

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Ana CERAR

**OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V IZTOKU
IZ BIOPLINSKE NAPRAVE ZA PROIZVODNJO
BIOPLINA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij-2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Ana CERAR

**OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V IZTOKU IZ
BIOPLINSKE NAPRAVE ZA PROIZVODNJO BIOPLINA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij-2. stopnja Mikrobiologija

**OPTIMIZATION OF MICROALGAL CULTIVATION IN BIOGAS
PLANT EFFLUENT FOR BIOGAS PRODUCTION**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani ter na podjetju AlgEn d.o.o., Ljubljana.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Tomaž ACCETTO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana Cerar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.26+579.66:628.3:582.263(043)=163.6
KG	alge/mikroalge/mikroalgna biomasa/mikrobne združbe/digestat/obdelava digestata/bioplina/anaerobna razgradnja/ <i>Chlorella sorokiniana</i> / <i>Scenedesmus quadricauda</i> /gojenje alg na digestatu/odpadne vode
AV	CERAR, Ana, dipl.mikrobiol. (UN)
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V IZTOKU IZ BIOPLINSKE NAPRAVE ZA PROIZVODNJO BIOPLINA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij-2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XV, 77 str., 10 pregl., 29 sl., 26 pril., 58 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Stranski produkt pri proizvodnji bioplina je med drugim tudi tekoči del digestata, ki vsebuje veliko hranil, predvsem amonijskega dušika, zato ga je potrebno ustrezno obdelati pred izpustom v okolje. Biološke čistilne naprave za svoje delovanje potrebujejo dovolj kisika, kar predstavlja velik del stroškov delovanja komunalne čistilne naprave. Mikroalge, fotosintetski mikroorganizmi, za svojo rast potrebujejo predvsem dušik in fosfor, ki se skupaj z ostalimi potrebnimi hranili nahajata v digestatu. Mikroalge v procesu fotosinteze fiksirajo CO₂ in proizvedejo kisik, kar omogoča delovanje bakterijske združbe v mikroalno-bakterijski čistilni napravi. V digestatu iz bioplinarne za predelavo odpadkov iz živilske industrije, bioloških odpadkov in gnojevke smo v kontinuirnem sistemu gojili mikroalgi <i>Chlorella sorokiniana</i> in <i>Scenedesmus quadricauda</i>. Ugotovili smo, da <i>Scenedesmus quadricauda</i> ne raste v takem digestatu. <i>Chlorella sorokiniana</i> in <i>Scenedesmus</i> sp. v kombinaciji z bakterijami iz aktivnega blata čistilne naprave lahko rastejo v 3 % in 5 % digestatu, vendar digestat v taki koncentraciji ne predstavlja optimalnega medija za rast mikroalg. Mikroalgna in mikroalno-bakterijska združba pri teh koncentracijah digestata ni zmanjšala vsebnosti amonijskega dušika in KPK v gojišču, mikroalge pa so zmanjšale vsebnost fosforja v gojišču. Mikroalgna biomasa vrst <i>Chlorella</i> sp. in <i>Scenedesmus</i> sp. brez predhodne obdelave ni najbolj primeren substrat za proizvodnjo bioplina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 579.26+579.66:628.3:582.263(043)=163.6

CX algae/microalgae/microalgal biomass/microbial communities/digestate/digestate treatment/biogas/anaerobic digestion/*Chlorella sorokiniana*/*Scendesmus quadricauda*/algae cultivation on digestate/waste water

AU CERAR, Ana

AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/STOPAR, David (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology

PY 2015

TI OPTIMIZATION OF MICROALGAL CULTIVATION IN BIOGAS PLANT EFFLUENT FOR BIOGAS PRODUCTION

DT M.Sc.Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)

NO XV, 77 p., 10 tab., 29 fig., 26 ann., 58 ref.

LA sl

AL sl/en

AB By-product in anaerobic digestion process for biogas production is liquid digestate, which contains considerable amount of nutrients, especially ammonium nitrogen, therefore it needs to be processed before it is released in to the environment. Bacterial waste water treatment systems require a sufficient amount of oxygen for operation, which represents the majority of costs in waste water treatment plant. Digestate is an adequate source of nutrients for microalgae which are photosynthetic microorganisms that require nitrogen and phosphorus for growth along with some other nutrients found in digestate. Microalgae fix CO₂ from air and produce oxygen, which is then used by bacteria in microalgal-bacterial waste water treatment plant. We used digestate from food industry, green waste and cattle slurry waste for continuous system with *Chlorella sorokiniana* and *Scendesmus quadricauda*. We concluded that *S. quadricauda* cannot be grown on this type of digestate. *Chlorella sorokiniana* and *Scendesmus* sp. in combination with active sludge bacteria were able to grow on 3 % and 5 % digestate, but their growth in such conditions is not optimal. Microalgal-bacterial consortium was not able to remove ammonium nitrogen, COD (Chemical Oxygen Demand) was not reduced. Microalgae did, however, reduce the amount of phosphorus in growth medium. Microalgae biomass from *Chlorella* sp. and *Scendesmus* sp. is not a suitable substrate for anaerobic digestion, unless biomass is sufficiently pretreated.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
SLOVARČEK.....	XV
1 UVOD.....	1
1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MIKROALGE	3
2.2 ČIŠČENJE ODPADNE VODE	4
2.2.1 Uporaba mikroalg pri čiščenju odpadne vode.....	5
2.2.1.1 Komunalne odpadne vode	6
2.2.1.2 Kmetijske odpadne vode.....	7
2.2.1.3 Industrijske odpadne vode	7
2.2.1.4 Vrste mikroalg	7
2.2.2 Mikroalge in rast v digestatu.....	8
2.3 UPORABA MIKROALG ZA PROIZVODNJO BIOPLINA	11
2.3.1 Bioplinski proces.....	11
2.3.2 Mikroalge kot substrat za produkcijo bioplina	12
2.3.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost anaerobne razgradnje mikroalgne biomase	14
2.3.2.1.1 Razmerje C/N in vpliv amonija.....	14
2.3.2.1.2 Zgradba celične stene mikroalg	15
2.3.2.1.3 Prisotnost H ₂ S	16
2.3.2.1.4 Stopnja organske obremenitve in hidravlični zadrževalni čas	17

3	METODE IN MATERIALI	18
3.1	POTEK DELA	18
3.2	GOJENJE MIKROALG V DIGESTATU-PREDHODNI POSKUS	19
3.2.1	Gojenje mikroalgnih kultur.....	20
3.2.1.1	Gojenje čistih kultur.....	20
3.2.1.2	Gojenje mikroalgne mešanice s periodičnim dodajanjem digestata	20
3.2.2	Merjenje optične gostote	21
3.2.3	Določanje vsebnosti suhe snovi v mikroalgnih kulturah in aktivnem blatu	21
3.2.4	Priprava mešanic za poskus	22
3.2.5	Vzorčenje in obdelava vzorcev	22
3.2.6	Prirast biomase	22
3.2.7	Merjenje vsebnosti ionov	23
3.2.8	Merjenje vsebnosti fosfata	23
3.2.9	Merjenje vsebnosti organskega dušika in amonijaka	23
3.2.10	Mikroskopija v svetlem vidnem polju	24
3.2.11	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	24
3.2.12	Suha in organska snov.....	25
3.3	OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V DIGESTATU	26
3.3.1	Gojenje mikroalgnih kultur.....	26
3.3.1.1	Gojenje čistih kultur.....	26
3.3.1.2	Gojenje mikroalgne mešanice.....	26
3.3.2	Določanje vsebnosti suhe snovi.....	26
3.3.3	Priprava mešanic za poskus	26
3.3.4	Vzorčenje in obdelava vzorcev	28
3.3.5	Merjenje optične gostote	28
3.3.6	Merjenje vsebnosti ionov	28
3.3.7	Merjenje vsebnosti fosfata	28
3.3.8	Merjenje vsebnosti organskega dušika in amonijaka	28
3.3.9	Mikroskopija.....	28
3.3.10	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	29
3.3.11	Suha in organska snov.....	30

3.4	BIOMETANSKI POTENCIAL MIKROALGNE BIOMASE VZGOJENE V DIGESTATU	30
3.4.1	Priprava mikroalgne biomase za pridobivanje bioplina	30
3.4.2	Priprava anaerobne mikrobne biomase za inokulum v BMP testu	30
3.4.3	Suha snov in organska snov	31
3.4.4	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	31
3.4.5	Izračun obremenitve anaerobne mikrobne biomase s substratom	31
3.4.6	Priprava mešanic za test biometanskega potenciala	32
3.4.7	Odvzem in analiza vzorcev	34
3.4.7.1	Merjenje volumna proizvedenega bioplina	34
3.4.7.2	Merjenje sestave pridobljenega bioplina	35
3.4.7.3	Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)	35
3.4.7.4	Skupna produkcija bioplina	36
3.4.7.5	Skupna produkcija metana	36
3.4.7.6	Volumen nastalega metana na 1g KPK substrata	37
3.4.7.7	Izplen metana glede na teoretični izplen metana	37
3.4.7.8	Meritve pH vrednosti	37
3.4.7.9	Kemijska potreba po kisiku	38
4	REZULTATI	39
4.1	RAST MIKROALG V DIGESTATU-PREDHODNI POSKUS	39
4.2	OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V DIGESTATU	39
4.2.1	Priraščanje biomase	39
4.2.2	Poraba hranil	41
4.2.3	Vsebnost organskega dušika in amonijaka	48
4.2.4	Vsebnost fosfata	50
4.2.5	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	51
4.2.6	Sprememba strukture mikroalgne združbe med poskusom	51
4.2.7	Gibanje pH vrednosti	56
4.3	BIOMETANSKI POTENCIAL MIKROALGNE BIOMASE VZGOJENE V DIGESTATU	57
4.3.1	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	57
4.3.2	Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)	57

4.3.3	Volumen nastalega bioplina.....	58
4.3.4	Skupna produkcija metana	60
4.3.5	Volumen metana, nastalega iz 1g KPK mešanice.....	61
4.3.6	Izplen metana.....	61
4.3.7	Gibanje pH vrednosti	61
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	63
5.1	RAZPRAVA	63
5.2	SKLEPI.....	70
6	POVZETEK.....	71
7	VIRI.....	73
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava gnojila Planfer-U	20
Preglednica 2: Sestava mikroalgnih in mikroalžno-bakterijskih mešanic za predhodni poskus	22
Preglednica 3: Umeritvena krivulja za KPK	25
Preglednica 4: Začetne mešanice za poskus optimizacije gojenja mikroalg na digestatu...	27
Preglednica 5: Obremenitev mikrobne biomase v testu biometanskega potenciala.....	32
Preglednica 6: Sestava fosfatnega pufra.....	33
Preglednica 7: Sestava testnih mešanic na začetku poskusa	34
Preglednica 8: Standardne koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin	36
Preglednica 9: Koncentracija hranil v 100 % in 3 % digestatu	42
Preglednica 10: Volumen nastalega metana na 1g KPK substrata in izplen metana	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poteka gojenja mikroalg na digestatu- predhodni poskus	18
Slika 2: Shema poteka dela optimizacije gojenja mikroalg na digestatu ter biometanski potencial	19
Slika 3: Plastenke in mešala uporabljena v poskusu. Cevke služijo za dovod plinov in odvzem vzorcev.	27
Slika 4: Umeritvena krivulja za KPK 2, pripravljena s standardnimi raztopinami glukoze	29
Slika 5: Steklenice s testnimi mešanici za test metanskega potenciala	33
Slika 6: Naraščanje suhe snovi v vzorcih za poskus optimizacije gojenja mikroalg	40
Slika 7: Naraščanje organske snovi v vzorcih za poskus optimizacije gojenja mikroalg	40
Slika 8: Naraščanje OD (optične gostote) med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	41
Slika 9: Spreminjanje koncentracije NO_3^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	42
Slika 10: Spreminjanje koncentracije NO_2^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	43
Slika 11: Spreminjanje koncentracije NH_4^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	44
Slika 12: Spreminjanje koncentracije K^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	45
Slika 13: Spreminjanje koncentracije Na^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	46
Slika 14: Spreminjanje koncentracije Ca^{++} med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	47
Slika 15: Spreminjanje koncentracije Cl^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	48
Slika 16: Spreminjanje koncentracije organskega dušika med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	49
Slika 17: Spreminjanje koncentracije amonijaka med poskusom optimizacije gojenja mikroalg	49
Slika 18: Spreminjanje koncentracije PO_4^{3-} v mešanicah BA (aktivno blato), DA (definirane alge) in ALBAD (definirane alge in aktivno blato)	50
Slika 19: Spreminjanje koncentracije PO_4^{3-} v mešanicah NA (nedefinirane alge) in ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)	50
Slika 20: Vrednosti KPK v mešanicah na 1. in 10. dan poskusa	51
Slika 21: Sprememba sestave združbe tekom poskusa optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica DA (definirane mikroalge), slikano pri 400x in 1000x povečavi	52
Slika 22: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica NA (nedefinirane mikroalge), slikano pri 400x in 1000x povečavi	53
Slika 23: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica ALBAD (definirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x in 1000x povečavi	54
Slika 24: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica ALBAN (nedefinirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x in 1000x povečavi	55
Slika 25: Spreminjanje pH vrednosti med poskusom pri mešanicah BA (aktivno blato), DA (definirane mikroalge), NA (nedefinirane mikroalge), ALBAD (definirane mikrolage in aktivno blato) ter ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)	56
Slika 26: Vrednosti KPK v mešanicah na 1. in 28. dan poskusa	57
Slika 27: Volumen nastalega bioplina v vzorcih med poskusom BMP	59

Slika 28: Skupna produkcija metana v vzorcih med poskusom BMP	60
Slika 29: pH vrednosti v mešanicah na 1. in 28. dan poskusa	62

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Spremljanje prirasta biomase med gojenjem v digestatu

PRILOGA A1: Naraščanje suhe snovi v vzorcih za predhodni poskus

PRILOGA A2: Naraščanje organske snovi v vzorcih za predhodni poskus

PRILOGA A3: Spremljanje prirasta biomase preko optične gostote (predhodni poskus)

PRILOGA B: Poraba hranil med predhodnim poskusom

PRILOGA B1: Spreminjanje koncentracije NO_3^- med predhodnim poskusom

PRILOGA B2: Spreminjanje koncentracije NO_2^- med predhodnim poskusom

PRILOGA B3: Spreminjanje koncentracije NH_4^+ med predhodnim poskusom

PRILOGA B4: Spreminjanje koncentracije K^+ med predhodnim poskusom

PRILOGA B5: Spreminjanje koncentracije Na^+ med predhodnim poskusom

PRILOGA B6: Spreminjanje koncentracije Ca^{++} med predhodnim poskusom

PRILOGA B7: Spreminjanje koncentracije Cl^- med predhodnim poskusom

PRILOGA C: Vsebnost organskega dušika v mešanicah 1. in 7. dan predhodnega poskusa

PRILOGA C1: Vsebnost amonijaka v mešanicah 1. in 7. dan predhodnega poskusa

PRILOGA D: Kemijska potreba po kisiku (KPK) v predhodnem poskusu

PRILOGA E: Sprememba strukture mikroalgne združbe med poskusom

PRILOGA E1: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica DA (definirane mikroalge), slikano pri 400x povečavi

PRILOGA E2: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica NA (definirane mikroalge), slikano pri 400x povečavi

PRILOGA E3: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica ALBAD (definirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x povečavi

PRILOGA E4: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica ALBAN (nedefinirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x povečavi

PRILOGA F: Spreminjanje pH vrednosti med poskusom pri mešanicah DA (definirane mikroalge), NA (nedefinirane mikroalge), ALBAD (definirane mikrolage in aktivno blato) ter ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)

PRILOGA G: Shema cevnega fotobioreaktorja uporabljenega za gojenje nedefiniranih mešanih mikroalgnih kultur (Resnik, 2011: 18)

PRILOGA G1: Cevni fotobioreaktor uporabljen za gojenje nedefiniranih mešanih mikroalgnih kultur

PRILOGA H: Koncentracija suhe in organske snovi prvi in zadnji dan poskusa optimizacije gojenja mikroalg

PRILOGA I: Spreminjanje koncentracije očetne kisline v vzorcih tekom poskusa BMP

PRILOGA I1: Skupen volumen nastalega bioplina po dnevih (mL)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$\mu\text{E s}^{-1} \text{ m}^{-2}$	Microeinstein na sekundo na kvadratni meter, merska enota za fotosintetsko aktivno sevanje (ang. PAR-Photosynthetically Active Radiation)
μM	mikro molarna koncentracija
ALBAD	definirane mikroalge in bakterije
ALBAN	nedefinirane mikroalge in bakterije
BA	bakterije iz aktivnega blata
BMP	biometanski potencial
COD	kemijska potreba po kisiku (ang. Chemical Oxygen Demand)
DA	definirane mikroalge
KMK	kratkoverižna maščobna kislina
KPK	kemijska potreba po kisiku
NA	nedefinirane mikroalge
nm	nanometri
OD	optična gostota (ang. optical density)
OS	organska snov
Sp.	vrsta (ang. species)
SS	suha snov

SLOVARČEK

anaerobna razgradnja	biološka razgradnja organske snovi v pogojih brez kisika
biometanski potencial	volumen metana, ki nastane ob anaerobni razgradnji substrata
biorafinerija	obrat, ki združuje pridelavo biomase in predelavo biomase za produkcijo goriv, energije, toplote in produktov z visoko vrednostjo
centrat	tekočina, ki jo dobimo po centrifugiranju aktivnega blata iz čistilnih naprav
digestat	tekoči del iztoka iz bioplinske naprave (po centrifugiranju in ločitvi na tekoč ter trden del)
hidravlični zadrževalni čas	povprečen čas zadrževanja spojine v bioreaktorju
hidroliza	razgradnja polimerov v monomere s pomočjo encimov hidrolaz
homogenizator	naprava, ki homogenizira vzorec
Kjeldahlova metoda	metoda za določanje vsebnosti dušika v kemijskih spojinah
KPK	kisikov ekvivalent organske snovi v vzorcu, indirektno merilo za količino organske snovi
metanogeneza	anaeroben proces, med katerim metanogeni mikrobi (arheje) proizvedejo metan
sporopolenin	težko razgradljiv polimer, del celične stene pri nekaterih mikroalgah; najdemo ga v celičnih stenah spor pri mikroorganizmih in v cvetnem prahu
stopnja obremenitve z organsko snovjo	količina organske snovi na liter, ki jo dnevno vnesemo v bioreaktor
zasenčenje	pojav, ko je kultura mikroalg tako gosta, da prepreči prehajanje svetlobe globlje v gojišče

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV PROBLEMA

Pri anaerobni razgradnji biomase kot stranski produkt nastane digestat, tekočina z visoko vsebnostjo hranil. Digestat lahko uporabimo kot gnojilo za kmetijske površine ali kot substrat za gojenje mikroalg. S tem, ko se hranila iz digestata vgradijo v mikroalžno biomaso, se izognemo vnašanju odvečnih hranil v okolje in neželenim procesom, kot je evtrofikacija (Bjornsson in sod., 2013).

Digestat s procesom odstranjevanja vode ločimo na tekoči in trdni del. Del tekočega digestata gre nazaj v proces anaerobne razgradnje, večina pa se izloči iz procesa. Ta del tekočega digestata ima visoko kemijsko in biološko potrebo po kisiku ter povečuje onesnaženost vode. Digestat lahko vsebuje tudi toksične spojine, vsebnost teh pa je odvisna od vrste, kvalitete in vira substrata (Sattar, 2011). Zaradi vseh naštetih lastnosti je potrebno tekoči del digestata dodatno očisti, preden ga lahko izpustimo v okolje, če ga ne uporabimo direktno za gnojenje kmetijskih površin.

Digestat predstavlja problem v bioplinarnah, saj nastaja v velikih količinah, kar zahteva ustrezne skladiščne prostore, predvsem v zimskem času. Če digestat uporabimo kot gnojilo za kmetijska zemljišča, so potrebne zadostne površine kmetijskih zemljišč, problem pa predstavlja tudi transport, saj na dolge razdalje to ni ekonomična rešitev. V primeru, da na razpolago ni dovolj kmetijskih površin, je potrebno tekoči del dodatno obdelati na bioloških čistilnih napravah, kjer bakterije predelajo organsko snov v celično biomaso in CO₂. Bakterijam je potrebno vpihovati kisik, kar je energetsko potraten proces. Z dodatkom mikroalg bi lahko povečali učinkovitost obdelave bioplinskega digestata. Mikroalge med fotosintezo porabljajo CO₂, ki nastaja z bakterijsko razgradnjo organskih snovi, pri tem pa proizvajajo kisik, ki ga porabijo bakterije. Poleg tega mikroalge za rast porabijo mineralne snovi, prisotne v digestatu. Pri procesu obdelave bioplinskega digestata nastane mikroalžna biomasa, ki lahko predstavlja substrat za proizvodnjo bioplina.

1.2 NAMEN DELA

Namen naloge je preučiti primernost in učinkovitost mikroalgnih in mikroalžno-bakterijskih združb za obdelavo bioplinskega digestata ter določiti primerne pogoje za ta proces. Zanima nas, ali je digestat ustrezen substrat za rast mikroalg ter kakšen je bioplinski donos nastale mikroalžne biomase. Z gojenjem mikroalg v digestatu želimo zagotoviti recikliranje hranil in nato nastalo mikroalžno biomaso uporabiti za proizvodnjo bioplina, zato bomo preverili tudi biometanski potencial mikroalžno-bakterijske biomase.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: Mikroalgna in mikroalžno-bakterijska združba bo učinkovito znižala koncentracijo dušika, fosforja, kalija in vsebnost kemijske potrebe po kisiku (KPK).

Hipoteza 2: Masa mikroalgne in mikroalžno-bakterijske biomase se bo med procesom obdelave bioplinskega digestata povečala.

Hipoteza 3: Sestava mikroalgne in bakterijske združbe se bo med procesom obdelave bioplinskega digestata stabilizirala.

Hipoteza 4: V digestatu namnožene mikroalgne in mikroalžno-bakterijske mešanice bodo primeren substrat za proizvodnjo bioplina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROALGE

Ko govorimo o algah, se to nanaša tako na makroalge kot tudi na zelo raznoliko skupino mikroorganizmov, poznanih kot mikroalge. Število algnih vrst je ocenjeno na 1-10 milijonov in večino od njih predstavljajo mikroalge (Barsanti in Gultieri, 2006). Ime mikroalge se nanaša na alge, ki so premajhne, da bi jih videli brez mikroskopa, sem pa spadajo tako evkariontske mikroalge kot prokariotske cianobakterije (Larsdotter, 2006).

Ocenjujejo, da obstaja 350 000 vrst mikroalg, od teh je približno 3000 sevov sekvenciranih. Večina raziskav in komercialne produkcije se osredotoča na monokulture majhnega števila vrst, ki so sposobne hitre rasti in imajo visoko vsebnost lipidov (Chen in sod., 2015).

Mikroalge za svojo rast potrebujejo ustrezna hranila in pogoje. Na rast mikroalg vplivajo fizikalni (svetloba, temperatura), kemični (razpoložljivost hranil, slanost, toksične snovi) in biološki dejavniki (patogeni mikroorganizmi, predatorji, tekmovanje med vrstami). Razmerje med najpogostejšimi elementi v povprečni mikroalgni celici najbolje prikažemo s sledečo formulo: $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$. Za zagotavljanje optimalne rasti morajo biti elementi v gojišču prisotni v teh razmerjih. Razmerje N/P = 30:1 predstavlja omejitev s fosforjem, razmerje N/P = 5:1 pa omejitev z dušikom (Larsdotter, 2006). Optimalno razmerje N/P za sladkovodne mikroalge je 12:1 (Boelee in sod., 2011).

Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na rast mikroalg so količina in kvaliteta hranil, svetloba, pH, mešanje, slanost in temperatura. Optimalni pogoji se razlikujejo od vrste do vrste. Večina najpogostejše gojenih vrst mikroalg tolerira temperature med 16 in 27 °C ter pH vrednosti med 7 in 9. Morske alge za preživetje potrebujejo slano okolje, kot optimalna velja slanost med 20 in 24 g/L. Pri gojenju mikroalg je potrebno zagotoviti mešanje, saj s tem preprečimo sedimentacijo mikroalg in omogočimo, da so vse celice enakomerno izpostavljene svetlobi in hranilom, s tem tudi izboljšamo izmenjavo plinov med ravnim medijem in zrakom, še posebej če je glavni vir CO₂ iz zraka. Vrednosti CO₂ v zraku so nizke (0,03 %), zato moramo ponavadi CO₂ vpihovati, da zagotovimo boljšo rast kulture mikroalg. Vir energije za fotosintetske reakcije je svetloba, zato je pomembna tudi intenziteta svetlobe in čas osvetlitve. To se spreminja glede na globino bioreaktorja ter gostoto mikroalgne kulture. Najpogostejše se uporablja intenziteta svetlobe med 100 in 200 $\mu E s^{-1} m^{-2}$ ter svetlo/temni cikel, po navadi v razmerju 14:10 ali 12:12, maksimalno 16:8 (16 ur svetlobe, 8 ur teme) (Barsanti in Gultieri, 2006).

Mikroalge kot vir ogljika najpogostejše uporabljajo anorgansko obliko ogljika (CO₂ ali HCO₃⁻), nekatere vrste pa so sposobne asimilacije organskega ogljika v obliki organskih

kislin, sladkorjev, acetata ali glicerola (Grobbelaar, 2004). Količina raztopljenega CO₂ v vodi niha glede na pH vrednost, z dodatkom CO₂ se pH vrednost vode zniža. Pri pH vrednosti, višji od 9 je večina anorganskega ogljika v obliki karbonata (CO₃²⁻), ki ga mikroalge ne morejo uporabiti (Larsdotter, 2006).

Drugi najpomembnejši element za rast mikroalg je dušik; najraje uporabljajo amonijski dušik v obliki NH₄⁺ ali nitrat (NO₃⁻) (Grobbelaar, 2004), lahko pa uporabljajo tudi nitrit (NO₂⁻) in ureo (CO(NH₂)₂) (Larsdotter, 2006). Amonij je primarni vir dušika za mikroalge, saj asimilacija amonija zahteva manj energije. Vse oblike anorganskega dušika se namreč pred vgradnjo v aminokisline reducirajo do amonija. Mikroalge načeloma asimilirajo amonij pred nitratom, le-tega začnejo porabljati šele, ko zmanjka amonija (Cai in sod., 2013). Številne mikroalge lahko prevzamejo več dušika, kot ga potrebujejo za metabolizem, ter viške porabijo, ko začne zmanjkovati virov dušika v okolju (Larsdotter, 2006).

Fosfor mikroalge asimilirajo v obliki anorganskega ortofosfata (PO₄³⁻), določene vrste pa lahko z izločanjem posebnih encimov porabljajo tudi organske oblike fosforja (Grobbelaar, 2004). Tudi fosfor lahko asimilirajo v prebitku ter ga shranjujejo znotraj celic v obliki polifosfatnih granul ter ga porabijo, ko fosforja v okolici primanjkuje (Larsdotter, 2006).

Poleg glavnih makronutrientov mikroalge za rast potrebujejo še žveplo, kalij, kalcij in magnezij ter mikronutriente, kot so mangan, molibden, baker, železo, cink, bor, klor in nikelj (Larsdotter, 2006).

Vsa omenjena hranila lahko mikroalgam zagotovimo tudi z gojenjem v odpadnih vodah ali digestatu, s tem pa ponovno uporabimo hranila iz odpadne vode in hkrati pridobimo produkt v obliki mikroalgne biomase, ki jo lahko uporabimo za različne namene, med drugim tudi za produkcijo bioplina.

2.2 ČIŠČENJE ODPADNE VODE

Čiščenje odpadne vode je proces, v katerem iz odpadne vode odstranimo onesnažila, preostalo vodo pa lahko spustimo v okolje. Nepredelana odpadna voda vsebuje veliko organskega materiala, patogene mikroorganizme, hranila, lahko pa tudi toksične snovi. Metode čiščenja odpadne vode v grobem delimo na fizikalne, kemijske in biološke načine čiščenja. Glede na to, do kakšne mere vodo očistimo, proces delimo še na različne stopnje: primarno, sekundarno in terciarno čiščenje (Rawat in sod., 2011).

Zahteva po čisti vodi je svetovna prioriteta, svetovna investicija v upravljanje z vodo pa trenutno znaša približno 150 milijard € letno. Obdelava odpadne vode na čistilnih napravah poteka na več načinov, ki temeljijo na fizikalnih, kemijskih in bioloških metodah, te pa pogosto odstranijo samo del skupnega dušika in fosforja prisotnega v odplakah. Zato so

potrebni novi sistemi za obdelavo odpadne vode, ki hkrati ne bodo pretirano povečali porabe energije. Nov pristop do reševanja te težave je obdelava odpadne vode, ki hkrati omogoča proizvodnjo obnovljive energije (Cabanelas in sod., 2013).

2.2.1 Uporaba mikroalg pri čiščenju odpadne vode

Mikroalge so v procesu čiščenja odpadne vode prvič uporabili že v šestdesetih in sedemdesetih letih 20. stoletja. Prvotni namen mikroalg v bazenih je bil izboljšava oz. dodatna obdelava odpadne vode po sekundarnem čiščenju, z namenom preprečitve evtrofikacije voda (terciarno čiščenje). Ugotovili so, da je proces čiščenja z mikroalgami bolj učinkovit pri odstranjevanju hranil iz odpadne vode, kot proces čiščenja z aktivnim blatom. Pogosto so pri tem uporabljali predvsem vrste iz rodu *Chlorella*, za katere je dokazano, da učinkovito zmanjšujejo koncentracijo dušika, fosforja in zmanjšuje kemijsko potrebo po kisiku (Wang in sod., 2010b).

Globalna poraba pitne vode leta 2009 je bila ocenjena na 3,908.3 milijarde m³, večina te vode pa konča kot odpadna voda. Skupne koncentracije dušika in fosforja v odpadni vodi iz gospodinjstev lahko dosežejo 10-100 mg/L, v kmetijski odpadni vodi pa celo več kot 1000 mg/L. V kitajskem mestu s 14 milijoni prebivalcev na primer letno v odpadni vodi konča 36,700 t dušika in 4700 t fosforja. Če vode ne obdelamo ustrezno, to vodi k izpustu dušika in fosforja, s tem se povečuje evtrofikacija voda in posledično pride do uničenja ekosistemov. Odpadno vodo, bogato s hranili, lahko uporabimo kot poceni vir hranil za gojenje mikroalg, ki imajo visok potencial prevzemanja hranil iz odpadne vode. Proces obdelave odpadnih voda z mikroalgami je bolj učinkovit pri odstranjevanju hranil in težkih kovin, kot tradicionalno terciarno čiščenje (Chen in sod., 2015).

Zanimanje za uporabo mikroalg pri obdelavi odpadne vode se je ponovno povečalo, ko je postalo jasno, da bi lahko produkcija biogoriv iz mikroalg postala ekonomična, če bi kot vir hranil za gojenje mikroalg uporabili odpadne vode (Boelee in sod., 2011). Najpomembnejši razlog za visoke stroške pri produkciji biogoriv iz mikroalg je namreč velika poraba hranil in vode. Stroški hranil predstavljajo večinski del stroškov. Kot poceni vir hranil lahko uporabimo odpadno vodo in izpušne pline, ki predstavljajo vir CO₂ (Chen in sod., 2015). Zaradi visoke koncentracije CO₂ so izpušni plini optimalen vir CO₂ za gojenje mikroalg. Kljub potencialno toksičnim NO_x in SO_x spojinam v izpušnih plinih, so dokazali, da je toksični vpliv teh plinov odvisen od vrste mikroalge ter da izpušni plini nimajo signifikantnih negativnih učinkov na rast mikroalg, v primerjavi z uporabo čistega CO₂ (Chen in sod., 2015).

Mikroalge kot del biološke obdelave odpadnih vod pripomorejo k odstranjevanju hranil, težkih kovin ter proizvajajo kisik, ki ga porabijo heterotrofne aerobne bakterije, ki mineralizirajo organske snovi. CO₂, ki nastane med bakterijsko respiracijo, kot vir ogljika

porabijo mikroalge. Z uporabo mikroalg zmanjšamo stroške delovanja bakterijske čistilne naprave, saj je drugače potrebno prepihanje s kisikom, v mikroalžno-bakterijskih sistemih pa kisik, ki ga proizvedejo mikroalge, podpira aerobno razgradnjo s strani drugih mikroorganizmov (Rawat in sod., 2011). Mehansko vpihovanje kisika v aerobnih čistilnih sistemih predstavlja 45-75 % energetskih stroškov čistilne naprave, zato je produkcija kisika s strani mikroalg dobrodošla (Razzak in sod., 2013).

Na učinkovitost odstranjevanja hranil z mikroalgami vplivajo tudi okoljski dejavniki. Li in sodelavci (2011) so ugotovili, da imajo intenziteta svetlobe, čas osvetlitve in koncentracija CO₂ pomemben vpliv na prirast biomase. Ob daljšem času osvetlitve se je KPK hitreje zmanjšal, s povečanjem koncentracije CO₂ pa se je znižala pH vrednost, kar je vplivalo na večjo odstranitev fosforja, ki pri nižji pH vrednosti precipitira. Prav tako vpihovanje CO₂ pozitivno vpliva na rast mikroalg (Li in sod., 2011).

Mikroalge so uspešno uporabili pri obdelavi komunalnih, kmetijskih in industrijskih odpadnih voda (He in sod., 2013).

2.2.1.1 Komunalne odpadne vode

Številne raziskave so potrdile, da mikroalge lahko učinkovito odstranjujejo dušik in fosfor iz komunalnih odpadnih vod. *Chlorella* sp. in *Chlamydomonas* sp. sta po dveh tednih odstranila ves fosfor in 84 % dušika iz odpadne vode (Rasoul-Amini in sod., 2013). Cabanelas in sodelavci (2013) so ugotovili, da je *Chlorella vulgaris* primerna vrsta za obdelavo odpadnih vod in produkcijo mikroalgne biomase, enako so za *Chlorella* sp. dokazali Cho in sodelavci (2013). Wang in sodelavci (2010b) so izolirali sev *Chlorella* sp. iz okolja in testirali rast v odpadni vodi, odvzeti med procesom čiščenja odpadne vode na čistilni napravi. Ugotovili so, da mikroalge najboljše rastejo v centratu (odpadna voda, ki ostane po centrifugiranju aktivnega blata), ki vsebuje visoke koncentracije P, N in C, čeprav nima ustreznega razmerja N/P. Vsebnost amonija se je znižala za 74-82 %, vsebnost fosforja pa za 90 %. Razmerje N/P se je z 52,3 znižalo na 20,8, kar dokazuje, da kljub neustreznemu razmerju N/P, to ni vplivalo na prevzem N in P. Mikroalge učinkovito odstranjujejo tudi Al, Fe, Mg, Mn in Zn (Wang in sod., 2010b). Mikroalge lahko gojimo tudi v centratu iz čistilne naprave. Ta s hranili bogat iztok, ki ponavadi potrebuje nadaljnjo obdelavo zaradi previsokih vsebnosti fosforja, lahko predstavlja vir hranil za mikroalge. V centratu so uspešno gojili *Chlorella* sp. in *Scenedesmus* sp., pri tem pa so kot vir CO₂ za mikroalge uporabili izpušne pline iz bližnje elektrarne. Mikroalge so odstranile 72 % amonijaka in več kot 85 % fosforja (Dalrymple in sod., 2013).

