

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Igor HORVAT

**VPLIV DODATKA ODPADNEGA PIVOVARSKEGA
KVASA NA PROIZVODNJO BIOPLINA Z
GRANULIRANIM MULJEM IZ UASB
BIOREAKTORJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Igor HORVAT

**VPLIV DODATKA ODPADNEGA PIVOVARSKEGA KVASA NA
PROIZVODNJO BIOPLINA Z GRANULIRANIM MULJEM IZ UASB
BIOREAKTORJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE IMPACT OF WASTE BREWERY YEAST ADDITION ON THE
PRODUCTION OF BIOGAS WITH GRANULAR SLUDGE FROM
THE UASB BIOREACTOR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

S tem diplomskim delom končujem univerzitetni študij kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Igor HORVAT

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

| | |
|----|---|
| ŠD | Dn |
| DK | UDK 579(043.2)=163.6 |
| KG | bioplin/metanogeneza/mikrobiologija/pivovarski kvas/UASB bioreaktor |
| KK | AGRIS / |
| AV | HORVAT, Igor |
| SA | MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica) |
| KZ | SI-1230 Domžale, Groblje 3 |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko |
| LI | 2010 |
| IN | VPLIV DODATKA ODPADNEGA PIVOVARSKEGA KVASA NA PROIZVODNJO BIOPLINA Z GRANULIRANIM MULJEM IZ UASB BIOREAKTORJA |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij) |
| OP | XII, 52 str., 6 pregl., 21 sl., 57 vir. |
| IJ | sl |
| JJ | sl/en |
| AI | Proizvodnja bioplina postaja vse bolj pomembna predvsem iz vidika oskrbe z obnovljivo energijo, varovanja okolja in nenazadnje tudi ekonomičnosti. Z raziskavo smo želeli preveriti ali se bo v mezofilnem bioreaktorju z muljno posteljico (UASB reaktor) s povečanjem koncentracije odpadnega nehidroliziranega kvasa v odpadni pivovarski vodi, povečala tudi proizvodnja bioplina. Hkrati smo želeli preveriti ali se bo proizvodnja bioplina povečala s povečanjem obremenitve mikrobne biomase. Test biometanskega potenciala (BMP) smo opravili pri štirih različnih substratih: odpadni pivovarski vodi, odpadni pivovarski vodi z 0,74 % kvasa, 1,85 % kvasa in 3,7 % kvasa. Test smo izvedli pri dveh različnih obremenitvah mikrobne biomase. V prvem poskusu je bila povprečna obremenitev 185 mg KPK/g OS, v drugem pa 344 mg KPK/g OS. Rezultati so pokazali, da je pri manjši obremenitvi mikrobne biomase najbolj učinkovit substrat za proizvodnjo bioplina odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa, medtem ko pri večji obremenitvi pridobimo največ bioplina iz odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa. Pri večji obremenitvi smo pri odpadni pivovarski vodi s 3,7 % kvasa opazili rahlo zmanjšanje proizvodnje bioplina. |

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579(043.2)=163.6

CX biogas/methanogenesis/microbiology/brewers yeast/UASB bioreactor

CC AGRIS /

AU HORVAT, Igor

AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)

PP SI-1230 Domžale, Groblje 3

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science

PY 2010

TI THE IMPACT OF WASTE BREWERY YEAST ADDITION ON THE PRODUCTION OF BIOGAS WITH GRANULAR SLUDGE FROM THE UASB BIOREACTOR

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XII, 52 p., 6 tab., 21 fig., 57 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Biogas production is becoming increasingly important especially in terms of renewable energy supply, environmental protection and economy. The aim of the study was to determine the increase of biogas production in the mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) by increasing the concentration of waste nonhydrolyzed brewery yeast. We also wanted to determine whether the biogas production increases due to the increased COD load of microbial biomass. Using the biomethane potential test we measured the quantity of produced methane for four different substrates: brewery wastewater, brewery wastewater with 0.74%, 1.85% and 3.7% added yeast. The test was performed at two different COD loads of microbial biomass. The average load value of microbial biomass in the first test was 185 mg COD/g OM and 344 mg COD/g OM in the second one. The results showed that biogas production was most efficient at lower load with 3.7 % yeast added in wastewater, while at higher load the production of biogas was most efficient with 1.85 % yeast added in wastewater. Just a slight decrease in biogas production was observed at higher load of microbial biomass with 3.7 % yeast added in wastewater.

KAZALO VSEBINE

| | str. |
|--|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija (KDI) | III |
| Key words documentation (KWD) | IV |
| Kazalo vsebine | V |
| Kazalo preglednic | IX |
| Kazalo slik | X |
| Okrajšave in simboli | XII |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE | 2 |
| 1.2 HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 BIOPLINARNE | 3 |
| 2.2 BIOPLIN IN PRESNOVLJEN SUBSTRAT | 5 |
| 2.3 ODPADNA PIVOVARSKA VODA IN ODPADNI PIVOVARSKI KVAS KOT SUBSTRATA ZA PROIZVODNJO BIOPLINA | 6 |
| 2.3.1 Odpadna pivovarska voda | 6 |
| 2.3.2 Odpadni pivovarski kvas | 7 |
| 2.4 MIKROBIOLOŠKI PROCES ANAEROBNE FERMENTACIJE | 8 |
| 2.4.1 Hidroliza | 9 |
| 2.4.2 Acidogeneza | 10 |
| 2.4.3 Acetogeneza | 10 |
| 2.4.4 Metanogeneza | 11 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.5 | VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA ANAEROBNO RAZGRADNJO ORGANSKIH SNOVI | 12 |
| 2.5.1 | Substrat in hranila | 13 |
| 2.5.2 | Začetni čas obratovanja in mikroorganizmi | 14 |
| 2.5.3 | Temperatura | 14 |
| 2.5.4 | Vrednost pH | 15 |
| 2.5.5 | Parcialni tlak vodika | 15 |
| 2.5.6 | Inhibitorne snovi | 15 |
| 2.5.6.1 | Kisik | 16 |
| 2.5.6.2 | Kratkoverižne maščobne kisline | 16 |
| 2.5.6.3 | Dušik (NH_4^+ , NH_3 , NO_3^-) | 17 |
| 2.5.6.4 | Žveplove spojine | 18 |
| 2.5.6.5 | Težke in lahke kovine | 19 |
| 2.5.6.5.1 | Težke kovine | 19 |
| 2.5.6.5.2 | Lahke kovine | 19 |
| 3 | MATERIAL IN METODE | 21 |
| 3.1 | MATERIAL | 21 |
| 3.2 | METODE | 21 |
| 3.2.1 | Analiza KPK substratov | 21 |
| 3.2.2 | Ugotavljanje organske in suhe snovi mikrobne biomase | 22 |
| 3.2.3 | Termostatiranje mikrobne biomase | 23 |
| 3.2.4 | Priprava fosfatnega pufra | 23 |
| 3.2.5 | Obremenitev mikrobne biomase z organsko snovjo in sestava testnih mešanic | 23 |
| 3.2.6 | Vzorčenje testnih mešanic | 25 |
| 3.2.7 | Spremljanje parametrov testa BMP 1 in BMP 2 | 26 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.2.7.1 | Spremljanje tlaka v poskusnih steklenicah in izračun količine nastalega bioplina | 26 |
| 3.2.7.2 | pH testnih mešanic | 27 |
| 3.2.7.3 | Analiza sestave nastalega bioplina | 27 |
| 3.2.7.4 | Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) | 28 |
| 3.2.7.5 | Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) | 28 |
| 3.2.7.6 | Celokupna produkcija metana | 29 |
| 3.2.7.7 | Bioplinski potencial | 29 |
| 3.2.7.8 | Produkcija metana na 1 g dodanega KPK substrata / metanski potencial | 29 |
| 3.2.7.9 | Izplen metana | 29 |
| 4 | REZULTATI | 30 |
| 4.1 | VREDNOSTI KPK SUBSTRATOV | 30 |
| 4.2 | SUHA SNOV (SS) IN ORGANSKA SNOV (OS) MIKROBNE BIOMASE | 30 |
| 4.3 | VREDNOST pH TESTNIH MEŠANIC V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) | 30 |
| 4.4 | PRODUKCIJA BIOPLINA V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) | 31 |
| 4.5 | PRODUKCIJA METANA V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) | 33 |
| 4.6 | DELEŽ METANA V BIOPLINU MED POSKUSOMA BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) | 35 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.7 | KONCENTRACIJE KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN (KMK) V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) | 36 |
| 4.8 | CELOKUPNA PRODUKCIJA METANA, BIOPLINSKI POTENCIAL, PRODUKCIJA METANA NA 1g DODANEGA KPK IN IZPLEN METANA V TESTIH BMP 1 IN BMP 2 | 39 |
| 5 | RAZPRAVA IN SKLEPI | 41 |
| 5.1 | RAZPRAVA | 41 |
| 5.2 | SKLEPI | 44 |
| 6 | POVZETEK | 45 |
| 7 | VIRI | 47 |
| | ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | str. |
|---|------|
| Preglednica 1: Obremenitev mikrobne biomase v poskusu BMP 1 in BMP 2 | 23 |
| Preglednica 2: Sestava testnih mešanic za BMP 1 | 24 |
| Preglednica 3: Sestava testnih mešanic za BMP 2 | 24 |
| Preglednica 4: KPK substratov v poskusih BMP 1 in BMP 2 | 30 |
| Preglednica 5: Povprečna vsebnost suhe snovi in organske snovi mikrobne biomase v poskusih BMP 1 in BMP 2 | 30 |
| Preglednica 6: Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2 | 40 |

KAZALO SLIK

| | str. |
|--|------|
| Slika 1: Shema UASB bioreaktorja (Khanal, 2008a: 106) | 5 |
| Slika 2: Shema anaerobne razgradnje (Wastewater anaerobic, 2004) | 9 |
| Slika 3: Razmerje amoniaka in amonijevega iona glede na vrednosti pH (Deublein in Steinhauser, 2008: 123) | 17 |
| Slika 4: Potek sestave testnih mešanic | 25 |
| Slika 5: Vzorčenje v času poskusa BMP 1 in BMP 2 | 26 |
| Slika 6: Začetne in končne vrednosti pH v poskusu BMP 1 | 31 |
| Slika 7: Začetne in končne vrednosti pH v poskusu BMP 2 | 31 |
| Slika 8: Produkcija bioplina v odvisnosti od časa v poskusu BMP 1 | 32 |
| Slika 9: Produkcija bioplina v odvisnosti od časa v poskusu BMP 2 | 33 |
| Slika 10: Produkcija metana v odvisnosti od časa v poskusu BMP 1 | 34 |
| Slika 11: Produkcija metana v odvisnosti od časa v poskusu BMP 2 | 34 |
| Slika 12: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni substrat v poskusu BMP 1 | 35 |
| Slika 13: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 2 | 36 |
| Slika 14: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 1 med poskusom BMP 1 | 37 |
| Slika 15: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 2 med poskusom BMP 1 | 37 |

| | |
|--|----|
| Slika 16: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 3 med poskusom BMP 1 | 37 |
| Slika 17: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 4 med poskusom BMP 1 | 37 |
| Slika 18: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 1 med poskusom BMP 2 | 38 |
| Slika 19: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 2 med poskusom BMP 2 | 38 |
| Slika 20: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 3 med poskusom BMP 2 | 38 |
| Slika 21: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 4 med poskusom BMP 2 | 38 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|------------|---|
| Substrat 1 | Vzorec odpadne pivovarske vode |
| Substrat 2 | Vzorec odpadne pivovarske vode z 0,74 % kvasa |
| Substrat 3 | Vzorec odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa |
| Substrat 4 | Vzorec odpadne pivovarske vode s 3,7 % kvasa |
| KMK | Kratkoverižne maščobne kisline |
| KPK | Kemijska potreba po kisiku |
| SS | Suha snov |
| OS | Organska snov |
| UASB | Upflow anaerobic sludge blanket = bioreaktor z lebdečo muljno posteljico in vtokom od spodaj |

1 UVOD

V zadnjih letih se ljudje vse bolj zavedamo okoljskih težav, ki pa jih je potrebno v današnjem sistemu uskladiti z načeli ekonomike, sociologije in drugimi vedami. Zavedati se moramo, da je današnja okoljska težava lahko že jutri stvar vsakega posameznika, tudi njegovega zdravja. Potrebno je poudariti, da okolje varujemo zaradi nas samih. Vse okoljske, ekonomske in druge težave je potrebno celostno reševati in med tem sprejemati kompromise, ki čim bolj koristijo in čim manj škodijo vsem vključenim dejavnikom. Vse odločitve moramo sprejemati po načelu trajnosti. Zaradi negativnih vplivov na okolje in velike porabe energije, se tako v svetu kot tudi v Sloveniji, vedno bolj uveljavljajo obnovljivi viri energije, med katere spada tudi proizvodnja energije iz bioplina. Proizvodnja bioplina v bioplinarnah je ena izmed rešitev, ki temelji na načelu trajnosti, vendar le takrat, ko ni škodljivega vpliva na okolje ali je le-ta tako majhen da ni dolgoročnih škodljivih posledic za ekosisteme. Pri taki rešitvi delujemo na dolgi rok pozitivno tako na gospodarstvo, kot tudi na okolje. Moramo še opozoriti, da se bioplinska tehnologija ne sme uporabljati na račun prekomernega zmanjšanja pridelave hrane in krme, ki je osnova za človekovo preživetje.

V Pivovarni Laško ob proizvodnji piva ustvarjajo velike količine stranskih produktov, med katere spadata odpadna pivovarska voda in odpadni pivovarski kvas. Odpadno pivovarsko vodo že sedaj porabljajo v UASB bioreaktorju za proizvodnjo bioplina medtem, ko odpadni pivovarski kvas dehidrirajo in prodajo na trgu. Pivovarski kvas morajo dehidrirati, ker je sicer njegova količina zelo velika, kar podraži ceno transporta. Zaradi okoljevarstvene zakonodaje so v Pivovarni Laško dolžni izvajati monitoring izpustov CO₂ in njegovih ekvivalentov. Pri dehidraciji odpadnega pivovarskega kvasa porabijo veliko energije in v zrak izpustijo veliko toplogrednih plinov, kar je povezano z večjimi stroški proizvodnje.

Povod raziskovalnega dela je bil zmanjšati stroške proizvodnje (sušenje kvasa), zmanjšati emisije toplogrednih plinov in povečati produkcijo energije v Pivovarni Laško s pretvorbo odpadnega pivovarskega kvasa v bioplin v UASB bioreaktorju.

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv različne koncentracije odpadnega nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi na produkcijo bioplina pri različni obremenitvi biomase. Želeli smo ugotoviti ali bo pri odpadni pivovarski vodi z večjo koncentracijo nehidroliziranega kvasa tudi večja produkcija bioplina ali pa se bo produkcija bioplina zmanjšala. Zanimalo nas je, ali se ob povečani obremenitvi mikrobne biomase poveča tudi proizvodnja biopina.

1.2 HIPOTEZE

Predpostavljali smo, da s povečevanjem koncentracije odpadnega pivovarskega kvasa (do 3,7 %) v odpadni pivovarski vodi in s povečanjem obremenitve mikrobne biomase z organsko snovjo povečamo produkcijo bioplina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLINARNE

Bioplinarna je katerakoli tehnološka enota in oprema za obdelavo biološko razgradljivih odpadkov z anaerobno razgradnjo (Uredba o obdelavi ... , 2008). Poznamo več različnih vrst bioplinarn, ki jih lahko razdelimo glede na vhodne substrate, stopnjo obdelave substratov, pretok substratov, količino tekoče faze in na vrsto procesa (Aber, 2007). V Sloveniji je največ bioplinskih naprav v Pomurski regiji (Bojnec in Papler, 2010).

Glede na vhodne substrate poznamo kmetijske bioplinarne, pri katerih uporabljajo svežo ali silirano zeleno biomaso ter živalsko gnojevko, gnojnico in gnoj; kofermentacijske bioplinarne, pri katerih uporabljajo t.i. kosubstrate, to so različni ostanki hrane, tropine, klavniški odpadki, maščobe in drugi biološki odpadki; industrijske bioplinarne, pri katerih uporabljajo najrazličnejše industrijske organske odpadke. Bioplinarne lahko ločimo tudi na podlagi števila stopenjskih procesov, tako poznamo 1-, 2-, 3- stopenjske procese. Vsi procesi razgradnje substratov in sinteze bioplina so lahko združeni ali ločeni. Glede na izvedbo oz. pretok substratov čez bioplinske naprave je najbolj razširjena t.i. zbiralno pretočna naprava. Poznane so še naprave z ločenimi fazami obdelave substratov. Fermentorji so lahko v pokončni ali ležeči izvedbi. Glede na delež tekoče faze v substratu ločimo dve vrsti fermentacije. To sta mokra in suha fermentacija. Pri mokri fermentaciji (manj kot 15 % suhe snovi) je delež vode večji kot pri suhi fermentaciji. Pri suhi fermentaciji je poraba vode manjša, vendar je tudi produkcija bioplina na kg vhodnega KPK manjša, zato je mokra fermentacija bolj razširjena. Glede na temperaturo, pri kateri poteka proces, ločimo termofilni, mezofilni in psihofilni proces. Termofilni proces največkrat uporabljajo v industrijskih napravah, kjer morajo substrat oz. odpadke termično obdelati. Poteka v temperaturnem območju med 50 in 58 °C. Mezofilni proces je najbolj razširjen in je stabilnejši od termofilnega. Poteka v temperaturnem območju od 32 do 42 °C. Psihofilni proces se zaradi dolgega zadrževalnega časa v praksi ni uveljavil, poteka pa v temperaturnem območju med 15 in 20 °C (Aber, 2007).

