mikroorganismi, kas noteiktos apstākļos var kļūt par fakultatīvi anaerobiem (Nakano, Zuber 1998). *Bacillus* spp. spēj hidrolizēt triglicerīdus (Dartois et al. 1994). Triglicerīdi ir viens no iespējamajiem piemaisījumiem jēlglicerīnā, kas iegūts no rapšu eļļas ražojot biodegvielu. Abos eksperimentos gandrīz visā fermentācijas laikā kā viena no dominējošām sugām izdalīta *Burkholderia cepacia*. Arī Resende et al. (2014) identificējuši *B. cepacia* 8,87% paraugu. *B. cepacia* ir plaši izplatīta dabā, jo īpaši augsnē, tai piemīt ļoti universālas metaboliskās īpašības (Palleroni, 2015). Tā ir stingri aeroba baktērija un neveic nitrātu reducēšanu. Tomēr Hutchison et al. (1998) parādīja, ka dzīvotspējīga *B. cepacia* varētu būt kultivējama pēc septiņām anaerobās inkubācijas dienām.

8.tabula.

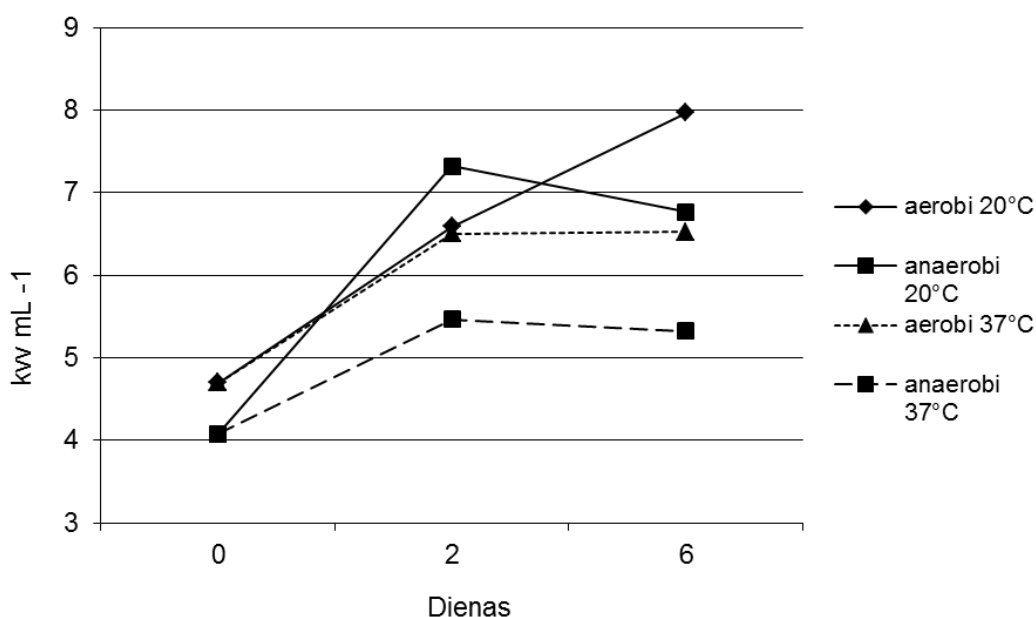
Dominējošās kultivējamo mikroorganismu sugas un klases analītiskā glicerīna fermentācijā.

Table 8

Predominant species and class of cultivable microorganisms isolated from analytical glycerol fermentation liquids.

Sugas	Klase	0 dianas	2 dianas 20°C	2 dianas 37°C	6 dianas 20°C	6 dianas 37°C
<i>Aspergillus</i> sp.	Eurotiomycetes	X			X	
<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	X	X			
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilli	X	X			
<i>Bacillus megaterium</i>	Bacilli	X				
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilli	X	X		X	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Betaproteobacteria	X	X		X	
<i>Clostridium butyricum</i>	Clostridia				X	X
<i>Clostridium romasum</i>	Clostridia	X	X			
<i>Clostridium</i> spp.	Clostridia		X	X		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Fusobacteria	X		X		
<i>Trichoderma</i> sp.	Sordariomycetes	X				
<i>Verticillium</i> sp.	Sordariomycetes	X			X	