V raziskavi izvedeni na Nizozemskem so dokazali, da lahko mikroalgne biofilme uporabijo za čiščenje komunalnih odpadnih vod. Maksimalna poraba je bila 1 g NO₃⁻-N/m²/dan in 0,13 g PO₄³⁻-P /m²/dan. To nakazuje, da mikroalge lahko asimilirajo N in P ne glede na razmerje N/P v odpadnih vodah. Velja namreč, da je razmerje N/P v odpadnih vodah 20:1, kar ni optimalno za sladkovodne mikroalge, katerih povprečno razmerje N/P je 12:1.

Ocenili so, da bi za čistilni sistem z mikroalgnimi biofilmi za 100 000 prebivalcev (poraba 130 L odpadne vode/prebivalca/dan) potrebovali 10 ha površine, pri čemer bi nastali 2 toni biomase na dan (Boelee in sod., 2011).

2.2.1.2 Kmetijske odpadne vode

Kmetijske odpadne vode imajo za razliko od komunalnih odpadnih voda višjo vsebnost dušika in fosforja. Dokazali so, da mikroalge lahko rastejo v kmetijski odpadni vodi in učinkovito znižajo vsebnost hranil v vodi. Problem pri gojenju mikroalg v kmetijskih vodah predstavljata visoka koncentracija hranil in motnost, kar lahko negativno vpliva na rast mikroalg, zato je potrebno kmetijske odpadne vode redčiti, kar pa vpliva na produktivnost in učinkovitost odstranjevanja hranil iz odpadne vode (Chen in sod., 2015).

2.2.1.3 Industrijske odpadne vode

Večina raziskav na industrijskih odpadnih vodah se osredotoča predvsem na odstranjevanje težkih kovin in toksinov. Problem za gojenje mikroalg v industrijskih odpadnih vodah predstavljajo visoka vsebnost kovin, kemijskih strupov, ter relativno nizko razmerje N/P, zato je uporaba mikroalg za produkcijo biomase na takih odpadnih vodah omejena (Chen in sod., 2015).

2.2.1.4 Vrste mikroalg

Za ustrezno učinkovitost čiščenja odpadnih vod in produkcijo biomase je potrebno izbrati ustrezne vrste mikroalg. Večina raziskav se osredotoča na vrste iz rodu *Chlorella*, vendar pa le te niso ustrezne, če želimo mikroalžno biomaso uporabiti za produkcijo biodizla, saj ne vsebujejo dovolj lipidov. Li in sodelavci (2011) so testirali 14 sevov rodov *Chlorella*, *Hematococcus*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* in *Chlorococcum*. Kot substrat so uporabili centrat in dokazali, da so vsi sevi sposobni avtotrofne in heterotrofne rasti ter da vsi lahko izrabljajo organski in anorganski ogljik. Za nadaljnje raziskave so uporabili dva seva *Chlorella* sp., ki sta rasla miksotrofno, saj ob takem načinu rasti nastane več biomase kot pri heterotrofni rasti. Dokazali so, da mikroalge rastejo heterotrofno, kadar je dovolj organskega ogljika, ko koncentracija le-tega pade pa začnejo rasti avtotrofno. Že pretekle študije so dokazale, da *Chlorella pyranidiosa* najprej eksponentno raste miksotrofno, v primeru manjše koncentracije organskega substrata pa po fazi adaptacije sledi avtotrofna rast. Dokazali so, da *Chlorella* sp. raste avtotrofno, heterotrofno in miksotrofno na številnih organskih substratih (Li in sod., 2011).

Kot najbolj učinkovito se je izkazalo gojenje mešanih, naravno prisotnih vrst mikroalg. Naravno prisotne vrste mikroalg v odpadnih vodah bolj učinkovito odstranijo hranila v primerjavi s čistimi kulturami iz laboratorija. Naravne vrste mikroalg, ki jih gojimo v odpadni vodi, tudi hitreje rastejo, imajo večjo produktivnost in večjo vsebnost lipidov; slednje je pomembno za uporabo biomase pri proizvodnji biogoriv. Mešanice mikroalgnih

združb so bolj raznolike, stabilne in odporne, gojenje mešanih kultur pa je cenejše in lažje za vzdrževanje, kar naredi uporabo mikroalg za čiščenje odpadnih vod še bolj učinkovito in cenovno ugodno (Chen in sod., 2015).

V odpadni vodi so vedno prisotne tudi bakterije, zato se nekatere raziskave osredotočajo tudi na interakcijo med mikroalgami in bakterijami v procesu obdelave odpadne vode. Pri odstranjevanju hranil iz odpadne vode je bolj učinkovita kombinacija mikroalg in bakterij, kot same mikroalge. Konzorcij mikroalg in bakterij lahko odstrani 100 % amonija, 15 % nitrata ter 36 % fosforja. Mikroalge porabijo amonij, bakterije pa nitrat. Če začne zmanjkovati organske snovi, se metabolizem bakterij upočasni in poraba nitrata se ustavi. V primeru, da zmanjka amonija, *Chlorella vulgaris* začne porabljati nitrat, ki ga bakterije niso porabile. V sistemu z bakterijami in *Chlorella vulgaris*, le ta odstrani največ dušika in fosforja, bakterije pa porabijo organsko snov (He in sod., 2013). Najboljše razmerje med algami in aktivnim blatom je 5:1 (Su in sod., 2012).

Obdelava odpadnih vod z mikroalgami je v primerjavi s klasičnimi sistemi za čiščenje odpadnih voda okolju prijazen proces, saj ne pride do sekundarnega onesnaževanja, biomaso, ki nastane pa lahko ponovno uporabimo ter tako zagotovimo učinkovito kroženje hranil (Rawat in sod., 2011). Moramo pa upoštevati, da gre v vseh primerih uporabe mikroalg za čiščenje odpadnih vod zgolj za raziskave na laboratorijski ravni, zato so potrebne nadaljnje raziskave na pilotni in industrijski ravni (Chen in sod., 2015).

2.2.2 Mikroalge in rast v digestatu

Za pojem digestat v literaturi zasledimo različne definicije. V tej magistrski nalogi je digestat mišljen kot tekoči del iztoka iz bioplinske naprave (po centrifugiranju in ločitvi na tekoč ter trden del), centrat pa opisuje tekočino, ki jo dobimo po centrifugiranju aktivnega blata iz čistilnih naprav.

Uporaba digestata za rast mikroalg je še posebej zanimiva v konceptu biorafinacij, kjer gre za združevanje čiščenja odpadnih vod, gojenja mikroalg za produkcijo visoko kvalitetnih produktov in anaerobne razgradnje. Kadar uporabljamo digestat z namenom ponovne uporabe hranil, je še posebej pomembna kvaliteta digestata. Upoštevati moramo vsebnost patogenov in težkih kovin. Glede na učinkovitost procesa anaerobne razgradnje lahko digestat vsebuje kratkoverižne maščobne kisline ter mikroorganizme iz substrata ali anerobne mikrobiote. Prav tako v tekoči fazi zasledimo flokule, ki so ostanek ločevanje digestata na tekoč in trdni del. Značilna za tekoči del digestata je nizka vsebnost organske snovi in fosforja ter visoka vsebnost kalija in dušika; 80 % dušika predstavlja amonijski dušik. Z digestatom zagotovimo tudi vse potrebne mikroelemente za rast mikroalg (Uggetti in sod., 2014a).

Problem anaerobne razgradnje je, da po koncu procesa v digestatu še vedno ostane veliko hranil. Številne raziskave so pokazale, da bi z uporabo mikroalg lahko zmanjšali vsebnost hranil v digestatu (Franchino in sod., 2013).

Značilna za tekočo fazo digestata je tudi motnost (Uggetti in sod., 2014a). Zaradi temne barve digestata in številnih delcev je prehod svetlobe skozi digestat zelo slab. Mikroalge za rast potrebujejo svetlobo, zato je dobro digestat predhodno obdelati, da omogočimo prehajanje svetlobe. Prav tako moramo uporabiti ustrezne vrste mikroalg, ki rastejo dovolj hitro pri spreminjajočih se pogojih (Rusten in Sahu, 2011).

Glede na vrsto oziroma vir digestata, se spreminja tudi količina hranil v njem in s tem pogoji za rast mikroalg (Marcilhac in sod., 2014). Mikroalge so gojili v digestatu iz bioplinarn, kjer so kot substrat uporabili blato iz čistilnih naprav, gnojevko, ostanke iz klavnic. Nekaj raziskav je narejenih tudi na digestatu, ki nastane po anaerobni obdelavi mikroalgne biomase (Uggetti in sod., 2014b). Zaradi raznolikosti digestata je potrebno izbrati ustrezne seve mikroalg, ki bodo dobro rasli v določenem digestatu (Marcilhac in sod., 2014).

Mikroalge so gojili v 10 % digestatu iz kravje gnojevke in dosegli zmanjšanje koncentracije $\text{PO}_4\text{-P}$ s 30 mg/L na 18 mg/L v petih dneh, skupni dušik se je zmanjšal iz 80 mg/L na 15 mg/L, koncentracija $\text{NH}_3\text{-N}$ se je zmanjšala s 70- 90 mg/L na 20 mg/L. Digestat je na začetku vseboval 2313 mg/L skupnega dušika, od tega 893 mg/L amonijaka ter 119 mg/L fosforja (Kobayashi in sod., 2013). *Desmodesmus* sp., izoliran iz okolja, je največ hranil asimiliriral pri 10 % koncentraciji digestata iz prašičje gnojevke (Ji in sod., 2014). Wang in sodelavci (2010a) so uspešno gojili divji tip *Chlorella* sp. na redčenem in filtriranem digestatu iz mlečne industrije, v katerem je večina dušika v digestatu v obliki amonija. Po treh tednih so mikroalge porabile ves amonij, katerega začetna koncentracija je bila med 81 mg/L in 178 mg/L. Skupni dušik se je zmanjšal za 76-83 %, skupni fosfor pa za 63-75 % (Wang in sod., 2010a). *Chlorella vulgaris* in *Scenedesmus obliquus* sta v drugem poskusu prednostno porabljala amonij pred nitritom in koncentracijo amonija v digestatu zmanjšala za 83 % oz 99 % ter ortofosfate za 94 %. Vrednosti kemijske potrebe po kisiku (KPK) se v tem primeru niso zmanjšale, saj se med avtotrofnim metabolizmom porabljajo hranila, ne pride pa do razgradnje organske snovi (Franchino in sod., 2013).

V digestatu so prisotni tudi številni drugi mikroorganizmi, ki pa ne vplivajo na raven hranil ter na hitrost rasti mikroalg (Franchino in sod., 2013). Na hitrost rasti mikroalg lahko vpliva začetna koncentracija amonija, prisotnega v digestatu. Z večanjem koncentracije amonija se hitrost rasti lahko zmanjša za 77 %, znano pa je tudi, da visoka koncentracija amonija (okoli 2,3 μM) v digestatih pogosto zavira hitrost rasti mikroalg. Kljub temu, da je amonij odličen vir dušika za mikroalge, je amonijak toksičen za večino sevov mikroalg, saj vpliva na proces fotosinteze. Pri tem moramo upoštevati, da rast mikrolag na digestatu lahko zavirajo tudi druge spojine (Ca, Mg, K, Na), če so prisotne v prevelikih količinah.

Vplivu toksičnih spojin se lahko izognemo tako, da digestat redčimo (Uggetti in sod., 2014a).

Mikroalge pozitivno vplivajo tudi na bakterijsko aktivnost, saj večja začetna koncentracija mikroalg vpliva na večjo razpoložljivost kisika, kar stimulira bakterijsko aktivnost. Med bakterijskimi procesi nastaja CO₂, kar izboljša rast mikroalg. Pri pH vrednosti med 7 in 8, poteka proces nitrifikacije. Če mikroalge proizvedejo veliko kisika, to stimulira oksidacijo amonija s strani nitrifikatorjev, s tem pa se poveča produkcija nitrita in nitrata. Posledica aerobne bakterijske oksidacije organske snovi je nastanek CO₂ in amonija, kar spodbudi rast mikroalg in s tem sintezo organske snovi iz CO₂ (Uggetti in sod., 2014).

Franchino in sodelavci so testirali gojenje različnih vrst mikroalg v enakih pogojih gojenja v različnih digestatih in z različnimi redčitvami. Ugotovili so, da pri neredčenem digestatu oz. majhnih redčitvah (1:1 do 1:5) pride do velikih izgub biomase, zato je bolje uporabiti večje redčitve, na primer 1:20 in 1:25 (Franchino in sod., 2013).

Redčenje digestata je potrebno tudi zaradi drugih vzrokov. Problem za rast mikroalg namreč pogosto predstavlja barva digestata, na rast pa lahko vplivajo tudi same mikroalge z zasenčenjem. Zasenčenje je pojav, ko je kultura mikroalg tako gosta, da prepreči prehajanje svetlobe globlje v gojišče. Marcilhac in sodelavci (2014) so ocenjevali vpliv barve digestata na rast mikroalg iz rodov *Scenedesmus* sp. in *Chlorella* sp. ter merili, koliko svetlobe prodre skozi ter kako to vpliva na gostoto mikroalg. Uporabili so tri različne vrste digestatov, ki so se med seboj razlikovali po vhodnem substratu pri anaerobni razgradnji. Ugotovili so, da vsi digestati absorbirajo v celotnem vidnem spektru (400-700 nm), z močnejšo absorpcijo na spodnji polovici vidnega spektra (460-570 nm). Večja optična gostota mešanic je negativno vplivala na prevzem dušika iz digestata, saj večja optična gostota zmanjša prehod svetlobe in s tem količino svetlobe v gojišču. Ugotovili so, da na zmanjšanje prevzema hranil iz digestata s strani mikroalg enako vpliva tako pomanjkanje svetlobe, kot tudi barva digestata. Če je digestat premalo redčen, imamo veliko optično gostoto in manjše odstranjevanje dušika, ob večjem redčenju pa je odstranjevanje dušika večje, a je večja tudi poraba vode za redčenje. Na primer: v primeru neredčenega digestata se asimilira 15,9 mg/L dušika na dan, za kar je potreben bazen velikosti 150 m³ za obdelavo 1 m³ digestata. V primeru 10 X redčenega digestata se asimilira 22 mg/L dušika na dan, za kar potrebujemo 106 m³ velik bazen za obdelavo 1 m³ digestata. Prevzem dušika s strani mikroalg lahko povečamo tudi z zmanjšanjem optične gostote digestata, kar naredimo z nadaljnjo obdelavo tekoče faze, koagulacijo, flokulacijo itd. Tudi pri močno obarvanih digestatih lahko odstranimo višek dušika, če zagotovimo dovolj svetlobe (Marcilhac in sod., 2014).

Svetloba manj prehaja v gojišče tudi zaradi gostote mikroalg, ki zrastejo med gojenjem v digestatu. Kadar imamo obarvano gojišče, je vpliv zasenčenja mikroalg še bolj pomemben, zato moramo zagotoviti ustrezno mešanje, da mikroalge dobijo dovolj svetlobe. Pri manjši osvetljenosti v kulturi, *Chlorella* sp. prevlada nad *Scenedesmus* sp. (Marcilhac in sod.,

2014). Vpliv prehajanja svetlobe na koncentracijo *Scendesmus* sp. so opazovali tudi Uggetti in sodelavci ter ugotovili, da v njihovem primeru na prehajanje svetlobe, bolj kot barva digestata, vpliva gostota mikroalg. Povečanje gostote mikroalg preko učinka zasenčenja vpliva na zmanjšanje hitrost rasti mikroalg, saj do celic pride manj svetlobe (Uggetti in sod., 2014a).

2.3 UPORABA MIKROALG ZA PROIZVODNJO BIOPLINA

2.3.1 Bioplinski proces

Bioplin nastane v procesu anaerobne razgradnje, ki ga lahko v grobem razdelimo na štiri stopnje. V procesu anaerobne razgradnje sodeluje konzorcij fakultativnih in striktno anaerobnih mikrobov, ki so pogosto prilagojeni na določen substrat (Chaudhari in sod., 2011).

Proces anaerobne razgradnje je sestavljen iz naslednjih procesov:

1. Hidroliza: v procesu hidrolize mikrobi s pomočjo ekstracelularnih hidrolaz razgradijo polimere (ogljikove hidrate, proteine, lipide) v monomere (glukoza, aminokisline, maščobne kisline, glicerol itd.).
2. Acidogeneza: mikroorganizmi, acidogene bakterije, ki so večinoma fakultativne, s pomočjo encimov pretvorijo monomere v kratkoverižne maščobne kisline, kot so očetna kislina, propionska kislina, maslena kislina in druge. V tem procesu nastanejo tudi amonijak (NH_3), ogljikov dioksid (CO_2) in vodikov sulfid (H_2S).
3. Acetogeneza: acetogeni mikroorganizmi, ki so lahko fakultativni ali obligatni anaerobi, v procesu acetogeneze pretvorijo kratkoverižne maščobne kisline v očetno kislino, H_2 in CO_2 .
4. Metanogeneza: zadnji korak v procesu nastanka bioplina je metanogeneza, kjer metanogene arheje proizvedejo metan po treh poteh: hidrogenotrofna oz. CO_2 -reduktivna, acetotrofna in metilotrofna pot.

Končni produkt anaerobne razgradnje je bioplin, ki je sestavljen iz 60-65 % metana (CH_4), 30-35 % CO_2 ter mešanice ostalih plinov v sledovih: N_2 , H_2 , CO , NH_3 , H_2S (Chaudhari in sod., 2011).

Proces anaerobne razgradnje lahko poteka v mezofilnih (32-42 °C) ali termofilnih pogojih (48-55 °C). Pri mezofilnih pogojih je manjša verjetnost za toksični vpliv amonija zaradi manjše vsebnosti prostega amonijaka. V termofilnih pogojih je stopnja razgradnje 50 % višja, višji je tudi izplen bioplina. Izbira procesa je odvisna tudi od vrste substrata (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.3.2 Mikroalge kot substrat za produkcijo bioplina

Prve raziskave na področju uporabe mikroalge biomase v anaerobni razgradnji so opravili že v 60ih letih 20. stoletja, ponovno se je zanimanje za to področje pojavilo v času prve naftne krize v 70ih in 80ih letih 20. stoletja (Mussgnug in sod., 2010). Danes se o uporabi mikroalg govori v okviru tretje generacij biogoriv, saj sta se prva in druga generacija izkazali kot neustrezni oziroma premalo učinkoviti rešitvi problematike fosilnih goriv (Montingelli in sod., 2015).

Prva stopnja v produkciji bioplina, hidroliza, predstavlja limitni korak, če kot substrat uporabljamo kompleksen organski material, kot so mikroalge. To vpliva na podaljšanje anaerobne razgradnje in zmanjšanje učinkovitosti pri produkciji bioplina. Vzrok za nizko učinkovitost bi bila lahko inhibicija z amonijem in odpornost celičnih sten mikroalg na razgradnjo s strani anaerobnih bakterij (Gonzales-Fernandez in sod., 2012).

Glavne prednosti uporabe mikroalg za produkcijo bioplina so predvsem dejstvo, da ne tekmujejo z rastlinami za kmetijska zemljišča, hitra rast, majhna vsebnost lignina ter kompatibilnost z biorafinerijami (Montingelli in sod., 2015).

Potencial mikroalg za produkcijo bioplina lahko predvidimo iz zgradbe mikroalg. Te so ustrezen vir hranil za anaerobne mikroorganizme, saj poleg ogljika, dušika, in fosforja, ki so glavni sestavni deli mikroalg, v njih najdemo tudi železo, kobalt in cink, ki stimulirajo metanogenezo (Sialve in sod., 2009). Teoretični izplen metana, izračunan po Bushwellovi enačbi (Sialve in sod., 2009), je največji pri lipidih (1104 mL CH₄/ g OS), sledijo proteini (851 mL CH₄/g OS) in nazadnje ogljikovi hidrati (515 mL CH₄/g OS). Višja kot je vsebnost lipidov, višji je metanski potencial, a hidroliza lipidov poteka počasneje kot hidroliza proteinov in ogljikovodikov (Sialve in sod., 2009). Moramo pa upoštevati, da Bushwellova enačba preceni bioplinsko produkcijo, saj predvideva 100% pretvorbo kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) v bioplin ter ne upošteva potreb bakterijskih celic za ohranjanje celic ter anabolizma (Ward in sod., 2014).

Na razgradnjo substrata vpliva tudi temperatura; biorazgradljivost se pri termofilnem procesu poveča za 5-10 %, v primerjavi z mezofilnim, vendar pa je v tem primeru energetska ravnotežje negativno, zato se kot optimalni pogoji smatrajo temperature v mezofilnem območju (Sialve in sod., 2009).

Tako kot pri čiščenju odpadnih voda, je tudi pri produkciji bioplina iz mikroalg potrebna izbira ustreznih vrst. Prve poskuse anaerobne razgradnje mikroalg sta Golueke in Oswald izvajali na mešani kulturi *Chlorella* sp. in *Scenedesmus* sp. (Dębowski in sod., 2013). Raziskave v zadnjih letih so se osredotočile tako na sladkovodne kot tudi morske mikroalge. Učinkovitost anaerobne razgradnje je pogosto odvisna od seva, izkupički metana pa se razlikujejo glede na različne načine delovanja bioreaktorja (tip bioreaktorja, hidravlični zadrževalni čas, temperatura razgradnje) ter glede na izbiro seva mikroalg in

pogojev gojenja (Uggetti in sod., 2014b). Caporgno s sodelavci (2015) je pri razgradnji morske mikroalge *Isochrysis galbana* v mezofilnih pogojih dobil 439 mL bioplina /g OS. Za to mikroalgo so značilne majhne celice, brez celične stene. Nasprotno pa je pri sladkovodni *Selenasrum capricornutum*, ki ima trdne in debele celične stene iz ogljikovih hidratov, nastalo samo 271 mL bioplina /g OS. Obe mikroalgi sta imeli v termofilnih pogojih manjši izplen bioplina kot v mezofilnih. Pri termofilnih pogojih je izkupiček metana nekoliko višji (82 %) kot pri mezofilnih (77 %), a v mezofilnih pogojih nastane več bioplina ter se porabi manj energije (Caporgno in sod., 2015).

Mussnug s sodelavci (2010) je testiral različne seve zelenih mikroalg (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella kessleri*) ter cianobakterijo *Arthrospira platensis*. Produkcijo bioplina pri mikroalgah so primerjali s produkcijo bioplina na koruzni silaži in ugotovili, da je delež metana višji pri mikroalgah (61-67 %) kot pri koruzni silaži (54 %), s čimer so dokazali, da je mikroalgna biomasa boljši substrat kot uporaba energetskih rastlin. Količina nastalega bioplina je močno odvisna od vrste mikroalge, ki jo uporabimo kot substrat. Med bolj uporabnimi sta *C.reinhardtii* (587 mL /g OS) ter *D. salina* (505 mL/g OS). Dobro se je obnesla tudi *A. platensis* (482 mL/g OS). Pomen vrst se vidi pri razliki v bioplinskem potencialu med *C. reinhardtii* in *C. kessleri*, kjer je bila produkcija bioplina pri *C. kessleri* precej manjša (355 mL/g OS). Najmanj bioplina je nastalo pri razgradnji *S. obliquus* (287 mL/g OS) (Mussnug in sod., 2010).

Za anaerobno razgradnjo lahko uporabimo tudi morske mikroalge, vendar pa se v tem primeru lahko pojavi problem slanosti, saj so soli v previsokih koncentracijah toksične za metanogene mikroorganizme. Kljub temu so poznani primeri uspešne razgradnje morskih sevov in produkcija bioplina med 95 mL/g OS in 260 mL/g OS za *Tetraselmis* sp. ter med 310 mL/g OS in 440 mL bioplina/g OS pri *Nannachloropsis oculata*. Slanost lahko inhibitorno vpliva na bakterije, saj celice dehidirajo. Ioni kot so Na, Mg, Ca in Al so lahko toksični v visokih koncentracijah. Najbolj toksičen je natrij, toksičnost pa niha glede na vir inokuluma, sestavo morske vode ter substrat. Dokazali so inhibitorni učinek natrija v koncentracijah od 3,5 g/L do 14 g/L (Ward in sod., 2014). Učinek inhibicije je manjši v termofilnih pogojih (Sialve in sod., 2009). Kljub temu so znani tudi primeri, kjer se je anaerobna mikrobiota sposobna prilagoditi na biomaso morskih mikroalg in razgradnja poteka tudi pri slanosti 35 g/L (Mottet in sod., 2014).

Najnižjo produkcijo metana so zaznali pri morski mikroalgi *Dunaliella tertoelecta*, 24 mL/g OS, vzrok za nizko produktivnost pa je verjetno vpliv slanosti na anaerobne mikroorganizme. Največjo produkcijo metana, 600 mL/g OS so zabeležili pri mešani kulturi nedefiniranega konzorcija sladkovodnih mikroalg (Ward in sod., 2014).

2.3.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost anaerobne razgradnje mikroalgne biomase

2.3.2.1.1 Razmerje C/N in vpliv amonija

Pri uporabi mikroalg kot substrata za anaerobno razgradnjo je še posebej pomembno razmerje C/N. Kot optimalno razmerje za anaerobno razgradnjo velja razmerje C/N med 20 in 30, razmerje v mikroalgni biomasi pa je običajno manjše od 10 (Montingelli in sod., 2015). Pri zelo nizkih razmerjih C/N se iz proteinov, ki predstavljajo velik del mikroalg, sprosti dušik (Ward in sod., 2014). Če je razmerje C/N manjše od 20, pride do neravnovesja med potrebami po C in N za anaerobne mikroorganizme. To sproži sproščanje amonija, kar lahko negativno vpliva na metanogene mikrobe. Razmerje 36,4 je na zgornji meji, saj koncentracije KMK prav tako lahko negativno vplivajo na anaerobno razgradnjo (Ehimen in sod., 2011). Povečane koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin so posledica toksičnega vpliva amonija na anaerobne mikroorganizme (Sialve in sod., 2009). Amonijski dušik in KMK so pomembni vmesni produkti anaerobne razgradnje, v prevelikih količinah pa so lahko potencialno inhibitorni (Ward in sod., 2014). Pri visokih razmerjih C/N je lahko koncentracija skupnega amonijskega dušika prenizka za celične potrebe anaerobnih mikroorganizmov, ki potrebujejo od 50 do 200 mg/L amonija (Ward in sod., 2014).

V vodni raztopini sta glavni obliki anorganskega amonijskega dušika amonijev ion NH_4^+ in prosti amonijak NH_3 . Koncentracije NH_4^+ do vrednosti 1500 mg/L nimajo toksičnega učinka na metanogenezo (Montingelli in sod., 2015), nad to vrednostjo pa pride do inhibicije rasti metanogenih mikroorganizmov, čeprav si podatki o koncentracijah in vplivih na metanogene mikroorganizme nasprotujejo (Ward in sod., 2014).

Razmerje C/N v mikroalgni biomasi lahko povečamo z dodatkom ustreznega substrata. Mikroalga biomasa ima po navadi višjo vsebnost dušika, zato je potrebno dodati substrat z visokim deležem ogljika. Kot učinkovito se je izkazalo dodajanje odpadkov iz papirne industrije in prašičje gnojevke (Uggetti, in sod., 2014b). Pri uporabi odpadkov iz papirne industrije je razmerje C/N med 20 in 25, produkcija metana pa se podvoji (Sialve in sod., 2009). Razmerje C/N lahko povečamo tudi s primarnim in sekundarnim blatom s čistilnih naprav, maščobami ter odpadki iz živilske industrije. Odpadno blato iz čistilnih naprav vsebuje veliko C in aktivne mikroorganizme, poleg tega je na voljo v velikih količinah (Wang in sod., 2013).

Anaerobna razgradnja *Chlorella* sp. pri mezofilnih pogojih, ob hkratni razgradnji blata s čistilne naprave, podvoji produkcijo bioplina s 262 mL bioplina /g OS za čisto mikroalga biomaso, na 468 mL bioplina /g OS pri 41 % vsebnosti mikroalg. Razgradnja samih mikroalg *Chlorella* je slaba, produkcija bioplina pa počasna, medtem ko pri mešanici mikroalg in blata nastane več bioplina v krajšem času, kar nakazuje, da so mikroalge v tej kombinaciji lažje razgradljive. Pri ko-razgradnji z odpadnim blatom verjetno pride do

hitrejše razgradnje tudi zaradi različnih mikroorganizmov prisotnih v blatu, ki pomagajo pri hidrolizi celične stene in večji razgradljivosti mikroalg. Dodatek blata k mikroalgni biomasi torej poveča izplen bioplina. Pri čisti mešanici po 30 dneh nastane 54 mL bioplina, po 45 dneh pa 123 mL bioplina. Do različnih izplenov bioplina verjetno pride zaradi različnih vrst mikroalg in pogojev razgradnje (Wang in sod., 2013). Ob razgradnji mikroalg in aktivnega blata v razmerju 2:1 nastane od 300 do 330 mL CH₄/g OS. Vrednosti pri sladkovodnih in morskih algah so podobne, do velikih razlik pa prihaja med različnimi sevi, saj se vsebnost metana glede na sev mikroalg giblje med 230 in 410 mL CH₄/g OS (Uggetti in sod., 2014b).

Mussnug in sodelavci so pri anaerobni razgradnji *C.reinhardtii* in koruzne silaže dobili za 11 % večji izkupiček metana, kot samo z uporabo mikroalgne biomase (Mussnug in sod., 2010).

Vendar pa izboljšanje C/N razmerja ter dodatek substrata nista vedno rešitev za boljšo anaerobno razgradnjo, kar kaže na to, da je potrebno vsako mešanico posebej oceniti glede ustreznosti za anaerobno razgradnjo (Ramos-Suárez in Carreras, 2014).

2.3.2.1.2 Zgradba celične stene mikroalg

Poleg razmerja C/N na razgradljivost mikroalgne biomase vpliva tudi sestava celične stene. Že Golueke je poročal o nerazgrajenih algah na koncu anaerobnega procesa, saj lahko kar 60 % mikroalgne biomase ostane nerazgrajene. Mikroalgne celice se lahko učinkovito upirajo bakterijski razgradnji; nerazgrajene celice *C. vulgaris* so našli v digestatu po 64 dneh (Ward in sod., 2014), Mussnug in sodelavci poročajo o prisotnosti živih celic *Scenedesmus* sp. v anaerobnem bioreaktorju po šestih mesecih, celice so v tem času preklopile na miksotrofno rast (Mussnug in sod., 2010). Za vse dobro razgradljive alge je značilno, da nimajo celične stene (*Dunaliella salina*) oziroma, da celična stena ne vsebuje celuloze ali hemiceluloznih spojin, temveč je iz proteinov (*C. reinhardtii* in *A.platensis*). Med bolj nerazgradljive spadajo celične stene *C. kessleri* in *S. obliquus*, ki imata celično steno iz hemiceluloze. *S. obliquus* ima še posebej težko razgradljivo celično steno, kar je posledica prisotnosti sporopolenina (Mussnug in sod., 2010). Celična stena *Chlorella* predstavlja 13,6 % suhe teže celice in vsebuje 31 % hemiceluloze, 15,4 % alfa celuloze in 5,2 % pepela, zato je težko razgradljiva (Wang in sod., 2013).

Zgradba celične stene je očitno poglavitni razlog za različno razgradljivost v anaerobnih pogojih in učinkovitost produkcije bioplina. Za anaerobno razgradnjo mikroalg moramo izbrati vrste brez celične stene oziroma brez vsebnosti hemiceluloznih struktur, a pri tem paziti, da mikroalge ne vsebujejo toksičnih substanc, ki bi lahko poškodovale anaerobne mikroorganizme (Dębowski in sod., 2013).

Izplen metana lahko izboljšamo s predhodno obdelavo mikroalgne biomase (Sialve in sod., 2009), kot najbolj učinkovito se je izkazalo segrevanje pri 100 °C, 8 ur, ki za 33 % izboljša

produktivnost (Ward in sod., 2014). Obstajajo številni načini predobdelave (toplotna, kemijska, encimska, mehanična), ki lahko povečajo izplen metana tudi za več kot 50 %. (Uggetti in sod., 2014). Temperaturna predobdelava poveča razgradljivost *Chlorella* sp. za 50 %, *Scenedesmus* sp. pa le za 21-27 % (Mendez in sod., 2014).

Za učinkovito produkcijo bioplina moramo biomaso dovolj skoncentrirati, saj v vsakem primeru vsebuje veliko vode. Najbolj energetsko učinkovita je uporaba sveže centrifugirane biomase, ki je po možnosti blizu bioplinske naprave, saj s tem zmanjšamo stroške prevoza (Mussnug in sod., 2010).

Izplen bioplina lahko povečamo tudi z uporabno predhodno razgrajene mikroalgne biomase. Ramos-Suárez in Carreras (2014) sta testirala produkcijo bioplina na ostankih *Scenedesmus* sp. po ekstrakciji aminokislin. Pri biomasi po ekstrakciji aminokislin se je v primerjavi s surovo biomaso *Scenedesmus* sp. razmerje C/N povečalo s 5,9 na 7,2, prav tako pa se je povečala produkcija bioplina in izplen metana. Pri razgradnji celih celic *Scenedesmus* sp. je nastalo 177 mL bioplina/g OS ter 140 mL metana/g OS. Pri *Scenedesmus* sp. po ekstrakciji aminokislin se je produkcija bioplina povečala na 401,2 mL/g OS, nastalo je 272,6 mL CH₄/g OS. Razbitje celičnih sten in obdelava z encimi pri ekstrakciji aminokislin iz *Scenedesmus* sp. je izboljšala uporabnost biomase za anaerobno razgradnjo (Ramos-Suárez in Carreras, 2014).

Pri biomasi, ki ostane pri pridobivanju vodika se produkcija bioplina poveča za 123 % v primerjavi s svežo mikroalžno biomaso. V procesu gojenja mikroalg za proizvodnjo vodika, se biomasa strda, kar pomeni, da celice kopičijo več založnih snovi v obliki škroba in maščob; te so lahko razgradljive in zaradi tega povečajo donos bioplina. Biomasa, ki ostane pri produkciji vodika je boljša za predelavo v bioplin, saj so izkoristki večji. Prav tako produkcijo vodika inducirajo s pomanjkanjem žvepla, kar še zmanjša pojav H₂S v bioplinu (Mussnug in sod., 2010).

2.3.2.1.3 Prisotnost H₂S

Pri anaerobni razgradnji pogosto povzroča probleme prisotnost H₂S, ki je koroziven. Prednost uporabe mikroalg je, da ob razgradnji biomase nastane manj H₂S kot pri drugih substratih. Mikroalge namreč vsebujejo zelo malo aminokislin z žveplom (Ward in sod., 2014), zato koncentracija H₂S v teh procesih ne doseže 100 mg/L, kar predstavlja mejno vrednost za delovanje kogeneratorske enote (Montingelli in sod., 2015).