Bioreaktor UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) je bioreaktor z lebdečo muljno posteljico, vtokom substrata od spodaj in spada med visoko produktivne anaerobne

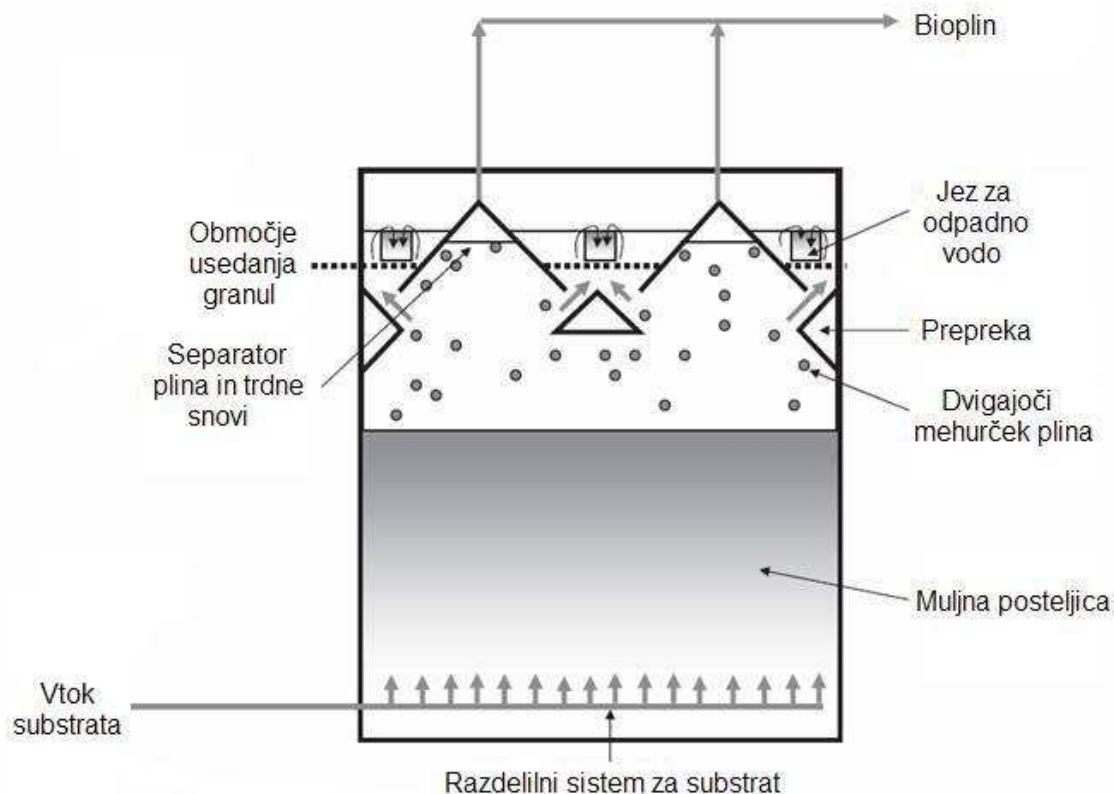
reaktorje. Postopek obdelave organskih snovi z UASB tehnologijo je razvil Lettinga s sodelavci v 70-ih letih dvajsetega stoletja na Nizozemskem (Khanal, 2008a). Z UASB bioreaktorjem je mogoče ublažiti motnje v anaerobnih obdelovalnih sistemih, ki nastanejo zaradi izpiranja biomase, strupenih snovi ali šoka zaradi preobremenitve (Khanal, 2008b).

Sestava UASB bioreaktorja je dokaj enostavna (Slika 1). Substrat, ki vstopa na dnu bioreaktorja, se enakomerno porazdeli po reaktorju s posebnim razdelilnim sistemom. Biomasa v obliki granul v reakcijski coni pretvori organsko snov v bioplin (Khanal, 2008a). Gibanje granul proti površini reaktorja povzročajo v/na granule pripeti plinski mehurčki (Marinšek Logar, 1992). Granule s plinskimi mehurčki vstopajo v plinski separator, kjer se plinski mehurčki ločijo, ko udarijo ob nagnjeno steno (Khanal, 2008a). Granule nato zdrsnejo nazaj v reaktor, bioplin pa se zbira preko plinsko zbiralnega sistema in izstopa iz reaktorja. Tekočina in manjše granule vstopajo v območje usedanja, ki je zasnovano tako, da je hitrost površinskega toka močno zmanjšana. To omogoča vračanje majhnih in lahkih granul nazaj v reaktor, odpadna voda pa se zbira v jezovih, nameščenih na vrhu reaktorja.

Dodatno mešanje vsebine reaktorja ni potrebno (Marinšek Logar, 1992). V primeru posebnih odpadnih voda, strupenih snovi ali posebnih okoliščin procesa, ki vplivajo na razvoj granul, naj bi imeli pripravljen rezervoar z granulami, s katerimi bi zagotovili inokulacijo novega substrata (Deublein in Steinhauser, 2008).

V granulah iz UASB bioreaktorja so različne združbe mikroorganizmov. Zunanja plast granul vključuje hidrolitske in acidogene bakterije, srednjo plast sestavljajo acetogene bakterije in hidrogenotrofne metanogene arheje, notranjost granul pa sestavljajo acetotrofne metanogene arheje (*Methanosaeta*), (Khanal, 2008c). Premer granul je od 1 do 3 mm (Khanal, 2008a).

Anaerobni reaktorji UASB so popolnoma zaprti, kar preprečuje širjenje smradu. Za tovrstne reaktorje je značilna precej manjša produkcija odpadne mikrobne biomase v primerjavi z aerobnimi razgradnimi postopki (Škorja, 2008).



Slika 1: Shema UASB bioreaktorja (Khanal, 2008a: 106)

2.2 BIOPLIN IN PRESNOVLJEN SUBSTRAT

Bioplin nastaja v procesu anaerobne razgradnje organskih snovi v različnih okoljih kot npr. v blatu čistilnih naprav, v močvirjih, sedimentih, deponijah, odlagališčih biološko razgradljivih snovi. Metan je glavna sestavina bioplina, ki je dragocen obnovljiv vir energije, če pa nekontrolirano izhaja v ozračje, je škodljiv toplogredni plin (Rasi, 2009). Proces anaerobne razgradnje organskih snovi v bioplin vršijo mikroorganizmi v odsotnosti kisika (Tušar, 2007). Glavni sestavini bioplina sta metan, 50 do 75 % in ogljikov dioksid, ki ga je od 10 do 40 %. Drugi plini, ki so še prisotni v bioplinu so: vodik (1 do 3%), vodikov sulfid (0,1 do 0,5 %), dušik (0,5 do 2 %) in ogljikov monoksid (manj kot 0,1 %) (Jejčič in Poje, 2009).

Poleg metana lahko zelo koristno uporabimo tudi čisti ogljikov dioksid (CO_2). V kmetijstvu ga lahko uporabljamo v toplih gredah kot gnojilo, v kemični industriji pa za

proizvodnjo polikarbonatov in suhega ledu. Čisti CO₂ uporabljajo tudi za obdelovanje površin (peskanje s CO₂) (Al Seadi in sod., 2010).

Pri proizvodnji bioplina dobimo tudi presnovljen substrat, ki ga lahko uporabimo kot koristno gnojilo za rastline. Ob tem hranilne snovi recikliramo nazaj v zemljo. Presnovljen substrat, ki je homogen in ima veliko vsebnost hranil ter dobro razmerje ogljika in dušika, lahko uporabimo namesto mineralnih gnojil, za izdelavo katerih porabimo veliko fosilne energije (Al Seadi in sod., 2010). Predelan material, ki ni primeren za uporabo v kmetijstvu, lahko uporabijo kot pelete in predstavlja sekundarno gorivo (Grmek, 2009).

Substrat, kot je gnojevka, se med procesom fermentacije razsluzi in ga tla bolje vsrkajo, ne maši talnih por in ne škodi talnim organizmom. Za korenine rastlin je tako predelana gnojevka manj škodljiva, ker se razgradijo fitotoksične snovi, zmanjša pa se tudi kaljivost semen plevelov in škodljivost patogenih mikroorganizmov. Ena od pomembnih prednosti pri gnojenju s predelano gnojevko je to, da precej manj smrdi. Povečana je vsebnost dostopnih hranil, predvsem dušika (N) in deloma fosforja (P). Zaradi povečane izkoristljivosti hranil je ob pravilnem gnojenju manjša nevarnost izgub hranil v okolje (Poje, 2009). Presnovljen substrat ima višjo vrednost pH, ki znaša 7,5 (Al Seadi in sod., 2010).

2.3 ODPADNA PIVOVARSKA VODA IN ODPADNI PIVOVARSKI KVAS KOT SUBSTRATA ZA PROIZVODNJO BIOPLINA

Pivovarska industrija proizvaja veliko odpadne pivovarske vode in odpadnega pivovarskega kvasa, ki vsebujeta veliko dobro razgradljivih organskih onesnaževal. Zaradi tega sta idealna za anaerobno razgradnjo, proizvodnjo bioplina in s tem lahko zmanjšamo energijske potrebe pivovarne (Zupančič, 2007).

2.3.1 Odpadna pivovarska voda

Opadna pivovarska voda je za okolje zelo obremenjujoč odpadni produkt zaradi velike količine in velike koncentracije posameznih snovi v njej. Ker je močno organsko obremenjena in ima stalno (relativno visoko) temperaturo, je primerna za anaerobne postopke čiščenja (Kus, 2008).

Odpadna pivovarska voda nastaja v procesu proizvodnje piva in polnjenja. Takšna voda vsebuje ostanke piva, tropine, odvečni kvas, ostanke čistilnih sredstev CIP (Clean in Place) sistema in drugega čiščenja, diatomejsko zemljo, odpadno vodo iz pralnega stroja steklenic (ostanki etiket), adhezive, lužino, soli kovin, sledi olja in maščob iz mazalnih sredstev, ostanke piva iz povratne embalaže kot so steklenice in sodi, ostanke piva pri čiščenju filtrov in podobno. Preden gre odpadna voda v anaerobno čiščenje, jo očistijo trdih delcev (na bobnastem situ). Z recikliranjem vode se zmanjša količina porabljene vode in tudi stroški čiščenja so manjši (Klemenčič in Vojvodič, 2010).

Tako odpadno pivovarsko vodo očistijo javne komunalne naprave ali pa jih očistijo pivovarne same. Ker imajo javne komunalne čistilne naprave visoke stroške čiščenja, je bolj ugodno, če pivovarne odpadno vodo čistijo same (Devolli in sod., 2010). V UASB bioreaktorju se KPK odpadne pivovarske vode zmanjša za 80 % (Škorja, 2008). Glede na okoljsko zakonodajo odpadno pivovarsko vodo po anaerobnem čiščenju odvajajo v postopek aerobnega čiščenja v biološko komunalno čistilno napravo. V aerobnem biološkem postopku čiščenja se odpadna pivovarska voda dokončno očisti (Kus, 2008).

2.3.2 Odpadni pivovarski kvas

Odpadni pivovarski kvas nastaja v proizvodnji piva v precej veliki količini in je dobro izkoristljiv stranski proizvod. Nastala količina je odvisna od več dejavnikov, npr. od količine vhodnega kvasa, načina proizvodnje piva in fermentacije, raztopljenega kisika in dušika, ki se asimilira, navzočnosti biofaktorjev itd. (Vitez, 1976). Vse odpadne surovine, ki so nastale v živilstvu (sem spada tudi odpadni pivovarski kvas) je smiselno predelati v produkte s čim večjo dodano vrednostjo (Kovač, 2008).

Suhi odpadni kvas je kot beljakovinski koncentrat visokovredno krmilo in živilski dodatek. Za farmacevtsko industrijo je pomemben za pridobivanje vitaminov. V živinoreji je odpadni pivski kvas pomemben predvsem za prehrano perutnine in prašičev (Vitez, 1976). Mas in sod. (2008) so ugotovili, da lahko pri krmljenju brojlerjev z beljakovinami odpadnega pivskega kvasa učinkovito nadomestimo beljakovine živalskega izvora (ribja moka). Odpadni kvas vsebuje od 50 do 60 % surovih beljakovin v suhi snovi, ki so dobro prebavljive (Vitez, 1976). Poleg beljakovin je bogat vir vitaminov skupine B, fosforja in

natrija (Vitez, 1977). Od vitaminov skupine B v suhem pivskem kvasu najdemo vitamine: B1, B2, B6, pantotensko kislino, folno kislino, niacin in biotin (Vitez, 1976).

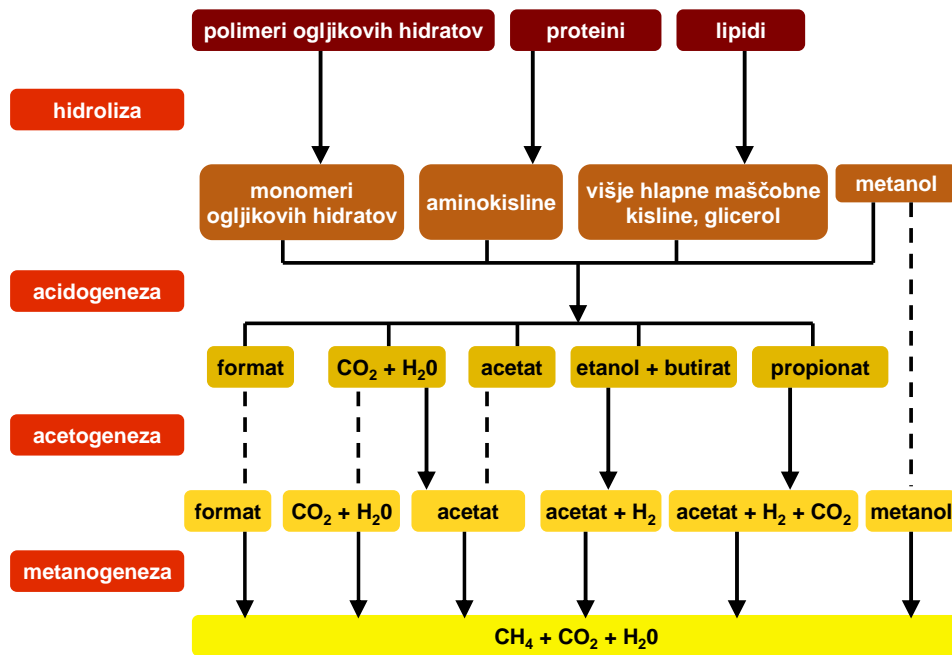
Škorja (2008) navaja, da ima odpadni kvas večji energetski potencial kot odpadna pivovarska voda. Raziskave kažejo, da je možno iz odpadnega kvasa v termofilnem reaktorju pridobiti 500 l bioplina na kg organske snovi s 70 % metana, kar znaša 350 l metana na kg organske snovi (Zupančič, 2007).

2.4 MIKROBIOLOŠKI PROCES ANAEROBNE FERMENTACIJE

Anaerobna fermentacija je naravni biološki proces, ko bakterije v okolju z malo ali brez kisika razgradijo organske snovi. Skoraj vsak organski material je lahko vključen v proces anaerobne razgradnje, vključno z odpadnim papirjem in kartonom (ki se ne more reciklirati, npr. zaradi onesnaženja s hrano), travo, ostanki hrane, odpadno industrijsko vodo, itd. (Briefing Anaerobic ... , 2007).

Transformacijo kompleksnih molekul, kot so beljakovine, ogljikovi hidrati (polisaharidi), maščobe (prisotni v odpadni vodi ali trdnih snoveh) v končne produkte, kot sta metan in ogljikov dioksid, opravijo različne skupine mikroorganizmov v več presnovnih stopnjah (Khanal, 2008c).

Metansko vrenje je kompleksen proces, ki ga lahko razdelimo na štiri faze imenovane hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza (Slika 2). Prva in druga faza, kot tudi tretja in četrta faza sta tesno povezani druga z drugo, zato se lahko proces izvrši v dveh stopnjah. V obeh stopnjah mora biti delež razgradnje enako velik. Če npr. prva stopnja teče prehitro, se delež CO₂ v bioplenu poveča, koncentracija kislin naraste in vrednost pH pade pod 7,0 (Deublein in Steinhauser, 2008).



Slika 2: Shema anaerobne razgradnje (Wastewater anaerobic, 2004)

2.4.1 Hidroliza

Med hidrolizo, ki je prva faza razgradnje, poteka razgradnja polimerov, kot so celuloza in drugi polisaharidi, proteini in maščobe, v manjše monomere (topne molekule). Razgradnjo omogočajo ekstracelularni hidrolitični encimi fakultativnih in obligatnih anaerobnih bakterij. Pravzaprav se kovalentne vezi razdvajajo v hidrolitski reakciji z vodo. Kisik, ki je v vodi v manjši količini, porabljajo fakultativni mikroorganizmi, ob tem se zmanjšuje redoks potencial, potreben za optimalno rast obligatnih anaerobnih bakterij in arhej. Faza hidrolize lahko poteka različno dolgo, odvisno od vrste substrata. Hidroliza enostavnih ogljikovih hidratov poteka nekaj ur, hidroliza proteinov in maščob nekaj dni, razgradnja lignoceluloze in lignina pa poteka zelo počasi in nepopolno (Deublein in Steinhauser, 2008).

Kompleksne organske spojine (polimeri) se med hidrolizo razgradijo v oligomere in/ali monomere. Lipidi se razgradijo v maščobne kisline in glicerol, polisaharidi se razgradijo v monosaharide, proteini pa v aminokisliline (Al Seadi in sod., 2010).

Številne zunajcelične hidrolitične encime proizvajajo hidrolitični rodovi bakterij, kot so *Clostridium*, *Peptococcus*, *Vibrio*, *Micrococcus* in *Bacillus*. Med hidrolitične encime

spadajo proteaze, lipaze, celulaze, pektinaze, amilaze, hitinaze, itd. Anaerobni fermentorji vsebujejo $10^8 - 10^9$ hidrolitičnih fakultativnih in obligatnih anaerobnih bakterij na ml. Poleg bakterij so prisotne tudi praživali in glive, vendar glede na njihovo število nimajo pomembne vloge pri anaerobnih presnovnih procesih. Glive so sicer maloštevilčne, vendar so sposobne razmnoževanja in tako s porabljanjem hranil za rast tudi sodelujejo pri procesu presnove. V anaerobnih fermentorjih sodelujejo posamezne vrste gliv iz redov *Phycomycetes*, *Ascomycetes* in *Basidiomycetes* (Anderson in sod., 2003).