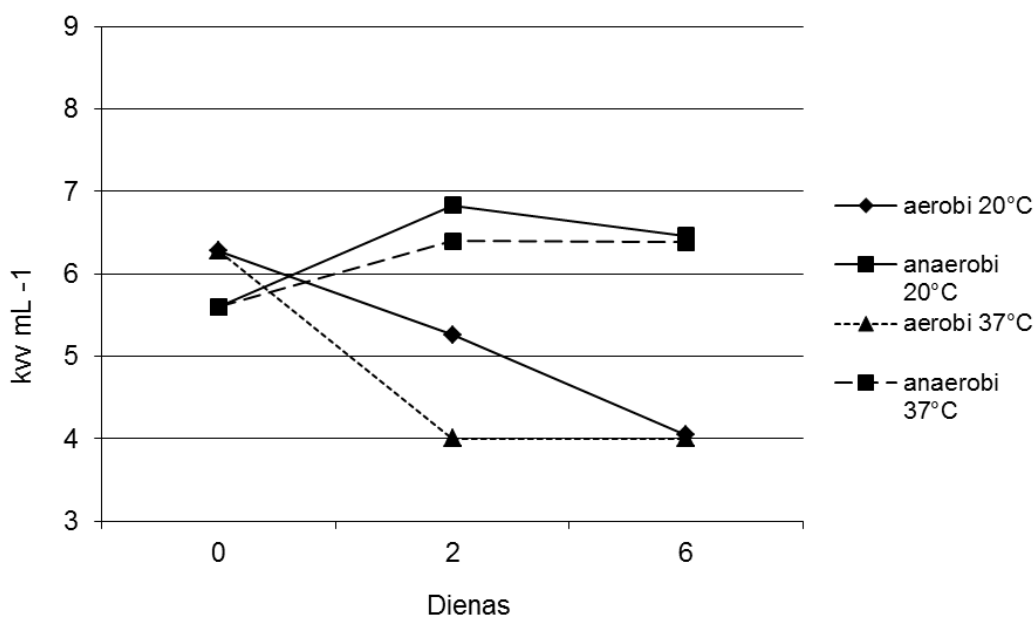
Noteikts mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību skaits pirms fermentācijas, otrajā dienā un sestajā dienā. Kolonijas veidojošo vienību skaits jēlglicerīna fermentācijas laikā izteikti palielinājies, visvairāk aerobi 20°C (5.attēls). Anaerobo mikroorganismu skaits jēlglicerīna fermentācijā strauji pieaudzis otrajā inkubācijas dienā, taču sestajā dienā samazinājies, vai nav mainījies. Lai gan fermentācijas process notika anaerobā vidē, tika konstatēts liels daudzums aerobo mikroorganismu, kas skaidrojams ar to, ka liela daļa no šiem organismiem ir fakultatīvi, nevis obligātie anaerobi.



5.attēls. Aerobos un anaerobos apstākļos augošu mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību (kvv) skaits jēlglicerīna fermentācijā 20°C un 37°C.

Figure 5. Amount of colony forming units (CFU) of aerobic and anaerobic microorganisms in crude glycerol fermentation at 20°C and 37°C.

Analītiskā glicerīna fermentācijā, kurā, kā iepriekš minēts, dominēja klostrīdijas, kas ir obligāti anaerobi, arī mikroorganismu kopskaits atspoguļo šādus rezultātus (6.attēls). Aerobo mikroorganismu skaits fermentācijas procesā strauji samazinājies. Visvairāk mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību bija anaerobos apstākļos pēc divu dienu inkubācijas.



6.attēls. Aerobos un anaerobos apstākļos augošu mikroorganismu kolonijas veidojošo vienību skaits (kvv) analītiskā glicerīna fermentācijā 20°C un 37°C.

Figure 6. Amount of colony forming units (CFU) of aerobic and anaerobic microorganisms in analytical glycerol fermentation at 20°C and 37°C.

3.4.Ķīmiskais skābekļa patēriņš un pH

Ķīmiskā skābekļa patēriņa rezultāti parādīti 9.tabulā. Nosakot ķīmisko skābekļa patēriņu jēlglicerīna fermentācijas laikā, iegūtie rezultāti 20°C un 37°C variantos bija ļoti līdzīgi. Pirms fermentācijas ĶSP bija 10,7 g/L, pēc divām dienām tā vērtība samazinājās par 1,60 g/L 20°C un 1,57 g/L 37°C. Sestajā eksperimenta dienā ĶSP gan 20°C, gan 37°C bija aptuveni 9 g/L. Analītiskā glicerīna fermentācijā ĶSP sākumā bija 11,47 g/L, pēc divām dienām 20°C tas samazinājās un lielāks kritums tika novērots sestajā dienā. 37°C ĶSP vērtība pēc divām dienām pazeminājās vairāk nekā 20°C, bet sestajā dienā tā bija nedaudz augstāka nekā 20°C. ĶSP vērtības fermentācijas sestajā dienā un sākumā starpības bija pavisam nelielas – mazāk nekā 1 g/L. Tas nozīmē, ka glicerīns un/vai citas organiskās vielas glicerīna klātbūtnē bija tikai daļēji noārdījušās.

Ķīmiskā skābekļa patēriņš jēlglicerīna un analītiskā glicerīna fermentācijā. * - būtiski atšķiras ($p < 0,05$) no 0.dienas. ** - atšķirību būtiskumu nebija iespējams noteikt.

Table 9

Chemical oxygen demand in crude glycerol and analytical glycerol fermentation. * - significantly different ($p < 0,05$) from day 0. ** - the significance of the difference could not be determined.

