

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Luka ŠAFARIČ

**IZBOLJŠANJE DELOVANJA BIOPLINSKEGA
REAKTORJA NA KOMUNALNI ČISTILNI NAPRAVI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Luka ŠAFARIČ

**IZBOLJŠANJE DELOVANJA BIOPLINSKEGA REAKTORJA NA
KOMUNALNI ČISTILNI NAPRAVI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**IMPROVEMENT OF ANAEROBIC DIGESTION OF
WASTEWATER SLUDGE IN A MUNICIPAL WASTEWATER
TREATMENT PLANT**

M.SC. THESIS

Master Study Programmes – Field Microbiology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Centralni čistilni napravi Domžale-Kamnik.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za recenzenta pa prof. dr. Aleša Podgornika.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. Aleš Podgornik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Aleš PODGORNIK

Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo, in procesno kontrolo (COBIK)

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Luka Šafarič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 602.4:628.35+628.385(043)=163.6
KG	bioplin / bioplinski reaktorji / mikrobne združbe / encimsko mikrobna obdelava / bioreaktorji / biološke čistilne naprave / dehidrirano blato / surovo blato / odpadne fermentacijske brozge farmacevtske industrije / TRFLP
AV	ŠAFARIČ, Luka, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ PODGORNIK, Aleš (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2013
IN	IZBOLJŠANJE DELOVANJA BIOPLINSKEGA REAKTORJA NA KOMUNALNI ČISTILNI NAPRAVI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIII, 67 str., 34 sl., 6 pril., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Čistilne naprave ob svojem delovanju proizvajajo velike količine odvečnega primarnega in aktivnega blata, ki skupaj tvorita surovo blato. To se pogosto uporabi za proizvodnjo bioplina, iz katerega nato pridobivajo električno energijo. Z namenom povečanja učinkovitosti tega procesa konstantno iščejo in uvajajo nove rešitve. Tudi ta naloga je bila opravljena s tem namenom. Z dvema pilotnima reaktorjema (en kontrolni in en eksperimentalni) smo na Centralni čistilni napravi (CCN) Domžale-Kamnik preverjali smotrnost uporabe dveh različnih postopkov za izboljšanje izplena bioplina in dveh novih substratov za njegovo proizvodnjo. Največje izboljšanje (do 40 %) produkcije bioplina smo dosegli z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor. Uporaba mešanice hidrolitičnih encimov in mikroorganizmov se ni izkazala kot uporabna, saj je večinoma vodila le do manj kot 2 % izboljšanja produkcije bioplina. Preverjali smo tudi primernost dveh odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije za anaerobno razgradnjo. Najboljše rezultate smo dobili z brozgo T, ki je izkazovala zelo podobno razgradljivost kot surovo blato. Potencial za produkcijo bioplina iz brozge V je bil sicer nekoliko manjši kot pri surovem blatu, vendar kljub temu tudi ta brozga izkazuje veliko potenciala za razgradnjo v bioplinskem reaktorju. Obe odpadni farmacevtski brozgi je možno direktno vključiti kot kosubstrat v proizvodnjo bioplina, s čimer se čistilna naprava lahko izogne težavam v aerobnem delu čiščenja. Tehnološke parametre proizvodnje bioplina smo spremljali z analizo mikrobne združbe z metodo TRFLP, kar raziskavi daje dodano vrednost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2

DC UDC 602.4:628.35+628.385(043)=163.6

CX biogas / biogas reactors / microbial communities / biological pretreatment / bioreactors / biological wastewater treatment plants / dehydrated anaerobic sludge / sewage sludge / waste pharmaceutical fermentation sludges / TRFLP

AU ŠAFARIČ, Luka

AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ PODGORNIK, Aleš (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2013

TI IMPROVEMENT OF ANAEROBIC DIGESTION OF WASTEWATER SLUDGE IN A MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT PLANT

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

NO XIII, 67 p., 34 fig., 6 ann., 54 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Waste water treatment plants produce large quantities of primary and activated sludge (combined in the form of raw sewage sludge) during their operation. This is often anaerobically digested to produce biogas, which is a useful energy source. In order to increase the profitability of this process, wastewater treatment plants constantly search for and implement improvements that lead to increased energy production. This thesis was a part of that process. We used two pilot-scale reactors (one as the experimental and the other as the control reactor) to evaluate two different methods for biogas yield improvement and two new substrates for biogas production at the Central wastewater treatment plant Domžale-Kamnik. The biggest improvement was achieved by recycling dehydrated anaerobic sludge back into the biogas reactor, which led up to a 40 % increase in biogas production. Adding a mixture of hydrolytic enzymes and bacteria into the reactor did not have a profound effect as it mostly led to less than a 2 % increase in biogas production. We also tested the usefulness of two waste pharmaceutical fermentation sludges as substrates. The best results were obtained with sludge T, which had similar degradation properties as sewage sludge. Sludge V had a somewhat lower biogas production potential than sewage sludge, but still showed good potential to be used in anaerobic digestion. Both sludges are suitable for direct use as cosubstrates in biogas production at wastewater treatment plants, which allows them to avoid problems in the aerobic part of wastewater treatment. We monitored technological parameters of biogas production by detecting changes in microbial community composition, using TRFLP analyses. This gives added value to this work.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK.....	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA.....	3
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ČIŠČENJE KOMUNALNIH ODPADNIH VODA	4
2.2 PROIZVODNJA BIOPLINA Z MIKROBIOLOŠKEGA VIDIKA.....	6
2.3 NAČINI IZBOLJŠANJA PRODUKCIJE BIOPLINA.....	8
2.3.1 Dezintegracija surovega blata	8
2.3.1.1 Mehanska dezintegracija	9
2.3.1.2 Dezintegracija z ultrazvokom.....	9
2.3.1.3 Kemijska dezintegracija	10
2.3.1.4 Toplotna dezintegracija	11
2.3.1.5 Dezintegracija z mikrovalovi	12
2.3.1.6 Termo-kemijska dezintegracija	13
2.3.1.7 Biološka dezintegracija	14
2.3.2 Vračanje odvečnega anaerobnega blata bioplinskega reaktorja nazaj v reaktor	17
2.3.3 Sistem več zaporednih bioplinskih reaktorjev	18
2.4 PROBLEM ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE NA KOMUNALNIH ČISTILNIH NAPRAVAH	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 POSKUSI POVEČANJA PROIZVODNJE BIOPLINA Z DODAJANJEM ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE	24
3.2 POSKUSI POVEČANJA PROIZVODNJE BIOPLINA Z VRAČANJEM DEHIDRIRANEGA BLATA.....	25

3.3	POSKUSI PROIZVODNJE BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE	25
3.4	ANALIZE VZORCEV	26
3.4.1	Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK).....	27
3.4.2	Analiza sestave anaerobne mikrobne združbe.....	28
3.4.3	Sestava bioplina	29
3.4.4	Merjenje kemijske potrebe po kisiku (KPK) v substratu.....	30
3.4.5	Merjenje organske snovi	30
3.4.6	Meritve pH	30
4	REZULTATI.....	31
4.1	VPLIV DODANE ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE B120 (BIO-SYSTEMS) NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU	31
4.1.1	Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice na kumulativno produkcijo bioplina	31
4.1.2	Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorju.....	31
4.1.3	Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice na sestavo bioplina.....	32
4.1.4	Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice na sestavo mikrobne združbe	33
4.2	VPLIV VRAČANJA DEHIDRIRANEGA BLATA NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN NA SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU.....	35
4.2.1	Vpliv vračanja dehidriranega blata na kumulativno produkcijo bioplina	35
4.2.2	Vpliv vračanja dehidriranega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorju.....	35
4.2.3	Vpliv vračanja dehidriranega blata na sestavo bioplina	36
4.2.4	Vpliv vračanja dehidriranega blata na sestavo mikrobne združbe	37
4.3	PROIZVODNJA BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE	38
4.3.1	Proizvodnja bioplina iz odpadne fermentacijske brozge V iz farmacevtske industrije in njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju	38
4.3.1.1	Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom	38
4.3.1.2	Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin pri anaerobni razgradnji brozge V v primerjavi s surovim blatom	38

4.3.1.3	Odstotna sestava bioplina, proizvedenega iz brozge V in iz surovega blata	39
4.3.1.4	Vpliv brozge V na sestavo mikrobne združbe v primerjavi s surovim blatom	40
4.3.2	Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe	41
4.3.2.1	Kumulativna produkcija bioplina iz mešanice brozge v in surovega blata v primerjavi z le surovim blatom.....	41
4.3.2.2	Vpliv mešanice brozge V in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin	41
4.3.2.3	Odstotna sestava bioplina pri njegovi proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom	42
4.3.2.4	Vpliv mešanice brozge V in surovega blata na sestavo mikrobne združbe	43
4.3.3	Dalj časa trajajoča proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v reaktorju	44
4.3.3.1	Kumulativna produkcija bioplina pri njegovi dalj časa trajajoči proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom .	44
4.3.3.2	Vpliv daljše proizvodnje bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin	45
4.3.3.3	Odstotna sestava bioplina pri njegovi dalj časa trajajoči proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom.....	46
4.3.3.4	Vpliv dalj časa trajajoče proizvodnje bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata na sestavo mikrobne združbe	47
4.3.4	Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe	48
4.3.4.1	Kumulativna produkcija bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata v primerjavi s surovim blatom.....	48
4.3.4.2	Vpliv mešanice brozge T in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin	49
4.3.4.3	Odstotna sestava bioplina pri njegovi proizvodnji iz mešanice brozge T in surovega blata v primerjavi s surovim blatom	50
4.3.4.4	Vpliv mešanice brozge T in surovega blata na sestavo mikrobne združbe	51
5	RAZPRAVA	52
5.1	VPLIV DODANE ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU	52

5.2	VPLIV VRAČANJA DEHIDRIRANEGA BLATA NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN NA SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU.....	54
5.3	PROIZVODNJA BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE	56
5.3.1	Brozga V	56
5.3.2	Brozga T	58
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK.....	61
8	VIRI	63
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO SLIK

Sl. 1	Shema CCN Domžale-Kamnik	5
Sl. 2	Prikaz glavnih stopenj pretvorbe substrata do bioplina	7
Sl. 3	Shema poskusov, ki smo jih izvajali	22
Sl. 4	Shema pilotnih bioreaktorjev, ki smo jih uporabljali	24
Sl. 5	Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico	31
Sl. 6	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico	32
Sl. 7	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico	33
Sl. 8	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice	33
Sl. 9	Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice	34
Sl. 10	Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom	35
Sl. 11	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom	36
Sl. 12	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom	36
Sl. 13	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor	37
Sl. 14	Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor	37
Sl. 15	Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom	38
Sl. 16	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom	39
Sl. 17	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz brozge V v primerjavi s surovim blatom	39
Sl. 18	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V	40

Sl. 19	Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V	40
Sl. 20	Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	41
Sl. 21	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	42
Sl. 22	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	42
Sl. 23	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom	43
Sl. 24	Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom	44
Sl. 25	Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja	45
Sl. 26	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja	46
Sl. 27	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja	46
Sl. 28	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja	47
Sl. 29	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja	48
Sl. 30	Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	49
Sl. 31	Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	50
Sl. 32	Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom	50
Sl. 33	Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom	51
Sl. 34	Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom	51

KAZALO PRILOG

- Priloga A** Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice B120 (Bio-Systems) na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju
- Priloga B** Vpliv vračanja dehidriranega blata na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe
- Priloga C** Proizvodnja bioplina iz odpadne fermentacijske brozge V iz farmacevtske industrije in njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju
- Priloga D** Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe
- Priloga E** Produkcija bioplina iz brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom glede na količino dodanega KPK v 24 urah po zadnjem dodajanju substrata v reaktor
- Priloga F** Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Brozga V	Odpadna fermentacijska brozga iz farmacevtske industrije V
Brozga T	Odpadna fermentacijska brozga iz farmacevtske industrije T
CČN	Centralna čistilna naprava
CSTR	<i>Continuous stirred-tank reactor</i> - reaktor s popolnim premešanjem
KMK	Kratkoverižne maščobne kisline
KPK	Kemijska potreba po kisiku
PCR	Verižna reakcija s polimerazo
PE	Populacijski ekvivalent – organsko, biološko razgradljivo breme, ki ima petdnevno biokemijsko porabo kisika (BPK5) 60g kisika na dan (Direktiva sveta..., 1991)
TRFLP	<i>Terminal restriction fragment lenght polymorphism</i> – molekularno biološka tehnika profiliranja mikrobnih združb na podlagi spremljanja velikosti terminalnih restrikcijskih fragmentov

SLOVARČEK

Odvečno anaerobno blato	Presnovljeni material, ki predstavlja stranski produkt pri proizvodnji bioplina in vsebuje anaerobno biomaso ter nerazgrajene ostanke substrata
Primarno blato	Blato, oziroma usedlina, ki se usede na dno bazenov primarne stopnje čiščenja odpadne vode
Sekundarno (aktivno) blato	Blato, oziroma posedena biomasa iz sekundarne (biološke) stopnje čiščenja odpadne vode
Surovo blato	Združeno odvečno primarno in sekundarno (aktivno) blato iz aerobnega čiščenja odpadnih voda

1 UVOD

Danes pridobivamo energijo v veliki meri iz fosilnih goriv, med katerimi je največ takšnih, ki temeljijo na nafti. Le majhen delež doprinosi energije predstavljajo nuklearne elektrarne, količina energije, ki jo pridobimo iz obnovljivih virov je pa skoraj zanemarljiva (Deublein in Steinhauser, 2008).

V tem delu smo se osredotočili na proizvodnjo bioplina kot obnovljivega vira energije. Gre za plin, ki ga proizvaja združba mikroorganizmov v anaerobnih razmerah. V naravi bioplin nastaja predvsem v sedimentih močvirij ter v prebavnem traktu prežvekovalcev in termitov. Ljudje so že pred tisočletji opazili ta proces in ga poskušali koristno uporabiti.

Bioplin je v glavnem sestavljen iz metana (55-70 %), ogljikovega dioksida (30-45 %) ter raznih drugih plinov in nečistoč v sledovih. Med te spadajo H_2S , NH_3 , vodna para, N_2 , siloksani in prašni delci, manjši od $5\mu m$. Točna razmerja med temi snovmi so specifična posamezni bioplinarni in posameznemu substratu (Deublein in Steinhauser, 2008). V primeru bioplinskih reaktorjev na bioloških čistilnih napravah to pomeni, da je sestava bioplina, ki ga proizvedejo iz odvečnega blata, odvisna od vira in sestave odpadne vode ter od načina njenega čiščenja.

Biološke čistilne naprave so objekti, namenjeni odstranjevanju predvsem organskega onesnaženja iz odpadnih vod. Del tega onesnaženja (okoli 50 %) se pretvori v surovo blato, ki predstavlja stranski produkt fizikalnih, kemijskih in bioloških procesov, ki se izvajajo na čistilnih napravah (Bodik in sod., 2011; Jenicek in sod., 2012). Nastaja na dveh stopnjah čiščenja odpadnih voda – v primarnih usedalnikih, kjer se usedajo predvsem organski delci, večji od 1 mm ter v sekundarni stopnji, kjer nastaja aktivno blato, katerega največji delež predstavljajo mikroorganizmi, ki sodelujejo pri čiščenju odpadnih voda (Tchobanoglous in sod., 2003). Surovo blato nastane po tem, ko se obe omenjeni blati postrgata z dna primarnih in sekundarnih usedalnikov ter se zmešata skupaj.

Povprečno se v Evropski uniji tega materiala dnevno proizvede 60-90 g suhe snovi na populacijski ekvivalent (PE), kar na letni ravni znese okoli 10 milijonov ton suhe snovi surovega blata (Bodik in sod., 2011). Ker gre za organski material, je mogoče iz njega pridelati bioplin in sicer od okoli 6 do $14 m^3$ na osebo, ki prispeva odpadne vode v komunalno čiščenje v enem letu. Iz vidika potenciala za proizvodnjo električne energije to pomeni od 15 do skoraj 37 kWh na osebo v enem letu (Jenicek in sod., 2012). Na ta način lahko čistilna naprava prihrani precej stroškov, saj del svojih potreb po elektriki krije sama. Takšna obdelava odvečnega blata je posledično tudi najpogostejša v svetu (Athanasoulia in sod., 2012). Proizvodnja bioplina ima lahko različne aplikacije: produkcija toplote, oziroma pare; proizvodnja ali kogeneracija elektrike; uporaba bioplina kot gorivo za vozila ter potencialno tudi proizvodnja kemikalij (Bodik in sod., 2011). Čistilna naprava ima korist od fermentiranja odvečnega surovega blata tudi z vidika zmanjšanja njegovega volumna z zmanjšanjem njegove vsebnosti suhe snovi, zmanjšanja smradu odvečnega blata, izboljšanja stopnje dehidracije, zmanjšanje vsebnosti patogenih mikroorganizmov ter posledičnega povečanja varnosti tega materiala za njegovo odstranjevanje. Odvečno anaerobno blato se na koncu postopka odstrani iz bioplinskega reaktorja in centrifugira.

Tako pripravljeno dehidrirano blato se nato lahko uporabi v nekaterih primerih kot gnojilo, ali pa se pošlje na sežig (Deublein in Steinhauser, 2008).

Energija, ki nam jo nudi anaerobna razgradnja surovega blata pa se ni vedno koristila v takšni meri kot danes. Pred koncem sedemdesetih let prejšnjega stoletja se je namreč velikokrat bioplin spuščal v okolje, saj se je smatral kot stranski produkt pri anaerobni fermentaciji z namenom stabilizacije surovega blata. Zadnje čase zaradi teženj po večji neodvisnosti od fosilnih goriv in preprečevanju učinka tople grede, vse več držav s spremembami zakonodaje in različnimi subvencijami, spodbuja izrabo obnovljivih virov energije, med katere spada tudi bioplin (Bodik in sod., 2011). Proizvodnja bioplina lahko poteka pri mezofilnih (30-40 °C) ali pri termofilnih (50-55 °C) razmerah (Athanasoulia in sod., 2012).

Na Centralni čistilni napravi (CČN) Domžale-Kamnik uporabljajo proizvedeni bioplin za kogeneracijo elektrike in toplote. Na ta način pokrijejo do 30 % svojih potreb po električni energiji, obenem pa proizvedejo dovolj toplote (2,2 mio KWh na leto) za ogrevanje anaerobnih bioreaktorjev in objektov na čistilni napravi. Odvečno dehidrirano blato odvažajo iz čistilne naprave na sežig.

Sicer je CČN Domžale-Kamnik trenutno največja čistilna naprava v Sloveniji, kapacitete do 200 000 PE, ki poleg odpadnih vod iz gospodinjstev sprejema tudi industrijske odpadne vode. Za fermentacijo odvečnega surovega blata ima dva bioplinska CSTR (continuous stirred-tank reactor - reaktor s popolnim premešanjem) reaktorja, skupnega volumna 7200 m³, ki obratujeta v mezofilnem temperaturnem območju – okoli 40 °C. Poleg surovega blata CČN Domžale-Kamnik se kot substrat dodajajo tudi vsebine praznjenih individualnih greznic in odvečnega blata iz majhnih čistilnih naprav.

Čistilnim napravam je kot ostalim podjetjem v interesu poslovati čim bolj ekonomično. Zaradi tega ves čas razvijajo in uvajajo izboljšave v celotnem procesu čiščenja odpadnih vod. Ena izmed pomembnih točk v tem procesu, ki omogoča veliko koristnih izboljšav, je ravno anaerobna stopnja obdelave surovega blata. Zaradi tega smo se v tej nalogi osredotočili na izboljšave te stopnje.

1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Namen tega magistrskega dela je bilo iskanje najprimernejših načinov izboljšanja učinkovitosti anaerobnega bioreaktorja, ki reducira organsko snov primarnega in sekundarnega blata komunalne čistilne naprave in jo pretvarja v bioplin. Cilj je bil poiskati tak postopek, ki bi ga bilo mogoče vključiti v obstoječo infrastrukturo komunalne čistilne naprave, hkrati pa bi bil cenovno dovolj ugoden. Izboljšanje produkcije bioplina je moralo biti dovolj veliko, da se dolgoročno takšna investicija izplača. V ta namen smo eksperimentalno preizkusili:

- Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice B120 (Bio-Systems) na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju
- Vpliv vračanja dehidriranega blata na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju
- Možnost proizvodnje bioplina iz odpadnih fermentacijskih brozg farmacevtske industrije

1.2 HIPOTEZE

- Dodajanje encimsko mikrobne mešanice B120, proizvajalca Bio-Systems v bioplinski reaktor izboljša stopnjo hidrolize in s tem celotno proizvodnjo bioplina
- Vračanje dehidriranega blata v bioplinski reaktor poveča produkcijo bioplina
- Odpadne fermentacijske brozge iz farmacevtske industrije so primerni substrati za anaerobno razgradnjo v bioplinskem reaktorju

2 PREGLED OBJAV

2.1 ČIŠČENJE KOMUNALNIH ODPADNIH VODA

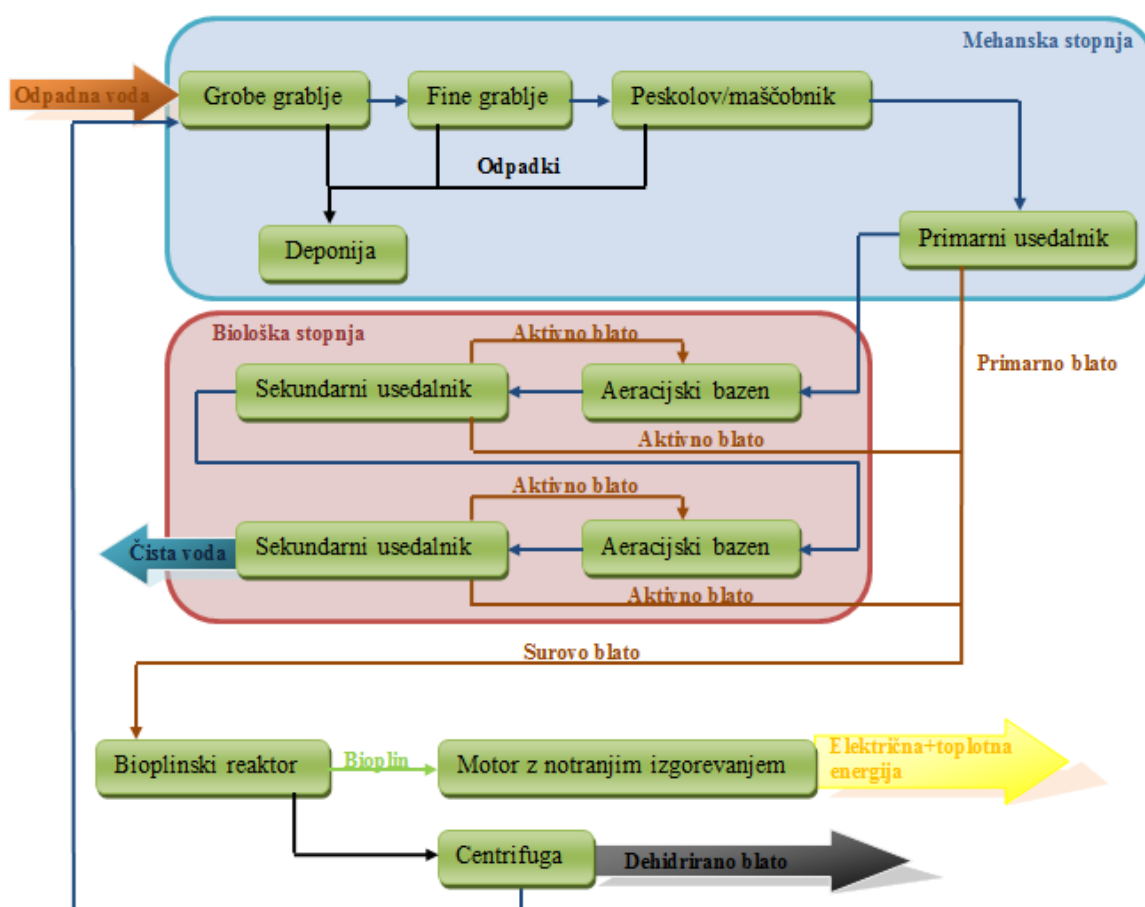
Odpadno vodo, ki jo pridelajo gospodinjstva in industrija je na koncu potrebno vedno vrniti v naravo. Da bi lahko to naredili brez večjega obremenjevanja okolja, jo je potrebno pred tem prečistiti. Za to skrbijo komunalne biološke čistilne naprave kot je npr. tudi CCN Domžale-Kamnik. Proces čiščenja vode je večstopenjski in vključuje fizikalno-kemijske in biološke postopke (Slika 1). Sama zasnova je lahko med različnimi čistilnimi napravami nekoliko različna. V nadaljnjem tekstu je predstavljena shema čiščenja, ki se uporablja na CCN Domžale-Kamnik.

Postopek se začne z mehanskim čiščenjem, kjer se na samem začetku, na grobih in finih grabljah odstranijo večji tujki, ki jih mikroorganizmi ne morejo učinkovito razgraditi in bi lahko v nadaljevanju poškodovali nekatere elemente čistilne naprave, oziroma kontaminirali rečno strugo, v katero se prečiščena voda sicer izliva (Tchobanoglous in sod. 2003). Na grobih grabljah se tako odstranijo vsi predmeti, ki so večji od 15 mm, na finih pa še tisti, ki so večji od 3 mm. Temu sledita maščobnik in peskolov, kjer se na dno posedejo peščeni delci, ki se od tam odstranijo s polžnimi črpalkami. Hkrati na površino splavajo maščobe, katere se odstranijo s strgalom. Z vpihovanjem zraka se zagotovi spiralni tok vode, ki zmanjša usedanje suspendiranih organskih delcev, obenem pa še vedno omogoča usedanje peščenih delcev. Ta stopnja je pomembna za zaščito mehanskih delov čistilne naprave pred prekomerno obrabo, hkrati pa tudi prepreči nalaganje teh težkih usedlin v ceveh in kanalih (Tchobanoglous in sod., 2003).

Preostala voda nadaljuje svojo pot v primarni usedalnik, kjer se izvede primarno čiščenje odpadne vode, oziroma usedanje trdnih organskih delcev, ki so večji od 1 mm. S tem se zmanjša vsebnost suspendiranih organskih delcev v odpadni vodi za 50 % do 70 % (Tchobanoglous in sod., 2003). Usedlina, ki jo imenujemo primarno blato, se s strgali, ki so pritrjena na pomični most primarnega usedalnika, postrgajo z dna do lijakov, ki delujejo kot zgoščevalci blata.

Voda teče dalje do aeracijskega bazena sekundarne (biološke) stopnje, kjer pride do biološkega čiščenja. Tukaj dovajajo zrak v bazen in s tem zagotovijo mešanje in zadostno vsebnost kisika v vodi, ki je pomembna za metabolno aktivnost aerobnih mikroorganizmov. Namen te stopnje je mikrobna oksidacija organskih snovi, ki so raztopljene ali suspendirane v odpadni vodi do sprejemljivih preprostejših končnih produktov. Poleg tega se na tej stopnji suspendirani in neusedljivi koloidni delci ulovijo in vključijo v skupke ali flokule, ki jih tvorijo prisotni mikroorganizmi. Takšni skupki se lažje posedejo in tvorijo tako imenovano aktivno blato. Ta stopnja čiščenja je poleg odstranjevanja ogljikovih spojin do neke mere pomembna tudi za biološko odstranjevanje dušika in fosforja. Mikroorganizmi z oksidacijo organskih molekul v odpadni vodi pridobijo energijo in metabolne intermediate, ki jih potrebujejo za rast. Končni produkti tega procesa so tako v glavnem ogljikov dioksid, voda in mikrobna biomasa. Ker se mikroorganizmi združujejo v skupke, se lažje posedajo in se po koncu procesa tudi relativno enostavno ločijo od prečiščene vode. Zaradi tega aeracijskemu bazenu sledi usedalnik, v katerem se aktivno blato usede na dno, od koder strgala na pomičnem mostu postrgajo, nato pa se deloma prečrpa nazaj v aeracijski bazen. Višek se zmeša z odstranim primarnim blatom in tako tvori tako imenovano surovo blato. Prečiščena

Surovo blato se v bioplinskih reaktorjih presnovi do bioplina. Ta se uporabi za proizvodnjo električne energije in toplote kot stranskega produkta, odvečno anaerobno blato bioplinskega reaktorja pa se centrifugira. Tako pridobijo dehidrirano blato, ki ga pošljejo v sežig. Odvečna tekočina, ki ostane po tem procesu se vrne nazaj v aerobni del čistilne naprave.



Slika 1: Shema CČN Domžale-Kamnik. Smer toka odpadne vode prikazujejo modre puščice, smer transporta blata pa rjave puščice.