2.4.2 Acidogeneza

V acidogeni fazi se enostavni sladkorji, aminokisliline in maščobne kisline pretvorijo v acetat, ogljikov dioksid in vodik (70 %), kot tudi v kratkoverižne maščobne kisline in alkohole (30 %) (Al Seadi in sod., 2010).

Različne vrste substratov in okoljskih dejavnikov določajo končne produkte metabolizma. Še posebej pomembna je prisotnost vodika (H_2). Šele ob nizkem parcialnem tlaku vodika nastajata acetat in CO_2 . Če je parcialni tlak vodika visok, se pojavi propionat in nekatere druge kratkoverižne maščobne kisline. Vodik proizvajajo bakterije, predvsem iz rodu *Clostridium*, v procesu acidogeneze (Khanal, 2008c).

Mikroorganizmi acidogene faze proizvajajo pomembne substrate za mikroorganizme acetogene in metanogene faze. Acidogena faza vključuje veliko različnih rodov in vrst mikroorganizmov, med njimi *Clostridium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Butyribacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Desulfobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus* in *Escherichia*. Fakultativni člani te skupine s porabo kisika, ki je v substratu, tudi pomagajo pri zaščiti na kisik občutljivih metanogenih arhej (Anderson in sod., 2003).

2.4.3 Acetogeneza

Proizvodi acidogene faze služijo kot substrat za bakterije acetogene faze. Acetogene reakcije so endergone. Acetogene bakterije lahko pridobijo energijo za svoje preživetje in rast le ob zelo nizkem parcialnem tlaku vodika, medtem pa obvezno proizvajajo vodik. Ker metanogene arheje preživijo samo ob visokem parcialnem tlaku vodika, živijo z acetogenimi mikroorganizmi v sožitju (simbiozi). Tako acetogene bakterije nenehno

proizvajajo vodik, ki ga metanogene arheje porabljajo in s tem ohranjajo nizek parcialni tlak vodika. Ko je parcialni tlak vodika nizek, takrat acetogene bakterije pretežno tvorijo H₂, CO₂ in acetat. Kadar je parcialni tlak vodika višji, v sistemu prevladujejo maslena, kapronska, propionska, valerianska kislina in etanol. Od vseh omenjenih produktov lahko metanogene arheje predelajo samo acetat, H₂ in CO₂ (Deublein in Steinhauser, 2008).

V acetogeni fazi sodelujeta dve skupini bakterij in sicer obvezne proizvajalke vodika imenovane tudi proton-reducirajoče bakterije, ki potrebujejo za svoj razvoj nizko koncentracijo vodikovih atomov ter homoacetogene bakterije, ki so popolnoma anaerobni organizmi (Bartkiewicz in sod., 2007). Skupina proton-reducirajočih acetogenih bakterij vključuje *Syntrophomonas wolfei* in *Syntrophobacter wolinii*. Znanе homoacetogene bakterije so iz rodov *Acetobacterium*, *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Butribacterium*, *Clostridium* in *Pelobacter* (Anderson in sod., 2003).

Vodik producirajoče acetogene bakterije presnavljajo organske kisline ($C \geq 3$), etanol in nekatere aromatske spojine (benzoat) v acetat, H₂ in CO₂. Homoacetogene bakterije, bodisi avtotrofne ali heterotrofne, so odgovorne za procese homoacetogeneze. Avtotrofne homoacetogene bakterije izkoriščajo mešanico vodika in ogljikovega dioksida, CO₂ jim služi kot vir ogljika za celično sintezo. Nekatere homoacetogene bakterije, lahko kot vir ogljika uporabljajo ogljikov monoksid (CO). Heterotrofne homoacetogene bakterije, na drugi strani, kot vir ogljika uporabljajo organske substrate kot so format in metanol, medtem pa nastaja končni produkt acetat (Khanal, 2008c). Zaradi porabljanja vodika, homoacetogene bakterije živijo v sintrofiji z vodik producirajočimi bakterijami (Anderson in sod., 2003). Po drugi strani pa so si homoacetogene bakterije in metanogene arheje med sabo konkurenčne (Khanal, 2008c).

2.4.4 Metanogeneza

Metanogeneza je končna faza anaerobne razgradnje. Metanogeni mikroorganizmi so obligatne anaerobne arheje, ki so jih včasih uvrščali med bakterije (O'Flaherty in sod., 2010). Metanogeneza se vrši po treh glavnih poteh: hidrogenotrofna oz. CO₂-reduktivna, acetotrofna oz. acetoklastična in metilotrofna (Khanal, 2008c).

Substrate metanogene faze lahko razvrstimo v tri skupine (Deublein in Steinhauser, 2008):

1. CO₂ tipa: (CO₂, HCOO, CO)
2. metilnega tipa (CH₃OH, CH₃NH₃, (CH₃)₂NH₂⁺, (CH₃)₃NH⁺, CH₃SH, (CH₃)₂S)
3. acetatnega tipa (CH₃COO⁻)

Hidrogenotrofna pot v metanogenezi, ki poteka v bioplinskem reaktorju, prispeva do 28 % metana, medtem ko acetotrofna pot, ki je glavni katabolični proces, prispeva do 72 % metana celotne metanogeneze (Khanal, 2008c).

Hidrogenotrofna oz. CO₂-reduktivna pot poteka z redukcijo CO₂ ali bikarbonata (HCO₃⁻) v metan. Večina metanogenih arhej lahko raste s porabo H₂, kot vira elektronov (hidrogenaza). Mnoge metanogene arheje, ki porabljajo H₂, lahko prav tako porabljajo format (HCOO⁻) kot vir elektronov za redukcijo CO₂ v metan (Boone in sod., 1993). Majhno število metanogenih arhej lahko tudi oksidira primarne in sekundarne alkohole za redukcijo CO₂ v metan (Khanal, 2008c).

Metilotrofna pot katabolizira spojine, ki vsebujejo metilno skupino, kot so metanol, trimetilamin in dimetil sulfid. Metan nastane z redukcijo metilne skupine. Elektroni za metilno redukcijo so lahko zagotovljeni z oksidacijo dela metilne skupine do CO₂ ali z uporabo vodika, kot vira elektronov (Boone in sod., 1993).

Acetotrofna pot je glavni katabolični proces pri katerem se acetat pretvori v metan. Dva pomembna rodova, ki sta prisotna v acetotrofni metanogenezi sta *Methanosarcina* in *Methanosaeta* (prej znan kot *Methanothrix*) (Khanal, 2008c). Ta katabolična pot razcepi acetat, oksidira karboksilno skupino do CO₂ in reducira metilno skupino do metana (Boone in sod., 1993).

2.5 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA ANAEROBNO RAZGRADNJO ORGANSKIH SNOVI

Anaerobni mikroorganizmi, še posebej metanogeni, so zelo dovzetni za spremembe v okolju. Številni raziskovalci ugotavljajo učinek anaerobnega sistema na podlagi stopnje metanske produkcije, ker se metanogeneza šteje kot omejujoči korak pri anaerobni obdelavi odpadnih voda. Zaradi ranljivosti in nizke stopnje rasti metanogenih arhej je

potrebno skrbno vzdrževati in spremljati okoljske razmere, kot so temperatura, hranila, vrednost pH, ... (Khanal, 2008d).

2.5.1 Substrat in hranila

Substrat določa stopnjo anaerobne razgradnje in ga je potrebno upoštevati v postopku tehnologije in proizvodnih procesov. Če pride do pomanjkanja življenjsko pomembnih sestavin v substratu, se metabolizem mikroorganizmov upočasnjuje ali ustavi. Zato je potrebno pogosto dodajati manjkajoče snovi (ogljikove hidrate, maščobe, beljakovine, mineralne snovi). Glede na sestavo substrata lahko vmesni produkti omejijo ali celo zavirajo razgradnjo. Tako npr. lahko razgradnja maščob privede do kopičenja maščobnih kislin, ki bi zavirale nadaljnjo razgradnjo. Razgradnja proteinov lahko privede do zaviranja metanogeneze zaradi nastanka amoniaka in vodikovega sulfida. Tudi specifična površina delcev substrata je pomembna za uspešnost biokemijskih reakcij. Večja kot je površina delcev substrata, uspešnejša bo razgradnja (Deublein in Steinhauser, 2008).

Vsi biokemični procesi v anaerobnih procesih potrebujejo za sintezo nove biomase tako makrohranila (dušik, fosfor), kot tudi mikrohranila (elementi v sledovih). Celična masa anaerobne bakterijske celice vsebuje približno 12 % dušika, kar pomeni da je za nastanek 100 g anaerobne mikrobne biomase potrebno približno 12 g dušika. Potreba po fosforju je $1/7 - 1/5$ potrebe po dušiku. Tako kot makrohranila so tudi mikrohranila bistvenega pomena za anaerobne mikroorganizme. Nikelj je še posebej pomemben, ker je sestavni del faktorja F 430, ki ga najdemo samo v metanogenih arhejah. Kobalt je ravno tako pomemben, ker je sestavni del vitamina B₁₂, ki katalizira metanogenezo (Khanal, 2008d).

Za produkcijo bioplina je zelo pomembno tudi razmerje med ogljikom in dušikom. C/N razmerje naj bi bilo 16 – 25 : 1, vendar je dušik lahko vezan tudi v ligninske strukture. Sprejemljivo razmerje ogljika in dušika je v razponu 25 – 50 : 0,75 – 1. Substrati s preozkim C/N razmerjem zavirajo proizvodnjo metana zaradi povečane proizvodnje amoniaka. Preširoko razmerje C/N v substratu pa pomeni pomanjkanje dušika in ima tudi negativne posledice za rast mikroorganizmov (Deublein in Steinhauser, 2008). Xiaoling in sodelavci (2008) so dokazali, da širše kot je začetno razmerje C/N, večji bo skupni donos kratkoveržnih maščobnih kislin.

2.5.2 Začetni čas obratovanja in mikroorganizmi

V anaerobnih procesih proizvodnje bioplina je pozornost usmerjena predvsem v začetni čas obratovanja, zaradi počasne rasti anaerobnih mikroorganizmov (predvsem metanogenih) in njihove občutljivosti na okoljske spremembe. Anaerobni obdelovalni sistemi rabijo za začetek obratovanja precej časa in so zato manj konkurenčni kot aerobnimi sistemi, ki imajo relativno kratek zagonski čas, od enega do dveh tednov. Za zagon anaerobne bioplinske naprave mezofilnega temperaturnega območja (37 °C) je običajno potrebno dva do štiri mesece (Khanal, 2008b).

Metanogene arheje morajo biti v mirujočem bioreaktorju prisotne najmanj 10 do 15 dni, da se prepreči njihovo izpiranje, medtem ko je regeneracijski čas hidrolitičnih in acidogenih bakterij precej krajši in zato je nevarnost njihovega izpiranja precej manjša (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.5.3 Temperatura

Anaerobni procesi so kot večina drugih bioloških sistemov zelo odvisni od temperature. V anaerobnem sistemu obstajajo za metanogenezo tri optimalna temperaturna območja, ki so razvrščena kot psihofilno, mezofilno in termofilno območje. Anaerobna razgradnja je najbolj učinkovita pri temperaturi od 5 do 15 °C za psihofilne arheje, od 35 do 40 °C za mezofilne arheje in približno 55 °C za termofilne arheje (Khanal, 2008d).

Večina metanogenih arhej živi v mezofilnem temperaturnem območju, redke so prilagojene na termofilno območje. Le nekatere so sposobne tvoriti metan pri nizki temperaturi (od 0,6 do 1,2 °C). Na splošno so metanogene arheje občutljive na hitre temperaturne spremembe, ob tem pa so termofilne arheje bolj občutljive kot mezofilne arheje. Potrebno je natančno vzdrževanje temperature, v razponu +/- 2°C. V nasprotnem primeru lahko pride do 30 % manjše proizvodnje bioplina (Deublein in Steinhauser, 2008). Zupančič in Roš (2003) poročata, da je termofilna presnova veliko hitrejša od mezofilne, zato se proizvede več bioplina v krajšem času ali v manjšem volumnu fermentorja (30 % mezofilnega fermentorja). Ker so ogrevalne zahteve pri termofilni presnovi približno dvakrat tolikšne kot pri mezofilni presnovi, Zupančič in Roš (2003) priporočata namestitev regenerativnega izmenjevalca toplote za večjo učinkovitost termofilnih fermentorjev.

2.5.4 Vrednost pH

Anaerobne mikroorganizme lahko razvrstimo v dve skupini glede na pH: acidogeni in metanogeni mikroorganizmi. Za acidogene bakterije je optimalna vrednost pH med 5,5 in 6,5, za metanogene arheje od 7,8 do 8,2 in za kombinirano kulturo mikroorganizmov od 6,8 do 7,4. Za kombinirano mikrobno združbo je idealen nevtralni pH (Khanal, 2008d). Od metanogenih arhej so samo vrste iz rodu *Methanosarcina* sposobne prenesti nižje vrednosti pH ($\text{pH} \leq 6,5$) (Deublein in Steinhauser, 2008).

Pri vrednosti pH 8 ali več pride do drastičnega padca metanogene aktivnosti arhej, ki ga lahko pripišemo pretvorbi NH_4^+ v bolj strupeno neionizirano obliko NH_3 . Pri nizki vrednosti $\text{pH}=5,0$ je bila ugotovljena metanogena aktivnost, ki ustreza približno 25 % metanogene aktivnosti pri nevtralnem pH (Khanal, 2008d).

2.5.5 Parcialni tlak vodika

Koncentracija vodika mora biti dobro uravnotežena: metanogene arheje rabijo dovolj vodika za proizvodnjo metana, medtem ko acetogene bakterije rabijo toliko nizek parcialni tlak vodika, da acetogenih bakterij ne obkroža preveč vodika in da se posledično produkcija vodika ne zaustavi. Zato vodikovi producenti in porabniki živijo v simbiozi. Najvišji sprejemljiv parcialni tlak vodika je odvisen od mikrobnih vrst in od substratov. Biološke reakcije morajo potekati eksergono (eksotermno) – prosta energija sklopljenih reakcij mora biti negativna (Deublein in Steinhauser, 2008). Oksidacija propionske kisline v acetat postane termodinamično ugodna samo ob parcialnem tlaku vodika, ki je nižji od 10^{-4} atm, za oksidacijo butirata mora biti vrednost pod 10^{-3} atm in za oksidacijo etanola pod 1 atm (Khanal, 2008c).

2.5.6 Inhibitorne snovi

Inhibicija anaerobne razgradnje je odvisna tudi od koncentracije inhibitorjev in sposobnosti prilagoditve mikroorganizmov na inhibitorje (Deublein in Steinhauser, 2008). Veliko organskih in anorganskih snovi, ki so lahko prisotne v odpadkih, ima pomembno vlogo pri procesu zaviranja posameznih mikrobnih skupin in toksičnosti. Prekomerna koncentracija kratkoveržnih maščobnih kislin, amoniaka, težkih kovin in sulfidov delujejo inhibitorno. Inhibicija anaerobne razgradnje s temi snovmi se kaže z zmanjšanjem ravnovesja

proizvodnje metana in koncentracija kratkoverižnih maščobnih kislin, medtem ko se toksičnost teh snovi izraža s popolno ustavitvijo metanogene aktivnosti (Kroeker in sod., 1979).

2.5.6.1 Kisik

Kato in sod. (1993) ugotavljajo, da so metanogene arheje v granuliranem mulju precej tolerantne na kisik in to predvsem zaradi fakultativnih bakterij, ki so pretežno na zunanji površini granul.

Večina kislinskih bakterij je fakultativno anaerobnih, tako da popolna izključitev kisika ni nujno potrebna. Ker so metanogene arheje striktno anaerobne, njihova inhibicija nastopi z 0,1 mg O₂/l (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.5.6.2 Kratkoverižne maščobne kisline

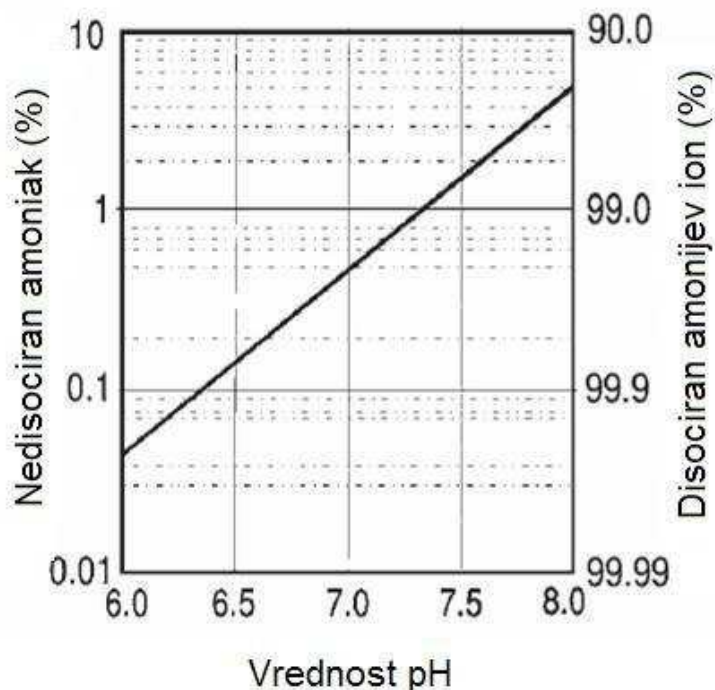
Kratkoverižne maščobne kisline so običajno v substratih že prisotne in se razgradijo v času metanogeneze. V substratu so lahko v disocirani ali nedisocirani obliki. Posebej problematične so nedisocirane kisline, ki prodrejo v celice mikroorganizmov in denaturirajo njihove proteine (Deublein in Steinhauser, 2008). Zaviranje metanogeneze zaradi toksičnosti snovi (sulfidov, amoniaka, težkih kovin, itd.), sprememb okoljskih dejavnikov (pH, temperatura, oksidacijsko-redukcijski potencial) ali omejitve hranil povzroči kopičenje acetata in vodika. Prevelik parcialni tlak vodika močno ovira mikroorganizme, ki porabljajo propionsko kislino, zaradi česar pride do njenega kopičenja (Khanal, 2008d). Do zakisanja reaktorja pride tudi, če ga na hitro preobremenimo z lahko razgradljivim substratom (Deublein in Steinhauser, 2008).