Dienas	Temperatūra	ĶSP, g/L	
		Jēlglicerīns	Analītiskais glicerīns**
0		10,7 ± 0,10	11,47
2	20°C	9,10 ± 0,29*	11,11
	37°C	9,13 ± 0,10*	10,67
6	20°C	8,99 ± 0,09*	10,16
	37°C	9,09 ± 0,11*	10,76

Eksperimenta gaitā sekots līdz arī vides pH, kā jau sagaidāms bioūdeņraža iegūšanā tumsas fermentācijā, pH vērtība samazinājusies (10.tabula). Analītiskā glicerīna fermentācijas eksperimenta sākuma pH bija 6,5, pēc divām dienām 37°C tas samazinājās 4,5, bet sestajā dienā nedaudz palielinājās līdz 4,7. Zemākā pH vērtība bija 20°C – tikai 4,1.

Pirms jēlglicerīna fermentācijas pH vērtība bija 6,5, tāpat kā analītiskā glicerīna eksperimentā. Šajā gadījumā pH vērtība tik ļoti nesamazinājās, bet tāpat bija zema – aptuveni 5. Seifert et al. (2009) norāda, ka pH samazinās, ja samazinās glicerīna koncentrācija. Jēlglicerīna fermentācijā sestajā dienā novērota metanogēnu darbība, kuras dēļ arī vides pH sestajā dienā ir palielinājies. Dubrovskis u.c. (2011) min, ka pH samazinās, jo notiek skābju veidošanās, bet, ja metānu veidojošās baktērijas ir pietiekošā vairumā, tad tās izmanto procesā izdalītās skābes, ātri neitralizē vidi, un process optimāli notiek pie pH 7–7,2 līdz pat pH 8. pH samazinoties zem 6, anaerobā fermentācija tiek inhibēta (Angelidaki et al. 2004). Khanal et al. (2004) pētot pH ietekmi anaerobajā fermentācijā, norāda, ka pH amplitūdā 4,5-6,5 nodrošina lielāku H₂ ieguvumu, bet lēnāku ražošanu.

10.tabula.

pH jēlglicerīna un analītiskā glicerīna fermentācijā. * - būtiski atšķiras ($p < 0,05$) no 0.dienas.

Table 10

pH in crude glycerol and analytical glycerol fermentation. * -significantly different ($p < 0,05$) from day 0.

Dienas	Temperatūra	pH	
		Jēlglicerīns	Analītiskais glicerīns
0		6,5	6,5
2	20°C	5,1 ± 0,1*	4,8 ± 0,1*
	37°C	5,0 ± 0,1*	4,5 ± 0,1*
6	20°C	4,9 ± 0,1*	4,1 ± 0,1*
	37°C	5,3 ± 0,1*	4,7 ± 0,1*

Tik liels pH kritums no 6,5 līdz pat 4,1 nozīmē, ka baktēriju barotnes šķidrā vidē bija uzkrājies liels daudzums sekundāro metabolītu, tai skaitā organisko skābju. Lai precīzāk noskaidrotu šo savienojumu koncentrāciju, tika veiktas šķidruma hromatogrāfijas analīzes.

3.5.Šķidruma hromatogrāfijas rezultāti

Noteikta organisko skābju koncentrācija jēlglicerīna fermentācijā (11.tabula). Pirms eksperimenta paraugos neviena no skābēm nepārniedza koncentrāciju 0,1 g/L, pienskābe un propionskābe vispār netika atrasta. Fermentācijās laikā skudrskābes koncentrācija pēc divu dienu inkubācijas bija palielinājusies vairāk nekā divas reizes gan 20°C, gan 37°C. Sestajā dienā skudrskābes koncentrācija turpināja pieaugt 37°C, sasniedzot gandrīz 0,2 g/L. Vienīgie paraugi, kuros novērota pienskābes izdalīšanās, bija pēc sešām dienām 20°C.

No visām noteiktajām skābju koncentrācijām lielākais kāpums novērots etiķskābei, kas sasaucas ar literatūrā minēto. Acidoģenēzes galaproduktu tipiskais daudzums fermentācijas vidē ir 77% etiķskābe, 14% sviestskābe, 8% propionskābe, 1% etanola (Mohan et al. 2008). Lai gan literatūrā minēti diezgan augsti sviestskābes un propionskābes procenti, šajos eksperimentos šo skābju klātbūtne netika novērota, kaut gan mikrobioloģiskā izpēte liecināja par klostrīdiju vairošanos.

11.tabula.

Organisko skābju koncentrācija jēlglicerīna fermentācijā. * - būtiski atšķiras ($p < 0,05$) no 0.dienas.

Table 11

Concentration of organic acids in crude glycerol fermentation. * - significantly different ($p < 0,05$) from day 0.

