

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ajda MEDJEDOVIĆ

**VPLIV RAZLIČNIH PIVOVARSKIH ODPADKOV NA
PROIZVODNJO BIOPLINA Z GRANULIRANIM
MULJEM IZ UASB BIOREAKTORJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Ajda MEDJEDOVIĆ

**VPLIV RAZLIČNIH PIVOVARSKIH ODPADKOV NA
PROIZVODNJO BIOPLINA Z GRANULIRANIM MULJEM IZ UASB
BIOREAKTORJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE IMPACT OF VARIOUS DIFFERENT BREWERY WASTE
MATTER ON THE PRODUCTION OF BIOGAS WITH GRANULAR
SLUDGE FROM THE UASB BIOREACTOR**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo 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: doc. dr. Blaž Stres

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: doc. dr. Blaž STRES
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Ajda MEDJEDOVIĆ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/bioplina/pivovarski odpadki/granulirani mulj/UASB bioreaktor
KK	AGRIS P05
AV	MEDJEDOVIĆ, Ajda
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2009
IN	VPLIV RAZLIČNIH PIVOVARSKIH ODPADKOV NA PROIZVODNJO BIOPLINA Z GRANULIRANIM MULJEM IZ UASB BIOREAKTORJA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 62 str., 8 tab., 29 sl., 60 vir.
IJ	sl
JJ	sl / en
AI	Bioplinske tehnologije postajajo danes vse bolj aktualne na področju okoljskih tehnologij in pridobivanja energije iz obnovljivih virov. Osnovni namen raziskave je bil preveriti ali se bo mezofilni bioreaktor z muljno posteljico (UASB), namenjen zgolj presnovi odpadnih pivovarskih vod, pozitivno ali negativno odzval na dodatek odpadnega hidroliziranega in nehidroliziranega kvasa. S testom biometanskega potenciala (BMP) smo izmerili količino metana, ki nastane pri anaerobni razgradnji substratov: odpadne pivovarske vode, odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom in odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom. Poskusi s testnimi mešanici so pokazali, da dodajanje odpadnih pivovarskih kvasovk v reaktor UASB pozitivno vpliva na anaerobni proces, pri čemer odpadna pivovarska voda z dodanim nehidroliziranim kvasom omogoči višjo celokupno produkcijo metana in večji izplen metana. Z dodanim nehidroliziranim kvasom se je izplen metana povečal za 18 %.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDK 579(043.2)=163.6
CX	microbiology/biogas/brewery wastes/granular sludges/UASB bioreactor
CC	AGRIS P05
AU	MEDJEDOVIĆ, Ajda
AA	MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY	2009
TI	THE IMPACT OF VARIOUS BREWERY WASTE MATTER ON THE PRODUCTION OF BIOGAS WITH GRANULAR SLUDGE FROM THE UASB BIOREACTOR
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XIII, 62 p., 8 tab., 29 fig., 60 ref.
LA	sl
AL	sl / en
AB	Biogas technologies are gaining increasing importance in the field of environmental technologies and energy generation from renewable sources. The main goal of this research was to determine whether the mesophilic upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB), intended for brewery wastewater treatment, would react positively or negatively to the addition of waste hydrolyzed brewery yeast and fresh brewery yeast. Using the biomethane potential (BMP) test we measured the quantity of methane produced by the anaerobic decomposition of the following substrates: brewery wastewater, brewery wastewater with added hydrolyzed brewery yeast, and brewery wastewater with added fresh brewery yeast. Experiments with the mixtures used in our test showed that the addition of waste brewery yeast into the UASB reactor had a positive impact on the anaerobic process, with the higher cumulative production of methane and the higher yield of methane resulting from the addition of fresh brewery yeast to brewery wastewater. With the addition of fresh brewery yeast, the yield of methane increased by 18%.

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	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED VIROV	2
2.1 OBNOVLJIVI VIRI ENERGIJE	2
2.2 BIOPLIN	2
2.2.1 Zgodovina proizvodnje in uporabe bioplina	3
2.2.2 Prvi poskusi uporabe bioplina v Evropi	3
2.3 PROIZVODNJA BIOPLINA	4
2.3.1 Obnovljivi viri energije v Evropi	4
2.3.2 Obnovljivi viri energije v Sloveniji	4
2.4 POMEN BIOPLINA	6
2.5 VIRI ORGANSKIH SNOVI ZA ANAEROBNO RAZGRADNJO	6
2.5.1 Živalski odpadki	7
2.5.2 Energetske rastline in ostanki pridelkov	7
2.6 BIOKEMIJSKI PROCESI PRI ANAEROBNI RAZGRADNJI ORGANSKIH SNOVI	8
2.6.1 Hidroliza	9
2.6.2 Acidogena faza	10

2.6.3	Acetogena faza	10
2.6.4	Metanogeneza	11
2.7	PARAMETRI, KI VPLIVAJO NA ANAEROBNO METANOGENO RAZGRADNJO ORGANSKIH SNOVI	12
2.7.1	Vpliv visokega parcialnega tlaka vodika	13
2.7.2	Koncentracija mikroorganizmov	14
2.7.3	Vrsta substrata	14
2.7.4	Specifična površina delcev substrata	14
2.7.5	Temperatura	14
2.7.6	Vrednost pH	16
2.7.7	Razmerje med organskim ogljikom in dušikom (C/N)	16
2.7.8	Inhibitorji	16
2.7.8.1	Organske kisline (maščobne kisline in amino kisline)	16
2.7.8.2	Amonijev ion (NH_4^+) in amoniak (NH_3)	17
2.7.8.3	Sulfat	18
2.7.8.4	Alkalijske kovine in njihove soli (Na, K, Mg, Ca, Al)	18
2.8	TEHNOLOGIJE	19
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	MATERIAL	21
3.2	METODE	21
3.2.1	Opis testa biometanskega potenciala (BMP)	21
3.2.2	Predpriprava za test BMP	24
3.2.2.1	Termostatiranje inokuluma	24
3.2.2.2	Določanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS) mikrobne biomase	24
3.2.2.3	Izračun volumna mikrobne biomase v testni steklenici	24

3.2.2.4	Priprava substratov in analiza KPK substratov	25
3.2.2.5	Izračun obremenitve mikrobne biomase v testu BMP	25
3.2.2.6	Obremenitev biomase z glukozo v testnih steklenicah za pozitivno kontrolo	25
3.2.3	Izvedba testa BMP	26
3.2.3.1	Priprava anaerobne vode (prepihovanje z dušikom)	26
3.2.3.2	Priprava fosfatnega pufra	26
3.2.3.3	Sestava testnih mešanic	26
3.2.3.4	Polnjenje testnih steklenic	26
3.2.4	Potek poskusa BMP	27
3.2.5	Spremljanje poskusnih parametrov v testih BMP 1 in BMP 2	29
3.2.5.1	Spremljanje naraščanja tlaka bioplina in izračun količine proizvedenega bioplina	29
3.2.5.2	pH reakcijskih mešanic	30
3.2.5.3	Analiza sestave proizvedenega bioplina	30
3.2.5.4	Etrska ekstrakcija hlapnih maščobnih kislin (HMK)	30
3.2.5.5	Analiza hlapnih maščobnih kislin (HMK)	31
3.2.5.6	Celokupna produkcija metana	31
3.2.5.7	Bioplinski potencial	31
3.2.5.8	Izplen metana	31
4	REZULTATI	32
4.1	REZULTATI PREDPRIPRAVE POSKUSA	32
4.1.1	KPK substratov	32
4.1.2	Suha (SS) in organska snov (OS) mikrobne biomase	32
4.1.3	Sestava testnih mešanic	32
4.2	REZULTATI TESTOV BMP 1 IN BMP 2	33

4.2.1	Vrednost pH testnih mešanic	33
4.2.2	Proizvodnja bioplina med testom BMP 1 in BMP 2	34
4.2.3	Proizvodnja bioplina in metana iz posameznih substratov	36
4.2.3.1	Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode (substrat 1)	36
4.2.3.2	Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2)	37
4.2.3.3	Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3)	38
4.2.4	Delež metana v bioplinu med poskusoma BMP 1 in BMP 2	39
4.2.5	Koncentracije hlapnih maščobnih kislin (HMK) v testnih mešanicah poskusov BMP 1 in BMP 2	41
4.2.5.1	Pozitivna kontrola	41
4.2.5.2	Opadna pivovarska voda (substrat 1)	42
4.2.5.3	Opadna pivovarska voda z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2)	44
4.2.5.4	Opadna pivovarska voda z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3)	45
4.2.6	Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in dejanski izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1	RAZPRAVA	48
5.2	SKLEPI	52
6	POVZETEK	53
7	VIRI	55
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijske lastnosti substratov	21
Preglednica 2: Opravljene analize na dan vzorčenja za poskus BMP 1	28
Preglednica 3: Opravljene analize na dan vzorčenja za BMP 2	29
Preglednica 4: KPK substratov v poskusih BMP 1 in BMP 2	32
Preglednica 5: Povprečne vrednosti suhe in organske snovi biomase za poskusa BMP 1 in BMP 2	32
Preglednica 6: Sestava testnih mešanic za BMP 1	33
Preglednica 7: Sestava testnih mešanic za BMP 2	33
Preglednica 8: Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in dejanski izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2	48

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Delež posameznih obnovljivih virov v skupni rabi za Slovenijo (Obnovljivi viri energije, 2008)	5
Slika 2: Prikaz povprečne letne stopnje rasti rabe obnovljivih virov za Slovenijo (Obnovljivi viri energije, 2008)	6
Slika 3: Shema mikrobioloških procesov pri metanogenezi (Burns, 2007)	9
Slika 4: Odvisnost sproščene energije od parcialnega tlaka vodika (Grepmeier, 2002)	13
Slika 5: Vpliv temperature na čas fermentacije (Deublein in Steinhauser, 2008)	15
Slika 6: Shema bioreaktorja BIOBED – UASB (Klemenčič in Vojvodič, 2009)	20
Slika 7: Potek poskusov	23
Slika 8: Shema vzorčenja v prvem poskusu	27
Slika 9: Shema vzorčenja v drugem poskusu	28
Slika 10: pH na začetku in na koncu inkubacije prvega poskusa	34
Slika 11: pH na začetku in na koncu inkubacije drugega poskusa	34
Slika 12: Proizvodnja bioplina v odvisnosti od časa za posamezni vzorec med testom BMP1	35
Slika 13: Proizvodnja bioplina v odvisnosti od časa za posamezni vzorec med testom BMP 2	36
Slika 14: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo v poskusu BMP 1	36

Slika 15: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo v poskusu BMP 2	37
Slika 16: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim hidroliziranim kvasom v poskusu BMP 1	37
Slika 17: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim hidroliziranim kvasom v poskusu BMP 2	38
Slika 18: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim kvasom v poskusu BMP 1	39
Slika 19: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim kvasom v poskusu BMP 2	39
Slika 20: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 1	40
Slika 21: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 2	40
Slika 22 : Koncentracija očetne kisline v testni mešanici med poskusom BMP 1 v pozitivni kontroli	41
Slika 23: Koncentracija očetne in propionske kisline v testni mešanici med poskusom BMP 2 v pozitivni kontroli	42
Slika 24: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode med poskusom BMP 1	43
Slika 25: Koncentracija očetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode med poskusom BMP 2	43
Slika 26: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom med poskusom BMP 1	44

- Slika 27: Koncentracija očetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom med poskusom BMP 2 45
- Slika 28: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom med poskusom BMP 1 45
- Slika 29: Koncentracija očetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom med poskusom BMP 2 46

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MO	Mikroorganizmi
Substrat 1	Vzorec odpadne pivovarske vode
Substrat 2	Vzorec odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom
Substrat 3	Vzorec odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom
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
CSTR	Completely stirred tank reactor = reaktor s popolnim premešanjem

1 UVOD

Bioplinska tehnologija, s katero hkrati razgrajujemo organske odpadke in proizvajamo obnovljivo energijo, danes postaja vse bolj aktualna in pomembna. Okolje, v katerem živimo, je zelo nasičeno z organskimi odpadki, ki jih moramo ustrezno odstraniti. Bioplinska tehnologija je na tem področju ustrezna izbira z več vidikov: prvič zaradi koristnega pridobivanja energije in drugič z ekološkega vidika, saj prispeva k zmanjševanju emisij toplogrednih plinov, onesnaženja voda, smradu in degradacije tal. Na agroživilskem področju imamo veliko odpadnih organskih substratov - virov za proizvodnjo bioplina. Za njihovo vključitev v bioreaktorje je nujno predhodno testiranje na laboratorijskem nivoju, saj lahko ob nepravilnem doziranju pride do inhibicije anaerobne razgradnje in v najslabšem primeru celo do zaustavitve bioreaktorja, kar ima negativne okoljske in ekonomske posledice. Predhodno je treba preveriti ustreznost in primernost posameznega substrata oziroma kombinacijo različnih substratov za bioreaktorsko mikrobno združbo, proizvajalko bioplina.

Pivovarna Laško izloči v biotehnološkem procesu proizvodnje piva veliko odpadne pivovarske vode, ki se kot dober organski substrat že uporablja za proizvodnjo bioplina v industrijskem bioreaktorju UASB. Proces želijo kvalitativno posodobiti in povečati produkcijo bioplina v bioreaktorju z dodajanjem novega substrata - odpadnih pivovarskih kvasovk k odpadni vodi v bioreaktorju UASB. Kvasovke, stranski proizvod pivovarne, morajo pred prodajo na trg trenutno dehidrirati (tako zahteva okoljevarstvena zakonodaja), kar ima za posledico precejšnjo porabo energije. Zato bi se temu energetskega strošku radi izognili oz. na račun tega raje pridelali še več bioplina.

1.1 CILJ DIPLOMSKE NALOGE

V raziskavi smo želeli ugotoviti ali se bo mezofilni bioreaktor z muljno posteljico (UASB), namenjen zgolj presnovi odpadnih pivovarskih vod, pozitivno (povečal produkcijo bioplina) ali negativno odzval na dodatek novega substrata.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

1. Predvidevali smo, da je test BMP ustrezen in dovolj občutljiv za ugotavljanje pozitivnih ali negativnih učinkov dodanih odpadnih pivovarskih kvasovk v reaktor UASB, ki je bil do sedaj namenjen le produkciji bioplina iz odpadnih pivovarskih vod.
2. Predvidevali smo, da ustrezna količina dodanih odpadnih pivovarskih kvasovk v reaktor UASB poveča metanski potencial (proizvodnjo bioplina).

2 PREGLED VIROV

2.1 OBNOVLJIVI VIRI ENERGIJE

Globalno gledano danes večino energije pridobimo s sežigom fosilnih goriv. Zelo malo energije pridobimo iz jedrskih elektrarn, prispevek energije iz obnovljivih virov je skoraj zanemarljiv. V prihodnosti se bo to spremenilo z naraščajočimi cenami nafte. Med primarne vire energije spadajo fosilna goriva (črni premog, rjavi premog, nafta, zemeljski plin), obnovljivi viri energije (hidro-, sončna, vetrna, geotermalna energija in biomasa) in jedrska goriva. Pretvorbo primarnih virov energije v visoko kakovostne izdelke dosežemo s postopki, kot so rafiniranje, fermentacija, mehanska obdelava ali izgorevanje v elektrarnah. Nastali produkti se imenujejo sekundarni viri energije, kjer se kot eden izmed produktov pojavlja tudi bioplin, ki nastane z anaerobno fermentacijo iz biomase (DIS 3, 2002, cit. po Deublein in Steinhauser, 2008).

2.2 BIOPLIN

Bioplin je zmes plinov, ki nastaja z anaerobnim vrenjem (brez prisotnosti kisika) ali gnitjem organskih snovi v enostavnejše sestavine. To omogočajo naravno prisotni mikroorganizmi oziroma njihova metabolična aktivnost (Deublein in Steinhauser, 2008, Kelleher in sod., 2000). Anaerobni mikroorganizmi razgradijo ogljikovodike na molekule metana (CH_4) (50-75 %), ogljikovega dioksida (CO_2) (10-40 %) ter vodik (H_2), žveplov dioksid (H_2S), dušik (N_2), amoniak (NH_3) itd. (Muršec in Vindiš, 2007). Anaerobna razgradnja ponuja mnoge pomembne prednosti, kot so nizka produkcija odpadkov, nizka poraba energije in obnova oziroma produkcija energije (Ghost in Pohland, 1974 cit. po Chen in sod., 2008).

2.2.1 Zgodovina proizvodnje in uporabe bioplina

Zelo stari viri prikazujejo, da je bila uporaba odpadnih voda oziroma obnovljivih virov energije poznana že pred našim štetjem. Okoli leta 3000 p. n. š. so Sumerci prakticirali anaerobno čiščenje odpadkov (Deublein in Steinhauser, 2008).

Sredi 10. stoletja p. n. š. so Asirci ogrevali vodo za kopanje z uporabo bioplina, za enak namen pa so ga uporabljali tudi v 16. stoletju v Perziji. O povezavi med razpadajočimi odpadki in gorljivimi oziroma vnetljivimi plini je govoril Jan Baptist Van Helmont v 17. stoletju, medtem ko je Alessandro Volta leta 1776 dokazal povezavo med količino organskega materiala in količino proizvedenega plina (Karničnik, 2009). Njegova odkritja dokazujejo, da je nastajanje plina odvisno od fermentacijskih procesov in da je plin lahko ob kontaktu z zrakom eksploziven (Deublein in Steinhauser, 2008). Nadaljevanje razvoja pelje v Anglijo v 19. stoletje, kjer so začeli za napajanje javne razsvetljave uporabljati bioplin, pridelan iz komunalnih odpadkov (Karničnik, 2009).

2.2.2 Prvi poskusi uporabe bioplina v Evropi

V Nemčiji je bil metan prvič pridelan leta 1923. V naslednjih letih je uporaba bioplina naraščala zelo hitro vse do 2. svetovne vojne (Deublein in Steinhauser, 2008).

Leta 1945 je od vseh evropskih držav samo Nemčija začela uporabljati kmetijske proizvode za proizvodnjo bioplina. Prva majhna bioplinarna s horizontalno cilindrično posodo za fermentacijo je bila razvita leta 1950. Nekaj let zatem, leta 1955, se je povpraševanje po bioplinu občutno zmanjšalo, saj le-ta ni bil več donosen zaradi presežka fosilnih goriv in njihove nižje cene na trgu. Drugi poskus uporabe bioplina se začne v obdobju prve naftne krize leta 1970, ko se je povpraševanje po bioplinu ponovno povečalo. Po letu 1990 so v Evropi zgradili veliko obratov, ki so izvajali mehansko-biološko obdelavo odpadkov. Tretji obširnejši poskus uporabe bioplina v Evropi pa se pojavi z zakonom o obnovljivih virih energije, ki je postal veljaven leta 2000, oziroma z drugo naftno krizo. Bioplinsko proizvodnjo je pospešilo subvencioniranje energije, pridobljene iz bioplinских objektov. V zadnjih nekaj letih je število obratov za pridobivanje bioplina nenehno raslo, predvsem zaradi višjih subvencij (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.3 PROIZVODNJA BIOPLINA

2.3.1 Obnovljivi viri energije v Evropi

Evropska skupnost je med prioritetami svojega delovanja izpostavila področje trajnostnega energetskega razvoja, in sicer zagotavljanje učinkovite rabe in trajnostne oskrbe z energijo. Bioplin je bil v preteklosti zapostavljen energetski vir, zato se je evropski parlament leta 2008 zavzel za spremembo evropske zakonodaje. Le-ta naj bi jasno določila cilje in ukrepe za izkoriščanje bioplina ter tako bolj spodbujala uporabo tega obnovljivega vira energije. V letu 2009 je rusko-ukrajinski spor o dobavi in distribuciji zemeljskega plina jasno pokazal, da je Evropa energetsko zelo ranljiva in kljub temu, da bioplin ne bo rešil energetske krize, lahko predstavlja pomemben del rešitve (Krajnc, 2009).