Kratkoverižne maščobne kisline na potek anaerobne presnove vplivajo različno; določena koncentracija kratkoverižnih maščobnih kislin je za nek fermentor optimalna, medtem ko je pri drugem inhibitorna. Ena od razlag je ta, da se populacija mikroorganizmov v fermentorjih razlikuje (Al Seadi in sod., 2010). Tako Deublein in Steinhauser (2008) za očetno kislino navajata mejo inhibicije 1000 mg/l (pri pH<7) in močan zaviralni učinek propionske kisline pri koncentraciji 5 mg/l (pri pH=7), medtem ko Khanal (2008d) navaja inhibitorni učinek propionske kisline pri koncentraciji 6000 mg/l, ob nevtralnem pH.

2.5.6.3 Dušik (NH_4^+ , NH_3 , NO_3^-)

Razmerje amoniaka (NH_3) in amonijevega iona (NH_4^+) v substratu je odvisno od vrednosti pH. Amoniak ima inhibitorni učinek na anaerobno metanogeno združbo in v večji koncentraciji tudi toksičen učinek, medtem ko je amonijev ion praktično neškodljiv oz. se njegov inhibitorni učinek začne šele pri 1,5 – 10 g/l, toksičnost pa pri 30 g/l. Amonijev ion vodi v izgubo kalija, ki je pomemben za metanogene arheje (Deublein in Steinhauser, 2008).

Povečanje vrednosti pH vodi do povečane inhibicije s prostim amoniakom (Al Seadi in sod., 2010). Razmerje med amonijevim ionom in amoniakom je pri pH = 7 približno 99:1 (Slika 3) in pri pH = 9 pa 70:30 (Deublein in Steinhauser, 2008).



Slika 3: Razmerje amoniaka in amonijevega iona glede na vrednosti pH (Deublein in Steinhauser, 2008: 123)

Tudi povečevanje temperature ima inhibitorni učinek na proizvodnjo metana. Ob naraščanju temperature se ravnovesje med amonijevim ionom in amoniakom preusmeri v korist amoniaka (Deublein in Steinhauser, 2008). Amoniak, ki je esencialno hranilo za anaerobne mikroorganizme, nastaja v procesu razgradnje proteinov (Bhattacharya in Parkin, 1989). Angelidaki in Ahring (1994) sta na primeru govejega gnoja v termofilnem

reaktorju ugotovila, da ob visoki obremenitvi z amoniakom znižanje temperature pod 55 °C poveča donos bioplina in zagotovi boljšo stabilnost procesa, ki ga dokazuje nižja koncentracija kratkoverižnih maščobnih kislin v iztoku.

Koncentracija amoniaka med anaerobno fermentacijo mora biti nižja od 80 mg/l. Na inhibicijo z amoniakom so še posebej občutljive metanogene arheje (Al Seadi in sod., 2010). Prosti amoniak zlahka prehaja skozi celično membrano, zato je najbolj toksična oblika dušika za metanogene arheje (Khanal, 2008d). Razlike v koncentraciji inhibitornega učinka amoniaka so možne zaradi razlik v substratu, inokulumu, okoljskih dejavnikih (temperatura, pH) in prilagoditvenem obdobju (Angelidaki in Ahring, 1994).

Nitrat (NO_3^-) se denitrificira v prvih fazah razgradnje, vsekakor pred metanogeno fazo. Inhibicija metanogeneze zaradi nitrata je mogoča le pri substratih z veliko vsebnostjo nitrata. Do tega pride v primeru, če denitrifikacija ne poteka ustrezno. Zato moramo substrate, ki so bogati z nitratom, osiromašiti kisika, npr. v stopnji denitrifikacije (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.5.6.4 Žveplove spojine

Žveplove spojine so v odpadkih in odpadnih industrijskih vodah prisotne v različnih oblikah: sulfat, sulfid, vodikov sulfid v plinu, nedisociran vodikov sulfid v tekočini in disocirana oblika (HS^- , S^-) (Deublein in Steinhauser, 2008).

Raziskave so pokazale, da je vsebnost žvepla v metanogenih arhejah večja kot v drugih skupinah mikroorganizmov v anaerobnih sistemih (Speece, 1983). Zato je žveplo kot hranilna snov pomembno predvsem za metanogene arheje (O'Flaherty in sod., 1999).

Kemijsko ravnotežje med nedisocirano in disocirano obliko žvepla je odvisno od vrednosti pH. Z manjšanjem vrednosti pH se delež raztopljenega nedisociranega žveplovega vodika povečuje (Deublein in Steinhauser, 2008). Za metanogene arheje je neioniziran sulfid (H_2S) bolj toksičen kot ionizirana oblika žvepla (HS^-) (Khanal, 2008d).

Raztopljeni sulfid postane inhibitoren pri koncentraciji med 100 in 800 mg/l ali približno 50 do 400 mg nedisociranega H_2S na liter (Parkin in sod., 1990).

Tudi temperatura ima pomembno vlogo pri inhibiciji z žveplovimi spojinami. Z naraščajočo temperaturo se toksičnost vodikovega sulfida povečuje (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.5.6.5 Težke in lahke kovine

2.5.6.5.1 Težke kovine

Težke kovine v nizkih koncentracijah spodbujajo aktivnost mikroorganizmov, v večjih koncentracijah pa delujejo toksično (Deublein in Steinhauser, 2008). Hayes and Theis (1978) sta ugotovila, da toksičnost težkih kovin sledi po naslednjem vrstnem redu: Ni > Cu > Pb > Cr > Zn. Topne težke kovine v procesu anaerobne presnove veljajo za bolj problematične od netopnih oblik (Khanal, 2008d). Pri anaerobni razgradnji je za redukcijo težkih kovin zelo koristen sulfid. Približno 0,5 mg sulfida je potrebno, da oborimo 1 mg težkih kovin.

V različnih raziskavah so ugotovili različne inhibitorne učinke težkih kovin, kar pojasnjujejo razlike v substratih, bakterijskih združbah, okoljskih dejavnikih in različne fizikalno kemijske oblike težkih kovin (Chen in sod., 2008).

2.5.6.5.2 Lahke kovine

Soli lahkih kovin kot so natrij, kalij, kalcij, magnezij in aluminij povzročajo dehidracijo mikrobnih celic zaradi osmotskega tlaka (Yerkes in sod., 1997). Previsoke koncentracije lahkih kovin najprej upočasnijo mikrobnost, ob še večjih koncentracijah delujejo močno inhibitorno ali celo toksično, zmerne koncentracije pa stimulirajo rast mikroorganizmov (Soto in sod., 1993). Sprostijo se lahko z razpadom organske snovi ali pa jih dodajajo za korekcijo vrednosti pH (Chen in sod., 2008).

Cabirol in sod. (2003) so poročali, da aluminij inhibira rast mikroorganizmov, ker konkurira z železom in manganom oz. se veže na celično membrano ali steno mikroorganizmov. Jackson-Moss in Duncan (1991) sta poročala, da anaerobni mikroorganizmi po prilagoditvi tolerirajo Al^{3+} v koncentraciji 2500 mg/l. Kalcij je poznan kot esencialen element za rast nekaterih mikroorganizmov (Murray in Zinder, 1985). V UASB bioreaktorju je nizka koncentracija kalcija, od 100 do 200 mg/l, koristna za

granulacijo mulja, medtem ko je večje koncentracija (nad 300 mg/l) škodljiva (Yu in sod., 2001). Ahring in sod. (1991) so poročali, da je za *Methanosarcina thermophila* optimalna koncentracija Mg^{2+} 720 mg/l. Nizka koncentracije kalija (pod 400 mg/l) povzroča povečanje učinkovitosti tako v termofilnih, kot mezofilnih območjih (Kugelman in McCarty, 1964). Ugotovljeno je bilo da 0,15 M kalija (K^+) povzroči 50 % inhibicijo metanogenih arhej, ki uporabljajo acetat (Chen in sod., 2008). Natrij je pri nizki koncentraciji ključnega pomena za metanogene arheje (Dimroth in Thomer, 1989). McCarty (1964) poroča, da natrij v koncentraciji 3500 do 5500 mg/l povzroči zmerno inhibicijo, medtem ko v koncentraciji 8000 mg/l povzroči močno inhibicijo metanogenih arhej v mezofilnem območju.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Osnovni material, ki smo ga uporabili v poskusu je bil odpadna pivovarska voda, nehidroliziran odpadni kvas in granulirana mikroba biomasa iz bioplinskega reaktorja UASB. Ves material je bil pridobljen iz Pivovarne Laško.

3.2 METODE

Za izvajanje testa biometanskega potenciala in njegovo predpripravo smo uporabljali standardno metodo (ISO 11734) za vrednotenje končne anaerobne biorazgradljivosti. Uporabljali smo postopke za ugotavljanje anaerobne biorazgradljivosti (Young, 1996), standardne postopke za ugotavljanje kemijske potrebe po kisiku ter standardne metode za ugotavljanje suhe in organske snovi (Eaton in sod., 1995).

Pred začetkom poskusa smo pripravili štiri različne substrate:

- odpadna pivovarska voda (substrat 1)
- odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa (substrat 2)
- odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa (substrat 3)
- odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa (substrat 4)

3.2.1 Analiza KPK substratov

Analizo KPK substratov smo izvedli zato, da smo mikrobnomo biomaso v nadaljnjih postopkih lahko primerno obremenili. Standardna obremenitev biomase v testu metanskega potenciala je 0,2 g KPK substrata na 1 g organske snovi (OS) mikrobne biomase. Za analizo kemijske potrebe po kisiku (KPK) smo uporabili KPK reagente testnega seta LCK 514, v merilnem območju 100 – 2000 mg/l. Pri vseh štirih substratih smo izvedli tri ponovitve in nato izračunali povprečje. Izvedli smo desetkratno redčitev, da so bili rezultati v merilnem območju. Iz razredčene raztopine smo odpipetirali 2 ml vzorca v reagent. Testne mešanice smo segrevali 2 uri pri temperaturi 148 °C. Uporabili smo grelno komoro

LT 200 (Hach Lange GMBH). Po pretečenem času smo testne mešanice pol ure hladili in jih nato prestavili v spektrofotometer DR 2800 (Hach Lange GMBH) ter odčitali vrednosti KPK substratov.

3.2.2 Ugotavljanje organske in suhe snovi mikrobne biomase

Mikrobni biomasi smo ugotavljali vsebnost organske snovi (OS) in suhe snovi (SS) za izračun potrebne količine mikrobne biomase v testni mešanici in s tem primerne obremenitve mikroorganizmov. V standardni izvedbi testa je potrebno 2 g OS mikrobne biomase na 1 liter testne mešanice. V našem primeru smo imeli 0,5 l testne mešanice, zato smo dodali samo 1 g OS mikrobne biomase.

Pri ugotavljanju SS in OS mikrobne biomase smo uporabili žarilne lončke, ki smo jih najprej očistili, prežarili, ohladili v eksikatorju in nato stehtali. V lončke smo odpipetirali 10 ml vzorca mikrobne biomase in jih ponovno stehtali. Sledilo je 24 urno sušenje vzorcev pri temperaturi 105 °C. Po sušenju smo lončke prestavili v eksikator in jih po hlajenju stehtali. Nadalje smo lončke z vzorcem mikrobne biomase 24 ur žarili v žarilni peči pri temperaturi 550 °C. Po žarjenju smo žarilne lončke ponovno ohladili in jih stehtali. Ugotavljanje OS in SS smo izvedli v treh paralelkah, za vsak vzorec smo posebej izračunali OS in SS (enačba 1, 2) in na koncu še povprečje.

$$SS (g/l) = ((m_s - m_p) / V) \times 1000 \quad \dots(1)$$

$$OS (g/l) = ((m_s - m_z) / V) \times 1000 \quad \dots(2)$$

m_s – masa žarilnega lončka z mikrobno biomaso po sušenju (g)

m_p – masa praznega žarilnega lončka (g)

V – volumen vzorca pred sušenjem (10 ml)

m_z – masa žarilnega lončka z mikrobno biomaso po žarjenju (g)

3.2.3 Termostatiranje mikrobne biomase

Preden smo združili vse sestavine testnih mešanic, smo mikrobno biomaso (inokulum) termostatirali. Inokulum, ki smo ga začasno hranili v hladilniku, smo pet dni pred izvedbo poskusa prestavili v inkubator pri temperaturi 37 °C. S tem smo dosegli stabilizacijo mikroorganizmov, kar pomeni, da so večino biološko razgradljivih snovi porabili, zato je pri preračunavanju neto produkcije bioplina iz substrata napaka manjša.

3.2.4 Priprava fosfatnega pufra

Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo združili dve raztopini in do uporabe shranili v hladilniku. Prvo raztopino smo pripravili z raztopitvijo 48,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml destilirane vode. Drugo raztopino pa smo pripravili tako, da smo 22,53 g KH_2PO_4 raztopili v 500 ml destilirane vode.

3.2.5 Obremenitev mikrobne biomase z organsko snovjo in sestava testnih mešanic

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo izvedli dva poskusa, kjer smo uporabili različni obremenitvi mikrobne biomase (Preglednica 1). V prvem testu biometanskega potenciala (BMP 1) smo mikrobno biomaso pri vseh vzorcih obremenili s približno 185 mg KPK/g OS mikrobne biomase. V testu BMP 2 smo z zmanjšanjem količine mikrobne biomase povečali njeno obremenitev za približno dvakrat (~ 344 mg KPK/gOS).

Preglednica 1: Obremenitev mikrobne biomase v poskusu BMP 1 in BMP 2

| | BMP 1 (mg KPK/g OS) | BMP 2 (mg KPK/g OS) |
|------------|---------------------|---------------------|
| Substrat 1 | 187 | 347 |
| Substrat 2 | 184 | 342 |
| Substrat 3 | 185 | 339 |
| Substrat 4 | 184 | 350 |

BMP 1 – obremenitev mikrobne biomase v prvem poskusu, BMP 2 – obremenitev mikrobne biomase v drugem poskusu, Substrat 1 – odpadna pivovarska voda, Substrat 2 – odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa, Substrat 3 – odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa, Substrat 4 – odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa

V poskusu BMP 1 in BMP 2 je sestava testnih mešanic bila podobna, razlika je bila v količini mikrobne biomase (Preglednica 2 in Preglednica 3). V testu BMP 1 smo v testne

mešanice dodali 30 ml mikrobne biomase, v testu BMP 2 smo količino mikrobne biomase zmanjšali na 15 ml, s čimer smo obremenitev mikrobne biomase povečali za dvakrat.

Preglednica 2: Sestava testnih mešanic za BMP 1

| | Negativna kontrola | Substrat 1 | Substrat 2 | Substrat 3 | Substrat 4 |
|---------------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|
| Biomasa (ml) | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Substrat 1 (ml) | | 58 | | | |
| Substrat 2 (ml) | | | 44 | | |
| Substrat 3 (ml) | | | | 30 | |
| Substrat 4 (ml) | | | | | 20 |
| Fosfatni pufer (ml) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Voda (ml) | do 500 | do 500 | do 500 | do 500 | do 500 |
| Skupaj (ml) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |

BMP 1 – prvi poskus, Substrat 1 – odpadna pivovarska voda, Substrat 2 – odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa, Substrat 3 – odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa, Substrat 4 – odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa

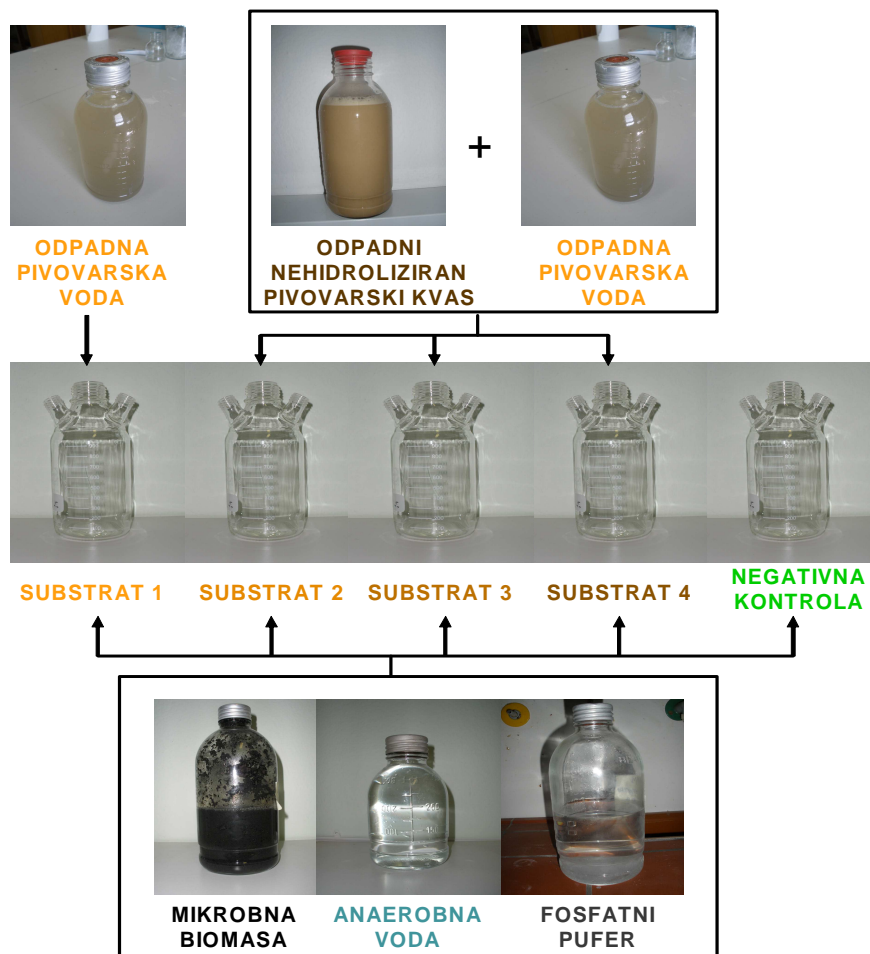
Preglednica 3: Sestava testnih mešanic za BMP 2

| | Negativna kontrola | Substrat 1 | Substrat 2 | Substrat 3 | Substrat 4 |
|---------------------|--------------------|------------|------------|------------|------------|
| Biomasa(ml) | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Substrat 1 (ml) | | 58 | | | |
| Substrat 2 (ml) | | | 44 | | |
| Substrat 3 (ml) | | | | 30 | |
| Substrat 4 (ml) | | | | | 20 |
| Fosfatni pufer (ml) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Voda (ml) | do 500 | do 500 | do 500 | do 500 | do 500 |
| Skupaj (ml) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |

BMP 2 – drugi poskus, Substrat 1 – odpadna pivovarska voda, Substrat 2 – odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa, Substrat 3 – odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa, Substrat 4 – odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa

V digestoriju smo v vsako testno steklenico dali mikrobno biomaso, določeno količino substrata, 20 ml fosfatnega pufera in dolili predhodno prevreto in ohlajeno vodo do končnega volumna testne mešanice, ki je znašal 500 ml (Slika 4). Negativno kontrolo smo pripravili na enak način, vendar brez dodanega substrata. Vsako testno mešanico smo pripravili v dveh paralelkah. Ko smo vsako posamezno steklenico napolnili, smo oba

stranska vratova zatesnili, čez zgornji vrat steklenice pa smo 20 minut prepihovali z dušikovim plinom, da smo zagotovili anaerobne razmere. Nato smo na steklenico namestili merilno glavo, dobro premešali in skozi stranski vrat v serumske stekleničke odlili 50 ml vzorca za ugotovitev začetnih parametrov testa: KPK, pH in kratkoverižne maščobne kisline. Po sestavi testnih mešanic in odvzemu vzorcev, smo steklenice postavili v inkubator pri 37 °C.