Dienas	Temperatūra	Koncentrācija g/L			
		Dzintarskābe	Pienskābe	Skudrskābe	Etiķskābe
0		0,028 ± 0,005	0,000	0,096 ± 0,004	0,016 ± 0,002
2	20°C	0,025 ± 0,010	0,000	0,148 ± 0,021*	0,120 ± 0,005*
	37°C	0,024 ± 0,004	0,000	0,170 ± 0,006*	0,305 ± 0,011*
6	20°C	0,046 ± 0,004*	0,020 ± 0,001*	0,169 ± 0,041*	0,226 ± 0,020*
	37°C	0,023 ± 0,007	0,000	0,194 ± 0,015*	0,056 ± 0,002*

Etiķskābes koncentrācija sākumā bija tikai $0,016 \pm 0,002$ g/L, taču jau pēc divām dienām 37°C koncentrācija sasniedza $0,305 \pm 0,011$ g/L, bet pēc sešām dienām etiķskābes koncentrācija strauji samazinājās. 20°C variantā etiķskābes koncentrācija sestajā dienā turpināja palielināties. Etiķskābes koncentrācija izskaidro pH izmaiņas, 20°C pH turpināja samazināties visas dienas, bet 37°C sestajā dienā pH palielinājās. Šīs izmaiņas, tāpat kā iepriekš minētā metāna izdalīšanās norāda uz metanogēnu, konkrētāk, acetotrofo metanogēnu darbību. Acetotrofās metanogēnās baktērijas šķeļ acetātu, veidojot metānu un ogļskābo gāzi, augšanai piemērota temperatūra variē no 2 līdz 70°C. Dabā plaši izplatītas dažādos anaerobos biotopos: saldūdens un sālsūdens dūņās un nogulās, nagiņu spurekļos, dzīvnieku ekskrementos, notekūdeņu dūņās, kā arī dažādos citos anaerobos biotopos (Kendall, Boone 2006). Tomēr ņemot vērā udeņraža samazināšanos, visdrīzāk paraugā bija gan acetotrofās, gan hidrogenotrofās metanogēnās baktērijas.

Noteikta glicerīna un citu spirtu koncentrācija paraugos (12.tabula). Pēc šķidrums hromatogrāfijas datiem, pirms fermentācijas paraugos bija $3,842 \pm 0,008$ g/L glicerīna. Jau pēc divām dienām glicerīna koncentrācija 37°C samazinājusies par vairāk nekā 1 g/L un sestajā dienā glicerīna koncentrācija bija $2,118 \pm 0,003$ g/L. Tātad pēc sešām dienām bija patērēti 44% glicerīna 37°C un 32% 20°C. Etanola koncentrācija pirms fermentācijas bija $0,228 \pm 0,140$ g/L, 20°C otrajā dienā tā palielinājās, bet sestajā samazinājās, 37°C etanola koncentrācija pamazām pieauga, līdz sestajā dienā sasniedza $0,381 \pm 0,013$ g/L. Fermentācijas

laikā saražots ne tikai etanols, bet arī izobutanols un *n*-butanols. Ievērojams koncentrācijas pieaugums novērots izobutanolam, it sevišķi 37°C, kur izobutanola koncentrācija atšķirībā no sākotnējās koncentrācijas palielinājusies 5 reizes. *n*-butanola koncentrācija attiecībā pret izobutanola koncentrāciju bija mazāka, taču *n*-butanola koncentrācija sestajā dienā 37°C atšķirībā no sākuma koncentrācijas palielinājās 10,7 reizes un 20°C – 10,3 reizes.

12.tabula.

Spirtu koncentrācija jēlglicerīna fermentācijā. * - būtiski atšķiras ($p < 0,05$) no 0.dienas.

Table 12

Concentration of alcohols in crude glycerol fermentation. * - significantly different ($p < 0,05$) from day 0.

Dienas	Temperatūra	Koncentrācija g/L			
		Glicerīns	Etanols	Izobutanols	<i>n</i> -butanols
0		3,842 ± 0,008	0,228 ± 0,140	0,174 ± 0,011	0,019 ± 0,001
2	20°C	3,148 ± 0,005*	0,289 ± 0,021	0,240 ± 0,012*	0,030 ± 0,011
	37°C	2,511 ± 0,083*	0,378 ± 0,038	0,364 ± 0,044*	0,163 ± 0,003*
6	20°C	2,598 ± 0,175*	0,216 ± 0,043	0,599 ± 0,072*	0,195 ± 0,006*
	37°C	2,118 ± 0,003*	0,381 ± 0,013	0,875 ± 0,017*	0,204 ± 0,013*

Veicot aprēķinus, noskaidrots, ka no 1 g glicerīna pēc sešām dienām 37°C bija radies 0,41 g izobutanola un 0,11 g *n*-butanola, bet 20°C – 0,34 g izobutanola un 0,14 g *n*-butanola. Izobutanols un *n*-butanols ir perspektīvas alternatīvas naftas degvielai. Etanols ir pirmās paaudzes biodegviela, un to izmanto galvenokārt kā piedevu benzīnam, izobutanols ir otrās paaudzes biodegviela ar vairākām īpašībām, kas to padara izdevīgāku nekā etanolu. Izobutanolu var jaukt ar benzīnu dažādās proporcijās, izobutanols slikti absorbē ūdeni no gaisa un tam ir relatīvi augsts enerģijas blīvums – 98% no benzīna enerģijas blīvuma (Peralta-Yahya et al. 2012). *N*-butanola ražošana no biomasas un lauksaimniecības atkritumiem tiek uzskatīta par ekonomiski efektīvāku nekā etanola vai metanola ražošana (Zheng et al. 2016).