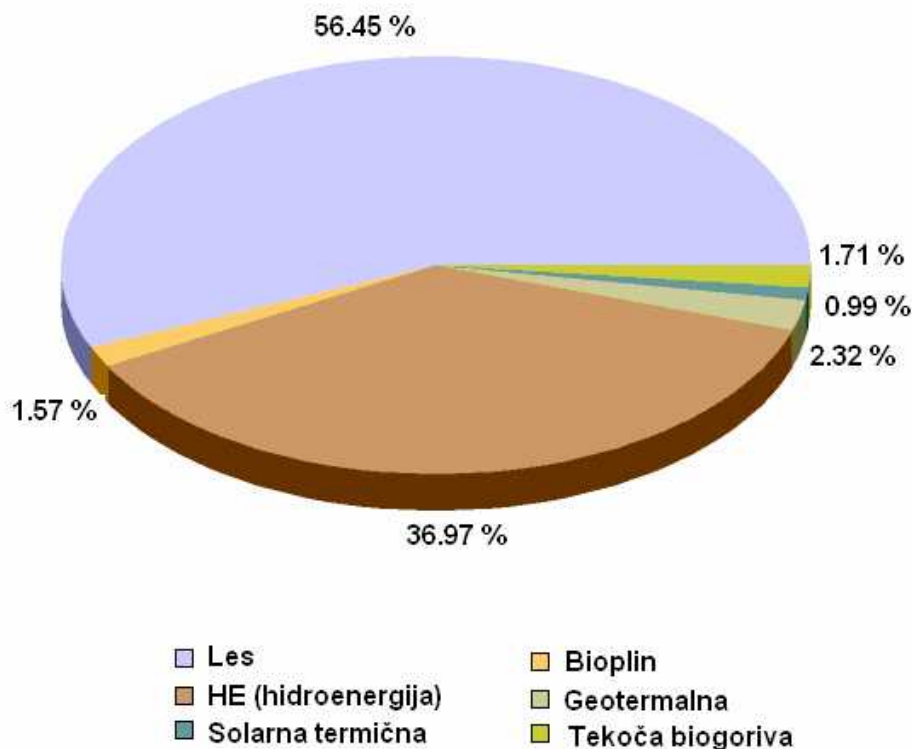
V EU danes obstaja približno 4000 obratov za pridobivanje bioplina. Proizvodnja je najbolj razvita v Nemčiji, Avstriji, na Švedskem in na Danskem (Krajnc, 2009).

V EU-27 je leta 2006 raba obnovljivih virov predstavljala 7,1 % skupne rabe energije. Glede na leto 2000 je raba porasla za 30 %. Raba obnovljivih virov v EU-27 je po državah zelo različna, saj je odvisna od naravnih danosti. V EU-27 prevladuje raba lesne biomase (52 %) in hidroenergije (21 %) (Obnovljivi viri energije, 2008).

2.3.2 Obnovljivi viri energije v Sloveniji

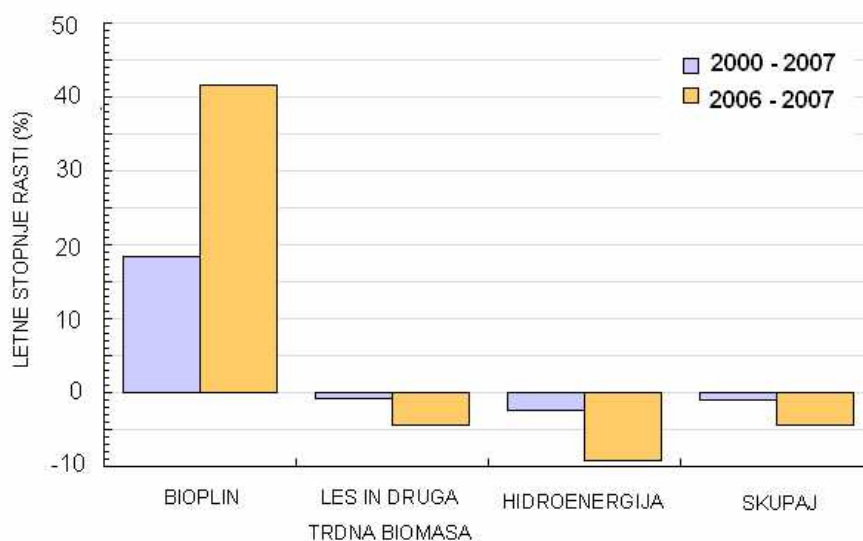
Na področju pridobivanja in energetske izrabe bioplina se je po vstopu Slovenije v EU veliko spremenilo. Vse bolj se kaže velik porast vrst in obsega substratov za proces anaerobnega gnitja (digestija). Tako je, ker po eni strani EU uvaja omejitve pri proizvodnji hrane in posledično preusmeritev kmetijske proizvodnje v proizvodnjo energetskih rastlin, po drugi strani pa zaradi novejših predpisov o ravnanju z biološko razgradljivimi odpadki (Muršec in Vindiš, 2007).

Slovenija pokriva okrog 90 % vseh energetskih potreb s fosilnimi gorivi (premoga, nafte in zemeljskega plina) skupaj z jedrsko elektrarno Krško. Okrog 10 % energije je zagotovljene iz lesne biomase in hidroelektrarn, manj kot 1 % energije pa prispevajo ostali obnovljivi viri energije, kot so sončna, vetrna, geotermalna energija ter biogoriva, ki so do danes še vedno marginalnega pomena (Šumenjak Sabol, 2007).



Slika 1: Delež posameznih obnovljivih virov v skupni rabi za Slovenijo (Obnovljivi viri energije, 2008)

Pomemben vir primarne energije v Sloveniji je lesna in druga biomasa. Cilj in prioriteta energetske in okoljske politike države sta njeno povečevanje (organski odpadki, kmetijske, živilske in komunalne dejavnosti) (Tepež, 2009a). Med pomembnejše obnovljive vire, glede na statistične podatke, v Sloveniji spadajo: deponijski plin, plin iz čistilnih naprav ter drugi bioplina, geotermalna energija, solarna energija ter biogoriva. V obdobju od 2000-2007 se je raba bioplina povečala za 299 %, predvsem na račun energetske izrabe deponijskega plina ter zaradi 800% povečanja proizvodnje bioplina v kmetijstvu v letu 2007 (Tepež, 2009a).



Slika 2: Prikaz povprečne letne stopnje rasti rabe obnovljivih virov za Slovenijo (Obnovljivi viri energije, 2008)

Slovenija se je morala v okviru Evropske unije politično zavezati, da bomo do leta 2020 dosegli 20% delež obnovljivih virov energije (Šumenjak Sabol, 2007).

2.4 POMEN BIOPLINA

Proizvodnja »zelene energije« iz bioplina pomeni obetaven in za okolje manj škodljiv način pridobivanja energije, saj zmanjšuje emisije toplogrednih plinov v okolje in tudi energetske odvisnosti od uvoženih virov energije. Poleg pridobivanja električne energije in toplote se s proizvodnjo bioplina v ruralnem okolju rešuje problem živalskih odpadkov in pridobi tudi odlično gnojilo, ki ga predstavlja presnovljeni substrat (Tepež, 2009a, b).

Bioplin ne more v celoti zamenjati fosilnih goriv, je pa pomembno, da zmanjšamo odvisnost od fosilnih goriv, stroške energije, predvsem pa škodljive emisije vsaj za nekaj odstotkov (Tepež, 2009b).

2.5 VIRI ORGANSKIH SNOVI ZA ANAEROBNO RAZGRADNJO

Mnogi kmetijski in industrijski odpadki so idealni za anaerobno razgradnjo, saj vsebujejo visoke stopnje biološko lahko razgradljivih snovi (Chen in sod., 2008).

2.5.1 Živalski odpadki

Hills in Roberts (1981) ter Hashimoto (1983) navajajo, da pri sočasni razgradnji rastlinskega materiala in gnoja, gnoj zagotavlja pufersko kapaciteto ter široko paleto hranilnih snovi. Rastlinska snov vsebuje visoko stopnjo ogljika, uravnava razmerje med ogljikom in dušikom v substratu (C / N), s čimer se zmanjšuje tveganje za inhibicijo z amoniakom. Živalski odpadki imajo pogosto visoko koncentracijo skupnega amonijskega dušika, zaradi prisotnosti amoniaka kot tudi beljakovin in sečnine, ki zlahka sproščajo amoniak med anaerobno razgradnjo (Hansen in sod., 1998; Kayhanian, 1994).

Bioplin lahko proizvajamo iz skoraj vseh vrst organskih substratov. Največji del predstavlja živalski gnoj in gnojevka iz govedoreje ter prašičereje, kot tudi iz perutninarstva. V EU-27 je vsako leto proizvedeno več kot 1500 milijonov ton živalskega gnoja. Evropsko kmetijstvo rokuje z več kot 65 % gnoja živine v obliki gnojevke. Gnojevka je tekoča mešanica urina, blata, vode in stelje (Holm-Nielsen in sod., 2009). Ti odpadki znatno prispevajo k netočkovnim virom onesnaževanja in lahko vplivajo na močvirske habitate ter kontaminirajo vire pitne vode (Hansen in sod., 1998; Kayhanian, 1994). Poleg amoniaka pa prašičji gnoj vsebuje tudi visoke koncentracije sulfata, ki izvira iz beljakovinsko bogate prehrane. Inhibiciji, povzročeni z amoniakom in sulfidom, vplivata druga na drugo (Hansen in sod., 1999).

2.5.2 Energetske rastline in ostanki pridelkov

Poleg živalskih odpadkov se kot kmetijski substrat za proizvodnjo bioplina uporabljajo tudi energetske rastline, med njimi najbolj pogosto žita in trave. Koruzna silaža sodi med najbolj obetajoče energetske rastline, primerne za produkcijo bioplina (Holm-Nielsen in sod., 2009).

Rastlinska snov vsebuje veliko nestrukturnih ogljikovih hidratov, ki se lahko razgradijo v optimalnih pogojih skladiščenja. Skladiščenje lahko štejemo kot predhodno obdelavo, ki spodbuja proizvodnjo metana iz rastlinskih snovi. Med skladiščenjem poteče postopek siliranja. Siliranje je mikrobni proces, ki ga že stoletja uporabljamo za ohranitev krme za živino (Egg in sod., 1993).

Biomasa poljščin v glavnem sestavljajo celuloza, hemiceluloza in lignin, tako imenovana lignoceluloza. Lignin je v anaerobnih pogojih slabo razgradljiv zaradi intenzivnega navzkrižnega povezovanja celuloze s hemicelulozo in ligninom (Noike in sod., 1985).

Hidroliza kompleksnih polimerov je stopnja, ki omejuje hitrost anaerobne razgradnje trdnih substratov, kot so energetske rastline in ostanki pridelkov (Mata-Alvarez in sod., 2000).

Amon in sod. (2006) ter Clemens in sod. (2006) so mnenja, da lahko energetske rastline ter ostanke pridelkov razgradimo bodisi same ali skupaj z drugimi substrati v mokrih ali suhih procesih. Ena od možnih rešitev je razgradnja skupaj z živalskim gnojem, ki je najobsežnejši kmetijski odpad.

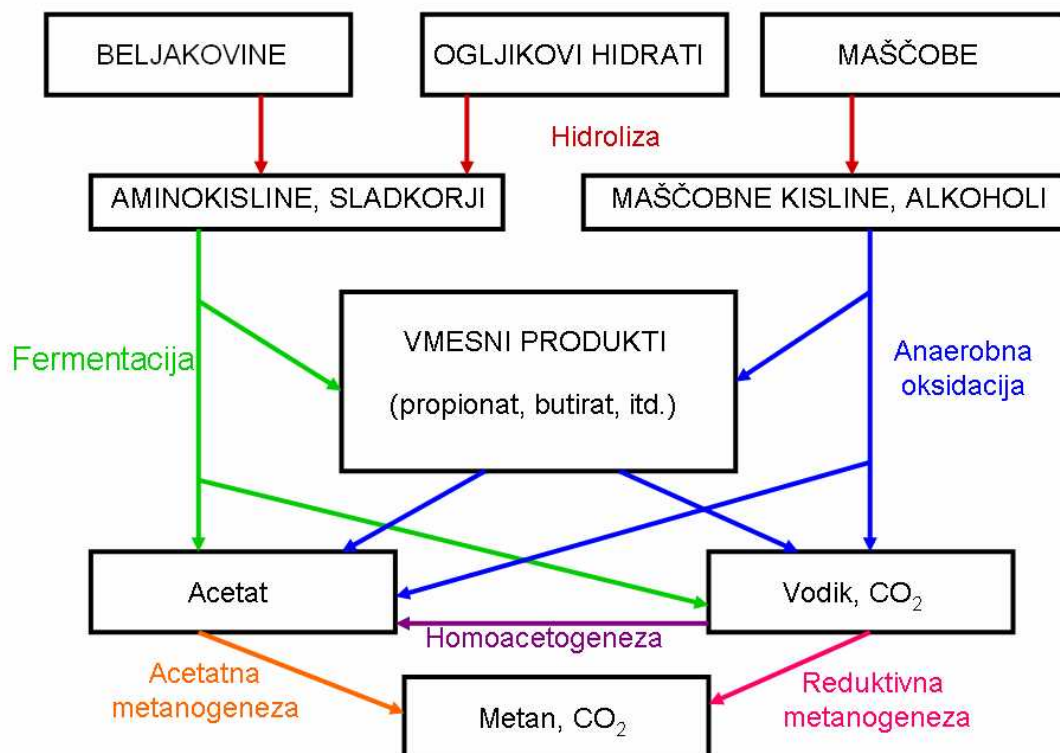
2.6 BIOKEMIJSKI PROCESI PRI ANAEROBNI RAZGRADNJI ORGANSKIH SNOVI

Razgradnja polimernih organskih spojin (v odpadni vodi) do CO₂, metana in vode (zaželeni razgradni produkti) ter določenih metabolitov poteka po shemi, prikazani na sliki 3.

Metanska fermentacija je kompleksen proces, ki ga oblikujejo najmanj štiri faze razgradnje: hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza, ki so tesno povezane ena z drugo. Če npr. hidroliza poteče prehitro, potem delež CO₂ v končnem bioplinu naraste, koncentracija kislin naraste in pH vrednost pade pod 7,0. To potem vpliva na nadaljnje faze razgradnje. Če pa acidogena faza poteče prehitro, je produkcija metana inhibirana (Deublein in Steinhauser, 2008).

Mikroorganizmi, ki proizvajajo metan, so metanogene arheje, proces mikrobne proizvodnje metana pa se imenuje metanogeneza (Madigan in sod., 2000).

Odkrita je bila velika raznolikost morfoloških tipov metanogenih arhej, ki spadajo med prokariontske organizme. Fiziološko gre za anaerobne organizme. V primerih laboratorijskega gojenja metanogenih arhej moramo striktno uporabljati posebne anaerobne gojitvene tehnike (Madigan in sod., 2000).



Slika 3: Shema mikrobioloških procesov pri metanogenezi (Burns, 2007)

2.6.1 Hidroliza

V prvi stopnji anaerobne razgradnje poteka razgradnja polimerov (celuloze, drugih polisaharidov, beljakovin, maščob) na manjše monomere (topne molekule) z ekstracelularnimi encimi, ki jih izločajo fakultativne ali obligatorne hidrolitske anaerobne bakterije. Čas trajanja hidrolize je odvisen od vrste organske snovi. Ogljikovi hidrati se razgradijo v roku nekaj ur, medtem ko hidroliza proteinov in maščob traja nekaj dni. Hidroliza substratov z visokim deležem lignina in celuloze poteka počasi in nepopolno. Fakultativni anaerobni mikroorganizmi porabljajo v vodi raztopljen kisik in tako omogočijo nizek redox potencial, potreben za optimalno rast striktno anaerobnih mikroorganizmov (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.6.2 Acidogena faza

Produkte, nastale pri hidrolizi (monosaharidi, aminokisline, maščobne kisline), uporabljajo kot substrat različne fakultativne in striktno anaerobne bakterije, ki v acidogeni fazi razgradijo monomere na krajše, nižje organske kisline od C1 do C5 molekul (ocetna kislina, propionska kislina, maslena kislina), alkohole, CO₂ in H₂ (Anderson in sod., 1982). Ocetna kislina igra pomembno vlogo pri anaerobni razgradnji organskih snovi. Večina hidrolizirane organske snovi se pretvori v ocetno kislino in posledično v metan ter ogljikov dioksid (Poulsen, 2003). Koncentracija nastalega vodika vpliva na vrsto produktov fermentacije. Večji kot je parcialni tlak vodika, manj nastane reduciranih snovi npr. acetat (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.6.3 Acetogena faza

Acetogeno fazo izvajajo mikroorganizmi, ki za substrat uporabljajo produkte, nastale v predhodni acidogeni fazi in jih pretvorijo v acetat. Acetogeni mikroorganizmi so vezni člen med acidogeno in metanogeno fazo (Deublein in Steinhauser, 2008).

Reakcije acetogenih mikroorganizmov so sledeče: (Deublein in Steinhauser, 2008)

- Propanojska kislina (propionska kislina)



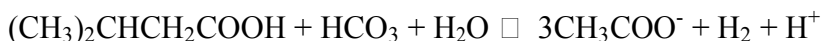
- Butanojska kislina (maslena kislina)



- n – pentanojska kislina (valerianska kislina)



- Izopentanojska kislina (izovalerianska kislina)



- Heksanojska kislina



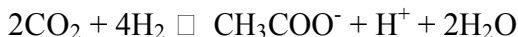
- 2 – hidroksipropanojska (mlečna kislina)



- Etanol



- Ogljikov dioksid in vodik



- Glicerin (1,2,3 – propantriol)



Acetat kot substrat za metanogenezo lahko nastane na več načinov. Prvi način je neposredno s fermentacijo (npr. bakterije rodov *Clostridium*, *Bifidobacterium*), drugi način nastanka acetata je s procesom acetogeneze, kjer je acetat končni produkt homoacetogenih bakterij, ki ga naredijo iz vodika in CO_2 (npr. bakterije rodu *Acetobacterium*), tretji pa s sekundarno fermentacijo hlapnih maščobnih kislin (propionat, butirat, sukcinat) in alkoholov (npr. bakterije rodu *Syntrophomonas*). Pri procesih nastanka acetata je eden izmed produktov tudi vodik, ki je nujno potreben za metanogenezo, hkrati pa je poraba vodika nujna za ustrezen potek fermentacije hlapnih maščobnih kislin (sintrofizem) (Madigan in sod., 2000).

Acetogene bakterije so obvezne proizvajalke vodika (H_2). Nastanek acetata z oksidacijo dolgoverižnih maščobnih kislin je termodinamsko možen le ob zelo nizkem parcialnem tlaku vodika. To pomeni, da lahko dobijo acetogene bakterije energijo za preživetje in rast samo pri nizki koncentraciji H_2 , medtem ko metanogene arheje preživijo zgolj ob ustrezni dostopnosti vodika, zato je nujno simbiotsko (sintrofizem) razmerje med acetogenimi in metanogenimi mikoroorganizmi (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.6.4 Metanogeneza

Metanogeno fazo (nastajanje metana) vršijo metanogene arheje, ki so striktno anaerobne (Deublein in Steinhauser, 2008). Ne morejo pa razgraditi vseh substratov, npr. glukoze, organskih ali maščobnih kislin (razen acetata). Razgradijo lahko zgolj za metanogenezo sprejemljive oblike substratov. Le-te razdelimo v tri skupine (Madigan in sod., 2000):

V prvo skupino sodijo CO₂ substrati (ogljikov dioksid, CO₂), format (HCOO) in ogljikov monoksid, CO). Metanogene arheje CO₂ z H₂ reducirajo v metan:

- $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}; \Delta G^\circ = -131 \text{ kJ/kmol}$ (Madigan in sod., 2000).