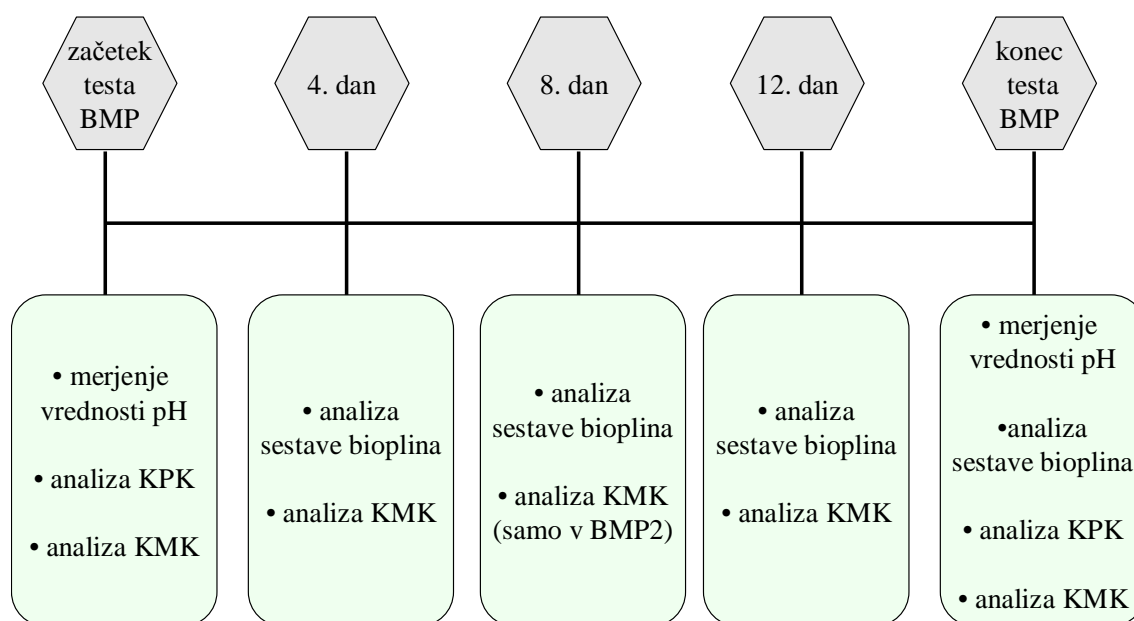


Slika 4: Potek sestave testnih mešanic

3.2.6 Vzorčenje testnih mešanic

V poskusu BMP 1 in BMP 2 smo vzorčenje izvajali v enakih časovnih presledkih in opravili enake analize, z izjemo osmega dne (Slika 5). Na začetni dan testa smo testnim mešanicam izmerili vrednost pH, analizirali KPK in odvzeli vzorec za analizo kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK). Na 4., 8. in 12. dan smo pri poskusu BMP 1 in BMP 2 analizirali sestavo bioplina in odvzeli vzorec za analizo kratkoverižnih maščobnih

kislin z izjemo osmega dne, ko smo v poskusu BMP 1 izvedli le analizo sestave bioplina. Na koncu testa, ki je bil končan na 21. dan, smo testnim mešanici izmerili vrednost pH, analizirali sestavo bioplina, opravili analizo KPK testnih mešanic in odvzeli vzorec za analizo KMK.



Slika 5: Vzorčenje v času poskusa BMP 1 (prvi poskus) in BMP 2 (drugi poskus)

3.2.7 Spremljanje parametrov testa BMP 1 in BMP 2

3.2.7.1 Spremljanje tlaka v poskusnih steklenicah in izračun količine nastalega bioplina

V poskusih BMP 1 in BMP 2 smo v testnih steklenicah spremljali naraščanje pritiska bioplina z manometriškimi glavami OxiTop sistema. Po končanem poskusu smo vse podatke z digitalnim kontrolnim modulom prenesli v program Excel. S splošno plinsko enačbo (3) smo izračunali volumen bioplina. Volumen bioplina, ki je nastal pri negativni kontroli smo odšteli od volumna bioplina substratov. Tako smo dobili neto volumen bioplina substratov pri normalnih plinskih razmerah.

$$\frac{P_0 \times V_0}{T_0} = \frac{P_x \times V_x}{T_x} \quad \dots(3)$$

P_0 – pritisk pri normalnih razmerah (1013 hPa)

V_0 – prostornina plina pri normalnih razmerah

T_0 – temperatura pri normalnih razmerah (273 K)

P_x – največji izmerjeni pritisk (hPa), odšteta vrednost pritiska bioplina negativne kontrole

V_x – prostornina praznega prostora v steklenici (710 ml)

T_x – temperatura inkubacije (310 K)

3.2.7.2 pH testnih mešanic

Testnim mešanicam smo vrednost pH merili na začetku in na koncu poskusa BMP. Uporabili smo pH – meter Orion 520 A.

3.2.7.3 Analiza sestave nastalega bioplina

V času poskusa smo spremljali spreminjanje sestave bioplina. S plinsko kromatografijo smo analizirali delež metana, ogljikovega dioksida in dušika. Sestavo bioplina smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu, GC-14A, ki je opremljen z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD). Plinski kromatograf je ločeval pline na 4 m dolgi jekleni koloni, notranjega premera $\frac{1}{4}$ inče in polnjene s polnilom PORAPAK Q. Za prenos molekul plinov po koloni smo uporabili nosilni plin (mobilna faza) helij. Delovna temperatura injektorja in kolone je bila 30 °C, detektorja pa 80 °C. Za vrednotenje kromatografskih signalov smo uporabljali integrator Chromatopack CR-6A (Shimadzu), z metodo absolutne kalibracije (Marinšek Logar, 1992). Za kalibracijo kromatografa smo uporabili plinsko mešanico, ki je vsebovala 15,3 % vodika, 19,9 % dušika, 20,3 % metana in 44,5 % ogljikovega dioksida.

Vzorci za analizo smo pridobili iz testnih steklenic tako, da smo s plinotesno brizgalko, odvzeli 50 μ l bioplina skozi septo in ga vbrizgali v injektor. Na dan vzorčenja smo analizirali odstotno sestavo plinov v testnih mešanicah in izračunali volumen posameznega plina (CH_4 , CO_2) v bioplenu.

3.2.7.4 Etrska ekstrakcija kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Za ugotavljanje koncentracije KMK smo najprej morali izvesti etrsko ekstrakcijo KMK. Iz vsake testne steklenice smo vzorčili v dveh paralelkah. Odvzeli smo po 1,5 ml testne mešanice. V HACH epruvete smo dodali eno malo spatulo sušenega NaCl in dodali 1 ml vzorca, ki smo ga predhodno premešali. Nato smo dodali 100 μ l internega standarda (krotonska kislina) in 200 μ l 50 % H_2SO_4 ter 1 ml etra. Sledilo je stresanje epruvet (20 krat gor – dol) in nato še centrifugiranje mešanic, do 2000 obratov. Po centrifugiranju smo zgornjo etersko fazo ekstrakta prenesli s Pasteurjevo pipeto v novo HACH epruveto. V prvo epruveto smo k preostali vodni fazi dodali 1 ml etra in ponovno stresali (20 krat gor – dol) ter centrifugirali, nato pa še enkrat prenesli zgornjo etrsko fazo v drugo HACH epruveto in jo tako združili s prvo fazo. Na koncu smo v epruveto, kjer je bila etrska faza dodali eno malo spatulo $CaCl_2$ in epruvete dobro zaprli zato, da kisline ne bi izhlapele. Ob pripravi vzorcev testnih mešanic smo istočasno na enak način ekstrahirali standardno mešanico (kalibracijsko raztopino) KMK, za kvalitativno in kvantitativno umeritev kromatografa.

3.2.7.5 Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Analizo kratkoverižnih maščobnih kislin smo izvajali na plinskem kromatografu Hewlett Packard 5890 A. Temperatura plamensko ionizacijskega detektorja je bila 290 °C. Kapilarno kolono NUKOL (Supelco), 30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m, smo ogrevali po programu: $T_{začetna} = 75$ °C, zadrževalni čas = 3,5 min, $T_{končna} = 160$ °C, končni zadrževalni čas = 3 min. Hitrost dogorevanja je bila 14 °C/min. Kot nosilni plin smo uporabljali argon, s pretokom 2 ml/min, detekcijska plina pa sta bila vodik (30 ml/min) in zrak (300 ml/min). Vbrizgali smo 1 μ l etrskega izvlečka v split postopku 30:1. Uporabili smo tehniko internega standarda. Za interni standard smo uporabili krotonsko kislino.

Kalibracijsko raztopina KMK je sestavljalo: 0,525 g/l oetne kisline, 0,495 g/l propionske kisline, 0,475 g/l izo-maslene, 0,480 g/l n-maslene, 0,465 g/l izo-valerianske, 0,470 g/l n-valerianske, 0,465 g/l n-kapronske in 1 g/l krotonske kisline. Za vrednotenje kromatografskih signalov smo uporabljali integrator Hewlett Packard 3392 A.

3.2.7.6 Celokupna produkcija metana

Celokupna produkcija metana predstavlja končni volumen metana ob koncu testa, na 21. dan poskusa BMP. Celokupno produkcijo metana smo izračunali na podlagi deleža metana in volumna proizvedenega bioplina na koncu poskusa.

3.2.7.7 Bioplinski potencial

Bioplinski potencial predstavlja količnik končnega volumna produciranega bioplina (pri normalnih razmerah) na KPK dodanega substrata (m^3/kg KPK substrata).

3.2.7.8 Produkcija metana na 1 g dodanega KPK substrata / metanski potencial

Produkcija metana na 1 g dodanega KPK substrata predstavlja količnik končnega volumna metana pri normalnih razmerah na KPK dodanega substrata (ml/g KPK substrata).

3.2.7.9 Izplen metana

Izplen metana predstavlja razmerje med teoretično (izračunano) vrednostjo produkcije metana iz 1 kg razgrajenega KPK in praktično izmerjeno produkcijo metana iz 1 kg KPK v testu BMP. Teoretična vrednost predpostavlja, da je iz 1 kg razgrajenega KPK, pri standardnih plinskih razmerah, možno proizvesti $0,35 \text{ m}^3$ metana (Michaud in sod., 2002).

4 REZULTATI

4.1 VREDNOSTI KPK SUBSTRATOV

V testu BMP 1 in BMP 2 je ob večji koncentraciji kvasa vrednost KPK substratov bila večja (Preglednica 4). Najmanjšo vrednost KPK je imela odpadna pivovarska voda brez kvasa, največjo pa odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa.

Preglednica 4: KPK substratov v poskusih BMP 1 in BMP 2

| Substrat | BMP 1 (mg KPK/l _{substrata}) | BMP 2 (mg KPK/l _{substrata}) |
|------------|--|--|
| Substrat 1 | 3480,00 | 3233,33 |
| Substrat 2 | 4530,00 | 4206,67 |
| Substrat 3 | 6676,67 | 6120,00 |
| Substrat 4 | 9946,67 | 9456,67 |

BMP 1 – kemijska potreba po kisiku v prvem poskusu, BMP 2 – kemijska potreba po kisiku v drugem poskusu, Substrat 1 – odpadna pivovarska voda, Substrat 2 – odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa, Substrat 3 – odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa, Substrat 4 – odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa

4.2 SUHA SNOV (SS) IN ORGANSKA SNOV (OS) MIKROBNE BIOMASE

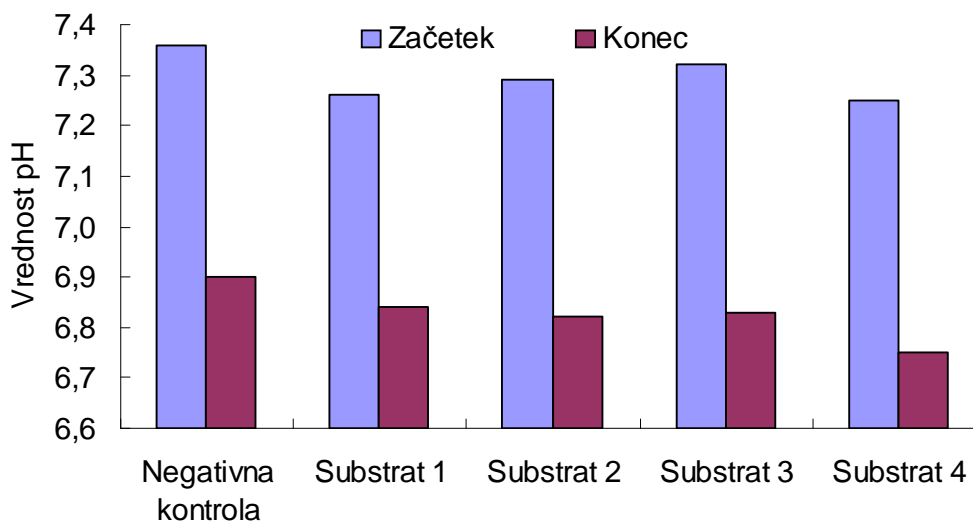
Suho snov in organsko snov mikrobne biomase smo izračunali z enačbama 1 in 2. V poskusih BMP 1 in BMP 2 je povprečna vsebnost suhe snovi mikrobne biomase znašala 44,10 g/l, povprečna vsebnost organske snovi pa 36,07 g/l (Preglednica 5).

Preglednica 5: Povprečna vsebnost suhe snovi in organske snovi mikrobne biomase v poskusih BMP 1 in BMP 2

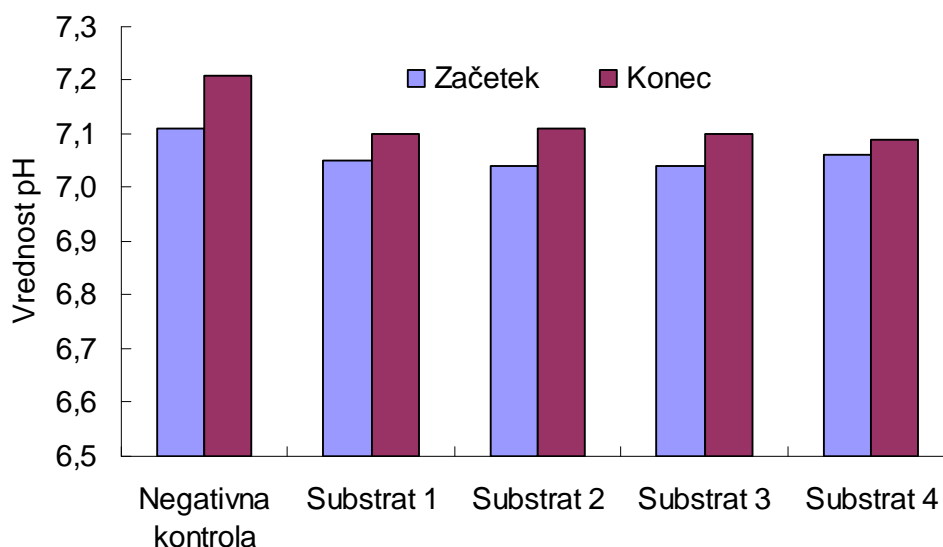
| Suha snov (SS) (g/l) | Organska snov (OS) (g/l) |
|----------------------|--------------------------|
| 44,10 | 36,07 |

4.3 VREDNOST pH TESTNIH MEŠANIC V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE)

V poskusu BMP 1 je bila povprečna začetna vrednost pH vzorcev 7,3 in končna povprečna vrednost 6,8 (Slika 6). V povprečju se je vsem testnim mešanici vrednost pH znižala za 0,5. V poskusu BMP 2 je bila povprečna začetna vrednost pH vzorcev 7,1 (Slika 7). Do konca inkubacije se je v poskusu BMP 2 vrednost pH rahlo zvišala.