3.6. Ūdeņraža iznākums

Lai aprēķinātu ūdeņraža iznākumu, saražotais ūdeņraža tilpums izteikts molos, iegūtā vērtība izdalīta ar patērēto glicerīna daudzumu molos, kas aprēķināti pēc šķidrums hromatogrāfijas datiem (Sen et al. 2008). Analītiskā glicerīna fermentācijas ūdeņraža iznākumu nevarēja noteikt, jo nebija noteikts gāzu procentuālais sastāvs un trūka šķidrums

hromatogrāfijas datu vairākiem paraugiem. Noteikts maksimālais ūdeņraža iznākums jēlglicerīna fermentācijā, un 20°C tas bija $0,59 \pm 0,01$ mol H₂/ mol glicerīna. 37°C ūdeņraža iznākums bija 2,7 reizes lielāks – $1,57 \pm 0,10$ mol H₂/ mol glicerīna. Qin & Li (2012) par optimālo temperatūru maksimālā ūdeņraža iznākuma iegūšanai min 35°C, Wang & Wan (2011) – 37,4°C un Abdeshahian et al. (2014) nosauca temperatūras diapazonu 34–37°C, norādot ka augstāka vai zemāka temperatūra inhibē ūdeņraža producēšanu. Teorētiskais ūdeņraža iznākums no glicerīna tumsas fermentācijā ir 3,0 mol H₂/mol glicerīna (Maru et al., 2013). 37°C fermentācijā sasniegti 52% no teorētiskā rezultāta, bet 20°C tikai – 20%, iespējams jēlglicerīnā esošie piemaisījumi inhibē ūdeņraža veidošanos.

SECINĀJUMI

1. Neapstrādātas ezera dūņas ir piemērots mikrobioloģiskais materiāls ūdeņraža iegūšanai no glicerīna.
2. Ezera dūņu mikroorganismi spēj producēt bioūdeņradi no jēlglicerīna 37°C temperatūrā, dominējot Clostridia klases baktērijām.
3. 20°C tumsas fermentācijas procesam ir mazāk piemēroti nekā 37°C, jo dominē *Bacillus*, kam ir zemākas bioūdeņraža producēšanas spējas nekā Clostridia.
4. Glicerīna fermentāciju nodrošināja galvenokārt anaerobi – Clostridia un Gamma-Proteobacteria klases baktērijas. Aerobiem (*Bacillus* spp.) bija lielāka nozīme jēlglicerīna nekā analītiskā glicerīna fermentācijas procesos.
5. Mikroorganismu izdalīto gāzu sastāvs un ūdeņraža daudzums būtiski neatšķīrās jēlglicerīna un analītiskā glicerīna fermentācijā.
6. Ezera dūņu mikroorganismi fermentēja glicerīnu 37°C, 6 dienās samazinot glicerīna koncentrāciju par 45 %, un uzkrāja galvenokārt neitrālus metabolisma produktus – izobutanolu un *n*-butanolu.
7. Jēlglicerīna fermentācijā 37°C temperatūrā maksimālais ūdeņraža iznākums bija $1,57 \pm 0,10$ mol H₂/ mol glicerīna, kas ir 52 % no teorētiski iespējamā.

PATEICĪBAS

Pateicos darba vadītājai Dr.biol., asoc.prof. Vizmai Nikolajevai par iespēju izstrādāt darbu, par palīdzību eksperimentu izveidē, par vērtīgiem padomiem datu apstrādē, pacietību un sapratni.

Pateicos LU Cietvielu un fizikas institūta inženierim Laimonim Jēkabsonam par sniegto palīdzību darba procesā ar masspektrometru.

Paldies LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta pētniecei Ritai Ščerbakai par šķidrums hromatogrāfijas rezultātiem.

Paldies Mg.biol. Artūram Grudulam par sniegto palīdzību FISH metodes apgūvē.

Izsaku pateicību darba recenzentei Dr.biol. Ilzei Dimantai.