Druga skupina substratov temelji na metilni skupini (metanol (CH₃OH), metilamin, dimetilamin, trimetilamin, metilmerkaptin, dimetilsulfid). Taki substrati, npr. metanol, se razgradijo do metana po dveh možnih poteh. Pri prvi gre za redukcijo z vodikovimi ioni, v primeru njihove odsotnosti pa se nekaj molekul CH₃OH oksidira do CO₂, kar sprosti elektrone, potrebne za redukcijo preostalih molekul metanola v metan. (Madigan in sod., 2000):

1. $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}; \Delta G^\circ = -113 \text{ kJ/kmol}$
2. $4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}; \Delta G^\circ = -319 \text{ kJ/kmol}$

Tretjo skupino substratov predstavlja acetat (CH₃COOH)

- $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2; \Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/kmol}$ (Madigan in sod., 2000)

Pri zgoraj opisanih reakcijah lahko vidimo, da se pri redukciji CO₂ z vodikom sprosti bistveno več energije kot pri razgradnji oetne kisline (Deublein in Steinhauser, 2008). V procesu metanogeneze 30 % metana proizvede hidrogenotrofna skupina arhej (rodova *Methanococcus*, *Methanobacterium*) z redukcijo CO₂, medtem ko 70 % metana nastane iz acetata z acetotrofnimi metanogenimi arhejami (rodova *Methanosarcina*, *Methanotherix*) (Madigan in sod., 2000).

Razlog za tako razmerje je omejena ponudba vodika. V nasprotnem primeru bi visoka koncentracija vodika povzročila inhibicijo metanogeneze. Sinteza metana iz vodika in ogljikovega dioksida je tako odvisna od akumulirane koncentracije vodika, nastalega v acetogeni fazi.

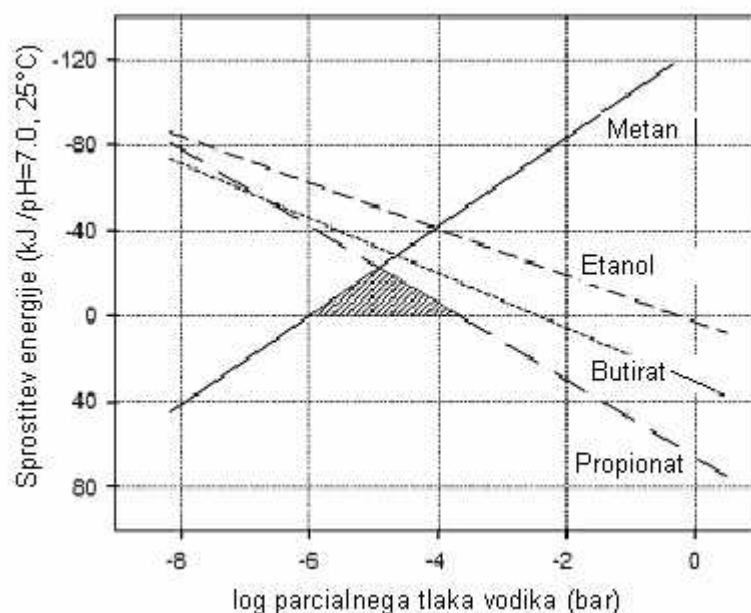
2.7 PARAMETRI, KI VPLIVAJO NA ANAEROBNO METANOGENO RAZGRADNJO ORGANSKIH SNOVI

Procesi mikrobnega metabolizma so odvisni od številnih parametrov. Za optimalen proces fermentacije je treba te parametre dobro nadzorovati (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.7.1 Vpliv visokega parcialnega tlaka vodika

Ozko specifična simbioza je nujna za nemoteno funkcioniranje vodikovih producentov (acetogene bakterije) in vodikovih porabnikov (metanogene arheje). Da lahko biološka reakcija poteče, mora biti eksotermna, kar pomeni, da mora biti prosta energija reakcije negativna. Vodikova koncentracija mora biti dobro uravnotežena: na eni strani metanogeni mikroorganizmi potrebuje dovolj vodika za produkcijo metana, po drugi strani pa mora biti parcialni tlak vodika dovolj nizek, da ne inhibira acetogenih bakterij. Maksimalno sprejemljiv parcialni tlak vodika je odvisen od vrst bakterij in arhej in tudi od dostopnih substratov (Deublein in Steinhauser, 2008).

Za anaerobno pretvorbo propionata preko očetne kisline in H_2/CO_2 do metana je energetska okna zelo ozka (Deublein in Steinhauser, 2008). Šrafirano področje na sliki 4 predstavlja »termodinamsko okno« razgradnje propionske kisline. Razgradnja propionske kisline poteka do 10^{-4} bara parcialnega tlaka vodika. Do inhibicije razgradnje etanola pride komaj pri enem baru parcialnega tlaka vodika (Harper in Pohland, 1986). Razgradnja propionske kisline je lahko pokazatelj produktivnosti bioreaktorja, saj je ta razgradnja pogosto limitirajoči faktor pri produkciji bioplina (Deublein in Steinhauser, 2008).



Slika 4: Odvisnost sproščene energije od parcialnega tlaka vodika (Grepmeier, 2002)

2.7.2 Koncentracija mikroorganizmov

Metanogeni mikroorganizmi imajo v splošnem dolge podvojevalne čase. Da se prepreči izpiranje in zagotovi učinkovito začetno delovanje bioreaktorja, morajo biti mikroorganizmi v mirujočem reaktorju prisotni vsaj 10-15 dni. Acidogene in acetogene bakterije rastejo hitreje, zato pri njih dejansko ni možnosti izpiranja. Nizka stopnja rasti metanogenih mikroorganizmov pomeni, da je za bioplinske reaktorje potrebna relativno dolga zagonska doba, tudi do treh mesecev (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.7.3 Vrsta substrata

Izplen fermentacije oziroma razgradnja substratov je odvisna predvsem od njihove sestave. Skoraj iz vseh organskih materialov, ki vsebujejo zadosten delež ogljika, lahko pridobivamo bioplin. Maščobe, ogljikovi hidrati in proteini se dobro razgrajujejo, medtem ko se vlaknine (oleseneli ali starejši deli rastlin) počasneje (Energetska izraba bioplina, 2009). Glede na strukturo substratov vmesni produkti razgradnje lahko tudi omejijo ali zavirajo proces razgradnje. Na primer razgradnja maščob lahko nakopiči maščobne kisline, kar zavira nadaljnjo razgradnjo. Z razgradnjo proteinov nastajata amoniak in žveplov dioksid, ki v preveliki količini zavirata metanogenezo (Deublein in Steinhauser, 2008).

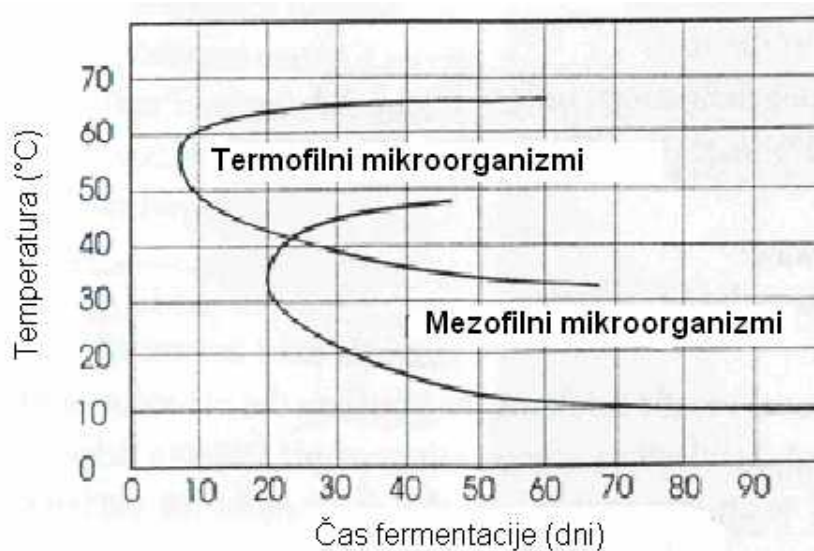
2.7.4 Specifična površina delcev substrata

Za uspešnost biokemijskih reakcij je nujna čim večja površina substrata, ki se mora razgraditi. Ta se spreminja proporcionalno s kvadratom velikosti delcev. Za povečanja površine substrata je v mnogih primerih priporočljivo drobljenje biomase na čim manjše delce pred fermentacijo (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.7.5 Temperatura

Glede na temperaturni optimum lahko anaerobne mikroorganizme razdelimo v tri skupine (Bouallagui in sod., 2004):

- psihrofilni (15-25 °C)
- mezofilni (35-37 °C)
- termofilni (50-60 °C)



Slika 5: Vpliv temperature na čas fermentacije (Deublein in Steinhauser, 2008)

Metanogeni mikroorganizmi so občutljivi na hitre spremembe temperature. Večina metanogenih mikroorganizmov pripada mezofilnemu temperaturnemu območju. V splošnem velja, da je energetska bilanca boljša v mezofilnem kot v termofilnem obsegu (Deublein in Steinhauser, 2008). Prednost mezofilnega obratovanja je visoka procesna stabilnost, tudi pri temperaturnem nihanju, v primerjavi s termofilnimi procesi (Zupančič in Roš, 2003), kjer majhno odstopanje od optimalne temperature povzroči precejšnjo motnjo procesa. Temperatura ne sme odstopati za več kot za 2 °C navzgor ali navzdol od temperaturnega optimuma (Deublein in Steinhauser, 2008).

V zadnjih letih postajajo vse bolj aktualni termofilni metanogeni procesi, medtem ko se psihrofilni procesi izvajajo le v redkih bioplinskih reaktorjih (Poulsen, 2003). Prednosti termofilnega procesa v primerjavi s procesi, ki potekajo pri nižji temperaturi, so krajši zadrževalni čas v reaktorju, zaradi hitrejšje razgradnje organskih snovi (slika 5), boljše uničenje patogenih mikroorganizmov, boljša razgradnja dolgoverižnih maščobnih kislin, manj biomase, potrebne v primerjavi s količino producirane metana. Na drugi strani je slabost termofilnega procesa večja poraba energije, ki je potrebna za segrevanje reaktorjev, in večja nevarnost zaviranja procesa z amoniakom (Poulsen, 2003; Zupančič in Roš, 2003).

2.7.6 Vrednost pH

V literaturi najpogosteje navajajo povezanost vrednosti pH s koncentracijo amonija. Pri višjem pH se namreč več raztopljenega amonijevega iona (NH_4^+) pretvori v amoniak (NH_3), ki je toksičen za mikroorganizme. Z višanjem pH tako lahko povečamo toksičnost za mikroorganizme (Borja in sod., 1996). Optimalni pH za delovanje metanogenih mikroorganizmov je med 6,7 in 7,5 (Deublein in Steinhauser, 2008). Pod vrednostjo 6,6 pride do očitnega padca aktivnosti metanogenih mikroorganizmov. Znano je, da lahko pri pH = 5 preživijo dva meseca (Anderson in sod., 1982).

2.7.7 Razmerje med organskim ogljikom in dušikom (C/N)

Pomemben vpliv na metanski potencial ima razmerje med ogljikom in dušikom (C/N) v substratu. Ogljik je vir energije pri anaerobnem dihanju. Optimalno razmerje C/N za produkcijo bioplina je 30 : 1 (Bardiya in Gaur, 1997), najmanjše še ugodno razmerje pa je 16 : 1. Substrati z nizkim razmerjem C/N privedejo do naraščanja koncentracije amoniaka ter zmanjšanja produkcije metana, previsoka razmerja pa povzročijo pomanjkanje dušika, kar negativno vpliva na rast mikroorganizmov (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.7.8 Inhibitorji

Pri anaerobni razgradnji se mikroorganizmi, ki tvorijo kisline in tisti mikroorganizmi, ki tvorijo metan, zelo razlikujejo v smislu fiziologije, prehranskih potreb, kinetike rasti in občutljivosti na okoljske dejavnike. Primarni vzrok reaktorske nestabilnosti so motnje ravnotežja med njimi (Demirel in Yenigun, 2002). Prisotnost inhibitornih snovi je pogosto glavni vzrok za motnje delovanja anaerobnih reaktorjev. Inhibicija se običajno pokaže kot zmanjšanje proizvodnje bioplina in kopičenjem hlapnih organskih kislin (Kroeker in sod., 1979).

2.7.8.1 Organske kisline (maščobne kisline in amino kisline)

Ponavadi so organske kisline do določenih koncentracij že prisotne v substratu. Razgradijo se med metanogenezo. Delno obstajajo v nedisociirani obliki in delno v disociirani obliki. Še posebej nedisociirane kisline imajo zaradi lipofilne narave zaviralni učinek, saj prodrejo v celice, kjer denaturirajo celične proteine. Reaktorji se običajno zakisajo, če jih

preobremenimo z lahko razgradljivim organskim substratom ali pa je razgradnja kislin zavrtla. To pomeni, da je mogoče organsko obremenitev metanskega reaktorja povečevati le postopoma in počasi (Deublein in Steinhauser, 2008).

Na zmanjšanje učinkovitosti bioreaktorja dodatno vpliva padanje pH vrednosti. Če je pH vrednost manjša od 7, se zaviralni učinek začne pri pragu koncentracije 1000 mg/l ocetne kisline. Pri izomasleni kislini ali izovalerianski kislini je prag zaviralnega učinka pri koncentraciji 50 mg/l nedisociirane maščobne kisline brez adaptacije, medtem ko ima propionska kislina močan zaviralni učinek že pri koncentraciji 5 mg/l (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.7.8.2 Amonijev ion (NH_4^+) in amoniak (NH_3)

Amoniak (NH_3) in amonijev ion (NH_4^+) nastaneta pri anaerobni biološki razgradnji dušikovih snovi, večinoma iz proteinov in uree (Kayhanian, 1999). Na razmerje amoniaka in amonijevega iona vpliva pH vrednost. Amoniak ima zaviralni učinek in je v večjih količinah lahko strupen, medtem ko so amonijski ioni povsem neproblematični (Deublein in Steinhauser, 2008).

Med štirimi funkcionalnimi skupinami anaerobnih mikroorganizmov so metanogeni najmanj tolerantni na amoniak (Kayhanian, 1994). Ko je koncentracija amoniaka narasla v območje 4051-5734 mg $\text{NH}_3\text{-N/l}$, je bila acidogena populacija v granuliranem odpadku komaj prizadeta, medtem ko je metanogena populacija izgubila 56,5 % svoje aktivnosti (Koster in Lettinga, 1988). Prosti amoniak (NH_3) so prepoznali kot glavni vzrok za zaviranje anaerobnega procesa, ker prosto prehaja skozi membrane (Kroeker in sod., 1979).

Vzdrževanje pH vrednosti znotraj optimalne rasti mikroorganizmov tako lahko zniža toksičnost amoniaka. Naraščanje pH vrednosti vodi v povečano toksičnost, zaradi povečanega razmerja med amoniakom in amonijevimi ioni (Bhattacharya in Parkin, 1989). Liu in Sung (2002) na splošno menita, da je koncentracije amonija okoli 200 mg/l v korist anaerobnemu procesu, saj je dušik, esencialno hranilo tako na voljo anaerobnim mikroorganizmom. Koncentracija skupnega amonijskega dušika v razponu od 1,7 do 14 g/l, povzroči 50 % redukcijo proizvodnje metana (Hansen in sod., 1998). Znatne razlike

v koncentraciji zaviralnega amoniaka je mogoče pripisati razlikam v substratu, inokulumu, okoljskim dejavnikom (temperatura, pH) in prilagoditvenem obdobju (Angelidaki in Ahring, 1994). Med obdelavo odpadkov, ki vsebujejo veliko koncentracijo amonijskega nitrata, pH vpliva na rast mikroorganizmov (Hansen in sod., 1999).

Proces nestabilnosti zaradi amoniaka pogosto vodi v kopičenje hlapnih maščobnih kislin, kar spet vodi v znižanje pH v rednosti in s tem upad koncentracije prostega amoniaka (NH_3). Interakcija med prostim amoniakom, nižjim maščobnim kislinam in pH vrednostjo verjetno vodi do »inhibiranega dinamičnega ravnovesja«, pogoja, kjer proces teče stabilno, a z manjšo metansko produkcijo (Angelidaki in Ahring, 1993).

Anaerobna fermentacija odpadkov z visoko koncentracijo amoniaka je lažje inhibirana in manj stabilna v termofilnem kot v mezofilnem območju (Braun in sod., 1981).

2.7.8.3 Sulfat

Žveplo je potrebno hranilo za metanogene mikroorganizme, saj se je izkazalo, da je vsebnost žvepla v metanogenih mikroorganizmih višja, kot pri drugih skupinah mikroorganizmov v anaerobnih okoljih. Sulfat je skupna sestavina številnih industrijskih odpadnih voda (O'Flaherty in sod., 1998). V anaerobnih reaktorjih sulfatne reducirajoče bakterije reducirajo sulfat v sulfid (Koster in Lettinga, 1988). V zvezi z naravo sulfidne toksičnosti in učinkov različnih sulfidov na mikroorganizme obstaja v literaturi precejšnja zmeda (Chen in sod., 2008). McCartney in Oleszkiewicz (1991) sta opazila, da toksičnost sulfida narašča z naraščanjem pH vrednosti.

Zaviralne koncentracije sulfida, o katerih so poročali v literaturi, so bile med 100 in 800 mg/l raztopljenega sulfida ali približno 50-400 mg/l neraztopljenega H_2S (Parkin in sod., 1990).

2.7.8.4 Alkalijske kovine in njihove soli (Na, K, Mg, Ca, Al)

Na, K, Mg, Ca, Al so lahke kovine, ki vplivajo na anaerobno razgradnjo. Sprostijo se lahko z razgradnjo organske snovi (npr. biomasa) ali pa so dodane kot kemikalije za korekcijo pH vrednosti. Zadostne količine stimulirajo mikrobno rast, presežene količine pa upočasnijo rast in povzročijo številne inhibicije in toksičnost (Soto in sod., 1993).

Informacije o vplivu aluminija na anaerobno razgradnjo so v literaturi minimalne. Dodatek $\text{Al}(\text{OH})_3$ je inhibiral tako acetogene kot tudi metanogene mikroorganizme. Po izpostavitvi 1000 mg/l $\text{Al}(\text{OH})_3$ za 59 dni se je aktivnost metanogenih in acetogenih mikroorganizmov zmanjšala (Cabirol in sod., 2003).

Kugelman in McCarty (1964) sta poročala, da je optimalna koncentracija Ca za metanogenezo iz očetne kisline 200 mg/l. Meja inhibicije metanogene aktivnosti s kalcijem je pri koncentraciji 2500-4000 mg/l, močna inhibicija pa se pojavi pri koncentraciji 8000 mg/l.

Optimalna koncentracija Mg za anaerobne bakterije je 720 mg/l (Ahring in sod., 1991). Opazili so, da je nizka koncentracija kalija vzrok za izboljšanje učinkovitosti v termofilnem in mezofilnem razponu, medtem ko je pri višji koncentraciji zaviralni učinek izrazitejši v termofilnem območju (Kugelman in McCarty, 1964).

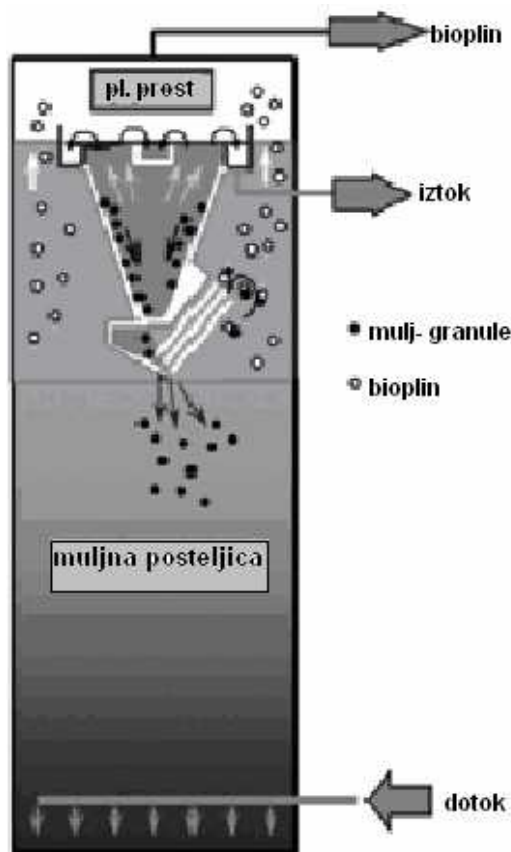
2.8 TEHNOLOGIJE

Danes obstajajo različne tehnologije bioplinske proizvodnje. Prevladujejo kontinuirni postopki, ki se ločijo v tri skupine, glede na razlike v zadrževalnih časih. V prvo skupino razvrščamo postopke, kjer so vsi trije zadrževalni časi enaki, to sta reaktor s popolnim premešanjem (CSTR – Completely Stirred Tank Reactor) in cevni reaktor. V drugi skupini sta zadrževalna časa mikroorganizmov in substrata daljša od zadrževalnega časa tekočine; tu najdemo kontaktni reaktor in reaktor z muljno posteljico (UASB). Za tretjo skupino je značilen daljši zadrževalni čas mikroorganizmov od zadrževalnih časov substrata, ta pa je zopet daljši od zadrževalnega časa tekočine. Sem uvrščamo anaerobne filtre in bioreaktorje z razširjeno plastjo. Od omenjenih tipov bioplinskih reaktorjev pa so najbolj učinkoviti bioreaktorji UASB (Deublein in Steinhauser, 2008).