2.2 PROIZVODNJA BIOPLINA Z MIKROBIOLOŠKEGA VIDIKA

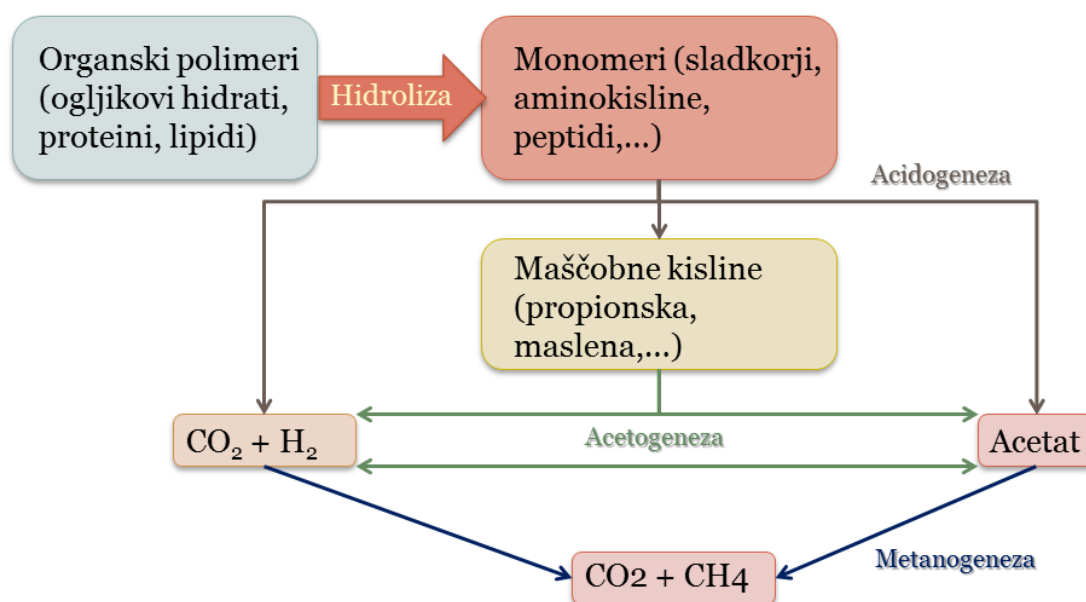
Proces proizvodnje bioplina je večstopenjski (Slika 2). Prva stopnja razgradnje substratov, ki vstopajo v bioplinski proces, je hidroliza. Pri tem sodelujejo fakultativno in obligatno anaerobne bakterije, med katerimi po aktivnosti prevladujejo rodovi *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Propioni-bacterium*, *Sphingomonas*, *Sporobacterium*, *Megasphaera* in *Bifidobacterium*. Ti mikroorganizmi s svojimi eksoencimi cepijo kovalentne vezi v polimerih, pri čemer pride do kemijske reakcije z vodo, od koder tudi izvira ime za to stopnjo. Zelo so pomembni za celoten bioplinski proces, saj z razgradnjo netopnih polimerov (kot so celuloza, proteini in maščobe) do topnih monomerov, povečajo dostopnost hranil za mikroorganizme v naslednjih stopnjah procesa. Poleg tega fakultativni anaerobi odstranijo kisik, ki je raztopljen v mediju ter tako znižajo redoks potencial, s čimer vzpostavijo ustrezne razmere za rast obligatnih anaerobov, ki so pomembni predvsem v poznejših fazah. Različni polimeri so različno težko razgradljivi. Tako so na primer ogljikovi hidrati v splošnem najlažje razgradljivi, proteini in maščobe nekoliko težje, lignoceluloza in lignin pa se razgrajujeta zelo počasi in neučinkovito (Deublein in Steinhauser, 2008). Hidroliza velja za omejujočo stopnjo pri proizvodnji bioplina iz surovega blata (Athanasoulia in sod., 2012; Coelho in sod., 2011).

Hidrolizi sledi acidogeneza, v kateri sodeluje združba fakultativno in obligatno anaerobnih bakterij od katerih jih večina prav tako sodeluje pri hidrolizi. Najbolj aktivni so predstavniki rodov *Clostridium*, *Paenibacillus*, *Ruminococcus*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* in *Bacteroides*. Ti mikroorganizmi kot substrat koristijo produkte hidrolize in iz njih s fermentacijo tvorijo različne kratkoverižne (C1-C5) maščobne kisline, med katerimi prevladujejo očetna, propionska in maslena. Na tej stopnji se proizvedejo tudi različni alkoholi, vodik in ogljikov dioksid (Deublein in Steinhauser, 2008).

Naslednja stopnja je acetogeneza, v kateri so najbolj aktivni predstavniki rodov *Desulfovibrio*, *Aminobacterium* in *Acidaminococcus*. Omenjenje acetogene bakterije izrabljajo produkte acidogene faze in jih oksidirajo do acetata. Gre za endergone reakcije, ki lahko tečejo le ob nizkem parcialnem tlaku vodika. Acetogene bakterije so obligatni producenti vodika, metanogene arheje pa ga izrabljajo kot substrat. Zaradi tega ti dve skupini mikroorganizmov živita v sožitju – metanogene arheje konstantno odstranjujejo produkte metabolizma acetogenih bakterij, s čimer zagotavljajo ustrezne pogoje za delovanje acetogenega metabolizma. Ob nizkem parcialnem tlaku vodika acetogene bakterije tvorijo predvsem vodik, ogljikov dioksid in acetat, ki so vsi uporabni kot substrati za metanogene mikroorganizme. Pri višjem parcialnem tlaku vodika tvorijo predvsem masleno, kaprnsko, propionsko in valerensko kislino ter etanol, ki so neuporabni kot direktni substrati za metanogene mikroorganizme. Ta simbioza je celo tako intenzivna, da prihaja do tako imenovanega medvrstnega prenosa vodika, pri katerem se vodik prenese direktno iz acetogene bakterije v metanogeno arhejo, ne da bi se vmes raztapljal v mediju (Deublein in Steinhauser, 2008).

Končna faza procesa je metanogeneza, ki lahko poteka le v striktno anaerobnih pogojih. Razlog za to je velika občutljivost metanogenih arhej, ki sodelujejo na tej stopnji, na kisik. Te mikroorganizme uvrščamo v deblo Euryarchaeota, njihova posebnost pa je kofaktor F420, ki sodeluje s hidrogenazo kot prenašalec vodika (Deublein in Steinhauser, 2008; Garcia in sod., 2000). Ker fluorescira, lahko metanogene arheje enostavno zaznamo v mediju z mikroskopom pri osvetlitvi s svetlobo valovne dolžine 420 nm. Tako po

morfologiji kot tudi po razmerah, v katerih živijo, so zelo raznolika skupina. Tako so celice lahko paličaste oblike, koki, nepravilnih ploščatih oblik ali spirili. So striktni anaerobi, ki lahko za svojo rast izrabljajo format, acetat, metanol, metilamine, dimetilne sulfide ali kombinacije metanola in vodika, ogljikovega dioksida in vodika, ogljikovega monoksida in vodika. Nekatere vrste izrabljajo tudi primarne ali sekundarne alkohole kot donorje elektronov (Deublein in Steinhauser, 2008). Glavni predstavniki metanogenih arhej v bioplinskih reaktorjih so običajno *Methanospirillum hungatii* ter predstavniki rodov *Methanobacterium* in *Methanosarcina*. Ob znižanih koncentracijah acetata, lahko filamentozni predstavniki *Methanosaeta* uspešno konkurirajo rodu *Methanosarcina*, saj imajo višjo afiniteto do substrata. Poleg tega so predstavniki rodu *Methanosaeta* tudi sposobni rasti na hidrofobnih površinah (imobilizacija), zaradi česar se lažje obdržijo v pretočnih sistemih, kjer druge vrste hitreje odplavi iz reaktorja (Deublein in Steinhauser, 2008). Metanogeneza lahko steče po dveh poteh in sicer po acetotrofni (v okoli 70 % deležu), kjer se kot substrat izrablja acetat in hidrogenotrofni, kjer prihaja do redukcije CO_2 z vodikom (okoli 27-30 %). Dokler metanogeneza poteka nemoteno, je brez težav tudi acetogena stopnja procesa. Ko pa pride do inhibicije metanogeneze, lahko pride do zakisanja zaradi vse večjega kopičenja kratkoverižnih maščobnih kislin in vodika (Deublein in Steinhauser, 2008).



Slika 2: Prikaz glavnih stopenj pretvorbe substrata do bioplina (Deublein in Steinhauser, 2008)

V CČN Domžale-Kamnik so leta 2009 preverjali nihanje sestave mikrobne združbe v bioplinskem reaktorju z metodo TRFLP (*Terminal restriction fragment length polymorphism*). Opazili so, da se mikrobna združba v zimskem času bistveno razlikuje (več kot 35 % razlika) od združbe v poletnem času. Kljub temu, da se mikrobna združba na ta način pod vplivom zunanjih dražljajev konstantno spreminja, pa to ne vpliva bistveno na proizvodnjo bioplina. Tako torej sprememba v sestavi združbe ne pomeni spremembe v delovanju reaktorja, saj so se bakterije in arheje očitno sposobne primerno prilagoditi. Za razliko od takšnih sezonskih nihanj, pa lahko dodatek toksične substance, kot je na primer

cianid, vpliva tako na sestavo mikrobne združbe reaktorja, kot tudi na njegovo delovanje (Stražar, 2009).

2.3 NAČINI IZBOLJŠANJA PRODUKCIJE BIOPLINA

Proizvodnjo bioplina v anaerobnih bioreaktorjih je mogoče izboljšati na različne načine. Pri tem je cilj vedno isti – povečanje stopnje razgradnje substrata in s tem količine proizvedenega bioplina na čim bolj ekonomičen način.

2.3.1 Dezintegracija surovega blata

Če kot osnovni substrat za proizvodnjo bioplina uporabljamo surovo blato, je ena izmed bolj učinkovitih metod izboljšanja izkoristka pri proizvodnji bioplina njegova dezintegracija. Dosežemo jo lahko z različnimi načini obdelave substrata, med katere med drugim sodijo toplotna, ultrazvočna, kemijska, termokemijska, alkalna, mehanska obdelava ter obdelava z mikrovalovi, ozonom ali biološka (z encimi in/ali mikroorganizmi) obdelava (Athanasoulia in sod., 2012; Chenxi, 2012). Gre torej za uporabo različnih metod razbitja mikrobnih celic, s čimer postanejo hranila, ki so bila v njih, bolj dostopna za anaerobne mikroorganizme v bioplinskem reaktorju. Prednosti tega postopka sta tudi izboljšanje stopnje razgradnje in zmanjšanje volumna surovega blata (Deublein in Steinhauser, 2008). Našteto je pomembno predvsem pri sekundarnem, oziroma aktivnem blatu, ki za razliko od primarnega vsebuje velike količine težko razgradljivih mikrobnih celic (Carrere in sod., 2010). V splošnem se z dezintegracijo zmanjša tudi viskoznost substrata, s čimer se izboljša prenos toplote in učinkovitost mešanja. Opaženo je zmanjšano pritrdjanje surovega blata na grelne površine in izboljšanje njegovega usedanja ter zmanjšana verjetnost penjenja v bioreaktorju, kar je problematično posebej takrat, ko so prisotni filamentozni mikroorganizmi (Deublein in Steinhauser, 2008; Dhar in sod., 2011). Poleg obdelave surovega blata ali njegovih sestavin lahko izvedemo tudi dezintegracijo odvečnega anaerobnega blata bioplinskega reaktorja, ki je stranski produkt proizvodnje bioplina. V njem se poleg aktivne anaerobne biomase nahaja še organski material, katerega biomasa ni uspela razgraditi. Z dezintegracijo ta material naredimo bolj dostopen mikrobnim biomasam v bioplinskem reaktorju, potem ko tako obdelanega znova vrnemo v reaktor skupaj s surovim blatom (Carrere in sod., 2011). Dezintegracija ima seveda tudi pomanjkljivosti, med katere na primer sodi otežena dehidracija po končanem postopku, ki se zgodi zaradi povečane vsebnosti težko razgradljivih polisaharidov v mediju in razbitja flokul. V odpadni vodi, ki zapušča reaktor je kot posledica razbitja celic prisotnih tudi več težkih kovin, fosfatov, dušikovih in ogljikovih spojin. To čistilno napravo bolj obremenjuje, kot če dezintegracije ne bi izvajali. Dezintegracija vodi tudi v povečano porabo energije, zaradi česar se poleg večjega izplena bioplina povečajo tudi stroški obratovanja čistilne naprave (Deublein in Steinhauser, 2008). V nadaljevanju je predstavljenih nekaj primerov dezintegracije.

2.3.1.1 Mehanska dezintegracija

Pri tej vrsti dezintegracije gre za mehansko razbijanje delcev, oziroma celic, s čimer se poveča dostopna površina substrata za mikroorganizme in njihove encime. To se je že izkazalo za zelo uporabno na bioplinarnah, ki razgrajujejo lignocelulozne substrate (Bruni in sod., 2010; Chenxi, 2012; Taherzadeg in Karimi, 2008). Ta vrsta dezintegracije je lahko zelo koristna tudi kot način obdelave surovega blata na čistilnih napravah. Če namreč iz tega substrata pridobivamo bioplin, ne da bi ga pred tem obdelali, lahko po koncu anaerobne digestije ostane tudi do 50 % neizkoriščenega bioplinskega potenciala v obliki intaktnih mikrobnih celic (Onyeche, 2007).

Jenicek in sodelavci (2012) so na ČN v Pragi z mehansko dezintegracijo aktivnega blata za 23 % izboljšali izplen bioplina. Dhar in sodelavci (2011) poročajo o 8-10 % izboljšanju produkcije bioplina, hkrati pa tudi o okoli 20 % zmanjšanju povprečne dnevne vsebnosti H_2S v bioplinu kot posledica mehanske dezintegracije aktivnega blata. V ZDA so Stephenson in sodelavci (2007) s procesom MicroSludge dosegli do 20 % izboljšanje po obdelavi aktivnega blata pred umešanjem v surovo blato. Ta proces vključuje kombinacijo kemijske in mehanske obdelave aktivnega blata.

Primerjava mehanske dezintegracije s kemijskimi in biološkimi metodami obdelave substrata nakazuje, da gre tukaj za ugodno metodo z velikim potencialom, ki pa je odvisen predvsem od sestave substrata (Hartmann in sod., 2000). Prednost mehanske dezintegracije je med drugim tudi v tem, da jo lahko enostavno izvajamo in da je nadgradnja že obstoječih reaktorjev s temi sistemi dokaj enostavna in ugodna (Chenxi, 2012). Poleg tega pomaga pri izboljšanju tako kvalitete bioplina kot anaerobnega blata bioreaktorja (Dhar in sod., 2011). Ima pa seveda tudi slabosti, med katerimi najbolj izstopa potencialno visoka poraba energije nekaterih metod mehanske dezintegracije (Dhar in sod., 2011).

2.3.1.2 Dezintegracija z ultrazvokom

Ultrazvok uvrščamo med mehanske metode obdelave substrata. Na ta način se razbijejo tako flokule kot tudi stene mikrobnih celic. Uporabijo se lahko nizke ali visoke frekvence, od katerih so za obdelavo surovega blata učinkovitejša nizke (20-40 kHz) (Carrere in sod., 2010). Pri tem postopku pride do dveh pojavov. Prvi je nastanek mikroskopskih mehurčkov v substratu, ki rastejo vse dokler ne dosežejo nestabilne velikosti in se sesedejo (kavitacija) ter tako sprostijo veliko količino energije (5000 °C in 500 atmosfer) na majhnem prostoru in za zelo kratek čas (Pilli in sod., 2011). Drugi je tvorba različnih radikalov ($OH\cdot$, $HO_2\cdot$, $H\cdot$), ki reagirajo z molekulami v substratu in tako pospešijo njihovo razgradnjo. Prvi pojav je značilen predvsem za nižje, drugi pa za višje frekvence (Carrere in sod., 2010). Pri obdelavi aktivnega blata se tako zaradi ekstremnih lokalnih temperatur in visokega tlaka, razbijejo celične stene in ekstracelularni polisaharidi, kar vodi v povečanje vrednosti topnega KPK. To pa seveda pomeni več dostopnih hranil za mikroorganizme v bioplinskem reaktorju in posledično večji izplen bioplina kot iz iste količine neobdelanega substrata (Apul in Sanin, 2010).

Apul in Sanin (2010) sta preučevala vpliv obdelave odvečnega aktivnega blata z ultrazvokom. Opazila sta povečanje vrednosti topnega KPK (do 49 krat), ki so se povečevale prvih 15 minut obdelave, nato pa so začele nihati in se rahlo zmanjševati. To

razlagata s kompleksnimi reakcijami, ki se začnejo v substratu pojavljati po tem času in so predvsem posledica toplotnih učinkov. Opazila sta tudi povišanje temperature raztopine od 20 °C do 70 °C v 15 minutah. S tem je bila povezana tudi produkcija bioplina, ki je bila največja po 15 minutni obdelavi substrata. Na koncu sta tako dosegla do 55 % povečanje produkcije bioplina v primerjavi z neobdelanim substratom. Ta razlika je bila največja pri krajših zadrževalnih časih in nižjih obremenitvah reaktorjev. Ocenjujeta, da bi s takšno obdelavo lahko za polovico manjši reaktor predelal enako količino aktivnega blata s skoraj enako učinkovitostjo. Obdelava substrata z ultrazvokom sicer porabi veliko energije in investicija za njegovo implementacijo je precej visoka. Kljub temu je povečanje produkcije bioplina dovolj veliko, da se čez čas ti stroški povrnejo. Braguglia in sodelavci (2011) so tudi preverjali učinke obdelave aktivnega blata z ultrazvokom na njegovo anaerobno razgradnjo. Tudi oni so opazili povečanje produkcije bioplina v primeru, ko so v reaktor dovajali z ultrazvokom obdelan substrat. Ta je bila do 30 % večja kot v kontrolnem reaktorju. Pozitivno energetske bilanco jim je uspelo doseči le v primeru, ko so kot substrat uporabljali s centrifugo zgoščeno aktivno blato. Pri tem poudarjajo, da bi ta sistem v velikem merilu porabil precej manj energije za obdelavo ene enote substrata kot njihov sistem na laboratorijski ravni.

Kot negativno lastnost tega načina obdelave substrata lahko izpostavimo relativno veliko porabo energije (Carrere in sod., 2010) in veliko začetno investicijo, vendar se vsi ti stroški čez čas povrnejo zaradi pozitivne energetske bilance tega načina obdelave substrata. Na nekaj čistilnih napravah je bil tak sistem postavljen že v velikem merilu in je izboljšal produkcijo bioplina ter vsebnost metana, zmanjšal vsebnost organske snovi v iztoku ter izboljšal dehidracijo in zmanjšal volumen anaerobnega blata bioreaktorja (Pilli in sod., 2011). Po drugi strani nekateri avtorji navajajo negativen učinek te vrste obdelave na dehidracijo iztoka bioplinskega reaktorja (Carrere in sod., 2010). Sicer lahko 1 kW vložene energije za obdelavo, dobimo 7 kW električne energije po upoštevanju vseh izgub. Po takšni obdelavi substrata, lahko zmanjšamo volumen reaktorjev in skrajšamo zadrževalni čas ter tako še dodatno znižamo stroške (Pilli in sod., 2011). Poleg že opisanih je še dodatna prednost zmanjšana nevarnost penjenja v reaktorju (Carrere in sod., 2010).

2.3.1.3 Kemijska dezintegracija

Kemijska dezintegracija je način obdelave substrata, kjer ga za določen čas izpostavimo kemijski spojini, ki razgradi material. Najpogostejša kemijska dezintegracija je dezintegracija z ozonom. Ustrezna doza ozona izboljša razgradnjo surovega blata in posledično tudi izplen bioplina. Previsoka doza lahko povzroči oksidacijo nekaterih sestavin substrata, kar ima lahko negativen učinek na produkcijo bioplina. Drugi pogosto uporabljena oksidacijska snov je vodikov peroksid. Omenjeni spojini dezintegrirata material s svojimi oksidacijskimi sposobnostmi. Uporabimo lahko tudi alkalne spojine, ki si po učinkovitosti delovanja sledijo tako: NaOH, KOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂. Tudi pri uporabi teh je potrebno biti pazljiv, saj lahko prevelike koncentracije natrijevih ali kalijevih kationov inhibirajo anaerobno razgradnjo. Alkalno lizo običajno izvajamo skupaj s toplotno obdelavo – torej izvajamo termo-kemijsko obdelavo (Carrere in sod., 2010).

Weemaes in sodelavci (2000) so poskušali izboljšati produkcijo bioplina iz surovega blata s predhodno obdelavo z ozonom. Pri svojem eksperimentu so uporabili različne doze

ozona in primerjali njihov vpliv na lastnosti substrata in produkcijo bioplina. Opazili so izboljšanje razgradljivosti substrata ter zmanjšanje vsebnosti organske snovi, razbitje flokulov v njem in močno znižanje pH vrednosti substrata (do 4,9), zaradi česar je bilo tega potrebno pred dovajanjem v reaktor zvišati z dodatkom NaOH. Produkcija bioplina je kot posledica te obdelave narasla za do 80 % pri dozi ozona 0,1 gO₃/g KPK, s tem da se je z večanjem doze preko te meje začel pozitiven učinek manjšati. Ocenjujejo, da bi bila takšna obdelava substrata tudi ekonomsko dovolj ugodna.

Kim in sodelavci (2003) so preverjali vpliv različnih načinov obdelave aktivnega blata na produkcijo bioplina, med drugim tudi kemijsko, oziroma bolj natančno alkalno obdelavo. Potekala je pri pH=12 z različnimi snovmi (NaOH, KOH, Mg(OH)₂, Ca(OH)₂). Najboljše rezultate so dobili z NaOH, zato so preverili vpliv različnih koncentracij te spojine na uspešnost razgradnje substrata. Vsebnost topnega KPK, ki dejansko predstavlja količino za mikroorganizme dostopnih hranil, v substratu je naraščala z naraščajočo koncentracijo NaOH vse do 7 g/l, nato pa se je začela spet zmanjševati. Povečanje vsebnosti topnega KPK v substratu kot posledica uporabe te metode obdelave je bilo v primerjavi s kontrolo sicer bistveno boljše, vendar še vedno za skoraj polovico slabše kot pri termo-kemijski obdelavi (opisano v poglavju 2.2.1.6). Kemijska in termo-kemijska obdelava substrata sta najbolj povečali vsebnost topnih proteinov v njem, zaradi česar bi pričakovali še dodaten pozitiven vpliv na produkcijo bioplina. Ta je bila pri kemijski obdelavi za 13,4 % boljša kot pri kontroli, kar je najslabši rezultat od vseh preizkušenih metod.

Opisane raziskave kažejo, da kemijska obdelava substrata sama po sebi sicer omogoča izboljšanje izplena bioplina iz aktivnega blata, vendar se veliko bolje izkaže v kombinaciji z drugimi metodami. Kot slabo lastnost moramo izpostaviti stroške nabave potrebnih kemikalij za obdelavo in pripravo substrata na anaerobno razgradnjo (v primeru alkalne obdelave, moramo na koncu dodati še kislino, pri obdelavi z ozonom pa bazo, da uravnamo pH), zaradi česar postane ta način nekoliko manj privlačen, vendar še vedno ugoden (Kim in sod., 2003; Weemaes in sod., 2000). Alkalna obdelava substrata se je sicer že večkrat izkazala pri izboljšanju razgradnje lignoceluloznih substratov in substratov, ki so bogati z lipidi ali fenolnimi spojinami (Taharzadeh in Karimi, 2008), vendar žal očitno na celične stene mikroorganizmov aktivnega blata ne deluje tako učinkovito. Še največ potenciala tako kaže obdelava z ozonom (Weemaes in sod., 2000; Carrere in sod., 2010).

2.3.1.4 Toplotna dezintegracija

To metodo so začeli najprej uporabljati kot način za izboljšanje dehidracije surovega blata, saj povzroča sproščanje vode, ki je vezana vanj. Poleg tega pride tudi do njegove delne razgradnje, kar vodi v izboljšanje produkcije bioplina. Pri tem je potrebno biti pazljiv, da temperature niso previsoke (ne višje od 170-190 °C), saj lahko v tem primeru pride do tako imenovanih Mailardovih reakcij, pri katerih ogljikovi hidrati in amino kisline reagirajo do melanoidinov, ki so zelo težko razgradljivi (Carrere in sod., 2010).

Kim in sodelavci (2003) so primerjali toplotno dezintegracijo z drugimi metodami obdelave aktivnega blata. Toplotno obdelavo so izvajali pri 121 °C za 30 minut, pri čemer so opazili več kot dvakratno povečanje vsebnosti topnega KPK v substratu v primerjavi s kontrolo. Prišlo je tudi do pomembnega zmanjšanja velikosti netopnih delcev v substratu,

kar je poleg toplotne, dosegla le še termo-kemijska dezintegracija. Produkcija bioplina se je kot posledica toplotne obdelave substrata povečala za okoli 32 %, kar je med metodami dezintegracije, ki so jih preverjali, drugi najboljši rezultat, takoj za termo-kemijsko dezintegracijo. Kuglarz in sodelavci (2013) so primerjali toplotno dezintegracijo in dezintegracijo z mikrovalovi. Substrat je bilo aktivno blato, v obeh primerih pa so preverjali vpliv različnih temperatur med 20 °C in 100 °C. V obeh primerih so zaznali izboljšanje razgradnje aktivnega blata in povečanje topnosti proteinov, s tem da so bili pri tem mikrovalovi precej bolj učinkoviti pri isti temperaturi kot toplotna obdelava. Nad 70 °C so zaznali rahlo zmanjševanje vsebnosti proteinov, kar pripisujejo Maillardovim reakcijam. Opazili so tudi korelacijo med višanjem temperature obdelave in produkcijo bioplina, vendar le do okoli 70 °C pri mikrovalovih in 40 °C pri toplotni obdelavi, pri višjih temperaturah od tega pa večanje produkcije ni bilo več opazno. Na koncu je toplotna dezintegracija sicer izboljšala izplen bioplina, vendar je ta bil še vedno 50 % manjši kot pri obdelavi z mikrovalovi. Poleg tega je toplotna obdelava porabila skoraj dvakrat več energije za doseganje iste temperature kot obdelava z mikrovalovi. V laboratorijskem poskusu je bila dodatno pridobljena energija s povečano produkcijo bioplina manjša kot energija, ki so jo porabili za obdelavo. Ko so upoštevali, da lahko tudi temperaturo substrata po obdelavi koristimo kot energijo, so ugotovili, da je energetska bilanca pri obdelavi z mikrovalovi lahko pozitivna, toplotna obdelava se pa še vedno ne izplača.

Učinek toplotne dezintegracije je odvisen od sestave substrata in je najbolj učinkovit pri težko razgradljivih substratih. Boljše učinke kot pri primarnem, opazimo pri aktivnem blatu. Poleg izboljšane razgradnje so prednosti te metode še uničenje patogenov v surovem blatu, zmanjšanje njegove viskoznosti, zaradi česar je delo z njim lažje ter pozitivna energetska bilanca – energija pridobljena iz dodatno sproščenega bioplina je večja kot energija, ki jo potrebujemo za toplotno obdelavo surovega blata (Carrere in sod., 2010). Kljub temu je poraba energije velika in je zato proces potrebno dobro optimizirati, da dosežemo pozitivno energetsko bilanco (Kuglarz in sod., 2013). Bolje kot sama po sebi se toplotna obdelava izkaže v kombinaciji s kemijskimi snovmi v obliki termo-kemijske dezintegracije (Kim in sod., 2003).

2.3.1.5 Dezintegracija z mikrovalovi

Dezintegracijo substratov lahko izvajamo tudi z mikrovalovi. Ti segrejejo substrat in razbijejo celice v njem (Chenxi, 2012). Mikrovalovi so oblika elektromagnetnega sevanja, ki poveča kinetično energijo vodnih dipolov, zaradi česar pride do segrevanja raztopine. Glavne organske spojine v surovem blatu so ogljikovi hidrati, proteini in lipidi. Obdelava z mikrovalovi pri vsaki od teh skupin vodi do hidrolize, katere produkti so preprostejše spojine z manjšimi molekulami, ki so lažje razgradljive (Elagroudy in El-Gohary, 2013). Poleg že omenjenega segrevanja substrata, lahko do te hidrolize vodijo tudi netoplotni efekti mikrovalov, ki so posledica usmeritve polariziranih stranskih verig, oziroma delov makromolekul s skladu z električnim poljem, zaradi česar se lahko trgajo vodikove vezi (Park in Ahn, 2011; Toreci in sod., 2009; Tyagi in Lo, 2013).

Park in Ahn (2011) sta primerjala vpliva toplotne in mikrovalovne obdelave surovega blata na produkcijo bioplina. Obdelava z mikrovalovi je izboljšala razmerje med topnim in skupnim KPK surovega blata za 3,2 krat v primerjavi z neobdelanim. To je bilo boljše tudi

v primerjavi s toplotno obdelavo, kjer je bilo to izboljšanje 2,7 kratno. V obeh primerih so opazili tudi močnejšo redukcijo KPK in večjo produkcijo bioplina. Ta se je povečala za 53 % po obdelavi z mikrovalovi in 33 % po toplotni obdelavi. Rezultati nakazujejo, da je obdelava z mikrovalovi učinkovitejša od toplotne obdelave in da so za to razliko odgovorni predvsem netopni učinki obdelave z mikrovalovi. Toreci in sodelavci (2009) so tudi preverjali vpliv mikrovalov na produkcijo bioplina in ugotovili, da lahko na ta način dosežejo do 83 % izboljšanje dnevne produkcije v primerjavi s kontrolo, če v obeh primerih uporabljajo enostopenjski sistem bioplinskih reaktorjev. Hkrati so preverjali tudi ali je boljše tako obdelan substrat predelati v sistemu z enim ali z dvema zaporednima bioplinskima reaktorjema. Pri tem so ugotovili, da je sistem dveh reaktorjev pri neobdelanem substratu sicer učinkovitejši kot, če imamo le en reaktor, pri obdelanem substratu z mikrovalovi pa te prednosti več ni, tako da je bolje bioplin proizvajati le v enem reaktorju. Hkrati so dosegli tudi skrajšanje zadrževalnih časov. Chi in sodelavci (2011) so tudi preverjali kako bi izboljšali učinkovitost termofilnega procesa pridobivanja bioplina. Poskusili so s kombinacijo mikrovalov in alkalne obdelave z NaOH, za substrat pa so uporabili zgoščeno aktivno blato iz aerobne stopnje čiščenja. V najboljšem primeru so dosegli do 27 % izboljšanje kumulativne produkcije bioplina, hkrati pa so opazili tudi zmanjšanje mase odvečnega dehidriranega blata. Pri nekaterih kombinacijah koncentracij NaOH in temperature ob obdelavi z mikrovalovi, so opazili rahlo podaljšanje lag faze pri metanogenezi, kar nakazuje, da so bile tam prisotne spojine, ki so povzročile blago inhibicijo. Kljub temu si je biomasa potem opomogla in je bila končna kumulativna produkcija bioplina boljša kot pri kontroli. Kot potencialno slabost izpostavljajo slabšo dehidracijo in povečanje topnega KPK (za 51 %) v iztoku bioreaktorja, kar lahko vodi v dodatno obremenjevanje aerobnega dela čistilne naprave.