IZMANTOTĀ LITERĀTŪRA

1. Abdeshahian P., Al-Shorgani N.K.N., Salih N.K.M., Shukor H., Kadier A., Hamid A.A., Kalil M.S. 2014. The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39 (24): 12524–12531.
2. Almeida J.R.M., Fávaro L.C.L., Quirino B.F. 2012. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, 5: 48.
3. Amon T., Kryvoruchko V., Amon B., Schreiner M. 2004. Untersuchungen zur Wirkung von Rohglycerin aus der Biodieselerzeugung als leistungssteigerndes Zusatzmittel zur Biogaserzeugung aus Silomais, Körnermais, Rapspresskuchen und Schweinegülle. Ergebnisbericht Department für Nachhaltige Agrarsysteme Institut für Landtechnik, Universität für Bodenkultur, Wien, 18 pp.
4. Angelidaki I., Sanders W., 2004. Assesment of anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3: 117 – 129.
5. Basak N., Das D. 2009. Photofermentative hydrogen production using purple non-sulphur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: A case study. *Biomass Bioenergy*, 33(6-7): 911–919.
6. Batista A.P., Moura P., Marques P., Ortigueira J., Alves L., Gouveia L. 2014. *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel*, 117: 537-543.
7. Bauer C., Korthals M., Gronauer A., Lebuhn M. 2008. Methanogens in biogas production from renewable resources – a novel molecular population analysis approach. *Water Science & Technology*, 58: 1433-1439.
8. Chong M.L., Sabaratnam V., Shirai Y., Hassan M. A. 2009. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 3277-3287.
9. Clomburg J.M., Gonzalez R. 2012. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, 31(1): 20-28.
10. Collet C., Adler N., Schwitzguebel J.P., Peringer P. 2004. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 1479-1485.

11. Crocetti G.R., Banfield J.F., Keller J., Bond P.L., Blackall L.L. 2002. Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, 148: 3353–3364.
12. Dartois V., Coppée J.Y., Colson C., Baulard A. 1994. Genetic analysis and overexpression of lipolytic activity in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5): 1670–1673.
13. Demirbas A. 2009. Biohydrogen: for future engine fuel demands (green energy and technology). London: Springer-Verlag, 276 pp.
14. Dollhofer V., Podmirseg S. M., Callaghan T. M., Griffith G. W., Fliegerova K. 2015. Anaerobic fungi and their potential for biogas production. In: Gübitz G. M., Bauer A., Bochmann G., Gronauer A., Weiss S. (eds.), *Biogas Science and Technology*, Springer, pp. 41–61.
15. Dubrovskis V., Niklass M., Emsis I., Kārklīņš A. 2011. Biogāzes ražošana un efektīva izmantošana. Latvijas biogāzes asociācija, 81 lpp.
16. Fang H.H.P., Li C.L., Zhang T. 2006. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31: 683-692.
17. Felske A., Akkermas A. D. L., De Vos W. M. 1998. *In situ* detection of an uncultured predominant *Bacillus* in Dutch grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4588–4590.
18. Ferchichi M., Crabbe E., Gil G.H., Hintz W., Almadidy A. 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J.Biotech.*, 120: 402-409.
19. Fountoulakis M. S., Petousi I., Manios T. 2010. Co-digestion of sewage sludge with glycerol to boost biogas production. *Waste Management*, 30, 1849–1853.
20. Fountoulakis M.S., Manios T. 2009. Enhanced methane and hydrogen production from municipal solid waste and agro-industrial by-products co-digested with crude glycerol. *Bioresource Technology*, 100: 3043-3047.
21. Franks A. H., Harmsen H. J., Raangs G. C., Jansen G. J., Schut F., Welling G. W. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3336–3345.
22. Fuchs B. M., Pernthaler J., Amann R. 2007. Single cell identification by fluorescence *in situ* hybridization. In: Reddy C. A., Beveridge T. J., Breznak J. A., Marzluf G., Schmidt T. M., Snyder L. R. (eds.), *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3rd edition. ASM Press, Washington, pp. 886–896.

23. Grimont F., Grimont P.A.D. 2006. The genus *Enterobacter*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes: Vol. 6, 3rd edition, Singapore, Springer Science+Business Media: 197-215.
24. Guo X.M., Trably E., Latrille E., Carrere H., Steyer J.P. 2010. Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19): 10660-10673.
25. Hallenbeck P. C. 2005. Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Science and Technology*, 52 (1-2): 21-29.
26. Hallenbeck P. C., Ghosh D. 2009. Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward? *Trends in Biotechnology*, 27(5): 287-297.
27. Huang C.L., Chen C.C., Lin C.Y., Liu W.T. 2009. Quantitative fluorescent *in-situ* hybridization: a hypothesized competition mode between two dominant bacteria groups in hydrogen-producing anaerobic sludge processes. *Water Science Technology*, 2009; 59(10):1901-1909.
28. Hutchison M. L., Poxton I. R., Govan J. R. W. 1998. *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. *Infection and Immunity*, 66: 2033–2039.
29. Ito T., Yoshiguchi K., Ariesyady H.D., Okabe S. 2011. Identification of a novel acetate-utilizing bacterium belonging to Synergistes group 4 in anaerobic digester sludge. *ISME Journal*, 5(12): 1844-1856.
30. Jo J.H., Lee D.S. Park D., Choe W.S., Park J.M. 2008. Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods. *Bioresource Technology*, 99(6): 2061-2066.
31. Kalia V. C., Jain, S. R., Kumar, A., Joshi A. P. 1994. Fermentation of biowaste to H₂ by *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10: 224–227.
32. Kapdan I.K., Kargi F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 569-582.
33. Kendall M.M., Boone D.R. 2006. The order Methanosarcinales. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt (ed.), The Prokaryotes: Vol. 3, 3rd edition, Singapore, Springer Science+Business Media: 244-256.
34. Khanal S.K., Chen W.H., Li L., Sung S.W. 2004. Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(11): 1123-1131.