Slika 6: Začetne in končne vrednosti pH v poskusu BMP 1

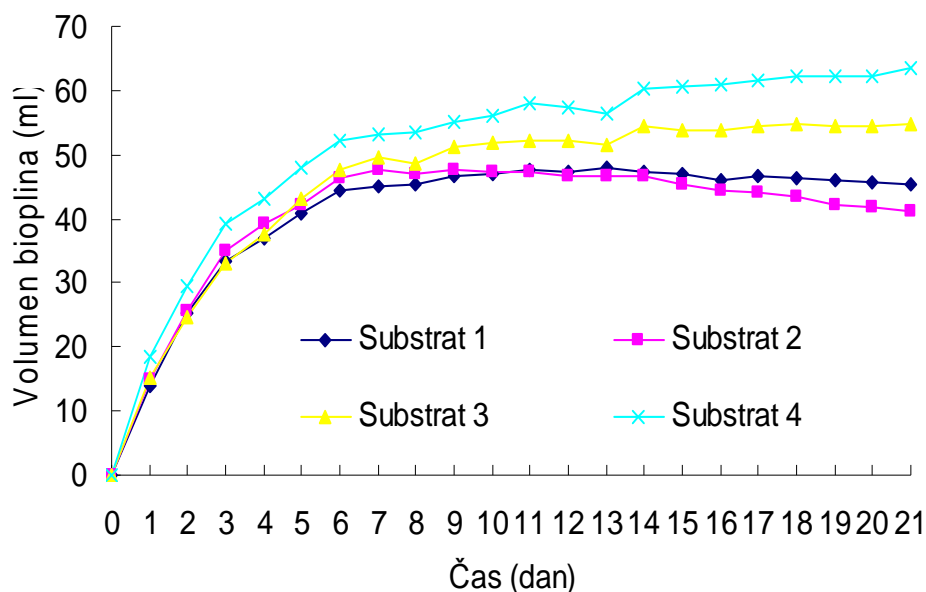


Slika 7: Začetne in končne vrednosti pH v poskusu BMP 2

4.4 PRODUKCIJA BIOPLINA V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE)

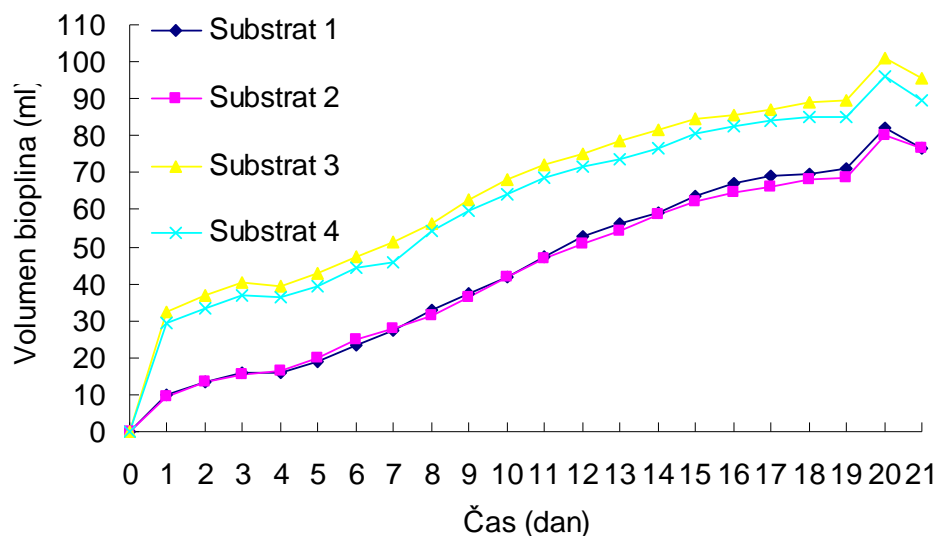
V poskusu BMP 1 je volumen bioplina naraščal pri vseh štirih substratih približno enako (Slika 8). Pri substratu 1 (odpadna pivovarska voda) je volumen bioplina na koncu

inkubacije dosegel 45 ml. Najmanj bioplina je nastalo pri substratu 2 (z 0,74 % kvasa). Končna produkcija bioplina je znašala 41 ml. Končna produkcija bioplina je pri substratu 3, ki je vseboval 1,85 % kvasa znašala 55 ml. Največjo končno produkcijo bioplina v poskusu BMP 1 smo zaznali pri substratu 4, ki je vseboval največji delež odpadnega kvasa (3,7 %) in sicer 64 ml.



Slika 8: Produkcija bioplina v odvisnosti od časa v poskusu BMP 1

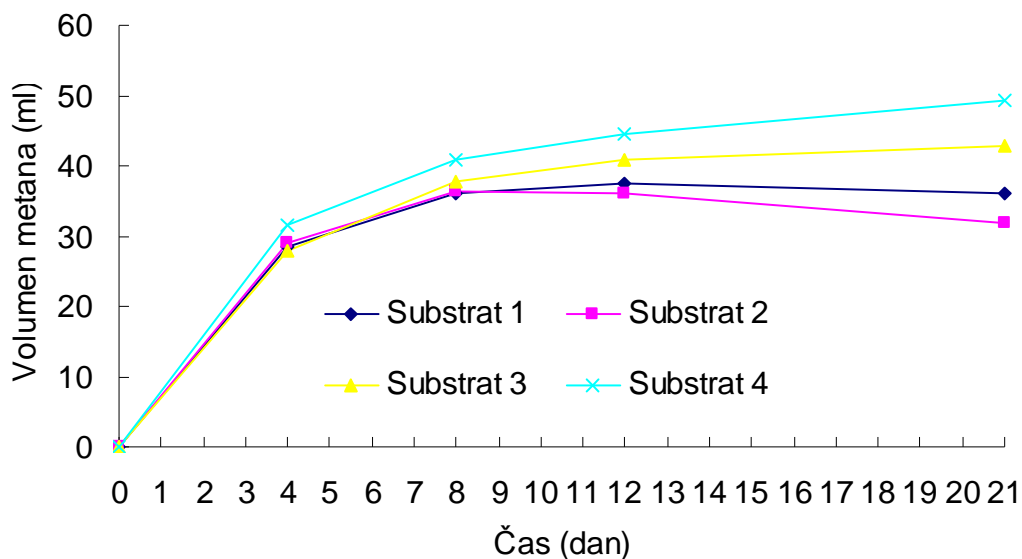
Produkcija bioplina je v poskusu BMP 2 pri vseh vzorcih naraščala (Slika 9). Pri substratu 1 (odpadna pivovarska voda) in substratu 2 (z 0,74 % odpadnega kvasa) je bila končna produkcija bioplina izenačena in sicer 77 ml. Največ bioplina na koncu poskusa smo zaznali pri substratu 3, ki je vseboval 1,85 % kvasa (95 ml), nekaj manj ga je bilo pri substratu 4 s 3,7 % dodanega kvasa (90 ml).



Slika 9: Produkcija bioplina v odvisnosti od časa v poskusu BMP 2

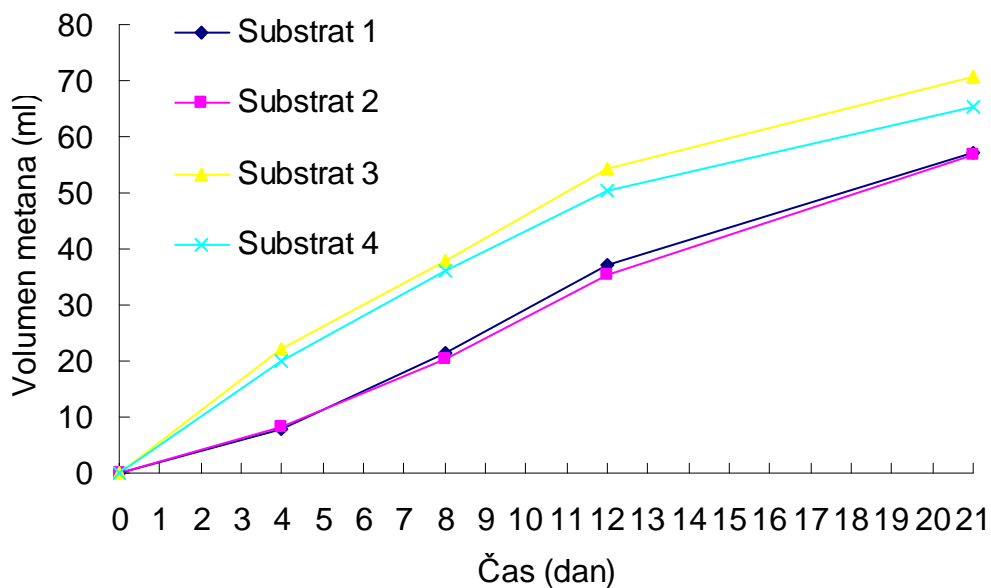
4.5 PRODUKCIJA METANA V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE)

V poskusu BMP 1 je volumen metana naraščal pri vseh štirih substratih približno enako (Slika 10). Pri substratu 1 (odpadna pivovarska voda) je končni volumen metana znašal 36 ml. Najmanjšo končno količino metana (32 ml) smo zaznali pri substratu 2 z najmanjšim deležem odpadnega kvasa (0,74 %). Končna produkcija metana pri substratu 3, ki je vseboval 1,85 % odpadnega kvasa je znašala 43 ml, medtem ko smo največjo količino metana v poskusu BMP 1 pridobili iz substrata 4 s 3,7 % dodanega kvasa (49 ml).



Slika 10: Produkcija metana v odvisnosti od časa v poskusu BMP 1

Produkcija metana je v poskusu BMP 2 pri vseh vzorcih naraščala (Slika 11). Pri substratu 1 (odpadna pivovarska voda) in substratu 2 (z 0,74 % odpadnega kvasa) je bila končna količina metana izenačena (57 ml). Največ metana smo na koncu poskusa zaznali pri substratu 3, ki je vseboval 1,85 % odpadnega kvasa. Količina metana je znašala 71 ml. Nekaj manj metana smo na koncu poskusa zaznali pri substratu 4 s 3,7 % dodanega kvasa (65 ml).

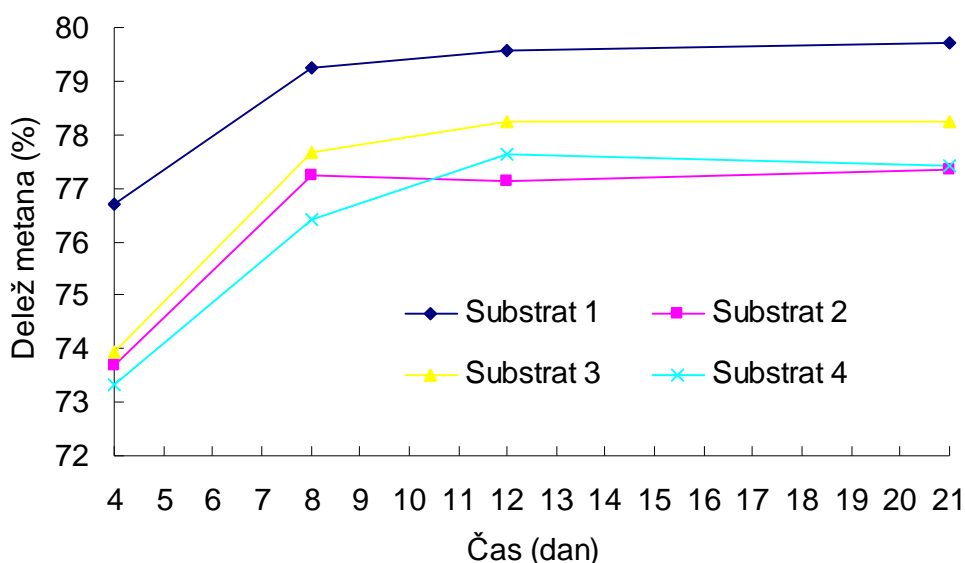


Slika 11: Produkcija metana v odvisnosti od časa v poskusu BMP 2

4.6 DELEŽ METANA V BIOPLINU MED POSKUSOMA BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE)

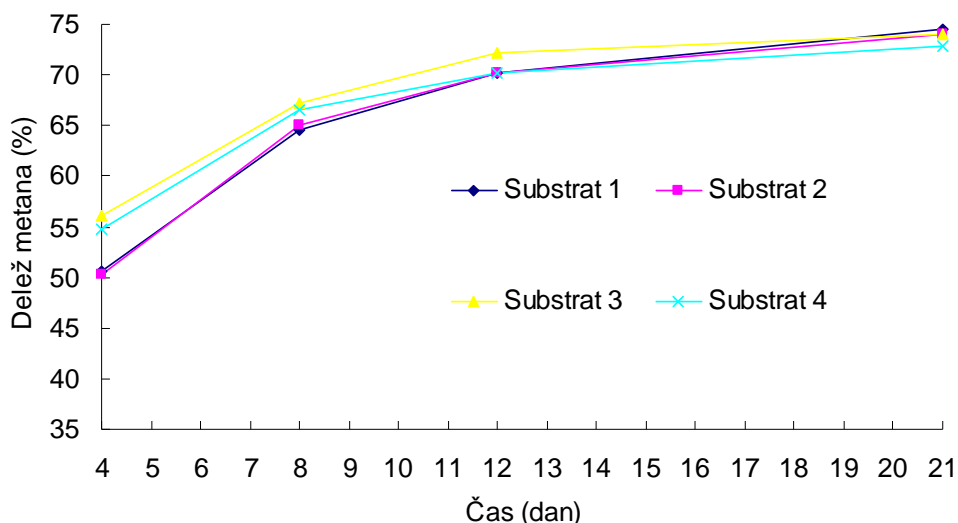
V poskusu BMP 1 je delež metana pri vseh štirih substratih v prvi tretjini inkubacije hitro naraščal (Slika 12). V substratu 1 (odpadna pivovarska voda) je delež metana na koncu poskusa dosegel vrednost 80 %, kar znaša 36 ml. Na koncu poskusa je za substrat 2 (z 0,74 % odpadnega kvasa) in substrat 4 (s 3,7 % odpadnega kvasa) delež metana znašal približno 77 %, kar za substrat 2 pomeni 32 ml metana, za substrat 4 pa 49 ml metana. V substratu 3 (z 1,85 % odpadnega kvasa) je delež metana na koncu poskusa znašal 78 %.

Največji končni delež metana smo ugotovili v substratu 1 (80 % oz. 36 ml), vendar pa je največja končna količina metana bila ugotovljena iz substrata 4 (49 ml oz. 77 %).



Slika 12: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni substrat v poskusu BMP 1

V poskusu BMP 2 je delež metana pri vseh vzorcih do konca poskusa naraščal (Slika 13). Dinamika deleža metana skozi testno obdobje je bila precej podobna pri vseh štirih substratih. Na koncu poskusa je pri vseh substratih bilo zaznati 74 % metana, razen pri substratu 4 (s 3,7 % odpadnega kvasa), kjer je delež metana znašal 73 %. Zaradi različne količine proizvedenega bioplina je bila končna količina nastalega metana različna.



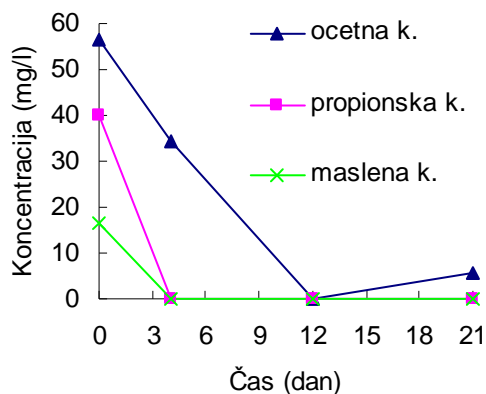
Slika 13: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 2

4.7 KONCENTRACIJE KRATKOVERIŽNIH MAŠČOBNIH KISLIN (KMK) V POSKUSU BMP 1 (NIŽJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE) IN BMP 2 (VIŠJA OBREMENITEV MIKROBNE BIOMASE)

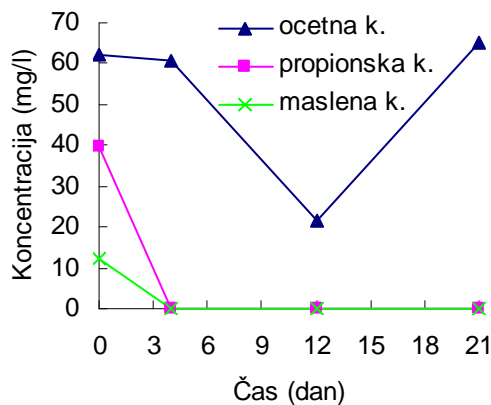
Na začetku poskusa BMP 1 je v vzorcu odpadne pivovarske vode (substrat 1) bila koncentracija oetne kisline 56 mg/l, propionske kisline 40 mg/l, maslene kisline 16 mg/l (Slika 14). Koncentracija oetne kisline se je do 12. dne zmanjševala, nato se je do konca testa rahlo povečala na 6 mg/l. V vzorcu odpadne pivovarske vode z 0,74 % kvasa (substrat 2) je bila začetna koncentracija oetne kisline 62 mg/l, propionske kisline 40 mg/l in maslene kisline 12 mg/l (Slika 15). Koncentracija oetne kisline je na četrti dan bila približno na isti ravni kot na začetku poskusa, na 12. dan se je zmanjšala na 22 mg/l in do konca poskusa dvignila na 65 mg/l. V vzorcu odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa (substrat 3) je bilo na začetku poskusa oetne kisline 54 mg/l, propionske kisline 34 mg/l in maslene kisline 9 mg/l (Slika 16). Koncentracija oetne kisline je na četrti dan bila približno enaka kot na začetku poskusa, do 12. dneva se je zmanjšala na 44 mg/l in na tej ravni ostala do konca poskusa. V odpadni pivovarski vodi s 3,7 % kvasa (substrat 4) je na začetku testa koncentracija oetne kisline znašala 47 mg/l, propionske kisline 28 mg/l in maslene kisline 6 mg/l (Slika 17). Koncentracija oetne kisline je bila največja na četrti dan (55 mg/l), do konca poskusa je upadla na vrednost nič.