Glavna prednost obdelave surovega blata z mikrovalovi je torej izboljšanje izpleta bioplina, ki je posledica učinkovitejše razgradnje organskih snovi v obdelanem substratu. Poleg tega lahko ta način obdelave substrata pripomore tudi h krajšim zadrževalnim časom v reaktorju (Park in sod., 2004; Toreci in sod., 2009). V primerjavi s toplotno obdelavo je produkcija bioplina po obdelavi z mikrovalovi večja, hkrati pa je tudi energetsko učinkovitejša (Toreci in sod., 2009; Park in Ahn, 2011). Izboljšano je uničenje patogenov in dehidracija anaerobnega blata (Toreci in sod., 2009; Coelho in sod., 2011). Kot slabost lahko izpostavimo povečano porabo energije kot posledico obdelave substrata, ki pa se lahko nekoliko zniža s hkratno obdelavo s kemijskimi snovmi (Tyagi in Lo, 2013). Pri tem moramo biti pazljivi, saj lahko to (vsaj v primeru uporabe NaOH in tudi pri drugih kemijskih spojinah) vodi v slabšo dehidracijo anaerobnega blata (Chi in sod., 2011). Zaradi vsega tega se vgradnja takšnega sistema splača predvsem, če ima čistilna naprava težave, ki jih lahko reši dezintegracija. Takšni primeri so preobremenjenost bioreaktorjev in/ali slaba razgradljivost surovega blata. Na koncu lahko zaključimo, da obdelava z mikrovalovi predstavlja hitro in ekonomično metodo obdelave substrata (Park in sod., 2004).

2.3.1.6 Termo-kemijska dezintegracija

Pri tem načinu obdelave substrata gre za obdelavo s kombinacijo kemijskih in toplotnih metod. Pri tem se uporabljajo kisle ali alkalne kemijske spojine (Chenxy, 2012; Rani in sod., 2012). Prednost take obdelave pred toplotno je v tem, da lahko zaradi dodatnega delovanja dodanih kemijskih spojin uporabljamo nižje temperature in s tem zmanjšamo

nevarnost tvorbe inhibitornih spojin, ki se lahko pojavljajo kot posledica visokih temperatur. Hkrati v tem procesu porabimo tudi manj energije (Rani in sod., 2012).

Kim in sodelavci (2003) so primerjalno testirali, katera metoda obdelave substrata je najboljša. Preizkušali so toplotno, kemijsko, ultrazvočno in termo-kemijsko obdelavo. Kot substrat jim je služilo aktivno blato iz sekundarne stopnje aerobnega čiščenja odpadne vode. Pri termo-kemijski obdelavi so substrat izpostavili NaOH in temperaturi 121 °C za 30 minut. Vse metode so vodile v zmanjšanje velikosti delcev v substratu, še najbolj pa sta se pri tem odrezali toplotna in termo-kemijska obdelava. Enako se je pokazalo tudi pri izboljšanju produkcije bioplina, kjer je termo-kemijska obdelava vodila do več kot 34,3 % povečanja produkcije bioplina. Park in sodelavci (2005) so primerjali vplive termo-kemijske in biološke dezintegracije aktivnega blata. Oba postopka sta zmanjšala velikost organskih delcev v substratu, povečala vsebnost topnih proteinov ter izplen in vsebnost metana v bioplinu, pri čemer je bila termo-kemijska obdelava pri obeh pokazateljih bolj učinkovita. Zaključili so, da termo-kemijska obdelava omogoča boljšo učinkovitost ob krajšem času obdelave kot biološka obdelava substrata. Hkrati jo je pa težje prenesti v veliko merilo, saj je iz vidika stroškov manj ugodna. Glavna izdatka sta posledica povečane porabe energije za vzdrževanje relativno visokih temperatur in kemijske spojine, ki se pri tem postopku porabljajo. Iz tega vidika se v primeru, ko želimo obdelati večjo količino substrata, bolje izkaže biološka obdelava. Rani in sodelavci (2012) so preverjali vpliv nizko temperaturne termo-kemijske obdelave aktivnega blata na produkcijo bioplina. Ta obdelava je potekala med 50 in 80 °C od 6 do 48 ur in z dodatkom NaOH do pH=10, 11 in 12. Po takšni obdelavi so opazili povečanje vsebnosti topnega KPK v substratu. Najprej so pri vseh parametrih poiskali najbolj optimalne in tako dobili sledečo kombinacijo parametrov: pH=12 pri 60 °C za 24 ur. S testom bio-metanskega potenciala so tako dosegli 51 % izboljšanje produkcije bioplina v primerjavi z neobdelanim substratom, s kasnejšim testiranjem enako obdelanega substrata v 4 litrskih pol-kontinuirnih laboratorijskih bioreaktorjih pa so dosegli 103 % povečanje produkcije bioplina.

Iz pregledanih raziskav lahko zaključimo, da je termo-kemijska dezintegracija učinkovit način obdelave substrata. V primerjavi z ostalimi obdelavami se v večini pogledov izkaže bolje (Kim in sod., 2003; Park in sod., 2005). Iz vidika stroškov je ta metoda – predvsem v primerjavi z biološko dezintegracijo - manj ugodna (Park in sod., 2005).

2.3.1.7 Biološka dezintegracija

Gre za dezintegracijo substrata z encimskimi mešanicami, z mikroorganizmi ali mešanicami obojega. Pri tem lahko gre za dodatno aerobno ali anaerobno stopnjo pred bioplinskim reaktorjem, katere namen je izboljšanje prve stopnje anaerobne razgradnje organskih snovi, torej hidrolize (Carrere in sod., 2010). Za ta namen se najpogosteje uporabljajo lipaze, proteinaze, celulaze in hidrolaze. O tem katere uporabiti, se odločamo na podlagi sestave izbranega substrata (Chenxi, 2012). Še najbolj pomembna je encimska obdelava lignoceluloznih substratov, saj ti vsebujejo velike količine težko razgradljivih polimerov, med katerimi je predvsem problematičen lignin (Vítěz in sod., 2011; Bruni in sod., 2010a). Na tem področju je bilo opravljenih že precejšnje število študij z različnimi encimi in substrati.

Različni avtorji navajajo različne stopnje izboljšanja produkcije bioplina iz različnih substratov. Tako so na primer Vítěz in sodelavci (2011) dosegli do 15 % izboljšanje z uporabo komercialne encimsko-mikrobne mešanice APD Biogas (Baktoma, s.r.o., Češka), pri čemer jim je kot substrat služila mešanica koruzne silaže in svinjske gnojevke. Zhong in sodelavci (2011) so preverjali možnost obdelave koruzne slame s posebno mikrobno mešanico, ki je vsebovala kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae* sp., *Coccidioides immitis* sp., *Hansenula anomala* sp.), celulolitične bakterije (*Bacillus licheniformis* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* sp., *Pleurotus florida* sp.) ter mlečnokislinske bakterije (*Lactobacillus deiliehii* sp.). Na ta način so uspeli povečati produkcijo bioplina pri tem substratu za okoli 33 %. Mshandete in sodelavci (2005) so preverjali ali bi bilo možno izboljšati anaerobno razgradnjo vlaken sisala z aerobno inkubacijo z aktivnim blatom. Na ta način so dosegli 26 % izboljšanje produkcije bioplina kot brez obdelave. Pri tem so opazili, da je potrebno biti pazljiv pri času obdelave, saj lahko začnemo ob predolgi inkubaciji izgubljati substrat za metanogenezo preko aerobne oksidacije. Damasceno in sodelavci (2012) so testirali sočasno uporabo surfaktanta (ramnolipida), ki ga proizvaja *Pseudomonas aeruginosa* in mešanico encimov (lipaz in proteaz), katere so pridobili z gojenjem *Penicillium simplicissimum* na pogači, ki sicer ostane po iztiskanju olja iz semen palme babassu. Kot substrat jim je služila odpadna voda iz perutninsko-predelovalne industrije, ki je bila bogata z maščobo. Opazili so povečano proizvodnjo bioplina. Masse in sodelavci (2003) so dodajali komercialno dostopno lipazo iz trebušne slinavke za izboljšanje hidrolize odpadne vode iz klavnice, ki je vsebovala delce svinjske maščobe. Opazili so le majhno povečanje produkcije bioplina (4 % izboljšanje pretvorbe skupnega KPK v bioplin). Hkrati niso zaznali pomembnejšega vpliva na vsebnost metana v bioplinu. Podobno so Gomes in sodelavci (2011) preverjali vpliv encimske obdelave odpadnih voda mlečne industrije na produkcijo bioplina. S pregledom literature in lastnih rezultatov so ugotovili, da encimska obdelava substratov, ki vsebujejo večje količine maščobe sicer res izboljša njihovo hidrolizo, vendar s tem ne izboljšamo nujno tudi izplena bioplina. Sklepali so, da razlog tiči v povečanih koncentracijah dolgoverižnih maščobnih kislin, ki se pojavijo v substratu po hidrolizi maščob. Te spojine ali pa izpostavljenost biomase samim encimom potem delujejo inhibitorno na metanogenezo in tako povzročajo težave v procesu, ki se kažejo v padcu učinkovitosti in stabilnosti. Zaznali so 38 % padec učinkovitosti odstranjevanja organske snovi (merjeno kot skupni KPK) v primerjavi z enako obremenjenim bioreaktorjem brez encimske obdelave substrata. Na koncu so zaključili tudi, da enkratna izpostavitve biomase lipazi ali z njo obdelanemu substratu nima inhibitornega vpliva nanjo ter da šele daljša izpostavitve vodi k negativnim učinkom. Bruni in sodelavci (2010a) so preverjali vpliv kombinacije encimske obdelave in obdelave s paro in NaOH ter tako dosegli 34 % povečanje produkcije bioplina iz gnojevke. Encim je bil komercialno dostopna lakaza. Preverjali so tudi ali bi učinek lahko dosegli samo z encimi in opazili, da tak postopek ni omogočil pomembnejšega izboljšanja produkcije bioplina, kar nakazuje, da intaktna lignoceluloza ni dobro dostopna za encime, zaradi česar je le-te potrebno uporabljati v kombinaciji z drugimi metodami obdelave. Pri tem so preverjali učinkovitost več različnih encimov. Hkrati z omenjenima poskusoma, so Bruni in sodelavci (2010a) preverjali tudi ali lahko dosežejo izboljšanje izplena bioplina iz istega substrata, tako da ga prej obdelajo z aerobnimi mikroorganizmi, ki bi lahko začeli razgradnjo lignoceluloznega materiala in jo tako olajšali za anaerobno mikrobno združbo. Pri tem so pazili, da obdelava ni bila predolga, saj bi sicer lahko prišlo do aerobne razgradnje holoceluloze. Vir mikroorganizmov je bil kompost iz vrtnih odpadkov in glive,

pridobljene iz silaže. Poskus ni omogočil pomembnejšega izboljšanja produkcije bioplina. Angelidaki in Ahring (2000) sta uspeli doseči do 30 % izboljšanje produkcije bioplina iz goveje gnojevke z uporabo bakterij B4, ki razkrajajo hemicelulozo. Omenjena mikroorganizme so najprej namnožili v gojiščih, ki so vsebovala ksilan, ko so dosegli eksponentno fazo rasti, pa so jih centrifugirali in dodali goveji gnojivki. Ocenili sta, da takšna obdelava nakazuje veliko potenciala v industrijskem merilu, še posebej, če bi bilo mogoče bakterije enostavno gojiti kar v bioplinarni sami.

Park in sodelavci (2005) so primerjali termo-kemijsko in biološko dezintegracijo aktivnega blata. Biološko dezintegracijo so izvajali z inokulacijo *Cellulomonas uda* KCCM 12156 in *Cellulomonas biazotea* KCCM 40760 z inkubacijo pri 30 °C. Biološka obdelava substrata se je izkazala kot slabša v primerjavi s termo-kemijsko v svoji sposobnosti zmanjšanja velikosti suspendiranih organskih delcev in povečanju topnosti proteinov. Enako se je pokazalo pri povečanju topnosti KPK v substratu (kar so definirali kot razmerje med topnim in skupnim KPK, pomnoženo s 100) in izplenu bioplina. Warthmann in sodelavci (2012) so preverjali vpliv 25 različnih encimskih mešanic za anaerobno razgradnjo različnih substratov, med drugim tudi surovega blata. Ugotovili so, da so encimi aktivni le zelo kratek čas (30 do 120 minut), potem pa njihova aktivnost hitro upade. Tako bi jih bilo potrebno konstantno dodajati za njihovo učinkovito delovanje, kar pa iz ekonomskega vidika ni sprejemljivo. Težava pri večini encimskih pripravkov leži v tem, da ti niso bili razviti za delovanje v bioplinskem reaktorju, ki razgrajuje surovo blato, temveč predvsem za razgradnjo substratov, ki izvirajo iz energetskih rastlin. Na istih substratih so preverjali tudi dodajanje mešanic mikroorganizmov, ki bi naj sami proizvajali encime ter tako izboljšali izplen bioplina. Rezultati ponovno niso bili obetajoči, saj se dodani mikroorganizmi niso dolgoročno uspešno ohranjali v reaktorjih. Še najboljše rezultate so dosegli z encimsko obdelavo po toplotni obdelavi, vendar se to v velikem merilu z vidika ekonomike najbrž ne bi obneslo. Zgodba bo morda nekoč drugačna, če se bo proizvodnja visoko učinkovitih encimskih mešanic dovolj pocenila (Warthmann in sod., 2012).

Na podlagi opisanih raziskav lahko vidimo, da lahko encime pridobimo z izolacijo ali pa izberemo takšne, ki so komercialno dostopni. Slednji imajo to prednost, da imamo z njimi manj dela ter da so čistejši in vedno na voljo v istih koncentracijah. Zaradi specifičnega delovanja encimov, moramo uporabiti takšne, ki so primerni za ciljni substrat. Posledično se moramo zavedati, katere so glavne sestavine našega substrata, da lahko izberemo primerne encime ter ustrezno strategijo doziranja za izboljšanje hidrolize (Chenxi, 2012). Zelo pomembna prednost biološke dezintegracije je relativno majhna poraba energije, kar je še posebej izrazito, če jo primerjamo s toplotno ali termo-kemijsko dezintegracijo (Park in sod., 2005). Kot slabost tako encimov kot mikrobnih mešanic, lahko izpostavimo njihovo kratkotrajno delovanje zaradi slabe prilagojenosti na okolje, v katerega jih dodajamo (Warthmann in sod., 2012). Zaenkrat se je ta način obdelave substrata izkazal kot učinkovit predvsem pri izboljšanju razgradnje substratov, ki vsebujejo majhne celulozne delce in ne toliko pri substratih, bogatih z lipidi (Chenxi, 2012; Luste in sod., 2011). Da se prepričamo ali je določena encimska ali bakterijska mešanica primerna za naš substrat, je to potrebno eksperimentalno preveriti.

2.3.2 Vračanje odvečnega anaerobnega blata bioplinskega reaktorja nazaj v reaktor

Kot stranski produkt proizvodnje bioplina nam ostane odvečno anaerobno blato, ki vsebuje mikrobnne celice aktivne biomase in nerazgrajene organske in anorganske delce. Različni avtorji so preverjali, kakšne so prednosti vračanja tega iztoka v takšni ali drugačni obliki nazaj v bioplinski reaktor. V glavnem izhajajo iz dveh možnih predpostavk: a) odvečno anaerobno blato anaerobnega bioreaktorja vsebuje veliko težje razgradljivega materiala, ki bi se lahko razgradil, če bi ga dezintegrirali in/ali podaljšali njegov zadrževalni čas v bioreaktorju (Onyeché in sod., 2007); b) odvečno anaerobno blato anaerobnega bioreaktorja vsebuje težje razgradljiv material in živo aktivno anaerobno biomaso iz bioreaktorja, katera bo po vrnitvi vanj, tam povečala koncentracijo aktivnih mikroorganizmov in tako poskrbela za večjo učinkovitost razgradnje ter boljše ohranjanje počasi rastočih metanogenih arhej v večjem številu (Young in sod., 2013; Vanyushina in sod., 2012).

Onyeché in sodelavci (2007) so razmišljali v skladu s prvo predpostavko in tako preverjali vpliv dezintegracije in vračanja dehidriranega blata v reaktor na produkcijo bioplina. Kot substrat so uporabljali surovo blato, rezultat uvedbe tega postopka v velikem merilu na čistilni napravi pa je bilo 23 % zmanjšanje produkcije odvečnega dehidriranega blata in več kot 30 % povečanje produkcije bioplina. Ob tem ima celoten sistem kljub povečanim potrebam po energiji (dodatne črpalke, homogenizator in ostali električni sistemi) pozitivno energetsko bilanco. To za čistilno napravo pomeni prihranek pri odstranjevanju dehidriranega blata in dodaten dobiček pri proizvodnji električne energije.

Po drugi strani so Young in sodelavci (2013) razmišljali v skladu z drugo predpostavko in tako spremljali delovanje pilotnega sistema vračanja anaerobnega blata anaerobnega bioreaktorja, ki ga je razvilo podjetje *Siemens water technologies*. Ta vrne najmanj 85 % iztoka anaerobnega bioreaktorja nazaj v aerobno stopnjo čiščenja odpadne vode. Opazili so, da nov sistem proizvede 1,5 do 5,5 krat več metana kot klasični sistem in da pretvori tudi več KPK v bioplin. V splošnem ocenjujejo, da je vračanje anaerobnega blata bioreaktorja v aerobno stopnjo ugodno za delovanje čistilne naprave, saj vodi v zmanjšanje volumna iztoka bioreaktorja in povečanje produkcije bioplina. Vanyushina in sodelavci (2012) so vračali biomaso v obliki dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor. S tem so podaljšali zadrževalni čas za težje razgradljive organske delce in skoncentrirali biomaso v reaktorju. Rezultat je bila boljša razgradnja organske snovi in do 17 % izboljšanje produkcije bioplina v primerjavi s kontrolnim reaktorjem. Tako torej vračanje dehidriranega blata v reaktor, poveča njegovo učinkovitost in izboljša učinkovitost dehidracije odvečnega anaerobnega blata po koncu procesa. Ocenili so, da bi se implementacija takšnega sistema v velikem merilu močno izplačala, saj omogoča povečanje intenzivnosti anaerobne digestije, brez potrebe po izgradnji večjih reaktorjev ali bistvene rekonstrukcije obstoječe infrastrukture. Omogoča zmanjšanje stroškov v povezavi z obdelavo in odvozom odvečnega dehidriranega blata, povečanje produkcije bioplina, ki bi kompenzirala povečano potrebo po energiji zaradi sistema vračanja dehidriranega blata v reaktor. Hkrati je tudi manj stroškov z dehidracijo blata, saj ima le-to ugodnejše lastnosti.

Na podlagi rezultatov opisanih študij lahko sklepamo, da ima vračanje anaerobnega blata bioreaktorja nazaj v sam bioreaktor za čistilne naprave zanimive prednosti. Na začetku je sicer potrebna določena investicija za implementacijo takšnega sistema, vendar se ta kmalu poplača s precejšnjim zmanjšanjem stroškov za odstranjevanje odvečnega anaerobnega

blata bioplinskega reaktorja in s povečano produkcijo bioplina (Onyeche in sod., 2007; Vanyushina in sod., 2012; Young in sod., 2013).

2.3.3 Sistem več zaporednih bioplinskih reaktorjev

Obdelava surovega blata v bioplinskih reaktorjih običajno poteka enostopenjsko pri mezofilnih (30-40 °C) ali termofilnih (50-55 °C) razmerah. Pri mezofilnih se na ta način pri zadrževalnem času 10-20 dni, razgradi le 30-40 % organske snovi. Težava je v tem, da so hranila v celicah iz aktivnega blata težko dostopna mikroorganizmom, ki sodelujejo pri proizvodnji bioplina. Hidroliza polimernih organskih snovi je omejujoča stopnja celotnega procesa (Athanasoulia in sod., 2012). Za izboljšanje produkcije se tako lahko uporabi dvostopenjski sistem, kjer acidogeni stopnji s kratkim zadrževalnim časom v prvem reaktorju sledi metanogena stopnja z dolgim zadrževalnim časom v drugem reaktorju. Po eni strani takšna postavitev izboljša učinkovitost razgradnje, po drugi je pa pri lahko razgradljivih substratih omenjena učinkovitost že v osnovi tako velika, da je z uporabo dodatnega reaktorja ne moremo bistveno povečati (Athanasoulia in sod., 2012).

Athanasoulia in sodelavci (2012) so primerjalno testirali tak dvostopenjski sistem in klasičen sistem z enim bioreaktorjem. Kot substrat so uporabljali aktivno blato iz čistilne naprave. Uporabljali so kontinuirne reaktorje s stalnim mešanjem (CSTR). Rezultati tega dvo-reaktorskega sistema na razgradnjo surovega blata izkazujejo od 9,5 do 40,1 % (odvisno od zadrževalnega časa) izboljšanje produkcije bioplina in izboljšano kvaliteto iztoka, kar se tiče vsebnosti kratkoveržnih maščobnih kislin (KMK). Park in sodelavci (2005) so razvili tristopenjski sistem za proizvodnjo metana iz aktivnega blata. Prva stopnja je bila bodisi biološka, bodisi termo-kemijska dezintegracija substrata, naslednja je bila acidogena stopnja, tretja pa je bila metanogena. Svoj sistem so primerjali z dvema drugima tristopenjskima, štirimi dvostopenjskim in enim enostopenjskim sistemom. Pri tem so že samo dezintegracijo substrata tudi pri drugih avtorjih smatrali kot posebno stopnjo. Izkaže se, da je kar se redukcije KPK in organske snovi ter izplena bioplina tiče, enostopenjski sistem precej slabši od večstopenjskih. Med večstopenjskimi se v splošnem bolje izkažejo tristopenjski, s tem da obstajajo tudi izjeme. Coelho in sodelavci (2011) so poleg vpliva obdelave substrata z mikrovalovi, preverjali tudi vpliv različnih kombinacij dvostopenjskih reaktorjev. Te so bile termofilno-mezofilni sistem in termofilno-termofilni sistem. Prvi torej izvaja acidogenezo v termofilnem, metanogenezo pa v mezofilnem reaktorju, pri drugem pa obe stopnji potekata pri termofilnih razmerah. Oba sistema so primerjali med seboj in z enostopenjskimi termofilnimi ali mezofilnimi reaktorji pri uporabi z mikrovalovi obdelanega in neobdelanega aktivnega blata. Kot najbolj učinkovit se je izkazal dvostopenjski termofilno-termofilni sistem, ki je kot substrat koristil z mikrovalovi obdelano aktivno blato. V primerjavi s kontrolo (enostopenjski mezofilni reaktor, obremenjen z neobdelanim aktivnim blatom) je ta kombinacija omogočila do 106 % povečanje produkcije bioplina. Uvedba dvostopenjskega sistema je omogočila tudi močno skrajšanje zadrževalnega časa, ne da bi s tem bistveno zmanjšali učinkovitost procesa.

Rezultati različnih avtorjev nakazujejo, da ima sistem dveh ali več zaporednih reaktorjev veliko potenciala za izboljšanje izplena bioplina iz težko razgradljivih substratov. Po drugi strani je uvedba tega sistema na že obstoječih čistilnih napravah lahko nekoliko težavna,

oziroma finančno neugodna, saj je potrebno izgraditi nove reaktorje. Hkrati ta sistem tudi ni primeren za vse vrste substratov, saj pri razgradnji lahko razgradljivih ni bistveno boljši od enostopenjske produkcije metana (Athanasoulia in sod., 2012).

2.4 PROBLEM ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE NA KOMUNALNIH ČISTILNIH NAPRAVAH

Odpadne brozge in odpadne vode farmacevtske industrije, ki pritekajo na komunalne čistilne naprave (med drugim tudi na CČN Domžale-Kamnik), lahko povzročijo slabše delovanje procesa aerobnega čiščenja odpadnih vod. Ostanke antibiotikov in njihovih presnovnih produktov v surovem blatu lahko potencialno negativno vplivajo tudi na mikroorganizme v bioplinskem reaktorju (Heidari in sod., 2012). Koncentracije različnih farmacevtskih spojin v surovem blatu so različne tako med samimi spojinami kot tudi med različnimi čistilnimi napravami. Do tega pride zaradi razlik v fizikalno kemijskih lastnostih posameznih spojin in različnimi stopnjami njihove uporabe na območju določene ČN (Stasinakis, 2012).

V anaerobnih bioreaktorjih poteka biodegradacija po različnih poteh, zaradi česar kratkotrajna inhibicija določene skupine mikroorganizmov, ki so tam prisotni, ne more povzročiti večjega zmanjšanja produkcije bioplina. Po drugi strani lahko daljša izpostavitve protimikrobnim spojinam kljub temu povzroča težave, ki so lahko posledica kopičenja stranskih produktov ali sprememb v mikrobni populaciji. Vse to se na koncu lahko pokaže v zmanjšani količini in kvaliteti proizvedenega bioplina (Heidari in sod., 2012). Različni antibiotiki in njihovi presnovni produkti imajo lahko na mikrobno združbo v reaktorju različne učinke. Nekateri že v svoji primarni obliki delujejo inhibitorno na določene skupine mikroorganizmov, drugi na njih nimajo posebnega vpliva, ga pa imajo zato njihovi presnovni produkti, katere na primer z blatom izločijo živali, ki so dobile antibiotik. Tretji sploh ne delujejo inhibitorno na izbrane mikroorganizme. Pri teh vplivih je seveda vedno pomembna tudi koncentracija prisotnega antibiotika ali drugega inhibitorja (Heidari in sod., 2012). V bioplinski reaktor na čistilni napravi pogosto pridejo antibiotiki ali njihovi presnovni produkti kar s surovim blatom, kamor se lahko vežejo, ko so prisotni v odpadni vodi. Tam nekatere mikrobna združba popolnoma odstrani, druge le deloma, tretjih pa sploh ne (Chenxi in sod., 2008). Zaradi tega je potrebno za vsako spojino posebej preveriti, kakšni so njeni učinki na mikrobno biomaso in do kakšne mere jih je biomasa sposobna razgraditi.