Tehnologija UASB (upflow anaerobic sludge blanket) je bila razvita v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja in je sedaj postala najbolj uporabljan postopek za anaerobno predobdelavo organsko in visokoobremenjenih odpadnih voda iz pivovarn kot tudi iz ostale živilske industrije (Klemenčič in Vojvodič, 2009).

Osnovna in najpomembnejša lastnost postopka UASB je granulirana ali peletirana mikrobnna biomasa z dobrimi usedalnimi lastnostmi in visoko specifično aktivnostjo. Ta

biomasa oblikuje dinamično muljno plast, ki lebdi v spodnji tretjini bioreaktorske posode. Njena prostornina se lahko povečuje ali zmanjšuje na račun gibanja granul. Gibanje granul navzgor v stolpu tekočine povzročajo nanje pripeti mehurčki bioplina. Zaradi delovanja strižnih sil ter diferenciranja hidrostatskega in plinskega tlaka v plinskih mehurčkih pri potovanju granul navzgor pride do razplinjevanja, to je do razdvajanja granul in mehurčkov, ter padanja granul nazaj v muljno posteljico. Dodatno mešanje v takem reaktorju največkrat ni potrebno. Konstrukcija samega bioreaktorja je dokaj enostavna. Svežo odplako črpamo pri dnu skozi poseben razdelilni sistem. Odplaka se potem dviguje navzgor in se razgrajuje do metana in CO₂. Plinski mehurčki se ločijo od biomase na poti skozi tlačni gradient, najkasneje pa na površini zvonasto oblikovanih razplinjevalcev v zgornjem delu bioreaktorja (Marinšek Logar, 1992).



Slika 6: Shema bioreaktorja BIOBED – UASB (Klemenčič in Vojvodič, 2009)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

V poskusu smo uporabljali sveže substrate iz pivovarne Laško. Naši substrati so bili odpadna pivovarska voda, hidroliziran kvas in nehidroliziran kvas. Med substrati je imel največji KPK nehidroliziran kvas, 293 g/l (preglednica 1). Odpadna pivovarska voda je imela KPK le 3,03 g/l. Hidroliziran kvas je imel v primerjavi z nehidroliziranim večje vrednosti KPK, suhe snovi in organske snovi. Kemijske lastnosti kvasine so konstantne tudi več mesecev, medtem ko vrednosti pri odpadni pivovarski vodi nihajo, zato je treba vsakič znova preveriti kemijske lastnosti substrata. Kvas hidrolizirajo pri visoki temperaturi brez dodatkov kemikalij (termična hidroliza).

Preglednica 1: Kemijske lastnosti substratov

Substrat	KPK (g/l)	BPK (g/l)	SS (g/l)	OS (g/l)	Dušik (g/l TKN)
Hidroliziran kvas	277,00	193,90	188	177	11-12
Nehidroliziran kvas	293,00	193,38	152	142	11-12
Opadna pivovarska voda	3,03	2,42			

KPK – kemijska potreba po kisiku, BPK – biološka potreba po kisiku, SS – suha snov, OS – organska snov, TKN – organski dušik, Kjeldahlov dušik

Granulirano biomaso, vir mikroorganizmov, smo prav tako kot substrate pridobili iz pivovarne Laško, natančneje iz njihovega bioreaktorja UASB.

3.2 METODE

Metode, ki smo jih uporabljali za predpripravo testa in med testom biometanskega potenciala, so standardne metode za vrednotenje anaerobne biorazgradljivosti (ISO 11734) in postopki za določanje anaerobne biorazgradljivosti po Youngu (1996), postopki določitve kemijske potrebe po kisiku in metode za določitev suhe in organske snovi (Eaton in sod., 1995).

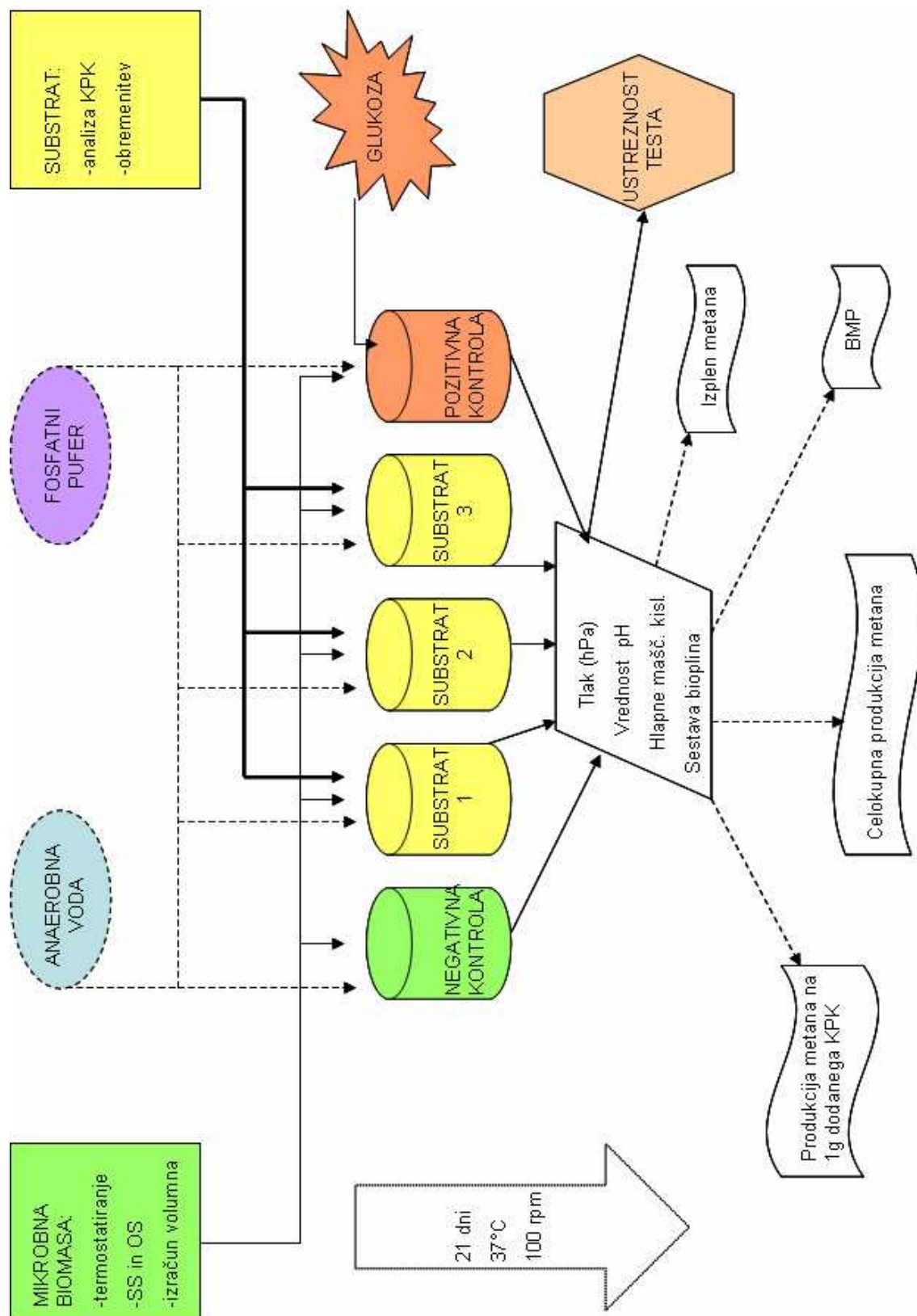
3.2.1 Opis testa biometanskega potenciala (BMP)

Kot osnovni testni postopek smo uporabili test biometanskega potenciala (test BMP) po Owenu in sod. (1979). Je učinkovita in cenovno ugodna metoda za spremljanje obsega in hitrosti pretvorbe organske snovi v metan v anaerobnih razmerah.

V testu BMP smo merili produkcijo metana, ki nastane pri anaerobni razgradnji testnih vzorcev: odpadne pivovarske vode, odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom in odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (slika 7).

Za ustrezno izvedbo testa BMP smo najprej analizirali suho in organsko snov biomase. Potem smo izmerili še kemijsko potrebo po kisiku (KPK) za posamezne substrate (odpadna pivovarska voda, odpadna pivovarska voda z dodanim hidroliziranim kvasom in odpadna pivovarska voda z dodanim nehidroliziranim kvasom). Iz teh podatkov smo za testne mešanice izračunali razmerje biomase in substrata (Sulfita in sod., 1996; Young, 1996).

V testnih steklenicah smo plinotesno inkubirali biomaso kot vir mikroorganizmov, ki pri anaerobnih pogojih razgrajujejo testne vzorce. Med testom je v steklenicah naraščal tlak, ki je kazalec obsega in hitrosti produkcije bioplina. Merilne glave na steklenicah so v našem poskusu beležile pritisk v hPa. Vzporedno s testnimi substrati pa smo testirali tudi produkcijo metana same biomase (negativna kontrola), kjer v testne steklenice nismo dodali substrata. Pozitivno kontrolo poskusa pa so predstavljali vzorci, ki imajo poleg biomase dodano znano, lahko razgradljivo organsko snov. V našem primeru je bila to glukoza. Pozitivna kontrola je potrebna za interno kontrolo poteka poskusa.



Slika 7: Potek poskusov

substrat 1 – odpadna pivovarska voda, substrat 2 – odpadna pivovarska voda s hidroliziranim kvasom, substrat 3 – odpadna pivovarska voda z nehidroliziranim kvasom

3.2.2 Predpriprava za test BMP

3.2.2.1 Termostatiranje inokuluma

Inokulum, ki je vir anaerobnih fermentativnih in metanogenih arhej, s termostatiranjem stabiliziramo tako, da mikroorganizme vsaj pet dni pred izvedbo testa BMP termostatiramo pri temperaturi 37°C. S stabilizacijo dosežemo porabo preostale prisotne organske snovi v inokulumu, ki bi sicer pri izračunavanju vplivala na produkcijo metana v vzorcih (SIST EN ISO 11734).

3.2.2.2 Določanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS) mikrobne biomase

SS in OS smo določali s standardno metodo (Eaton in sod., 1995). Za sušenje smo uporabili žarilne lončke, ki smo jih predhodno očistili in prežarili (24 h, 105 °C) ter ohladili v eksikatorju. Lončke smo stehtali in v vse odpipetirali 10 ml vzorca ter jih ponovno stehtali. Vzorce smo 24 ur pustili pri 105 °C. Po končanem sušenju smo lončke previdno prenesli v eksikator, jih ohladili in stehtali. Vzorce smo dalje žarili v žarilni peči 24 ur pri 550 °C. Po končanem žarjenju smo nato lončke prenesli v eksikator, jih ohladili in stehtali. Sledil je izračun SS in OS po enačbah 1 in 2 za vse vzorce. SS in OS smo določali v treh ponovitvah in izračunali povprečne vrednosti.

$$SS \text{ (g/l)} = ((m_{\text{pos}} - m_{\text{lon}}) / V_{\text{VZ}}) * 1000 \quad \dots(1)$$

$$OS \text{ (g/l)} = ((m_{\text{pos}} - m_{\text{pož}}) / V_{\text{VZ}}) * 1000 \quad \dots(2)$$

m_{pos}	-	masa lončka z vzorcem po sušenju (g)
m_{lon}	-	masa praznega lončka (g)
V_{VZ}	-	volumen vzorca pred sušenjem (10 ml)
$m_{\text{pož}}$	-	masa lončka z vzorcem po žarjenju (g)

3.2.2.3 Izračun volumna mikrobne biomase v testni steklenici

Mikrobno biomaso (inokulum) moramo obremeniti s primerno količino substrata, če želimo test izvesti v merljivem območju. Obremenitev mikrobne biomase podajamo kot kvocient vrednosti KPK dodanega substrata na organsko snov inokuluma (mg KPK/g OS inokuluma). Koncentracija OS biomase je v standardni izvedbi testa BMP 2 g OS/l testne

mešanice. Glede na predhodno določeno vrednost OS v biomasi, preračunamo volumen biomase, ki jo moramo dodati testni mešanici. Volumen testne mešanice v naših poskusih je bil 0,5 l, zato smo dodajali 1 g OS biomase.

3.2.2.4 Priprava substratov in analiza KPK substratov

Vrednost KPK substratov potrebujemo za izračun ustreznih obremenitev mikrobne biomase, kajti v nasprotnem primeru lahko visoka obremenitev biomase vodi do previsokega tlaka bioplina v steklenici OxiTop®. Previsokega tlaka (izven merilnega območja sistema OxiTop®) ne moremo izmeriti.

Za substrate 1, 2 in 3 smo izmerili KPK vrednosti

- Substrat 1: 1 l odpadne pivovarske vode
- Substrat 2: 1 l odpadne pivovarske vode + 3,7 ml hidroliziranega kvasa
- Substrat 3: 1 l odpadne pivovarske vode + 3,7 ml nehidroliziranega kvasa

V več paralelkah smo odpipetirali 500 µl vsakega substrata in ga dodali reagentom za KPK iz testnega seta LCK 014 v merilnem območju 1000 – 10000 mg KPK/ l O₂ (Hach Lange GMBH). Testne mešanice smo segrevali 2 h pri 148 °C v grelni komori tipa LT 200 (Hach Lange GMBH). Nato smo jih prestavili v spektrofotometer DR 2800 (Hach Lange GMBH), ki je izmerila vrednosti KPK posameznih vzorcev. Vrednosti KPK substrata 1, 2 in 3 so povprečja dveh paralelnih ponovitev.

3.2.2.5 Izračun obremenitve mikrobne biomase v testu BMP

Na liter testne mešanice dodamo 2 g OS mikrobne biomase (ISO 11734: 1995). Naš poskus smo izvedli z 0,5 l testne mešanice na steklenico, kar pomeni v posamezni steklenici 1 g OS biomase. Obremenitev biomase s substratom je bila 0,2 g KPK/g OS. Dodali smo 0,2 g KPK substratov. Glede na izmerjen KPK smo izračunali volumne testnih substratov 1, 2 in 3, ki jih je bilo potrebno dodati v različne testne mešanice pri predvideni obremenitvi biomase.

3.2.2.6 Obremenitev biomase z glukozo v testnih steklenicah za pozitivno kontrolo

Enem gramu glukoze ustreza 1070 mg KPK. Iz tega sledi, da pri obremenitvi 200 mg KPK/1 g OS v steklenice s pozitivnimi kontrolami dodamo 0,187 g glukoze.

3.2.3 Izvedba testa BMP

3.2.3.1 Priprava anaerobne vode (prepihovanje z dušikom)

Pred izvedbo testa BMP smo pripravili vodo, iz katere smo izrinili kisik, da smo zagotovili anaerobne pogoje. Vodo smo segrevali do vretja in dodatnih pet minut prepihovali s kisika prostim dušikovim plinom in nato plinotesno zaprli.

3.2.3.2 Priprava fosfatnega pufra

Fosfatni pufer vsebuje mešanico dveh raztopin. Raztopino 1 pripravimo tako, da 22,53 g KH_2PO_4 raztopimo v 500 ml vode. Raztopino 2 pa pripravimo tako, da 48,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 500 ml deionizirane vode. Raztopino 1 in raztopino 2 zmešamo in do uporabe shranimo v hladilniku.

3.2.3.3 Sestava testnih mešanic

Volumen celotne testne mešanice v testu BMP je znašal 500 ml na testno steklenico. Iz vrednosti SS, OS biomase ter KPK substrata smo izračunali volumne biomase in volumne testnih substratov v testnih mešanicah. Volumen dodanega fosfatnega pufra na testno steklenico je bil konstanten, in sicer 20 ml. Do končnega volumna testne mešanice (500 ml) pa smo dodali anaerobno vodo. Merili smo metanski potencial v treh testnih mešanicah. Na enak način smo sočasno z vzorci v testu BMP pripravili tudi negativno kontrolo (brez dodanega substrata) in pozitivno kontrolo z dodano glukozo pri enaki obremenitvi.

3.2.3.4 Polnjenje testnih steklenic

Steklenice smo v digestoriju polnili z ustrezno količino mikrobne biomase, substrata, puferske raztopine in vode ob prepihavanju z dušikovim plinom. Nato smo na steklenico namestili merilno glavo in zatesnili en stranski vrat, medtem ko smo na drugem stranskem vratu steklenico še naprej prepihovali z dušikovim plinom, da smo zagotovili anaerobne pogoje. Po petnajst minutnem prepihovanju smo zatesnili še drugi stranski vrat, vsebino steklenic dobro premešali in iz vsake steklenice odlili po 50 ml v označene serumske stekleničke ter jih shranili pri 4°C v hladilniku. Vsebinske serumskih stekleniček smo uporabili za meritev pH, KPK mešanic in etrsko ekstrakcijo hlapnih maščobnih kislin na

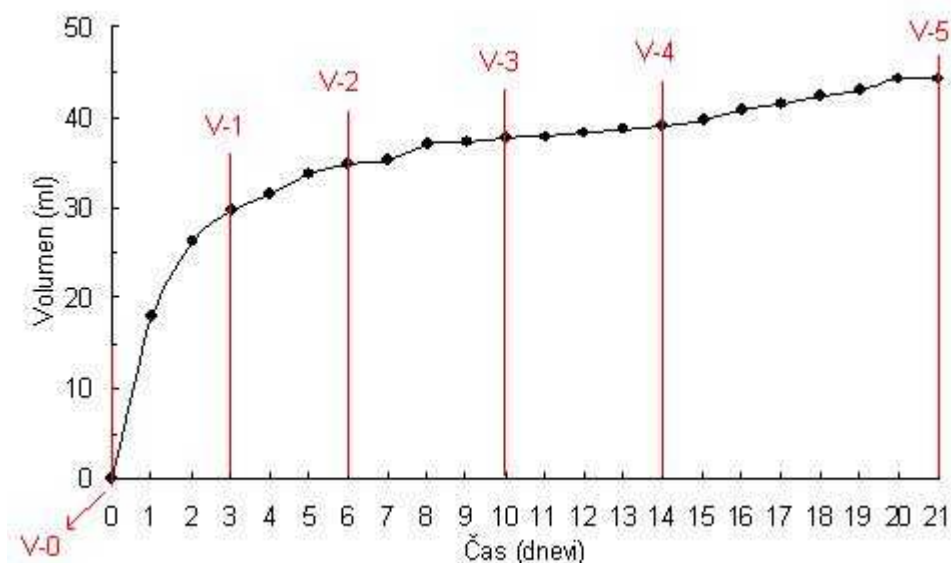
začetku poskusa. Vse steklenice smo potem istočasno prenesli na magnetna mešala v termostatirno komoro pri temperaturi 37°C. Poskus je trajal 21 dni. Naraščanje tlaka bioplina smo odčitali in spremljali s kontrolnim modulom OC 110.