2.3.2.1.4 Stopnja organske obremenitve in hidravlični zadrževalni čas

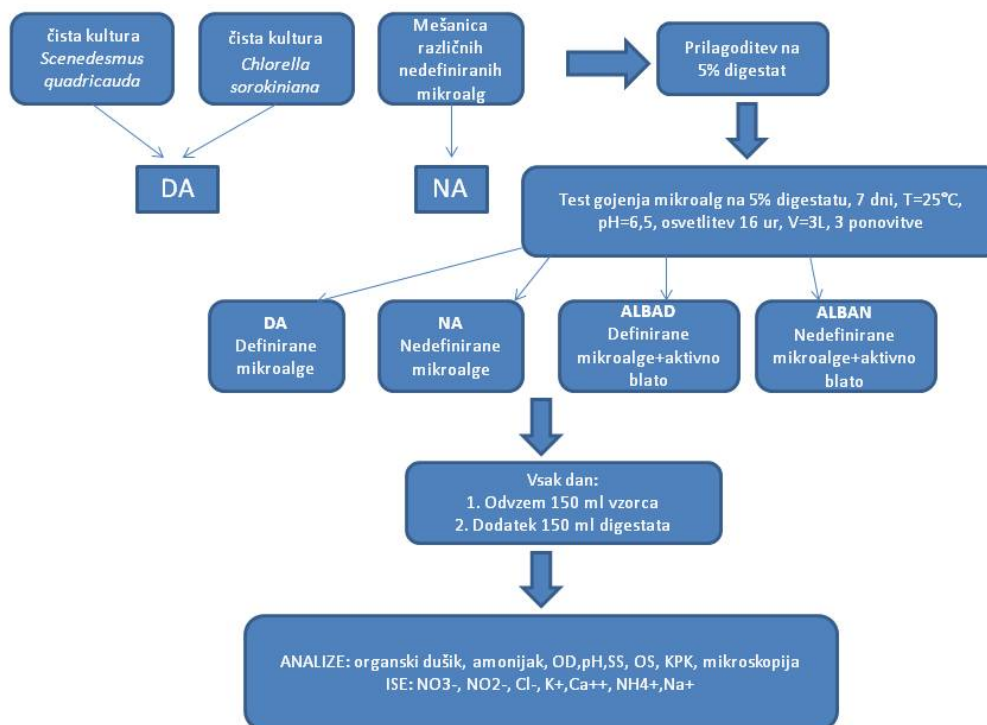
Pri procesu anaerobne obdelave mikroalg je pomembna tudi stopnja obremenitve z organsko snovjo ter hidravlični zadrževalni čas. Stopnja obremenitve z organsko snovjo je količina organske snovi na liter, ki jo dnevno vnesemo v bioreaktor. Z visokimi stopnjami lahko zmanjšamo velikost bioreaktorja in zmanjšamo stroške, a moramo zagotoviti dovolj velik zadrževalni čas, da mikroorganizmi razgradijo organski material in ga pretvorijo v bioplin. Delež metana je konstanten in maksimalen, kadar proces teče pri nizkih obremenitvah in z visokim hidravličnim zadrževalnim časom. Če čas zmanjšamo in povečamo obremenitev, lahko pride do neravnotežja med bakterijsko populacijo, kar vodi k akumulaciji organske snovi in destabilizaciji ali celo porušenju procesa (Montingelli in sod., 2015). Če hidravlični zadrževalni čas pri *C. vulgaris* povečamo s 16 na 28 dni, se delež metana štirikratno poveča (Ras in sod., 2011). Jegde je preučeval vpliv obremenitve z organsko snovjo na produkcijo bioplina pri hidravličnem zadrževalnem času 3 dni in ugotovil, da je maksimalna produkcija pri obremenitvi 7g OS pri *Chlorella* sp., nad to vrednostjo pa se produkcija zmanjša (Jegede, 2012). Ehimer je prišel do zaključka, da je najboljša kombinacija obremenitve s substratom 5 g OS/L, pri zadrževalnem času 15 dni (Ehimen in sod., 2011). Glede na vrsto in zgradbo mikroalgnega substrata je potrebno izbrati ustrezno obremenitev in hidravlični zadrževalni čas (Montingelli in sod., 2015).

Kljub napredku na področju produkcije bioplina iz mikroalg pa še vedno ni določeno, kakšni so optimalni pogoji gojenja za visoko produkcijo biomase in veliko anaerobno razgradljivost, zato so potrebne nadaljnje raziskave (Uggetti in sod., 2014b). Da lahko resnično optimiziramo produkcijo bioplina, je potrebno vsako vrsto mikroalge posebej testirati za proces anaerobne razgradnje (Ward in sod., 2014).

3 METODE IN MATERIALI

3.1 POTEK DELA

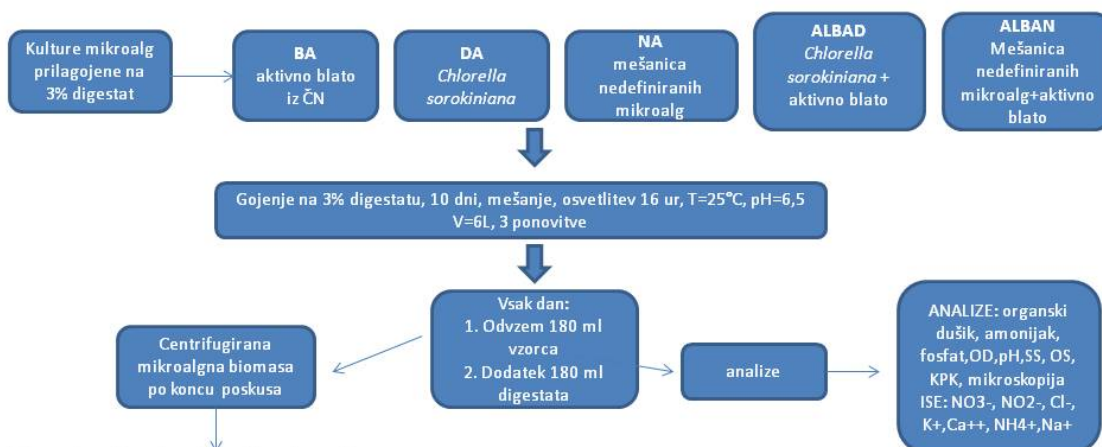
Gojenje mikroalg na digestatu-predhodni poskus



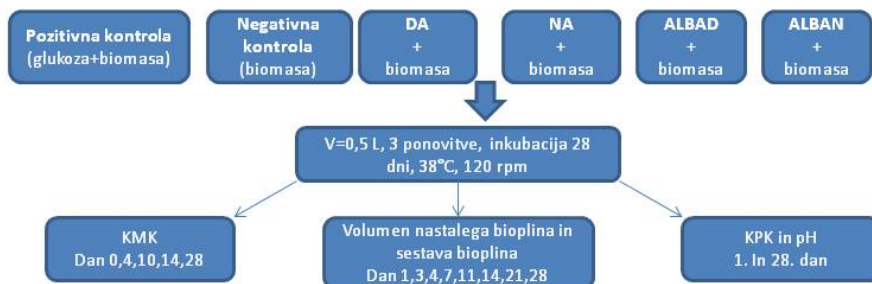
Slika 1: Shema poteka gojenja mikroalg na digestatu- predhodni poskus

OS=organska snov, SS=suha snov, KPK=kemijska potreba po kisiku, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD=definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

Optimizacija gojenja mikroalg na digestatu



Biometanski potencial mikroalgne biomase



Slika 2: Shema poteka dela optimizacije gojenja mikroalg na digestatu ter biometanski potencial

ČN=čistilna naprava, OS=organska snov, SS=suha snov, KPK=kemijska potreba po kisiku, KMK=kratkoverižne maščobne kisline, DA=definirane mikro alge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD=definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato, BA=bakterije-aktivno blato

3.2 GOJENJE MIKROALG V DIGESTATU-PREDHODNI POSKUS

Preizkusili smo gojenje mikroalg in mikroalžno-bakterijskih združb v digestatu iz bioplinske naprave. Za poskus smo uporabili različne mešanice mikroalg in aktivno blato iz Centralne čistilne naprave Domžale Kamnik (CČN Domžale Kamnik). Digestat smo pridobili iz ene izmed slovenskih bioplinarn, kjer kot substrat uporabljajo odpadke iz živilske industrije, biološke odpadke in gnojevko.

3.2.1 Gojenje mikroalgnih kultur

3.2.1.1 Gojenje čistih kultur

Za izvedbo poskusa smo izbrali definirane kulture mikroalg *Chlorella sorokiniana* in *Scenedesmus quadricauda*. Za tak izbor smo se odločili glede na predhodni pregled literature (Abdel-Raouf in sod., 2012; Congestri in sod., 2006; Craggs in sod., 2012; Horan in sod., 2006). Izbrali smo rodove, ki se najpogosteje pojavljajo v odpadnih vodah. Mikroalge smo najprej gojili v predhodno steriliziranem gojišču pripravljenemu iz gnojila Plantfer-U z znano sestavo (Preglednica 1). Plantfer-U smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:300 in tako dobili končno gojišče. V gojišče smo nacepili čiste kulture izbranih mikroalg iz alge banke podjetja AlgEn d.o.o. Kulture smo gojili pod lučmi (6 x 36 W luči Osram Fluora, Nemčija, osvetlitev 16 ur, $87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in jih dnevno premešali. Z mikroskopskim štetjem v števni komori smo na vsakih nekaj dni preverili gostoto celic. Ko so kulture po mikroskopskem štetju dosegle približno 10^7 celic/mL, smo jih precepili v gojišče s 5% digestatom. To gojišče smo pripravili tako, da smo digestat zmešali v ustreznem razmerju z destilirano vodo. Najprej smo mikroalge nagojili v gojišču z avtoklaviranim digestatom, pred začetkom poskusa pa smo jim dodajali čisti digestat.

Preglednica 1: Sestava gnojila Planfer-U

Sestava	%	Koncentracija (g/L)
N	7,8	100
P₂O₅	7,8	100
K₂O	7,03	90
B	0,025	0,3
Co	0,001	0,01
Cu	0,0025	0,3
Fe	0,05	0,6
Mg	0,025	0,3
Mn	0,033	0,4
Mo	0,001	0,01
S	0,075	0,9
Zn	0,025	0,3

3.2.1.2 Gojenje mikroalgne mešanice s periodičnim dodajanjem digestata

Za poskus smo pripravili tudi nedefinirano mešanico mikroalg. V cevnem fotobioreaktorju (podatki o fotobioreaktorju so v Prilogah G-G1) z mešanjem smo pripravili gojišče, tako da smo zmešali 45L vodovodne vode in gnojilo Plantfer-U v razmerju 1:300. V tako pripravljeno gojišče smo vcepili različne nedefinirane mešanice mikroalgnih kultur iz laboratorija v podjetju AlgEn d.o.o. Ko so kulture dosegle gostoto približno 10^7 celic/mL, smo jih dodali digestat v taki količini, da je bila končna koncentracija digestata v

fotobioreaktorju 5 %. Gostoto celic smo določali s štetjem v števeni komori pod mikroskopom.

3.2.2 Merjenje optične gostote

Merili smo absorbcijo kultur s fotometrom (Hanna Instruments HI 83200, ZDA), pri valovni dolžini 525 nm in jih po potrebi redčili z destilirano vodo, da smo dobili približno enako optično gostoto v vseh mikroalgnih kulturah. Valovna dolžina je bila izbrana na podlagi predhodnih poskusov in se je izkazala kot optimalna za zaznavo mikroalg in bakterij v vzorcih.

3.2.3 Določanje vsebnosti suhe snovi v mikroalgnih kulturah in aktivnem blatu

Mikroalgne kulture z ustrezno optično gostoto in aktivno blato smo v mešanicah za poskus zmešali glede na razmerje suhe snovi. Na podlagi predhodnih raziskav smo se odločili, da mikroalge in aktivno blato zmešamo v razmerju suhe snovi 1:1, kar se je izkazalo kot ustrezno razmerje pri obdelavi odpadnih vod (Su in sod., 2012). Suho snov smo po standardni metodi (Standard Methods, 2005) pomerili tako, da smo keramične lončke najprej eno uro sušili pri 105 °C (sušilnik Ehret, Nemčija), jih ohladili v eksikatorju in stehali. Nato smo vanje z avtomatsko pipeto odpipetirali 10 mL vzorca in lončke sušili v sušilniku pri 105 °C do konstantne teže. Po sušenju smo jih ohladili v eksikatorju in ponovno stehali. Vsebnost suhe snovi smo izračunali z enačbo:

$$SS \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{m_{pos} - m_{lon}}{V_{vz}} \right) * 1000 \quad \dots(1)$$

m_{pos} -masa lončka in vzorca po sušenju (g)

m_{Lon} -masa lončka (g)

V_{vz} -volumen vzorca (mL)

Glede na vsebnost suhe snovi smo kulture mikroalg in aktivnega blata zmešali v ustreznem razmerju (Preglednica 2).

Preglednica 2: Sestava mikroalgnih in mikroalžno-bakterijskih mešanic za predhodni poskus

Mešanica	Cs (mL)	Sq (mL)	Mix (mL)	AB (mL)	Digestat (mL)	dH ₂ O (mL)	Skupaj volumen (mL)
DA	1000	1000	/	/	150	850	3000
NA	/	/	2000	/	150	850	3000
ALBAD	1000	1000	/	400	150	450	3000
ALBAN	/	/	2000	400	150	450	3000

Cs=*Chlorella sorokiniana*, Sq=*Scenedesmus quadricauda*, mix=mešanica nedefiniranih mikroalg, AB=aktivno blato, dH₂O=destilirana voda, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD=definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

3.2.4 Priprava mešanic za poskus

Pripravili smo štiri različne mešanice v treh ponovitvah. Mešanice smo poimenovali DA (definirane mikroalge: *C.sorokiniana* in *S.quadricauda*), NA (nedefinirane mikroalge), ALBAD (definirane mikroalge: *C. sorokiniana* in *S.quadricauda* ter aktivno blato iz čistilne naprave) in ALBAN (nedefinirane mikroalge in aktivno blato iz čistilne naprave).

Mešanice smo pripravili v 5 L plastenkah, volumen mešanice je bil 3 L (Preglednica 2). Vsebinsko plastenk smo premešali in uravnali pH vrednost na 6,5 z vpihovanjem CO₂. Plastenke smo inkubirali 7 dni pri osvetlitvi 16 ur dnevno z 6 x 36 W Fluora žarnicami (87 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Mešanice smo med poskusom vsak dan večkrat na dan ročno premešali s stresanjem plastenk. Dnevno smo merili pH vrednost in jo uravnavali na 6,5 z vpihovanjem CO₂. pH vrednost smo izbrali glede na rezultate predhodnih poskusov v AlgEn laboratoriju.

3.2.5 Vzorčenje in obdelava vzorcev

Sedem dni zapored smo vsak dan odvzeli po 150 mL vzorca, pomerili pH vrednost (pH meter Voltcraft, Nemčija), dodali 150 mL svežega neredčenega digestata in uravnali pH na 6,5 z vpihovanjem CO₂. Vzorce smo zamrzili pri -20 °C za nadaljnje analize.

3.2.6 Prirast biomase

Prirast biomase smo spremljali z merjenjem absorbance s fotometrom (Hanna Instruments HI 83200, ZDA) pri valovni dolžini 525 nm.

3.2.7 Merjenje vsebnosti ionov

Med poskusom smo spremljali koncentracijo različnih ionov z ionsko selektivnimi elektrodami (ISE). Merili smo koncentracije NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , Na^+ , Ca^{++} , K^+ , NH_4^+ . Pripravili smo raztopine vseh ionov v standardnih koncentracijah: 0,10,100,500 in 1000 ppm. Uporabljali smo Nico2000 ELIT Ion-Selective Electrodes (Velika Britanija). Meritve smo opravili po navodilih proizvajalca. ISE smo pred meritvami sprali z destilirano vodo, nato smo jih za 1 uro namočili v standardno raztopino s koncentracijo 1000 ppm za izbran ion. Nato smo elektrodo dali v vzorec, izmerili napetost in vrednosti preračunali po navodilih proizvajalca. Elektrode smo med meritvami različnih vzorcev spirali z destilirano vodo. Vsak dan smo pred začetkom merjenja vzorcev elektrode umerili tako, da smo z vsako elektrodo pomerili vse standardne raztopine za izbrani ion. Koncentracije ionov smo pomerili prvi dan pred dodatkom digestata. Med poskusom smo vsak dan pomerili koncentracije ionov v vzorcih, ki smo jih odvzeli preden smo dodali nov digestata.

3.2.8 Merjenje vsebnosti fosfata

50 mL vzorca smo predhodno centrifugirali v centrifugi (Beckman Coulter, ZDA) pri 3200 rpm, 15 minut in za analize uporabili tekoči del vzorca. Vsebnost fosfata smo merili s preparati Hanna Instruments, po metodi Phosphate High Range. Občutljivost metode je v območju 0,0 do 30,0 mg/L. Kiveto smo napolnili z 10 mL vzorca in jo vstavili v fotometer (Hanna Instruments HI 83200, ZDA) kot ničelni vzorec. Nato smo 10 mL vzorca po postopku dodali 10 kapljic reagenta molibdat HI 93717A-O ter eno vrečko reagenta HI 93717B-O, pretresli kiveto in jo vstavili v fotometer. Po preteku petih minut smo iz zaslona fotometra odčitali koncentracijo fosfata. V primeru, da je imel vzorec previsoko koncentracijo fosfata, smo ga ustrezno redčili z destilirano vodo.

3.2.9 Merjenje vsebnosti organskega dušika in amonijaka

Vzorke za analizo organskega dušika in amonijaka smo odmrznili, centrifugirali v centrifugi (Beckman Coulter, ZDA) pri 3200 rpm, 10 minut, združili ponovitve, dobro premešali in jih poslali v analizo v kemijski laboratorij oddelka za Zootehniko na Biotehniški fakulteti. Analiza organskega dušika je bila izvedena po metodi Kjeldahl (Standard Methods, 2005).

3.2.10 Mikroskopija v svetlem vidnem polju

Spremljali smo spremembe strukture združbe preko mikroskopskega pregleda vzorcev. Sveže vzorce smo pogledali in poslikali pod mikroskopom (Olympus, Japonska) pri 100x, 400x in 1000x povečavi. Mikroskopirali smo vzorce prvega in sedmega dne poskusa.

3.2.11 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Naredili smo KPK test za prvi in zadnji dan poskusa. Pripravili smo reagente za KPK test: za pripravo reagenta R1 smo v 500 mL destilirane vode raztopili 10,216 g $K_2Cr_2O_7$, predhodno sušenega dve uri na 105 °C. Dodali smo 167 mL koncentrirane H_2SO_4 in dodali destilirano vodo do 1000 mL. Za reagent R2 smo v 1000 mL koncentrirane H_2SO_4 raztopili 10g Ag_2SO_4 . Reagenta R1 in R2 smo počasi zmešali v razmerju 1,5:3,5 (150 mL R1+350 mL R2). Ker se reagent močno segreje, smo ga pripravili en dan pred uporabo. Za ničelni vzorec smo pripravili še reagent R1, tako da smo 1,67 mL koncentrirane H_2SO_4 dodali destilirano vodo do 10mL. Pripravili smo ničelni vzorec, proti kateremu umerimo vzorce in umeritvene raztopine po končanem testu. Za ničelni vzorec smo zmešali 2,5 mL destilirane vode, 1,5 mL KPK reagenta R1 za ničelni vzorec in 3,5 mL reagenta R2.

Pripravili smo umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami glukoze, za katere lahko izračunamo, kolikšna je kemijska potreba po kisiku iz enačbe za popolno kemijsko oksidacijo glukoze. Pripravili smo raztopine glukoze v različnih koncentracijah (Preglednica 3), tako da smo ustrezno količino glukoze raztopili v destilirani vodi.

Test KPK smo izvedli tako, da smo v epruvete HACH odpipetirali 2,5 mL reagenta KPK, dodali 1,75 mL vzorca in premešali na mešalu. Epruvete smo inkubirali v termobloku (Hach, ZDA) pri 150 °C, 1,5 ure. Po kuhanju smo vzorce pustili, da se ohladijo in nato v kvarčnih kivetah pomerili absorbanco.

Na spektrofotometru smo proti ničelnem vzorcu pomerili absorbanco pri 600 nm. Upoštevali smo, da 1000 mg glukoze ustreza 1070 mg KPK in na podlagi tega izračunali vrednosti za umeritveno krivuljo. Absorbancam, pomerjenim na spektrofotometru smo pripisali ustrezne vrednosti KPK (Preglednica 3).

Vzorce, ki smo jih pred analizo odmrznili, smo centrifugirali pri 3200 rpm, 10 min (centrifuga Beckman Coulter, Allegra x-12R, ZDA). Pelet smo zavrgli in za analize uporabili tekoči del vzorca. Vzorce prvega dneva poskusa smo testirali neredčene, vzorce za sedmi dan poskusa smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:1.

Preglednica 3: Umeritvena krivulja za KPK

Koncentracija glukoze (mg/L)	Vrednost KPK (mg O ₂ /L)	Absorbanca
0	0	0,015
100	107	0,074
300	321	0,130
500	535	0,233
700	749	0,274
1000	1070	0,391

KPK=kemijska potreba po kisiku

3.2.12 Suha in organska snov

Prirast biomase smo spremljali tudi z merjenjem suhe in organske snovi v vzorcih prvi in sedmi dan. Lončke za merjenje suhe snovi smo 1 uro sušili pri 105 °C (sušilnik Ehret, Nemčija) in jih nato ohladili v eksikatorju. Ohlajene lončke smo stekali in vanje odpipetirali 10 mL vzorca. Lončke smo ponovno stekali in sušili pri 105 °C čez noč. Po sušenju smo lončke ponovno stekali in izračunali, koliko suhe snovi je v vzorcu. Uporabili smo enačbo (1).

Lončke s suho snovjo smo žarili v žarilni peči pri 550 °C do konstante teže, jih ohladili v eksikatorju in stekali. Vsebnost organske snovi smo izračunali z enačbo:

$$OS \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{m_{pos} - m_{pož}}{V_{vz}} \right) * 1000 \quad \dots(2)$$

m_{pos} -masa lončka in vzorca po sušenju (g)

$m_{pož}$ -masa lončka po žarjenju (g)

V_{vz} - volumen vzorca (mL)

3.3 OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V DIGESTATU

3.3.1 Gojenje mikroalgnih kultur

3.3.1.1 Gojenje čistih kultur

Uporabili smo kulture *Chlorella sorokiniana* vzgojene v digestatu iz predhodnega poskusa in jih gojili v 3 % digestatu. Gojišče smo pripravili tako, da smo destilirani vodi dodali neredčen digestat do koncentracije 3 %.

3.3.1.2 Gojenje mikroalgne mešanice

Nedefinirano mešanico mikroalg smo pripravili v fotobioreaktorju. Dodali smo 45 L vodovodne vode, 160 mL gnojila Plantfer-U (razmerje gnojilo:voda = 1:300) ter približno 3 L mešanih algnih kultur iz predhodnih poskusov ter alge banke. Kulturo smo en teden gojili v tem gojišču, nato smo ji začeli dodajati digestat do koncentracije 1 %. Pred začetkom poskusa smo ustavili mešanje v fotobioreaktorju, odstranili večino gojišča ter uporabili posedeno biomaso mikroalg za pripravo nove mešanice v novem fotobioreaktorju. Tudi tega smo pripravili na isti način kot prvega. Po enem tednu smo začeli dodajati digestat do koncentracije 3 %.

3.3.2 Določanje vsebnosti suhe snovi

Za pripravo mešanic za poskus smo čistim kulturam mikroalg, mešanici mikroalg in aktivnemu blatu iz CČN Domžale-Kamnik pomerili vsebnost suhe snovi. Na podlagi predhodnega poskusa in informacij iz literature (Su in sod., 2012) smo se odločili, da mikroalge in aktivno blato namešamo glede na razmerje suhe snovi in sicer v razmerju 3:1 za mikroalge. Suho snov smo pomerili po enakem postopku kot pri predhodnem poskusu.

3.3.3 Priprava mešanic za poskus

Mešanice smo poimenovali enako kot v predhodnem poskusu (DA, NA, ALBAD in ALBAN), dodali pa smo še mešanico BA (bakterije: aktivno blato iz čistilne naprave). Začetne mešanice smo namešali tako, da je bila suha snov mikroalge : aktivno blato v razmerju 3:1, skupni volumen mešanice pa 6 L. Mešanice smo imeli v 10 L plastenkah z mešali (Slika 3). Mešala smo sestavili iz motorčkov in plastične osi, na katero smo dali majhen propeler. Mešala so bila pritrjena na pokrov, skozi pokrov so bile zvrtnane luknje, v

katere smo dali plastične cevke, skozi katere smo dodajali digestat, odvezemali vzorce in omogočali prehajanje plinov. Vsaka mešanica je bila v treh ponovitvah.

Poskus je potekal 10 dni. Mešanje je potekalo 24 ur na dan, vsak dan smo odvzeli 180 mL vzorca in pomerili pH vrednost. Nato smo dodali 180 mL digestata ter uravnali pH na 6,5 s prepihanje s CO₂. Mešanico BA smo 24 ur na dan prepihovali še z zrakom. Sobna temperatura je bila ~25 °C. Zaradi zagotavljanja enakomerne osvetljenosti smo mešanice vsak dan prestavljali, saj nismo uspeli zagotoviti enakomerne osvetljenosti na vseh pozicijah. Povprečna osvetljenost je bila 108 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Mešanice smo osvetljevali 16 ur na dan, z lučmi (6 x 36 W luči Osram Fluora, Nemčija) in reflektorji (50 W, V-TAC, Kitajska).

Preglednica 4: Začetne mešanice za poskus optimizacije gojenja mikroalg na digestatu

Mešanica	Cs (mL)	Mix (mL)	Aktivno blato (mL)	Digestat (mL)	dH ₂ O (mL)	SKUPAJ (mL)
BA	/	/	86	180	5734	6000
DA	1846	/	/	180	3974	6000
NA	/	4800	/	180	1002	6000
ALBAD	1864	/	86	180	3888	6000
ALBAN	/	4800	86	180	934	6000

Cs=*Chlorella sorokiniana*, mix=mešanica nedefiniranih mikroalg, dH₂O=destilirana voda, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD=definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato, BA=bakterije-aktivno blato



Slika 3: Plastenke in mešala uporabljena v poskusu. Cevke služijo za dovod plinov in odvzem vzorcev.

3.3.4 Vzorčenje in obdelava vzorcev

Dnevno smo odvzeli 180mL vzorca, pomerili optično gostoto, pH vrednost in vsebnost ionov. Ostanek vzorca smo centrifugirali pri 8000 rpm, 15 minut (centrifuga Bluewave, Kitajska). Supernatant smo shranili za analize fosforja, organskega dušika, amonijaka in KPK, pelet pa za vsebnost suhe in organske snovi. Vzorce smo do analiz zamrznili pri -20 °C.

3.3.5 Merjenje optične gostote

Enak postopek kot pri predhodnem poskusu.

3.3.6 Merjenje vsebnosti ionov

Enak postopek kot pri predhodnem poskusu. Začetne koncentracije ionov so se med različnimi mešanici razlikovale, saj smo z mikroalgnimi kulturami, ki so bile predhodno gojene na digestatu, v mešanice vnesli različne koncentracije hranil.

3.3.7 Merjenje vsebnosti fosfata

Enak postopek kot pri predhodnem poskusu.

3.3.8 Merjenje vsebnosti organskega dušika in amonijaka

Združili smo ponovitve za posamezno mešanico med sabo in poslali v analizo vzorce za prvi, četrti, sedmi in deseti dan.

3.3.9 Mikroskopija

Vzorce smo mikroskopirali prvi, četrti, sedmi in deseti dan poskusa po enaki metodi kot pri predhodnem poskusu.

3.3.10 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

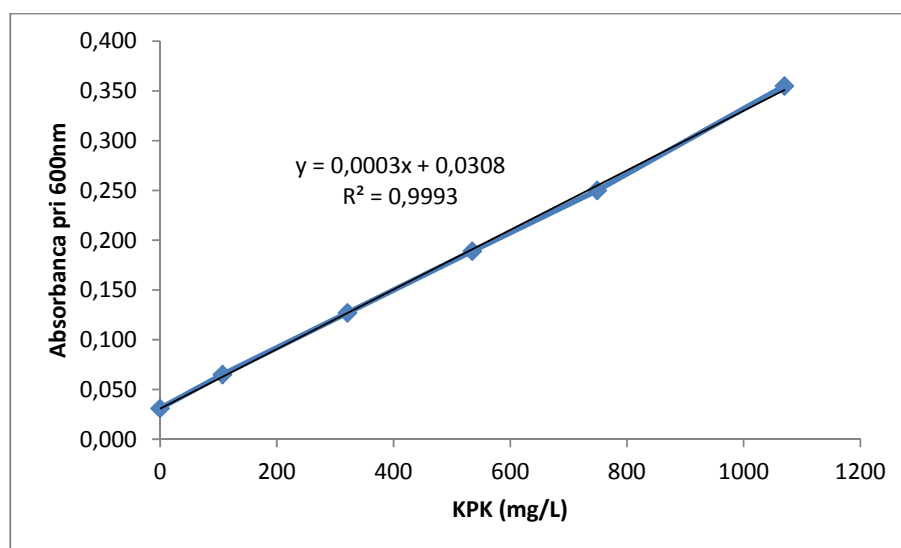
KPK test smo izvedli za vzorce od prvega in zadnjega dne poskusa. Pripravili smo raztopino za razgradnjo 1 (R1) tako, da smo k 500 mL destilirane vode dodali 10,216 g $K_2Cr_2O_7$, predhodno sušenega dve uri pri 105 °C. Dodali smo 167 mL koncentrirane H_2SO_4 , raztopil, ohladili na sobno temperaturo in dopolnili z destilirano vodo do 1000 mL. Reagent z žvepleno kislino (R2) smo pripravili tako da smo dodali 10,120 g $AgSO_4$ na 1000 mL H_2SO_4 . Pustili smo stati en dan, da se je raztopilo in premešali.

Vzorci prvega dne nismo redčili, vzorce zadnjega dne poskusa smo redčili z destilirano vodo v razmerju 1:1.

Test KPK smo izvedli tako, da smo v epruvete HACH odpipetirali 2,5 mL vzorca in dodali 1,5 mL R1. Nato smo previdno dodali še 3,5 mL R2, tako da smo ustvarili sloj kisline pod vzorcem in R1. Epruvete smo zaprli s pokrovčkom in nekajkrat obrnili, da se je vsebina premešala.

Epruvete smo postavili v predhodno segret termoblok (Hach, ZDA) pri 150 °C ter inkubirali dve uri. Po kuhanju smo vzorce pustili, da se ohladijo in nato v plastičnih kivetah za enkratno uporabo pomerili absorbanco pri 600 nm. Predhodno smo v spektrofotometer vnesli vrednosti za umeritveno krivuljo, ki je bila že vnaprej pripravljena (Slika 4).

Kot ničelni vzorec smo uporabili destilirano vodo, ki smo ji dodali KPK reagente po enakem postopku kot vzorcem.



Slika 4: Umeritvena krivulja za KPK 2, pripravljena s standardnimi raztopinami glukoze

3.3.11 Suha in organska snov

Suho in organsko snov smo pomerili za prvi, četrti, sedmi in deseti dan poskusa. Keramične lončke smo posušili v peči pri 105°C in jih ohladili v eksikatorju. Lončke smo stehali in nato vanje prenesli zamrznjene pelete, ki smo jih shranili po koncu poskusa, ko smo vzorce centrifugirali. Lončke z vzorci smo sušili do konstantne teže pri 105°C. Nato smo jih ohladili v eksikatorju, stehali in žarili v žarilni peči pri 550°C do konstantne teže. Po žarjenju smo lončke ponovno ohladili v eksikatorju in stehali. Vsebnost suhe in organske snovi smo izračunali z enačbama (1) in (2).

3.4 BIOMETANSKI POTENCIAL MIKROALGNE BIOMASE VZGOJENE V DIGESTATU

3.4.1 Priprava mikroalgne biomase za pridobivanje bioplina

Biomaso mikroalg smo pridobili med poskusom, ki je opisan v poglavju 3.3. Mikroalžno biomaso smo po koncu omenjenega poskusa redčili, tako da smo dodali 2 L vode, ter pustili v plastenkah z mešanjem še dva tedna. Nato smo izklopili mešanje, počakali, da se je biomasa usedla in s peristaltično črpalko (LongerPump, Kitajska) odstranili tekoči del gojišča. Posedeno biomaso (približno 2 L na mešanico) smo nato centrifugirali in združili paralelne vzorce, tako da smo na koncu imeli biomaso iz mešanic DA, NA, ALBAD in ALBAN. Vzorce smo do začetka testa metanskega potenciala (BMP testa) zamrznili pri -20 °C. Pred začetkom BMP testa smo biomaso odmrznili, homogenizirali s homogenizatorjem in redčili z destilirano vodo, tako da smo 50 g biomase vsake mešanice zamešali v 450 g destilirane vode. Tako pripravljeno biomaso smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.2 Priprava anaerobne mikrobne biomase za inokulum v BMP testu

Za poskus smo uporabili anaerobno metanogeno biomaso iz bioplinarne Ihan, kjer je proces mezofilen. Biomaso smo predhodno en teden stabilizirali v inkubatorju pri 38 °C.

3.4.3 Suha snov in organska snov

Da smo lahko izračunali, koliko mikroalgnih mešanic, ki predstavljajo substrat, in koliko mikrobne biomase iz bioplinarne moramo dati v mešanice za poskus, smo izmerili suho snov. Uporabili smo postopek opisan pri poglavju 3.2.12.

3.4.4 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Za izračun obremenitve anaerobne mikrobne biomase s substratom smo potrebovali podatke o kemijski potrebi po kisiku za preizkušane substrate-mikroalžno biomaso. Vzorce, pripravljene kot opisano v točki 3.3.1 smo redčili 20 X in izvedli KPK test. Regente za test smo pripravili po enakem postopku kot pri točki 3.2.11.

Pripravili smo umeritveno krivuljo s standardnimi koncentracijami glukoze, tako da smo ustrezno količino glukoze raztopili v destilirani vodi. Nato smo za te vzorce izvedli test KPK.

Test KPK smo izvedli tako, da smo v epruvete HACH odpipetirali 5 mL reagenta KPK, dodali 2,5 mL vzorca mikroalgnih mešanic oz vzorca s standardnimi koncentracijami glukoze in premešali na mešalu. Epruvete smo inkubirali v termobloku pri 150 °C, 2 uri. Po inkubaciji smo vzorce pustili, da se ohladijo in nato v kvarčnih kivetah pomerili absorbanco.

Vzorce smo pomerili na spektrofotometru kot opisano pri točki 3.2.11.

3.4.5 Izračun obremenitve anaerobne mikrobne biomase s substratom

Na podlagi podatkov za suho snov, organsko snov in KPK, smo izračunali, koliko mikroalgnega substrata in anaerobne mikrobne biomase inokuluma moramo dati v posamezno poskusno mešanico za merjenje metanskega potenciala. Volumen mešanic je bil 500 mL. Mikrobno biomaso smo obremenili tako, kot je prikazano v preglednici 5. Obremenitev smo izbrali glede na predhodne teste biometanskega potenciala. Prav tako smo na enak način izbrali koncentracijo biomase inokuluma, ki je 2 g OS/L mešanice (Deublein in Steinhauser, 2008).