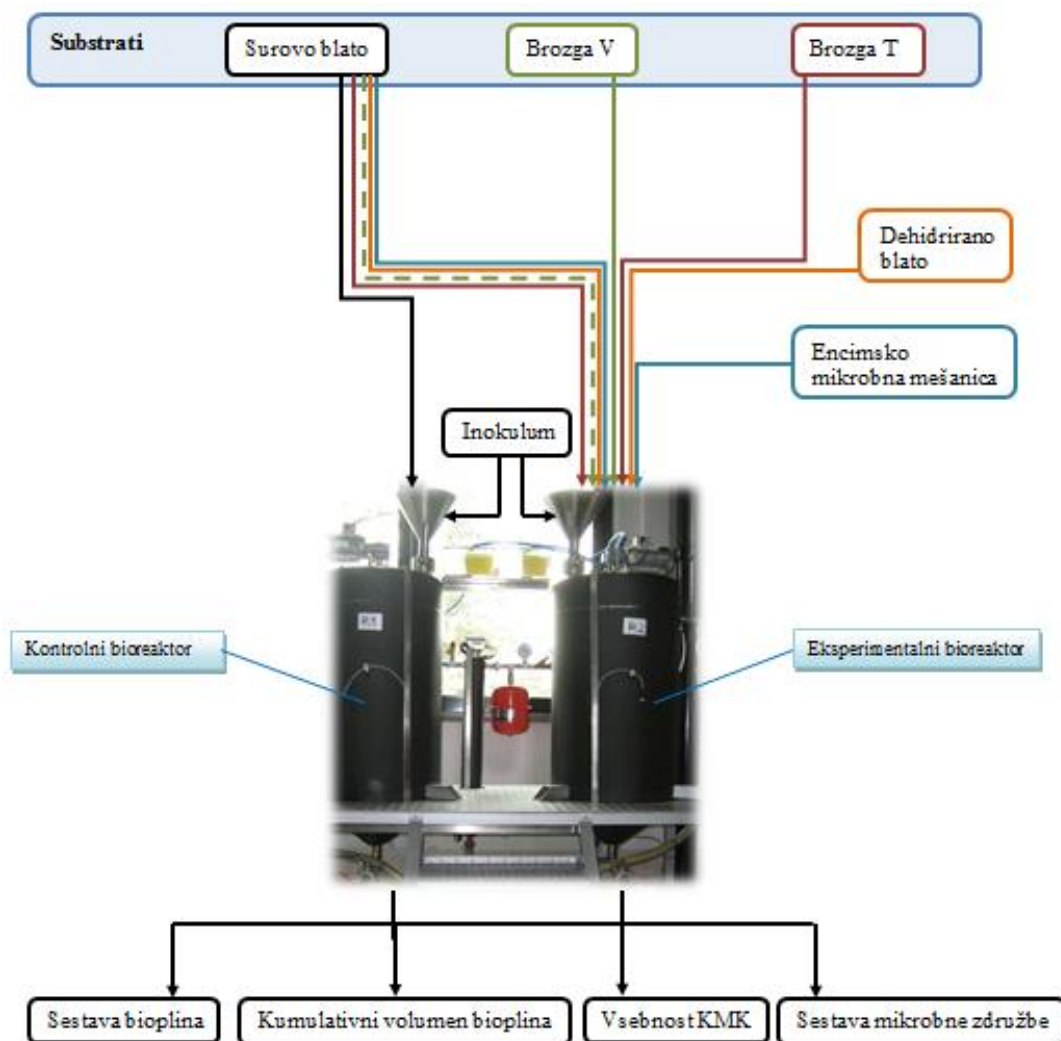
Težavnost biodegradacije se med spojinami torej razlikuje. Na njo lahko vplivajo različni parametri anaerobnega procesa, kot sta na primer zadrževalni čas in temperatura obratovanja. Pomembna je lahko tudi sestava mikrobne združbe, saj pri marsikateri toksični spojini čez čas pride do prilagoditve združbe in njene uspešnejše razgradnje. Na to v veliki meri vplivajo tudi lastnosti same spojine, med katerimi je posebej pomembna dostopnost spojine mikroorganizmom. Tako se na koncu lahko nekatere toksične snovi v bioplinskem reaktorju uspešno presnovijo, druge tam povzročajo težave v proizvodnji bioplina, tretje pa reaktor v večji meri zapuščajo nerazgrajene in tako še naprej predstavljajo nevarnost za okolje (Stasinakis, 2012). Dodatno težavo predstavlja tudi dejstvo, da se rutinske analize za prisotnost takšnih različnih za okolje škodljivih organskih spojin ne izvajajo. Tako še posebej v primeru uporabe dehidriranega blata kot gnojila, te

snovi pridejo nazaj v okolje in na koncu tudi lahko vstopajo v kopenske prehranske verige ali pitno vodo. Problematično je tudi, da je takšnih nevarnih spojin veliko in da pri mnogih njihov učinek na delovanje bioplinskega reaktorja še ni znan (Carballa in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

Na podlagi informacij, pridobljenih s pregledom objav in na podlagi realnih možnosti na CCN Domžale-Kamnik, smo se odločili, da testiramo nekatere od opisanih metod izboljšanja produkcije bioplina. Prednost so imele tiste metode, ki bi jih bilo na CCN Domžale-Kamnik najlažje uvesti. Tako smo opravili poskuse z biološko dezintegracijo (dodajanje mešanice encimov in mikroorganizmov) in vračanjem dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor (opisano v poglavjih 2.3.1.7 in 2.3.2). Poleg tega smo preverili tudi uspešnost anaerobne razgradnje odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije (poglavje 3.3), saj bi v primeru, da je to mogoče, lahko preprečili potencialne negativne vplive (kot so opisani v poglavju 2.4) omenjenih brozg na aerobno stopnjo čiščenja odpadne vode tako, da bi jih direktno uvajali v anaerobno stopnjo čiščenja.

Da bi poiskali rešitev problema, smo oblikovali različne poskuse (Slika 3).



Slika 3: Shema poskusov, ki smo jih izvajali. Puščice nakazujejo katere sestavine smo dali v posamezni reaktor (zgornji del sheme) in katere analize smo izvajali (spodnji del sheme). Različne barve puščic označujejo zasnovo posameznih poskusov (Črna – uporabljeno v vseh poskusih; modra – uporabljeno v poskusih preverjanja vpliva dodane encimsko mikrobne mešanice; oranžna – uporabljeno v poskusih preverjanja vpliva vračanja dehidriranega blata v reaktor; zelena – uporabljeno v poskusih proizvodnje bioplina iz brozge V; rdeča – uporabljeno v poskusih proizvodnje bioplina iz brozge T). Črtna črta označuje, da je bila sestavina pri eni vrsti poskusa uporabljena, pri drugi pa ne (pri proizvodnji bioplina iz čiste brozge V ni bilo surovega blata v eksperimentalnem bioreaktorju, pri proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata pa je bilo tja dodano)

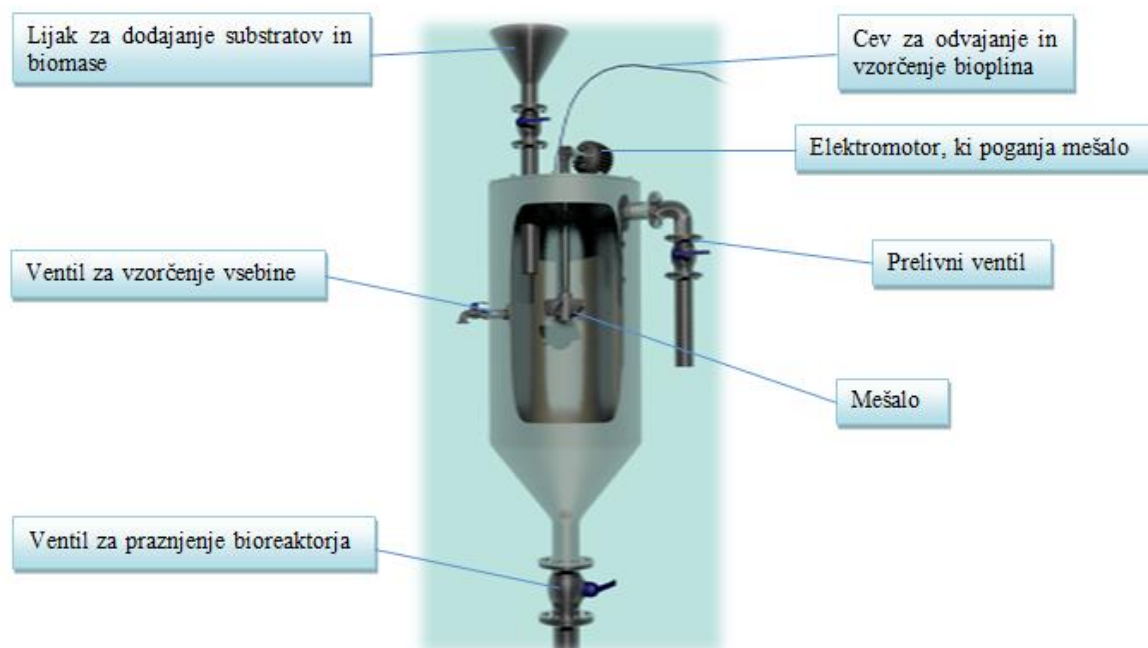
Inokulum mikroorganizmov za proizvodnjo bioplina smo pridobili preko cevi direktno iz industrijskih CSTR bioreaktorjev na Centralni čistilni napravi Domžale-Kamnik (CČN). Kot substrat smo večinoma uporabljali surovo blato. Ta substrat se tudi sicer dovaja v industrijske bioplinske reaktorje na CČN. Sestavljen je iz živih mikroorganizmov, pomešanih z različnimi organskimi delci. Odpadna voda, ki prihaja na čistilno napravo se spreminja z letnimi časi, iz dneva v dan in celo iz ure v uro. Posledično prihaja tudi do večjih sprememb v sestavi surovega blata, ki se kažejo tudi v spremembah v kemijski potrebi po kisiku (KPK) in vsebnosti kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK). Zaradi tega je bilo potrebno pred zagonom vsakega poskusa izračunati, koliko substrata je potrebno

dodati glede na organsko snov inokuluma, da je bila obremenitev reaktorjev vedno enaka. Izračun smo pripravili z enačbo 1:

$$V_S = \frac{V_r}{1 + \frac{KPK}{Obr * OS}} \quad \dots(1)$$

V_s=volumen substrata; V_r=volumen reaktorja; KPK =kemijska potreba substrata po kisiku; Obr=želena obremenitev reaktorja, OS= organska snov inokuluma

S tem smo poskušali čim bolj zmanjšati razlike med posameznimi poskusi in ponovitvami znotraj njih. Kljub temu popolne ponovljivosti vseh poskusov ni bilo mogoče zagotoviti. Da bi kar se da zmanjšali vpliv variabilnosti substratov in morebitnih napak na rezultate, smo vsak poskus ponovili trikrat. Pri vseh poskusih smo uporabili pilotno napravo podjetja Talisman d.o.o., ki jo sestavljata 2 šaržna bioreaktorja, z delovnim volumnom 196,8 litrov ter skupnim volumnom 226,5 litrov (Slika 4). Eden je vedno služil kot negativna kontrola in je poleg inokuluma vseboval le še surovo blato kot substrat. Drugi je bil eksperimentalni in je poleg ali namesto surovega blata vseboval še druge snovi. Vsak reaktor ima na vrhu lijak za dodajanje substratov in biomase in pritrjen elektromotor, ki poganja mešalo v notranjosti. Mešanje je bilo pri vseh poskusih nastavljeno enako – po dve minuti mešanja in ena minuta premora (hitrost mešanja: 141 obratov na minuto). Dno reaktorjev je konično oblikovano in ima v sredini cev, ki vodi do ventila za praznjenje reaktorja. Za tem ventilom je na cevi še en manjši, namenjen vzorčenju. Ob straneh ima vsak reaktor mesto za pH elektrodo, ki smo jo kasneje nadomestili z ventilom za vzorčenje, ki nam je omogočal natančnejše vzorčenje z manjšim vplivom na meritve sproščenega bioplina. Nivo tekočine v reaktorju regulira prelivni ventil, ki je ob polnjenju naprave odprt, da omogoči iztok odvečne vsebine, nato pa se zapre in ostane cel poskus zaprt. Nad gladino tekočine iz reaktorja izhajajo cevi za meritve plina – tako tiste za meritev produkcije kot tiste za vzorčenje. Te imajo nameščene še ventile, cevi za meritev produkcije pa se končajo v merilni napravi, proizvajalca Wet tip gas meter (ZDA), ki deluje po principu izpodrivanja vode z nastalim plinom. Ko se merilna posodica napolni s 100 ml plina, se prevrne, kar naprava zazna in zabeleži izmerjen volumen. Oba reaktorja sta toplotno izolirana in tekočinsko ogrevana na želeno temperaturo. Vsi naši poskusi so potekali pri 39 °C.



Slika 4: Shema pilotnih bioreaktorjev, ki smo jih uporabljali. Prikazan je prerez enega izmed obeh reaktorjev. Na shemi niso prikazani toplotna izolacija bioreaktorja in sistem za vzdrževanje konstantne temperature ter sistem za programiranje delovanja reaktorja .

3.1 POSKUSI POVEČANJA PROIZVODNJE BIOPLINA Z DODAJANJEM ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE

Pri teh poskusih smo v oba reaktorja dali enako količino surovega blata, le da smo poleg tega v eksperimentalni reaktor dodali še encimsko mikrobn mešanico B120, proizvajalca Bio-Systems (Slika 3, modra barva). Volumen surovega blata smo izračunali z enačbo 1, pri kateri smo kot želeno obremenitev vnesli vrednost 0,2 g KPK/g OS inokuluma biomase. Takšno obremenitev smo izbrali, ker so tako obremenjeni industrijski CSTR bioreaktorji na CČN. Izbrana encimsko mikrobn mešanica vsebuje amilaze in lipaze ter hidrolitične fakultativno anaerobne mikroorganizme. Po trditvah proizvajalca preparat izboljša prvo stopnjo bioplinske produkcije – torej hidrolizo. Posledično bi naj prišlo tudi do zmanjšanja količine maščobnih oblog v reaktorjih ter povečanja izplena bioplina.

S temi poskusi smo preverjali hipotezo, da bi naj zaradi slabe hidrolize prišlo do ohranjanja suspendiranih organskih delcev v iztoku bioplinskega reaktorja, kar bi lahko bil vzrok za občasno povečano vsebnost organske snovi, ki se odraža v povečani vrednosti KPK. Hkrati bi izboljšanje stopnje hidrolize moralo povečati tudi produkcijo bioplina. Encimsko mikrobn mešanico smo dozirali ob zagonu in po treh pretečenih dnevih, vsakič po 5 g na celoten volumen reaktorja. Te vrednosti so bile izračunane po navodilih proizvajalca za anaerobne lagune.

3.2 POSKUSI POVEČANJA PROIZVODNJE BIOPLINA Z VRAČANJEM DEHIDRIRANEGA BLATA

Pri tej seriji poskusov smo kot substrat v obeh reaktorjih uporabili surovo blato. V eksperimentalni reaktor smo poleg tega dodali še dehidrirano blato, ki je centrifugirano odvečno anaerobna blato iz industrijskih bioplinskih bioreaktorjev (Slika 3, oranžna barva). Ta material vsebuje predvsem koncentrirane mikrobnne celice in nerazgrajene organske delce iz bioplinskega reaktorja (Young in sod., 2013; Vanyushina in sod., 2012). Pridobili smo ga takoj po centrifugiranju, ko gre običajno na deponijo in kasnejše uničenje s sežigom. Zbrali smo ga ustrezno količino in to potem dodali v reaktor, skupaj s substratom. Z dodajanjem tega materiala smo povečali koncentracijo mikroorganizmov, ki sodelujejo pri procesu metanogene anaerobne presnove. Z vračanjem dehidriranega blata smo želeli zmanjšati vpliv izpiranja delovnih mikroorganizmov iz bioreaktorja oziroma povečali njihovo koncentracijo v reaktorju, kar bi lahko izboljšalo razgradnjo organskih spojin. V pilotnih reaktorjih do izpiranja seveda ne pride, je pa zato še vedno lahko opazen pozitiven učinek na hitrost razgradnje substrata. Zaradi povečanih koncentracij mikroorganizmov smo za enako obremenitev eksperimentalnega in kontrolnega reaktorja v eksperimentalnega morali dodati večji volumen substrata, da je bila obremenitev enaka kot pri vseh ostalih poskusih. Izračun doziranja substrata v reaktor z dodanim dehidriranim blatom je potekal po enačbi 2. Pri tem smo ciljali na obremenitev reaktorjev 0,2 g KPK/g OS inokuluma biomase:

$$V_S = \frac{V_r + V_{db} * \left(\frac{OS_{db}}{OS} - 1 \right)}{1 + \frac{KPK}{Obr * OS}} \quad \dots(2)$$

V_s=volumen substrata; V_r=volumen reaktorja; V_{db}=volumen dehidriranega blata; OS_{db}=organska snov dehidriranega blata; KPK =kemijska potreba substrata po kisiku; Obr=želena obremenitev reaktorja, OS=organska snov inokuluma

3.3 POSKUSI PROIZVODNJE BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE

Odpadne fermentacijske brozge iz farmacevtske industrije nastajajo pri proizvodnji aktivnih farmacevtskih učinkovin s fermentacijo. Ustrezne proizvodne mikroorganizme vcepijo v gojišče, kjer s fermentacijo proizvedejo sekundarne metabolite, ki so ciljne aktivne učinkovine. Te izolirajo iz fermentacijskega medija in obdelujejo dalje, ostanki mikrobnih celic in gojišča pa se zavržejo. Preverjali smo uspešnost proizvodnje bioplina iz dveh različnih brozg: odpadne fermentacijske brozge V (v nadaljevanju brozga V) in odpadne fermentacijske brozge T (v nadaljevanju brozga T). Ta odpadni material ima relativno veliko vrednost KPK (okoli 484 g/l pri brozgi V in 78,2 g/l pri brozgi T), kar nakazuje potencial za anaerobno razgradnjo do bioplina. Do sedaj sta brozgi do čistilne naprave prihajali po kanalu skupaj z ostalo odpadno vodo. Fermentacijski brozgi v aerobni stopnji čiščenja lahko predstavljata enega izmed možnih vzrokov občasnih težav v delovanju čistilne naprave. Te se lahko kažejo med drugim tudi v porastu količine filamentoznih mikroorganizmov, ki povzročajo penjenje v aeracijskih bazenih in slabše usedanje aktivnega blata. Ker je le-to tudi substrat za proizvodnjo bioplina, bi lahko tako prišlo tudi do vpliva na delovanje bioplinskega reaktorja (Deublein in Steinhauser, 2008).

Zaradi tega je čistilni napravi v interesu preveriti ali bi se takšen, za proces čiščenja vode neugoden material, morda dalo predelati direktno z anaerobno pretvorbo v bioplin.

Kontrolni reaktor smo pripravili enako kot v prvih dveh serijah poskusov (poglavji 3.1 in 3.2), v eksperimentalnega pa smo namesto surovega blata kot substrat dodali eno od dveh odpadnih fermentacijskih brozg iz bioreaktorjev farmacevtske industrije (Slika 3, zelena in rdeča barva). Brozge smo dobili v plastičnih sodih, ki so bili pripeljani direktno iz farmacevtskega podjetja. Z nekajdnevnimi zaporednimi meritvami KPK smo opazili, da se vrednost KPK v brozgah čez čas spreminja. Poleg tega smo opazili tudi sproščanje plinov, katerih tlak je po zaprtju soda narastel. Vse to je nakazovalo, da je prisotna intenzivno metabolno aktivna mikrobna populacija. Da bi ohranili primerljivost med ponovitvami poskusov smo zato brozgi prelili v dvolitrska vedra, jih zaprli s pokrovom in jih zamrznili. Kot KPK za izračun obremenitve smo upoštevali zadnjega izmerjenega (na dan zamrzovanja) in ga kasneje še občasno preverili na odmrznjenih vzorcih.

S tema brozgama smo izvedli do tri vrste poskusov – eno serijo z uporabo le brozge kot substrata, drugo z uporabo mešanice brozge in surovega blata v razmerju 1:1 glede na obremenitev ter tretjo vrsto poskusa, ki je bil dejansko enak drugi, le da je trajal 30 dni namesto 5 in so bili reaktorji po prvih petih dneh dohranjevani vsakodnevno z enako obremenitvijo kot ob zagonu. Zadnje štiri dni poskusa, smo preverjali stabilnost sistema pri višjih obremenitvah in smo zato v reaktorja dodajali po dvakrat več substrata. Pri tem poskusu je hidravlični zadrževalni čas znašal povprečno dobrih 17 dni za kontrolni reaktor in skoraj 30,5 dni za reaktor z mešanico farmacevtske brozge in surovega blata (zadnje štiri dni potem ti dve vrednosti padeta na 8 dni za kontrolni in 14 dni za reaktor z mešanico farmacevtske brozge in surovega blata). Za brozgo V smo opravili vse tri vrste poskusov, za brozgo T pa le drugo vrsto. Izračun obremenitve reaktorja s kombinacijo surovega blata in brozge je bil opravljen z enačbo 3, pri čemer smo kot želeno obremenitev reaktorja vnesli vrednost 0,2 g KPK/g OS inokuluma biomase (izjema so zadnji štirje dnevi 30-dnevnega poskusa, ko je obremenitev znašala 0,4 g KPK/g OS inokuluma biomase):

$$Vs1 = \frac{Vr - \frac{OS \cdot Obr/2}{KPK1} + \frac{OS \cdot Obr/2}{KPK2} + 1}{\frac{KPK1}{KPK2} + 1} \quad \dots(3)$$

Vs1=volumen prvega substrata; Vr=volumen reaktorja; Obr=želena obremenitev reaktorja, OS= organska snov inokuluma; KPK1=kemijska potreba prvega substrata po kisiku; KPK2=kemijska potreba drugega substrata po kisiku. Za izračun volumna drugega substrata obrnemo ulomek v spodnjem členu enačbe, tako da je potem KPK2 v števcu in KPK1 v imenovalcu.

S petdnevnimi poskusi smo tako preverjali, kakšen je vpliv teh brozg na proces in mikroorganizme, ki pri njem sodelujejo. S podaljšanim poskusom (30 dni) smo preverili ali ima uporabljena fermentacijska brozga morda dolgoročne učinke na proces in mikrobno združbo.

3.4 ANALIZE VZORCEV

Pri poskusih anaerobne razgradnje navedenih substratov smo vzorčili tako vsebino reaktorjev, kot tudi nastali bioplin. Vzorčili smo preko temu namenjenih ventilov na pilotni napravi. Vzorce vsebine smo odvzeli v steklene čaše, pri čemer smo prvi natočen volumen

zavrgli. Na ta način smo zmanjšali verjetnost, da bi na rezultate vplivali ostanki vsebine od prejšnjega vzorčenja v ceveh ali ventilih. Čaše smo prenesli v laboratorij in vzorce prelili v plastične epruvete Falcon. Te smo ustrezno označili in jih shranili do analize v zamrzovalniku ali hladilniku (odvisno od tega, koliko časa je bilo predvideno, da bo preteklo do analize). Za analizo kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) smo shranili okoli 10 ml, za analize mikrobne združbe pa vsaj 25 ml vsebine. Vsebino smo analizirali za vsebnost KMK s plinsko kromatografijo in sestavo mikrobne združbe z metodo TRFLP. Merili smo tudi vrednost pH. Pri plinu smo poleg kumulativne produkcije, ki smo jo spremljali avtomatsko na pilotnih reaktorjih, analizirali tudi odstotno sestavo plina s plinsko kromatografijo. Vzorce plina smo odvzeli v temu namenjene vzorčne vrečke Tedlar sampling bag, volumna 1 l (SKC, ZDA, kataloška številka: 232-01). Začetni tok plina smo spustili mimo vrečke, da smo izpihali zrak iz cevi, ki je pritrjena na ventil za vzorčenje, nato pa smo vrečke napolnili z manjšo količino plina. Ker je v reaktorjih relativno majhen volumen plina z dokaj nizkim nadtlakom, smo poskušali z vzorci odvzeti čim manj plina in tako čim manj vplivati na meritve kumulativne produkcije. Za analize smo potrebovali najmanj 200 µl bioplina. Vrečke smo ustrezno označili in jih shranili do analize pri sobni temperaturi.

3.4.1 Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK)

Vsebnost KMK smo preverjali v vzorcih vsebin reaktorjev s plinsko kromatografijo. Pred tem je bilo potrebno KMK iz vzorcev ekstrahirati z etrsko ekstrakcijo. To smo izvajali po postopku, ki ga je opisal Holdemann s sodelavci (1977). Da bi zmanjšali vpliv napak, smo za vsak vzorec ekstrakcijo izvedli v dveh paralelkah.

Po ekstrakciji smo izvedli analizo s plinskim kromatografom Shimadzu GC 14-A (Japonska) s plamensko-ionizacijskim detektorjem (Flame ionization detector - FID) in split-splitless injektorjem. Kisline so se ločile ob potovanju skozi kolono (fused silica capillary column DB-WAX), dolžine 30 m in premera 0,326 mm. Temperatura injektorja je znašala 160 °C, temperatura detektorja pa 210 °C. Temperaturni program je bil takšen, da je bila začetna temperatura kolone 90 °C in je takšna ostala 4 minute, nato pa se je začela zviševati s 15 °C na minuto do končne temperature 160 °C, katero je ohranila za 2 minuti. Pred analizo smo kromatograf kalibrirali z vbrizgom 1 µl kalibracijske raztopine, ki je vsebovala 0,105 g/l očetne, 0,099 g/l propionske, 0,095 g/l izo-maslene, 0,096 g/l maslene, 0,093 g/l izo-valerenske, 0,094 g/l valerenske in 0,093 g/l kapronske kisline. Rezultate smo vpisali v računalnik, nato pa za vsak vzorec izračunali povprečno vrednost in standardni odklon. Na koncu smo na podlagi rezultatov za vsak poskus izrisali grafikone, ki prikazuje dinamiko koncentracij KMK. Pri tem smo upoštevali le očetno, propionsko in masleno kislino, saj so se ostale pojavljale v zelo nizkih koncentracijah, ki so bile blizu meje detekcije. Zaradi tega so podatki pri ostalih kislinah manj zanesljivi kot pri omenjenih treh. Postopek plinsko-kromatografske analize KMK je povzet po Marinšek-Logar (1992).

3.4.2 Analiza sestave anaerobne mikrobne združbe

V opisanih poskusih nas je zanimalo, kako lahko različni substrati in dodatki vplivajo na sestavo mikrobne združbe v bioplinskem reaktorju.

Sestavo mikrobne združbe (bakterijske in arhejske) smo preverjali v vsebini kontrolnega in poskusnega bioreaktorja na začetku in na koncu vsakega poskusa. Pri podaljšanem poskusu z brozgo V, smo vzorce za sestavo mikrobne združbe jemali vsak drugi dan in se potem na podlagi rezultatov ostalih analiziranih parametrov na koncu odločili, v katerih časovnih točkah bomo vzorce mikrobne biomase analizirali z metodo TRFLP.

Gre za metodo ločevanja med različnimi mikrobnimi združbami na podlagi terminalno označenih koncev DNK, ki jih ob pomnoževanju z metodo PCR, na 5' koncu označimo s fluorokromom 6-FAM (6-karboksifluorescein). Pomnoževali in analizirali smo gene za 16S rRNA. Analiza se je začela s pripravo vzorcev, ki smo jih najprej centrifugirali pri 10000 x g za 10 minut. Supernatant smo previdno odlili, usedlino pa smo preko noči sušili v odprtih epruvetah Falcon v sušilniku pri 45 °C. Posušene vzorce smo nato zamrznili do izolacije DNK. Sledila je izolacija DNK s kompletom UltraClean Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio, ZDA, kataloška številka: 12800-50) po navodilih proizvajalca. Za izolacijo smo uporabili po 0,5 g posušenega vzorca vsebine reaktorja. Njeno uspešnost smo preverili z elektroforezo (oprema proizvajalca Bio-Rad, ZDA), tako da smo izolirano DNK nanесли na 0,8 % agarozni gel (*SeaKem®* LE agaroz, Lonza, ZDA, kataloška številka: 50005). Nato smo pri vsakem vzorcu posebej optimizirali njegovo koncentracijo v reakcijski mešanici za PCR. To smo naredili tako, da smo izolirano DNK pri vsakem vzorcu redčili 10 in 100 x (včasih tudi 5 x), nato pa izvedli PCR z uporabo teh redčitev in neredčene DNK. Za to smo uporabili PCR napravi MyCycler (Bio-Rad, ZDA) in Super Cycler Trinity (Kyrtec, Avstralija). Pri tem smo za pomnoževanje bakterijske DNK uporabljali začetna oligonukleotida FD1-FAM (Lane, 1991) in 926R (Watanabe *et al.*, 2001), za pomnoževanje arhejske DNK pa 109F-FAM (5'-ACNGCTCAGTAACRCGYR-3') (modificirano po Großkopf in sod., 1998) in 915R (DeLong, 1992). Polimeraza je bila običajno *Taq* polimeraza (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA), nekajkrat pa smo poskusili pomnožiti DNK tudi z *DreamTaq* polimerazo (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). Program za pomnoževanje bakterijske DNK se je začel s 5 minutami denaturacije pri 95 °C, nato pa je sledilo običajno 25 ciklov (pri vzorcih, ki so se slabo pomnoževali tudi več), ki so zajemali 30 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 55 °C in 1 minuto pri 72 °C, temu je pa sledil še zadnji korak podaljševanja verige – 10 minut pri 72 °C. Za arhejsko DNK je bil potreben nekoliko drugačen program: 5 minut pri 95 °C, nato pa 30 ciklov (pri vzorcih, ki so se slabo pomnoževali tudi več), ki so zajemali 30 sekund pri 95 °C, 45 sekund pri 52 °C in 1 minuta 30 sekund pri 72 °C, čemur je sledila še zadnja stopnja, ki je trajala 10 minut pri temperaturi 72 °C. Rezultate smo preverili z nanašanjem po 4 µl pomnožkov na 1 % agarozni gel (*SeaKem®* LE agaroz, Lonza, ZDA, kataloška številka: 50005) in elektroforezo. Pri tem smo preverjali, ali je sploh prišlo do pomnožkov in ali so ti primerne velikosti.

Redčitev, pri kateri je bilo pomnoževanje najuspešnejše, smo uporabili pri nadaljnjih PCR reakcijah. Tako smo vsak vzorec pomnožili še vsaj 4 x, nato pa vsebine vseh mikrocentrifugirk posameznega vzorca združili in očistili s kompletom High Pure PCR Product purification kit (Roche, Švica, kataloška številka: 11732676001). Pri tem smo

upoštevali navodila proizvajalca, ki smo jih za zagotovitev višje koncentracije DNK priredili tako, da v zadnji fazi namesto 50 µl, odpipetiramo 30 µl elucijskega pufra.

Po čiščenju je bilo potrebno izvesti še eno elektroforezo na 1 % agaroznem gelu, pri kateri smo nanegli po 3 µl vzorcev in lestvice. Koncentracijo pomnožene DNK za restrikcijske mešanice smo določili s programom Gene Tools (Syngene, Velika Britanija). Program delež pomnožka v posamičnih pasovih preračuna na osnovi primerjave intenzitete sevanja pomnožkov na sliki gelske elektroforeze s standardom znane koncentracije DNK (1 kb DNK lestvica) (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA).

Pomnožke smo cepili z restrikcijsko endonukleazo *BsuRI*, (prepoznavno zaporedje 5' GG↓CC 3') (Fermentas, Thermo Fischer Scientific, ZDA). Restrikcijsko endonukleazo smo izbrali na podlagi predhodnih izkušenj. Pred pripravo reakcijske mešanice, smo pomnožke vsakega vzorca primerno redčili (izračunano na podlagi prej omenjene kvantifikacije), tako da smo restrikcijo vedno izvedli na okoli 200 ng pomnožka. S tem smo zagotovili, da ni prišlo do pojava premočnega signala na detektorju med kapilarno elektroforezo. Restrikcija je potekala prekonočno pri 37 °C, nato pa smo encime deaktivirali z izpostavitvijo 80 °C za 20 minut. Cepljene odseke smo ponovno očistiti s kompletom High Pure PCR Product purification kit (Roche, Švica, kataloška številka: 11732676001).