35. Kim M.S., Lee T.J., Yoon Y.S., Lee I.G., Moon K.W. 2001. Hydrogen production from food processing wastewater and sewage sludge by anaerobic dark fermentation combined with photofermentation. In: Biohydrogen II, Pergamon, eBook ISBN: 9780080527963, 288 pp.
36. Lay J.J., Fan K.S., Chang J., Ku C.H. 2003. Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28(12): 1361-1367.
37. Lee J.Y., Chen X.J., Lee E.J., Min K.S. 2012. Effects of pH and carbon sources on biohydrogen production by co-culture of *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3): 400-406.
38. Levin D.B., Pitt L., Love M. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(2): 173–185.
39. Liu H., Zhang T., Fang H.H.P. 2003. Thermophilic H₂ production from a cellulose-containing wastewater. *Biotechnology Letters*, 25: 365-369.
40. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus*. 2015. In: Whitman W. B. (ed.). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley & Sons, in association with Bergey's Manual Trust, pp. 1–163.
41. Lomell S., Benesch S., Rohde M., Wehland J. 2010. Pedestal formation by pathogenic *Escherichia coli*: a model system for studying signal transduction to the actin cytoskeleton. In: Kreitzer G., Fanny J., Espenel C. (ed), *Cell Biology Assays Essential Methods*, Oxford, Elsevier: 249-258.
42. Luque R. 2011. *Handbook of biofuels production: processes and technologies*, 1st edition. Padstow: Woodhead Publishing, 688 pp.
43. Makàdi M., Tomócsik A., Orosz V. 2012. Digestate: a new nutrient source – review. *Biogas*. Rijeka, InTech, 408 pp.
44. Manish S., Banerjee R. 2008. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(1): 279-286.
45. Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer, K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15: 593–600.
46. Markov S. A., Averitt J., Waldron B. 2011. Bioreactor for glycerol conversion into H₂ by bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36: 262 – 266.

47. Márquez-Reyes L.A., del Pilar Sánchez-Saavedra M., Valdez-Vazquez I. 2015. Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40: 7291-7300.
48. Martínez-Merino V., Gil M.J., Cornejo A. 2013. Biological hydrogen production. In: Gandia L.M., Arzamedi G., Dieguez P.M. (ed.), *Renewable hydrogen technologies: production, purification, storage, applications and safety*, Oxford, Elsevier Science: 171-201.
49. Maru B.T., Constanti M., Stchigel A.M., Medina F., Sueiras J.E., 2013. Biohydrogen production by dark fermentation of glycerol using *Enterobacter* and *Citrobacter* sp. *Biotechnology Progress*, 29 (1): 31–38.
50. Mohan S.V., Mohanakrishna G., Sarma P.N. 2008. Integration of acidogenic and methanogenic processes for simultaneous production of biohydrogen and methane from wastewater treatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33: 2156–2166.
51. Mortensen L.M., Gislerød H.R. 2015. The growth of *Chlamydomonas reinhardtii* as influenced by high CO₂ and low O₂ in flue gas from a silicomanganese smelter. *Journal of Applied Phycology*, 27(2): 633-638.
52. Moter A., Göbel U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2): 85-112.
53. Nakano M.M., Zuber P. 1998. Anaerobic Growth of a 'Strict Aerobe' (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52: 165-190.
54. Nath K., Das D. 2004. Improvement of fermentative hydrogen production – various approach. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 520–529.
55. Neuman R. C. 2013. *Organic Chemistry*. University of California, Riverside, 667 pp.
56. Pachapur V.L., Sarma S.J., Brar S.K., Bihan Y.L., Buelna G, Verma M. 2016. Surfactant mediated enhanced glycerol uptake and hydrogen production from biodiesel waste using co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Renewable Energy*, 95: 542-551.
57. Paiders M., Gruduls A., Kalnina L., Valucka S., Dimanta I., Kleperis J., Nikolajeva V. 2017. Biogas and hydrogen production from glycerol by *Enterobacter aerogenes* and anaerobic microbial communities. *Agronomy Research*, 15(1): 256–269.
58. Palleroni N. J. 2015. *Burkholderia*. In: Whitman W. B. (ed.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley & Sons, in association with Bergey's Manual Trust, pp. 1–50.