Propionska in maslena kislina sta pri vseh štirih substratih poskusa BMP1 do četrtega dne popolnoma porabili, vendar smo pri substratih 3 in 4 na koncu poskusa ugotovili majhne

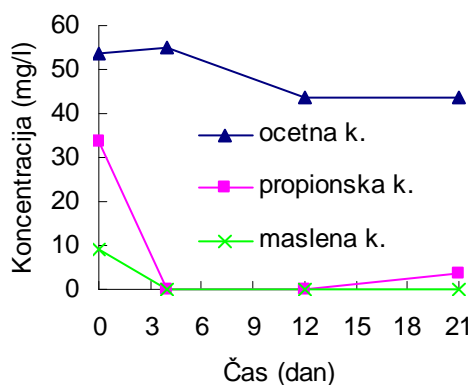
vrednosti propionske kisline (3 – 4 mg/l). V celotnem času poskusa BMP 1 drugih kratkoverižnih maščobnih kislin pri vseh štirih substratih nismo ugotovili.



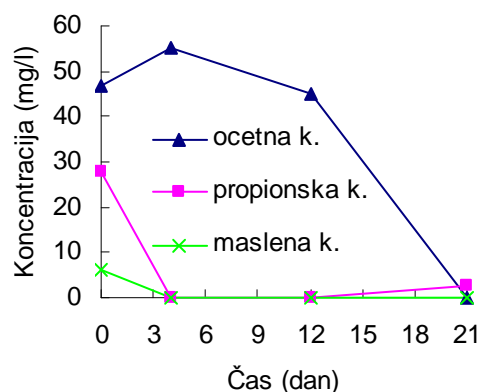
Slika 14: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 1 med poskusom BMP 1



Slika 15: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 2 med poskusom BMP 1



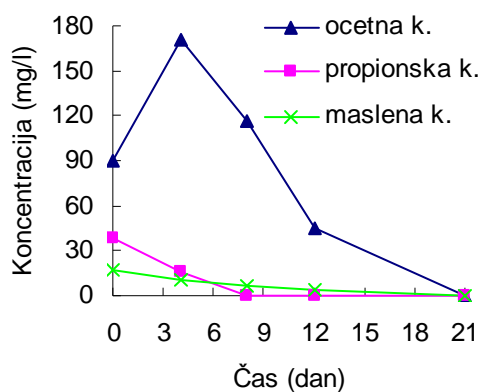
Slika 16: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 3 med poskusom BMP 1



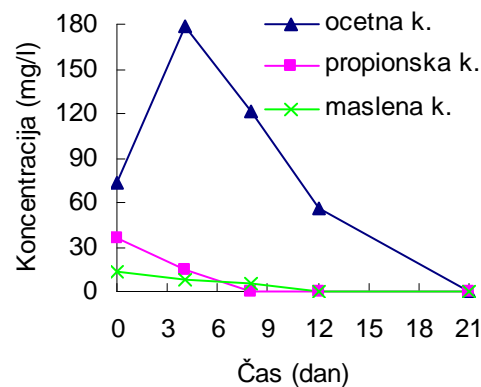
Slika 17: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 4 med poskusom BMP 1

V poskusu BMP 2 smo v vzorcu odpadne pivovarske vode (substrat 1) ugotovili precej očetne kisline (91 mg/l), propionske kisline (39 mg/l) in maslene kisline (18 mg/l), (Slika 18). Koncentracija očetne kisline se je do četrtega dne povečevala, dosegla vrednost 171 mg/l, nato zmanjševala in ob koncu testa padla na vrednost nič. Količina maslene kisline se je zelo enakomerno porabljala do konca poskusa, ko je več nismo zaznali. V odpadni pivovarski vodi z 0,74 % kvasa (substrat 2) je na začetku testa koncentracija očetne kisline znašala 74 mg/l, propionske kisline 36 mg/l in maslene kisline 14 mg/l (Slika 19). Koncentracija očetne kisline je bila največja na četrti dan (179 mg/l). Na koncu

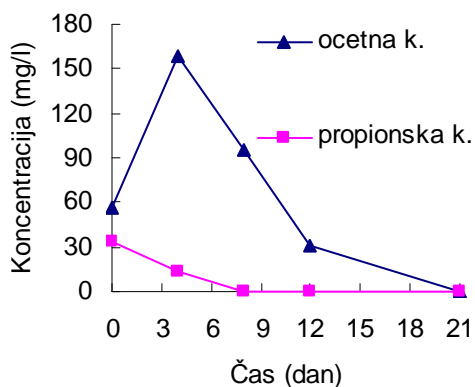
testa oetne kisline nismo več zaznali. 12. dan maslene kisline v substratu ni več bilo. V vzorcu odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa (substrat 3) smo zaznali največ oetne kisline (57 mg/l) in propionske kisline (34 mg/l), (Slika 20). Na četrti dan vzorčenja je bilo oetne kisline 158 mg/l, propionske kisline pa 14 mg/l. Po tem času se je koncentracija oetna kislina zmanjševala in je na koncu poskusa več nismo zaznali. V vzorcu odpadne pivovarske vode s 3,7 % kvasa (substrat 4) je bila začetna koncentracija oetne kisline 41 mg/l, propionske kisline pa 34 mg/l (Slika 21). Koncentracija oetne kisline je do četrtega dne naraščala do 146 mg/l, nadalje se je do konca poskusa zmanjševala do vrednosti nič. Propionske kisline pri vseh štirih substratih na osmi dan testa nismo več ugotovili. Koncentracije drugih kratkoverižnih maščobnih kislin v poskusu BMP 2 so bile pri vseh štirih substratih nižje od 10 mg/l.



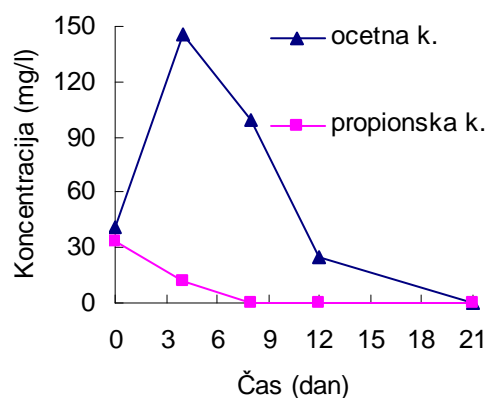
Slika 18: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 1 med poskusom BMP 2



Slika 19: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 2 med poskusom BMP 2



Slika 20: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 3 med poskusom BMP 2



Slika 21: Koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin v substratu 4 med poskusom BMP 2

4.8 CELOKUPNA PRODUKCIJA METANA, BIOPLINSKI POTENCIAL, PRODUKCIJA METANA NA 1g DODANEGA KPK IN IZPLEN METANA V TESTIH BMP 1 IN BMP 2

Vsi parametri so v poskusu BMP 2 dosegli večje vrednosti kot v poskusu BMP 1 (Preglednica 6). Vse vrednosti parametrov, so bile največje pri substratu 3 pri večji obremenitvi biomase (BMP 2), najmanjše pa pri substratu 2 pri manjši obremenitvi biomase (BMP 1). Največja celokupna produkcija metana je bila dosežena pri substratu 3 pri večji obremenitvi biomase (BMP 2) in sicer 70,64 ml, najmanjša pa pri substratu 2, pri manjši obremenitvi biomase (BMP 1) (31,75 ml). Ravno tako smo največji bioplinski potencial ($0,52 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$) in produkcijo metana na 1 g dodanega KPK (384,77 ml/g KPK) ugotovili pri substratu 3 iz poskusa BMP 2. Substrat 2 iz poskusa BMP 1 je imel najmanjši bioplinski potencial, ki je znašal $0,21 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$ in najmanjšo produkcijo metana na 1 g dodanega KPK, ki je dosegla vrednost 159,31 ml/g KPK. Največji izplen metana, ki je znašal 109,54 %, smo dobili iz substrata 3 v poskusu BMP 2. Izplen metana (45,52 %) je bil najmanjši pri substratu 1 v poskusu BMP 1.

V poskusu BMP 1 so vsi parametri (celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in izplen metana) največji pri substratu 4 in najmanjši pri substratu 2.

V poskusu BMP 2 so celokupna produkcija metana (70,64 ml), bioplinski potencial ($0,52 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$), produkcija metana na 1 g dodanega KPK (384,77 ml/g KPK) in izplen metana (109,54 %) največji pri substratu 3. Najmanjše vrednosti vseh parametrov v poskusu BMP 2 so bile pri substratu 1 in substratu 2. Najmanjša celokupna produkcija metana (56,69 ml) in izplen metana (87,15 %) sta bila pri substratu 2 medtem, ko je vrednost bioplinskega potenciala ($0,41 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$) pri substratu 1 in 2 bila enaka. Produkcija metana na 1 g dodanega KPK (305,03 ml/g KPK) je bila najmanjša pri substratu 1, vendar je bil rezultat pri substratu 2 zelo podoben (306,28 ml/g KPK).

Preglednica 6: Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2

| | Substrat 1 | Substrat 2 | Substrat 3 | Substrat 4 |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | BMP 1/BMP 2 | BMP 1/BMP 2 | BMP 1/BMP 2 | BMP 1/BMP 2 |
| Celokupna produkcija metana (ml) | 36,16/ 57,20 | 31,75/ 56,69 | 42,74/ 70,64 | 49,22/ 65,41 |
| Bioplinski potencial (m ³ /kg KPK) | 0,22/ 0,41 | 0,21/ 0,41 | 0,27/ 0,52 | 0,32/ 0,47 |
| Produkcija metana na 1 g dodanega KPK (ml/g KPK) | 179,14/ 305,03 | 159,31/ 306,28 | 213,40/ 384,77 | 247,42/ 345,82 |
| Izplen metana (%) | 51,18/ 87,15 | 45,52/ 87,51 | 59,28/ 109,54 | 70,69/ 98,81 |

BMP 1 – prvi poskus biometanskega potenciala; BMP 2 – drugi poskus biometanskega potenciala, Substrat 1 – odpadna pivovarska voda, Substrat 2 – odpadna pivovarska voda z 0,74 % kvasa, Substrat 3 – odpadna pivovarska voda z 1,85 % kvasa, Substrat 4 – odpadna pivovarska voda s 3,7 % kvasa

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskavi smo uporabili mikrobnno biomaso iz UASB bioreaktorja Pivovarne Laško in odpadno pivovarsko vodo ter odpadni nehidrolizirani pivovarski kvas iz Pivovarne Laško.

V predhodni raziskavi na laboratorijski ravni Medjedović (2009) ugotavlja, da dodatek z 0,37 % deležem odpadnega nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi poveča produkcijo bioplina in metana, medtem ko dodatek hidroliziranega kvasa ni prispeval k povečanju parametrov bioplinske produkcije. V omenjeni raziskavi je bila mikrobnna biomasa obremenjena z 0,2 g KPK/g OS mikrobne biomase.

V obeh poskusih BMP 1 in BMP 2 smo imeli štiri različne substrate: odpadno pivovarsko vodo, odpadno pivovarsko vodo z 0,74 % kvasa, odpadno pivovarsko vodo z 1,85 % kvasa in odpadno pivovarsko vodo s 3,7 % kvasa. V prvem in drugem poskusu smo imeli različni obremenitvi mikrobne biomase (Preglednica 1). V prvem poskusu (BMP 1) je bila obremenitev mikrobne biomase pri vseh substratih v povprečju 185 mg KPK/g OS mikrobne biomase, medtem ko smo v drugem poskusu (BMP 2) obremenitev povečali na 344 mg KPK/g OS mikrobne biomase.

V poskusu z manjšo obremenitvijo mikrobne biomase (BMP 1) smo ugotovili, da se s povečevanjem koncentracije kvasa (do 3,7 %) v odpadni pivovarski vodi povečujejo tudi vsi parametri testa biometanskega potenciala (celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in izplen metana). Vsi omenjeni kazalci bioplinske produkcije v prvem poskusu (Preglednica 6) so bili najugodnejši za odpadno pivovarsko vodo z dodanim 3,7 % deležem kvasa. Zanimivo je da so parametri vzorca odpadne pivovarske vode bili nekoliko višji, kot pri vzorcu odpadne pivovarske vode z 0,74 % kvasa. Pri slednjem so vse vrednosti parametrov v poskusu BMP 1 bile najnižje, hkrati pa dokaj blizu vrednostim vzorca odpadne pivovarske vode. Rezultati našega poskusa BMP 1 kažejo, da dodatek kvasa v koncentraciji 0,74 % ni povečal produkcije metana, v drugih dveh koncentracijah pa so se vrednosti parametrov povečale.

Zaradi majhnega števila vzorcev in ponovitev poskusa, statistična analiza ni bila izvedena, vendar je iz rezultatov viden trend proizvodnje bioplina. Če bi hoteli rezultate natančno ovrednotiti, bi bilo potrebno narediti večje število neodvisnih ponovitev poskusa.

V prvem poskusu (BMP 1) je bila vrednost pH na začetku in na koncu testa v mejah optimuma (Slika 6), ki je za kombinirano anaerobno združbo mikroorganizmov od 6,8 do 7,4 (Khanal, 2008d).

Rezultati sestave bioplina kažejo, da je v poskusu z nižjo obremenitvijo mikrobne biomase (BMP 1) bil delež metana pri substratih z dodanim kvasom nižji, kot pri odpadni pivovarski vodi (Slika 12). Morda to lahko pojasnimo s povečanjem deleža CO₂ na račun fermentativnega metabolizma kvasovk vsaj v začetnih delih testa. Najnižji delež metana (77 %) je bil pri vzorcu odpadne pivovarske vode z 0,74 % kvasa. Opravljene analize kratkoverižnih maščobnih kislin istega vzorca kažejo, da se je koncentracija očetne kisline do 12. dne zmanjševala, nato pa do konca testa narasla na 65 mg/l (Slika 16). Taka koncentracija očetne kisline ni inhibitorna (Deublein in Steinhauser, 2008). Iz teh podatkov lahko sklepamo, da sta hidroliza in acidogeneza potekali nekoliko prehitro, delež metana v bioplinu se je zmanjšal, koncentracija kisline je narasla, vrednost pH se je rahlo znižala, vendar je zaradi vsebnosti pufra v substratu ostala v optimalnih mejah. To pomeni, da razgradnja med fazami ni bila najboljše uravnotežena. Vzrok tega so možne eksperimentalne napake (vdor kisika) in nenatančnost testa.

Iz poskusa z nižjo obremenitvijo mikrobne biomase (BMP 1) lahko ugotovimo, da dodajanje odpadnega pivovarskega kvasa k odpadni pivovarski vodi do koncentracije 3,7 % ne ovira bioplinske produkcije, temveč jo pospešuje. Pri tem se trditev nanaša na laboratorijsko raven testiranja pri obremenitvi s približno 185 mg KPK/g OS biomase. Laboratorijski ravni testiranja mora slediti še testiranje na pilotni ravni, preden rezultate prenesemo v prakso.

V drugem poskusu (BMP 2) smo obremenitev mikrobne biomase povečali za skoraj dvakrat. Največjo celokupno produkcijo metana (70,64 ml), bioplinski potencial (0,52 m³/kg KPK), produkcijo metana na 1 g dodanega KPK (384,77 ml/g KPK) in izplen metana (109,54 %) v poskusu BMP 2 smo ugotovili v vzorcu odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa (Preglednica 6). Vrednosti parametrov drugega poskusa so bili pri odpadni

pivovarski vodi in odpadni pivovarski vodi z 0,74 % kvasa skoraj enake. Rezultati drugega poskusa tudi kažejo, da dodatek kvasa v koncentraciji 0,74 %, ne poveča bioplinske produkcije. Pri odpadni pivovarski vodi s 3,7 % kvasa smo opazili večje vrednosti parametrov, kot pri odpadni pivovarski vodi in odpadni pivovarski vodi z 0,74 % kvasa. Pri odpadni pivovarski vodi z 1,85 % kvasa so bile vrednosti parametrov večje kot pri odpadni pivovarski vodi s 3,7 % kvasa.

Vitez (1976) je poročal o visoki vsebnosti beljakovin v odpadnem pivskem kvasu. Deublein in Steinhauser (2008) navajata da razgradnja beljakovin lahko privede do inhibicije metanogeneze zaradi amoniaka. Predvidevamo, da je pri odpadni pivovarski vodi s 3,7 % kvasa, prišlo do rahle inhibicije metanogeneze zaradi povečane količine amoniaka, ki je posledica anaerobne razgradnje beljakovin. Med vsemi mikroorganizmi so metanogene arheje najbolj občutljive na inhibicijo z amoniakom (Al Seadi in sod., 2010). Med raziskavo vsebnosti amoniaka nismo analizirali, zato ne moremo primerjati rezultatov s trditvami iz literature.

Glede na naše rezultate ni bojazni zmanjšanja produkcije bioplina, ker je za bioreaktor Pivovarne Laško največja realno pričakovana koncentracija odpadnega kvasa v odpadni pivovarski vodi približno 1% (Klemenčič, 2010).

Vrednost pH je bila v drugem poskusu (BMP 2) na začetku testa pri vseh substratih v zgornjih optimalnih mejah (Slika 7). Na koncu testa se je vrednost pH dvignila, še vedno bila v optimalnih mejah (6,8-7,4). Rahel dvig vrednosti pH pri vzorcu odpadne pivovarske vode in vzorcih odpadne pivovarske vode z različno koncentracijo dodanega kvasa lahko pojasnimo z razgradnjo kvasa. Medtem, ko se je kvas razgradil, se je povečala količina amoniaka, ki je povzročil rahel dvig vrednosti pH.

Na podlagi analiz kratkoverižnih maščobnih kislin iz drugega poskusa (BMP 2) ugotovimo, da je koncentracija očetne kisline pri vseh substratih do četrtega dne naraščala, kar je posledica večje obremenitve mikrobne biomase. Zaradi teh razlogov je pri drugem poskusu prišlo tudi do večje produkcije bioplina in metana. Analize so pokazale, da so bile vse kratkoverižne maščobne kisline do konca testa povsem porabljene. Pri vseh vzorcih so kisline bile prisotne že na začetku testa. To pomeni, da je že sam substrat vseboval kisline oz. so te nastale v času skladiščenja substratov.

Glede na rezultate drugega poskusa lahko ugotovimo, da je pri obremenitvi 344 mg KPK/g OS mikrobnne biomase pri vzorcu odpadne pivovarske vode z 1,85 % kvasa, produkcija bioplina in metana največja.