Za analizo TRFLP smo v mikrotitrsko ploščo odpipetirali po 5 µl tako obdelanih pomnožkov skupaj z reakcijsko mešanico, ki je vsebovala 9 µl formamida in 0,5 µl označevalca velikosti GeneScan™ -500 ROX™ (Life Technologies, ZDA). Označevalec velikosti smo uporabili kot interni standard za natančno primerjavo variabilnosti dolžine fragmentov. Pred analizo smo vzorce denaturirali pri 95 °C za 5 minut in jih nato ohladili na ledu za 5 minut. Alikvote vzorcev smo analizirali s kapilarno elektroforezo 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., ZDA).

Rezultate smo obdelali s programom Bio Numerics 5.1 (Applied Maths, Belgija). Vzorce fragmentov smo med seboj poravnali in na podlagi pridobljenih rezultatov izrisali dendrograme, ki izkazujejo podobnosti v mikrobnih združbah med vzorci. V nekaterih primerih je prevelika ali premajhna količina pomnožka onemogočala natančno analizo, zato smo kapilarno elektroforezo ponovili z ustrezno količino pomnožka.

3.4.3 Sestava bioplina

S plinsko kromatografijo smo spremljali tudi odstotno sestavo proizvedenega bioplina po metodi, ki jo je opisala Marinšek-Logar (1992). Vzorce smo jemali ob koncu vsakega poskusa; pri eni od treh ponovitev pa smo jih jemali tudi vsak drugi dan. Vzorčili smo v plinotesne vrečke Tedlar sampling bag, volumna 1 l (SKC, ZDA, kataloška številka: 232-01), preko ventila za vzorčenje plina na pilotni napravi.

Tako pripravljene vzorce smo analizirali s plinskim kromatografom Shimadzu GC-14A (Japonska) z detektorjem toplotne prevodnosti (TCD). Kot nosilni plin nam je služil helij, plini so se pa ločili s prehajanjem skozi 4 m dolgo jekleno kolono, premera 6 mm, ki je vsebovala Porapak Q. Temperatura injektorja je znašala 50°C, temperatura kolone 30 °C, temperatura detektorja pa 80 °C. Analiza je potekala izotermalno. Pred samo analizo je

bilo potrebno kromatograf kalibrirati s kalibracijsko plinsko mešanico, ki je vsebovala znane koncentracije vodika (15,3 %), dušika (19,9 %), metana (20,3 %) in ogljikovega dioksida (44,5 %). Rezultate smo vnesli v računalnik in na podlagi njih izrisali grafikone. Dejansko smo spremljali le razmerje med metanom in ogljikovim dioksidom, vsebnost ostalih sestavin pa smo zanemarili. Te se sicer v bioplinu pojavljajo v zelo majhnih deležih (do 0,5 % H_2S ; do 0,5 % NH_3 , do 5 % vodne pare in do 5 % N_2), saj večji del volumna sestavljata prav metan in ogljikov dioksid (Deublein in Steinhauser, 2008). Meritev smo izvajali tako, da smo vsak vzorec plina vbrizgali po dvakrat, s čimer smo zagotovili večjo zanesljivost rezultatov z zmanjšanjem vplivov posameznega vbrizgavanja na njih. Po pridobitvi rezultatov smo na podlagi njih izrisali grafikone sestave bioplina.

3.4.4 Merjenje kemijske potrebe po kisiku (KPK) v substratu

Preden lahko izračunamo koliko substrata potrebujemo za določeno obremenitev anaerobnega bioreaktorja (enačbe 1, 2 in 3), je potrebno pridobiti podatek o kemijski potrebi po kisiku (KPK) substrata. To smo izmerili z metodo, ki temelji na spektrofotometričnem merjenju spremembe barve reagenta (kalijev dikromat), ki se zgodi ob oksidaciji vzorca. Uporabljali smo kivetni test LCK 114 (Hach Lange, Nemčija) in spektrofotometer DR 3900 (Hach Lange, Nemčija). Analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca.

3.4.5 Merjenje organske snovi

Pri izračunu potrebne količine dodanega substrata za doseganje želene obremenitve reaktorja potrebujemo tudi podatek o vsebnosti organske snovi inokuluma (enačbe 1, 2 in 3). Do njega smo prišli tako, da smo najprej izmerili količino suhe snovi, za tem pa še anorganske snovi inokuluma. Postopek njune pridobitve temelji na segrevanju vzorca pri različnih temperaturah. Najprej smo odvzeli vzorec inokuluma iz industrijskega CSTR reaktorja na CCN in ga odpipetirali v keramični žarilni lonček. Nato smo ga dali v sušilnik SP-45 C (Kambič, Slovenija) ter nastavili temperaturo sušenja na 105 °C. Po 500 minutah, smo vzorec stehali in tako dobili maso suhe snovi. Žarilni lonček z vzorcem smo nato predstavili v žarilno peč B180 (Nabertherm, Nemčija) in žarili 3 ure pri 600 °C. Ob tem so se organske snovi oksidirale do ogljikovega dioksida in vode, v lončku pa je ostala le anorganska snov, oziroma pepel, katerega smo ponovno stehali. Organsko snov smo izračunali iz razlike v masi suhe in anorganske snovi (Standard methods..., 2005).

3.4.6 Meritve pH

Eden izmed parametrov, ki smo ga spremljali tekom vsakega poskusa je bil tudi pH v reaktorju. Ta se je meril ob zagonu in koncu vsakega poskusa, pri podaljšanem poskusu pa vsak drugi dan. Meritve smo izvajali z gelsko elektrodo SensoLyt SE in pH metrom inoLab pH 730 (WTW, Nemčija). Merilno elektrodo smo pomočili v vzorec vsebine reaktorja in počakali, da se vrednost ustali.

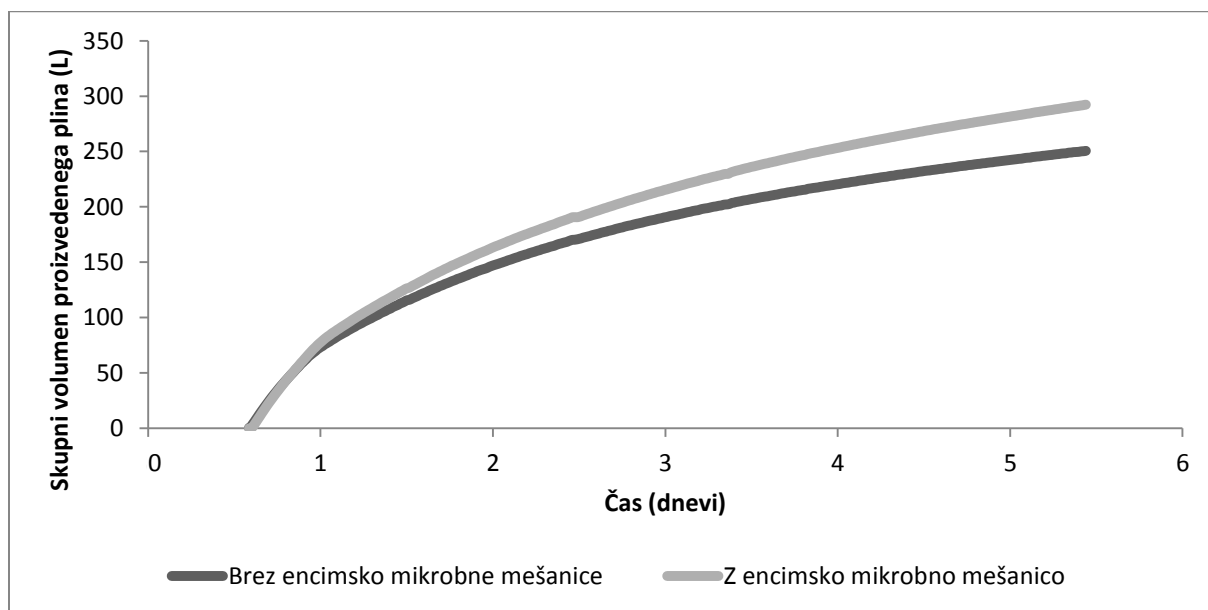
4 REZULTATI

4.1 VPLIV DODANE ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE B120 (BIO-SYSTEMS) NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU

V tej seriji poskusov imamo 3 takšne, ki so bili do konca pravilno izpeljani.

4.1.1 Vpliv dodane encimsko mikrobn mešanice na kumulativno produkcijo bioplina

Dodana encimsko mikrobn mešanica je za minimalno 1 % in maksimalno 17 % povečala kumulativno produkcijo bioplina (Slika 5 in Prilogi A1, A2). Le ena ponovitev poskusa je dala relativno visoko stopnjo izboljšanja (17 %), ostali dve pa obe manj kot 2 %.

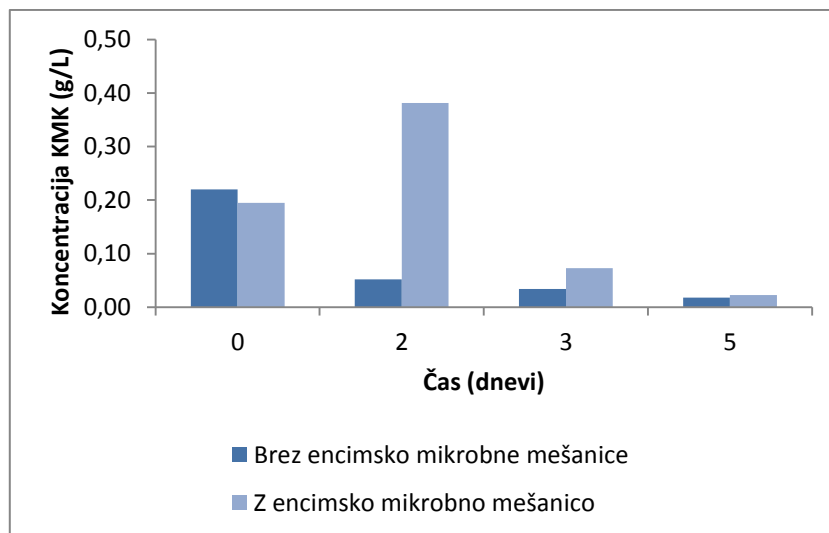


Slika 5: Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobn mešanico. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi A.

4.1.2 Vpliv dodane encimsko mikrobn mešanice na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorju

Dinamika spreminjanja vsebnosti KMK je bila v poskusnem reaktorju drugačna kot v kontrolnem (Slika 6, Prilogi A3, A4). V primeru, ko smo v reaktorje dodajali encimsko mikrobn mešanico, je skupna koncentracija KMK narastla po dveh ali treh dneh od začetka poskusa in za tem v enem dnevu zelo hitro upadla. V kontrolnem reaktorju, kamor nismo dodali encimsko mikrobn mešanice, so bile koncentracije KMK najvišje ob začetku poskusa, potem pa so hitro upadle do precej nizkih vrednosti. Zaradi tega je tako po dveh

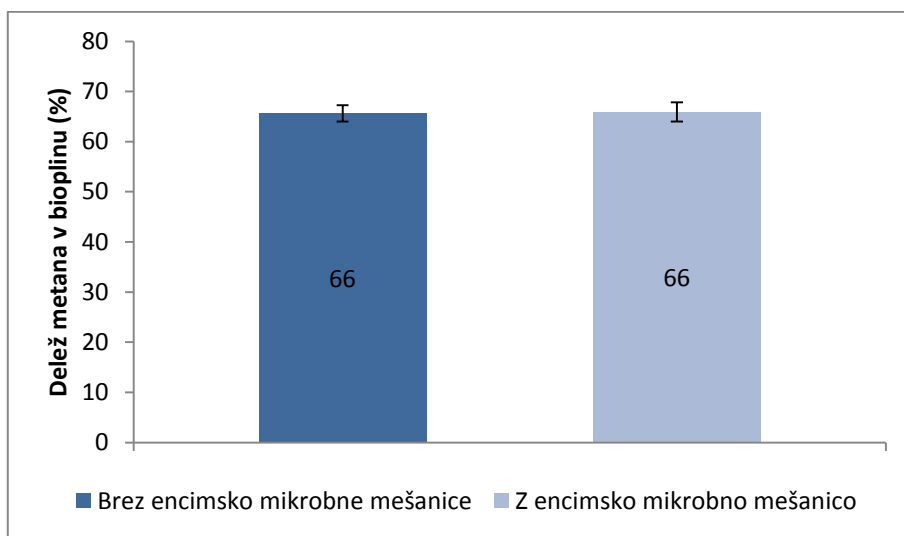
ali treh dneh poskusa prišlo do zelo velikih razlik (tudi do 100 x višje koncentracije v reaktorju z dodano encimsko mikrobn mešanico) v koncentracijah KMK v reaktorjih. Koncentracije KMK so se sicer med ponovitvami poskusov razlikovale tako med reaktorji z dodano encimsko mikrobn mešanico, kot med kontrolnimi reaktorji. Še najbolj je izstopala prva ponovitev poskusa, kjer so bile koncentracije KMK ob zagonu približno za polovico nižje kot pri ostalih dveh ponovitvah, naraščanje koncentracij v kasnejših dneh v reaktorju z dodano encimsko mikrobn mešanico pa tudi ni bilo tako izrazito kot v ostalih dveh primerih, vendar je bil trend vedno isti.



Slika 6: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobn mešanico. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi A.

4.1.3 Vpliv dodane encimsko mikrobn mešanice na sestavo bioplina

Dodatek encimsko mikrobn mešanice ni imel vpliva na sestavo bioplina (Slika 7). Vsebnost metana se je v obeh reaktorjih na koncu poskusov gibala med 64,5 % in 67 %, s tem da so si bile vrednosti med reaktorjema znotraj posamezne ponovitve poskusa bližje kot vrednosti med različnimi ponovitvami.

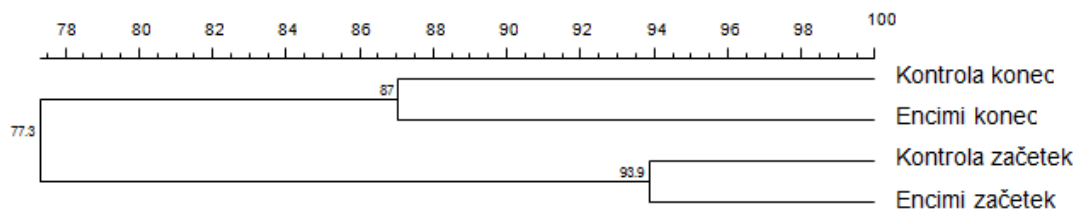


Slika 7: Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico. Prikazano je povprečje vseh rezultatov. Številke v stolpcih so zaokrožene povprečne vrednosti.

4.1.4 Vpliv dodane encimsko mikrobne mešanice na sestavo mikrobne združbe

Primerjava sestave bakterijske združbe:

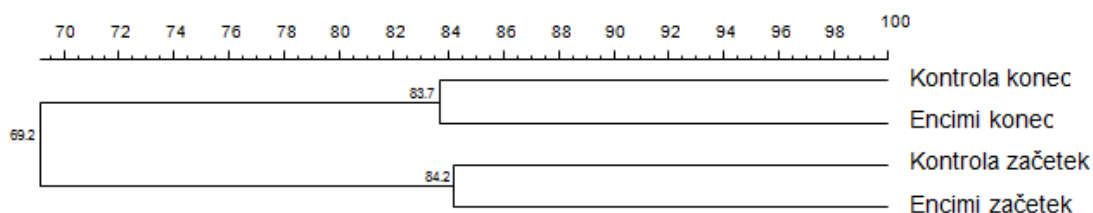
V bioplinskem reaktorju, v katerega smo dodali encimsko mikrobno mešanico, se je bakterijska združba po profilu TRFLP med poskusom spremenila za 32 ± 15 % (Slika 8 in Prilogi A5, A6). To je podobna sprememba kot tista, do katere je v tem času prišlo v kontrolnem reaktorju (ta je znašala v povprečju okoli 20 ± 13 %). Povprečna končna razlika med reaktorjem v katerega smo in tistim v katerega nismo dodali encimsko mikrobne mešanice je znašala okoli 12 ± 9 %, začetna razlika pa je znašala 6 ± 2 %. Rezultati metode TRFLP kažejo na to, da se bakterijska združba v bioplinskem reaktorju pod vplivom encimsko mikrobne mešanice ni statistično značilno spremenila, je pa nakazan trend manjših sprememb v sestavi bakterijske združbe, ki ga je povzročil dodatek encimov in mikroorganizmov.



Slika 8: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so v Prilogi A. Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

V reaktorju, v katerega smo dodali encimsko mikrobno mešanico, se je arhejska združba tekom poskusa spremenila za 29 ± 7 %, kar je podobno kot v kontrolnem reaktorju (23 ± 12 %) (Slika 9 in Prilogi A7, A8). Na koncu poskusov je povprečna razlika med reaktorjem z dodano encimsko mikrobno mešanico in kontrolnim reaktorjem, znašala okoli 13 ± 3 %, razlika med reaktorjema na začetku poskusov pa je znašala 11 ± 4 %. Končni rezultati analize TRFLP kažejo, da se tudi arhejska mikrobna združba pod vplivom encimsko mikrobne mešanice ni statistično značilno spremenila.



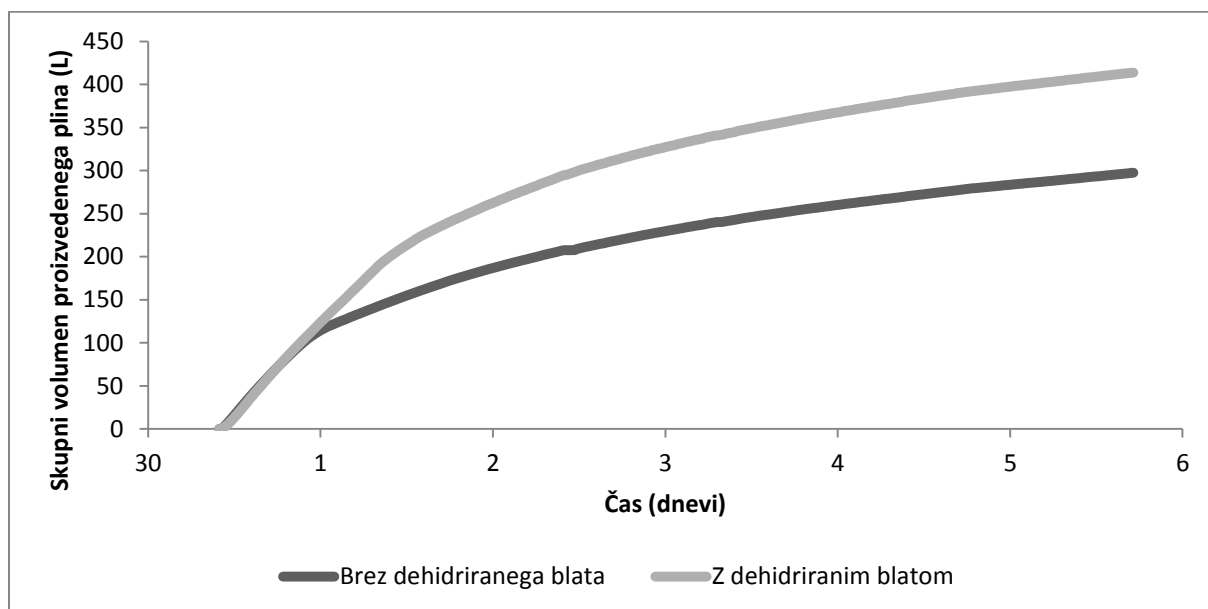
Slika 9: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi A. Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

4.2 VPLIV VRAČANJA DEHIDRIRANEGA BLATA NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN NA SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU

V tej skupini poskusov smo uspeli pravilno do konca izpeljati le 2 ponovitvi poskusov.

4.2.1 Vpliv vračanja dehidriranega blata na kumulativno produkcijo bioplina

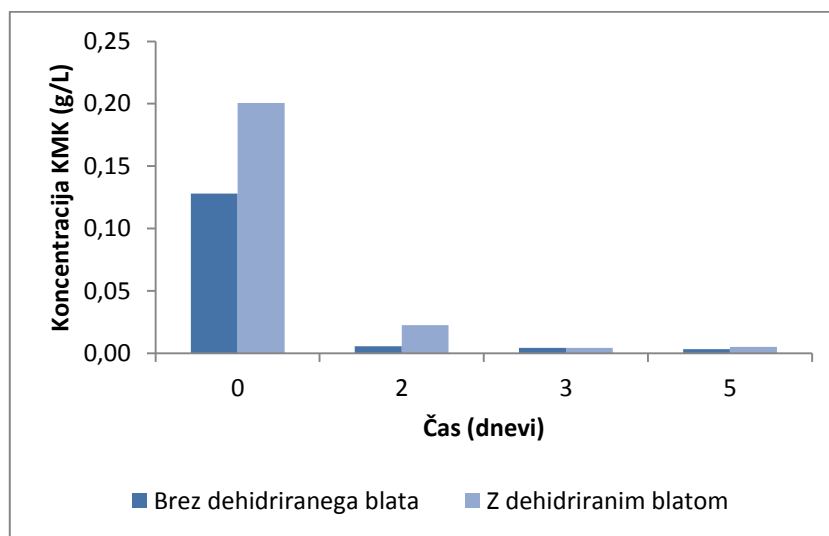
Vračanje dehidriranega blata v bioplinski reaktor je povzročilo od 35 % do 40 % povečanje produkcije bioplina (Slika 10 in Priloga B1). Začetnih nekaj ur sta bili produkciji v obeh reaktorjih približno enaki, kasneje pa so se razlike povečale. Opazimo lahko tudi, da je linearna stopnja produkcije bioplina, ki se dogaja v logaritemski fazi rasti mikroorganizmov, v reaktorju z dodanim dehidriranim blatom, trajala dlje kot v kontrolnem reaktorju.



Slika 10: Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitve), rezultati druge ponovitve so prikazani v Prilogi B.

4.2.2 Vpliv vračanja dehidriranega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin v bioreaktorju

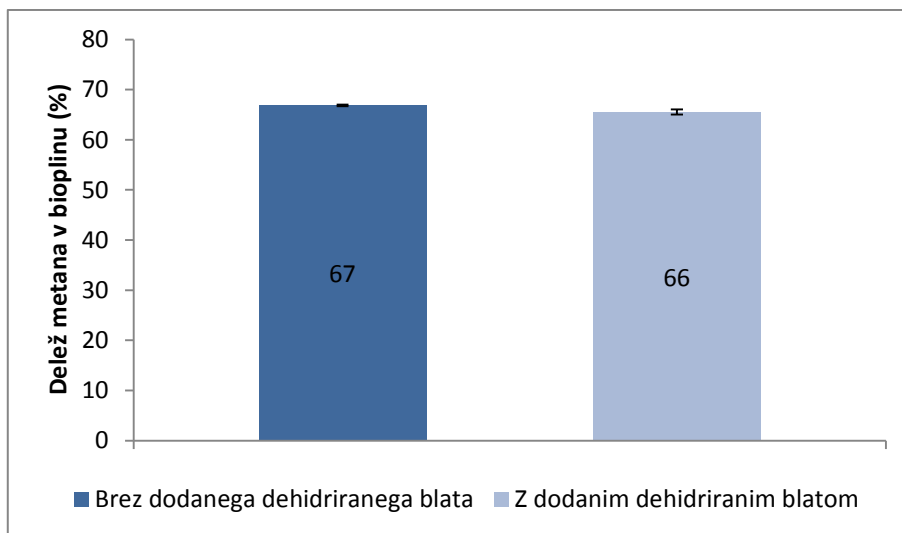
Vsebnost KMK v obeh primerih se zmanjšuje od začetka proti koncu poskusa (Slika 11 in Priloga B2). Največje zmanjšanje je opaženo do konca drugega dne poskusa. Na začetku poskusa so bile koncentracije KMK v reaktorju z dodanim dehidriranim blatom skoraj dvakrat višje kot v kontrolnem reaktorju, po dveh dneh skoraj štiri krat višje, šele po treh dneh pa oboje padejo na podobne vrednosti. Tudi tukaj so se vrednosti izenačile po treh dneh obratovanja. V vseh primerih so bile izmerjene koncentracije KMK v običajnih mejah za normalno delovanje bioplinskega procesa in v nobenem primeru niso presegle vrednosti 0,25 g/l.



Slika 11: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom (2. ponovitev). Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa, rezultati druge ponovitve so prikazani v Prilogi B.

4.2.3 Vpliv vračanja dehidriranega blata na sestavo bioplina

Dodatek dehidriranega blata ni vplival na vsebnost metana v bioplinu (Slika 12). Odstotni delež metana se je v vseh primerih gibal med 65 % in 67 %.

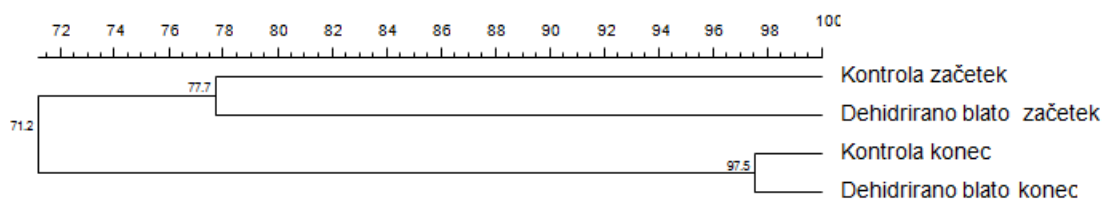


Slika 12: Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom. Prikazano je povprečje vseh rezultatov. Številke v stolpcih so zaokrožene povprečne vrednosti.

4.2.4 Vpliv vračanja dehidriranega blata na sestavo mikrobne združbe

Primerjava sestave bakterijske združbe:

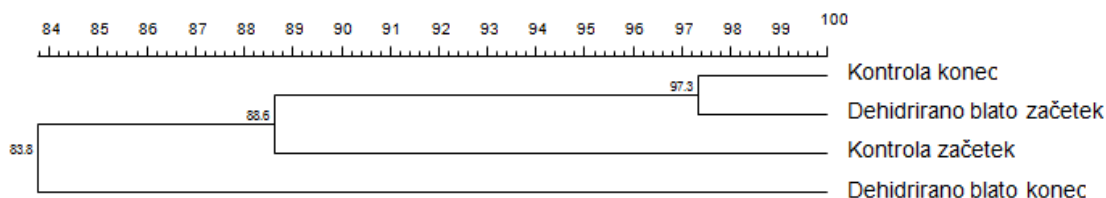
V mikrobni biomasi bioplinskega reaktorja, v katerega smo dodali dehidrirano blato, smo med začetnim in končnim stanjem z metodo TRFLP dokazali v povprečju 36 ± 7 % razlik v sestavi bakterijske združbe, kar je nekoliko večja sprememba kot pri kontrolnem reaktorju, v katerem je ta razlika znašala 21 ± 7 % (Slika 13 in Priloga B3). Kljub temu končna razlika med reaktorjema v povprečju ni bila večja kot 3 ± 0 % in ni statistično značilna. Na začetku je bila razlika med reaktorjema precej večja, saj je znašala 26 ± 5 %.



Slika 13: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi B. Oznaka »dehidrirano blato« označuje reaktor, v katerega je bilo to dodano, oznaka »kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega dehidrirano blato ni bilo dodano. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

V bioplinskem reaktorju z dodanim dehidriranim blatom, se je arhejska združba med poskusom v povprečju spremenila za 21 ± 3 %, v kontrolnem reaktorju, kamor dehidriranega blata nismo dodali, pa je znašala 15 ± 6 % (Slika 14 in Priloga B4). Končna razlika med reaktorjem, v katerega smo dodajali dehidrirano blato in kontrolnim, v katerega tega nismo dodajali, je v povprečju znašala le okoli 2 ± 1 %, med tem ko je na začetku znašala 10 ± 4 %. S TRFLP analizo nismo dokazali, da bi dodano dehidrirano blato statistično značilno vplivalo na spremembo sestave arhejske združbe.