3.2.4 Potek poskusa BMP

Test biometanskega potenciala (test BMP) smo izvedli na dva načina:

- test BMP 1
- test BMP 2

V testu BMP 1 smo testirali 35 vzorcev testnih mešanic v sedmih paralelkah za vsak vzorec. Testno mešanico smo med poskusom vzorčili šestkrat. Shema vzorčenja prikazuje slika 8. Na dan vzorčenja smo izbrali pet testnih steklenic iz vsake paralelke, izmerili sestavo bioplina in opravili preostale analize. Vrsto opravljenih analiz na odvzetih vzorcih prikazuje preglednica 2.



Slika 8: Shema vzorčenja v prvem poskusu

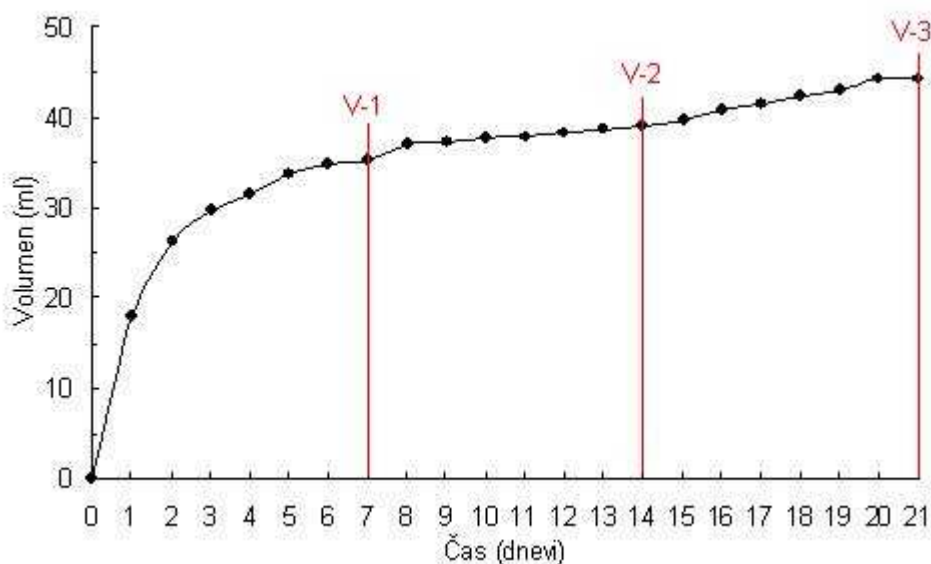
V₀ – prvi dan vzorčenja, V₁-V₄ – tretji, šesti, deseti, štirinajsti dan vzorčenja, V₅ – enaindvajseti dan vzorčenja, KPK – kemijska potreba po kisiku, GC-FID – plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem, GC – TCD – plinski kromatograf z detektorjem na toplotno prevodnost

Preglednica 2: Opravljene analize na dan vzorčenja za poskus BMP 1

V ₀	V ₁ -V ₄	V ₅
KPK		KPK
Hlapne maščobne kisline (GC-FID)	Hlapne maščobne kisline (GC-FID)	Hlapne maščobne kisline (GC-FID)
Sestava bioplina (GC-TCD)	Sestava bioplina (GC-TCD)	Sestava bioplina (GC-TCD)
Ph	pH	pH

V₀ – prvi dan vzorčenja, V₁-V₄ – tretji, šesti, deseti, štirinajsti dan vzorčenja, V₅ – enaindvajseti dan vzorčenja, KPK – kemijska potreba po kisiku, GC-FID – plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem, GC – TCD – plinski kromatograf z detektorjem na toplotno prevodnost

Pri drugem načinu izvedbe poskusa (BMP 2) smo testirali 25 vzorcev testnih mešanic v petih paralelkah za vsak vzorec. Testno mešanico smo vzorčili tri-krat. S hemo vzorčenja prikazuje slika 9. Na dan vzorčenja smo izbrali pet testnih steklenic iz vsake paralele, izmerili sestavo bioplina in opravili preostale analize. Vrsto opravljenih analiz pri odvzetih vzorcih prikazuje preglednica 3. Poleg tega smo ob prvem vzorčenju izbrali pet vzorcev z najvišjim tlakom iz vsake paralele in med celotnim poskusom spremljali še natančneje naraščanje tlaka bioplina in njegovo sestavo.



Slika 9: Shema vzorčenja v drugem poskusu

V₁ – vzorčenje na sedmi dan, V₂ – vzorčenje na štirinajsti dan, V₃ – vzorčenje na enaindvajseti dan, KPK – kemijska potreba po kisiku, GC-FID – plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem, GC – TCD – plinski kromatograf z detektorjem na toplotno prevodnost

Preglednica 3: Opravljene analize na dan vzorčenja za poskus BMP 2

V ₁	V ₂	V ₃
KPK		KPK
Hlapne maščobne kisline (GC-FID)	Hlapne maščobne kisline (GC-FID)	Hlapne maščobne kisline (GC-FID)
Sestava bioplina (GC-TCD)	Sestava bioplina (GC-TCD)	Sestava bioplina (GC-TCD)
pH	pH	pH

V₁ – vzorčenje na sedmi dan, V₂ – vzorčenje na štirinajsti dan, V₃ – vzorčenje na enaindvajseti dan, KPK – kemijska potreba po kisiku, GC-FID – plinski kromatograf s plamensko ionizacijskim detektorjem, GC – TCD – plinski kromatograf z detektorjem na toplotno prevodnost

3.2.5 Spremljanje poskusnih parametrov v testih BMP 1 in BMP 2

3.2.5.1 Spremljanje naraščanja tlaka bioplina in izračun količine proizvedenega bioplina

V testu BMP smo spremljali naraščanje tlaka bioplina v testnih steklenicah. Privite glave OxiTop (System OxiTop) so v urnem intervalu merile tlak v testnih steklenicah. Po končanem poskusu smo s kontrolnim modulom prenesli podatke v program Excel. Volumen bioplina pri normalnih pogojih smo izračunali po splošni plinski enačbi (3). Z odštevanjem volumna bioplina pri negativni kontroli vzorca od volumna bioplina pri testnih steklenicah, smo dobili volumen bioplina, ki je nastal zaradi dodanega substrata.

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

- P₀ - tlak pri normalnih pogojih (101,3 kPa)
- V₀ - volumen plina pri normalnih pogojih
- T₀ - temperatura pri normalnih pogojih (273 K)
- P_x - najvišji doseženi tlak iz testa BMP (v hPa), ki mu je vrednost tlaka bioplina negativne kontrole že odšteta
- V_x - volumen praznega prostora v steklenici, kjer od celotnega volumna steklenice ml odštejemo 450 ml tekočine in dobimo, da je V_x enak 750 ml
- T_x - temperatura inkubacije (310 K)

3.2.5.2 pH reakcijskih mešanic

Na začetku in na koncu testa BMP smo merili pH vrednost testnih mešanic s pH – metrom Orion 520 A.

3.2.5.3 Analiza sestave proizvedenega bioplina

Med testom BMP smo spremljali spreminjanje sestave plinov v reakcijskih steklenicah: odstotni delež (%) metana, dušika in ogljikovega dioksida v skupnem plinu smo analizirali s plinsko kromatografijo na plinskem kromatografu Shimadzu, GC-14A, opremljenim z detektorjem na toplotno prevodnost (TCD) (Marinšek Logar, 1992).

Na dan vzorčenja smo testnim mešanicam s plinsko kromatografijo določili odstotno sestavo plinov in nato izračunali volumen posameznih plinov v bioplenu. Zanimal nas je predvsem volumen CH_4 in CO_2 .

Pline smo ločevali na 4 m dolgi jekleni koloni z notranjim premerom $\frac{1}{4}$ inče, polnjeni s polnilom PORAPAK Q. Kot mobilno fazo (nosilni plin) smo uporabljali helij. Temperatura injektorja in kolone je bila 30°C ter detektorja 80°C . Kalibracijska plinska mešanica je vsebovala: 15,3 % vodika (H_2), 19,9 % dušika (N_2), 20,3 % metana (CH_4) in 44,5 % ogljikovega dioksida (CO_2). V injektor smo injicirali 50 μl vzorca. Kromatografske signale smo vrednotili z integratorjem Chromatopack CR-4A (Shimadzu) z metodo absolutne kalibracije (Marinšek Logar, 1992).

3.2.5.4 Etrska ekstrakcija hlapnih maščobnih kislin (HMK)

Za analizo koncentracij HMK smo pri vsakem vzorčenju odvzeli 3 ml testne mešanice. Vzorcem smo znižali pH vrednost na $\text{pH} = 2$ s 50% H_2SO_4 . V epruvete HACH smo dodali 0,4 g sušenega NaCl in 1 ml vzorca. V vsako epruveto smo dodali 100 μl internega standarda (krotonska kislina) in 200 μl 50 % H_2SO_4 . Dodali smo 1 ml etra in epruvete 20-krat stresali gor – dol. Sledilo je centrifugiranje mešanic, dokler centrifuga ni dosegla 2000 obratov. Potem smo zgornjo etrsko fazo ekstrakta prenesli s Pasterjevo pipeto v druge HACH epruvete. K preostali vodni fazi smo ponovno dodali po 1 ml etra in 20-krat stresali gor – dol, ponovno centrifugirali in s Pasterjevo pipeto odvzeli zgornjo etrsko fazo in jo združili s prvo. Dodali smo še 2 mali spatuli CaCl in dobro zatesnili epruvete (Holdeman

in sod., 1977). Istočasno smo ekstrahirali tudi standardno mešanico HMK za kvalitativno in kvantitativno umeritev plinskega kromatografa.

3.2.5.5 Analiza hlapnih maščobnih kislin (HMK)

Koncentracije hlapnih maščobnih kislin smo določili na plinskem kromatografu Hewlett Packard 5890 A, s plamenskoionizacijskim detektorjem. Temperatura detektorja je bila 290°C. Kapilarno kolono NUKOL, 30 m X 0,25 mm X 0,25 µm, Supelco, smo ogrevali po temperaturnem programu: $T_{\text{začetna}} = 75^{\circ}\text{C}$, zadrževalni čas = 3,5 min, $T_{\text{končna}} = 160^{\circ}\text{C}$, končni zadrževalni čas = 3 min in hitrost dogorevanja = 14 C/min. Nosilni plin je bil argon s pretokom 2 ml/min, detekcijska plina pa vodik (30 ml/min) in zrak (300 ml/min). Vbrizgali smo 1 µl etrskega izvlečka v split postopku 30:1. Uporabili smo tehniko internega standarda. Kot interni standard smo uporabili krotonsko kislino. Kalibracijska raztopina HMK je vsebovala: 0,581 g/l očetne kisline, 0,515 g/l propionske kisline, 0,478 g/l izo-maslene, 0,480 g/l n-maslene, 0,457 g/l izo-valerjanske, 0,458 g/l n - valerjanske, 0,462 g/l n-kaprnske in 1 g/l krotonske kisline.

3.2.5.6 Celokupna produkcija metana

Celokupna produkcija metana je končni volumen nastalega metana na koncu testa BMP, v našem primeru na 21. dan poskusa. Izračunamo ga kot končni volumen bioplina pri normalnih pogojih iz splošne plinske enačbe (3).

3.2.5.7 Bioplinski potencial

Bioplinski potencial smo izračunali kot kvocient volumna nastalega bioplina in KPK dodanega substrata (m^3/kg KPK substrata). Pri tem smo upoštevali končni volumen produciranega plina pri normalnih pogojih.

3.2.5.8 Izplen metana

Izplen metana smo izračunali kot razmerje med pričakovano izračunano produkcijo metana iz 1 kg razgrajenega KPK in dejansko izmerjeno produkcijo metana iz 1 kg KPK v testu BMP. Izračunana vrednost predpostavlja, da je iz 1 kg popolnoma razgrajenega KPK mogoče pridobiti 0,35 m^3 metana pri standardnih plinskih pogojih (STP) (Michaud in sod., 2002).

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PREDPRIPRAVE POSKUSA

4.1.1 KPK substratov

V obeh primerih (BMP 1 in BMP 2) je dodatek kvasa (hidroliziranega ali nehidroliziranega) povečal vrednost KPK odpadne pivovarske vode. KPK vrednosti testiranih substratnih mešanic so prikazane v preglednici 4.

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	3062,00	2973,30
Substrat 2	4095,33	4016,00
Substrat 3	3172,17	4226,67

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 s hidroliziranim kvasom, substrat 3 – odpadna pivovarska voda z nehidroliziranim kvasom

4.1.2 Suha (SS) in organska snov (OS) mikrobne biomase

Suho in organsko snov biomase smo pri obeh poskusih (BMP 1, BMP 2) izračunali z enačbo 1 in enačbo 2. Njihove povprečne koncentracije so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: Povprečne vrednosti suhe in organske snovi biomase v poskusih BMP1 in BMP 2

	Suha snov (SS) (g/l)	Organska snov (OS) (g/l)
BMP 1	30,03	23,07
BMP 2	43,70	21,13

4.1.3 Sestava testnih mešanic

Vsi vzorci v prvem poskusu so vsebovali 40 ml biomase, v drugem poskusu pa 47 ml biomase. Količina fosfatnega pufra je bila konstantno 20 ml za vse vzorce pri obeh poskusih. Volumne dodanih substratov in celotno sestavo testnih mešanic za BMP 1 prikazuje preglednica 6, za BMP 2 pa preglednica 7.

Preglednica 6: Sestava testnih mešanic za BMP 1

	Negativna kontrola	Pozitivna kontrola	Substrat 1	Substrat 2	Substrat 3
Biomasa (ml)	40	40	40	40	40
Glukoza (mg)	0	187	0	0	0
Substrat1 (ml)			65		
Substrat2 (ml)				50	
Substrat3 (ml)					62
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

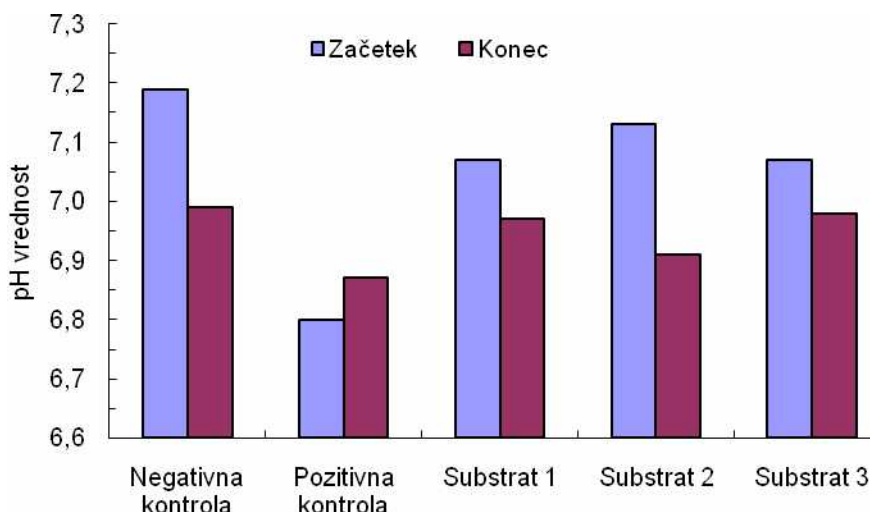
Preglednica 7: Sestava testnih mešanic za BMP2

	Negativna kontrola	Pozitivna kontrola	Substrat 1	Substrat 2	Substrat 3
Biomasa(ml)	47	47	47	47	47
Glukoza (mg)	0	180	0	0	0
Substrat1 (ml)			65		
Substrat2 (ml)				50	
Substrat3 (ml)					50
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

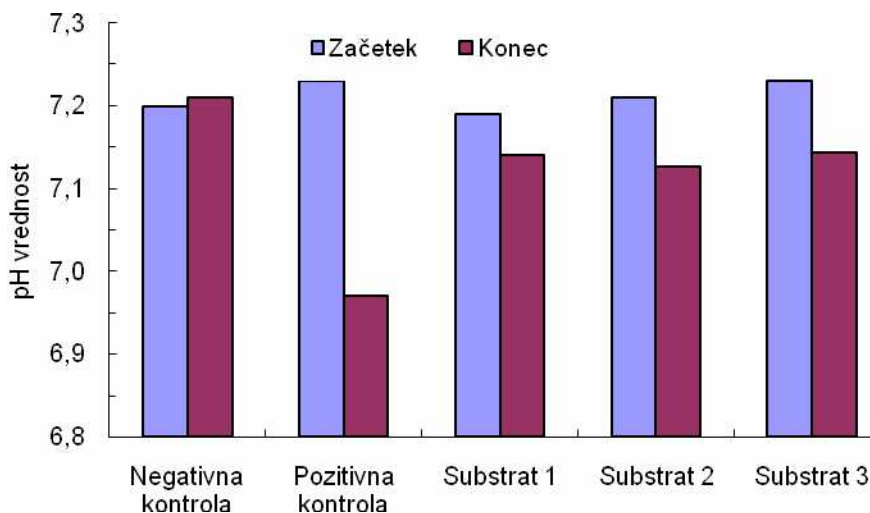
4.2 REZULTATI TESTOV BMP 1 IN BMP 2

4.2.1 Vrednost pH testnih mešanic

Začetne in končne pH vrednosti za poskusa BMP 1 in BMP 2 so prikazane na slikah 10 in 11. Začetna vrednost pH vzorcev je bila v obeh testih izenačena, razen pri pozitivni kontroli v prvem poskusu, kjer meritve odstopajo zaradi možne analitske napake. Začetna povprečna vrednost pH testnih mešanic je bila v prvem testu 7,1 in v drugem testu 7,2. Med inkubacijo so se vse vrednosti pH znižale, in sicer za 0,2 v prvem testu in 0,1 v drugem testu.



Slika 10: pH na začetku in na koncu inkubacije prvega poskusa



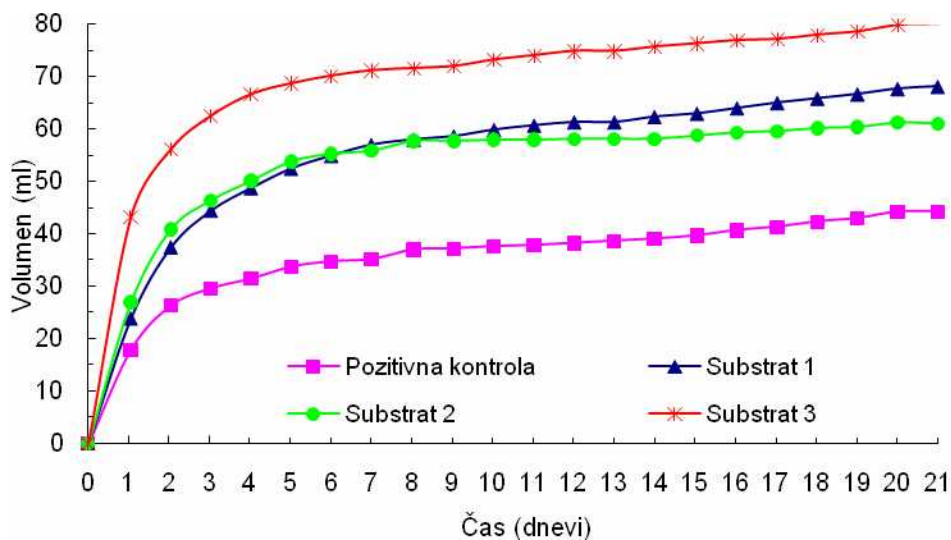
Slika 11: pH na začetku in na koncu inkubacije drugega poskusa

Vse vrednosti pH vzorcev prvega in drugega poskusa so v zgornji polovici pH optimuma za metanogeni proces (pH nad 7), (Deublein in Steinhauser, 2008).