Preglednica 5: Obremenitev mikrobne biomase v testu biometanskega potenciala

Testna mešanica	Obremenitev (g KPK substrata/1g OS biomase)
Negativna kontrola	/
Pozitivna kontrola	0,2
Mikroalgne mešanice	0,2

OS=organska snov, KPK=kemijska potreba po kisiku

Volumen biomase inokuluma smo izračunali z enačbo:

$$V_1 = \frac{c_2 * V_2}{c_1} \quad \dots(3)$$

c_1 - organska snov za mikrobno biomaso inokuluma (g OS/L)

V_2 - volumen mešanice v steklenicah (L)

c_2 -koncentracija mikrobne biomase (g OS/L)

V_1 -volumen mikrobne biomase inokuluma, ki ga dodamo v testne mešanice (L)

Volumen mikroalnega substrata, ki ga dodamo v testne mešanice smo izračunali z enačbo:

$$V_{vz} = \frac{\text{obremenitev}}{\text{KPK substrata}} * 1000 \quad \dots(4)$$

V_{vz} -volumen mikroalnega substrata (mL)

obremenitev- koliko obremenimo biomaso (g KPK substrata/ 1g OS biomase)

KPK substrata- vrednost izmerjenega KPK za substrate (g KPK/L)

Z enako enačbo smo izračunali tudi, koliko glukoze damo v testno mešanico za pozitivno kontrolo.

3.4.6 Priprava mešanic za test biometanskega potenciala

Test biometanskega potenciala smo izvedli v litrskih steklenicah, delovni volumen je bil 500 mL (Slika 5). Pripravili smo 6 mešanic: pozitivno kontrolo, kjer smo uporabili glukozo kot substrat, negativno kontrolo brez substrata, ter mešanice kjer so bile substrat mikroalge iz poskusa optimizacije gojenja mikroalg v digestatu: DA, NA, ALBAD, ALBAN. Vse vzorce smo testirali v treh ponovitvah.

Pripravili smo deoksigenirano vodo, tako da smo vodovodno vodo prekuhali, da je zavrela in jo prelili v steklenice ter nepredušno zaprli. Fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo pripravili raztopino 1 in raztopino 2 (Preglednica 6) ter ju zmešali v enakovrednih količinah. Pufer smo prevreli in ga do uporabe hranili v hladilniku.

Testne mešanice smo zmešali glede na predhodne izračune (Preglednica 7) v digestoriju, ob stalnem prepihanju z dušikom. Za zagotavljanje anaerobnosti smo najprej 15 minut prepihovali steklenice in nato še mikrobnno biomaso, mikroalgi substrat, fosfatni pufer ter vodo. Preden smo steklenice nepredušno zaprli z gumijastimi zamaški in aluminijastimi navojnimi pokrovčki, smo jih prepihovali z dušikom še 20 minut, odvzeli vzorce za dan 0 in steklenice dali v inkubator pri 38 °C s stresanjem pri 120 rpm za 28 dni. Stekleno steno inkubatorja smo prekrili z aluminijasto folijo in tako preprečili dostop svetlobe.



Slika 5: Steklenice s testnimi mešanicami za test metanskega potenciala

Preglednica 6: Sestava fosfatnega pufra

Raztopina 1	
KH₂PO₄	45,06 g
Destilirana voda	1000 mL
Raztopina 2	
Na₂HPO₄x 2H₂O	97,54 g
Destilirana voda	1000 mL

Preglednica 7: Sestava testnih mešanic na začetku poskusa

Testna mešanica	DA	NA	ALBAD	ALBAN	NK	ST
Mikrobna biomasa (mL)	69	69	69	69	69	69
Glukoza (g)	/	/	/	/	/	0,187
Mikroalge (mL)	23	19	25	18	/	/
Fosfatni pufer (mL)	20	20	20	20	20	20
Voda (mL)	388	392	386	393	411	411
SKUPAJ (mL)	500	500	500	500	500	500

DA=definirane alge, NA=nedefinirane alge, ALBAD=definirane alge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane alge in aktivno blato, NK=negativna kontrola, ST= pozitivna kontrola

3.4.7 Odvzem in analiza vzorcev

Preden smo steklenice postavili v inkubator smo iz vsake odvzeli 50 mL vzorca, ki smo mu pomerili pH vrednost s pH-metrom ter vzorec zakisali z 0,5 mL 50 % H₂SO₄, ter shranili v hladilnik do analize KPK. Z injekcijsko brizgalko smo preko gumijastega pokrovčka odvzeli 3 mL vzorca za analizo KMK in vzorce v mikrocentrifugirkah zamrznili do analiz.

Meritve nastalega volumna bioplina smo izvedli za dneve 1,3,4,7,11,14,21 in 28. Meritve KMK smo opravili za dneve 0,4,14 in 28. Zadnji dan poskusa smo ponovno odvzeli 50 mL vzorca iz vsake steklenice, pomerili pH vrednost in zakisali vzorce za KPK test.

3.4.7.1 Merjenje volumna proizvedenega bioplina

Količino proizvedenega bioplina smo spremljali z merjenjem razlik v tlaku v steklenicah z vodnim stolpcem (Hansen in sod., 2004). V zamašek na steklenici smo potisnili iglo z brizgalko in ko se je vodni stolpec izravnal, zabeležili volumen nastalega bioplina na brizgalki. Volumen bioplina, nastalega na posamezni dan, smo tekom poskusa seštevili, da smo dobili skupno produkcijo bioplina. Dobljene volumne smo nato standardizirali, tako da smo upoštevali tlak in temperaturo v času poskusa; za izračun smo uporabili splošno plinsko enačbo:

$$V_0 = \frac{P_x * V_x * T_0}{T_x * P_0} \quad \dots(5)$$

T₀-273 K

P₀-1013 hPa

P_x-tlak v laboratoriju (hPa)

V_x -izmerjen volumen bioplina (mL)

T_x -izmerjena temperatura v laboratoriju (K)

Podatke o povprečnem tlaku na določen dan smo pridobili na spletni strani Agencije Republike Slovenije za Okolje (ARSO, 2014).

3.4.7.2 Merjenje sestave pridobljenega bioplina

Sestavo plinov smo spremljali z analizo vzorcev bioplina na plinskem kromatografu Shimadzu 14A z detektorjem TCD. Ločevanje plinov je potekalo na jekleni koloni dolžine 4 m, premera 1/8", polnjeni s polnilom PORAPAK Q. Kot nosilni plin smo uporabili helij, pretok 25 mL/min. Temperatura injektorja je bila 50 °C, temperatura kolone 30 °C, temperatura detektorja 80°C in temperatura detektorskega bloka 80°C. Realni tok na detektorju je bil 60 mA. Za kalibracijo kromatografa smo uporabili standardno mešanico plinov (vbrizgano 100 µl) v sestavi 15,3 % H₂, 19,9 % N₂, 20,3 % CH₄, 44,5 % CO₂. Za izpis podatkov smo uporabili integrator Chromatopac C-R6A, Shimadzu. Vsak dan vzorčenja smo odvzeli 100 µl vzorca s plinotesno brizgalko in ga vbrizgali v injektor.

3.4.7.3 Analiza kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Za dneve 0,4,10,14 in 28 smo odvzeli 3 mL vzorca iz vsake steklenice. To smo naredili tako, da smo iglo zapičili v gumijasti zamašek in odvzeli 3mL tekočine iz vsake steklenice s testnimi mešanicami. Vzorce smo do analize zmrznili pri -20 °C.

Vzorce za kratkoverižne maščobne kisline (KMK) smo odmrznili in centrifugirali 1 min pri 10000 rpm (Eppendorf MiniSpin, Nemčija). Nato smo izvedli etrsko ekstrakcijo KMK po postopku, ki je opisan v Anaerobe Manual (Holdeman, 1977). V epruvete HACH smo dodali 0,4 g sušenega NaCl ter dodali 1 mL vzorca. Hkrati smo ekstrahirali tudi standardno mešanico KMK. V epruvete z vzorci in standardno mešanico smo dali 100 µl internega standarda (krotonska kislina). Nato smo dodali 200 µl 50 % H₂SO₄ ter dodali 1 mL dietiletra. Epruvete smo stresali gor in dol 20 X ter jih nato centrifugirali v centrifugi (Janetzki) do 2000 obratov. Zgornjo etrsko fazo smo s Pasteurjevo pipeto prenesli v drugo epruveto HACH. V prvo pipeto smo še enkrat dodali 1 mL dietiletra, stresali in ponovno centrifugirali ter prenesli zgornjo etrsko fazo in jo združili s tisto od prvega centrifugiranja. V epruvete s preneseno etrsko fazo smo dodali eno malo spatulo CaCl₂ in jih dobro zaprli ter do analize shranili v hladilniku. Med celotnim postopkom so bile epruvete dobro zaprte s pokroveci.

Kratkoverižne maščobne kisline smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu 14A s plamensko ionizacijskim detektorjem. Kot nosilni plin smo uporabili helij. Temperatura injektorja je bila 160 °C, temperatura detektorja 210 °C, začetna temperatura kolone 90 °C, končna T kolone 160 °C. Čas ohranjanja začetne temperature je 4 minute, čas ohranjanja končne temperature je 2 minuti. Po temperaturnem programu smo kolono dogrevali s hitrostjo 15 °C/min. Za umeritev smo uporabili standardne koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin (Preglednica 8). Vbrizgali smo 100 µl vzorca v injektor, analiza je potekala 12 minut. Za izpis podatkov smo uporabili integrator Chromatopac C-R6A, Shimadzu.

Preglednica 8: Standardne koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin

Kratkoverižna maščobna kislina	Koncentracija (g/L)
propionska	0,495
izo-maslena	0,475
maslena	0,480
izo-valerenska	0,465
valerenska	0,470
kapronska	0,465

3.4.7.4 Skupna produkcija bioplina

Skupno produkcijo bioplina smo izračunali tako, da smo izmerjene volumne bioplina najprej standardizirali (opisano pri točki 3.4.7.1), nato pa smo jih sešteli po dnevih za vsako mešanico posebej. Za mešanico NK (negativna kontrola) smo izračunali povprečje ter to vrednost odšteli od vrednosti vsake od mešanic. Izračunali smo povprečje treh ponovitev in dobili podatek o tem, koliko bioplina je skupno nastalo na koncu poskusa v vsaki od mešanic, pri danih pogojih.

3.4.7.5 Skupna produkcija metana

Za vsak dan poskusa smo izračunali volumen nastalega metana (mL), tako da smo standardiziran volumen nastalega bioplina na določen dan množili z deležem metana. Uporabili smo enačbo:

$$V(CH_4) = \left(\frac{c_1}{c_1 + c_2} \right) * V(bpst) \quad \dots(6)$$

c1-koncentracija metana, podatek iz kromatografa

c2-koncentracija ogljikovega dioksida, podatek iz kromatografa

$V_{(bpstd)}$ -standardiziran volumen bioplina (mL)

Dobljene volumne metana po dnevih smo sešteli in tako dobili skupno produkcijo metana. Na koncu smo izračunali povprečja treh paralelk.

3.4.7.6 Volumen nastalega metana na 1g KPK substrata

Preračunali smo, koliko metana je nastalo na 1 g KPK substrata. To smo naredili tako, da smo vrednosti skupnega volumna metana, izmerjenega na 28. dan, delili z vrednostjo KPK, s katero smo začeli poskus in z enačbo 7 preračunali na 1 g KPK substrata:

$$V(CH_4 \text{ na } 1gKPK) = V(CH_4 t28)/obremenitev \quad \dots(7)$$

$V_{(CH_4 t28)}$ - volumen celokupnega metana na 28. dan (mL)

obremenitev- g KPK substrata/1g OS biomase

3.4.7.7 Izplen metana glede na teoretični izplen metana

Teoretični izplen metana je 350 mL na 1g KPK substrata (Dublein in Steinhauser, 2008). Delež metana, nastalega v našem poskusu, glede na teoretični izplen metana smo preračunali po enačbi:

$$CH_4 (\%) = \frac{V * 100}{350 \text{ ml}} \quad \dots(8)$$

V- volumen metana na 1g KPK substrata (mL)

3.4.7.8 Meritve pH vrednosti

Vrednosti pH v mešanicah na prvi in zadnji dan poskusa smo pomerili s pH-metrom, ki smo ga prej umerili na vrednosti med pH=4 in pH=10. Elektrodo smo sprali z destilirano vodo in pomočili v vzorec. Iz pH metra smo odčitali vrednost. Elektrodo smo po vsakem merjenju ponovno sprali z destilirano vodo.

3.4.7.9 Kemijska potreba po kisiku

Za prvi in zadnji dan smo pomerili vrednosti KPK z metodo, ki je opisana v točki 3.2.11.

4 REZULTATI

4.1 RAST MIKROALG V DIGESTATU-PREDHODNI POSKUS

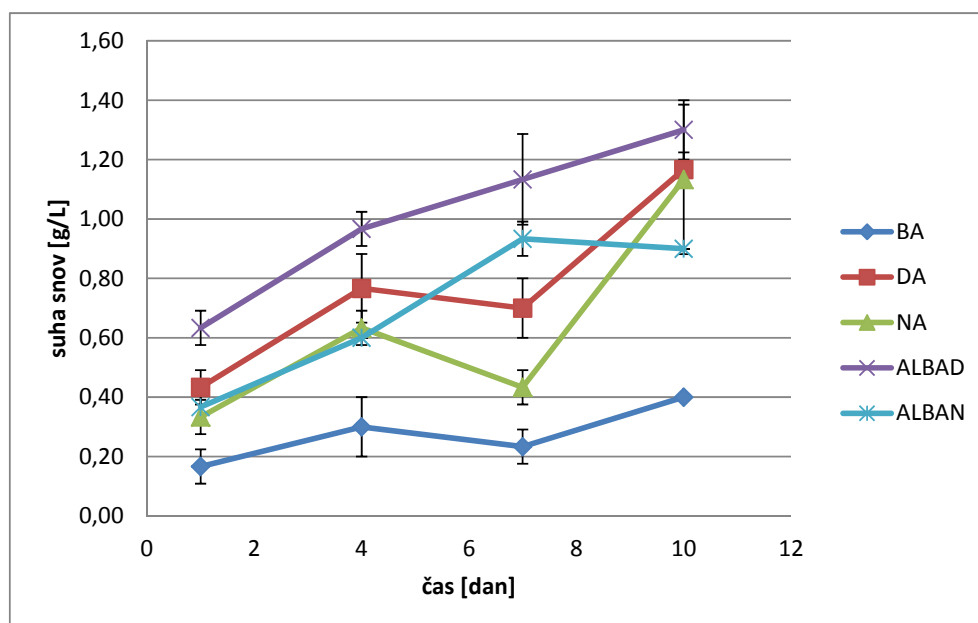
Rezultati rasti mikroalg v digestatu iz predhodnega poskusa so prikazani v prilogah (Priloge A-F). Rezultate meritev fosfata zaradi napak pri izvedbi meritev (posledica premajhne količine vzorca) nismo vključili.

4.2 OPTIMIZACIJA GOJENJA MIKROALG V DIGESTATU

4.2.1 Priraščanje biomase

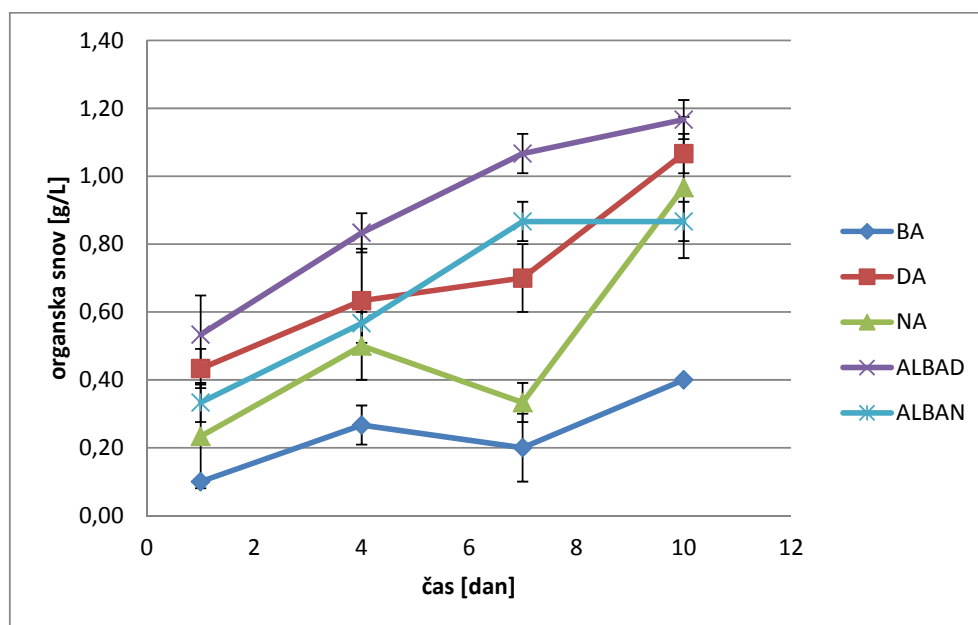
Priraščanje biomase smo spremljali preko naraščanja suhe in organske snovi v mešanicah ter z optično gostoto (OD). Suha snov v vseh mešanicah je med poskusom naraščala (Slika 6). Tudi organska snov je tekom poskusa naraščala v vseh mešanicah (Slika 7). Opazili smo, da večino suhe snovi predstavlja organska snov. Začetne in končne koncentracije suhe ter organske snovi za vse mešanice so prikazane v prilogi H. Enak trend naraščanja vrednosti je viden tudi pri merjenju OD (Slika 8). Vrednost OD se je tekom poskusa povečevala v vseh mešanicah, kar kaže na naraščanje vsebnosti biomase. Na sliki, ki prikazuje OD, ni prikazana mešanica BA, ker je bila barva digestata pretemna in rezultati meritev niso zanesljivi.

Vsebnost organske snovi v digestatu je ~3 % (podatki iz bioplinarne).



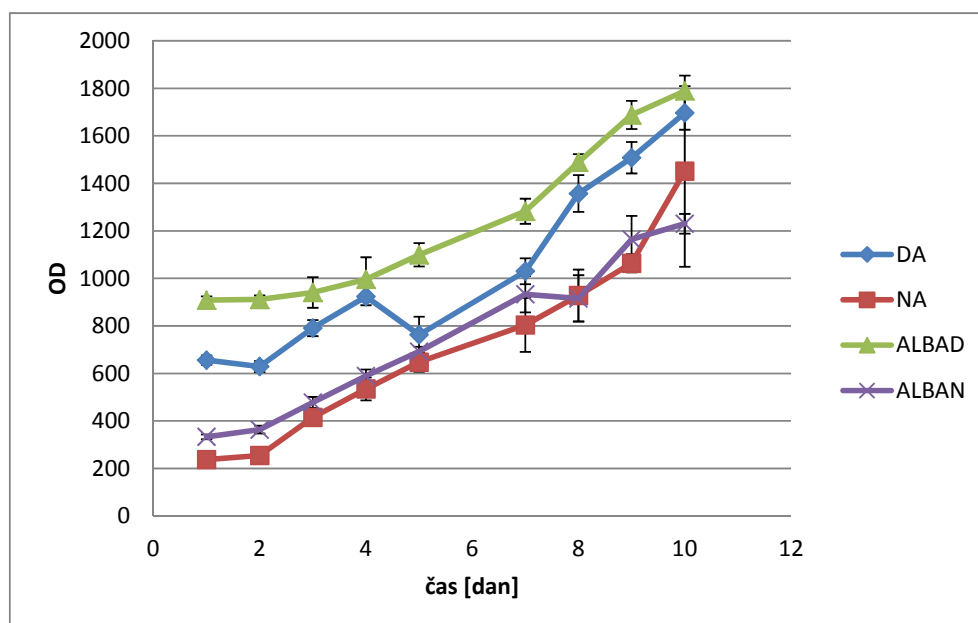
Slika 6: Naraščanje suhe snovi v vzorcih za poskus optimizacije gojenja mikroalg

BA=aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD=definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato



Slika 7: Naraščanje organske snovi v vzorcih za poskus optimizacije gojenja mikroalg

BA=aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato



Slika 8: Naraščanje OD (optične gostote) med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato,
ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

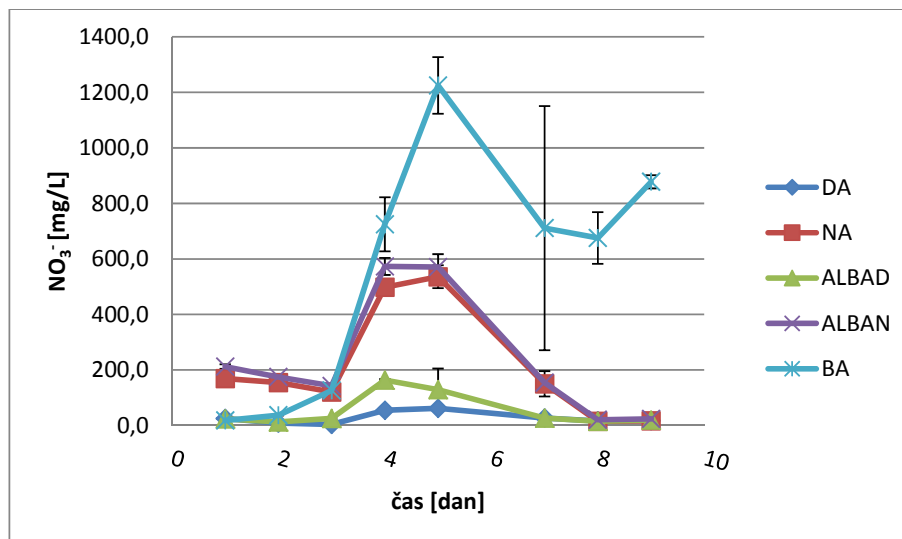
4.2.2 Poraba hranil

Zaradi težav z elektrodami na zadnji dan poskusa, so prikazani rezultati meritev hranil od prvega do devetega dne poskusa, iz rezultatov smo izločili deseti dan. Koncentracije hranil v mešanicah NA in ALBAN so bile na začetku poskusa občutno višje kot pri ostalih mešanicah. Vzrok za to je v pripravi mešanic za poskus. Pri pripravi nedefiniranih mikroalgnih mešanic smo imeli težave z vzdrževanjem kulture v bioreaktorju, zato je bila kultura pred začetkom poskusa manj prilagojena na digestat in so bile koncentracije hranil v mešanicah NA in ALBAN višje. Koncentracije hranil v 100 % digestatu in 3 % digestatu so prikazane v preglednici 9.

Preglednica 9: Koncentracija hranil v 100 % in 3 % digestatu

Hranilo	Koncentracija v 100 % digestatu (mg/L)	Koncentracija v 3 % digestatu (mg/L)
Ca^{++}	372	11,2
Cl^-	1860	55,8
K^+	563	16,9
Na^+	1910	57,3
NH_4^+	1300	39,0
NO_2^-	107	3,21
NO_3^-	23	0,7

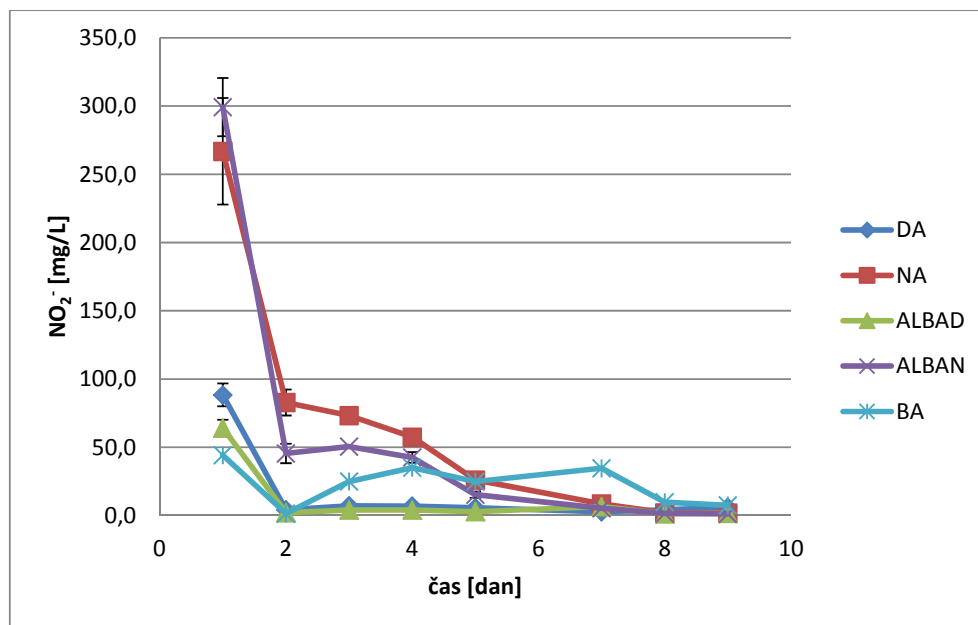
Koncentracije nitrata so se prvi dan poskusa gibale med 18,2 mg/L (BA) ter 212,3 mg/L (ALBAN) (Slika 9). Koncentracija nitrata je bila do tretjega dne v mešanica z mikroalgami približno enaka začetnim, nato pa so vrednosti v vseh mikroalgnih mešanicah narasle. Najbolj v mešanicah NA in ALBAN, ki sta že na začetku imeli višje vrednosti. Do ponovnega padca je v vseh mešanicah prišlo po petem dnevu poskusa. Zadnji dan poskusa so bile koncentracije nitrata v vseh mikroalgnih mešanicah približno enake ter hkrati nižje od začetnih. Vrednosti na deveti dan poskusa so se gibale med 16,7 mg/L (NA) in 24 mg/L (ALBAN). Od mikroalžno bakterijskih mešanic najbolj odstopa mešanica z bakterijami (BA), kjer je bila začetna koncentracija nitrata 18,2 mg/L, nato pa se je dvigovala in najvišje vrednosti dosegla približno na sredini poskusa. Po petem dnevu so se vrednosti nitrata v mešanici BA znižale, nato pa so se sedmi dan zopet dvignile in ostale precej višje kot v ostalih mešanicah, 878,1 mg/L (Slika 9).



Slika 9: Spreminjanje koncentracije NO_3^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

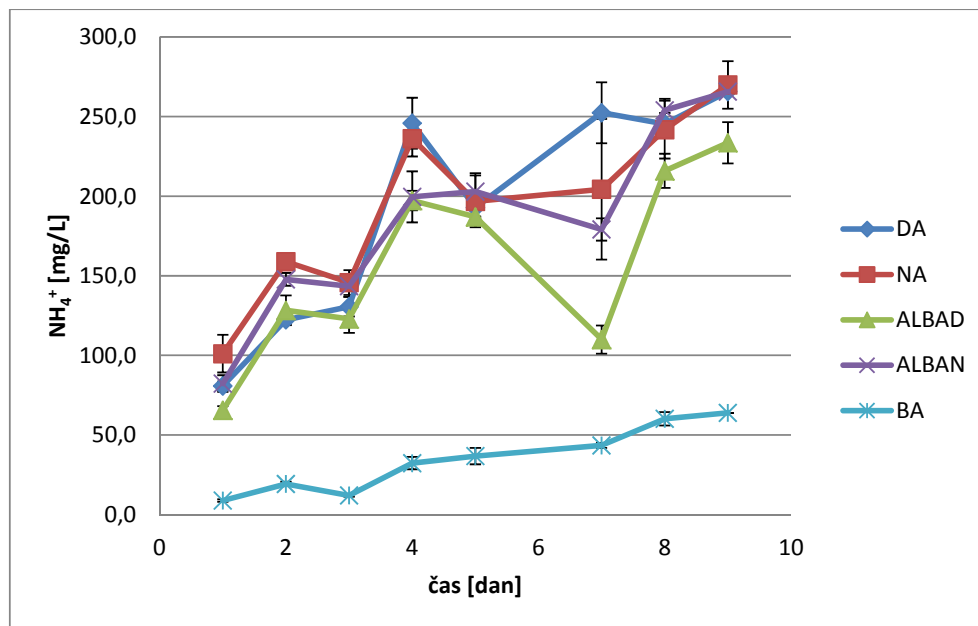
Koncentracije nitrita so bile v mešanicah NA (266,8 mg/L) in ALBAN (299,2 mg/L) prvi dan poskusa precej višje kot v mešanicah DA (88,4 mg/L), ALBAD (64,1 mg/L) ter BA (44,2 mg/L). Koncentracija nitrita se je v vseh mešanicah znižala takoj na začetku poskusa in ostala nižja od začetnih vrednosti do konca poskusa. Vrednosti nitrita na koncu poskusa so se gibale med 1,2 mg/L (ALBAN) ter 7,9 mg/L (BA) (Slika 10).



Slika 10: Spreminjanje koncentracije NO_2^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

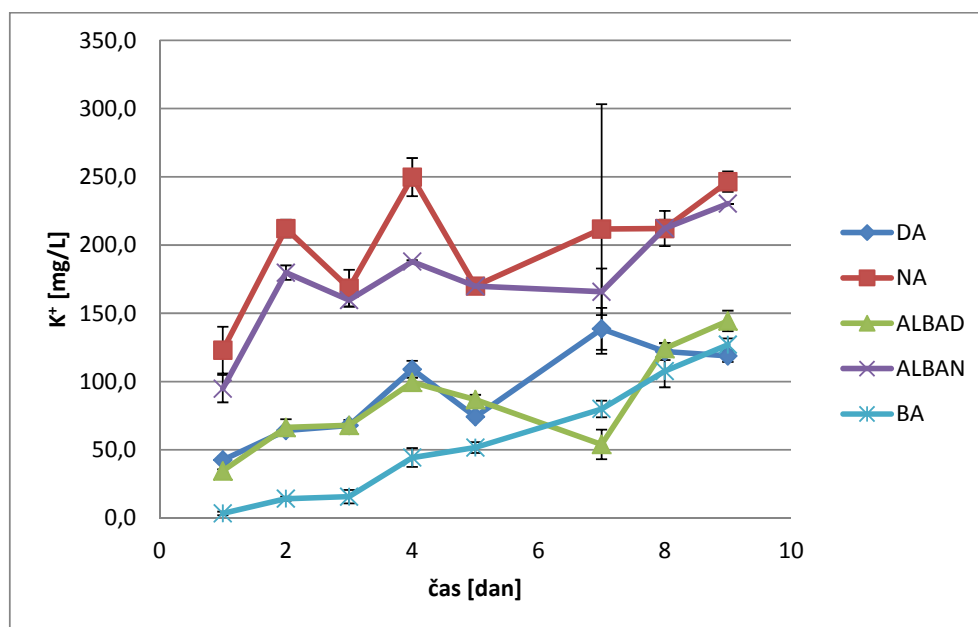
Koncentracija amonija je bila prvi dan najnižja v mešanici BA (8,9 mg/L), v ostalih mešanicah pa je bila koncentracija med 65,5 mg/L (ALBAD) in 101,1 mg/L (NA). Koncentracija amonija je med poskusom naraščala v vseh mešanicah (Slika 11). Koncentracija amonija na 9. dan poskusa je bila v mešanici BA 63,9 mg/L, v ostalih mešanicah pa so se vrednosti gibale med 233,6 (ALBAD) in 269,9 mg/L (NA).



Slika 11: Spreminjanje koncentracije NH_4^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

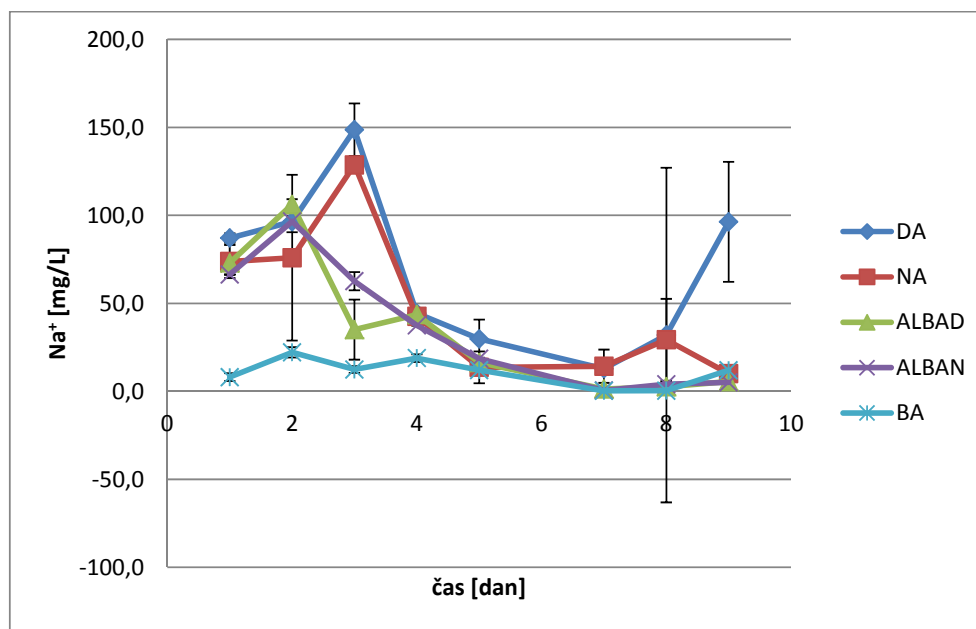
Koncentracija kalija je bila prvi dan najnižja v mešanici BA (3,3 mg/L), v ostalih mešanicah pa so se vrednosti gibale med 34,5 mg/L (ALBAD) in 123 mg/L (NA). Koncentracija kalija je med poskusom naraščala v vseh mešanicah. Mešanici NA in ALBAN sta imeli že na začetku višje vrednosti kot mešanice DA, ALBAD in BA. Kot je razvidno na sliki 12, je koncentracija kalija enakomerno naraščala v mešanici BA, v mešanicah z mikroalgami pa je prihajalo do nihanj. 9. dan poskusa so bile koncentracije kalija v vseh mešanicah višje kot prvi dan; vrednosti so se gibale med 118,8 mg/L (DA) in 246,5 mg/L (NA).