Slika 14: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi B. Oznaka »dehidrirano blato« označuje reaktor, v katerega je bilo to dodano, oznaka »kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega dehidrirano blato ni bilo dodano. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

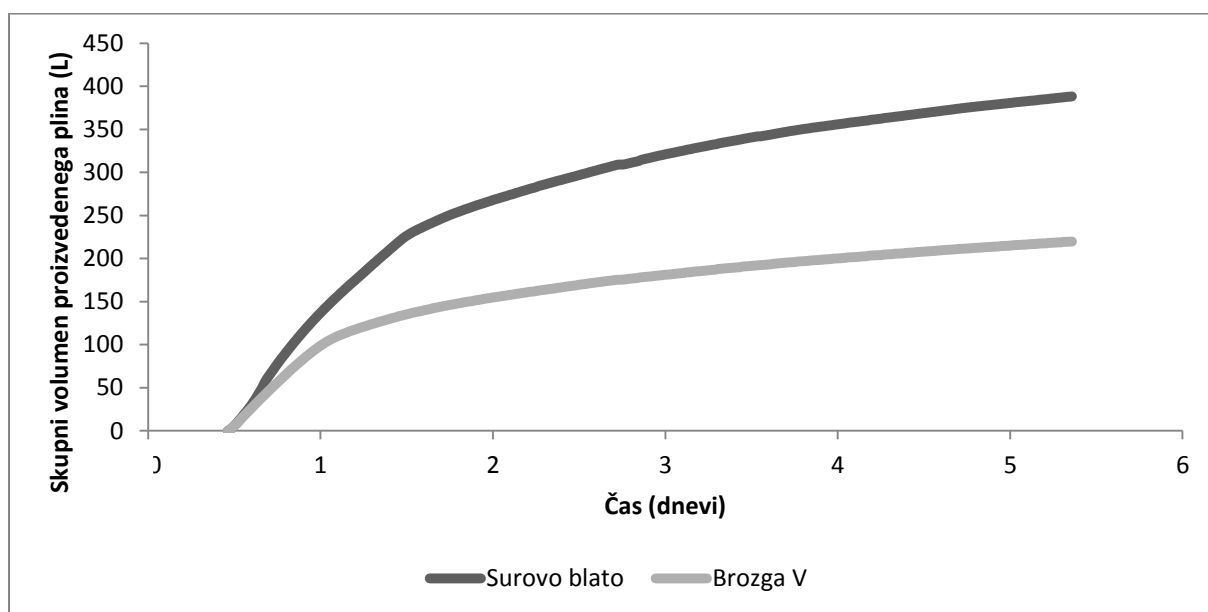
4.3 PROIZVODNJA BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE

4.3.1 Proizvodnja bioplina iz odpadne fermentacijske brozge V iz farmacevtske industrije in njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju

Z brozgo V smo opravili več različnih poskusov. Najprej smo preverjali, kakšen vpliv ima na mikrobno biomaso sama brozga kot substrat. V tem primeru smo izvedli tri popolne ponovitve poskusa

4.3.1.1 Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom

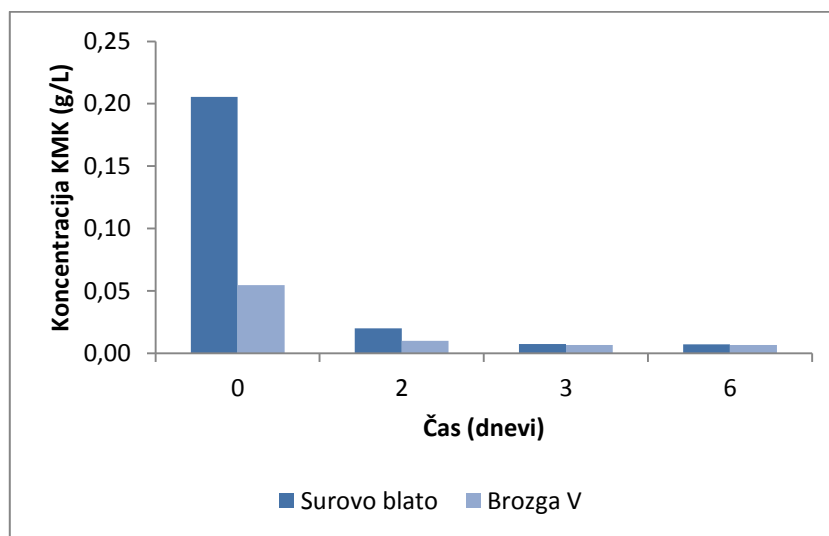
Ko smo kot substrat za produkcijo bioplina uporabljali brozgo V, je bila kumulativna produkcija bioplina pri enakih obremenitvah s KPK od 18 % do 43 % manjša kot v reaktorju, kjer smo kot substrat uporabili surovo blato (Slika 15 in Prilogi C1, C2).



Slika 15: Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (3. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi C.

4.3.1.2 Vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin pri anaerobni razgradnji brozge V v primerjavi s surovim blatom

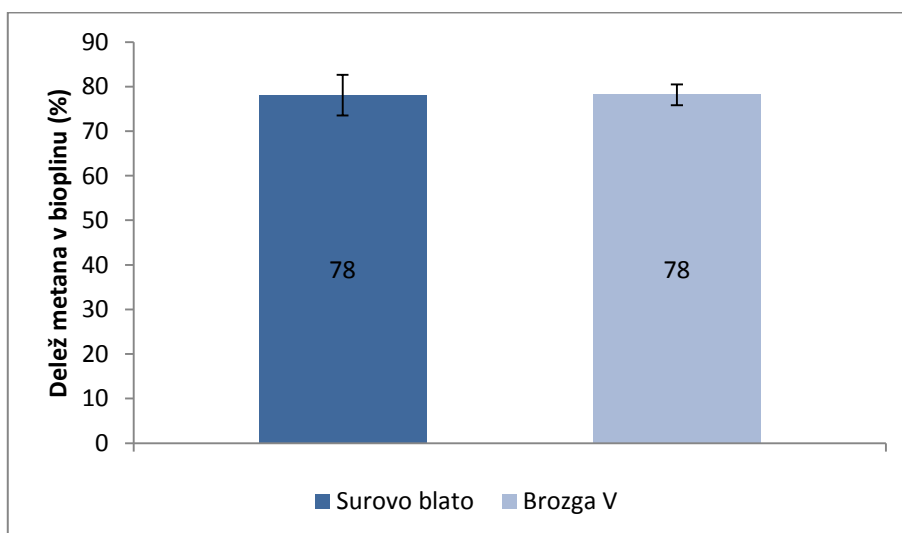
Pri anaerobni razgradnji brozge V in surovega blata je bila najvišja koncentracija KMK na začetku poskusov in je nato hitro upadla – najbolj v prvih dveh dnevih (Slika 16 in Prilogi C3, C4). Med ponovitvami poskusa se je vsebnost KMK razlikovala predvsem v reaktorjih s surovim blatom, pri brozgi V pa je ostajala dokaj konstantna. Vse izmerjene skupne koncentracije KMK so bile majhne in niso presegle vrednosti 0,2 g/L, kar je znotraj meja za normalno delovanje bioplinskih reaktorjev.



Slika 16: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi C.

4.3.1.3 Odstotna sestava bioplina, proizvedenega iz brozge V in iz surovega blata

Uporaba brozge V ni imela vpliva na sestavo proizvedenega bioplina (Slika 17). Vsebnost metana v reaktorjih se je pri tej seriji poskusov gibala med 73 % in 82 %, pri čemer so bile razlike med reaktorjema znotraj posamezne ponovitve poskusa precej manjše od razlik med različnimi ponovitvami.

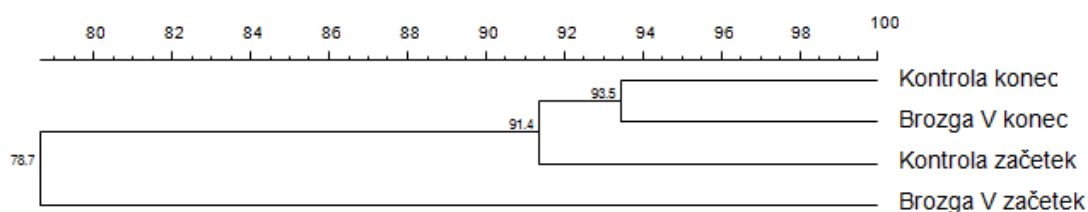


Slika 17: Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz brozge V v primerjavi s surovim blatom. Prikazano je povprečje vseh rezultatov. Številke v stolpcih so zaokrožene povprečne vrednosti.

4.3.1.4 Vpliv brozge V na sestavo mikrobne združbe v primerjavi s surovim blatom

Primerjava sestave bakterijske združbe:

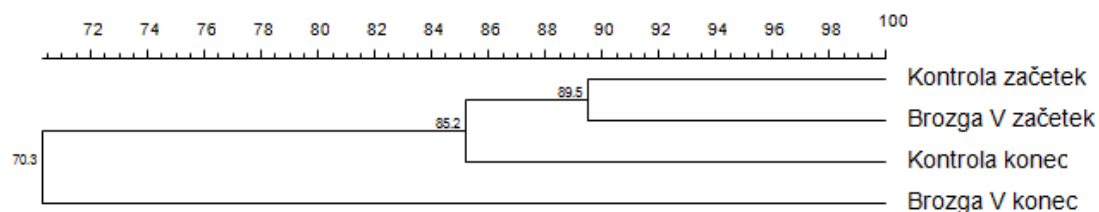
V reaktorju, kjer smo kot substrat uporabili brozgo V, se je sestava bakterijske združbe na koncu poskusa razlikovala od začetnega stanja za 12 ± 6 % (Slika 18 in Prilogi C5, C6). Ta razlika je podobna tisti, ki se je zgodila v kontrolnem reaktorju, ki je kot substrat vseboval surovo blato (9 ± 3 %). Zanimivo je, da je bila med obema reaktorjema ob zagonih poskusa relativno velika razlika v sestavi bakterijske združbe, saj je znašala 24 ± 3 %, proti koncu poskusa pa se je zmanjšala na 10 ± 6 %. Analiza TRFLP je pokazala, da brozga V ni povzročila statistično značilnih sprememb v sestavi bakterijske združbe.



Slika 18: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (3. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi C. Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

V reaktorju, kjer smo kot substrat uporabili brozgo V, se je sestava arhejske združbe na koncu poskusa razlikovala od začetnega stanja za 27 ± 15 % (Slika 19 in Prilogi C7, C8). V istem obdobju je v kontrolnem reaktorju prišlo do 15 ± 10 % razlike. Na koncu poskusa je razlika med tem reaktorjem in kontrolnim, ki je kot substrat vseboval surovo blato, znašala 20 ± 16 %, na začetku pa 10 ± 7 %. Analiza TRFLP je pokazala trend vpliva brozge V na sestavo arhejske združbe v bioreaktorju, vendar zaradi prevelikih standardnih odklonov rezultatov, ne moremo z gotovostjo trditi, da je do večjih sprememb zares prišlo.



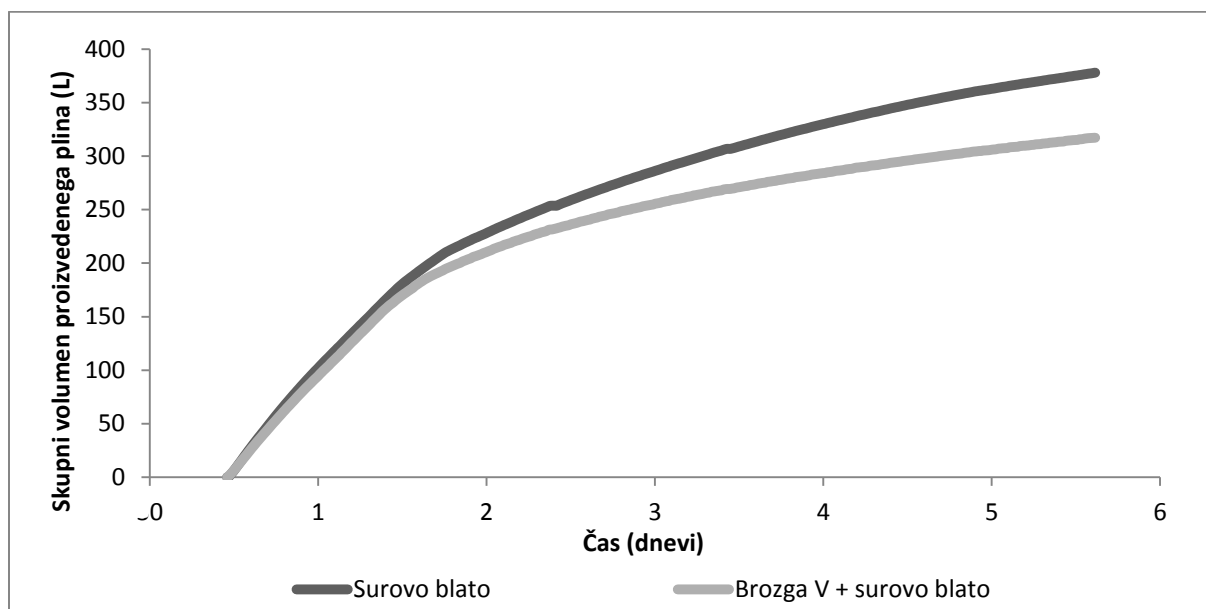
Slika 19: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (3. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi C. Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem je ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

4.3.2 Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe

V tej seriji poskusov smo kot substrat kombinirali brozgo V in surovo blato v razmerju KPK obremenitve 1:1. Pri tem poskusu sta bili uspešno izpeljani dve ponovitvi.

4.3.2.1 Kumulativna produkcija bioplina iz mešanice brozge v in surovega blata v primerjavi z le surovim blatom

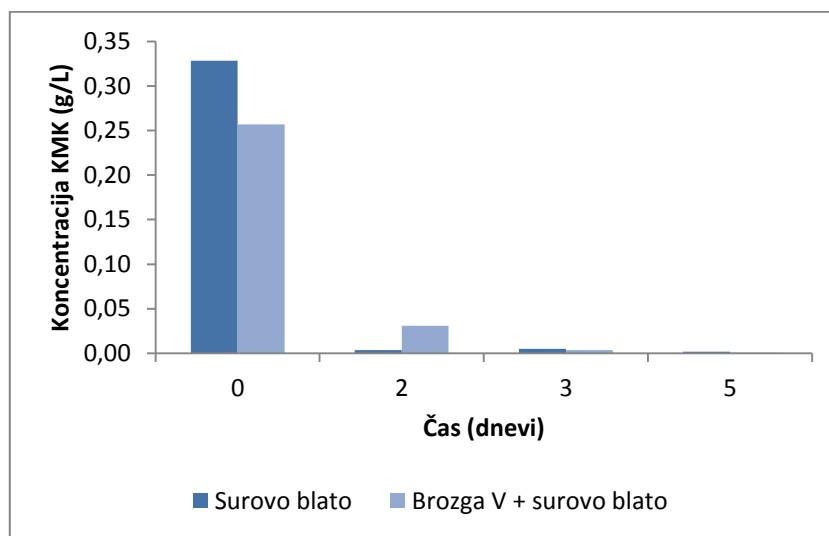
Na koncu poskusa je bila v eksperimentalnem reaktorju, kjer je bila kot substrat prisotna kombinacija brozge V in surovega blata, od 14 % do 16 % manjša produkcija bioplina v primerjavi s kontrolnim reaktorjem, ki je vseboval le surovo blato (Slika 20 in Prilogi D1, D2).



Slika 20: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega eksperimenta (1. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi D.

4.3.2.2 Vpliv mešanice brozge V in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin

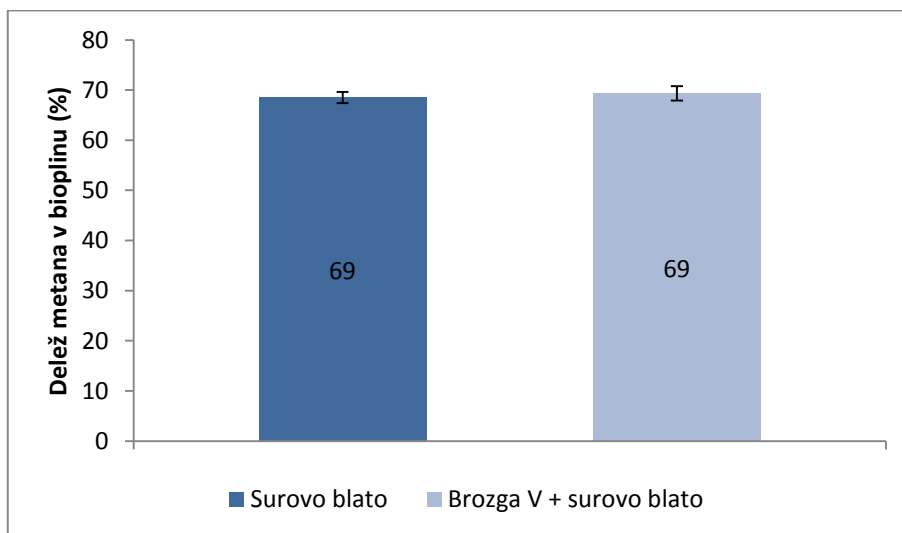
Dinamika spreminjanja koncentracij KMK je bila v obeh reaktorjih približno enaka (Slika 21 in Priloga D3). Opazili smo klasični potek spreminjanja koncentracij KMK, pri katerem, v vzorcu, odvzetem ob zagonu opazimo najvišje vrednosti KMK, že po dveh dneh pa te precej padejo in ostanejo nizke do konca poskusa. Sicer je bila skupna koncentracija KMK v kontrolnem reaktorju na začetku poskusa do 20 % višja kot v reaktorju, ki je kot substrat vseboval kombinacijo surovega blata in brozge V. Koncentracije KMK v nobenem primeru niso presegle 0,35 g/l.



Slika 21: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi D.

4.3.2.3 Odstotna sestava bioplina pri njegovi proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom

Brozga V v kombinaciji s surovim blatom kot substrat ni pomembneje vplivala na vsebnost metana v bioplinu (Slika 22). Ta se je pri tej seriji poskusov gibala med 67 % in 71 %, pri čemer je med ponovitvami poskusa prihajalo do večjih razlik kot med reaktorjema znotraj posamezne ponovitve.

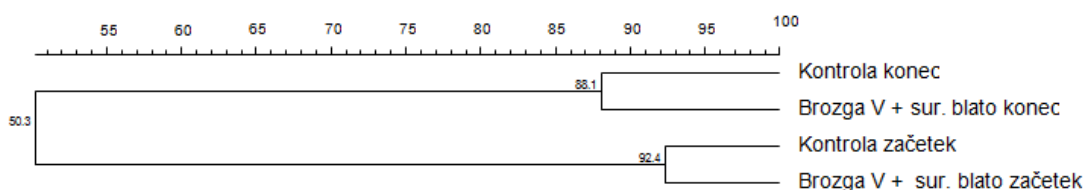


Slika 22: Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazano je povprečje vseh rezultatov. Številke v stolpcih so zaokrožene povprečne vrednosti.

4.3.2.4 Vpliv mešanice brozge V in surovega blata na sestavo mikrobne združbe

Primerjava sestave bakterijske združbe:

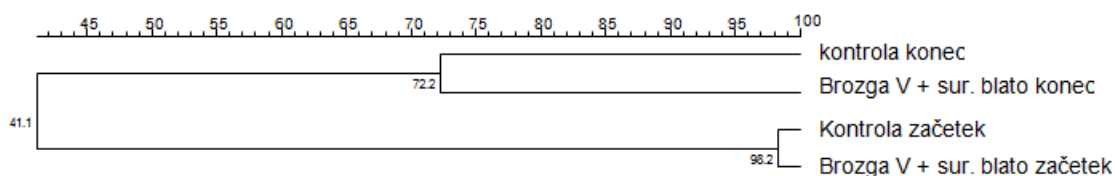
V reaktorju, kjer smo kot substrat uporabili kombinacijo brozge V in surovega blata, se je sestava bakterijske združbe na koncu poskusa razlikovala od začetnega stanja za 58 ± 5 % (Slika 23 in Prilogi D4, D5). Ta sprememba je le rahlo večja od tiste, ki se je zgodila v kontrolnem reaktorju (substrat je le surovo blato) in je znašala 38 ± 2 %. Na koncu poskusa, po pretečenih 5 dneh, je bila razlika v sestavi bakterijske združbe med reaktorjema relativno majhna, saj je v povprečju znašala le okoli 11 ± 2 %. Ta vrednost se ne razlikuje bistveno od povprečja razlik v bakterijski združbi ob začetku poskusov, ki je znašala 11 ± 5 %. Analiza TRFLP je dokazala, da dodatek brozge V k surovemu blatu v razmerju 1:1 ni povzročil statistično značilnih sprememb v sestavi bakterijske združbe.



Slika 23: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (3. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi D. Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem sta nam kot substrat služila brozga V in surovo blato, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

Rezultati analiz arhejske DNK z metodo TFLP so se izkazali za zelo variabilne med različnimi ponovitvami poskusov (Slika 24 in Prilogi D6, D7). Vpliv uporabljene kombinacije surovega blata in brozge V se je tako pokazal kot povprečna razlika 29 ± 16 % v sestavi arhejske združbe med začetkom in koncem poskusa. Podobne vrednosti smo zaznali tudi v kontrolnem reaktorju, kjer je ta razlika v povprečju znašala 62 ± 21 %. Na koncu poskusov je bila razlika med reaktorjema v povprečju 40 ± 17 %. Začetna razlika med reaktorjema je znašala povprečno 17 ± 21 %. Ponovno je analiza TRFLP pokazala trend vpliva brozge V na sestavo arhejske združbe v bioreaktorju, vendar zaradi prevelikih standardnih odklonov rezultatov, ne moremo z gotovostjo trditi, da je do večjih sprememb zares prišlo.



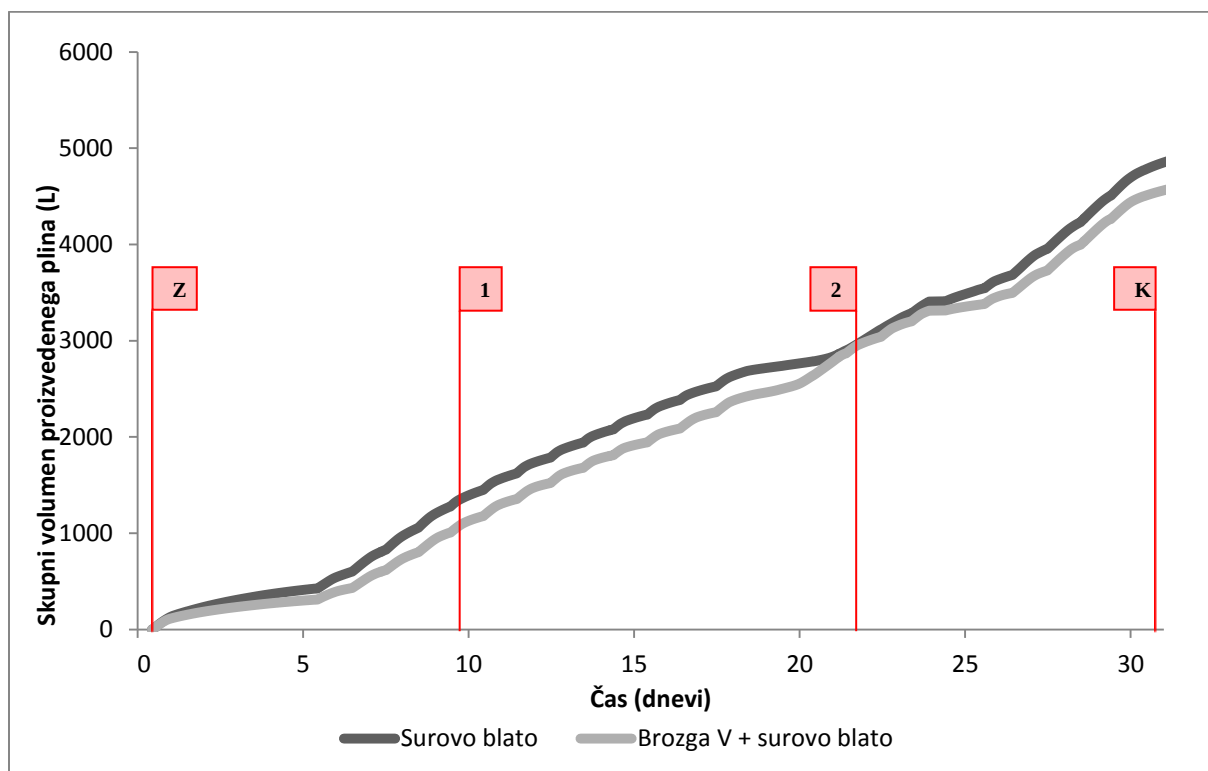
Slika 24: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi D. Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge V in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

4.3.3 Dalj časa trajajoča proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v reaktorju

Ta poskus smo izvedli le enkrat, njegov namen pa je bil preveriti, kakšen vpliv ima dolgoročna uporaba brozge V kot dodatnega substrata v bioplinskem reaktorju na proces proizvodnje bioplina in na sestavo mikrobne združbe. Poskus je trajal 30 dni, kot substrat pa smo ponovno uporabili kombinacijo brozge V in surovega blata v razmerju KPK 1:1.

4.3.3.1 Kumulativna produkcija bioplina pri njegovi dalj časa trajajoči proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom

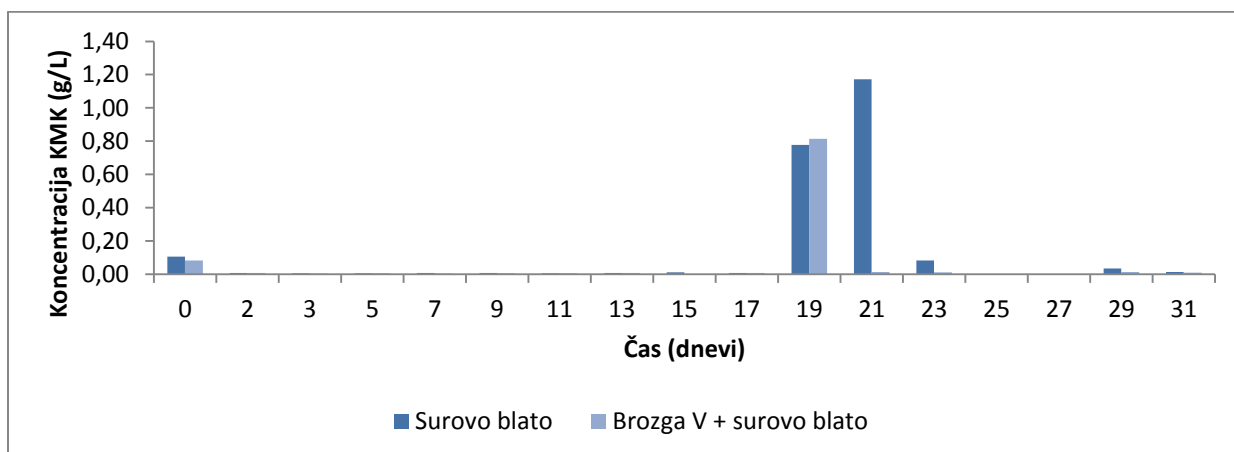
Pri tem poskusu se je v eksperimentalnem reaktorju, kjer smo kot substrat uporabljali kombinacijo surovega blata in brozge V, proizvedlo okoli 6 % manj bioplina kot v kontrolnem reaktorju, kjer je kot substrat služilo le surovo blato (Slika 25). Krivulji kumulativne proizvodnje bioplina imata podoben trend in zelo podoben naklon. Petnajsti dan po zagonu poskusa smo zaznali padec pH v obeh reaktorjih iz pH=7,0-7,2 na pH=6,8-6,9.



Slika 25: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja. Rdeče črte označujejo dneve vzorčenja vsebine za analize mikrobne združbe z metodo TRFLP (Z – začetek poskusa, 1 – obdobje linearne produkcije bioplina, 2 – obdobje po ponovni vzpostavitvi normalnega pH, K – konec poskusa). Prikazani so rezultati edine ponovitve poskusa.

4.3.3.2 Vpliv daljše proizvodnje bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin

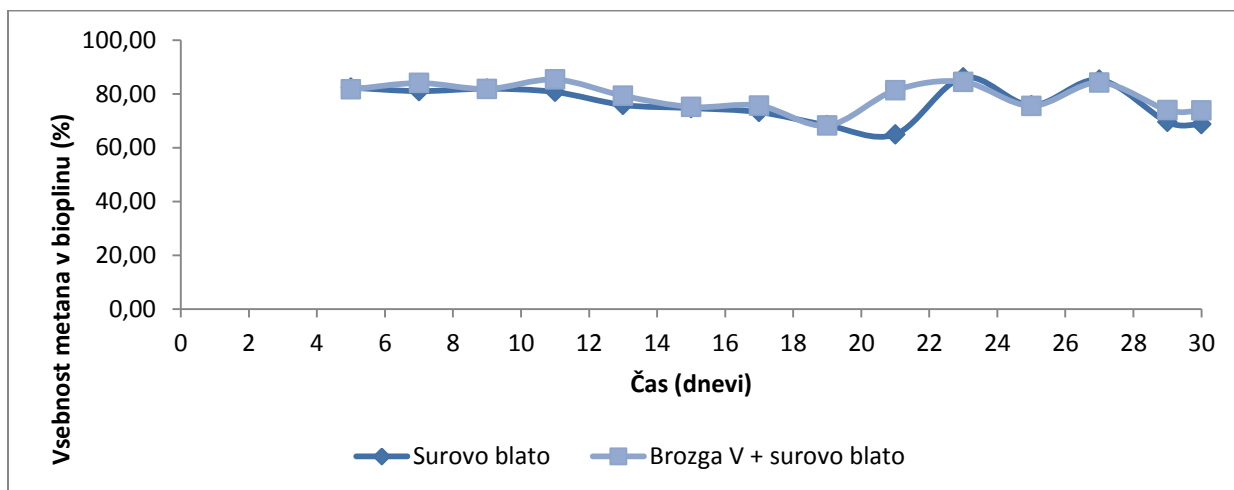
Koncentracije KMK so bile tekom tega poskusa v obeh reaktorjih večino časa precej majhne (Slika 26). Zaznali pa smo velik porast koncentracije KMK v 19. in 21. dnevu, kasneje pa so KMK spet upadle. V tem obdobju smo zaznali tudi padec pH iz 7,2, kolikor je običajno znašal v obeh reaktorjih, na 6,8 v kontrolnem in 6,9 v reaktorju, ki je vseboval kombinacijo surovega blata in brozge V.



Slika 26: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja. Prikazani so rezultati edine ponovitve poskusa.

4.3.3.3 Odstotna sestava bioplina pri njegovi dalj časa trajajoči proizvodnji iz mešanice brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom

Proizvedeni bioplin smo začeli vzorčiti peti dan poskusa (Slika 27). Vsebnost metana je v bioplinu nihala skozi čas. Večino časa so bile vrednosti v obeh reaktorjih približno enake. Največja razlika se pojavi 21. dan poskusa, ko vsebnost metana v kontrolnem reaktorju (64,9 %), kjer se je kot substrat uporabljalo le surovo blato, pade precej nižje od vsebnosti metana v eksperimentalnem reaktorju (81,3 %), kjer smo kot substrat uporabili kombinacijo surovega blata in brozge V. Opazne razlike se pojavijo tudi med 11. in 13. dnevom ter od 29. dne dalje, ko je bilo v bioplinu kontrolnega reaktorja za do 5 % manj metana kot v reaktorju z brozgo V in surovim blatom.