4.2.2 Proizvodnja bioplina med testom BMP 1 in BMP 2

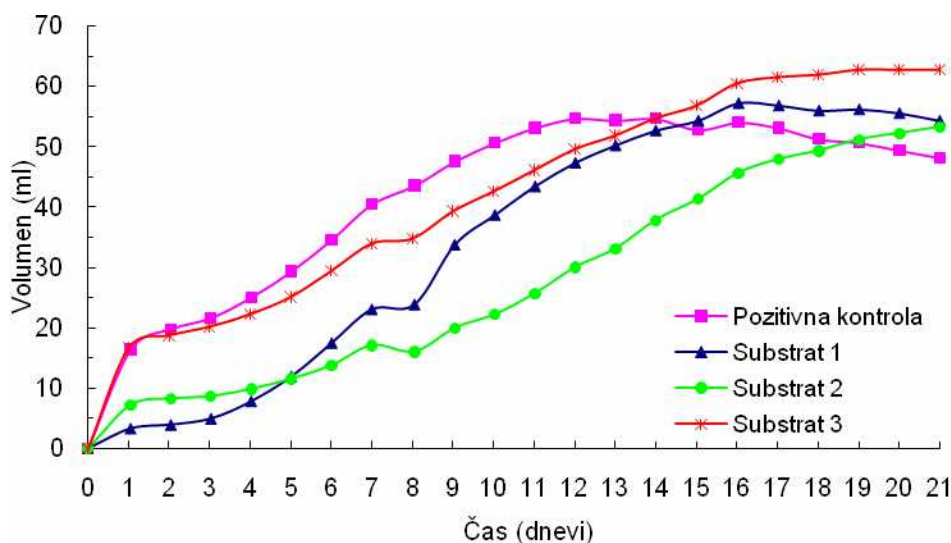
Med testom BMP 1 je volumen bioplina naraščal pri vseh vzorcih (slika 12). Največ bioplina je nastalo iz substrata z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3), najmanj pa pri pozitivni kontroli. Volumen bioplina pri vzorcu odpadne vode z dodanim nehidroliziranim kvasom že po prvem dnevu doseže 54 % celotnega volumna bioplina. Celokupna produkcija bioplina za vzorec z dodanim nehidroliziranim kvasom znaša 80 ml.

Naraščanje volumna nastalega bioplina ima podobno dinamiko pri vzorcu pivovarske odpadne vode (substrat 1) in pri vzorcu pivovarske odpadne vode, ki ji je dodan hidroliziran kvas (substrat 2). Končna (celokupna) produkcija bioplina iz vzorca odpadne vode je 68 ml in 62 ml pri vzorcu z dodanim hidroliziranim kvasom.



Slika 12: Proizvodnja bioplina v odvisnosti od časa za posamezni vzorec med testom BMP1

V poskusu BMP 2 je bioplinska produkcija naraščala pri vseh vzorcih (slika 13), le da je bil trend naraščanja počasnejši kot v poskusu BMP 1. Prav tako kot v poskusu BMP 1 smo tudi tu največjo celokupno produkcijo bioplina zabeležili pri vzorcu odpadne pivovarske vode, ki ji je bil dodan hidroliziran kvas (substrat 3), in sicer 62 ml. Kumulativni produkciji bioplina pri substratu 1 in 2 sta izenačeni (54 ml).

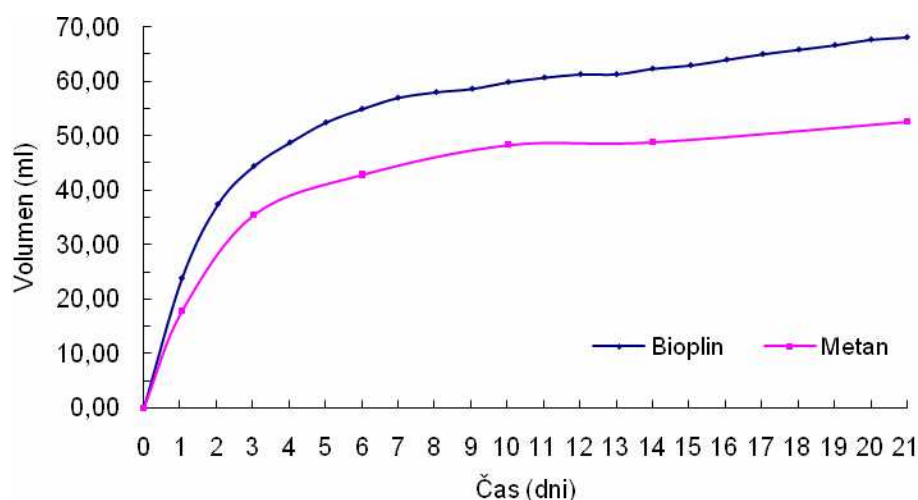


Slika 13: Proizvodnja bioplina v odvisnosti od časa za posamezni vzorec med testom BMP 2

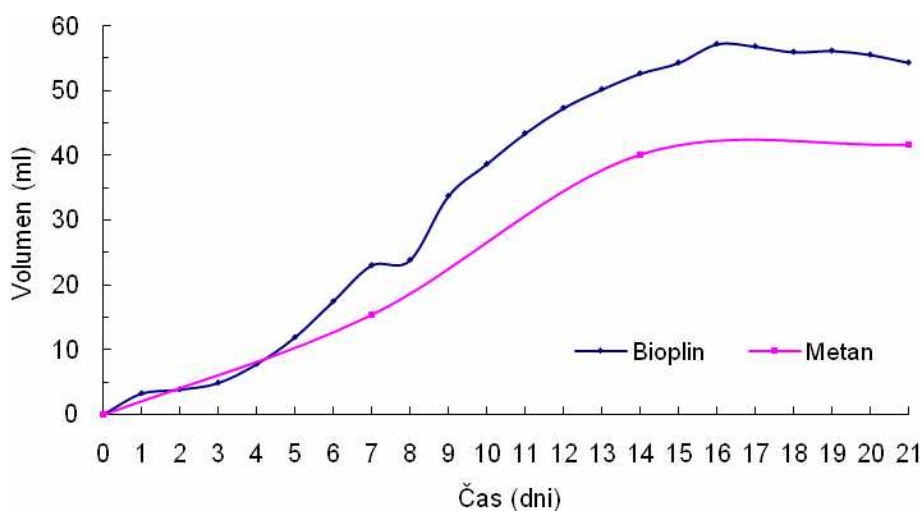
4.2.3 Proizvodnja bioplina in metana iz posameznih substratov

4.2.3.1 Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode (substrat 1)

V poskusu BMP 1 smo po metanogeni razgradnji odpadne pivovarske vode pridobili 68 ml bioplina, od tega je bilo 53 ml metana, kar pomeni 77 % metana v skupnem bioplinu. V poskusu BMP 2 pa je proizvodnja bioplina in s tem tudi metana naraščala počasneje, dosegla je manjše končne vrednosti : 54 ml bioplina, 42 ml metana, kar je 76 %.



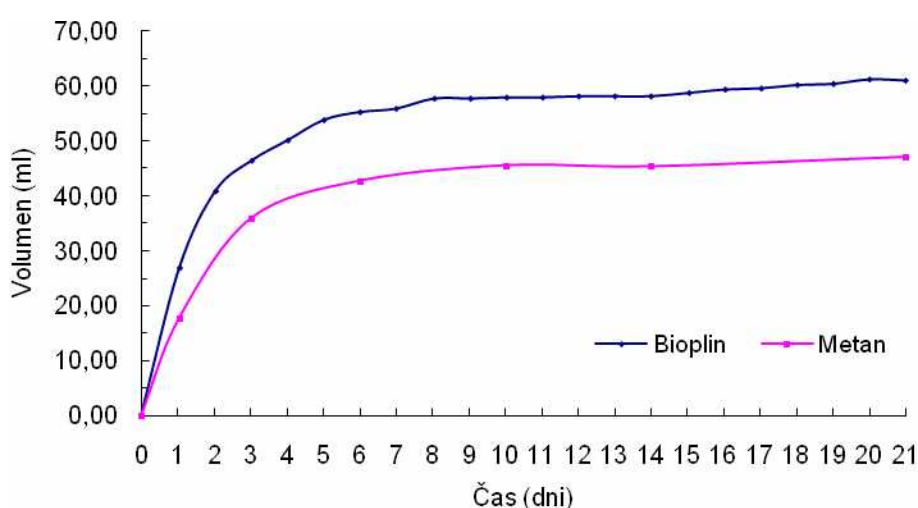
Slika 14: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo v poskusu BMP 1



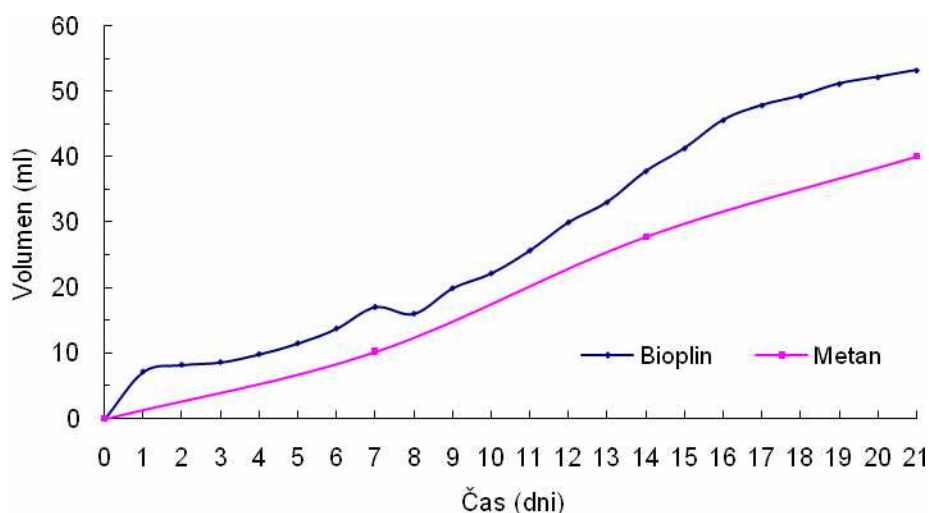
Slika 15: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo v poskusu BMP 2

4.2.3.2 Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2)

V poskusu BMP 1 smo po metanogeni razgradnji odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom pridobili 61 ml bioplina, od tega je bilo 47 ml metana, kar pomeni 77 % metana v skupnem bioplinu. V poskusu BMP 2 pa je proizvodnja bioplina in s tem tudi metana naraščala počasneje in je dosegla manjše končne vrednosti : 53 ml bioplina, 40 ml metana, kar je 76 %.



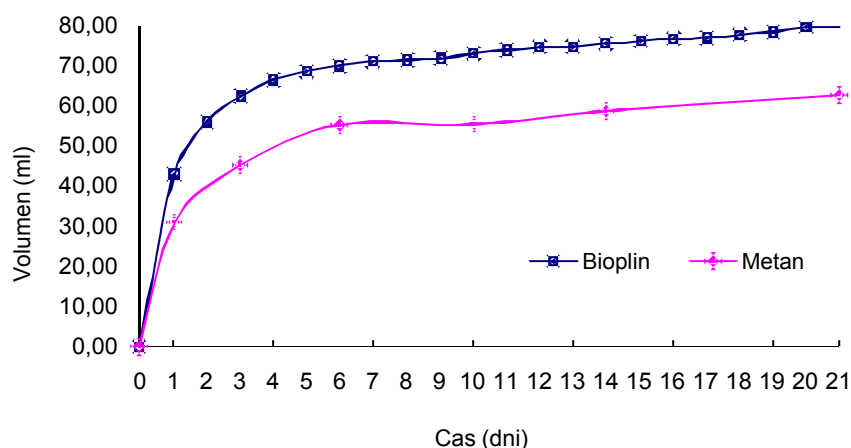
Slika 16: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim hidroliziranim kvasom v poskusu BMP 1



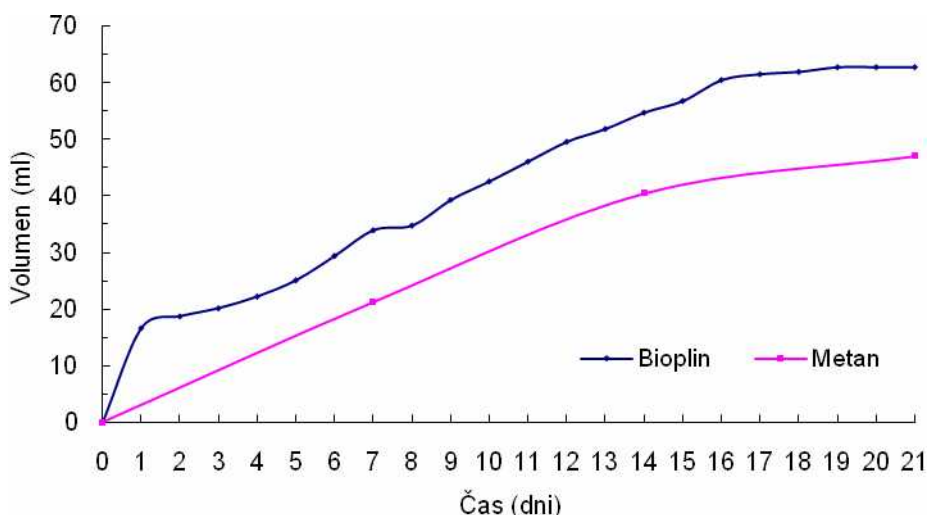
Slika 17: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim hidroliziranim kvasom v poskusu BMP 2

4.2.3.3 Proizvodnja bioplina in metana iz odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3)

V poskusu BMP 1 smo po metanogeni razgradnji odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom pridobili največje vrednosti bioplina v primerjavi z vzorci odpadne pivovarske vode (substrat 1) in vzorci odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2), in sicer 80 ml bioplina, od tega je bilo 63 ml metana, kar pomeni 79 % metana v skupnem bioplinu. V poskusu BMP 2 pa je proizvodnja bioplina in s tem tudi metana naraščala počasneje ter je dosegla manjše končne vrednosti: 63 ml bioplina, 47 ml metana, kar je 75 %.



Slika 18: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim nehidroliziranim kvasom v poskusu BMP 1



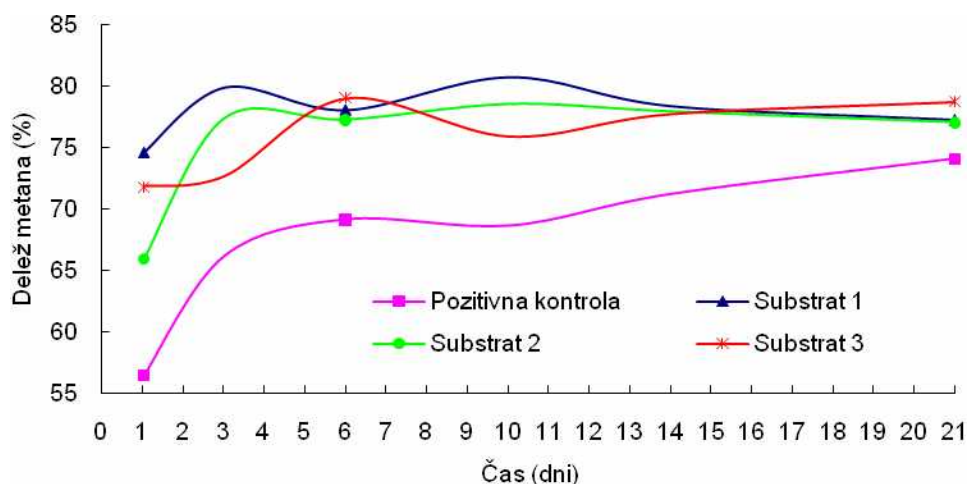
Slika 19: Proizvodnja bioplina in metana v odvisnosti od časa za odpadno pivovarsko vodo z dodanim nehidroliziranim kvasom v poskusu BMP 2

4.2.4 Delež metana v bioplinu med poskus BMP 1 in BMP 2

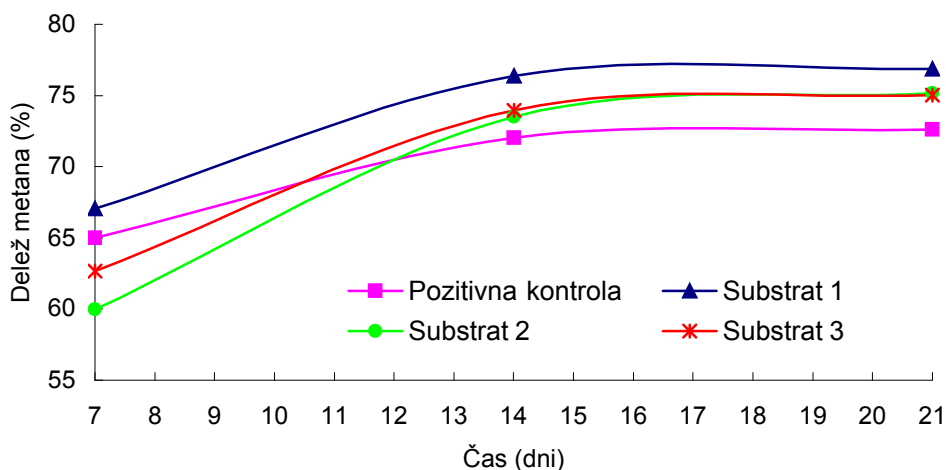
Delež metana v bioplinu je naraščal pri vseh testiranih vzorcih v poskusih BMP 1 in BMP 2 (slika 20, slika 21). Največjo proizvodnjo metana v testu BMP 1 smo ugotovili v vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3), in sicer 79 % ali 63 ml, najmanjšo proizvodnjo metana pa v vzorcih pozitivne kontrole, in sicer 74 % ali 33 ml. Delež metana v vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim

hidroliziranim kvasom (substrat 2) in v vzorcih odpadne pivovarske vode (substrat 1) je znašal: 77 % ali 47 ml in 77 % ali 36 ml.

Največjo proizvodnjo metana v bioplinu testa BMP 2 smo ugotovili v vzorcih odpadne pivovarske vode (substrat 1), in sicer 77 % ali 42 ml, sledita deleža metana v vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3) in hidroliziranim kvasom (substrat 2). Najmanjšo proizvodnjo metana pa so zagotovili vzorci pozitivne kontrole, in sicer 73 % ali 35 ml.



Slika 20: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 1

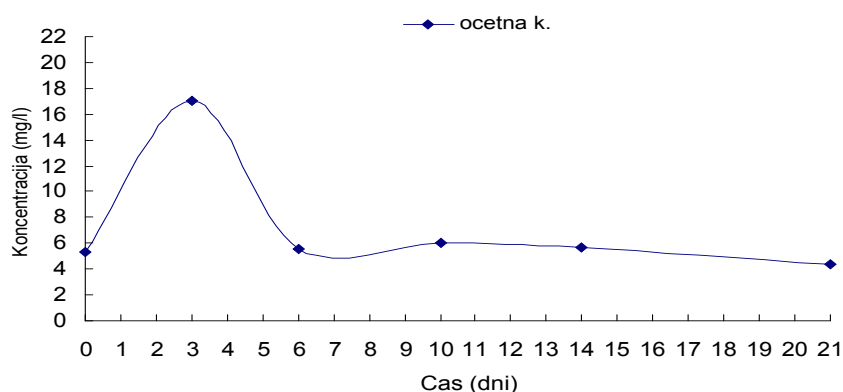


Slika 21: Delež metana v odvisnosti od časa za posamezni vzorec v poskusu BMP 2

4.2.5 Koncentracije hlapnih maščobnih kislin (HMK) v testnih mešanicah poskusov BMP 1 in BMP 2

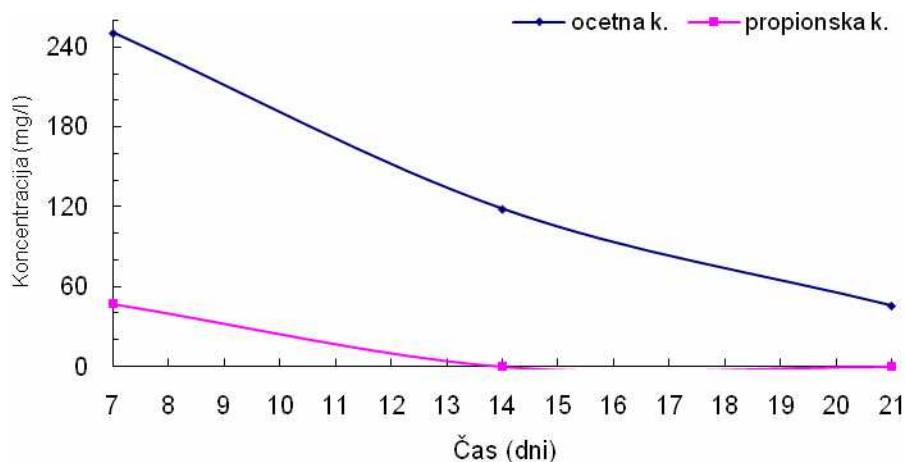
4.2.5.1 Pozitivna kontrola

V testu BMP 1 je koncentracija očetne kisline dosegla pri vzorcih pozitivne kontrole po treh dneh inkubacije maksimum (slika 22), in sicer 16 mg/l (0,27 mM). Potem je začela upadati, a se do konca poskusa koncentracija ni zmanjšala pod 4 mg/l. Koncentracija ostalih kislin je bila med celotnim testom BMP majhna in ni presegla 0,64 mg/l za posamezno kislino.