Slika 12: Spreminjanje koncentracije K^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

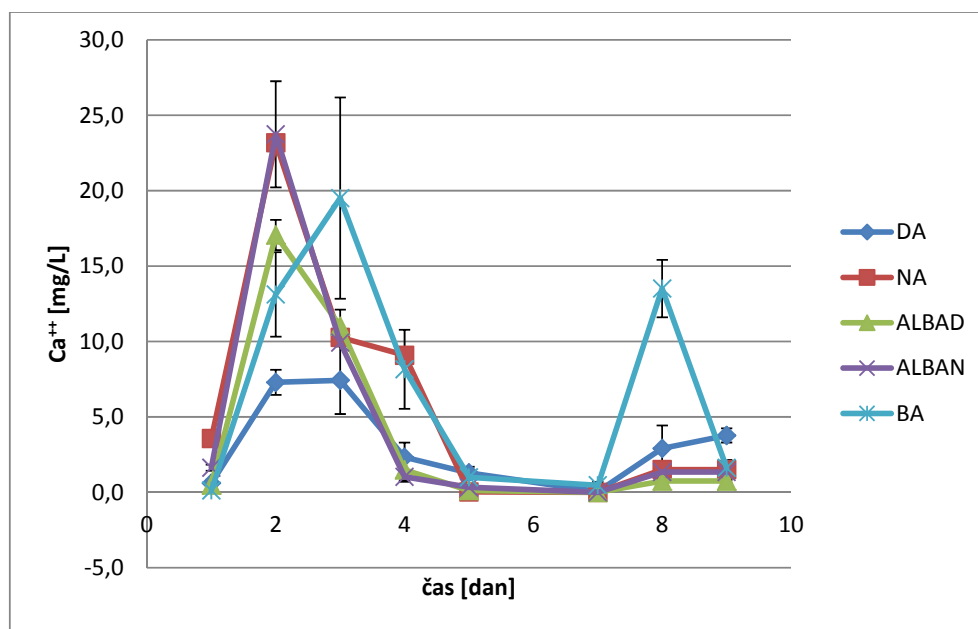
Koncentracija natrija je bila prvi dan poskusa najnižja v mešanici BA, 8,1 mg/L, v mešanicah z mikroalgami pa se je koncentracija natrija gibala med 66,4 mg/L (ALBAN) in 87,1 mg/L (DA). Kot je razvidno na sliki 13, najbolj odstopa mešanica BA, kjer je koncentracija natrija ostala približno enaka med poskusom, deveti dan je bila koncentracija natrija v mešanici BA 12 mg/L. V mešanicah z mikroalgami je koncentracija natrija nihala bolj, kot v mešanici BA. Pri mešanicah DA in NA je prišlo do povečanja koncentracija natrija okoli tretjega dne, nato pa se je koncentracija natrija v obeh mešanicah zopet znižala in se zniževala do konca poskusa, izjema je le 9. dan pri mešanici DA, kjer je zopet prišlo do povišanja koncentracije natrija. Pri mešanicah ALBAD in ALBAN se je koncentracija od drugega dne poskusa naprej manjšala. 9. dan poskusa je bila koncentracija natrija v vseh mešanicah z mikroalgami nižja kot prvi dan z izjemo mešanice DA. Vrednosti natrija v mikroalgnih mešanicah na 9. dan so se gibale med 5,1 mg/L (ALBAN) in 10,1 mg/L (NA), izstopa samo mešanica DA, kjer je bila koncentracija natrija deveti dan 96,3 mg/L.



Slika 13: Spreminjanje koncentracije Na^+ med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

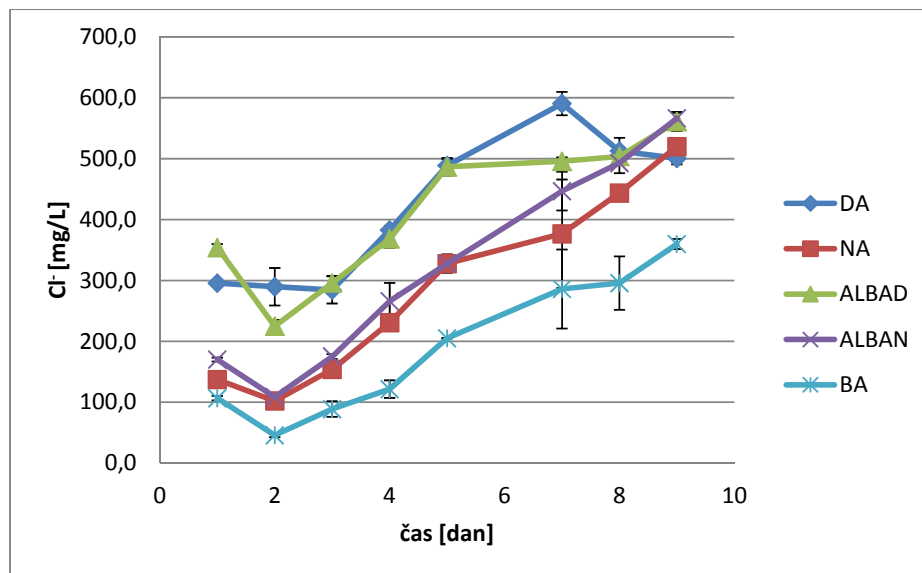
Prvi dan poskusa je bila koncentracija kalcija nizka v vseh mešanicah. Vrednosti so se gibale med 0,1 mg/L (BA) in 3,6 mg/L (NA). Nato se je koncentracija v vseh mešanicah zelo povišala (prvih nekaj dni poskusa), po 4. dnevu pa se je koncentracija kalcija v vseh mešanicah znižala in ostala nizka do 9. Dne. Izjema je mešanica BA, kjer se je koncentracija na 8. dan poskusa zvišala, nato pa zopet padla. Vrednosti na 9. dan poskusa so se gibale med 0,7 mg/L (ALBAD) in 3,8 mg/L (DA) (Slika 14).



Slika 14: Spreminjanje koncentracije Ca^{++} med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

Koncentracija klora se je (z razliko rahlega znižanja na 2. dan poskusa) med poskusom povečevala v vseh mešanicah (Slika 15). Vrednosti 1. dan poskusa so se gibale med 106,5 mg/L (BA) in 354 mg/L (ALBAD). 9. dan poskusa so se koncentracije klora v mešanicah gibale med 359,8 (BA) mg/L in 566,3 mg/L (ALBAN). Koncentracija klora je bila 9. dan poskusa v vseh mešanicah višja kot 1. dan poskusa.



Slika 15: Spreminjanje koncentracije Cl^- med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

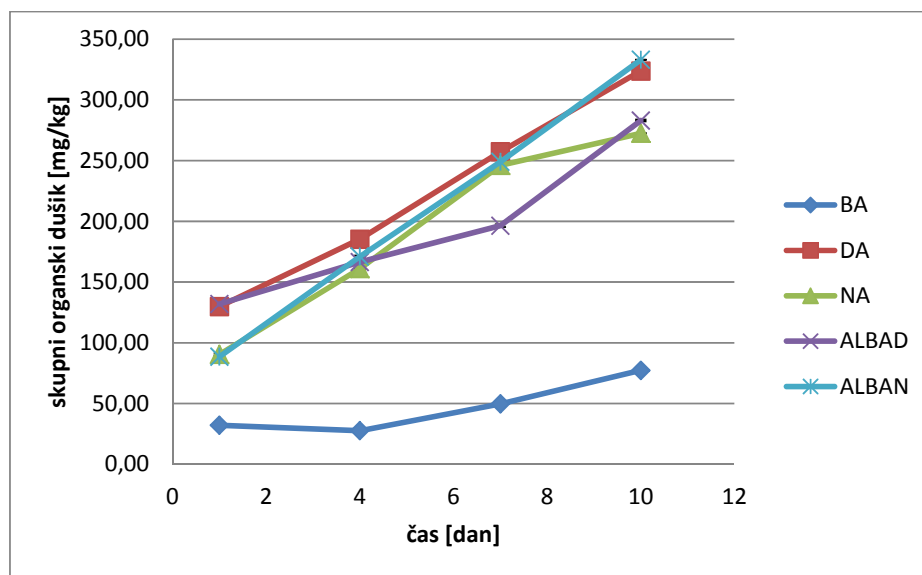
BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.2.3 Vsebnost organskega dušika in amonijaka

Med 10 dnevnim poskusom smo v približno enakih časovnih presledkih merili vsebnost organskega dušika (Slika 16) in amonijaka v vzorcih (Slika 17). Koncentracija organskega dušika se je tekom poskusa povečevala v vseh mešanicah, opazna razlika v koncentraciji je vidna le pri mešanici BA (Slika 16). Koncentracija organskega dušika v mešanicah je bila prvi dan med 32,3 mg/kg (BA) in 131,89 mg/kg (ALBAD). Mešanice ALBAD in DA so imele višje vrednosti organskega dušika, kot mešanice NA in ALBAN. Zadnji dan so bile vrednosti med 77,23 mg/kg (BA) ter 333,07 mg/kg (ALBAN). Na sliki 16 ni prikazana vrednost za digestat. Dnevno smo dodajali toliko digestata, da je bila povprečna koncentracija organskega dušika 56 mg/kg. Na koncu poskusa bi bilo v mešanici, kjer se dušik ne bi porabljal, 563 mg/kg organskega dušika.

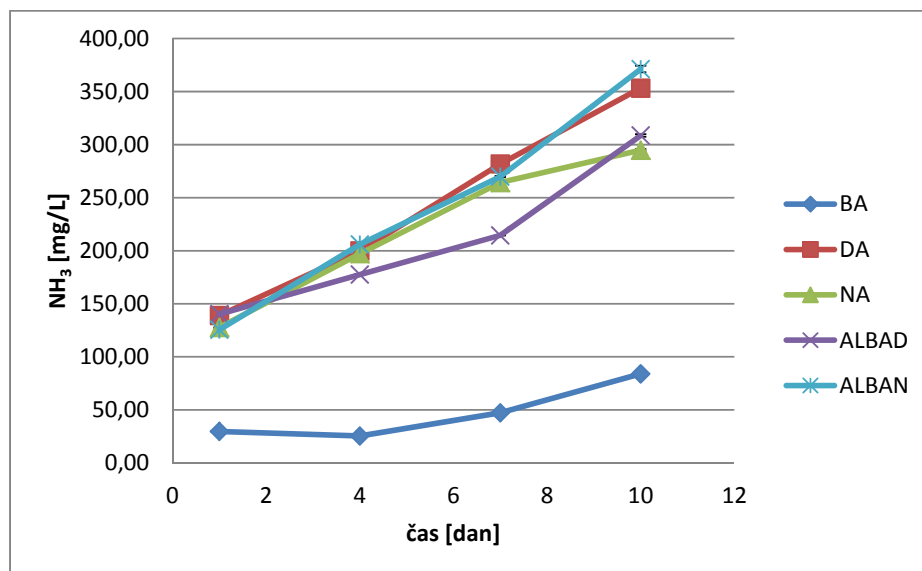
Prav tako se je med poskusom povečevala koncentracija amonijaka; tudi tu izstopa mešanica BA, kjer je bila koncentracija precej nižja (Slika 17). Začetne koncentracije amonijaka na prvi dan so bile 29,7 mg/L za BA ter med 125,47 in 140,23 mg/L za ostale

mešanice. Zadnji dan so bile koncentracije 83,93 mg/L (BA) ter med 294,86 ter 371,33 mg/L za ostale mešanice. Na sliki 17 ni prikazana vrednost za digestat. Dnevno smo dodajali toliko digestata, da je bila povprečna koncentracija amonijaka 42 mg/L. Na koncu poskusa bi bilo v mešanici, kjer se amonijak ne bi porabljal, 426 mg/L amonijaka.



Slika 16: Spreminjanje koncentracije organskega dušika med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

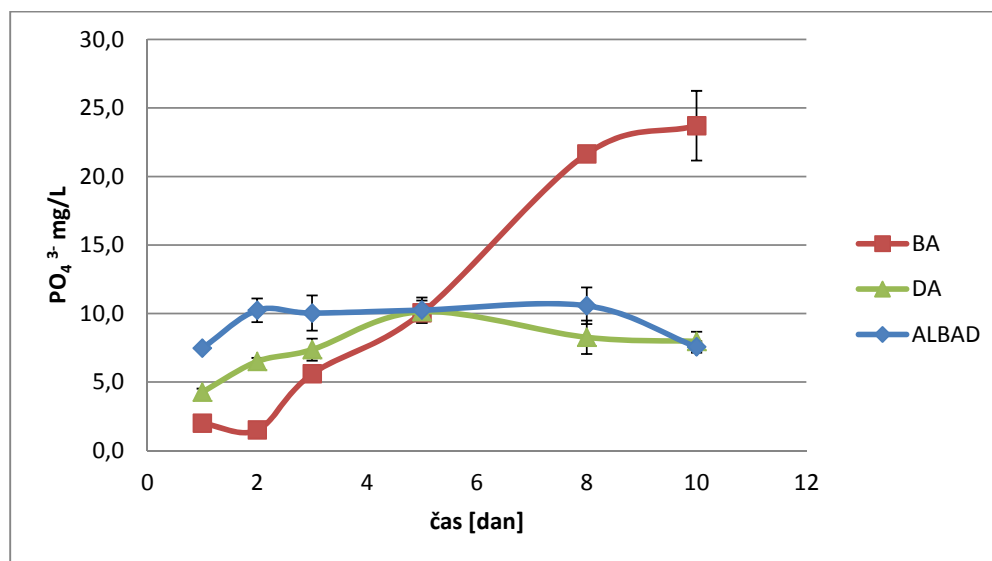


Slika 17: Spreminjanje koncentracije amonijaka med poskusom optimizacije gojenja mikroalg

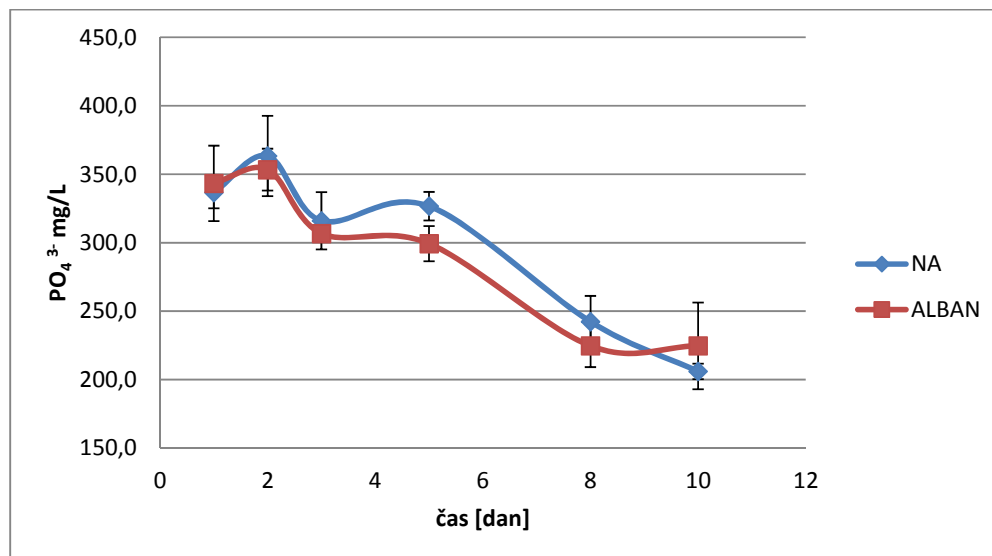
BA= aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.2.4 Vsebnost fosfata

Med poskusom smo merili vsebnost PO_4^{3-} v mešanicah. Mešanice NA in ALBAN (Slika 19) so imele na začetku precej višjo vsebnost fosfata, med poskusom pa je prišlo do zmanjšanja koncentracije fosfata v obeh mešanicah. Vsebnost fosfata v mešanici DA je bila zadnji dan poskusa višja kot prvi dan, v mešanici ALBAD pa nižja (Slika 18). Izmed vseh mešanic najbolj izstopa mešanica BA, kjer se je koncentracija fosfata povečala za 10X (Slika 18).



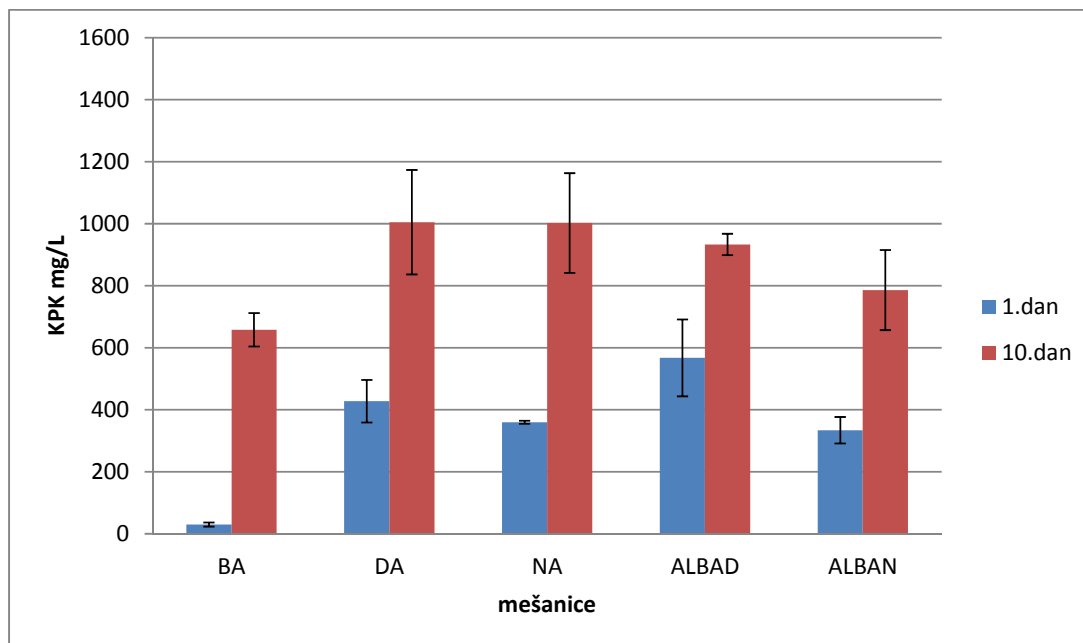
Slika 18: Spreminjanje koncentracije PO_4^{3-} v mešanicah BA (aktivno blato), DA (definirane alge) in ALBAD (definirane alge in aktivno blato)



Slika 19: Spreminjanje koncentracije PO_4^{3-} v mešanicah NA (nedefinirane alge) in ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)

4.2.5 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Spremljali smo spremembo kemijske potrebe po kisiku v mešanicah prvi in zadnji dan poskusa (Slika 20). KPK se je v vseh mešanicah med poskusom povečal. Vrednosti so se prvi dan poskusa gibale med 30 mg KPK/L (BA) ter 567 mg KPK /L (ALBAD). Zadnji dan poskusa so se vrednosti gibale med 658 mg KPK /L (BA) ter 1005 mg KPK/L (DA).



Slika 20: Vrednosti KPK v mešanicah na 1. in 10. dan poskusa

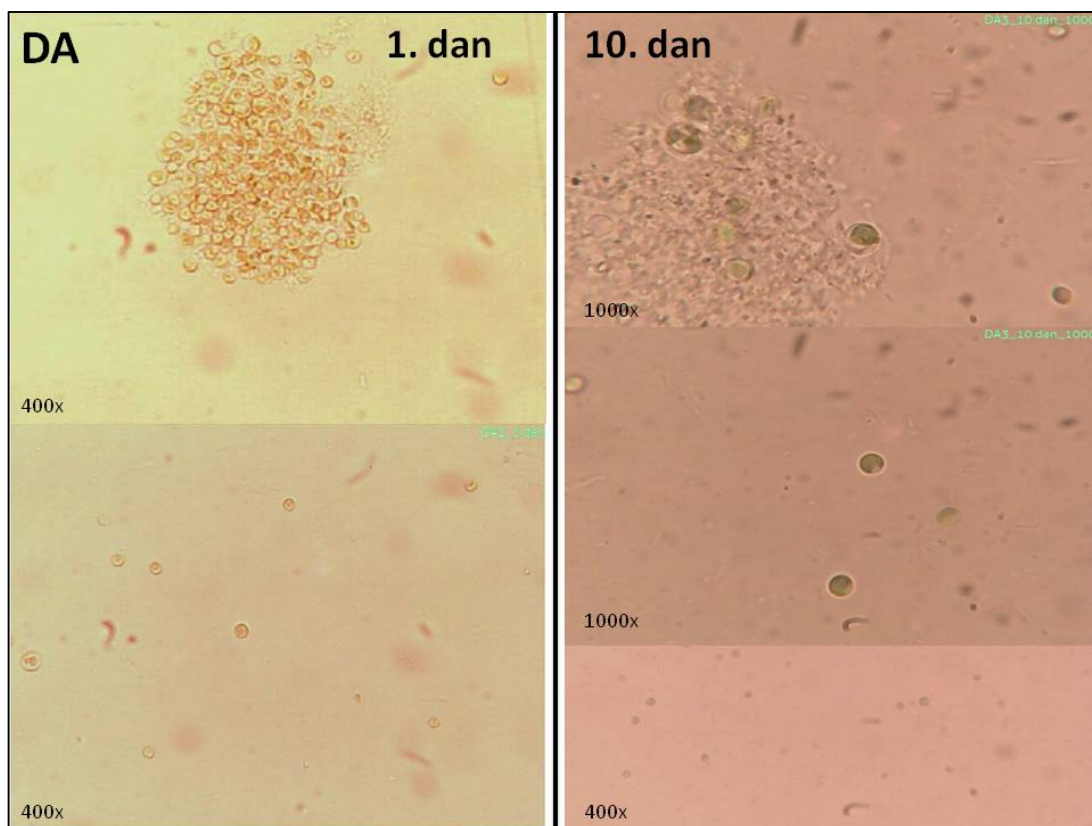
BA=aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.2.6 Sprememba strukture mikroalgne združbe med poskusom

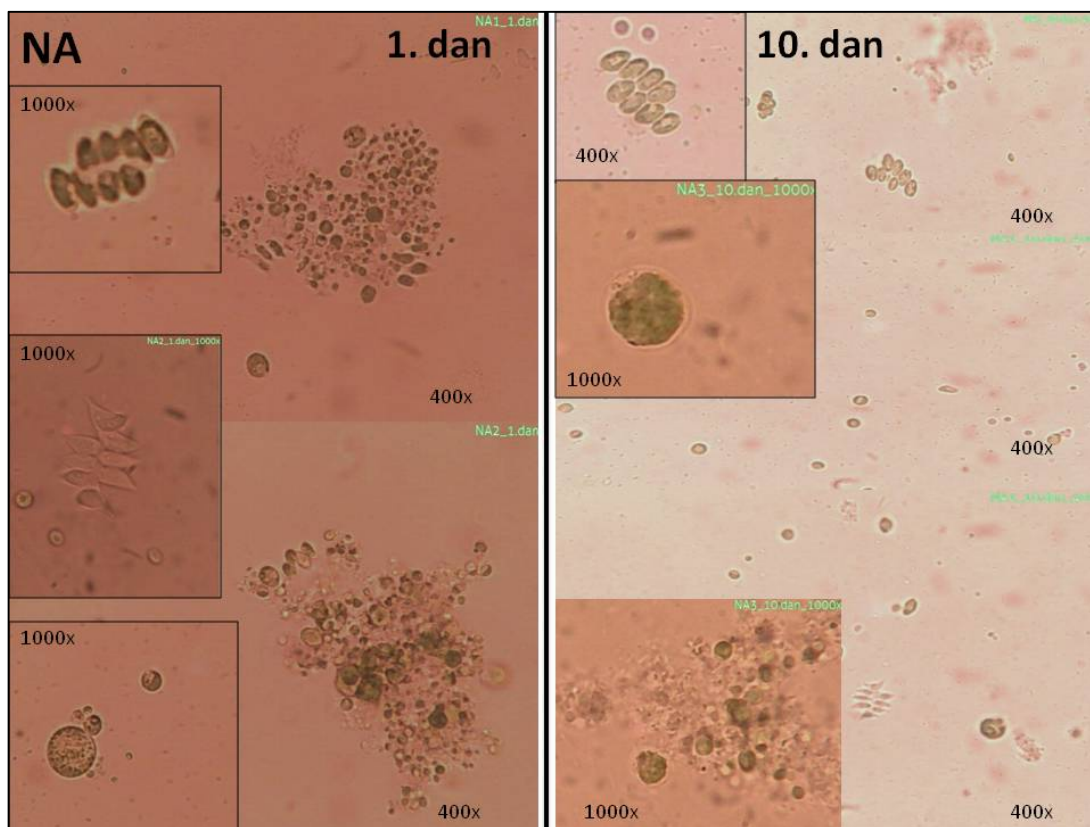
Spremembo strukture združbe smo spremljali s pregledom mikroskopskih preparatov vzorcev. Zaradi uporabe digestata, ki otežuje pregled, ter slabše kvalitete kamere, na slikah stanje ni tako dobro vidno kot je bilo pri sami mikroskopiji svežih vzorcev. Zaradi tega razloga so prikazane samo slike za prvi in zadnji dan poskusa, čeprav smo vzorce pregledali tudi četrti in sedmi dan.

Med poskusom so se mikroalge namnožile in sprijele v skupke. Do večjih sprememb v strukturi združbe ni prišlo v nobeni od mešanic. Pri mešanici DA smo na začetku in koncu poskusa opazili skupke ter posamezne celice *Chlorella sorokiniana* (Slika 21). V mešanici

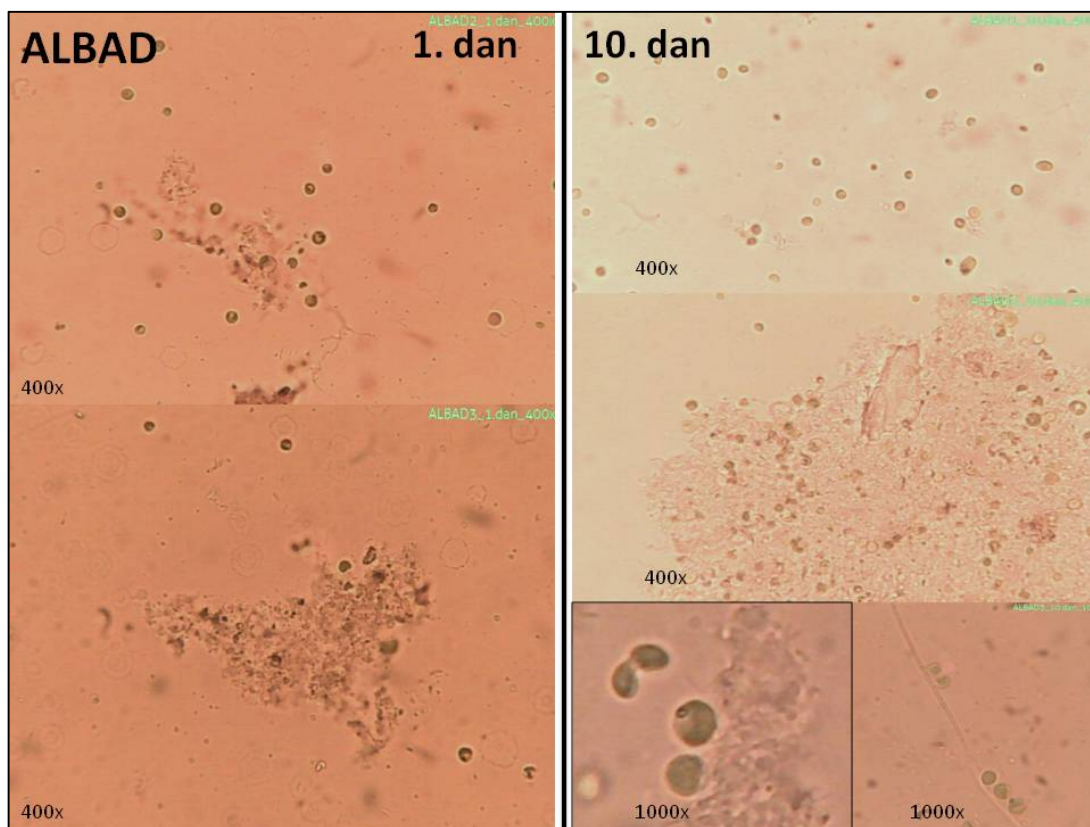
NA so prevladovala različne vrste mikroalg, večinoma smo opazili različne vrste *Scenedesmus* sp., za katere so značilni skupki štirih ali osmih celic (Belinger in Sigeo, 2015). Opazili smo tudi večje okrogle mikroalge (Slika 22). V mešanici ALBAD se prvi in zadnji dan poskusa struktura združbe ni vidno spremenila, obakrat smo opazili okrogle celice *Chlorella sorokiniana*, ki so se ponekod sprijele v skupke (Slika 23). Tudi pri mešanici ALBAN nismo opazili pomembnejših sprememb v strukturi združbe prvi in zadnji dan poskusa (Slika 24). Kot pri mešanici NA se tudi v mešanici ALBAN pojavljajo predvsem mikroalge *Scenedesmus* sp., vendar pa so v mešanici ALBAN (Slika 24) prisotne druge vrste *Scenedesmus* kot v mešanici NA (Slika 22). Mikroalge v mešanici ALBAN so se pojavljale v skupkih in kot ločene celice oz. skupek celic ene vrste mikroalg (Slika 24).



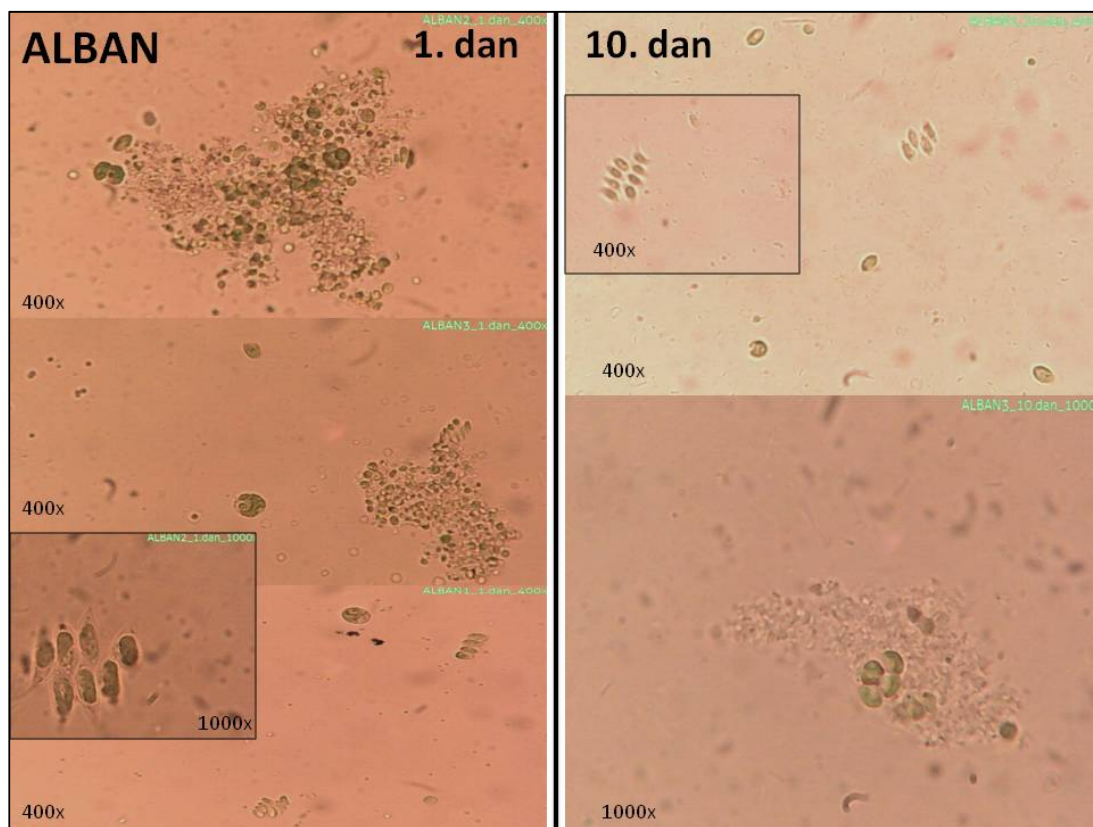
Slika 21: Sprememba sestave združbe tekom poskusa optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica DA (definirane mikroalge), slikano pri 400x in 1000x povečavi



Slika 22: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica NA (nedefinirane mikroalge), slikano pri 400x in 1000x povečavi



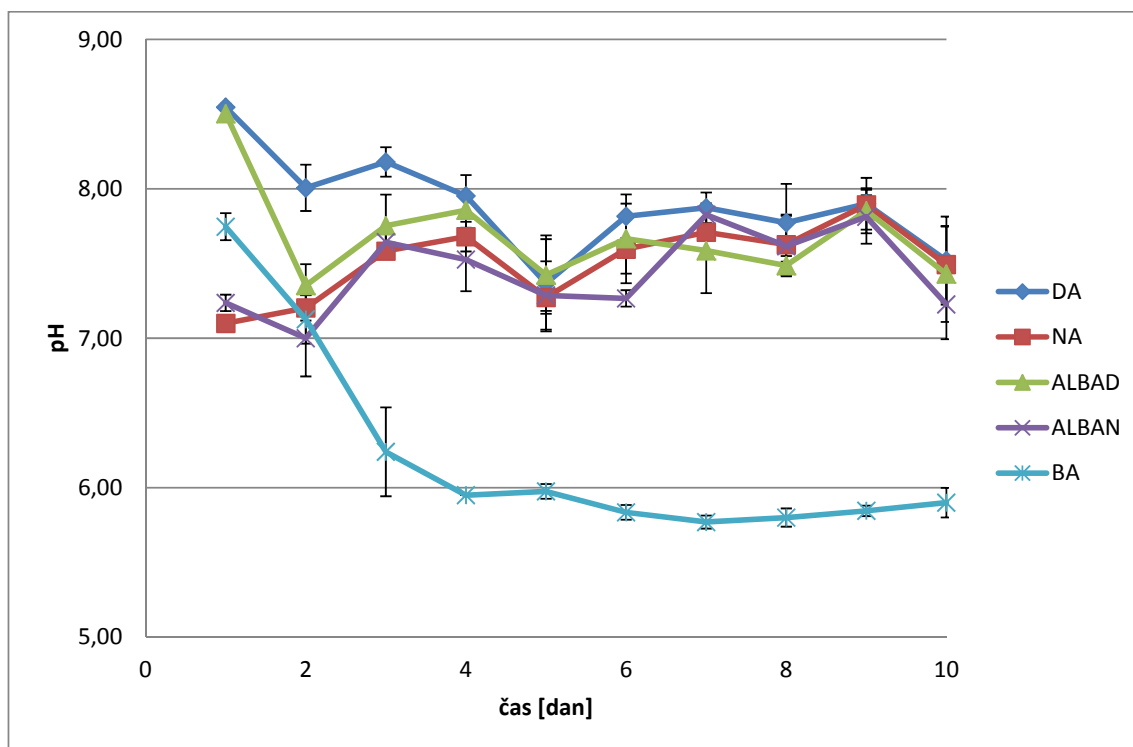
Slika 23: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica ALBAD (definirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x in 1000x povečavi



Slika 24: Sprememba sestave združbe med poskusom optimizacije rasti mikroalg na digestatu, mešanica ALBAN (nedefinirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x in 1000x povečavi

4.2.7 Gibanje pH vrednosti

Med poskusom smo vsak dan merili pH vrednosti in s tem spremljali potek procesa. Gibanje pH vrednosti je prikazano na sliki 25. Začetne vrednosti pH mešanic so se gibale med 7,10 in 8,55 ter so z izjemo mešanice BA ostale med 7 in 8 tekom celotnega poskusa. Pri mešanici BA smo opazili znižanje vrednosti pH, ta je dosegla najnižjo vrednost pri 5,77. Na koncu poskusa so se vrednosti pH mešanic gibale med 7,23 in 7,52, izjema je mešanica BA, kjer je bila vrednost pH med 5,7 in 5,9.