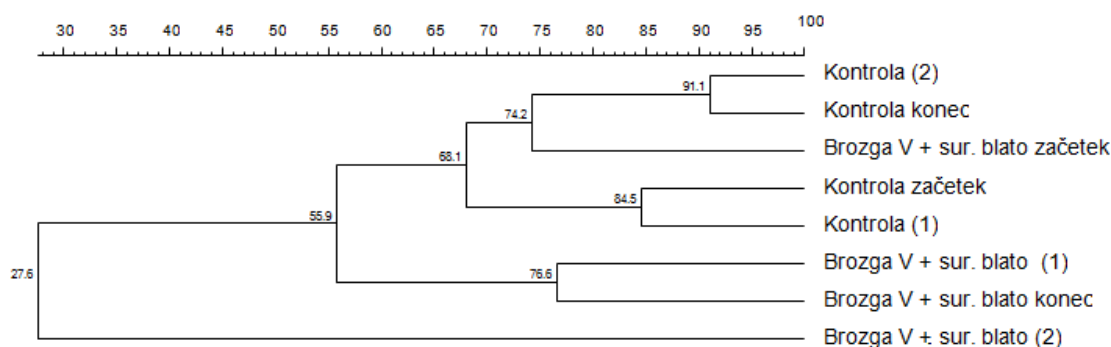


Slika 27: Odstotni delež metana v bioplinu, proizvedenem iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja. Prikazani so rezultati edine ponovitve poskusa.

4.3.3.4 Vpliv dalj časa trajajoče proizvodnje bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata na sestavo mikrobne združbe

Primerjava sestave bakterijske združbe:

Rezultati TRFLP analize so pokazali, da se je sestava bakterijske združbe v bioplinskem reaktorju, kjer smo k surovemu blatu dodajali brozgo V, spremenila za okoli 65% od začetka do konca poskusa (Slika 28). V kontrolnem reaktorju, kjer smo kot substrat uporabljali le surovo blato je bila ta sprememba le 36 %. Na koncu poskusa je bila med reaktorjema skoraj 60 % razlika v sestavi bakterijske združbe, med tem ko je na začetku znašala 44 %. Zanimivo je, da si v obdobju linearne produkcije (točka 1, deveti dan poskusa) postaneta združbi med reaktorjema nekoliko bolj podobni, saj se razlikujeta le še za 24 %, na točki 2 (takoj po izboljšanju pH – enaindvajseti dan poskusa) pa se ta razlika močno poveča vse do 69 %. Rezultati TRFLP analize so pokazali, da dolgoročno dodajanje brozge V v bioplinski reaktor statistično značilno vpliva na sestavo bakterijske združbe.

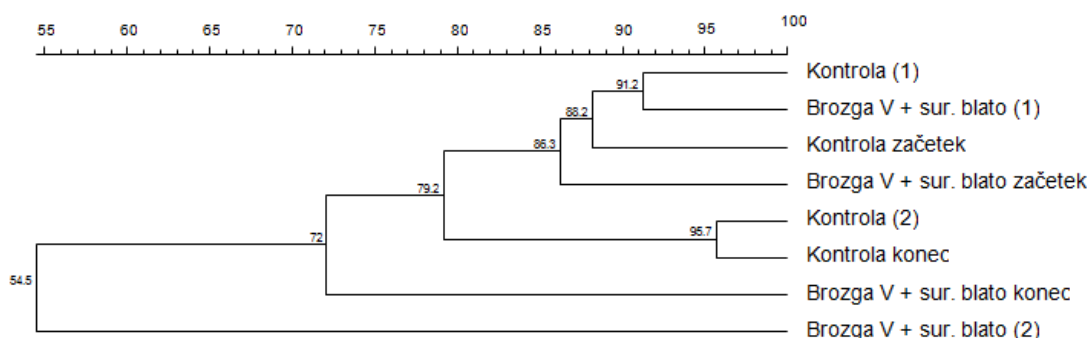


Slika 28: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja. Prikazani so rezultati edine ponovitve poskusa. Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge V in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po 30 pretečenih dneh. Oznaka »(1)« označuje vzorce iz vmesne točke 1, ki je postavljena v obdobje linearne produkcije, preden je v obeh reaktorjih padel pH, oznaka »(2)« pa vzorce iz vmesne točke 2, ki so bili odvzeti takoj po izboljšanju stanja pH v reaktorjih (za boljšo predstavbo so te točke označene tudi na sliki 25). Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

Rezultati TRFLP analize so pokazali, da se je sestava arhejske združbe v bioplinskem reaktorju, kjer smo k surovemu blatu dodajali brozgo V, spremenila za okoli 29 % od začetka do konca poskusa (Slika 29). Sprememba v sestavi arhejske združbe je bila podobna, ko smo uporabili le surovo blato za substrat, saj je takrat prišlo do okoli 24 % razlike. Po koncu poskusa se je arhejska združba med obema reaktorjema razlikovala za okoli 28 %, med tem ko se je na začetku razlikovala za 15 %. Tudi tukaj je opazna podobna dinamika sprememb kot pri bakterijski združbi. Na točki 1 je razlika v arhejski združbi med reaktorjema padla na okoli 9 %, na točki 2 pa so razlike bistveno višje, saj

znašajo že 37 %. TRFLP analiza je pokazala majhen vpliv dodane brozge V na sestavo arhejske združbe v bioplinskem reaktorju.



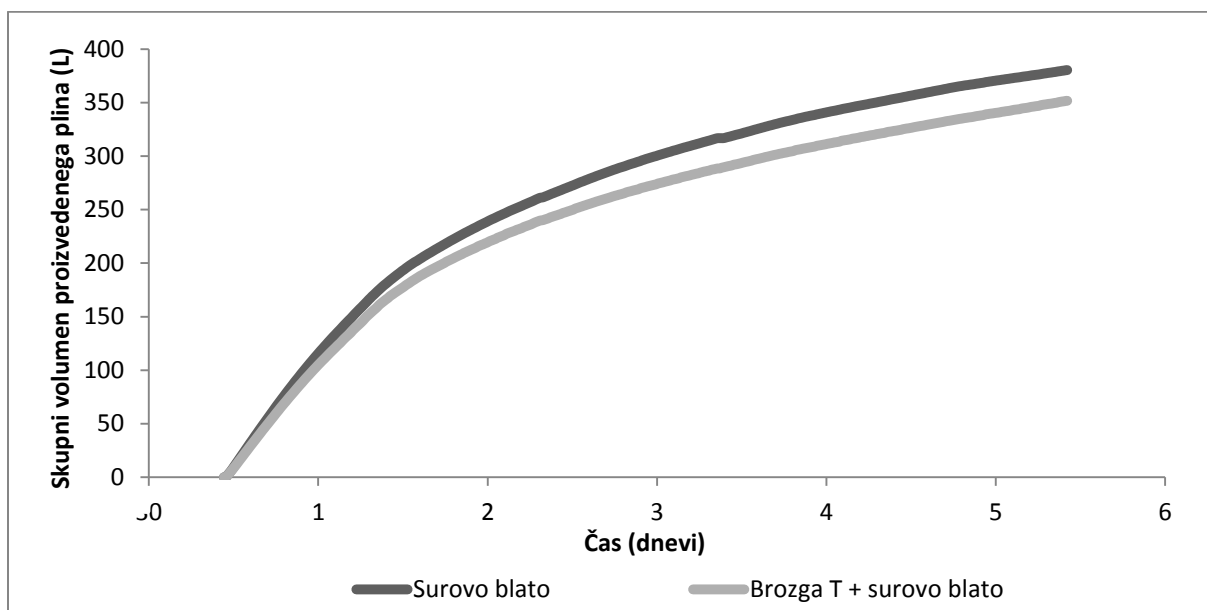
Slika 29: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom pri daljšem obratovanju bioplinskega reaktorja. Prikazani so rezultati edine ponovitve poskusa. Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge V in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po 30 pretečenih dneh. Oznaka »(1)« označuje vzorce iz vmesne točke 1, ki je postavljena v obdobje linearne produkcije, preden je v obeh reaktorjih padel pH, oznaka »(2)« pa vzorce iz vmesne točke 2, ki so bili odvzeti takoj po izboljšanju stanja pH v reaktorjih (za boljšo predstavbo so te točke označene tudi na sliki 25). Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

4.3.4 Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe

Pri tej seriji poskusov smo preverjali vplive druge odpadne fermentacijske brozge iz farmacevtske industrije, brozge T. Tudi to brozgo smo uporabljali kot substrat v kombinaciji s surovim blatom v razmerju KPK 1:1. Poskus je bil izveden v dveh ponovitvah.

4.3.4.1 Kumulativna produkcija bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata v primerjavi s surovim blatom

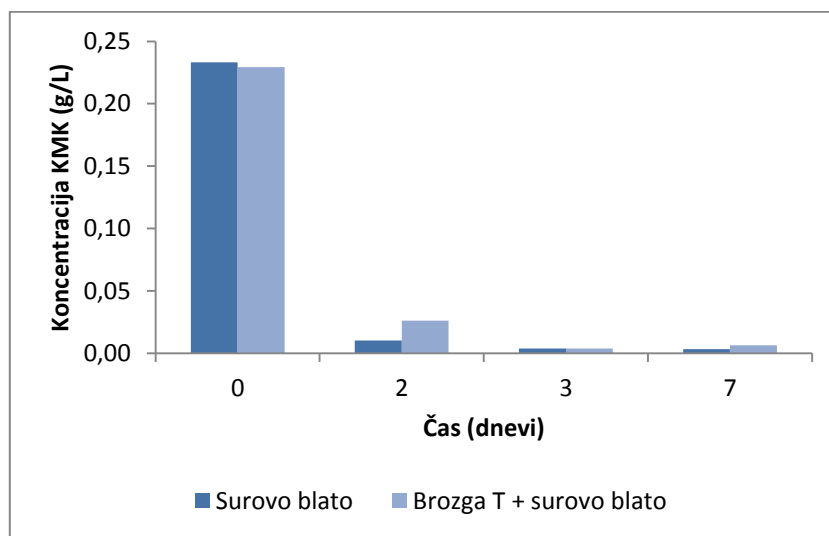
Iz mešanice brozge T in surovega blata kot substrata, se je proizvedlo od 0-8 %, v povprečju pa okoli 4 % manj bioplina kot iz samega surovega blata (Slika 30 in Priloga F1). Krivulji kumulativne produkcije bioplina v obeh reaktorjih si precej tesno sledita.



Slika 30: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega eksperimenta (1. ponovitev), ostali rezultati pa so predstavljeni v Prilogi F.

4.3.4.2 Vpliv mešanice brozge T in surovega blata na vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin

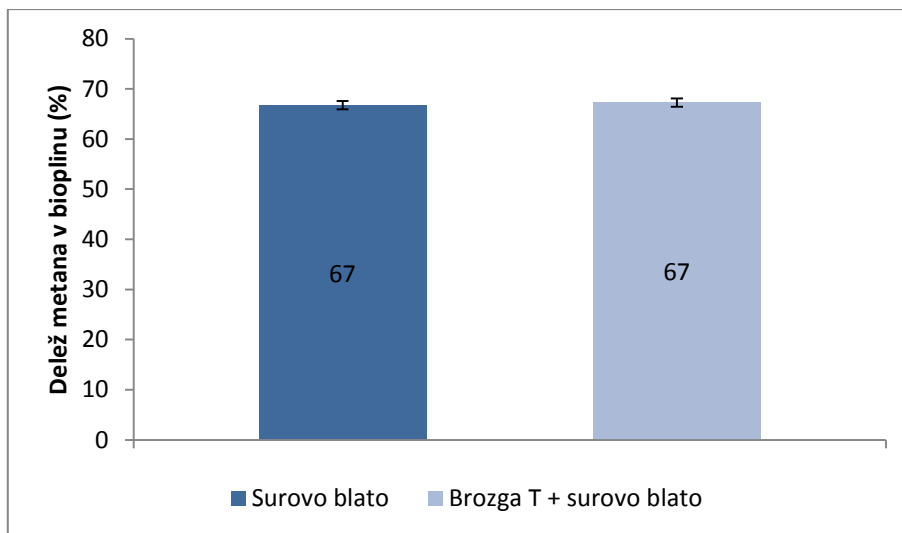
Uporaba mešanice brozge T in surovega blata ni imela večjega vpliva na vsebnost KMK v reaktorju (Slika 31 in Priloga F2) v primerjavi s surovim blatom kot edinim substratom. Opazimo lahko običajno spreminjanje koncentracij med potekom poskusa, koncentracije v obeh reaktorjih so bile v različnih časovnih točkah precej podobne in niso nikoli presegle 0,25 g/l.



Slika 31: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitve), rezultati ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi F. Tokrat je bil poskus zaključen 7 dni po zagonu, hkrati so pa bili takrat odvzeti tudi vzorci.

4.3.4.3 Odstotna sestava bioplina pri njegovi proizvodnji iz mešanice brozge T in surovega blata v primerjavi s surovim blatom

Brozga T v kombinaciji s surovim blatom ni imela vpliva na vsebnost metana v bioplenu (Slika 32). Vrednosti so se gibale okoli 77 %, pri čemer smo med ponovitvami poskusov opazili večje razlike kot med reaktorjema znotraj posamezne ponovitve.

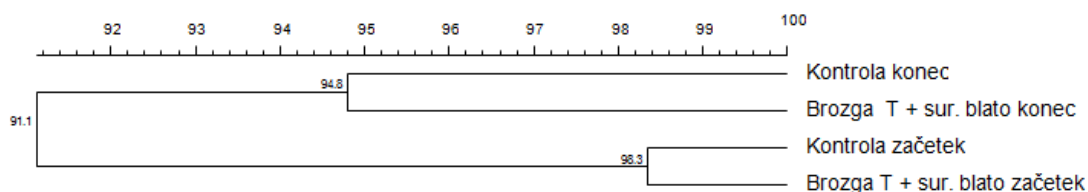


Slika 32: Odstotni delež metana v bioplenu, proizvedenem iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Prikazano je povprečje vseh rezultatov. Številke v stolpcih so zaokrožene povprečne vrednosti.

4.3.4.4 Vpliv mešanice brozge T in surovega blata na sestavo mikrobne združbe

Primerjava sestave bakterijske združbe:

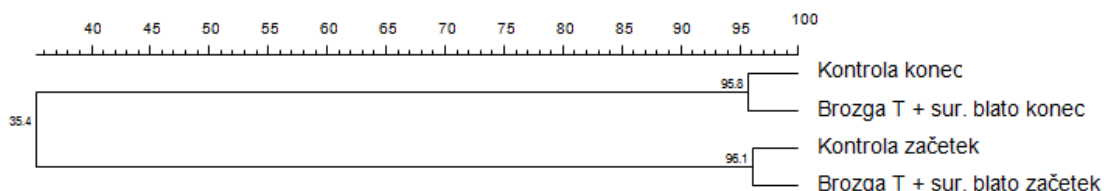
Rezultati TRFLP analize so pokazali, da se je sestava bakterijske združbe v bioplinskem reaktorju, kjer smo k surovemu blatu dodajali brozgo T, spremenila za 22 ± 18 % od začetka do konca poskusa (Slika 33 in Priloga F3). V kontrolnem reaktorju, ki je vseboval le surovo blato kot substrat, se je bakterijska združba v istem času spremenila za 20 ± 16 %. Po končanih ponovitvah poskusa so bile razlike v bakterijski združbi med obema reaktorjema precej majhne, saj so znašale v povprečju le 7 ± 2 %, kar je podobno kot povprečne razlike med reaktorjema na začetku poskusa, ki so znašale 4 ± 3 %. Kot je razvidno tudi iz slike 11, je imel čas precej večji vpliv na spremembe v sestavi bakterijske združbe kot uporabljeni substrat.



Slika 33: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi F. Oznaka »Brozga T + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge T in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

Primerjava sestave arhejske združbe:

Brozga T v kombinaciji s surovim blatom je v povprečju povzročila 3 ± 1 % razliko v arhejski združbi na začetku in 4 ± 1 % razliko na koncu poskusa. Tako je imel tudi pri sestavi arhejske združbe čas precej večji vpliv kot uporaba izbranega substrata (Slika 34 in Priloga F4). Analiza TRFLP je pokazala, da brozga T nima statistično značilnega vpliva na sestavo arhejske združbe v bioplinskem reaktorju.



Slika 34: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom. Za prikaz je bil izbran rezultat najbolj reprezentativnega poskusa (1. ponovitev), dendrogrami ostalih ponovitev so prikazani v Prilogi F. Oznaka »Brozga T + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge T in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

5 RAZPRAVA

Kot je predstavljeno v poglavju 2.3, obstaja mnogo različnih načinov izboljšanja produkcije bioplina iz odvečnega blata čistilnih naprav. Odločitev za to, kateri je najboljši, je lahko drugačna za vsako čistilno napravo posebej, saj je odvisna od mnogih različnih parametrov. Zato je potrebno preizkusiti več različnih postopkov in na koncu poleg pridobljenih rezultatov upoštevati tudi finančne stroške, ki bi jih zahtevala morebitna nadgradnja čistilne naprave z izbrano metodo.

Na CCN Domžale – Kamnik smo se v prvi vrsti odločili za testiranje dveh metod, ki bi ju bilo relativno lahko in cenovno ugodno vključiti v obstoječo infrastrukturo. To sta bila dodajanje hidrolitične encimsko mikrobne mešanice v bioplinski reaktor in vračanje dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor.

Poleg iskanja postopkov izboljšanja produkcije bioplina iz surovega blata, pa smo se zaradi možnega vpliva odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije na proces čiščenja odpadne vode (poglavje 2.4), odločili preveriti tudi ali bi bilo možno iz nekaterih takšnih brozg, ki pritekajo na CCN skupaj z ostalo odpadno vodo, proizvajati bioplin in jih tako izločiti iz aerobnega dela komunalnega čiščenja. Po dogovoru s farmacevtskim podjetjem smo pridobili dve takšni brozgi za svoje eksperimente – imenovali smo jih brozga V in brozga T.

5.1 VPLIV DODANE ENCIMSKO MIKROBNE MEŠANICE NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU

Dodajanje mešanice encimov in mikroorganizmov spada med biološke načine dezintegracije substrata (poglavje 2.3.1.7). Ta način izboljšanja produkcije bioplina je preverjalo že več avtorjev. Problema so se lotevali z uporabo različnih encimov in mikroorganizmov ter s kombiniranjem biološke dezintegracije z drugimi metodami obdelave substrata. Večini raziskav je bilo skupno to, da so dezintegracijo z encimi in/ali mikrobi izvajali kot način predobdelave substrata – torej pred njegovim dovajanjem v reaktor. CCN je za poskuse pospešitve proizvodnje bioplina iz surovega blata izbrala encimsko mikrobno mešanico B120, proizvajalca Bio-Systems, ki smo jo testirali v tem magistrskem delu. Po navodilih proizvajalca smo to mešanico dodajali direktno v bioplinski reaktor. Prednost tega je v tem, da pri prenosu te metode na veliko raven, ni potrebna izgradnja posebnega rezervoarja, oziroma reaktorja za predobdelavo substrata.

Z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice B120 (Bio-Systems) v bioplinski pilotni reaktor nam je v najboljšem primeru uspelo povečati proizvodnjo bioplina za približno 17 % (Slika 5). Takšno izboljšanje je uspelo le pri eni ponovitvi poskusa, pri ostalih dveh (prilogi A1 in A2) pa je dodatek encimsko mikrobne mešanice imel manj kot 2 % učinek, kar je lahko tudi posledica neustreznih eksperimentalnih pogojev. Razlog za slabo ponovljivost verjetno leži v različnih sestavah surovega blata pri različnih ponovitvah poskusa. Temu se je težko izogniti, ker se sestava surovega blata na CCN lahko dnevno spreminja. Sicer je bila pri prvi ponovitvi poskusa skupna količina proizvedenega bioplina v obeh reaktorjih manjša (približno 30 %). V prvi ponovitvi poskusa smo dosegli boljši, v drugih dveh ponovitvah pa slabši rezultat kot Warthmann in sod. (2012), ki so z uporabo

različnih encimskih in encimsko mikrobnih mešanic dosegli med 5 % in 10 % izboljšanje v proizvodnji bioplina iz surovega blata.

Spreminjanje koncentracij KMK med poskusom z dodano encimsko mikrobn mešanico je bilo pri vsaki ponovitvi drugačno, vendar je bil trend pri vseh ponovitvah enak. V drugem ali tretjem dnevu po začetku poskusa opazimo povečanje vsebnosti KMK v reaktorju z dodano encimsko mikrobn mešanico (Slika 6, Prilogi A3 in A4), med katerimi sta prevladovali predvsem očetna in propionska kislina. To dokazuje, da so encimi pospešili hidrolizo polimernih snovi, kar je hitreje sprostilo monomere, iz teh pa so nastajale KMK, ki so se dalje v procesu dovolj hitro porabljale, to pa se je odrazilo v nekoliko povečani proizvodnji bioplina. Zanimivo je, da je bila skupna vsebnost KMK ob zagonu poskusa v obeh reaktorjih pri prvi ponovitvi, kjer smo opazili največje izboljšanje proizvodnje, precej manjša (okoli 0,08 g/L) (Priloga A3) kot pri ostalih dveh ponovitvah (okoli 0,19 g/L) (Slika 6 in Priloga A4). Prav tako je bilo prej omenjeno zvečanje koncentracij KMK v drugem ali tretjem dnevu po zagonu precej manjše (0,02 g/L) kot pri ostalih dveh ponovitvah (0,38 g/L in 0,44 g/L). Ta rezultat še dodatno potrjuje hipotezo, da je bil substrat ob prvi ponovitvi poskusa težje razgradljiv kot pri ostalih dveh.

Dodajanje encimsko mikrobn mešanice v pilotni bioplinski reaktor ni povečalo deleža metana v bioplinu (Slika 7). Vsebnost metana se je gibala med 64,5 % in 67 %.

Do sedaj v znanstvenih poročilih nismo zasledili analize vplivov encimskih in encimsko mikrobnih mešanic na sestavo bakterijske in arhejske združbe v bioplinskih reaktorjih. V naših pilotnih poskusih smo pričakovali, da bo dodatek encimsko mikrobn mešanice imel vpliv na sestavo mikrobn združbe v bioreaktorju zaradi sledečih razlogov: povečana je bila koncentracija substrata za vse predstavnike mikrobn združbe po stopnji hidrolize, skupaj z encimi so bili dodani tudi hidrolitični mikroorganizmi (razlike je pričakovati le v primeru, da so ti drugačni od tistih, ki so v reaktorju običajno prisotni). Teh mikroorganizmov smo v bioreaktor dodali zelo malo glede na njegov celotni volumen (5 g mešanice v 196,8 litrih) in ne vemo, v kakšni meri tam dejansko tudi preživijo. Rezultati analiz TRFLP so pokazali, da dodatek encimsko mikrobn mešanice B120 ne vpliva, oziroma ima zelo blag vpliv na sestavo tako bakterijske kot arhejske mikrobn združbe v bioreaktorju. Iz rezultatov ob začetku ponovitev poskusa lahko vidimo, da sam dodatek encimsko mikrobn mešanice ne vpliva bistveno na sestavo tako bakterijske kot arhejske združbe v bioplinskem reaktorju. Ta namreč znaša le 6 ± 2 % za bakterijsko in 11 ± 4 % za arhejsko združbo. To pomeni, da z dodatkom mešanice v bioreaktor res ne dovedemo večje količine mikroorganizmov, ki bi bili drugačni od že prisotnih. Po drugi strani lahko s pregledom rezultatov s koncev ponovitev poskusa, ugotovimo ali ima delovanje dodane encimsko mikrobn mešanice v bioreaktorju morda učinek na njegovo mikrobn združbo. Izkaže se, da statistično značilnega učinka na sestavo njegove bakterijske ali arhejske združbe ni, saj so razlike v primerjavi z reaktorji brez dodane encimsko mikrobn mešanice znašale le 12 ± 9 % za bakterijsko in 13 ± 3 % za arhejsko združbo.

Glede na to, da encimsko mikrobn mešanica B120 (Bio-Systems) vsebuje amilaze in lipaze, bi lahko sklepali, da je surovo blato, ki smo ga uporabljali za prvo ponovitev poskusa, ko smo dosegli 17 % izboljšanje proizvodnje, v primerjavi s tistim pri ostalih ponovitvah, vsebovalo večji delež škroba in/ali lipidov, ki so jih encimi uspešno razgradili in tako povečali proizvodnjo bioplina. Med tem, ko samo zvečanje proizvodnje bioplina

glede na kontrolni reaktor to hipotezo potrjuje, nam rezultati analiz vsebnosti KMK dajejo temu nasprotujoče dokaze (Priloga A3). Tukaj namreč vidimo, da encimi niso uspeli tako bistveno povečati koncentracije KMK kot v drugih ponovitvah tega poskusa, kjer se je po dveh ali treh dneh obratovanja ta povečala za okoli dvakrat glede na začetne vrednosti. Možno je, da je surovo blato v prvi ponovitvi poskusa vsebovalo določene kemijske spojine, ki so inhibirale anaerobno razgradnjo.

Naši rezultati se skladajo z ugotovitvami Warthmann-a in sodelavcev (2012), ki so preverjali učinek za 25 različnih encimskih mešanic in prišli do ugotovitve, da z njimi ni mogoče doseči dovolj velikega izboljšanja produkcije bioplina iz surovega blata, da bi to bilo ekonomsko upravičeno. Glavna težava je, da je aktivnost dodanih encimov v reaktorju zelo kratka (le 30-120 minut), kar znižuje njihovo uporabnost, saj bi jih bilo za učinkovito delovanje potrebno konstantno dovajati, kar je pa iz ekonomskega vidika nesprejemljivo (Warthmann in sod., 2012). Omenjena raziskovalna skupina je preverjala tudi vpliv dodatka hidrolitičnih mikroorganizmov v reaktor, vendar se tudi ti tam niso dolgoročno ohranili (Warthmann in sod., 2012). Podobno lahko sklepamo tudi v našem primeru, ko nam rezultati TRFLP analiz nakazujejo, da med reaktorjema na koncu ni bilo statistično značilne razlike v sestavi mikrobne združbe. To lahko pomeni, da se mikroorganizmi niso tam uspeli ohraniti, in/ali pa so bili dodani mikroorganizmi enaki že prisotnim.

Na podlagi rezultatov tako lahko zaključimo, da v našem primeru produkcije bioplina ne moremo pomembno izboljšati z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice B120, proizvajalca Bio-Systems. Sicer smo v enem primeru res imeli 17 % izboljšanje izplena, vendar tega rezultata nismo uspeli ponoviti, kar nakazuje, da je ta encimsko mikrobna mešanica premalo zanesljiva za izboljšanje produkcije bioplina z uporabo surovega blata na CCN Domžale-Kamnik. Glede na naše rezultate in tiste v pregledani literaturi, sklepamo da uporaba encimskih ali encimsko mikrobnih mešanic za izboljšanje produkcije bioplina na čistilnih napravah, ne izkazuje zadostne uporabnosti za uvedbo v velikem merilu. V prihodnjih raziskavah bi bilo bolje preveriti učinkovitost katere od drugih metod obdelave surovega blata, npr. termo-kemijske postopke dezintegracije.

5.2 VPLIV VRAČANJA DEHIDRIRANEGA BLATA NA PROIZVODNJO BIOPLINA IN NA SESTAVO MIKROBNE ZDRUŽBE V BIOREAKTORJU

Drug način izboljšanja produkcije bioplina, ki smo ga testirali, je bilo vračanje dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor. Vračanja dehidriranega blata ali pa kar anaerobnega blata bioplinskega reaktorja nazaj vanj so se različni avtorji lotili različno (poglavje 2.3.2). Najprimernejša možnost za CCN bi bila uvedba podobnega sistema kot so ga testirali Vanyushina in sodelavci (2012), ki so z vračanjem dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor dosegli do 17 % izboljšanje produkcije bioplina. Zaradi tega smo poskus tako tudi zastavili.

Ugotovili smo, da lahko vračanje dehidriranega blata v bioplinski reaktor za do 40 % izboljša produkcijo bioplina (Slika 10, priloga B1). Med reaktorjema so opažene tudi manjše razlike v vsebnosti KMK, ki nakazujejo, da je bila ob začetku ponovitev poskusa v bioreaktorju z dodanim dehidriranim blatom nekoliko večja koncentracija KMK kot v kontrolnem reaktorju (Slika 11, priloga B2). Tak rezultat je tudi pričakovan, saj je imel

bioplinski reaktor z dodanim dehidriranim blatom, dodanega več tudi surovega blata. Tako je bilo kljub enaki obremenitvi v obeh reaktorjih, v tistem z dodanim dehidriranim blatom večja količina surovega blata in posledično tudi večja vsebnost KMK v celotnem reaktorju. Večja količina substrata in anaerobne biomase pa se na koncu kaže v večji skupni produkciji bioplina v enako velikem bioreaktorju in v istem času, kot če ne bi vračali dehidriranega blata. Kot smo opisali v poglavju 2.3.2, so bili nekateri avtorji uspešni tudi pri uporabi dehidriranega blata, oziroma kar anaerobnega blata bioplinskega reaktorja kot dodatnega substrata za proizvodnjo bioplina. Predpostavili so namreč, da ta poleg aktivne mikrobne biomase vsebuje še nerazgrajene organske delce, ki bi se lažje razgradili, če jih vrnemo v bioplinski reaktor ter jim tako podaljšamo zadrževalni čas v njem. Povečana koncentracija mikrobne biomase bi pa tudi že sama po sebi ugodno vplivala na delovanje bioplinskega reaktorja (Young in sod., 2013, Vanyushina in sod., 2012). Na podlagi njihovih rezultatov bi bilo tudi v našem primeru pričakovati, da bi se zaradi težje razgradljivih komponent dehidriranega blata, še dodatno povečala produkcija bioplina. Izračun količine proizvedenega plina glede na količino dodanega KPK (Priloga B5, zadnji stolpec) (pri čemer smo upoštevali le KPK surovega blata) pokaže, da temu ni tako, saj med reaktorjem z dodanim dehidriranim blatom in kontrolnim reaktorjem ni bistvene razlike v tej učinkovitosti pretvorbe. Če bi imeli težko razgradljivi delci v dehidriranem blatu pomemben doprinos k skupnemu volumnu proizvedenega bioplina, bi se to namreč kazalo kot navidezno večja količina proizvedenega bioplina glede na dodan KPK v obliki surovega blata.