Slika 22 : Koncentracija očetne kisline v testni mešanici med poskusom BMP 1 v pozitivni kontroli

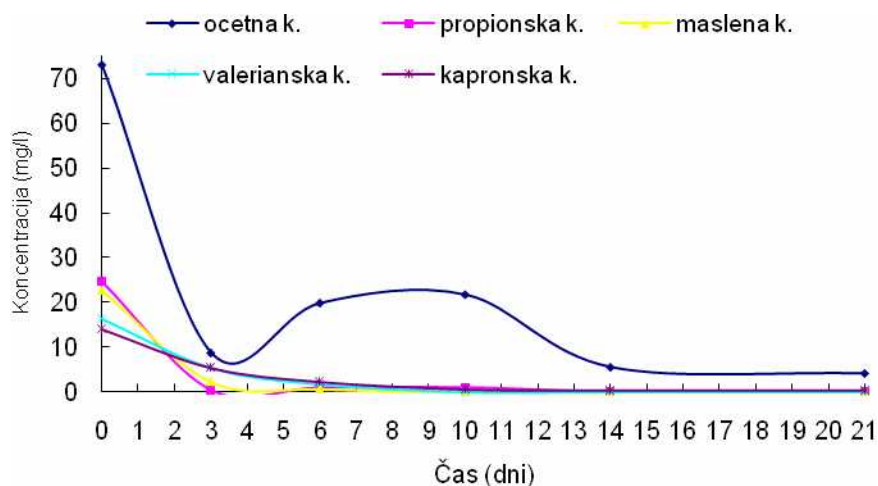
V testu BMP 2 je koncentracija očetne kisline pri pozitivni kontroli dosegla maksimum po sedmih dneh inkubacije (slika 23), in sicer 240 mg/l. Potem je začela upadati, a se do konca poskusa koncentracija ni zmanjšala pod 46 mg/l. Koncentracija propionske kisline je upadla od 7. dne dalje (47 mg/l) in se je popolnoma porabila do 14. dne.



Slika 23: Koncentracija ocetne in propionske kisline v testni mešanici med poskusom BMP 2 v pozitivni kontroli

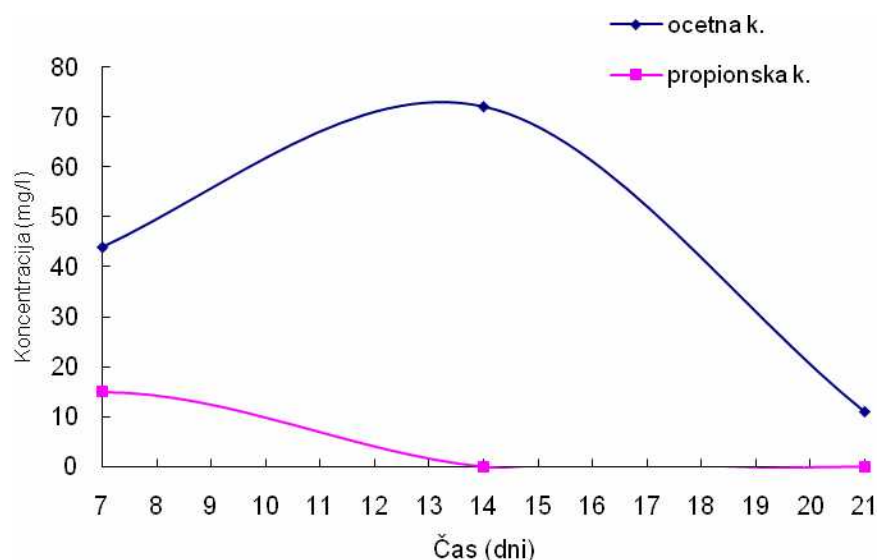
4.2.5.2 Odpadna pivovarska voda (substrat 1)

Na začetku inkubacije so bile v odpadni vodi prisotne različne hlapne maščobne kisline (slika 24). Najvišjo vrednost je dosegla ocetna kislina, in sicer 70 mg/l (1,17 mM), nato propionska in maslena kislina s koncentracijo okoli 25 mg/l (0,42 mM). Najmanj je bilo valerianske (16 mg/l) in kapronske kisline (14 mg/l). Po treh dneh inkubacije smo zaznali upadanje koncentracije kislin razen ocetne kisline, ki se je ponovno akumulirala do 21 mg/l (0,35 mM) in se pretežno porabila do 14. dne. Do konca testa BMP se je koncentracija vseh kislin zmanjšala pod 10 mg/l.



Slika 24: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode med poskusom BMP 1

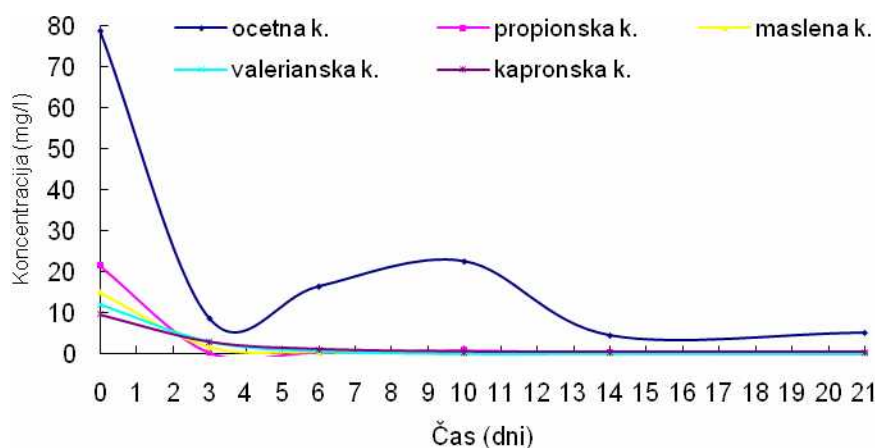
V poskusu BMP 2 je koncentracija ocetne kisline naraščala do 14. dne inkubacije, do konca testa pa upadla pod 11 mg/l. Propionske kisline je bilo malo (pod 15 mg/l) in se je popolnoma porabila do 14. dne.



Slika 25: Koncentracija ocetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode med poskusom BMP 2

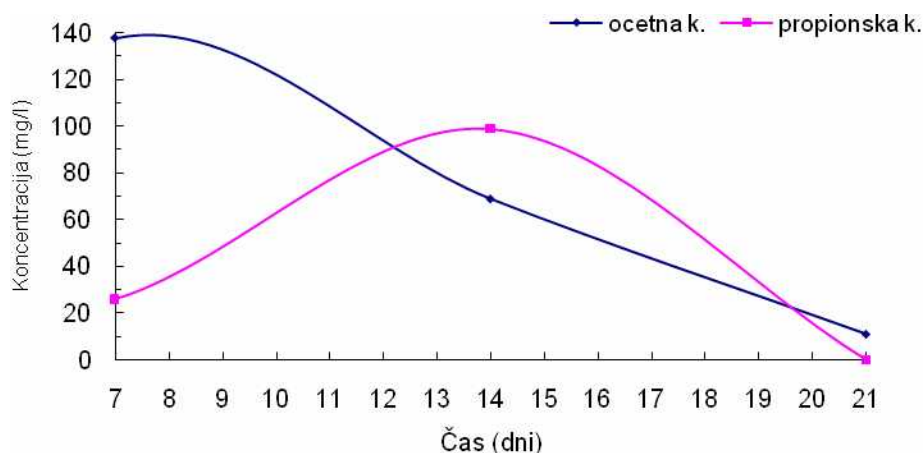
4.2.5.3 Odpadna pivovarska voda z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2)

V testu BMP 1 so bile ob začetku inkubacije prisotne različne hlapne maščobne kisline (slika 26). Najvišjo vrednost sta dosegli očetna kislina, in sicer 80 mg/l (1,33 mM) ter propionska kislina s koncentracijo 20 mg/l (0,33 mM). Po treh dneh inkubacije, ob drugem vzorčenju kislin, smo zaznali upadanje koncentracije kislin razen očetne kisline, ki se je ponovno akumulirala do 20 mg/l (0,33 mM) in se pretežno porabila do 14. dne. Do konca testa BMP 1 se je koncentracija vseh kislin zmanjšala pod 10 mg/l.



Slika 26: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom med poskusom BMP 1

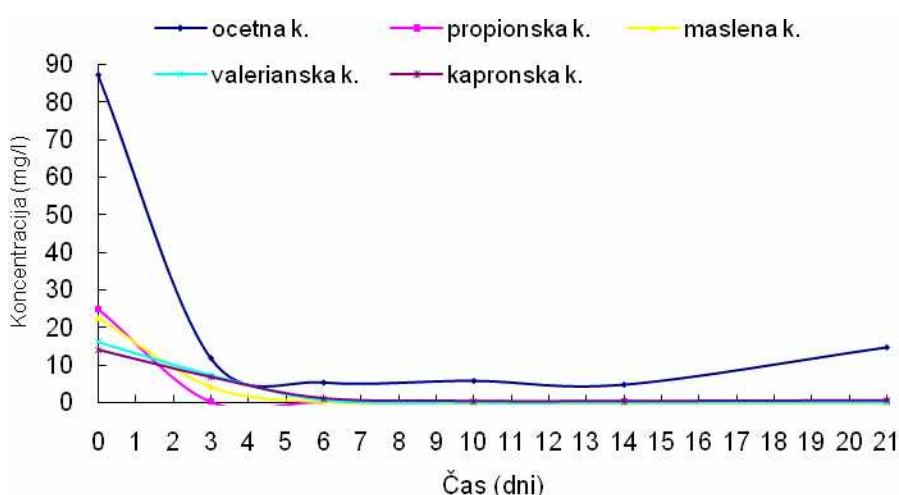
V poskusu BMP 2 se je koncentracija očetne kisline zmanjšala od 7. dne (140 mg/l) in do konca testa upadla pod 11 mg/l. Propionska kislina je naraščala do 14. dne inkubacije in se popolnoma porabila do konca testa (slika 27).



Slika 27: Koncentracija ocetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom med poskusom BMP 2

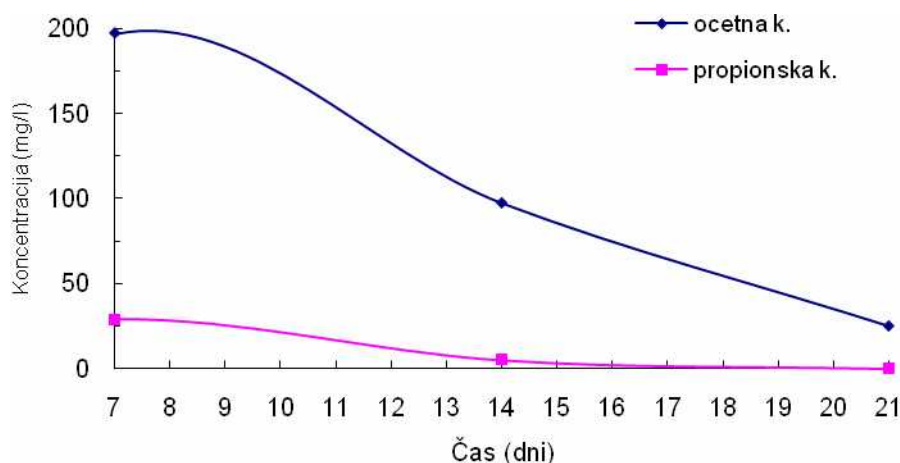
4.2.5.4 Odpadna pivovarska voda z dodanim nehidroliziranim kvasom

V testu BMP 1 so bile na začetku inkubacije prisotne različne hlapne maščobne kisline (slika 28). Najvišjo vrednost je dosegla ocetna kislina, in sicer okoli 90 mg/l, sledijo ji propionska kislina, maslena, valerianska in kapronska v nižji koncentraciji (med 15 in 35 mg/l). Do konca testa se je koncentracija zmanjšala, in sicer ocetne kisline pod 25 mg/l, druge kisline pa so se popolnoma porabile.



Slika 28: Koncentracija hlapnih maščobnih kislin v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom med poskusom BMP 1

V poskusu BMP 2 se je koncentracija očetne kisline zmanjševala od 7. dne inkubacije in do konca testa upadla pod 25 mg/l. Propionske kisline je bilo manj (pod 29 mg/l) in se je v večini porabila do 14. dne.



Slika 29: Koncentracija očetne in propionske kisline v testni mešanici odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom med poskusom BMP 2

4.2.6 Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in dejanski izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2

Izmerjeni parametri testa BMP (celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in dejanski izplen metana) so bili v testu BMP 1 večji kot v BMP 2. Vrednosti izmerjenih parametrov so prikazane v preglednici 8.

Največjo celokupno produkcijo metana v obeh testih so zagotovili vzorci odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3), in sicer 63 ml v BMP 1. Najmanjšo celokupno produkcijo metana v obeh poskusih pa smo dosegli iz vzorcev z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2), in sicer 47,1 ml v BMP 1.

Največji bioplinski potencial v obeh testih je dosegel vzorec odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3), in sicer 0,41 m³/kg KPK v BMP 1. Najnižjo vrednost bioplinskega potenciala je dosegla odpadna pivovarska voda z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2).

Največjo produkcijo metana iz 1 g dodanega KPK substrata smo dosegli pri vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom, in sicer 320,33 mg/g KPK v BMP 1. Najnižja vrednost produkcije metana je bila pri vzorcu odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2)

Izplen metana pri obeh testih BMP je bil najvišji pri vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom (substrat 3), in sicer 91,52% pri prvem poskusu. Najnižji izplen smo dobili pri vzorcih odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom (substrat 2).

Preglednica 8: Celokupna produkcija metana, bioplinski potencial, produkcija metana na 1 g dodanega KPK in dejanski izplen metana v testu BMP 1 in BMP 2

	Substrat 1	Substrat 2	Substrat 3
	BMP 1/BMP 2	BMP 1/BMP 2	BMP 1/BMP 2
Celokupna produkcija metana (ml)	52,62/ 41,76	47,10/ 40,05	63,00/ 47,08
Bioplinski potencial (m ³ /kg KPK)	0,34/ 0,28	0,30/ 0,27	0,41/ 0,30
Produkcija metana na 1 g dodanega KPK (ml/g KPK)	264,42/ 216,06	230,01/ 199,47	320,33/ 222,78
Dejanski izplen metana (%)	75,55/ 61,73	65,72/ 56,99	91,52/ 63,65

BMP 1 – prvi test biometanskega potenciala; BMP 2 – drugi test biometanskega potenciala, substrat 1 – odpadna pivovarska voda, substrat 2 – odpadna pivovarska voda z dodanim hidroliziranim kvasom, substrat 3 – odpadna pivovarska voda z dodanim nehidroliziranim kvasom

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Preučevali smo anaerobno metanogeno razgradnjo treh substratov iz pivovarniške industrije, in sicer odpadno pivovarsko vodo, pivovarski vodi dodan hidroliziran kvas in pivovarski vodi dodan nehidroliziran kvas. Kot proizvodno mikrobovno biomaso smo uporabili biomaso iz bioreaktorja UASB. S testom BMP smo ugotavljali produkcijo skupnega bioplina in metana in iz tega izračunali biometanski potencial (test BMP) odpadne pivovarske vode, odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom pri enih in z dodanim nehidroliziranim kvasom pri drugih vzorcih. Osnovno vprašanje je namreč bilo, kako dodajanje dveh oblik odpadnega pivovarskega kvasa odpadni pivovarski vodi vpliva na proizvodnjo bioplina in izplen metana.

Zaradi vse večjega spektra različnih odpadnih organskih substratov in njihovih mešanic na agroživilskem in komunalnem področju, obstaja interes proizvajalcev bioplina po čim bolj razgradljivih in izkoristljivih substratih, primernih za njihovo doziranje v anaerobne fermentorje. Pomen testa BMP je zato ključen za preizkušanje anaerobne biorazgradljivosti različnih substratov in različnih mešanic substratov na laboratorijskem nivoju. Rezultati, ki smo jih pridobili s testom BMP, so nujno potrebni za nadaljevanje raziskav na pilotnem nivoju in za realizacijo v končnih industrijskih procesih proizvodnje bioplina.

Pred začetkom testa BMP smo najprej analizirali osnovne kemijske in fizikalne lastnosti substratov in biomase. Podatki o KPK substratov in OS mikrobovne biomase so potrebni za primerno obremenitev mikrobovne biomase z različnimi substrati. Prevelika obremenitev biomase vodi do nastanka previsokega tlaka bioplina v steklenici Oxitop s substratom. Nastali tlak ni več v merljivem območju, zato merilne glave ne morejo ustrezno meriti. Nasprotno, nizka obremenitev biomase pomeni premajhno razliko v tlaku nastalega bioplina med negativno kontrolo vzorca in testno mešanico s substratom. V obeh naših poskusih (BMP1 in BMP2) smo uspeli zagotoviti ustrezno obremenitev. Testna mešanica je bila ustrezna ($0,2 \text{ g KPK}_{\text{substrata}}/\text{g OS biomase (ISO 11734)}$), saj smo v vseh primerih lahko ustrezno merili naraščanje tlaka ob proizvodnji bioplina v testnih steklenicah.

Sestava testnih mešanic (preglednica 6, preglednica 7) ni bila popolnoma enaka pri obeh poskusih BMP kljub temu, da smo uporabili enake substrate, enako biomaso in obremenitve v razmaku štirih tednov (hranjeno pri 4°C v hladilniku). V prvem poskusu so imele testne mešanice 40 ml biomase v drugem pa 47 ml biomase, zato ker je biomasa v testu BMP 1 vsebovala več organskih snovi kot v testu BMP 2. Metanogenih arhejskih agregatov in konglomeratov granularne oblike, večinoma sestavljenih iz čiste biomase nismo smeli homogenizirati, saj bi s tem uničili specifično strukturo mikrobne združbe, zato je bilo težko ponovljivo alikvotirati v obeh poskusih s pipetiranjem. Obremenitev s substratom 1 in substratom 2 je bila enaka v obeh poskusih (BMP 1, BMP 2), saj so si bile vrednosti KPK substratov zelo podobne (preglednica 4).

Ugotovili smo, da je vrednost pH vzorcev v prvem in drugem poskusu rahlo upadla od začetka do konca inkubacije, vendar se ni pomaknila v vrednosti pod 6,7, kar kaže na to, da je razgradnja organskih substratov potekala v optimalnih pogojih glede na pH.

Test BMP je v obeh poskusih pokazal najvišjo celokupno produkcijo metana iz odpadne pivovarske vode, ki ji je bil dodan nehidroliziran kvas (preglednica 8). V prvem poskusu smo dobili po 21. dnevni inkubaciji 63 ml metana, v drugem pa 47,08 ml metana. Vzorci z nehidroliziranim kvasom so se izkazali kot najbolj produktivni. Tudi pri izračunu bioplinskega potenciala (preglednica 8) se je kot najboljši dodatek izkazal nehidroliziran kvas. Največjo produkcijo metana iz 1 g dodanega KPK substrata smo dosegli v obeh poskusih pri vzorcih z nehidroliziranim kvasom, najmanjšo pa pri vzorcih s hidroliziranim kvasom (preglednica 8). Dejanski izplen metana pa je prav tako pripadal vzorcu z dodanim nehidroliziranim kvasom (preglednica 8).