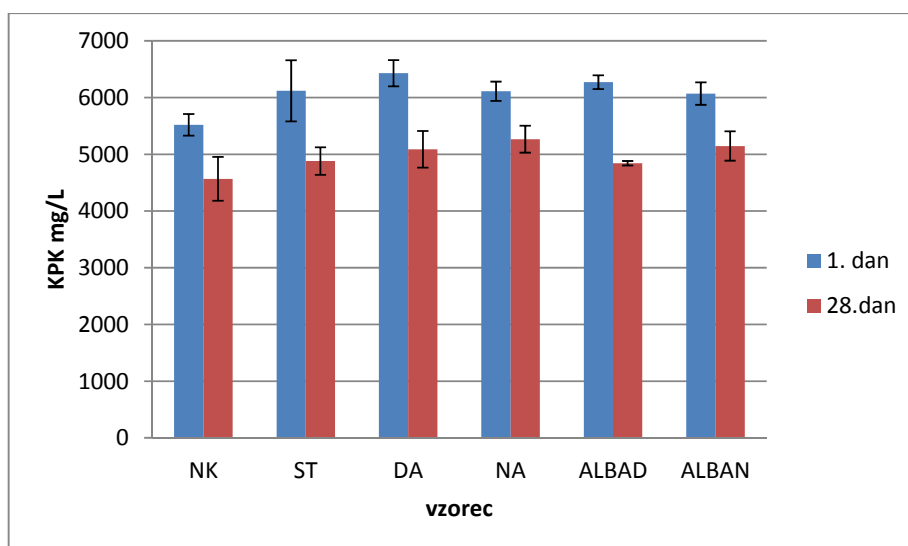


Slika 25: Spreminjanje pH vrednosti med poskusom pri mešanicah BA (aktivno blato), DA (definirane mikroalge), NA (nedefinirane mikroalge), ALBAD (definirane mikrolage in aktivno blato) ter ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)

4.3 BIOMETANSKI POTENCIAL MIKROALGNE BIOMASE VZGOJENE V DIGESTATU

4.3.1 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Na začetku in koncu testa biometanskega potenciala smo merili kemijsko potrebo po kisiku, ki je indirektno merilo za vsebnost organske snovi v vzorcih. KPK se je med poskusom v vseh vzorcih znižala, kot je prikazano na sliki 26. Začetne vrednosti mešanic so se gibale med 5518 mg KPK/L ter 6430 mg KPK/L. Končne vrednosti KPK so se gibale med 4567 mg KPK/L in 5265 mg KPK/L. Med posameznimi mešanicami ni velikih razlik v redukciji KPK.



Slika 26: Vrednosti KPK v mešanicah na 1. in 28. dan poskusa

NK=negativna kontrola, ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.3.2 Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)

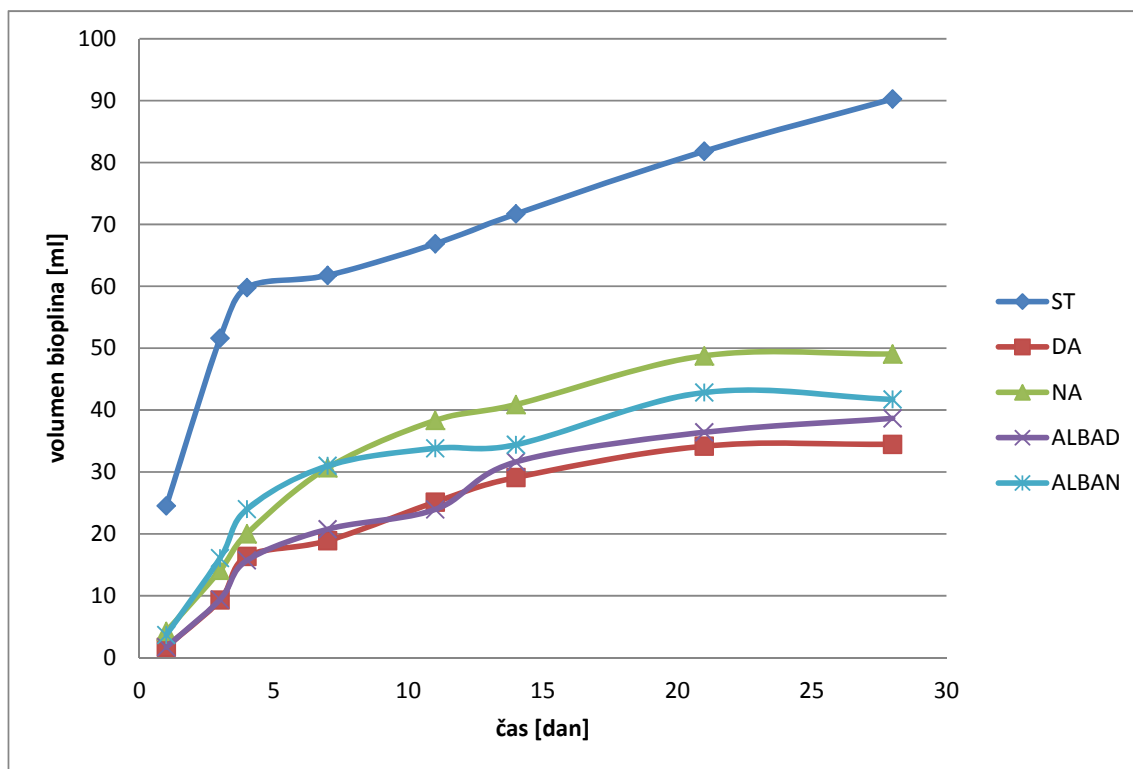
S spremljanjem koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin smo spremljali anaerobno fermentacijo med poskusom. Največkrat smo v vzorcih zaznali očetno kislino, ki je najbolj zastopana KMK. Koncentracija očetne kisline se je v mešanicah ST, DA, NA, ALBAD in ALBAN zniževala proti koncu poskusa. Koncentracije očetne kisline v mešanicah so na dan začetka poskusa (dan 0) znašale med 15,8 in 29,6 mg/L, zadnji dan poskusa pa med 0 mg/L ter 17,3 mg/L, v vseh primerih so bile koncentracije zelo nizke. Koncentracije KMK

dokazujejo, da se KMK med poskusom niso kopičile in je proces potekal brez inhibicije. Koncentracije KMK so zanemarljivo majhne, zato so podatki prikazani v Prilogi I.

V nekaterih vzorcih smo zaznali še nekatere druge KMK (valerianska, kapronska, propionska, izo-maslena, maslena, izo-valerianska), ki pa so se pojavile v nižjih koncentracijah kot očetna kislina oziroma smo jih zaznali samo na določene dneve v določenih vzorcih. Omenjene KMK smo zaznali v koncentracijah nižjih od 25 mg/L.

4.3.3 Volumen nastalega bioplina

Volumen bioplina je v vseh mešanicah najbolj naraščal prvih pet dni poskusa, nato pa se je produkcija bioplina upočasnila (slika 27). Do največjih razlik pri produkciji bioplina je prišlo med testnimi mešanicami z mikroalgami ter kontrolno mešanico z glukozo. Volumen bioplina v pozitivni kontrolni mešanici je naraščal tudi na koncu poskusa, medtem ko se je produkcija bioplina v testnih mešanicah z mikroalgami ustalila proti koncu poskusa. Največ bioplina (90 mL) je nastalo v kontrolni mešanici, sledile so mešanice NA, ALBAN, ALBAD ter DA, ki pa se med sabo niso bistveno razlikovale po produkciji bioplina. Na sliki 27 lahko vidimo, da je do manjše razlike v produkciji bioplina prišlo med mešanicama DA in ALBAD, v primerjavi z mešanicama NA in ALBAN. Pri mešanicah DA in ALBAD je bila produkcija bioplina prvih 14 dni počasnejša, nato pa se je stanje približalo ostalim mešanicam. Po 28 dneh je v mešanici DA nastalo 34 mL bioplina, v mešanici NA 49 mL v mešanici ALBAD 39 mL ter v mešanici ALBAN 42 mL. Skupna produkcija bioplina v posamezni mešanici po dnevih je prikazana v Prilogi II.

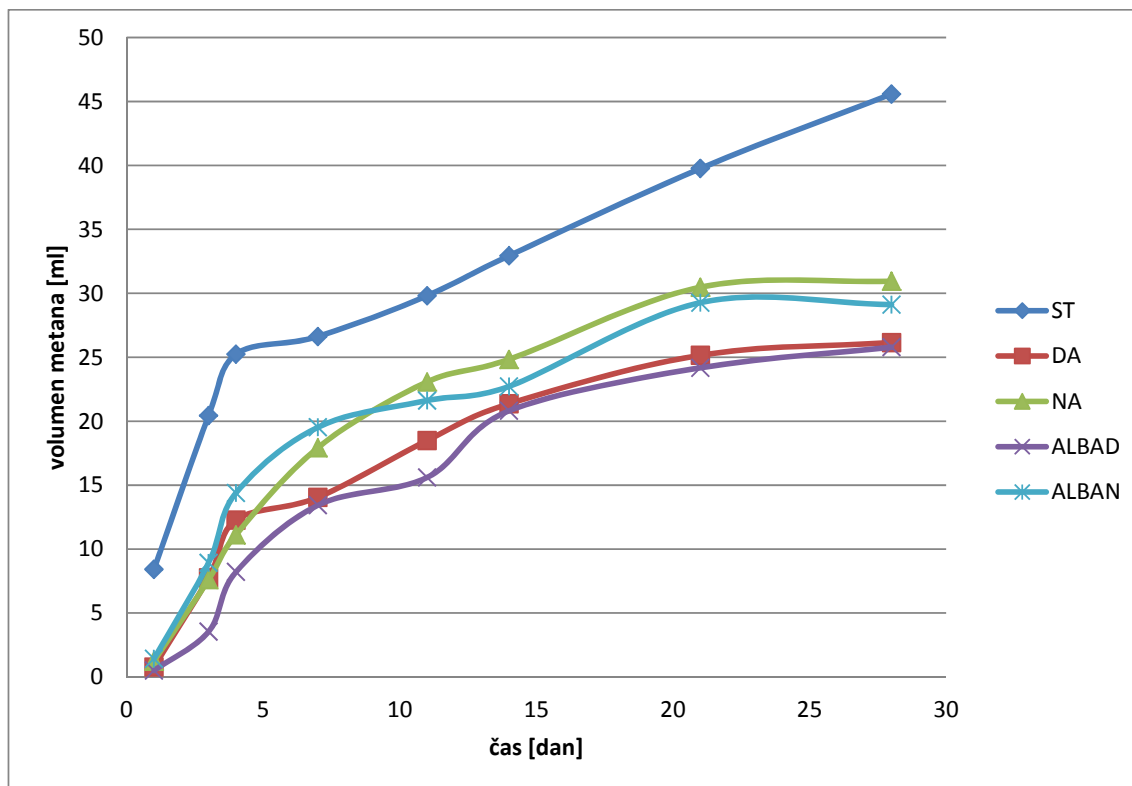


Slika 27: Volumen nastalega bioplina v vzorcih med poskusom BMP

ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.3.4 Skupna produkcija metana

Produkcija metana je bila v vseh mešanicah največja prvih pet dni poskusa, nato pa je počasi naraščala do konca poskusa (slika 28). Največ metana je nastalo v kontrolni mešanici (46 mL), manj pa v mešanicah z mikroalgami. Največ metana v mikroalgnih mešanicah je nastalo v mešanici NA (31 mL), sledile so mešanice ALBAN (29 mL), ALBAD (26 mL) ter DA (26 mL).



Slika 28: Skupna produkcija metana v vzorcih med poskusom BMP

ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

4.3.5 Volumen metana, nastalega iz 1g KPK mešanice

Glede na KPK mešanic smo izračunali, koliko metana nastane na 1g KPK. Teoretično iz 1g KPK substrata nastane 350 mL metana (Deublein in Steinhauser, 2008). V standardni mešanici je nastalo je 228 mL metana. Največ metana je nastalo v mešanici NA, 155 mL, najmanj pa v mešanici ALBAD, 129 mL (Preglednica 10).

Preglednica 10: Volumen nastalega metana na 1g KPK substrata in izplen metana

mešanica	g KPK substrata/1 g OS biomase	V CH ₄ skupen (mL)	V CH ₄ na 1 g KPK (mL)	izplen CH ₄ (%)
ST	0,2	46	228	65
DA	0,2	26	131	37
NA	0,2	31	155	44
ALBAD	0,2	26	129	37
ALBAN	0,2	29	146	42
teoretičen			350	100

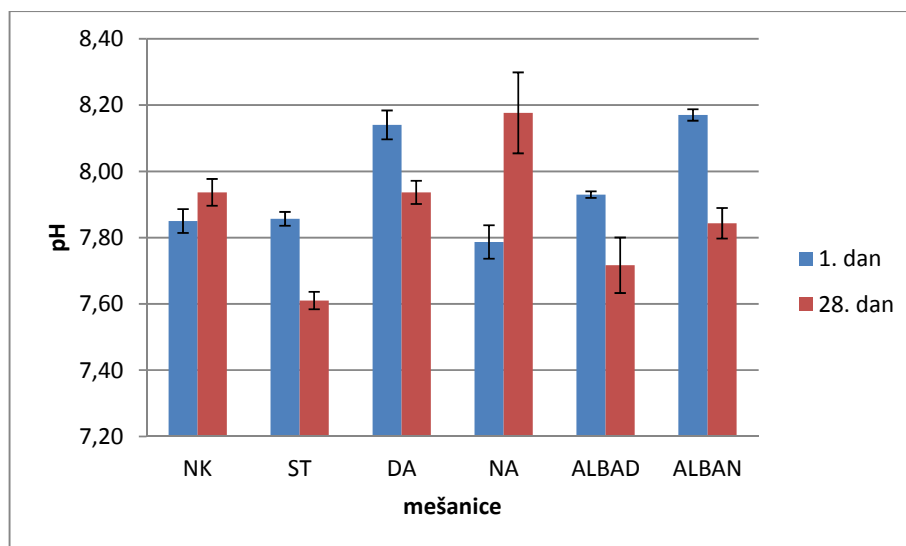
ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge, OS=organska snov, KPK=kemijska potreba po kisiku

4.3.6 Izplen metana

Največji izplen metana glede na teoretično vrednost je bil v kontrolni mešanici (65 %). Izplen metana se med testnimi mešanicami ni veliko razlikoval. Med mešanicami z mikroalgami je bil najvišji izplen, 44 %, v mešanici NA ter najnižji, 37 %, v mešanicah DA in ALBAD (Preglednica 10).

4.3.7 Gibanje pH vrednosti

pH vrednost se je med poskusom v mešanicah spremenila, a vrednosti so ostale okoli 7 in 8. Ob začetku poskusa so se pH vrednosti mešanic gibale med 7,79 ter 8,17, ob koncu poskusa pa med 7,72 ter 8,18 (slika 29).



Slika 29: pH vrednosti v mešanicah na 1. in 28. dan poskusa

NK=negativna kontrola, ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge,
ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z naraščanjem števila bioplinarn v Evropi, narašča tudi produkcija digestata (Biogas report, 2014). Tekoči del digestata po centrifugiranju predstavlja odpadno vodo, ki zaradi visoke vsebnosti hranil potrebuje nadaljnjo obdelavo pred izpustom v okolje (Uggetti in sod., 2014a). Zaradi tega smo se v nalogi osredotočili na obdelavo digestata z mikroalgami.

Mikroalge so že uspešno gojili na odpadnih vodah, saj lahko v kombinaciji z bakterijami izboljšajo proces biološkega čiščenja odpadne vode (Rawat in sod., 2011). V klasičnih bakterijskih čistilnih napravah je pomembno prepihanje s kisikom, ki predstavlja precejšen strošek (Razzak in sod., 2013), zato smo želeli proces obdelave digestata izboljšati z uporabo mikroalg. Predpostavili smo, da bodo mikroalge med procesom fotosinteze proizvedle kisik in s tem omogočile boljše delovanje bakterijske aerobne združbe.

Zanimalo nas je, ali lahko mikroalge oziroma mikroalge v kombinaciji z aktivnim blatom uspešno gojimo v digestatu iz bioplinarne, ki predeluje odpadke iz živilske industrije, biološke odpadke ter gnojvko. Z gojenjem mikroalg v digestatu smo želeli izboljšati proces biološkega čiščenja in s tem koristno izrabiti odvečni digestat, nastalo biomaso pa smo uporabili kot substrat za pridobivanje bioplina.

V predhodnem poskusu smo v 5 % digestatu gojili štiri različne mešanice mikroalg. Uporabili smo kulture *Chlorella sorokiniana* in *Scenedesmus quadricauda*, mešanico različnih nedefiniranih mikroalg ter mešanice, kjer smo obema skupinama mikroalg dodali še aktivno blato iz čistilne naprave. Zanimalo nas je, ali bodo mikroalgne mešanice oziroma mikroalgno-bakterijske mešanice učinkovito zmanjšale vsebnost hranil v gojišču po dodatku digestata. Na podlagi rezultatov analiz suhe in organske snovi lahko sklepamo, da so mikroalge rasle v digestatu, čeprav je prihajalo do nihanj med poskusom in končne koncentracije organske snovi v predhodnem poskusu niso bile dosti višje kot začetne (Priloga A2). Podobno smo sklepali tudi iz počasnega naraščanja OD, vendar pa ti rezultati zaradi temne barve digestata niso najbolj zanesljivi (Priloga A3). Zaradi narave vzorcev tudi ne pride v poštev štetje celic v števnici komori. Mikroalgne celice v gosti kulturi namreč tvorijo skupke, kar onemogoča štetje posameznih celic, prav tako pa so v vzorcih prisotni večji delci iz digestata, kar je razvidno tudi iz mikroskopskih slik.

Mikroalge kot glavni vir dušika ponavadi preferenčno izrabljajo amonijski dušik, če tega začne zmanjkovati pa asimilirajo tudi nitrat. Poleg tega za svojo rast v manjših količinah

potrebujejo tudi natrij, kalcij in kalij (Cai in sod., 2013). Na podlagi rezultatov bakterijskih mešanic iz drugega poskusa (Slika 9 in 10) sklepamo, da se je koncentracija nitratov in nitritov v mikroalžno-bakterijskih mešanicah spremenila predvsem zaradi delovanja nitrifikatorjev, ki so amonij pretvarjali v nitrit in nitrat, vendar pa so bile količine amonija previsoke, da bi lahko bakterijska in mikroalžna združba učinkovito odstranila večino amonijskega dušika. Hkrati so se večale tudi koncentracije ostalih hranil. Najbolj opazno je naraščanje koncentracije klora, kar najverjetneje lahko razložimo s tem, da je koncentracija klora v digestatu visoka (Preglednica 10). Predvidevamo, da je visoka koncentracija klora posledica predelave odpadkov iz živilske industrije, kjer je prisotno veliko natrijevega klorida. Predvidevamo, da mikroalge klora ne porabljajo, zato se ta kopiči v gojišču.

S kontinuiranim dodajanjem digestata smo očitno dodajali več hranil, kot so jih lahko porabile mikroalge. Mikroalge za rast potrebujejo ustrezno razmerje N/P, v primeru sladkovodnih mikroalg je to razmerje 12:1, a je bilo dokazano, da lahko rastejo tudi pri neoptimalnem razmerju (Boelee in sod., 2011). Ugotovili smo, da smo očitno z digestatom dodajali preveč hranil, saj je koncentracija amonija, ki je primarni vir dušika za mikroalge, naraščala med poskusom. Glede na meritve vsebnosti hranil sklepamo, da se je nekaj hranil vseeno porabilo (Priloga B), saj smo dokazali rast mikroalg, vendar pa ta ni bila optimalna (Priloga A). Pomemben faktor za rast mikroalg je tudi fosfor, vendar pri predhodnem poskusu zaradi premajhne količine vzorca nismo uspeli izvesti ustreznih meritev fosforja, kar smo izboljšali pri naslednjem poskusu optimizacije rasti mikroalg v digestatu.

Pričakovali smo, da se bodo vrednosti KPK med predhodnim poskusom zmanjšale, česar pa nismo dokazali.

Z merjenjem KPK smo spremljali porabo organske snovi v vzorcih. Vrednost KPK se je med predhodnim poskusom povečala (Priloga D). Do tega bi lahko prišlo zaradi celic, ki so med zamrzovanjem vzorca popokale in se je tako lahko sprostila organska snov, ki smo jo zaznali s testom. Vprašljiva je tudi primernost same metode oziroma obdelava vzorca, saj so mikroalžne celice zelo majhne in bi lahko po centrifugiranju še vedno ostale v vzorcu, kar bi vplivalo na večje vrednosti KPK. Druga možna razlaga za mikroalžno-bakterijske mešanice je, da bakterije, ki so glavni razgrajevalci organske snovi, niso mogle razgraditi prisotne organske snovi, ker ni bilo na voljo dovolj kisika. Mešanic namreč nismo prepihovali z zrakom, mikroalge pa očitno niso proizvedle dovolj kisika, saj tudi njihova rast ni bila optimalna. Ker večino organske snovi v mikroalžno-bakterijskih mešanicah razgradijo bakterije (He in sod., 2013), bi to lahko bil vzrok za slabo razgradnjo organske snovi v mešanicah z mikroalgami.

Ugotovili smo, da pri porabi hranil (Priloge B1-B6) in zmanjšanju vsebnosti KPK (Priloga D) ni opaziti večjih razlik med mešanicami z mikroalgami in mešanicami, kjer smo uporabili mikroalge in aktivno blato. Prav tako nismo opazili večjih razlik pri porabi hranil med mešanicami z definiranimi algami in nedefiniranimi algami (Priloge B1-B6). S spremljanjem strukture mikrobne združbe z mikroskopiranjem smo ugotovili, da

Scenedesmus quadricauda ni primerna vrsta mikroalge za rast v digestatu, saj na koncu poskusa nismo več zaznali živih celic *S. quadricauda*, prav tako pa smo imeli težave z gojenjem *S. quadricauda* v digestatu že pred začetkom poskusa. Mikrobná združba se je med predhodnim poskusom spremenila, tako da smo v vzorcih definiranih mikroalg opazili samo še *Chlorella sorokiniana* (Priloga E1), v vzorcih nedefiniranih mikroalg pa je bilo opaziti izrazito prevlado rodu *Scenedesmus* (Priloga E2), vendar so bile prisotne druge vrste, ne *S. quadricauda*.

Z drugim poskusom smo poskušali optimizirati gojenje mikroalg v digestatu, predvsem smo želeli izboljšati pogoje gojenja, zato smo uporabili posode, ki so zagotavljale konstantno mešanje in večjo osvetlitev. Na rast mikroalg vpliva tako gostota mikroalg v gojišču, kot tudi barva digestata (Marcilhac in sod., 2014). Da lahko zagotovimo ustrezno osvetljenost za celotno kulturo, je potrebno mikroalžno mešanico stalno mešati. Ker smo med predhodnim poskusom ugotovili, da je koncentracija hranil v digestatu previsoka za optimalno rast mikroalg, smo v drugem poskusu koncentracijo digestata znižali na 3 %. S tem smo poskušali izboljšati razmerje hranil in zmanjšati vpliv barve digestata. Hkrati smo tudi odvezemali več biomase.

Med optimizacijo rasti mikroalg v digestatu smo spremenili tudi razmerje suhe snovi mikroalgne biomase in aktivnega blata iz 1:1 na 3:1 za mikroalge, hkrati pa smo z mešanico BA (aktivno blato iz čistilne naprave) preverjali, kakšen vpliv na porabo hranil imajo bakterije iz aktivnega blata.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da smo uspeli izboljšati pogoje za rast mikroalg v digestatu, saj je biomasa med poskusom naraščala (Slika 7), prav tako smo opazili spremembo barve kulture iz svetlo v temno zeleno, kar prikazuje tudi povišanje OD (Slika 8). Nihanje pH vrednosti med poskusom bi lahko pomenilo porabo CO₂, saj smo pH vrednost vsak dan uravnavali na 6,5, izmerjene vrednosti pa so se gibale med pH=7 in 8. Do dviga pH vrednosti v gojišču lahko pride tudi zaradi porabe CO₂. Vendar pa glede na rezultate meritev hranil sklepamo, da pogoji za asimilacijo hranil s strani mikroalg še vedno niso bili optimalni. Koncentracije amonija, ki je glavni vir dušika za mikroalge, so naraščale med poskusom, kar najverjetneje pomeni, da je bila koncentracija hranil, dodanih z digestatom, še vedno previsoka. Drugi raziskovalci so na primer ugotovili, da mikroalge rastejo v digestatu tudi pri koncentracijah od 50 do 260 mg NH₄⁺/L, vendar višja koncentracija amonija vpliva na počasnejšo rast mikroalg (Uggetti in sod., 2014a). Najverjetneje je na slabšo asimilacijo hranil vplivalo tudi neustrezno razmerje N/P. Razmerje N/P v naših mešanicah se je gibalo med 17 in 26 pri mešanicah z definiranimi mikroalgami (DA in ALBAD), v mešanicah z nedefiniranimi mikroalgami (NA in ALBAN) pa je bilo razmerje N/P=1:1. Razmerje N/P je pomembno za rast mikroalg, kot ugotavljajo tudi Chen in sodelavci (Chen in sod., 2015).

S spremljanjem bakterijskih kultur (BA) smo poskušali ugotoviti, kako na porabo hranil, v primerjavi z mikroalgami, vplivajo bakterije iz aktivnega blata čistilne naprave. Najbolj

opazne so bile razlike pri koncentraciji nitrata, ki se je v bakterijskih kulturah med poskusom povečeval (Slika 9). Najverjetneje je vzrok za to aktivnost nitrifikacijskih bakterij, saj je bila koncentracija amonija v mešanicah BA bistveno nižja kot v mikroalgnih mešanicah (Slika 11). Koncentracija kalcija in natrija se je v tem poskusu znižala bolj (Slika 12 in 13) kot pri predhodnem poskusu (Priloga B4 in B5) kar lahko verjetno pripišemo večjemu prirastu biomase in s tem večji porabi hranil.

Za razliko od predhodnega poskusa smo pri poskusu optimizacije rasti uspešno izmerili tudi koncentracijo fosforja in ugotovili, da se je koncentracija fosforja v mešanicah NA in ALBAN med poskusom znižala, medtem ko v mešanicah DA in ALBAD ni prišlo do velikih sprememb v koncentracijah, pri mešanici BA pa je prišlo do naraščanja koncentracije fosforja (Slika 18 in 19). Vsebnost fosforja smo spremljali preko meritev ortofosfata, saj mikroalge fosfor asimilirajo v obliki ortofosfata (Grobbelaar, 2004). Očitno je v mikroalgnih in mikroalžno-bakterijskih mešanicah prišlo do asimilacije fosforja kljub neoptimalnemu razmerju N/P, kar morda lahko razložimo s sposobnostjo mikroalg, da kopičijo fosfor v vakuolah znotraj celic in ga porabijo, ko v okolju zmanjka vira dostopnega fosforja (Larsdotter, 2006).

Vsebnost KPK se je povečala tudi pri drugem poskusu (Slika 20), kar zopet lahko razložimo z neoptimalnimi pogoji za rast bakterij, predvsem v mikroalgnih mešanicah. Kljub izboljšanju pogojev z mešanjem in močnejšo osvetlitvijo, mešanic z mikroalgami, za razliko od bakterijskih, nismo prepričevali z zrakom. Ker mikroalge najverjetneje niso proizvedle dovolj kisika, tudi bakterijska aktivnost v mešanicah ALBAD in ALBAN ni bila optimalna. Problem pri produkciji kisika bi lahko bila prevelika gostota biomase in temna barva digestata, kar vpliva na prehod svetlobe v gojišče in s tem otežuje fotosintezo. Mikroalge lahko prekipijo tudi na miksotrofno rast (Li in sod., 2011), kar bi lahko razložilo povečevanje biomase in hkratno neoptimalno delovanje bakterijske združbe.

Sestava mikroalgne združbe se med poskusom ni bistveno spremenila, kar potrjuje ugotovitve predhodnega poskusa. *Chlorella sorokiniana* dobro raste v digestatu, prav tako dobro rastejo različne vrste iz rodu *Scenedesmus* sp. Glede na mikroskopske slike (Slika 22 in 24) gre najverjetneje za *Scenedesmus obliquus* in *Scenedesmus dimorphus*, pojavile pa so se tudi nekatere druge vrste mikroalg, ki jih nismo uspeli identificirati. Pri vseh mešanicah smo opazili, da mikroalge tvorijo skupke, kar bi lahko bilo uporabno v primeru uporabe mikroalg za čiščenje odpadnih vod, saj se taki skupki boljše usedajo. Učinkovito posedanje biomase smo opazili tudi pri zaključku poskusa, ko smo želi biomaso za potrebe testa bioplinskega potenciala. Na podlagi prikazanih rezultatov in opažanj iz laboratorija sklepamo, da je za obdelavo digestata najboljše uporabiti mešanico različnih mikroalg in pustiti, da se razraste tista vrsta, ki ji to okolje najbolj ustreza. Do enakega zaključka so prišli tudi Chen in sodelavci (2015) pri gojenju mikroalg na odpadni vodi.

Glede na rezultate predhodnega poskusa in poskusa optimizacije rasti mikroalg v digestatu lahko sklepamo, da smo z izboljšanjem pogojev (mešanje, manjša koncentracija digestata,

večja osvetljenost, večji delovni volumen) izboljšali pogoje za rast mikroalg. V drugem poskusu je suha in organska snov naraščala med poskusom (Slika 6 in 7), brez večjih nihanj, prav tako opazimo spremembe v pH vrednosti (Slika 25), kar kaže, da so mikroalge porabljale CO₂ in s tem vplivale na spremembo pH vrednosti. Pri predhodnem poskusu je pH ostajal približno enak (Priloga F), kar lahko pomeni, da mikroalge niso porabile CO₂. Vendar pa na spremembo pH lahko vpliva več dejavnikov, tako da tega ne moremo zagotovo trditi.

Glede na rezultate sklepamo, da mikroalge lahko rastejo v digestatu, kar je razvidno iz povečanja koncentracije suhe in organske snovi, vendar pa niso sposobne učinkovito odstraniti dušika, če je koncentracija dušika previsoka. Aslan in Kapdan (2006) sta spremljala učinkovitost odstranjevanja NH₄-N in PO₄-P na sintetični odpadni vodi ter ugotovila, da do asimilacije vsega amonijskega dušika pride, ko je ta v koncentracijah do 21,2 mg/L. Pri vrednostih do 92,8 mg/L se je učinkovitost asimilacije dušika zmanjšala za 50 %, pri koncentracijah NH₄-N višjih od 129 mg/L pa so mikroalge porabile manj kot 24 % NH₄-N (Aslan in Kapdan, 2006). V našem poskusu so bile začetne koncentracije NH₄⁺ med 45 mg/L in 182 mg/L pri predhodnem poskusu ter med 65 mg/L in 101 mg/L pri poskusu optimizacije rasti. Z dodatkom digestata so se koncentracije hranil še povečevale, zato sklepamo, da je bil vzrok v previsokih koncentracijah amonija in bi morali digestat še bolj redčiti.

Večina raziskav na digestatu in odpadni vodi je narejenih v šaržnih sistemih, koncentracije dušika in fosforja pa so nižje, kot so bile v našem poskusu. Naš kontinuirni sistem je imel že na začetku visoko koncentracijo hranil, ki se je z dodajanjem digestata še večala. Mikroalge niso bile sposobne asimilirati toliko hranil, vendar pa to vseeno ni ustavilo njihove rasti.

Predvidevamo, da bi lahko izboljšali asimilacijo hranil iz digestata s strani mikroalg, tako da bi digestat ustrezno redčili in predhodno preverili koncentracije dušika in fosforja ter redčitve pripravili tako, da bi bilo razmerje N/P optimalno. Prav tako bi lahko mešanice še dodatno prepihovali z zrakom in tako izboljšali bakterijsko aktivnost. Ena od možnosti izboljšav je tudi kontinuirano odvzemanje večjih količin biomase, s čimer bi preprečili morebitno zasenčenje v primeru pregoste kulture mikroalg.

Biomasa pridobljena tekom optimizacije rasti mikroalg na digestatu smo preizkusili kot substrat za proizvodnjo bioplina. Uporaba mikroalgne biomase kot substrat za proizvodnjo bioplina ponovno pridobiva zanimanje, saj anaerobno razgradnjo lahko vpeljemo v koncept biorafinerij (Uggetti in sod., 2014b).

Mikroalžno biomaso iz mešanic DA, NA, ALBAD in ALBAN smo testirali za biometanski potencial. Vzporedno smo preverili še ustreznost izvedbe testa BMP in aktivnost mikrobne inokuluma v testu z mešanico glukoze (pozitivna kontrola). Spremljali smo produkcijo bioplina in delež nastalega metana. Skupna produkcija bioplina v pozitivni

kontroli je znašala 90 mL, od tega je bilo 46 mL metana. Pri mešanicah z mikroalžno biomaso je bila produkcija bioplina slabša in se je gibala med 34 in 49 mL, od tega je bilo metana med 26 mL in 31 mL (Preglednica 10), med posameznimi mešanicami nismo opazili večjih razlik. To lahko verjetno pripišemo predvsem dejstvu, da so bile v vseh mešanicah prisotne mikroalge iz rodu *Chlorella* in *Scenedesmus* sp., torej se združba ni močno razlikovala. Za oba omenjena rodova mikroalg je značilna slaba razgradljivost celične stene v procesu anaerobne razgradnje, kar vpliva na produkcijo bioplina.

Spremljali smo tudi produkcijo kratkoverižnih maščobnih kislin, ki so vmesni produkti anaerobne fermentacije in so pokazatelj delovanja procesa (Ras in sod., 2011). Zaznali smo predvsem ocatno kislino, katere najvišje koncentracije so bile pod 30 mg/L. Iz tega lahko sklepamo, da proces ni tekel optimalno, saj so po navadi koncentracije ocatne kisline, ki predstavlja vmesni produkt pri procesu anaerobne razgradnje, višje (Parkin in Owen, 1986). Nastanek kratkoverižnih maščobnih kislin vpliva tudi na spremembo pH vrednosti. V primeru, da metanogeneza ne bi dobro potekala bi lahko nastajale večje koncentracije kratkoverižnih maščobnih kislin, kar bi vplivalo tudi na pH vrednost. Naši rezultati kažejo, da se je pH vrednost gibala med 7 in 8, kar ne nakazuje nastajanja viška kislin. V našem primeru je verjetno šlo za slabo razgrajevanje substrata, predvsem za nezadostno hidrolizo polimerov v mikroalgnih celičnih stenah s strani anaerobnih mikroorganizmov, posledično je nastalo tudi manj kratkoverižnih maščobnih kislin.

Preverili smo, koliko metana je nastalo na 1 g KPK substrata. Teoretično iz 1g KPK nastane 350 mL metana (Deublein in Steinhauser, 2008), če bioplinski proces dobro teče. Naši rezultati kažejo na slabši potek procesa, saj je v standardni mešanici nastalo 228 mL metana na 1 g KPK, v mikroalgnih mešanicah pa precej manj, med 131 mL in 155 mL metana na 1 g KPK (Preglednica 10).

Razlogov za takšne rezultate je verjetno več. Prvi problem je obremenitev, saj smo uporabil standardno obremenitev 0,2 g KPK substrata na 1 g OS biomase (Deublein in Steinhauser, 2008), kar se je izkazalo kot ustrezna obremenitev pri poskusih z drugačnimi substrati, vendar pa ta obremenitev ni ustrezna če kot substrat uporabimo mikroalžno biomaso. Obremenitve v BMP poskusih z mikroalgami so večje, gibljejo se od 0,5 g do 7 g/g OS (Jegade, 2012).

Naslednji problem predstavlja anaerobna biomasa, ki ni bila prilagojena na uporabljen substrat. Znano je, da proces anaerobne razgradnje v bioplin poteka bolje, če je biomasa prilagojena na substrat (Deublein in Steinhauser, 2008).

Rezultati testa KPK nam povedo tudi kolikšna je bila redukcija KPK in s tem koliko substrata se je razgradilo. Redukcija KPK je bila nizka, med 14 % in 20 % za vse mešanice, vključno s pozitivno kontrolo, kar nakazuje, da se je razgradil samo majhen del substrata. Redukcija KPK se med mešanicami ni veliko razlikovala.