59. Peralta-Yahya P., Fuzhong Z., del Cardayre S. B., Keasling J.D., 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*, 488 (7411): 320–328.
60. Pernthaler J., Glöckner F.O., Schönhuber W., Amann R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, 30(1): 207-227.
61. Petitdemange G., Durr C., Abbdan Analoussi S., Raval G. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J. Ind. Microbiol.*, 15: 498-502.
62. Pilon L., Berberoglu H. 2014. Photobiological hydrogen production. In: Sherif S.A., Goswami D.Y., Stefanakos E.K., Steinfeld A. (ed.), *Handbook of hydrogen energy*, Boca Raton, CRC Press, 369-421.
63. Porwal S., Kumar T., Lal S., Rani A., Kumar S., Cheema S., Purohit H. J., Sharma R., Patel S. K. S., Kalia V. C. 2008. Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99: 5444–5451.
64. Qin Z., Li D. 2012. Hydrogen-production of hydrogen-producing bacteria at different temperatures in batch culture. *Advanced Materials Research*, 515: 1400–1403.
65. Rademacher A., Zakrzewski M., Schlüter A., Schönberg M., Szczepanowski R., Goesmann A., Pühler A., Klocke M. 2012. Characterization of microbial biofilms in a thermophilic biogas system by high-throughput metagenome sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 79: 785–799.
66. Raghunandan K., McHunu S., Kumar A., Kumar K.S., Govender A., Permaul K., Singh S. 2014. Biodegradation of glycerol using bacterial isolates from soil under aerobic conditions. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 49(1): 85 - 92.
67. Rai P.K. 2016. Recent advances in substrate utilization for fermentative hydrogen production. *J. App. Biol. Biotech.*, 4 (6): 059-067.
68. Resende J. A., Silva V. L., De Oliveira T. L. R., De Oliveira F. S., Da Costa C. J., Otenio M. H., Diniz C. G. 2014. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*, 153: 284–291.
69. Sabourin-Provost G., Hallenback C. 2009. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresource Technology*, 100: 3513-3517.

70. Sarma S.J., Brar S.K., Sydeny E.B., Bihan Y., Buelna G., Soccol C.R. 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37: 6473-6490.
71. Seifert K., Waligorska M., Wojtowski M., Laniecki M. 2009. Hydrogen generation from glycerol in batch fermentation process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34: 3671 – 3678.
72. Sen U., Shakdwipee M., Banerjee R. 2008. Status of Biological hydrogen production. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 980-993.
73. Silva G.P., Mack M., Contiero J. 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27: 30-39.
74. Sinha P., Roy S., Das D. 2015. Role of formate hydrogen lyase complex in hydrogen production in facultative anaerobes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40: 8806-8815.
75. Siyambalapitiya N., Blackall L.L. 2006. Discrepancies in the widely applied GAM42a fluorescence in situ hybridisation probe for Gammaproteobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 242 (2): 367-373.
76. Skarka J. 2012. Microalgae biomass potential in Europe. Land availability as a key issue. *Technikfolgenabschätzung - Theorie und Praxis*, 21(1): 72-79.
77. Skjanes K., Lindblad P., Muller J. 2007. BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. *Biomolecular Engineering*, 24 : 405–413.
78. Stahl D. A., Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: Stackebrandt E. & Goodfellow M. (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley & Sons, New York, pp. 205–248.
79. Szymanowska-Powalowska D. 2015. The effect of high concentrations of glycerol on the growth, metabolism and adaptation capacity of *Clostridium butyricum* DSP1. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18: 128-133.
80. Tokumoto H., Bandow H., Kurahashi K., Wakamatsu T. 2012. Utilization of crude glycerin from biodiesel production: A field test of a crude glycerin recycling process. *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*, 13: 363-382.
81. Van Ginkel S.W., Oh S.E., Logan B.E. 2005. Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30: 1535-1542.

82. Wang J., Wan W. 2011. Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge. *Biomass and Bioenergy*, 35 (9): 3896–3901.
83. Yang F., Hanna M. A., Sun R. 2012. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5: 1–10.
84. Yang F., Milford A.H., Sun R. 2012. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. *Biotechnol. Biofuels*, 5: 13.
85. Yazdani S.S., Gonzalez R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3): 213–219.
86. Zhang L.P., Happe T., Melis A. 2002. Biochemical and morphological characterization of sulfur deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 214: 552–561.
87. Zheng Z., Wang X., Zhong X., Hu B., Liu H., Yao M. 2016. Experimental study on the combustion and emissions fueling biodiesel/*n*-butanol, biodiesel/ethanol and biodiesel/2,5-dimethylfuran on a diesel engine. *Energy*, 115: 539-549.

Maģistra darbs „DABISKU MIKROORGANISMU ASOCIĀCIJU IZMANTOŠANA BIOŪDENRAŽA IEGŪŠANAI NO GLICERĪNA” izstrādāts LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Lauma Kalniņa

26.05.2017.

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Dr. biol., asoc.prof. Vizma Nikolajeva

26.05.2017.

Recenzents:

Dr. biol. Ilze Dimanta

Darbs iesniegts Bioloģijas fakultātē 26.05.2017.

Metodiķe: Diāna Marcinkēviča

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

2017.gada 6.jūnijā prot. Nr. ____, vērtējums _____

Komisijas sekretāre: Dr. biol., asoc. prof. Līga Plakane