Iz rezultatov je razvidno, da je dodatek nehidroliziranega kvasa dosegel najvišje vrednosti pri kumulativni produkciji metana, bioplinskem potencialu, produkciji metana na 1g dodanega KPK in dejanskem izplenu metana. Dodatek hidroliziraninega kvasa pa je dosegel najnižje vrednosti, vendar so bile le-te blizu vrednostim same odpadne vode, ki jo trenutno v pivovarni presnavljajo v reaktorju UASB. Iz tega lahko sklepamo, da dodatek hidroliziranega kvasa ne zavira anaerobnega procesa, ne doprinese pa tudi k višji produkciji metana.

Pred začetkom poskusa BMP smo predvidevali, da bo dodatek hidroliziranega kvasa bolj učinkovit v produkciji bioplina od dodatka nehidroliziranega kvasa, saj je hidroliziran kvas delno že razgrajen. Rezultati so pokazali nasprotno. Vzrok za manjšo učinkovitost hidroliziranega kvasa v primerjavi z nehidroliziranim kvasom je lahko višja koncentracija amoniaka v raztopini, saj se hidroliziran kvas zaradi predhodne obdelave na začetku inkubacije hitro razgradi in nastane več amoniaka, kot ga mikroorganizmi potrebujejo in porabljajo za rast. Posledica je njegovo kopičenje in posledično inhibitorni učinek na produkcijo bioplina. Ob zaključku poskusa smo zato naredili analizo vsebnosti amoniaka v raztopini za vzorec z dodanim hidroliziranim kvasom in z dodanim nehidroliziranim kvasom. Analiza ni pokazala večje koncentracije amoniaka pri vzorcu z dodanim hidroliziranim kvasom. Liu in Sung (2002) na splošno menita, da je koncentracija amoniaka pod 200 mg/l v korist anaerobnemu procesu. Pri naši analizi je bila koncentracija na koncu poskusa pod to vrednostjo. V povprečju je bilo amoniaka pri vzorcu z dodanim hidroliziranim kvasom 0,12 g/l in 0,13 g/l pri vzorcu z dodanim nehidroliziranim kvasom. Vrednost dušika je bila 0,19 g/l pri dodanem hidroliziranem kvasu in 0,42 g/l pri dodanem nehidroliziranem kvasu. Ne vemo pa, kakšna je bila koncentracija amoniaka med samim poskusom.

Test BMP smo izvedli na dva načina. Razlika je bila le v pogostosti merjenja hlapnih maščobnih kislin in sestave plina s plinskim kromatografom. Menimo, da med inkubacijo ni treba vzorčiti več kot tri-krat, če imamo v mešanici prisoten hitro razgradljiv substrat. Morali bi tudi razmisliti o krajši inkubacijski dobi. Ker so naši substrati hitro razgradljivi, se ključni procesi zgodijo v prvem in drugem tednu. Tretji teden je stabilen in morda nepotreben.

Za določanje biorazgradljivosti substrata v anaerobnih pogojih je bilo treba opravljati analize pred in po poteku poskusa BMP. Vrednosti KPK na začetku in na koncu poskusa ter % biorazgradljivosti nismo vključili med rezultate, saj izmerjeni rezultati niso bili smiselni (npr. biorazgradljivost večjo od 100% in na koncu poskusa imamo več snovi kot na začetku). KPK mešanic je bil pri vseh vzorcih na koncu poskusa večji kot na začetku. Vzrok temu so lahko suspendirani delci v vzorcu, ki motijo spektrofotometer med meritvijo absorbance pri testu KPK, zato smo na začetku in na koncu poskusa mešanice centrifugirali in izmerili poleg KPK mešanic tudi KPK supernatanta. Vrednost KPK

supernatanta je bila manjša v primerjavi s KPK mešanic, vendar še vedno večja od vrednosti KPK na začetku poskusa. Možna je tudi sledeča interpretacija: na začetku poskusa merimo skupaj KPK substrata in KPK biomase. Med inkubacijo mikroorganizmi razgrajujejo substrat in s tem manjšajo vrednost KPK substrata, istočasno pa se mikrobnna masa povečuje zaradi razmnoževanja mikroorganizmov, kar prispeva k povečanju KPK mešanice.

Razen tega občutljivost testa HACH Lange ni najboljša. HACH Lange test se sicer rutinsko uporablja v čistilnih napravah, vendar predvsem za testiranje vzorcev, ki nimajo veliko suspendiranih snovi. V našem poskusu pa smo imeli veliko suspendiranih delcev (biomasa), ki motijo meritve, zato test HACH Lange ni primeren. Če bi hoteli izvesti povsem natančno testiranje KPK z visoko občutljivostjo, bi morali uporabiti standardni postopek po Eatonu in sod. (1995).

Opravljenе analize hlapnih maščobnih kislin med testoma BMP so pokazale visoke začetne vrednosti očetne kisline, v primerjavi s krivuljo pozitivne kontrole, ki prikazuje dejanski proces akumuliranja in porabljanja očetne kisline (slika 22). Glede na to, da je glukoza lahko razgradljiv substrat, je bila koncentracija očetne kisline na začetku poskusa 5 mg/l, zato substrati 1, 2 in 3 ne bi smeli prekoračiti te začetne vrednosti. To dokazuje, da je proces anaerobne razgradnje in s tem tvorba očetne kisline potekal pri omenjenih substratih že pred samim poskusom. Odpadno pivovarsko vodo smo namreč nekaj dni pred izvedbo testa hranili v hladilniku. Očetno kislino so metanogene arheje postopoma porabile do konca testa, razen pri odpadni pivovarski vodi in pri odpadni pivovarski vodi z dodanim hidroliziranim kvasom, kjer smo opazili ponovno akumuliranje očetne kisline po treh dneh poskusa, vendar vrednost 21 mg/l (0,35 mM) ni inhibirala produkcije metana. To je v skladu z ugotovitvami Deubleina in Steinhauserja (2008), ki navajata, da se zaviralni učinek očetne kisline začne šele od 1000 mg/l dalje. Ugotavljamo torej, da v testu BMP očetna kislina ni zavirala procesa anaerobne razgradnje in s tem produkcije metana.

Podatkov o anaerobni metanogeni presnovi kvasa v bioplin še ni v tuji literaturi. Industrija se za presnavljanje kvasa v bioplin doslej ni odločala zaradi bojazni, da bi utegnil dodatek kvasa v reaktor inhibirati proizvodnjo bioplina, poleg tega pa tudi ni bilo te potrebe, saj se sušeni kvas odlično prodaja kot surovina za krmo živali in humano prehrano. Kvas je bogat vir vitaminov B skupine (vitamini B1, B2, B6, niacin, pantotenska kislina, folna kislina,

biotin) in beljakovin. Za vitamine B skupine je značilno, da se v organizmu živali ne morejo naložiti v obliki telesnih rezerv, zato je z njimi potrebna stalna in redna oskrba (Orešnik in Kermauner, 2009). Kod dodatek v humani prehrani pa pivski kvas ščiti pred številnimi boleznimi in med drugimi koristnimi učinki povečuje tudi vitalnost organizma z ugodnim delovanjem na možganske in živčne celice (Suhi pivski kvas, 2009).

Vendar pa velja opozoriti, da je proces predelave kvasa (sušenje) relativno energetsko zahteven in tako iz ekonomskega vidika problematičen za industrijo. Poleg tega nova okoljska zakonodaja uvaja in zahteva strogo kontrolo procesa sušenja kvasa, ki pivovarne obremenjuje še z dodatnimi finančnimi stroški (meritve izpustov CO₂ ekvivalentov).

Rezultati testa BMP so pokazali, da je dodatek kvasa zelo učinkovit v proizvodnji bioplina, zato ga kaže v prihodnosti pospešeno uporabljati v pivovarski industriji.

5.2 SKLEPI

Naše rezultate lahko strnemo v naslednje sklepe:

- Dodatek hidroliziranega in nehidroliziranega kvasa k odpadni pivovarski vodi ne inhibira anaerobne produkcije bioplina.
- Ustrezna količina dodanih nehidroliziranih odpadnih pivovarskih kvasovk k odpadni pivovarski vodi poveča metanski potencial.
- Dodatek hidroliziranega kvasa ne doprinese k višji proizvodnji metana.

6 POVZETEK

Na agroživilskem področju imamo veliko odpadnih organskih substratov - virov za proizvodnjo bioplina. Za njihovo vključitev v bioreaktorje je nujno predhodno testiranje na laboratorijskem nivoju, saj lahko ob nepravilnem doziranju pride do inhibicije anaerobne razgradnje in v najslabšem primeru celo do zaustavitve bioreaktorja, kar ima negativne okoljske in ekonomske posledice.

Pivovarna Laško izloči v biotehnološkem procesu proizvodnje piva veliko odpadne pivovarske vode, ki je dobro presnovljiv substrat za proizvodnjo bioplina v bioreaktorju UASB. Proces želijo kvalitativno posodobiti in povečati produkcijo bioplina v bioreaktorju z dodajanjem novega substrata - odpadnih pivovarskih kvasovk k odpadni vodi v UASB bioreaktorju. Kvasovke, stranski proizvod pivovarne, morajo pred prodajo na trg trenutno dehidrirati (tako zahteva okoljevarstvena zakonodaja), kar ima za posledico precejšnjo porabo energije. Zato bi se temu energetskega strošku radi izognili oz. na račun tega raje pridelali še več bioplina. Cilj naloge je bil ugotoviti ali se bo mezofilni bioreaktor z muljno posteljico (UASB), do sedaj namenjen zgolj presnovi odpadnih pivovarskih vod, pozitivno (povečal produkcijo bioplina) ali negativno odzval na dodatek novega substrata. S testom biometanskega potenciala (BMP) smo izmerili produkcijo metana, ki nastane pri anaerobni razgradnji naslednjih substratov: odpadne pivovarske vode, odpadne pivovarske vode z dodanim hidroliziranim kvasom in odpadne pivovarske vode z dodanim nehidroliziranim kvasom. Testne mešanice s substrati in enako mikrobno biomaso smo inkubirali 21 dni v plinotesnih steklenicah OxiTop®. Predhodno smo opravili analize suhe (SS) in organske (OS) snovi mikrobne biomase in KPK substratov. Med inkubacijo smo spremljali naraščanje tlaka v testnih steklenicah, vrednost pH, hlapne maščobne kisline in sestavo bioplina.

Iz rezultatov je razvidno, da je dodatek nehidroliziranega kvasa dosegel najvišjo vrednost kumulativne produkcije metana (63 ml), bioplinskega potenciala ($0,41 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$), produkcije metana na 1g dodanega KPK (230 ml/g KPK) in izplena metana (91%). Dodatek hidroliziraninega kvasa pa je dosegel najnižjo vrednost kumulativne produkcije metana (47 ml), bioplinskega potenciala ($0,3 \text{ m}^3/\text{kg KPK}$), produkcije metana na 1g dodanega KPK (320 ml/g KPK) in izplena metana (66%), vendar je bila le-ta blizu

vrednosti odpadne vode, ki jo trenutno v pivovarni uporabljajo. Iz tega lahko sklepamo, da dodatek hidroliziranega kvasa ne zavira anaerobnega procesa, ne doprinese pa tudi k večji produkciji metana. Pivovarna lahko varno presnovi nehidroliziran odpadni kvas v bioplin v reaktorju UASB.

7 VIRI

- Ahring B.K., Alatrste-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: 686-689
- Amon B., Kryvoruchko V., Amon T., Zechmeister-Boltenstern S. 2006. Methane, nitrous oxide and ammonia emissions during storage and after application of dairy cattle slurry and influence of slurry treatment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 112: 153–162
- Anderson G.K., Donnelly T., McKeown K.J. 1982. Identification and control of inhibition in the anaerobic treatment of industrial wastewater. *Process Biochemistry*, 31, 5: 477-483
- Angelidaki I., Ahring B.K. 1993. Thermophilic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38: 560-564
- Angelidaki I., Ahring B.K. 1994. Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: effect of temperature. *Water Resource*, 28: 727-731
- Bhattacharya S.K., Parkin G.F. 1989. The effect of ammonia on methane fermentation process. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 61, 1: 55-59
- Bardiya N., Gaur A.C. 1997. Effects of carbon and nitrogen ratio on rice straw biomethanation. *Journal of Rural Energy*, 4: 53-57
- Borja R., Sanchez E., Weiland P. 1996. Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Process Biochemistry*, 31, 5: 477-483
- Bouallagui H., Haouari O., Touhami Y., Ben Cheikh R., Marouani L., Hamdi M. 2004. Effect of temperature on the performance of an anaerobic tubular reactor treating fruit and vegetable waste. *Process Biochemistry*, 39: 2143-2148

- Braun B., Huber P., Meyrath J. 1981. Ammonia toxicity in liquid piggery manure digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, 47: 298-307
- Burns R.T. 2007. Anaerobic digester basics. Iowa State University, Agricultural Biosystems Engineering Department. <http://www.chpcentermw.org/presentations/041103-IA/burns.pdf> (13. jan. 2009)
- 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: 4044-4064
- Clemens J., Trimborn M., Weiland P., Amon B. 2006. Mitigation of greenhouse gas emissions by anaerobic digestion of cattle slurry. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 112: 171-177
- Demirel B., Yenigun O. 2002 Two- phase anaerobic digestion processes: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77: 743-755
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from Waste and Renewable Resources. Substrate and biogas. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 443 str.
- 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
- Egg R., Coble C., Engler C., Lewis D. 1993. Feedstock storage, handling and processing. *Biomass and Bioenergy*, 5: 71-94
- Energetska izraba bioplina. Ministrstvo za okolje, prostor in energijo. Agencija republike Slovenije za učinkovito rabo energije. www.aure.si/dokumenti/Izrababioplina.pdf (7. mar. 2009)
- Grepmeier M. 2002. Experimentelle Untersuchungen an einer zweistufigen fuzzy – geregelten anaeroben Abwasserreinigungsanlage mit neuartigem Festbettmaterial.

Genehmigten Dissertation. München, der Technischen Universität, die Fakultät
Wissenschaftszentrum: 180 str.

Hansen K.H., Angelidaki I., Ahring B.K. 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Research*, 33: 1805-1810

Hansen K.H., Angelidaki I., Ahring B.K. 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition of ammonia. *Water Research*, 32: 5-12

Harper S.R., Pohland F.G. 1986. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 4: 585-602

Hashimoto A.G., 1983. Conversion of straw-manure mixtures to methane at mesophilic and thermophilic temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*, 25: 185–200

Hills D.J., Roberts D.W., 1981. Anaerobic digestion of dairy manure and field crop residues. *Agricultural Wastes*, 3: 179–189

Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E.C. 1997. *Anaerobe laboratory manual*. 4th Edition. Virginia Polytechnic Blacksburg, Virginia Institute and State University: 145 str

Holm-Nielsen J.B., Al Seadi T., Oleskowicz-Popiel P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology* (v tisku)

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

Karničnik M. 2009. Skok v zgodovino. *Sinenergija*, 1: 15-16

Kayhanian M. 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion process under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59: 349-352

Kayhanian M. 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: an overview and practical solutions. *Environmental Technology*, 20: 355-365

- Kelleher B.P., Leahy J.J., Henihan A.M., O Dwyer T.F., Sutton D., Leahy M.J. 2000. Advances in poultry litter disposal technology- a review. *Bioresource Technology*, 83: 27-36
- 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 (17. jun. 2009)
- Koster I.W., Lettinga G. 1988. Anaerobic digestion at extreme ammonia concentrations. *Biological Wastes*, 25: 51-59
- Krajnc B. 2009. Uvodnik. *Sinenergija*, 1: 2
- Kroeker E.J., Schulte D.D., Sparling A.B., Lapp H.M. 1979. Anaerobic treatment process stability. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 51: 781-727
- Kugelman I.J., McCarty P.L. 1964. Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 37: 97-116
- Liu T., Sung S. 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Science and Technology*, 45: 113-120
- Madigan T.M., Martinko J.M., Parker J. 2000. *Brock Biology of microorganisms*. 9th ed. Upper Saddle River, Prentice Hall: 991 str.
- 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.
- Mata-Alvarez J., Mace S., Llabres P. 2000. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*, 74: 3-16
- McCartney D.M., Oleszkiewicz J.A. 1991. Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. *Water Resource*, 25, 2: 203-209

- 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
- Muršec B., Vindiš P. 2007. Izgradnja postrojenja za proizvodnjo bioplina v laboratorijske namene. V: *Orodjarne v svetu globalne sposobnosti*, Portorož, 9-11 okt. 2007. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 245-250
- Noike T., Endo G., Chang J.E., Yaguchi J.I., Matsumoto J.I. 1985. Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic-digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 1482-1489
- Obnovljivi viri energije. 2008. Kazalci okolja v Sloveniji (28. okt. 2008). A gencija Republike Slovenije za okolje. http://kazalci.arso.gov.si/kazalci/index_html?Kaz_id=184&Kaz_naziv=Obnovljivi%20viri%20energije&Sku_id=7&Sku_naziv=ENERGIJA&tip_kaz=1#KAZALEC_TOP (20. mar. 2009)
- O'Flaherty V., Mahony T., O Kennedy R., Colleran E. 1998. Effect of Ph on growth kinetics and sulphide toxicity thresholds of a range of methanogenic, syntrophic and sulphate-reducing bacteria. *Process Biochemistry*, 33, 5: 555-569
- Orešnik A., Kermauner A. 2009. *Osnove prehrane živali*. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 179 str.
- Owen W.F., Stuckey D.C., Healy J.B., Young L.Y., McCarty P.I. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Research*, 13: 485-492
- 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: 780-788
- Poulsen T.G. 2003. Anaerobic digestion. V: *Solid waste management*: 93-115. http://gis.lrs.uoguelph.ca/AgriEnvArchives/bioenergy/download/intwastech5_poulsen_2003.pdf (4. apr. 2009)

- Soto M., Mendez R., Lema J.M. 1993. Methanogenic and nonmethanogenic activity tests: theoretical basis and experimental setup. *Water Resource*, 27: 1361-1376
- Suhi pivski kvas. Biotop. http://www.biotop.s5.com/html_slo/slo_suhipivkvas.htm (10. maj. 2009)
- Sulfit J.M., Londry K.L., Ulrich G.A. 1996. Determination of Anaerobic Biodegradation Activity. V: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C.J. (ed). Washington, ASM Press: 790-801
- Šumenjak Sabol M. 2007. Biomasa-vir energije za Slovenijo. V: Mednarodni simpozij Bioplin, tehnologija in okolje, Rakičan, Murska Sobota, 29. nov. 2007. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 17-19
- Tepež G. 2009a. Možnosti in ovire uporabe bioplina. *Sinenergije*, 1: 9-10
- Tepež G. 2009b. Možnosti uporabe bioplina v Sloveniji. *Sinenergije*, 1: 11
- Young L.Z. 1996. Anaerobic Biodegradability Assay. V: *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst C.J. (ed.) Washington, ASM Press: 802-805
- Zeeman G., Wiegant W.M., Koster-Treffers M.E., Lettinga G. 1985. The influence of the total ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes*, 14: 19-35
- Zupančič G.D., Roš M. 2003. Heat and energy requirements in thermophilic anaerobic sludge digestion. *Renewable Energy*, 28, 14: 2255-2267

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar se iskreno zahvaljujem za strokovno vodenje in dragoceno pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Doc. dr. Blažu Stresu gre zahvala za recenzijo diplomske naloge, prav tako pa tudi prof. dr. Ivanu Štuhcu za končni pregled naloge.

Za pomoč, potrpežljivost in koristne napotke pri eksperimentalnem delu se zahvaljujem Domnu Novaku.

Zahvaljujem se tudi celotni ekipi laboratorija na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo.

Posebna zahvala velja kolegici Martini Planinc za njeno širokosrčno prijaznost, oblikovno pomoč ter koristne in strokovne nasvete pri izdelavi naloge.

Na koncu in ne nazadnje ne smem pozabiti prijateljic Petre Verbič, ki mi je pomagala pri vseh kemijskih zapletih, in Lane Cvikl za njeno dragoceno pomoč pri prevajanju angleških virov.