Mikroalga biomasa je bogata s proteini, kar posledično pomeni, da vsebuje veliko dušika. Neustrezno razmerje C/N pri anaerobni razgradnji je še eden od problemov, s katerim se srečujemo pri uporabi mikroalgne biomase za produkcijo bioplina (González-Fernández in sod., 2013). C/N razmerje v mikroalgni biomasi je po navadi manjše od 10 (Parkin in Owen, 1986) zato je potrebno za izboljšanje procesa dodajati substrat, ki je bogat z ogljikom. V našem poskusu mikroalgni biomasi nismo dodali dodatnega vira ogljika, zato je bilo verjetno razmerje C/N neustrezno.

V naših mešanicah sta večino mikroalg predstavljala rodova *Chlorella* sp. in *Scenedesmus* sp., ki imata celične stene iz ogljikovih hidratov, kar predstavlja problem za anaerobno združbo, saj težko razgradijo (hidrolizirajo) celične stene mikroalg. Celična stena vrste *Chlorella* je med drugim sestavljena iz hemiceluloze, ki jo anaerobni mikroorganizmi težko razgradijo. Še posebej odporne so celične stene *Scenedesmus* sp., zaradi vsebnosti sporopolenina, zaradi česar so *Scenedesmus* sp. že označili kot neprimerne za produkcijo bioplina (González-Fernández in sod., 2013). Tako *Chlorella* kot *Scenedesmus* spadata med slabo razgradljive mikroalge za proces produkcije bioplina. Kljub temu pa mikroalge lahko predstavljajo ustrezen substrat za produkcijo bioplina, saj lahko omenjene probleme rešimo na več načinov. Proces bi lahko izboljšali z dodatkom substrata, bogatega z ogljikom. Yen in Brune sta na primer uporabila odpadno vodo iz papirne industrije (Yen in Brune, 2007). Smiselno bi bilo uporabiti druge vrste mikroalg, v kolikor pa to ni mogoče, je potrebna predhodna obdelava mikroalgne biomase (Passos in sod., 2014). Z ustrezno predobdelavo razbijemo celične stene mikroalg, ki predstavljajo problem za anaerobno združbo in s tem omogočimo boljšo produkcijo bioplina.

Izplen metana v našem poskusu je bil 65 % za kontrolno mešanico, kar je nižje od običajnega. To pomeni, da biomasa ni bila najbolj aktivna. V mikroalgnih mešanicah je bil izplen metana med 37 % in 44 %. Deleži metana pri produkciji bioplina iz mikroalgne biomase so lahko tudi 65 % (Dębowski in sod., 2013) ob optimalnem procesu, kar nakazuje, da proces v našem primeru ni potekal optimalno. Na koncu testa biometanskega potenciala smo v steklenicah s testnimi mešanicami še vedno opazili zeleno barvo, kar je še dodatna potrditev, da se celice mikroalg niso razgradile in so bile v mešanicah kljub inkubaciji v temi še vedno prisotne žive mikroalge. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi avtorji (Mussgnug in sod., 2010).

Na podlagi rezultatov testa biometanskega potenciala lahko sklepamo, da mikroalga biomasa, pridobljena z gojenjem v digestatu, ni najboljši substrat za bioplin, lahko pa bi produkcijo bioplina izboljšali s predhodno obdelavo biomase, s katero bi razbili celične stene mikroalg ter z dodatkom ustreznega substrata bogatega z ogljikom. Prav tako bi morali optimizirati proces z izbiro ustrezno prilagojene mikrobne anaerobne biomase in ustrezno obremenitvijo.

Na podlagi rezultatov lahko potrdimo hipotezo, da se masa mikroalgne in mikroalgnobakterijske biomase med procesom obdelave bioplinskega digestata poveča. Prav tako

lahko potrdimo hipotezo, da se sestava mikroalgne združbe med procesom obdelave bioplinskega digestata stabilizira. Hipotezo, da je mikroalgna bakterijska biomasa gojena v digestatu primeren substrat za produkcijo bioplina lahko delno potrdimo, saj je nastalo nekaj bioplina, vendar pa je potrebno proces optimizirati. Na podlagi naših rezultatov ne moremo v celoti potrditi hipoteze, da bo mikroalgna in mikroalžno-bakterijska združba učinkovito znižala koncentracijo dušika, fosforja, kalija in vsebnost KPK. Omenjena združba je učinkovito znižala koncentracijo fosforja, ni pa prišlo do znižanj koncentracije dušika, kalija in vsebnosti KPK.

Iz rezultatov pridobljenih v magistrski nalogi lahko zaključimo, da mikroalge lahko gojimo v digestatu ter pridobljeno biomaso uporabimo za produkcijo bioplina, vendar pa oba postopka potrebujeta optimizacijo, da bi bil proces učinkovit. Mikroalg v takih pogojih ne moremo uporabiti za odstranjevanje hranil iz digestata, prav tako pa neobdelana mikroalgna biomasa pridobljena z gojenjem na digestatu ni najbolj primeren substrat za predelavo v bioplin, saj so izkupički skupnega metana prenizki. Ob ustrezni optimizaciji procesov bi tak koncept najverjetneje uspešno deloval.

5.2 SKLEPI

- Mikroalgna in mikroalžno-bakterijska združba lahko raste v 3 % in 5 % digestatu.
- 3 % digestat, uporabljen v tem poizkusu, ima previsoko vsebnost hranil, zato mikroalgna in mikroalžno-bakterijska združba ne moreta učinkovito znižati vsebnosti dušika in ostalih hranil, mikroalge pa lahko asimilirajo fosfor.
- Za rast v digestatu so najprimernejše mešane kulture mikroalg.
- *Scenedesmus quadricauda* ni ustrezna vrsta mikroalge za rast v digestatu, vendar pa na digestatu uspešno rastejo druge vrste *Scenedesmus* sp. ter *Chlorella sorokiniana*.
- *Chlorella* sp. in *Scenedesmus* sp. brez predhodne obdelave nista najbolj primerni vrsti za produkcijo bioplina.

6 POVZETEK

Z naraščajočo potrebo po alternativni za fosilna goriva se povečuje tudi zanimanje za bioplin in s tem število bioplinaren. Stranski produkt anaerobne razgradnje je digestat, ki ga pogosto ločijo na trdni in tekoči del. Del digestata se lahko porabi kot gnojilo na kmetijskih zemljiščih, velik del tekočega dela digestata pa predstavlja odpadno vodo, ki zaradi visoke vsebnosti hranil, predvsem dušika, potrebuje nadaljnjo obdelavo.

Za učinkovito čiščenje odpadnih vod v bioloških čistilnih napravah je potrebno stalno prezračevanje s kisikom, kar zagotavlja optimalno delovanje aerobnih mikroorganizmov v aktivnem blatu. Ravno prezračevanje pa predstavlja večji del stroškov aerobne biološke čistilne naprave.

Kot alternativa klasičnim biološkim načinom čiščenja odpadne vode se zadnjih nekaj let ponovno pojavljajo tudi mikroalge, fotostintetski mikroorganizmi, ki v procesu fotosinteze fiksirajo CO₂ in proizvajajo kisik. Zaradi te lastnosti so mikroalge že v preteklosti preučevali v povezavi s čiščenjem odpadnih voda, saj mikroalge uspešno asimilirajo hranila iz odpadne vode in hkrati proizvajajo kisik, ki lahko koristi aerobnim bakterijam. Prav tako mikroalge lahko rastejo v digestatu, ki vsebuje veliko amonijskega dušika. Mikroalgam glavni vir dušika predstavlja prav amonijski dušik, za rast pa potrebujejo tudi fosfor, CO₂ in nekatere druge makro in mikronutriente, ki jih prav tako najdemo v digestatu.

Koncept gojenja mikroalg v digestatu je zanimiv tudi iz vidika proizvodnje biogoriv, saj s tem znižamo stroške za hranila, hkrati pa pridobimo mikroalžno biomaso, ki jo lahko uporabimo za produkcijo biogoriv ali produktov z višjo dodano vrednostjo. Ena izmed možnosti uporabe mikroalgne biomase za produkcije biogoriv je tudi anaerobna razgradnja biomase za produkcijo bioplina. Problem pri tem trenutno predstavljajo predvsem odporne celične stene nekaterih mikroalg in neustrezno razmerje C/N.

V magistrski nalogi smo si kot cilj zastavili optimizacijo gojenja mikroalg v bioplinskem digestatu, ki sicer predstavlja odpadni produkt, v našem primeru pa smo želeli hranila v digestatu uporabiti za gojenje mikroalg. Zanimalo nas je tudi ali so mikroalge enako ali bolj uspešne pri asimilaciji hranil v kombinaciji z bakterijami iz aktivnega blata čistilne naprave. Pridobljeno mikroalžno biomaso smo nato uporabili v testu biometanskega potenciala in preverili, kakšen je izplen metana iz mikroalgne biomase.

Na podlagi rezultatov gojenja mikroalg na digestatu smo ugotovili, da je za rast v digestatu najbolj primerna mešana mikroalжна združba; uspešno smo gojili vrsto *Chlorella sorokiniana* ter različne vrste *Scenedesmus* sp., z izjemo *Scenedesmus quadricauda*, ki ni primeren za rast na digestatu. Med poskusom ni prišlo do velikih razlik med asimilacijo

hranil v mikroalgnih in mikroalžno-bakterijskih mešanicah, smo pa ugotovili, da mikroalgne mešanice učinkovito asimilirajo fosfor v oblik ortofosfata. V našem primeru smo očitno uporabili preveliko koncentracijo digestata (3 % in 5 %), saj nismo zaznali velike porabe amonija in ostalih hranil, čeprav se je biomasa med poskusom povečevala. Opazili smo tudi slabšo aktivnost bakterij, za kar predvidevamo da je posledica pomanjkanja kisika, saj mikroalžno-bakterijskih mešanic nismo dodatno prezračevali, rast mikroalg pa ni bila optimalna in zato verjetno ni nastalo dovolj kisika.

Mikroalžno biomaso smo v nadaljevanju uporabili kot substrat za proizvodnjo bioplina in ugotovili, da kljub neoptimalnemu poteku procesa nastane nekaj bioplina. Ker smo tudi pri pozitivni kontroli dobili nižje vrednosti bioplina in manjši delež metana, kot predvideno, smo sklepali, da proces ni potekal optimalno in bi ga lahko izboljšali. Problem so verjetno predstavljale predvsem odporne celične stene mikroalg (*Chlorella* sp. in *Scenedesmus* sp.), ki jih anaerobni mikroorganizmi težko razgradijo. Prav tako smo anaerobno biomaso premalo obremenili. Problem pri produkciji bioplina iz mikroalgne biomase lahko predstavlja tudi neustrezno razmerje C/N, saj mikroalge vsebujejo velik delež proteinov in s tem veliko dušika. Proces anaerobne razgradnje mikroalgne biomase bi lahko izboljšali z ustrezno predobdelavo mikroalgne biomase in optimizacijo procesa.

Na podlagi rezultatov magistrske naloge lahko zaključimo, da določene vrste mikroalg uspešno rastejo na digestatu, vendar je potrebno proces še nadalje optimizirati, saj je rast odvisna od številnih dejavnikov, med drugim tudi od vrste digestat in koncentraciji hranil v njem. Mikroalgnim mešanicam moramo zagotoviti tudi ustrezno mešanje ter dovolj svetlobe, bakterije pa potrebujejo zadostno količino kisika. Mikroalžno biomaso lahko uporabimo za produkcijo bioplina, a je za višji izplen metana potrebna predhodna obdelava mikroalgne biomase in optimizacija procesa v smislu prilagajanja anaerobne biomase na substrat in zagotavljanja ustreznega razmerja C/N.

7 VIRI

- Abdel-Raouf N., Al-Homaidan A.A., Ibraheem I.B.M. 2012. Review: Microalgae and waste water treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19: 257-275.
- ARSO. 2014. Arhiv-opazovani in merjeni meterološki podatki po Sloveniji.
<http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive> (november, 2014).
- Aslan S., Kapdan I. K. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28: 64–70.
- Barsanti L., Gultieri P. 2006. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Washington, Taylor and Francis Group: 301 str.
- Bellinger E.G., Sigee D.C. 2015. *Freshwater algae: Identification, enumeration and use as bioindicators*. 2nd ed. Oxford, Wiley Backwell: 275 str.
- Biogas report 2014. 2014. Brussels, European Biogas Association: 29 str.
- Bjornsson W. J., Nicol R. W., Dickinson K. E., McGinn P. J. 2013. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 25, 5: 1523–1528.
- Boelee N. C., Temmink H., Janssen M., Buisman C. J. N., Wijffels R. H. 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Research*, 45, 18: 5925–5933.
- Cabanelas I. T. D., Ruiz J., Arbib Z., Chinalia F. A., Garrido-Pérez C., Rogalla F., Perales J. A. 2013. Comparing the use of different domestic wastewaters for coupling microalgal production and nutrient removal. *Bioresource Technology*, 131: 429–436.
- Cai T., Park S. Y., Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19: 360-369.
- Caporgno M. P., Trobajo R., Caiola, N., Ibáñez C., Fabregat A., Bengoa C. 2015. Biogas production from sewage sludge and microalgae co-digestion under mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy*, 75: 374–380.
- Chaudhari A.B., Suryawanshi P.C., Kothari R.M. 2011. Microbial aspects of anaerobic digestion for biogas production. V: *Anerobic digestion: Processes, products, and applications*. Caruana D.J., Olsen A. (eds.) Hauppauge, Nova Science Publishers: 133-143.

- Chen G., Zhao L., Qi Y. 2015. Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review. *Applied Energy*, 137: 282–270.
- Cho S., Lee N., Park S., Yu J., Luong T. T. Oh Y.K., Lee T. 2013. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresource Technology*, 131: 515–520.
- Congestri R., Di Pippo F., De Philippis R., Buttino I., Paradossi G., Alberatano P. 2006. Seasonal succession of phototrophic biofilms in an Italian wastewater treatment plant: biovolume, spatial structure and exopolysaccharides. *Aquatic Microbial Ecology*, 45: 301-312.
- Craggs R., Sutherland D., Campbell H. 2012. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *Journal of Applied Phycology*, 24, 3: 329-337.
- Dalrymple O. K., Halfhide T., Udom I., Gilles B., Wolan J., Zhang Q., Ergas S. 2013. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. *Aquatic Biosystems*, 9, 1:1-11.
- Dębowski M., Zieliński M., Grala A., Dudek M. 2013. Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies—review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27: 596–604.
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. Biogas from waste and renewable resources: An introduction. Weinheim, Wiley-VCH: 443 str.
- Ehimen E. A., Sun Z. F., Carrington C. G., Birch E. J., Eaton-Rye J. J. 2011. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy*, 88, 10: 3454–3463.
- Franchino M., Comino E., Bona F., Riggio V. A. 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere*, 92, 6: 738–744.
- Gonzales-Fernandez C., Bernet N., Steyer J. P. 2012. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel . Part II□: Focus on biomethane. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6, 2: 205–218.
- González-Fernández C., Sialve B., Bernet N., Steyer J. P. 2013. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 129: 219–223.

- Grobbelaar J.U. 2004. Algal nutrition: Mineral nutrition. V: Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Richmond A. (ed.). Oxford, Blackwell Publishing: 97-115.
- Hansen T. L. 2004. Method for determination of methane potential of solid organic waste. Waste Management, 24: 393-400.
- He P. J., Mao B., Lü F., Shao L. M., Lee D. J., Chang J. S. 2013. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. Bioresource Technology, 146: 562–568.
- Holdeman L.V., Cato E.P., Moore W.E.C. 1977. Anaerobe laboratory manual. 4th ed. VPI, Blacksburg, Virginia.
- Horan N.J., Salih A., Walkinshaw T. 2006. Wind-aerated lagoons for sustainable treatment of wastewaters from small communities. Water and Environment Journal, 20, 4: 265-270.
- Jegade A. O. 2012. Anaerobic digestion of cyanobacteria and *Chlorella* to produce methane for biofuel. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 5, 3: 1–8.
- Ji F., Liu Y., Hao R., Li G., Zhou Y., Dong R. 2014. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. Bioresource Technology, 161: 200–207.
- Kobayashi N., Noel E. A., Barnes A., Watson A., Rosenberg J. N., Erickson G., Oyler G. A. 2013. Characterization of three *Chlorella sorokiniana* strains in anaerobic digested effluent from cattle manure. Bioresource Technology, 150: 377–386.
- Larsdotter K. 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. Vatten, 62, 13: 31–38.
- Li Y., Zhou W., Hu B., Min M., Chen P., Ruan R. R. 2011. Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: strains screening and significance evaluation of environmental factors. Bioresource Technology, 102, 23: 10861–10867.
- Marcilhac C., Sialve B., Pourcher A.M., Ziebal C., Bernet N., Béline F. 2014. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. Water Research, 64: 278–287.
- Mendez L., Mahdy A., Ballesteros M., González-Fernández C. 2014. Methane production of thermally pretreated *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. biomass at increasing biomass loads. Applied Energy, 129: 238–242.

- Montingelli M. E., Tedesco S., Olabi A. G. 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43: 961–972.
- Mottet A., Habouzit F., Steyer J. P. 2014. Anaerobic digestion of marine microalgae in different salinity levels. *Bioresource Technology*, 158: 300–306.
- Mussnug J. H., Klassen V., Schlüter A., Kruse O. 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150, 1: 51–56.
- Sattar A.N. 2011. Anaerobic digestion: Processes, products, and applications. V: *Anaerobic digestion: Processes, products, and applications*. Caruana D.J., Olsen A. (eds.) Hauppauge, Nova Science Publishers: 133–143.
- Parkin GF, Owen WF. 1986. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. *Journal of Environmental Engineering*, 112, 5: 867–920.
- Passos F., Uggetti E., Carrère H., Ferrer I. 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresource Technology*, 172: 403–412.
- Ramos-Suárez J. L., Carreras N. 2014. Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal*, 242: 86–95.
- Ras M., Lardon L., Brun, S., Bernet N., Steyer J. P. 2011. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102, 1: 200–206.
- Rasoul-Amini S., Montazeri-Najafabady N., Shaker S., Safari A., Kazemi A., Mousavi P., Ghasemi Y. 2013. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in batch culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 2: 126–131.
- Rawat I., Ranjith Kumar R., Mutanda T., Bux F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88, 10: 3411–3424.
- Razzak S. A., Hossain M. M., Lucky R. A., Bassi A. S., De Lasa H. 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27: 622–653.
- Resnik M. 2011. Encimska hidroliza celične stene mikroalge *Scenedesmus quadricauda*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Medoddelčni študij mikrobiologije: 56 str.
- Rusten B., Sahu A. K. 2011. Microalgae growth for nutrient recovery from sludge liquor and production of renewable bioenergy. *Water Science & Technology*, 64, 6: 1195–1201.

- Sialve B., Bernet N., Bernard O. 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, 4: 409–416.
- Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. 2005. American Public Health Association, Washington. <http://www.standardmethods.org/> (oktober, 2010).
- Su Y., Mennerich A., Urban B. 2012. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technology*, 105: 67–73.
- Uggetti E., Sialve B., Latrille E., Steyer J.P. 2014a. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: the role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology*, 152: 437–443.
- Uggetti E., Sialve B., Trably E., Steyer J., L. De. 2014b. Integrating microalgae production with anaerobic digestion□: a biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* . DOI: 10.1002/bbb.1469: 14 str.
- Wang L., Li Y., Chen P., Min M., Chen Y., Zhu J., Ruan R. R. 2010a. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 101, 8: 2623–2628.
- Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Ruan R. 2010b. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162, 4: 1174–1186.
- Wang M., Sahu A. K., Rusten B., Park C. 2013. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 142: 585–590.
- Ward A. J., Lewis D. M., Green F. B. 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: A review. *Algal Research*, 5: 204–214.
- Yen H. W., Brune D. E. 2007. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98: 130–134.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. Romani Marinšek Logar, ker mi je omogočila opravljati magistrsko nalogo na želeno temo; hvala za strokovne nasvete tekom izdelave magistrske naloge, predvsem pa za hiter odziv pri pregledu naloge. Hvala prof. dr. Davidu Stoparju za recenzijo naloge.

Najlepše hvala celotni ekipi iz podjetja AlgEn d.o.o., ker so mi omogočil izdelavo magistrske naloge in mi nudili vso potrebno pomoč in opremo. Še posebej hvala Mihiu Žitniku za strokovne nasvete in končne popravke, ter Robertu Reinhardtju za vso pomoč, predvsem tehnično, ob vseh urah dneva.

Zahvaljujem se tudi dr. Maši Zorec, dr. Lijani Fanedl in Maši Čater za nasvete in pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela naloge, še posebej hvala pa Marti Majdič za neštete usluge, saj bi brez nje verjetno še danes merila vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin na Rodici.

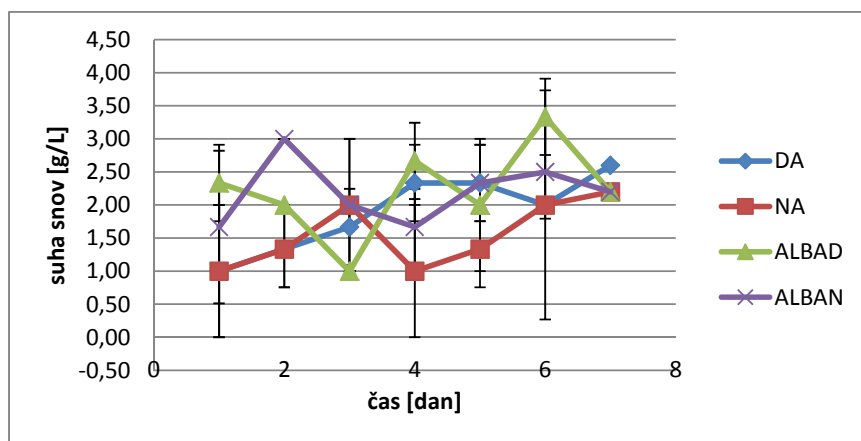
Nazadnje pa hvala za potrpljenje še vsem prijateljem in sorodnikom, ki so v preteklem letu nedvomno izvedeli veliko o mikroalgah, ne vedno po lastni želji.

PRILOGE

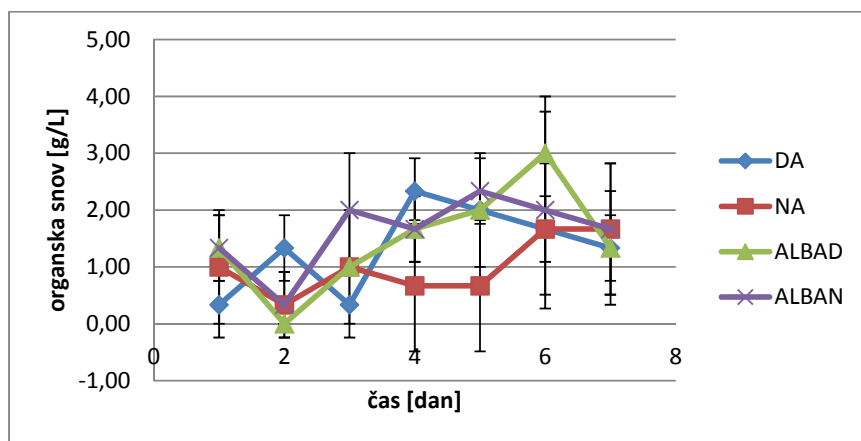
PRILOGA A: Spremljanje prirasta biomase med gojenjem v digestatu

Prirast mikroalgne biomase smo spremljali z merjenjem suhe in organske snovi v vzorcih. Suha snov predstavlja organske in anorganske spojine, organska snov pa samo organske spojine in je v tem primeru merilo za količino mikroalgnih in bakterijskih celic. Med poskusom smo opazili trend naraščanja suhe snovi v vseh mešanicah, čeprav so opazna občasna nihanja. Največja nihanja smo opazili pri mešanicah definiranih mikroalg in aktivnega blata (ALBAD) ter nedefiniranih mikroalg (NA). Prav tako je viden trend naraščanja organske snovi v vseh mešanicah. Opazili smo, da pretežni del suhe snovi predstavlja organska snov.

PRILOGA A1: Naraščanje suhe snovi v vzorcih za predhodni poskus

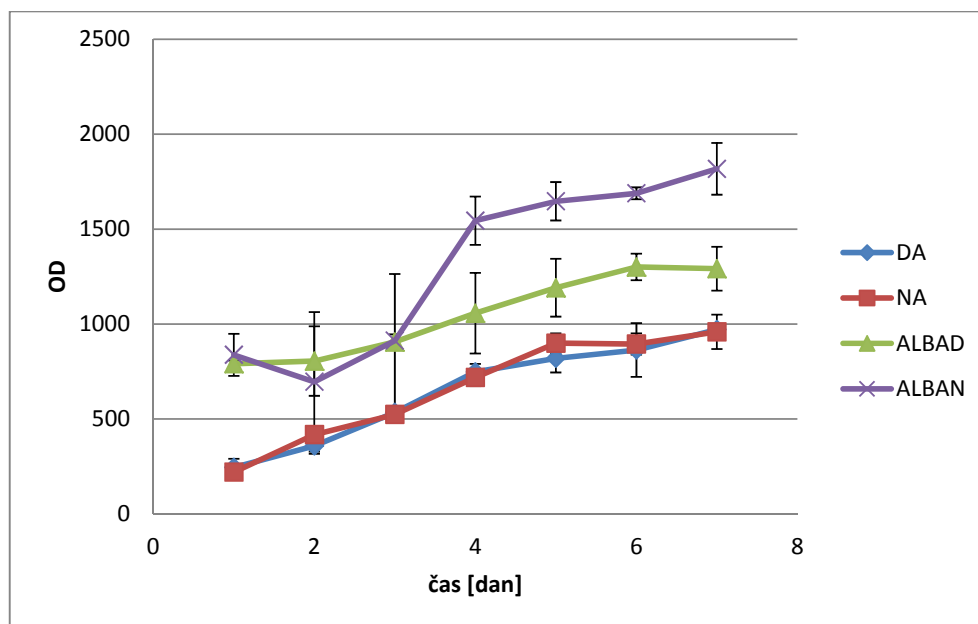


PRILOGA A2: Naraščanje organske snovi v vzorcih za predhodni poskus



PRILOGA A3: Spremljanje prirasta biomase preko optične gostote (predhodni poskus)

Prirast biomase smo spremljali tudi z merjenjem optične gostote. OD je naraščal pri vseh mešanicah med celotnim poskusom. Prirast biomase smo spremljali z dvema metodama, zaradi možnega vpliva barve digestata na meritve OD.

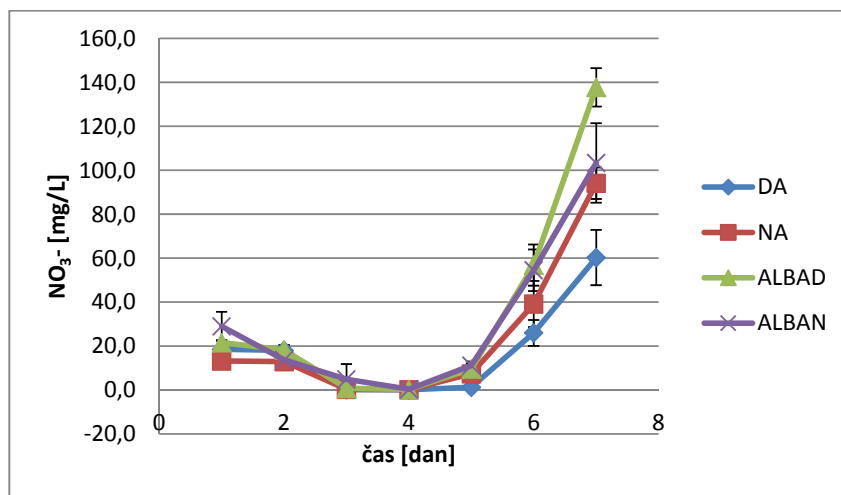


PRILOGA B: Poraba hranil med predhodnim poskusom

Med celotnim poskusom smo spremljali porabo hranil z merjenjem koncentracij ionov v vzorcih. Merili smo koncentracijo nitrata, nitrita, amonija, kalcija, kalija, natrija in klora.

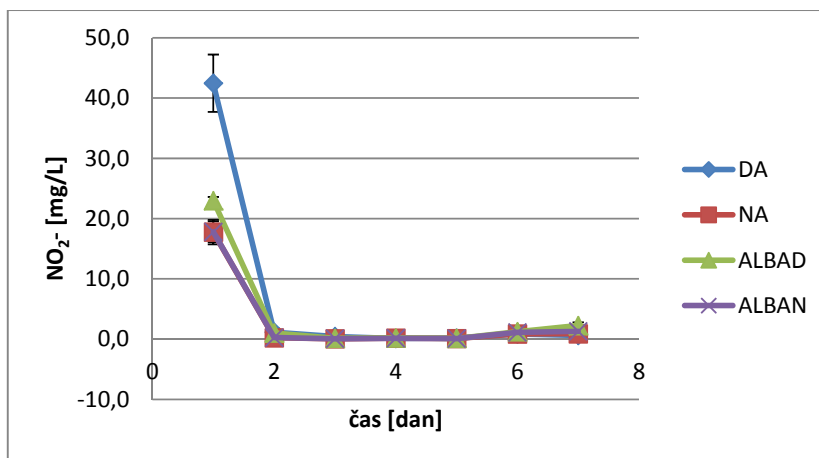
PRILOGA B1: Spreminjanje koncentracije NO_3^- med predhodnim poskusom

Koncentracija nitrata je v vseh mešanicah padala do četrtega dne, nato pa se je dvignila. Zadnji dan poskusa je bila koncentracija nitrata v vseh mešanicah višja kot prvi dan poskusa. Vrednosti prvi dan poskusa so se gibale med 13,2 mg/L (NA) in 29 mg/L (ALBAN), vrednosti zadnji dan pa so bile med 60,2 mg/L (DA) ter 137,7 mg/L (ALBAD).



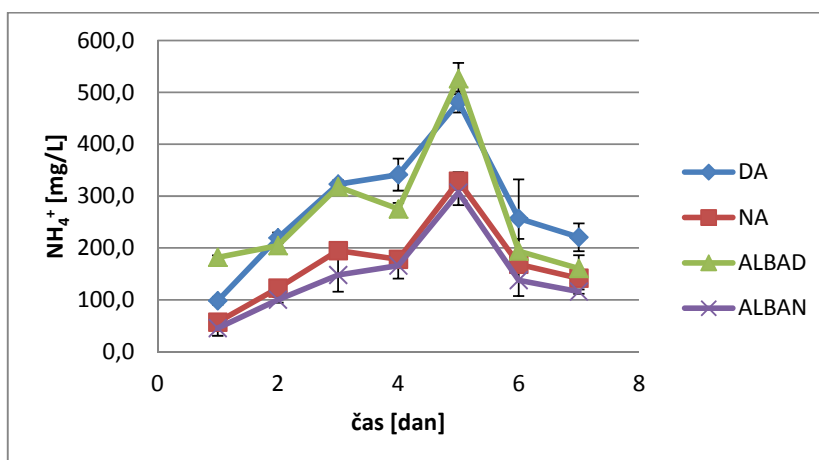
PRILOGA B2: Spreminjanje koncentracije NO_2^- med predhodnim poskusom

Koncentracija nitrita je bila prvi dan poskusa pri vseh mešanicah višja, kot zadnji dan poskus. Koncentracija nitrita je padla takoj drugi dan poskusa in ostala približno enakih vrednosti v vseh mešanicah do konca poskusa. Vrednosti prvi dan poskusa so se gibale od 17,7 mg/L (NA) do 42,5 mg/L (DA), zadnji dan poskusa pa med 0,6 mg/L (DA) in 2,3 mg/L (ALBAD).



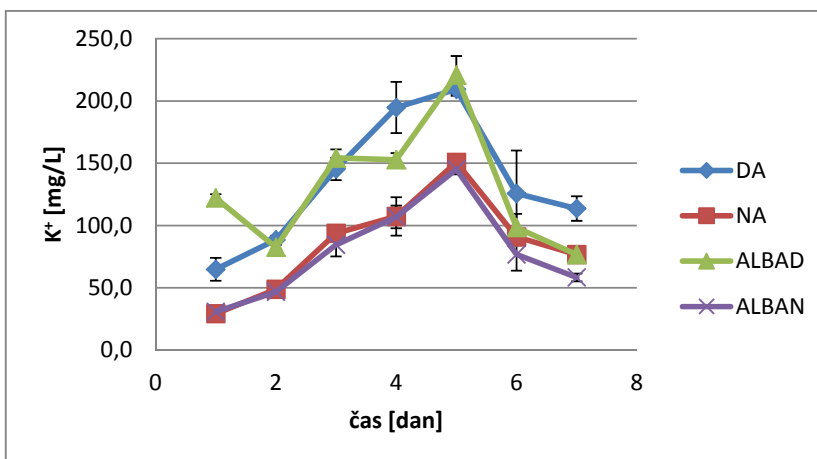
PRILOGA B3: Spreminjanje koncentracije NH_4^+ med predhodnim poskusom

Koncentracija amonija je v vseh mešanicah naraščala med poskusom; najvišje vrednosti smo opazili 5. dan poskusa, nato pa se je koncentracija zopet znižala, a je bila z izjemo mešanice ALBAD zadnji dan višja kot prvi dan poskusa. Vrednosti so se prvi dan poskusa gibale med 45,3 mg/L (ALBAN) in 181,8 mg/L (ALBAD), zadnji dan poskusa pa med 115,8 mg/L (ALBAN) ter 220,6 mg/L (DA).



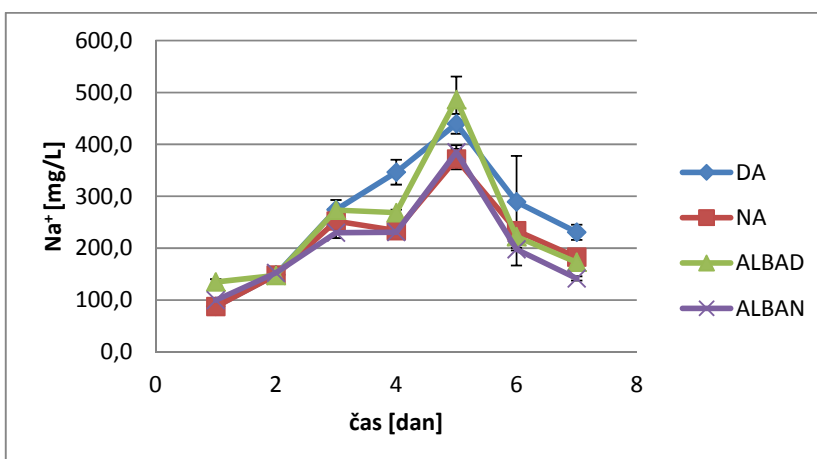
PRILOGA B4: Spreminjanje koncentracije K^+ med predhodnim poskusom

Koncentracija kalija je med poskusom naraščala v vseh mešanicah, tudi tukaj je prišlo do povišanih vrednosti 5. dan poskusa, nato se je koncentracija kalija zopet znižala. Vrednosti so se prvi dan poskusa gibale med 29,2 mg/L (NA) ter 122,1 mg/L (ALBAD). Koncentracije kalija zadnji dan poskusa so bile višje v vseh mešanicah, razen v mešanici ALBAD. Koncentracije kalija zadnji dan poskusa so se gibale med 58,3 mg/L (ALBAN) in 113,6 mg/L (DA).