5.2 SKLEPI

Glede na rezultate našega poskusa lahko ugotovimo, da:

- dodatek nehidroliziranega kvasa k odpadni pivovarski vodi v koncentraciji 0,74 %, 1,85 % in 3,7 % pri obremenitvi mikrobnne biomase s približno 185 mg KPK/g OS mikrobnne biomase ne inhibira anaerobne razgradnje,
- pri obremenitvi s približno 185 mg KPK/g OS mikrobnne biomase poteka anaerobna razgradnja najbolj učinkovito pri 3,7 % koncentraciji nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi,
- pri obremenitvi 344 mg KPK/g OS mikrobnne biomase z odpadno pivovarsko vodo in nehidroliziranim pivovarskim kvasom v koncentraciji 1,85 % in 3,7 % je produkcija bioplina večja, kot pri manjši koncentraciji kvasa (0,74 %) in sami odpadni pivovarski vodi
- pri obremenitvi s približno 344 mg KPK/g OS mikrobnne biomase poteka produkcija bioplina najbolj učinkovito pri 1,85 % koncentraciji nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi,
- pri višji obremenitvi (344 mg KPK/g OS mikrobnne biomase) dodatek s 3,7 % deležem odpadnega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi najverjetneje ustvari rahlo inhibicijo metanogeneze.
- pri obeh različnih obremenitvah mikrobnne biomase dodatek nehidroliziranega pivovarskega kvasa v koncentraciji 0,74% ne doprinese k večji produkciji metana in bioplina.

6 POVZETEK

V svetu in v Sloveniji se zadnje čase vse bolj uveljavljajo obnovljivi viri energije, med katere spada tudi proizvodnja bioplina. Tovrsten vir energije je izredno pomemben z vidika oskrbe energije, varovanja okolja in nenazadnje tudi ekonomičnosti.

Bioplin nastaja v procesu anaerobne razgradnje organskih snovi. Glavna sestavina bioplina je metan. Anaerobna razgradnja poteka v štirih fazah imenovanih hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza, pod vplivom različnih anaerobnih mikroorganizmov.

V industriji proizvodnje piva nastaja veliko organsko razgradljivih snovi, med katere spadata odpadna pivovarska voda in odpadni pivovarski kvas, ki sta dobro izkoristljiva substrata za proizvodnjo bioplina. Posušen odpadni pivovarski kvas lahko koristno uporabimo za prehrano živali, v farmacevtski industriji in živilski industriji.

Zaradi sušenja odpadnega pivskega kvasa se v pivovarniški industriji porablja veliko energije, kar je bil tudi povod za naše raziskovalno delo. Uporaba odpadnega pivovarskega kvasa v Pivovarni Laško za proizvodnjo bioplina lahko zmanjša stroške proizvodnje (sušenje kvasa), zmanjša emisijo toplogrednih plinov in zmanjša stroške energije v proizvodnem procesu na račun uporabe lastne energije iz obnovljivega vira. V Pivovarni Laško v UASB bioreaktorju že sedaj uporabljajo odpadno pivovarsko vodo za proizvodnjo bioplina, medtem ko odpadni pivovarski kvas posušijo in prodajo na trg.

V naši raziskavi smo na laboratorijski ravni želeli preizkusiti vpliv različne koncentracije nehidroliziranega odpadnega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi, pri dveh različnih obremenitvah. Izvedli smo dva poskusa, v katerih smo imeli štiri različne substrate: odpadno pivovarsko vodo, odpadno pivovarsko vodo z 0,74 % kvasa, odpadno pivovarsko vodo z 1,85 % kvasa in odpadno pivovarsko vodo s 3,7 % kvasa. Najprej smo ugotovili vsebnost suhe snovi (SS) in organske snovi (OS) mikrobne biomase ter opravili analizo KPK substratov. Pripravili smo si različne testne mešanice, ki so vsebovale mikrobno biomaso, enega od substratov, fosfatni pufer in vodo. Pri prvem poskusu smo mikrobno biomaso vseh substratov v povprečju obremenili s 185 mg KPK/g OS mikrobne biomase, medtem ko smo v drugem poskusu mikrobno biomaso vseh štirih substratov v povprečju obremenili s 344 mg KPK/g OS mikrobne biomase. V testu biometanskega

potenciala (BMP) smo testne mešanice inkubirali 21 dni, pri mezofilnih razmerah. Testne mešanice smo imeli v plinotesnih OxiTop® steklenicah. V času testa smo spremljali proizvodnjo tlaka v testnih steklenicah, ugotovili sestavo bioplina, izmerili vrednost pH in opravili analizo kratkoverižnih maščobnih kislin. Iz pridobljenih podatkov smo za vse štiri substrate ugotovili produkcijo metana in bioplina.

Naši rezultati kažejo, da pri obremenitvi 185 mg KPK/g OS mikrobne biomase poteka produkcija metana in bioplina najbolj učinkovito pri odpadni pivovarski vodi s 3,7 % nehidroliziranega odpadnega kvasa. Pri tem substratu je znašala celokupna produkcija metana 49,22 ml, bioplinski potencial je bil 0,32 m³/kg KPK, produkcija metana na 1 g dodanega KPK je znašala 247,42 ml/g KPK, izplen metana pa je bil 70,69 %.

Glede na naše rezultate drugega poskusa lahko ugotovimo, da pri obremenitvi s približno 344 mg KPK/g OS mikrobne biomase poteka produkcija metana in bioplina najbolj učinkovito pri 1,85 % koncentraciji nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi. Tako je ta substrat dosegel največjo vrednost celokupne produkcije metana (70,64 ml), bioplinskega potenciala (0,52 m³/kg KPK), produkcije metana na 1 g dodanega KPK (384,77 ml/g KPK) in izplena metana (109,54 %). Iz rezultatov drugega poskusa, s povprečno obremenitvijo substratov 344 mg KPK/g OS mikrobne biomase predpostavljamo, da 3,7 % koncentracija nehidroliziranega odpadnega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi inhibira proizvodnjo metana in bioplina.

Ugotavljamo, da na laboratorijski ravni pri manjši obremenitvi (manj kot 200 mg KPK/g OS mikrobne biomase) lahko učinkovito presnovimo 3,7 % dodatek odpadnega nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi. Za učinkovito proizvodnjo bioplina pri večji obremenitvi (čez 300 mg KPK/g OS mikrobne biomase) lahko uporabimo 1,85 % koncentracijo odpadnega nehidroliziranega pivovarskega kvasa v odpadni pivovarski vodi. Predvidevamo, da se pri višji koncentraciji (3,7 %) odpadnega nehidroliziranega kvasa v odpadni pivovarski vodi, pri obremenitvi čez 300 mg KPK/g OS mikrobne biomase začne rahla inhibicija anaerobne razgradnje organskih snovi.

Pred prehodom na industrijsko raven proizvodnje bioplina z dodanim nehidroliziranim pivovarskim kvasom je potrebno opraviti še pilotno testiranje.

7 VIRI

Aber A. 2007. Vrste bioplinarn. Energetika.NET d.o.o. (22. maj 2007).

<http://www.energetika.net/si/novice/ekonomija/vrste-bioplinarn> (14. apr. 2010)

Ahring B.K., Alatryste-Mondragon F., Westermann P., Mah R.A. 1991. Effects of cations on *Methanosarcina thermophila* TM-1 growing in moderate concentrations of acetate: production of single cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 5: 686-689

Al Seadi T., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S., Janssen R., Grmek M. 2010. Priročnik o bioplinu. Ljubljana, Agencija za prestrukturiranje energetike: 144 str.

Anderson K., Sallis P., Uyanik S. 2003. Anaerobic treatment processes. V: *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Mara D., Horan N. (eds.). London, Academic Press: 391-426

Angelidaki I., Ahring B.K. 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Research*, 28, 3: 727-731

Bartkiewicz B., Umiejewska K., Skalska K. 2007. Effect of hydrolysis of municipal sludge on biogas production in the digestion process. V: *Management of Pollutant Emission from Landfills and Sludge*. Pawlowska M., Pawlowski L. (eds). London, Taylor & Francis Group: 259-264

Bhattacharya S.K., Parkin G.F. 1989. The Effect of Ammonia on Methane Fermentation Processes. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 61, 1: 55-59

Bojnec Š., Papler D. 2010. Trajnostni razvoj sodobnih kmetijskih bioplinjskih naprav za soproizvodnjo električne in toplotne energije. V: *Sodobni izzivi menedžmenta v agroživilstvu*. 5. konferenca DAES, Pivola, 18-19 mar. 2010. Rozman Č., Kavčič S. (ur.). Ljubljana, Društvo agrarnih ekonomistov Slovenije – DAES: 143-153

Boone D.R., Whitman W.B., Rouviere P. 1993. Diversity and Taxonomy of Methanogens. V: Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics. Ferry J.G. (ed.). New York, Chapman & Hall: 35-80

Briefing Anaerobic Digestion. 2007. Friends of the Earth.

http://www.foe.co.uk/resource/briefings/anaerobic_digestion.pdf (9. avg. 2010)

Cabirol N., Barragan E.J., Duran A., Noyola A. 2003. Effect of aluminium and sulphate on anaerobic digestion of sludge from wastewater enhanced primary treatment. *Water Science and Technology*, 48, 6: 235-240

Chen Y., Cheng J.J., Creamer K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99, 10: 4044-4064

Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from Waste and Renewable Resources. Substrate and biogas. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 443 str.

Devolli A., Shabani L., Mali S., Hila N. 2010. Brewery Waste Water Management. Balwois.

http://www.balwois.com/balwois/administration/full_paper/ffp-1736.pdf

(14. avg. 2010)

Dimroth P., Thomer A. 1989. A primary respiratory Na⁺ pump of an anaerobic bacterium: the Na⁺-dependent NADH: quinone oxidoreductase of *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology*, 151, 5: 439-444

Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg A.E. 1995. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19th edition. Washington, APHA: 5220-5310, 5420-5480

Grmek M., 2009. Potencial bioplina v Sloveniji. Zbirno poročilo. Ljubljana, Agencija za prestrukturiranje energetike d.o.o.: 14 str.

Hayes T.D., Theis T.L. 1978. The distribution of heavy metals in anaerobic digestion. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 50, 1: 61-72

ISO 11734. Vrednotenje končne anaerobne biorazgradljivosti organskih spojin v presnovljenem blatu – Metoda z merjenjem nastalega bioplina. 1994.

Jackson-Moss C.A., Duncan J.R. 1991. The effect of aluminum on anaerobic digestion. *Biotechnology Letters*, 13, 2: 143-148

Jejčič V., Poje T. 2009. Biogas regions. Bioplin v kmetijstvu: Informacije za proizvodnjo bioplina v Sloveniji. Ljubljana. Kmetijski inštitut Slovenije: 16 str.

Kato M.T., Field J.A., Lettinga G. 1993. High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 11: 1360-1366

Khanal S.K.. 2008a. Anaerobic Reactor Configurations for Bioenergy Production. V: *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Khanal S.K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 93-114

Khanal S.K.. 2008b. Overview of Anaerobic Biotechnology. V: *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Khanal S.K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 1-27

Khanal S.K.. 2008c. Microbiology and Biochemistry of Anaerobic Biotechnology. V: *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Khanal S.K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 29-41

Khanal S.K.. 2008d. Environmental Factors. V: *Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Khanal S.K. (ed.). Ames, John Wiley & Sons, Inc.: 43-64

Klemenčič M. 2010. "Koncentracija odpadnega kvasa v odpadni pivovarski vodi v Pivovarni Laško". Laško, Pivovarna Laško (osebni vir, september 2010)

Klemenčič M., Vojvodič A. Čiščenje industrijskih odpadnih vod Pivovarne Laško. Društvo za zaščito voda.

http://www.sdzv-drustvo.si/si/VD%2008_Referati/Prispevki/04%20Klemenci.pdf

(13. avg. 2010)

- Kroeker E.J., Schulte D.D., Sparling A.B., Lapp H.M. 1979. Anaerobic Treatment Process Stability. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 51, 4: 718-727
- Kovač B., 2008. Postopki za zmanjševanje odpadkov v proizvodnji živil. V: *Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija*. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17-18 apr. 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; Slovensko prehransko društvo: 37-44
- Kugelman I.J., McCarty P.L. 1964. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 37, 1: 97-116
- Kus J., 2008. Voda kot surovina in odpadek v živilstvu. V: *Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija*. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17-18 apr. 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; Slovensko prehransko društvo: 27-35
- Marinšek Logar R. 1992. Vpliv razdalje med sintrofnimi partnerji na metanogeno aktivnost v modelnih alginatnih kroglicah. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Medicinska fakulteta: 112 str.
- Mas N., Strakova E., Šerman V., Horvat Ž., Suchy P., Karačić V., Valpotić H., Strmotić A. 2008. Brewers yeast in broiler feed mixtures as a substitution for fish meal. *Krmiva*, 50, 5: 261-265
- McCarty P.L. 1964. Anaerobic waste treatment fundamentals. *Public Works*, 95, 9: 107-112
- Medjedović A. 2009. Vpliv različnih pivovarskih odpadkov na proizvodnjo bioplina z granuliranim muljem iz UASB bioreaktorja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 60 str.
- Michaud S., Bernet N., Buffière P., Roustan M., Moletta R. 2002. Methane yield as a monitoring parameter for the start-up of anaerobic fixed film reactors, *Water Research*, 36, 5: 1385-1392

- Murray P.A., Zinder Z.H. 1985. Nutritional requirements of *Methanosarcina* sp. strain TM-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 1: 49-55
- O'Flaherty V., Collins G., Mahony T. 2010. *Anaerobic Digestion of Agricultural Residues*. V: *Environmental Microbiology*. 2nd edition. Mitchell R., Gu J.D. (eds.). New Jersey. Wiley-Blackwell: 259-280
- O'Flaherty V., Colohan S., Mulkerrins D., Colleran E. 1999. Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. II: Microbial interactions and toxic effects. *Bioresource Technology*, 68, 2: 109-120
- Parkin G.F., Lynch N.A., Kuo W., Van Keuren E.L., Bhattacharya S.K. 1990. Interaction between sulfate reducers and methanogens fed acetate and propionate. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 62, 6: 780-788
- Poje T. 2009. Predstavili tudi novo uredbo: seminar Bioplin. *Kmečki glas*, 66, 50: 11
- Rasi S. 2009. *Biogas Composition and Upgrading to Biomethane*. Doctoral dissertation. Jyväskylä, University of Jyväskylä, Department of Biological and Environmental Science: 76 str.
- Soto M., Mendez R., Lema J.M. 1993. Methanogenic and nonmethanogenic activity tests: theoretical basis and experimental setup. *Water Resource*, 27, 8: 1361-1376
- Speece R.E. 1983. *Anaerobic biotechnology for industrial waste treatment*. *Environmental Science & Technology*, 17, 9: 416-427
- Škorja A., 2008. *Gospodarjenje z energijo v proizvodnji živil*. V: *Stranski proizvodi in odpadki v živilstvu – uporabnost in ekologija*. 25. Bitenčevi živilski dnevi 2008, Ljubljana, 17-18 apr. 2008. Gašperlin L., Žlender B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo; Slovensko prehransko društvo: 45-54
- Tušar R. 2007. *Od tehnološkega koncepta skozi investicijo do proizvodnje bioplina*. V: *Mednarodni simpozij Bioplin, tehnologija in okolje*, Rakičan, Murska Sobota, 29. nov. 2007. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 20-24

Uredba o obdelavi biološko razgradljivih odpadkov. Ur.l. RS št. 62-2628/2008

Vitez L. 1976. Študij pivskega kvasa z namenom njegovega izkoriščanja: II. Letno poročilo. Ljubljana, Raziskovalna skupnost Slovenije: 74 str.

Vitez L. 1977. Študij odpadnega pivskega kvasa z namenom njegovega izkoriščanja: III. Letno poročilo. Ljubljana, Raziskovalna skupnost Slovenije: 59 str.

Wastewater anaerobic. 2004. Waterleau.

<http://waterleau.nettools.be/default2.aspx?PageId=115> (16. avg. 2010)

Xiaoling L., He L., Yiyang C., Guochen D., Jian C. 2008. Effects of organic matter and initial carbon–nitrogen ratio on the bioconversion of volatile fatty acids from sewage sludge. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, 7: 1049-1055

Yerkes D.W., Boonyakitombut S., Speece R.E. 1997. Antagonism of sodium toxicity by the compatible solute betaine in anaerobic methanogenic systems. *Water Science and Technology*, 36, 6-7: 15-24

Young L.Z. 1996. Anaerobic Biodegradability Assay. V: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C.J. (ed.). Washington, ASM Press: 802-805

Yu H.Q., Tay J.H., Fang H.H.P., 2001. The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*, 35, 4: 1052-1060

Zupančič G. 2007. Pridobivanje bioplina iz pivovarniških odpadkov. V: *Mednarodni simpozij Bioplin, tehnologija in okolje*, Rakičan, Murska Sobota, 29. nov. 2007. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 36-40

Zupančič G.D., Roš M. 2003. Heat and energy requirements in thermophilic anaerobic sludge digestion. *Renewable Energy*, 28, 14: 2255-2267

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za izredno prijazne strokovne razlage in spodbude, ki mi jih je nudila v času nastajanja diplomskega dela.

Domnu Novaku in Marti Majdič se zahvaljujem za praktične napotke, potrpežljivost in pomoč pri eksperimentalnem delu.

Zahvala gre tudi celotnemu osebju Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo.

Zahvaljujem se prof. dr. Gorazdu Avguštinu za recenzijo diplomske naloge.

Prof. dr. Ivanu Štuhcu se zahvaljujem za končne popravke diplomske naloge.

Iskrena hvala moji najdražji, Aniti za vso spodbudo, razumevanje, skrb, potrpežljivost, in pomoč, ki mi jo je dajala v času študija.

Posebno zahvalo izrekam svojim staršem in babici, ki so mi v času študija stali ob strani, me podpirali, spodbujali in verjeli vame.

Še enkrat, hvala vam!