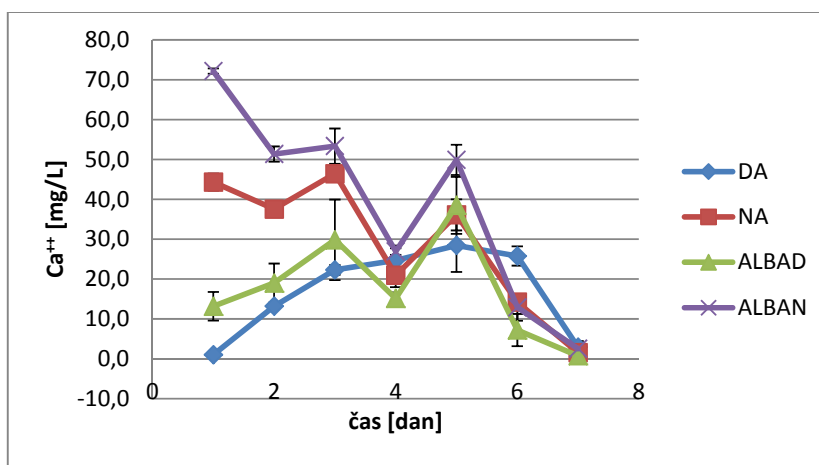
PRILOGA B5: Spreminjanje koncentracije Na^+ med predhodnim poskusom

Koncentracija natrija se je povečevala med celotnim poskusom v vseh. Najvišje koncentracije natrija smo opazili 5. dan poskusa, potem so se zopet znižale, a ostale višje od začetnih. Koncentracija natrija se je gibala med 87,4 mg/L (NA) in 134,7 mg/L (ALBAD) ter med 141,6 mg/L (ALBAN) ter 230,6 mg/L (DA) na zadnji dan poskusa.



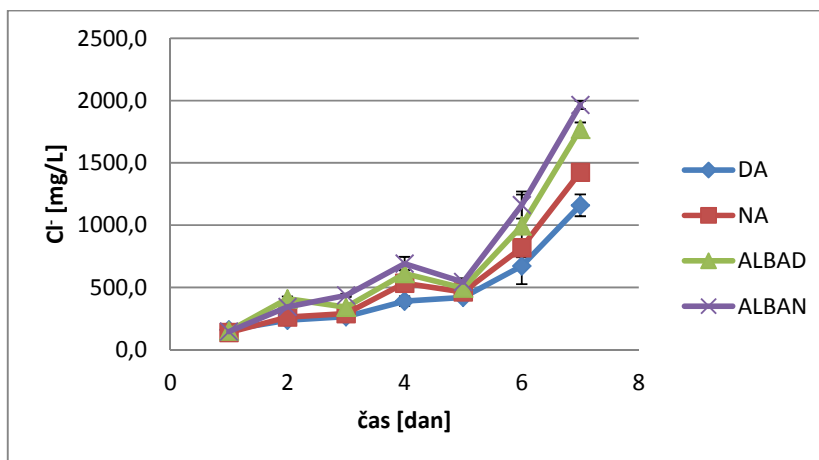
PRILOGA B6: Spreminjanje koncentracije Ca^{++} med predhodnim poskusom

Koncentracija kalcija se je prvi dan poskusa med mešanicami zelo razlikovala, med poskusom je prihajalo do velikih nihanj v koncentraciji kalcija. Zadnji dan poskusa je bila koncentracija kalcija v vseh mešanicah nižja kot prvi dan. Vrednosti so se prvi dan gibale med 1,0 mg/L (DA) ter 72,2 mg/L (ALBAN), zadnji dan poskusa pa so bile koncentracije kalcija podobne- med 0,7 mg/L (ALBAD) ter 2,9 mg/L (DA).



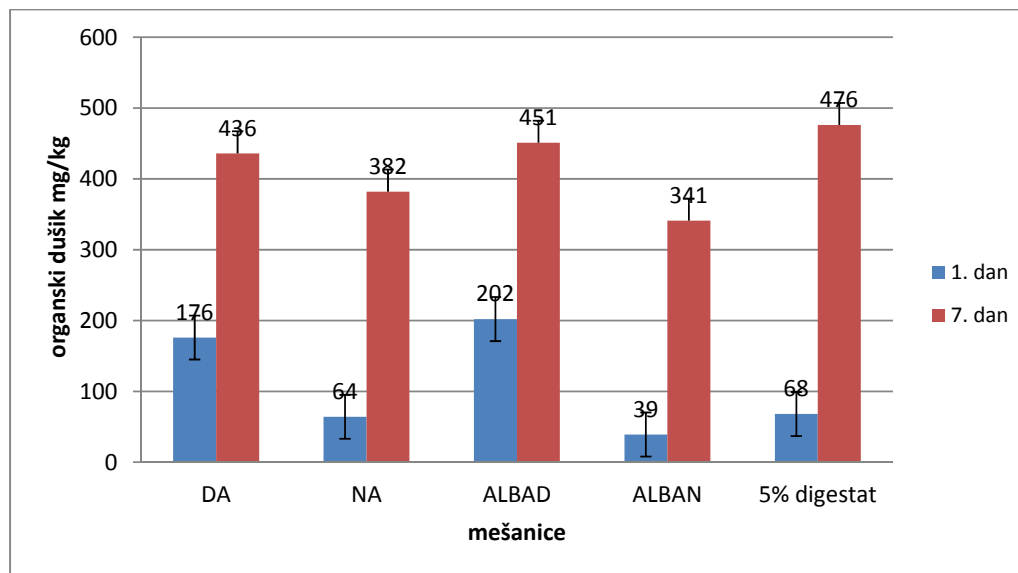
PRILOGA B7: Spreminjanje koncentracije Cl^- med predhodnim poskusom

Koncentracija klora se je prvi dan poskusa gibala med 137,6 mg/L (NA) in 159,2 mg/L (DA), nato pa je naraščala med celotnim poskusom v vseh mešanicah. Vrednosti zadnji dan poskusa so se gibale med 1159,1 mg/L ter 1965,2 mg/L.



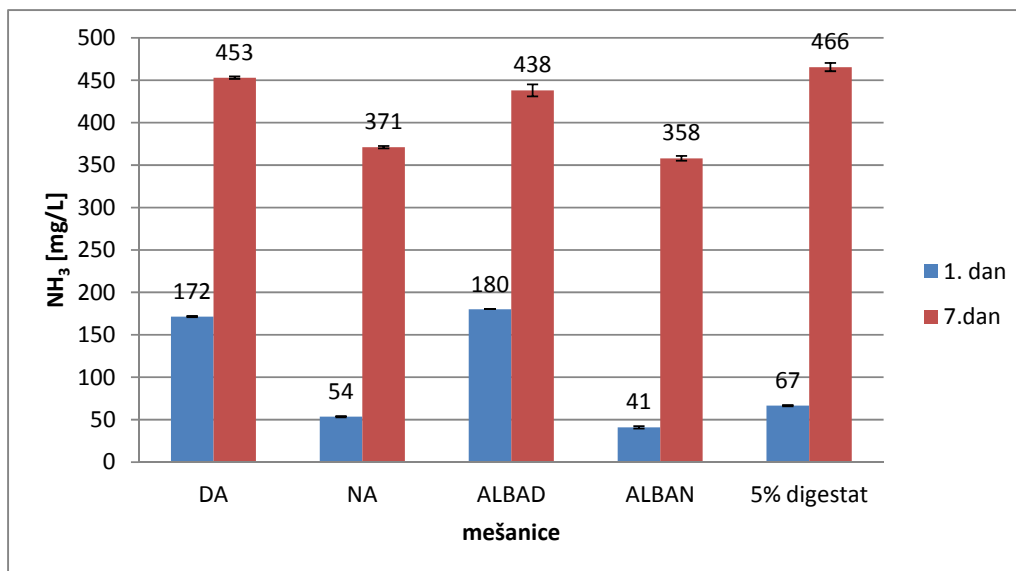
PRILOGA C: Vsebnost organskega dušika v mešanicah 1. in 7. dan predhodnega poskusa

Zaradi nihanj v meritvah z ionsko selektivnimi elektrodami v predhodnih poskusih smo vsebnost organskega dušika in amonijaka še dodatno preverili z analizo v kemijskem laboratoriju Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti. Skupni organski dušik so merili z metodo Kjeldahl (Standard Methods, 2004). Primerjali smo vsebnost organskega dušika in amonijaka prvi ter zadnji dan poskusa, v primerjavi z digestatom. Vrednosti organskega dušika so se prvi dan gibale med 39 mg/L (ALBAN) ter 202 mg/L (ALBAD). Med poskusom smo dnevno dodali toliko digestata, da smo dosegli povprečno vrednost 68 mg/L organskega dušika. Vrednosti zadnji dan so bile v vseh mešanicah višje kot prvi dan, med 341 mg/L (ALBAN) ter 451 mg/L (ALBAD). Če te vrednosti primerjamo z vrednostjo 476 mg/L organskega dušika, kolikor smo ga dodali z digestatom med poskusom, vidimo, da se je nekaj organskega dušika porabilo v vseh mešanicah, največ v mešanicah ALBAD in DA.



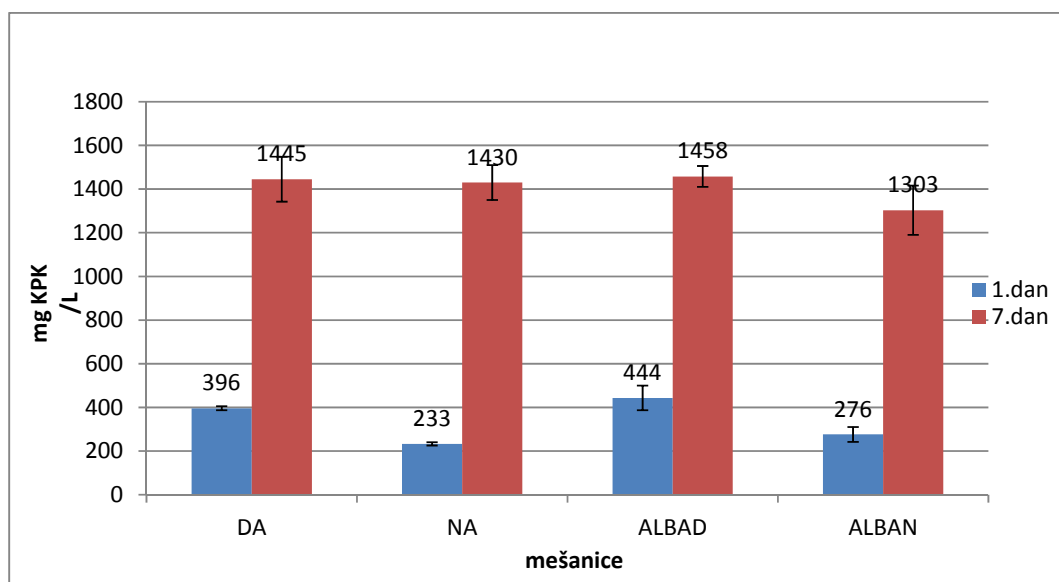
PRILOGA C1: Vsebnost amonijaka v mešanicah 1. in 7. dan predhodnega poskusa

Primerjali smo še vrednosti amonijaka (izmerjeno v kemijski laboratoriju Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti) prvi ter zadnji dan poskusa v vseh mešanicah, v primerjavi z vrednostmi amonijaka v digestatu, ki smo ga dodali med poskusom. Vrednosti amonijaka v mešanicah na prvi dan poskusa so se gibale med 41 mg/L (ALBAN) ter 180 mg/L (ALBAD). V vseh mešanicah je bila zadnji dan poskusa koncentracija amonijaka višja, kot prvi dan. Vrednosti so se gibale med 358 mg/L (ALBAN) ter 466 mg/L (DA). Med poskusom smo z digestatom dodali toliko amonijaka, da smo dosegli koncentracijo 466 mg/L. Na spodnji sliki vidimo, da je vsebnost amonijaka v mešanicah na zadnji dan nižja, kot v digestatu.



PRILOGA D: Kemijska potreba po kisiku (KPK) v predhodnem poskusu

Prvi in zadnji dan poskusa smo merili kemijsko potrebo po kisiku v vseh mešanicah. Povprečna vrednost KPK za 5 % digestat je bila 565 mg/L. KPK se je prvi dan poskusa gibal med 233 mg KPK /L (NA) ter 444 mg KPK/L (ALBAD). Zadnji dan poskusa smo izmerili višje vrednosti KPK pri vseh mešanicah. Vrednosti so se gibale med 1303 mg KPK /L (ALBAN) ter 1458 mg KPK /L (ALBAD).

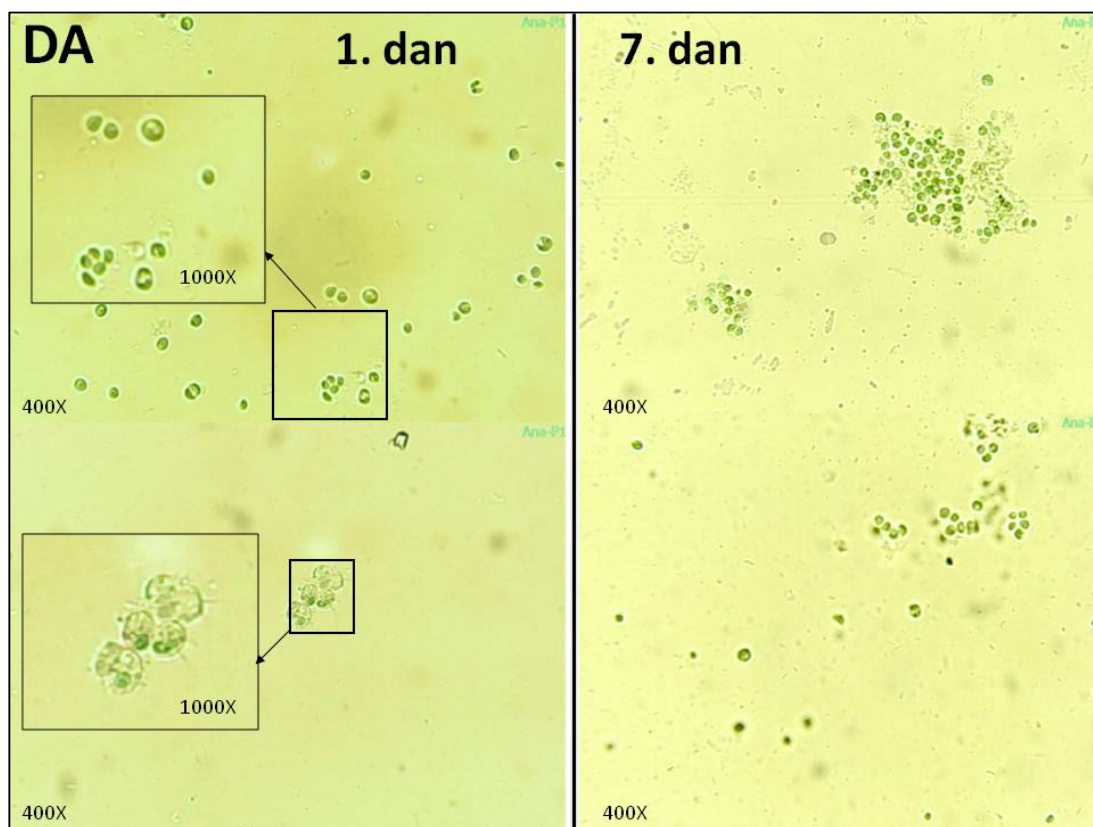


PRILOGA E: Sprememba strukture mikroalgne združbe med poskusom

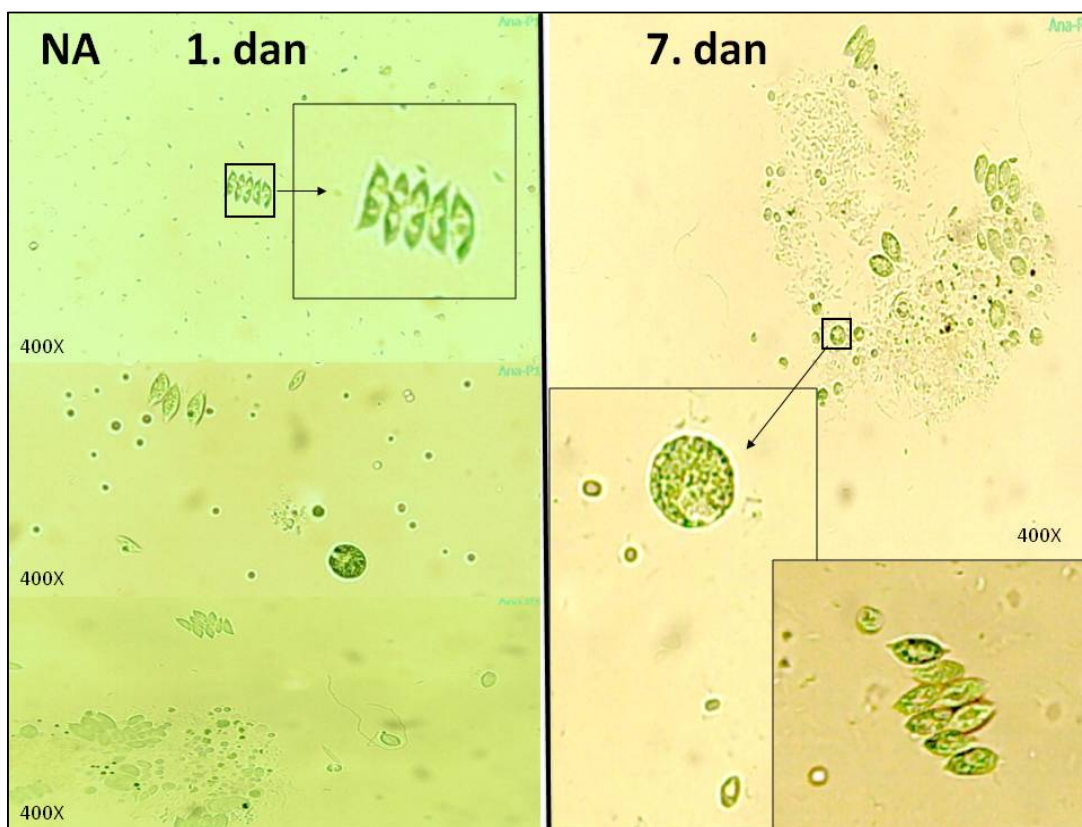
Spremembo strukture mikroalgne združbe smo spremljali z mikroskopiranjem svežih vzorcev med kultivacijo. Združbo bi lahko primerjali tudi z uporabo genetski metod, na primer TRFLP, a je to presegalo obseg te magistrske naloge. Primerjali smo sestavo združbe v vseh mešanicah na prvi in zadnji dan poskusa.

Do spremembe združbe je prišlo v mešanicah z definiranimi algami, kot je razvidno iz priloge E1 in E3. Pri mešanici DA so prvi dan vidne tako celice *Chlorella sorokiniana* (zgornji del slike v prilogi E1, 1. dan), kot celice *Scenedesmus quadricauda* (spodnji del slike v prilogi E1, 1. dan). Sedmi dan poskusa smo opazili samo še celice *Chlorella sorokiniana*. Podobno se je združba spremenila tudi v mešanici ALBAD, saj tudi tukaj sedmi dan nismo več opazili celic *Scenedesmus quadricauda*, ki jih lahko vidimo 1. dan (prvi okvirček na spodnjem levem delu slike v prilogi E3). Opazili smo tudi diatomeje (drugi okvirček na spodnjem levem delu slike v prilogi E3) (Bellinger in Sigee, 2015). Pri mešanicah NA (slika v prilogi E2) in ALBAN (slika v prilogi E4) nismo opazili večjih sprememb med prvim in sedmim dnem poskusa. Oba dneva smo opazili celice *Scenedesmus* sp. (celice v obliki elips), ter številne okrogle celice, za katere predvidevamo, da spadajo v rod *Chlorella* in *Chlamydomonas* (Bellinger in Sigee, 2015). Preparate smo pregledali na 20 vidnih poljih. Zaradi velikega števila slik in slabe kvalitete posnetkov, so prikazane samo izbrane slike, ki ustrezno prikažejo videno strukturo združbe.

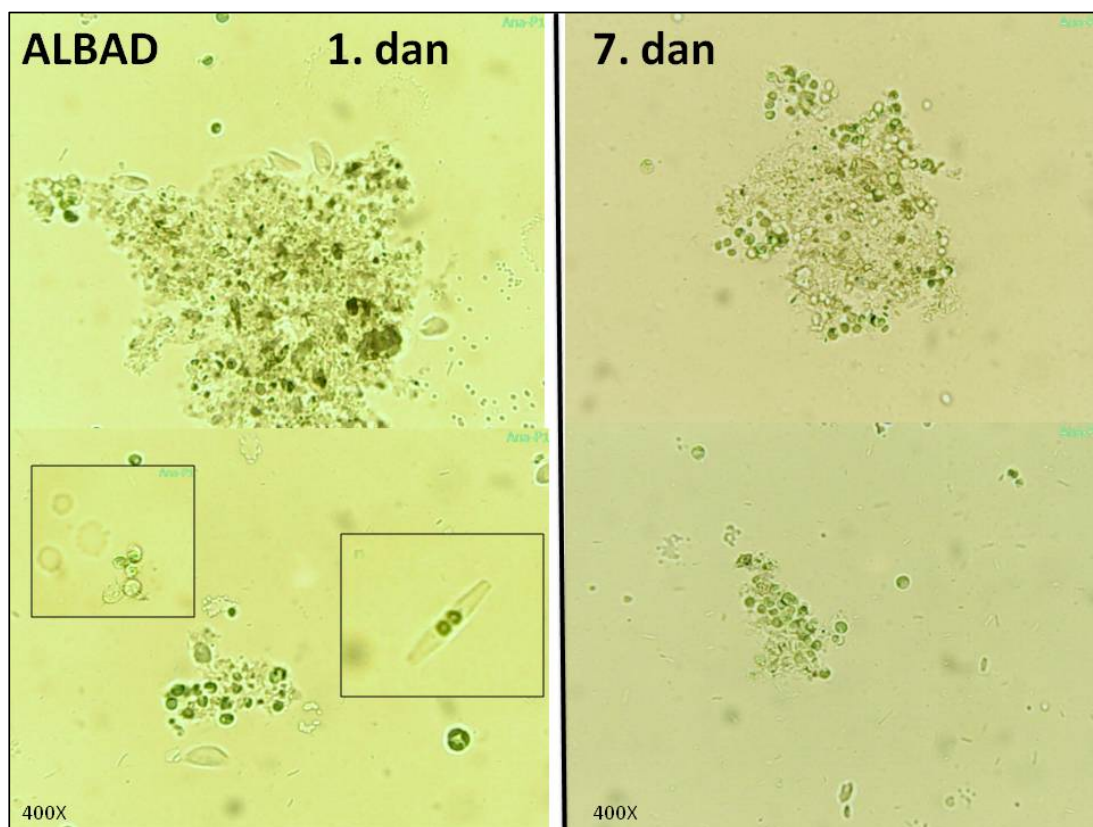
PRILOGA E1: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica DA (definirane mikroalge), slikano pri 400x povečavi



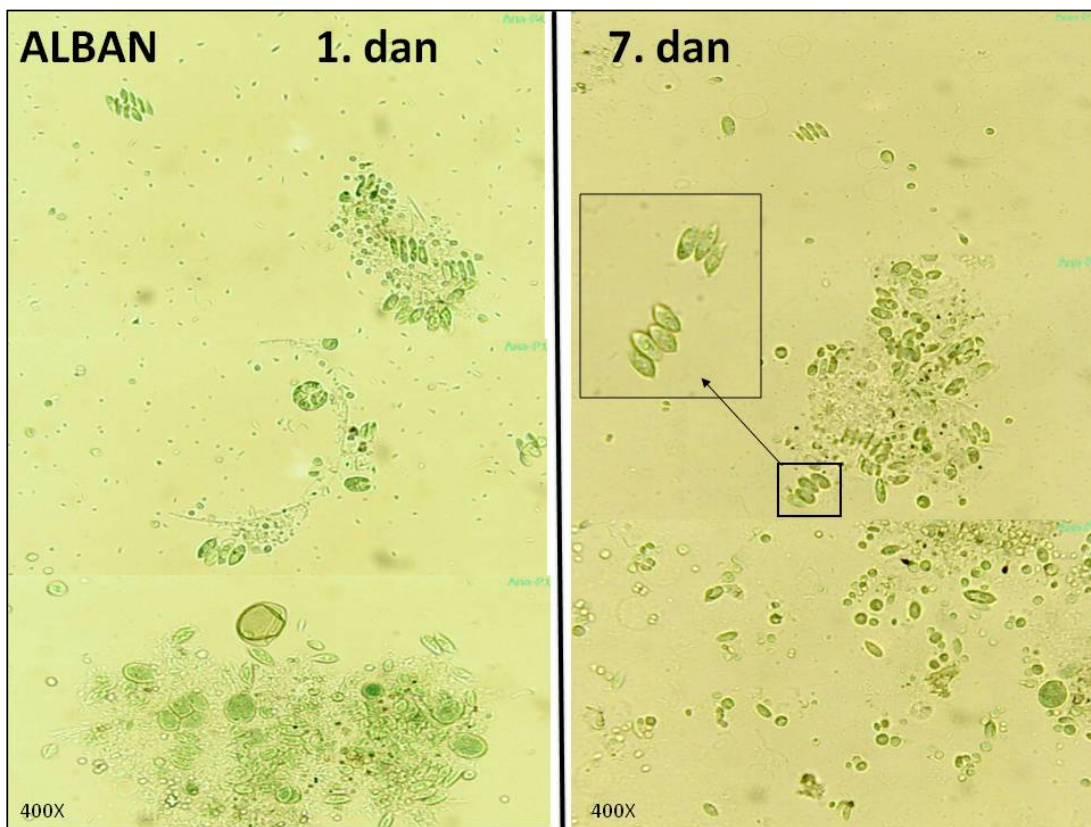
PRILOGA E2: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica NA (definirane mikroalge), slikano pri 400x povečavi



PRILOGA E3: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica ALBAD (definirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x povečavi

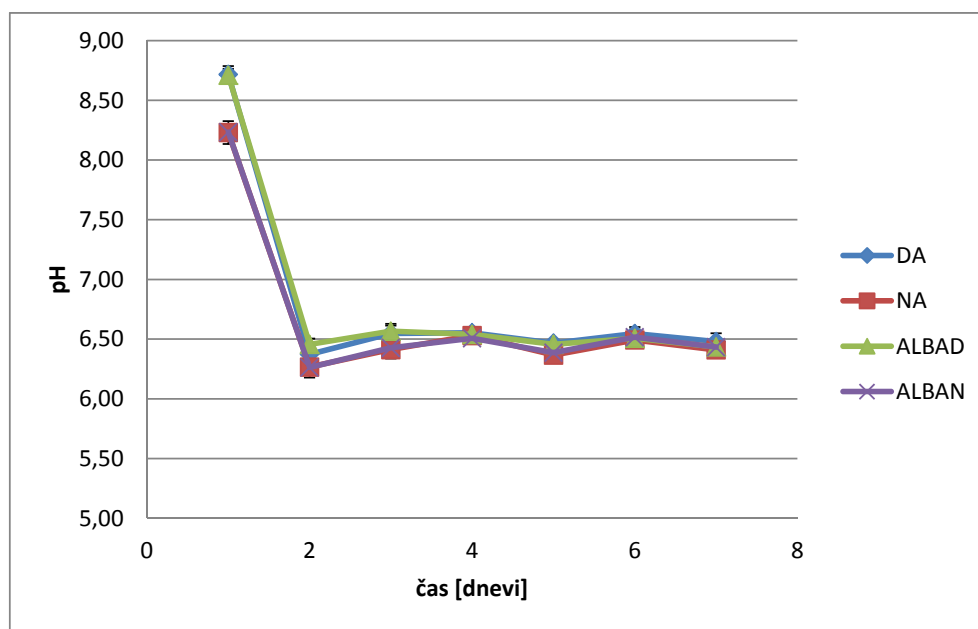


PRILOGA E4: Sprememba sestave združbe predhodnega poskusa, mešanica ALBAN (nedefinirane mikroalge in aktivno blato), slikano pri 400x povečavi

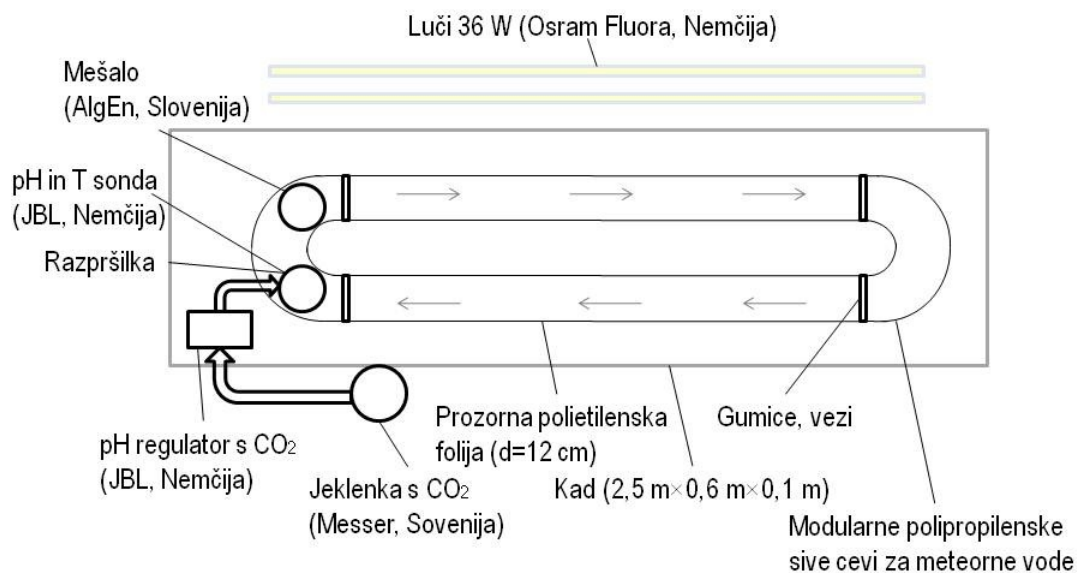


PRILOGA F: Spreminjanje pH vrednosti med poskusom pri mešanicah DA (definirane mikroalge), NA (nedefinirane mikroalge), ALBAD (definirane mikrolage in aktivno blato) ter ALBAN (nedefinirane alge in aktivno blato)

Med poskusom smo vsak dan merili pH vrednost. pH vrednost vseh mešanic se je prvi dan gibala med 8,23 in 8,72, nato pa se je znižala in ostala na približno enaki ravni do konca poskusa. Zadnji dan je bila pH vrednost mešanic med 6,41 in 6,48.



PRILOGA G: Shema cevnega fotobioreaktorja uporabljenega za gojenje nedefiniranih mešanih mikroalgnih kultur (Resnik, 2011: 18)



PRILOGA G1: Cevni fotobioreaktor uporabljen za gojenje nedefiniranih mešanih mikroalgnih kultur

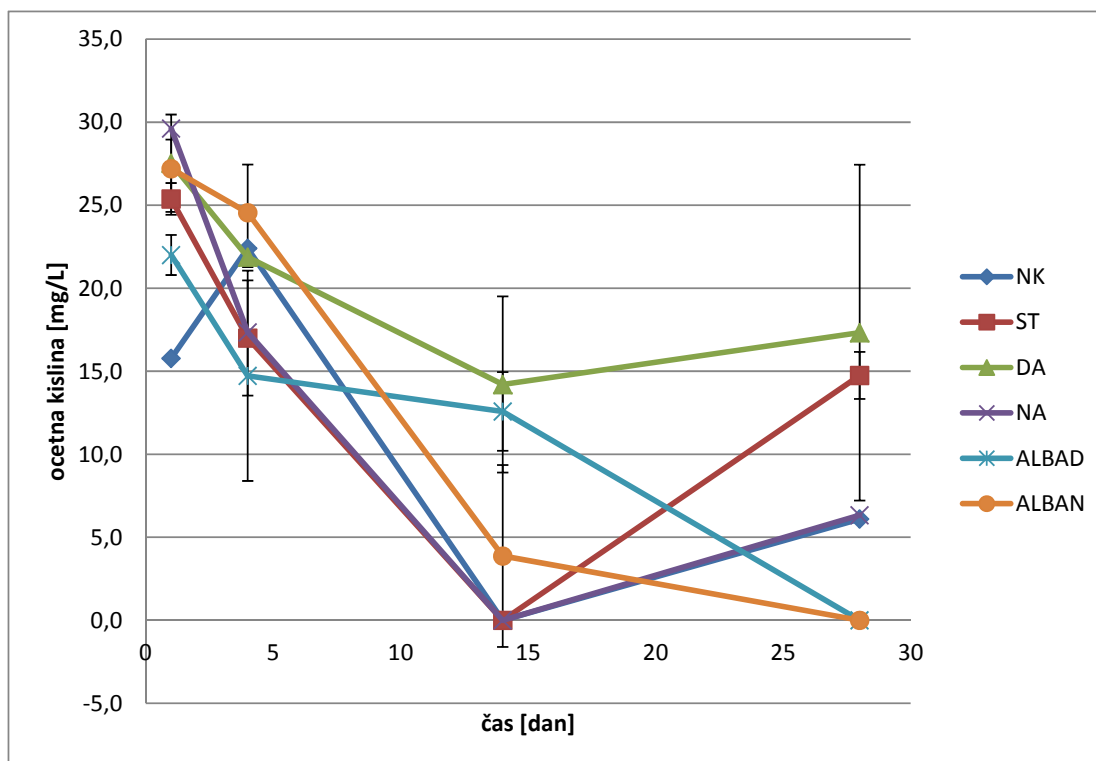


PRILOGA H: Koncentracija suhe in organske snovi prvi in zadnji dan poskusa optimizacije gojenja mikroalg

	SS [g/L]		OS [g/L]	
	1. dan	10. dan	1. dan	10. dan
BA	0,17	0,40	0,10	0,40
DA	0,43	1,17	0,43	1,07
NA	0,33	1,13	0,23	0,97
ALBAD	0,63	1,30	0,53	1,17
ALBAN	0,37	0,90	0,33	0,87

SS= suha snov, OS=organska snov, BA=aktivno blato, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato

PRILOGA I: Spreminjanje koncentracije očetne kisline v vzorcih tekom poskusa BMP; NK=negativna kontrola, ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato



PRILOGA II: Skupen volumen nastalega bioplina po dnevih (mL)

mešanica/čas	1.dan	3.dan	4.dan	7.dan	11.dan	14.dan	21.dan	28.dan
ST	25	52	60	62	67	72	82	90
DA	2	9	16	19	25	29	34	34
NA	4	14	20	31	38	41	49	49
ALBAD	2	9	16	21	24	32	36	39
ALBAN	4	16	24	31	34	34	43	42

ST=pozitivna kontrola, DA=definirane mikroalge, NA=nedefinirane mikroalge, ALBAD= definirane mikroalge in aktivno blato, ALBAN=nedefinirane mikroalge in aktivno blato