Kar se tiče vsebnosti metana in ogljikovega dioksida v nastalem bioplinu, vračanje dehidriranega blata ni povzročilo pomembnejših razlik, saj so te znašale le do okoli 1,6 % v prid kontrolnega reaktorja. To je bilo tudi pričakovati, saj bi naj na sestavo bioplina vplival predvsem substrat, ki pa je bil pri teh poskusih vedno enak v obeh reaktorjih – surovo blato. Vsebnost metana v bioplinu je bila vedno okoli 66 %.

Statistično značilnih vplivov na sestavo mikrobne združbe v tem primeru nismo pričakovali, saj sta oba reaktorja vsebovala enak substrat in podobno mikrobno biomaso, le da je bila v eksperimentalnem reaktorju njena koncentracija nekoliko večja. Analize sestave združbe z metodo TRFLP so pokazale, da se povečano doziranje biomase in substrata v eksperimentalni reaktor na začetku poskusa, lahko kaže kot razlika v sestavi bakterijske, ne pa tudi arhejske združbe. Ta je namreč ob začetkih poskusov znašala 26 ± 5 % za bakterije in 10 ± 4 % za arheje. Glede na natančnost uporabljene metode TRFLP lahko trdimo, da je ta razlika pri bakterijah dokaj opazna, pri arhejah je pa zelo majhna in skoraj zanemarljiva. Razlog za te razlike na začetkih poskusov bi lahko morda tičal v postopku dehidracije anaerobnega blata bioplinskega reaktorja. Mogoče pride ob tem do sprememb v mikrobni združbi, ki se kažejo predvsem na nivoju bakterij. Do tega bi lahko prišlo z uničenjem bolj občutljivih vrst ob centrifugiranju, ali pa z izplavljanjem slabše usedajočih se celic skupaj z odtočno vodo po centrifugiranju. Druga možnost je, da so te razlike posledice eksperimentalnih napak ob zagonu poskusov, ko bi lahko med različnimi ponovitvami prišlo do manjših razlik v razmerjih surovega blata in inokuluma. Za boljšo predstavbo o realnem stanju bi bilo dobro poskus še večkrat ponoviti. Omenjene razlike v združbah se tekom poskusa med reaktorjema očitno zmanjšajo, saj so na koncu znašale le še okoli 3 % za bakterijsko in 2 % za arhejsko združbo, kar so zanemarljivo nizke vrednosti. Precej večje razlike v obeh reaktorjih opazimo med začetkom in koncem

poskusov, kar pomeni, da ima čas precej večji vpliv na sestavo mikrobne združbe reaktorja kot dodatek dehidriranega blata.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da je vračanje dehidriranega blata v proces proizvodnje bioplina, ugodno za povečanje produkcije bioplina. Naši rezultati se tako ujemajo z rezultati, ki so jih pridobili Vanyushina in sod. (2012) in Young in sod. (2013). Očitno vračanje dehidriranega blata poveča učinkovitost procesa proizvodnje bioplina v reaktorju. Glavni razlog za to je povečanje koncentracije delovnih mikroorganizmov, ki nam omogoči anaerobno razgradnjo večje količine substrata v istem času. Nekateri avtorji kot posledico takšnega recikliranja dehidriranega blata navajajo tudi zmanjšanje volumna odvečnega dehidriranega blata, kar pomeni zmanjšanje stroškov čistilne naprave za njegovo nadaljnjo obdelavo (Young in sod., 2013; Vanyushina in sod., 2012). Tega učinka v našem delu sicer nismo preverjali, bi ga pa bilo zanimivo v prihodnje še preučiti. Sicer bi tak sistem bilo smiselno uvesti tudi na CČN Domžale-Kamnik, vendar tu trenutno ni na razpolago dovolj surovega blata, da bi lahko reaktorjem zagotavljali dovolj substrata za isto obremenitev kot jo imajo sedaj. CČN bodo v bližnji prihodnosti povečali, takrat pa bo ta rešitev dobrodošla.

5.3 PROIZVODNJA BIOPLINA IZ ODPADNIH FERMENTACIJSKIH BROZG IZ FARMACEVTSKE INDUSTRIJE

Drugi del te naloge obsega poskuse, s katerimi smo preverjali primernost dveh farmacevtskih brozg (brozga V in brozga T) za proizvodnjo bioplina.

5.3.1 Brozga V

Brozga V se je za proizvodnjo bioplina izkazala kot slabši substrat v primerjavi s surovim blatom, saj iz nje proizvedemo do 43 % manj bioplina kot iz enake količine (glede na KPK) surovega blata (Slika 15, Prilogi C1 in C2). Sicer je res, da je omenjena vrednost najbolj ekstremen rezultat, ki smo ga dobili, vendar se je pri vseh poskusih, v katerih smo za proizvodnjo bioplina uporabljali bodisi čisto, bodisi mešano brozgo V s surovim blatom, kazal enak trend zmanjšanja količine proizvedenega bioplina v primerjavi s surovim blatom (Slike 15, 20 in 25, Priloge C1, C2 in D1, D2). Pri tem je pa bila po drugi strani vsebnost metana v bioplinu enaka ne glede na uporabljen substrat. Enak pojav kot pri kumulativni produkciji bioplina, smo zaznali z analizami vsebnosti KMK, kjer je bilo teh v reaktorju z brozgo V vedno nekoliko manj kot v kontrolnem reaktorju (Slike 16, 21 in 26, priloge C3, C4 in D3, D4). Glavni razlog za variacije v razlikah v količini proizvedenega bioplina in med obema reaktorjema pri različnih ponovitvah poskusa, so razlike v sestavi surovega blata. Do te ugotovitve smo prišli, ker sta bila volumen proizvedenega bioplina in produkcija glede na količino dodanega KPK pri proizvodnji iz brozge V precej konstantni, pri surovem blatu pa ne. To je bilo tudi pričakovati, saj smo brozgo V imeli shranjeno v zamrzovalniku in so zato njene lastnosti med ponovitvami poskusa ostajale konstantne, med tem ko pa to ne velja za surovo blato, ki je bilo vedno izbrano sveže. Do zmanjšane produkcije bioplina pri uporabi brozge V kot substrata bi lahko prišlo zaradi različnih razlogov. Prva možnost je, da brozga V deluje inhibitorno na mikrobno združbo bioplinskega reaktorja, druga pa, da ne izkazuje inhibitornega delovanja, temveč je kljub

svojim visokim vrednostim KPK, težko razgradljiva za prisotno mikrobo združbo. Možna je tudi kombinacija obeh učinkov. Brozga V je sicer res stranski produkt pri proizvodnji farmacevtskih učinkovin, vendar te praktično v celoti odstranijo v postopku njihove izolacije. Zaradi tega je koncentracija teh spojin v brozgi premajhna, da bi lahko negativno vplivale na mikrobo združbo bioreaktorja. Kljub temu pa s tem ne ovržemo popolnoma prve zgoraj opisane možnosti, saj bi lahko inhibicijo povzročile tudi kakšne druge spojine, kot so na primer nekateri presnovni produkti, ki so v brozgi V morda ostali po produkciji farmacevtskih učinkovin. O tem za katero možnost gre v resnici, smo se prepričali z mešanjem brozge V s surovim blatom (Poglavji 4.3.2 in 4.3.3). Glede na količino proizvedenega bioplina in vsebnost KMK pri teh poskusih, lahko vidimo, da je brozga V v začetnih dneh dokaj slabo razgradljiva in prihaja do produkcije bioplina najverjetneje najprej predvsem iz surovega blata in le deloma tudi iz brozge V. V primeru inhibitornih učinkov na mikrobo združbo bi bilo pričakovati večje razlike med reaktorjema v količini proizvedenega bioplina, kot so bile opažene (Slikah 20 in 25 ter Prilogah D1 in D2).

Zanimiv vpogled v posledice daljše uporabe brozge V kot kosubstrata za proizvodnjo bioplina, nam daje podaljšan poskus z njeno uporabo (Slika 25). Tukaj smo lahko opazili učinke, ki se v petih dneh, kolikor so trajali običajni poskusi, niso mogli izraziti. V tem poskusu se je namreč po približno 10 dneh hitrost produkcije bioplina v obeh reaktorjih precej izenačila, kar se je kazalo v enakem naklonu krivulj produkcije in v grafikonu, ki prikazuje rezultate izračuna proizvedene količine bioplina glede na dodani KPK (Priloga E). Izkaže se torej, da se mikroba združba bioplinskega reaktorja po približno 10 dneh prilagodi na nov substrat in ga razgrajuje enako učinkovito kot surovo blato. Žal tako učinkovitega delovanja reaktorja nismo mogli dolgo spremljati, saj je 18 dni po zagonu poskusa prišlo do zmanjšanja vrednosti pH v obeh reaktorjih, kar je močno vplivalo na učinkovitost pretvorbe KPK substrata v bioplin. To se je kazalo tako v proizvedenem volumnu bioplina (Slika 25), kot v vsebnosti metana v njem (Slika 27). Ker se je sprememba v pH zgodila tako sunkovito v obeh reaktorjih kot posledica povečanih koncentracij KMK (Slika 26) in ker je bil učinek večji v kontrolnem reaktorju, ki je vseboval več surovega blata, smo zaključili, da je za opažene anomalije krivo ravno surovo blato v teh dneh. Po ponovni vzpostavitvi ustreznih vrednosti pH, je produkcija bioplina tekla dalje, vendar z nekoliko manjšo učinkovitostjo kot do 18. dne. Proti koncu poskusa je učinkovitost znova naraščala, kar spet nakazuje na postopno prilagoditev mikrobne združbe. V zadnjih štirih dneh smo preizkusili delovanje reaktorja ob dva krat večji obremenitvi kot sicer. Izkazalo se je, da bi reaktorji z uporabljenimi substrati delovali tudi pri takšnih obremenitvah, saj je prišlo le do blagega povečanja koncentracij KMK (Slika 26), ki pa so se v glavnem uspele še vedno pretvoriti v bioplin.

Ko smo preverjali kakšen vpliv ima uporaba brozge V v bioplinskem reaktorju na sestavo njegove združbe, smo dobili rezultate, ki se ujemajo z vsem do sedaj opisanim. Predvsem bakterijske združbe se ob zagonih poskusov dokaj razlikujejo (Slika 18, 23 in 28, Priloge C5, C6 in D4, D5), kar namiguje na to, da je brozga V vsebovala svojo združbo bakterij, ki smo jo skupaj z njo dodali v reaktor. To se tudi sklada z našimi opažanji, da je v brozgi V prisotna intenzivno metabolno aktivna mikroba združba, saj se je iz nje preden smo jo zamrznili, izločala velika količina plina, hkrati je pa prihajalo do sprememb v KPK. Po petih pretečenih dneh, oziroma po devetih pri podaljšanem poskusu, sta si bakterijski združbi med reaktorjema postali precej bolj podobni, iz česar lahko sklepamo, da dodana združba ni dolgo preživela v anaerobnih razmerah bioplinskega reaktorja. Pri podaljšanem

poskusu je, kot smo že zgoraj opisali, v tem času prišlo tudi do postopnega izboljšanja učinkovitosti razgradnje KPK do bioplina. Ponovno na naše rezultate močno vpliva padec pH v podaljšanem poskusu, saj to zelo močno spremeni tako bakterijsko kot arhejsko mikrobno združbo v reaktorju (Sliki 28 in 29). Razlike med reaktorjema so takrat znašala 69 % za bakterijsko in 37 % za arhejsko združbo. V obeh primerih je proti koncu poskusa ponovno začelo prihajati do manjšanja razlik med reaktorjema v združbah obeh skupin mikroorganizmov, kar je bilo ponovno v korelaciji z večanjem učinkovitosti pretvorbe KPK v bioplin. V splošnem pri rezultatih teh poskusov težje interpretiramo kaj se je dogajalo z arhejsko združbo kot z bakterijsko, saj so bili rezultati pri arhejah precej bolj variabilni, kar se kaže v velikih standardnih odklonih. Kljub temu se da opaziti trend povečanja razlik v arhejski združbi med reaktorjema tekom poskusa. Na koncu ponovitev poskusa so bile običajno te vrednosti namreč večje kot na začetkih, kar ponovno potrjuje, da brozga V verjetno ni vsebovala bistvene količine arhejskih celic, da pa je tekom poskusa imela zaznaven vpliv na arhejsko združbo bioplinskega reaktorja.

Na podlagi rezultatov vseh poskusov, kjer smo kot substrat ali del njega uporabljali brozgo V, lahko zaključimo, da ta sama po sebi nima večjih negativnih učinkov na proces proizvodnje bioplina. Je nekoliko težje razgradljiva kot surovo blato, vendar jo je še vedno ugodneje dovajati v bioplinski reaktor, kot pa jo spuščati v aerobni del čistilne naprave, kjer lahko potencialno povzroča težave. Poleg tega rezultati nakazujejo na možnost postopne prilagoditve mikrobne biomase bioplinskega reaktorja nanjo. Zaključimo lahko tudi, da ne izkazuje nikakršnih negativnih vplivov na mikrobno združbo, saj je bilo delovanje bioreaktorja tudi po daljši izpostavitvi temu substratu najmanj enako učinkovito kot v začetnih dneh delovanja in zelo podobno kot pri uporabi surovega blata kot substrata. Za bolj zanesljivo oceno o vplivih dolgotrajne uporabe tega substrata za proizvodnjo bioplina, bi bilo potrebno podaljšano obliko poskusa še večkrat ponoviti, oziroma dlje časa izvajati. Končna vsebnost te brozge v mešanici s surovim blatom za industrijski bioplinski reaktor bo precej manjša, kar pomeni, da je njeno dodajanje v bioplinski reaktor popolnoma varno.

5.3.2 Brozga T

Druga brozga, ki smo jo testirali kot substrat za proizvodnjo bioplina, je bila brozga T, ki se je v kombinaciji s surovim blatom izkazala kot boljši substrat za proizvodnjo bioplina kot brozga V. Iz mešanice brozge T in surovega blata smo proizvedli od 0 % do 8 % manj bioplina kot iz čistega surovega blata (Slika 30, Priloga F1), pri čemer nismo zaznali pomembnejših razlik v kvaliteti bioplina (Slika 32). Tako velika podobnost v volumnu proizvedenega bioplina nakazuje, da ta substrat nima negativnih učinkov na delovanje bioplinskega reaktorja in da je relativno lahko razgradljiv (podobno kot čisto surovo blato). Prav tako ni bil zaznan večji vpliv na koncentracije KMK, saj so si bile te v primerjavi z reaktorjem, ki je kot substrat vseboval le surovo blato zelo podobne. Tekom poskusa so se koncentracije KMK pri reaktorju z dodano brozgo T, zmanjševale na enak način, kot to običajno poteka pri proizvodnji bioplina iz surovega blata.

Za konec smo z analizami sprememb v sestavi mikrobnih združb obeh reaktorjev ugotovili, da uporaba brozge T v kombinaciji s surovim blatom kot substrat nima vpliva na sestavo tako bakterijske kot arhejske združbe (Sliki 33 in 34, Prilogi F3 in F4). Na koncu se je

bakterijska združba med obema reaktorjema namreč razlikovala zgolj za 7 ± 2 %, kar je zanemarljivo nizka vrednost. Tudi na začetku poskusov ta razlika ni bila velika, saj je znašala le 4 ± 3 %. Iz tega lahko sklepamo, da brozga T ne vsebuje večje količine bakterij, hkrati pa tudi ne vpliva na sestavo bakterijske združbe bioplinskega reaktorja. Pri sestavi arhejske združbe je bila zgodba podobna, saj je na koncu poskusa med reaktorjema prišlo le do zanemarljive 4 ± 1 % razlike v sestavi, na začetku poskusov pa 3 ± 1 %.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da ni nobenega dokaza, da bi uporaba brozge T predstavljala kakršnekoli težave v proizvodnji bioplina. Dejansko izkazuje v vseh pogledih precej podobne lastnosti za razgradnjo kot že obstoječi substrat – surovo blato in jo tako CCN brez težav uporablja kot kosubstrat za proizvodnjo bioplina, namesto, da jo razgrajuje v aerobnem delu naprave.

6 SKLEPI

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo vsaj deloma potrdili obe zastavljeni hipotezi v zvezi s povečanjem produkcije bioplina.

- Vračanje dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor se je izkazal kot boljši postopek za povečanje bioplinske proizvodnje v primerjavi z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice
- Vračanje dehidriranega blata nazaj v bioreaktor povzroči do 40 % izboljšanje produkcije bioplina. Verjetno bo v prihodnje to postopek izbire na CČN Domžale-Kamnik.
- Dodajanje encimsko mikrobne mešanice B120, proizvajalca Bio-Systems do neke mere izboljša razgradnjo surovega blata, kar pa ne vodi vedno v dovolj povečano produkcijo bioplina. Postopek tudi zaradi cene encimsko mikrobni mešanic ne pride v poštev na CČN Domžale-Kamnik.

Potrdili smo tudi hipotezo o ustreznosti obeh testiranih odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije kot kosubstrata za anaerobno razgradnjo v bioplinskem reaktorju.

- Brozga T se je sicer izkazala kot boljša od brozge V, saj v vseh merjenih parametrih izkazuje večjo podobnost surovemu blatu kot brozga V.
- Zaključimo lahko, da sta testirani brozgi V in T primerni za proizvodnjo bioplina, kar bo CČN Domžale-Kamnik nudilo dve prednosti: povečano količino substrata za proizvodnjo bioplina in posledično večjo količino proizvedene električne energije ter preprečeno možnost negativnih vplivov testiranih brozg na aerobni del čistilne naprave.

Prišli pa smo tudi do nekaterih bolj splošnih sklepov.

- Kvaliteta bioplina je precej stabilen parameter, na katerega nismo mogli vplivati tako z dodatki encimov ali dehidriranega blata, kot tudi z uporabo novih kosubstratov.
- Spremembe v pH lahko zaradi inhibitornega delovanja na anaerobno biomaso, negativno vplivajo na volumen in kvaliteto proizvedenega bioplina ter imajo močan vpliv na sestavo mikrobne združbe bioreaktorja.
- Anaerobna biomasa bioplinskega reaktorja je dolgoročno precej stabilna, saj je poleg sprememb v pH le brozga V imela vpliv na njeno sestavo.

Glede na uspešnost teh poskusov bi bilo v prihodnje dobro podobne poskuse izvesti še za druge odpadne brozge, ki sedaj iz farmacevtskega podjetja še vedno dotekajo na CČN skupaj z ostalo odpadno vodo. Prav tako bi bilo smiselno preizkusiti še druge načine izboljšanja produkcije bioplina iz surovega blata.

7 POVZETEK

Čistilne naprave ob svojem delovanju proizvajajo velike količine odvečnega primarnega in aktivnega blata, ki skupaj tvorita surovo blato. To se pogosto uporabi za proizvodnjo bioplina iz katerega lahko nato pridobivamo električno in toplotno energijo. Tak proces se izvaja tudi na Centralni čistilni napravi Domžale – Kamnik (CČN). Z namenom povečanja učinkovitosti tega procesa konstantno iščejo in uvajajo nove rešitve. Tudi ta naloga je bila opravljena s tem namenom. Izvedli smo dve skupini poskusov: v eni smo poskušali izboljšati učinkovitost bioplinskega reaktorja, v drugi pa smo preverjali ustreznost odpadnih farmacevtskih fermentacijskih brozg kot substratov za proizvodnjo bioplina.

Obstaja mnogo različnih načinov izboljšanja produkcije bioplina na čistilnih napravah. Lahko uporabimo načine obdelave, oziroma dezintegracije surovega blata (na primer dezintegracija z ultrazvokom ali z mikrovalovi, mehanska, toplotna, kemijska, termokemijska ali biološka dezintegracija) ali kakšne druge metode, kot je vračanje dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor ali uporaba več anaerobnih bioreaktorjev zapored. Vsaka metoda ima svoje prednosti in slabosti ter je lahko za nekatere substrate ali čistilne naprave bolj ustrezna kot za druge. Zaradi tega je najbolje za vsako čistilno napravo posebej preveriti in oceniti kateri način izboljšanja produkcije bioplina se tam najbolj splača uporabiti. Kot del te naloge smo se odločili preveriti ali bi bilo dodajanje encimsko mikrobne mešanice B120, proizvajalca Bio-Systems koristno za izboljšanje učinkovitosti delovanja bioplinskega reaktorja na CČN. Prav tako smo preverjali učinek vračanja dehidriranega blata nazaj v bioplinski reaktor. S proizvodnjo bioplina iz odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije, bi lahko preprečili morebitne negativne učinke le-teh na aerobno stopnjo čistilne naprave, kamor so do sedaj pritekale skupaj z ostalo odpadno vodo. V splošnem je dobro vsak substrat testirati v pilotnih bioreaktorjih, preden ga začnemo uporabljati v veliki meri. S takšnimi poskusi lahko namreč predvidimo kakšno količino bioplina je mogoče proizvesti iz substrata ter kakšen vpliv ima le-ta na mikrobno združbo anaerobnega bioreaktorja.

Poskuse smo izvajali v dveh pilotnih bioplinskih reaktorjih, volumna 196,8 l. Pri vsakem poskusu smo spremljali več parametrov. Pilotna reaktorja sta bila opremljena z merilnimi napravami za kumulativno produkcijo bioplina, ostale analize pa smo izvajali na vzorcih proizvedenega plina in tekoče vsebine bioreaktorjev. Tako smo spremljali sestavo bioplina, pH vsebin bioreaktorjev, vsebnost kratkoverižnih maščobnih kislin (KMK) in sestavo mikrobne združbe, katero smo analizirali z metodo TRFLP. Poskuse smo izvajali tako, da nam je en pilotni bioreaktor vedno služil kot kontrola in je zato vseboval le surovo blato in inokulum – torej enak substrat in v enaki obremenitvi kot je to trenutno v industrijskih CSTR bioplinskih reaktorjih na CČN (0,2 g KPK/g organske snovi). V drugem pilotnem bioreaktorju smo izvajali različne poskuse, pri čemer smo pa ne glede na poskus zaradi primerljivosti tudi ta reaktor vedno obremenili enako kot kontrolnega. Večina poskusov je trajala 5 dni, z dovajanjem substrata le ob zagonu. Pri enem izmed poskusov preverjanja ustreznosti brozg za proizvodnjo bioplina, smo želeli odkriti morebitne dolgoročne posledice uporabe takega substrata, zaradi česar smo ta poskus podaljšali na 30 dni. Tokrat smo tudi po prvih petih dneh, oba bioplinska reaktorja dohranjevali vsakodnevno.

Največje izboljšanje produkcije bioplina (do 40 %) smo dosegli z vračanjem dehidriranega blata v anaerobni bioreaktor. Ker je bila tam prisotna večja količina mikrobne združbe (dodane v obliki surovega blata), smo vanj lahko dali tudi več substrata in tako še vedno

dosegli enako obremenitev. Posledično se je tako v enakem časovnem obdobju in v enako velikem bioplinskem reaktorju, razgradila večja količina substrata, zaradi česar je bila tudi končna količina proizvedenega bioplina večja. Uvedba takšnega sistema v veliki meri bi zato najbolj koristila tistim čistilnim napravam, ki proizvedejo več surovega blata, kot so ga sposobne same predelati. Na CČN Domžale – Kamnik temu trenutno ni tako, saj so bioplinski reaktorji tam nizko obremenjeni. Zaradi tega izboljšanje v produkciji bioplina morda nebi bilo tako veliko kot v naših rezultatih, ker nebi mogli zagotoviti dovolj substrata za ohranjanje enake obremenitve kot do sedaj. CČN bodo v bližnji prihodnosti povečali, takrat pa bo ta rešitev dobrodošla. Uporaba mešanice hidrolitičnih encimov in mikroorganizmov se ni izkazala kot uporabna, saj je večinoma vodila do manj kot 2 % izboljšanja produkcije bioplina. Opazili smo tudi povečanje koncentracij KMK, ki je bilo najbolj izrazito 2 ali 3 dni po zagonu poskusa. Neučinkovitost te metode izboljšanja produkcije bioplina je morda posledica neustreznosti izbrane encimsko mikrobne mešanice za naš substrat ali pa njena aktivnost ne traja dovolj dolgo. Težave lahko predstavlja tudi spremenljivost sestave surovega blata na CČN. Morda bi nam lahko kakšna druga encimsko mikrobna mešanica nudila boljše rezultate.

Pri preverjanju primernosti dveh odpadnih fermentacijskih brozg iz farmacevtske industrije za anaerobno razgradnjo smo najboljše rezultate dobili pri brozgi T. Ta je namreč izkazovala zelo podobno razgradljivost in posledično podobno količino (do 8 % manj) proizvedenega bioplina kot surovo blato. Zaradi tega proizvodnja bioplina iz te brozge nebi smela povzročati nikakršnih težav. Volumen proizvedenega bioplina iz brozge V je bil sicer nekoliko manjši kot iz surovega blata (do 43 % manj proizvedenega bioplina), vendar kljub temu tudi ta brozga izkazuje veliko potenciala za razgradnjo v bioplinskem reaktorju. Opazili smo tudi nekoliko večji vpliv na sestavo mikrobne združbe bioplinskega reaktorja, kar je bilo najverjetneje posledica postopne prilagoditve združbe na nov substrat. Učinkovitost njegove pretvorbe v bioplin se je namreč pri podaljšanem poskusu sčasoma povečala. Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da bi bili obe testirani brozgi uporabni kot dodaten substrat, ki bi se v bioplinske reaktorje CČN dovajal skupaj s surovim blatom. Volumen dodanih brozg bo v primerjavi z volumenom dodanega surovega blata precej manjši kot v naših poskusih, zaradi česar bo njun vpliv na produkcijo bioplina še manjši. Poleg tega se bo na ta način CČN izognila morebitnim negativnim vplivom na aerobno stopnjo čiščenja, ki jih lahko imajo takšne brozge.

Naši rezultati so precej spodbudni, saj smo potrdili uporabnost ene izmed obeh testiranih metod izboljšanja produkcije bioplina ter smotrnost uporabe obeh testiranih odpadnih fermentacijskih brozg za proizvodnjo bioplina. V prihodnje bi bilo dobro preveriti ustreznost še kakšne metode izboljšanja produkcije bioplina na CČN. Največ potenciala tako kažejo različni načini dezintegracije surovega blata. Koristno bi bilo testirati tudi uporabnost še kakšne druge odpadne fermentacijske brozge kot substrat za proizvodnjo bioplina, saj bi tako ponovno lahko povečali njegovo proizvedeno količino in hkrati zmanjšali verjetnost negativnih vplivov na aerobno stopnjo čiščenja odpadne vode.

8 VIRI

- Angelidaki I., Ahring B.K. 2000. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Science and Technology*, 41, 3: 189-194
- Apul O. G., Sanin F. D. 2010. Ultrasonic pretreatment and subsequent anaerobic digestion under different operational conditions. *Bioresource Technology*, 101: 8984-8992
- Athanasoulia E., Melidis P., Aivasidis A. 2012. Optimization of biogas production from waste activated sludge through serial digestion. *Renewable Energy*, 47: 147-151
- Bodik I., Sedláček S., Kubaská M., Hutňan M. 2011. Biogas production in municipal wastewater treatment plants – current status in EU with a focus on the Slovak republic. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25, 3: 335-340
- Braguglia C. M., Gianico A., Mininni G. 2011. Laboratory-scale ultrasound pre-treated digestion of sludge: Heat and energy balance. *Bioresource Technology*, 102: 7567-7573
- Bruni E., Jensen A.P., Angelidaki I. 2010a. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology*, 101: 8713-8717
- Bruni E., Jensen A.P., Angelidaki I. 2010b. Steam treatment of digested biofibers for increasing biogas production. *Bioresource Technology*, 101: 7668-7671
- Carballa M., Omil F., Ternes T., Lema J.M. 2007. Fate of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) during anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 41: 2139-2150
- Carrere H., Dumas C., Battimelli A., Batstone D.J., Delgenès J.P., Steyer J.P., Ferrer I. 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 183: 1-15
- Chi Y., Li Y., Fei X., Wang S., Yuan H. 2011. Enhancement of thermophilic anaerobic digestion of thickened waste activated sludge by combined microwave and alkaline pretreatment. *Journal of Environmental Sciences*, 23, 8: 1257-1265
- Chenxi L. 2012. Using anaerobic co-digestion with addition of municipal organic wastes and pre-treatment to enhance biogas production from wastewater treatment plant sludge. PhD. Kingston, Queen's University Kingston: 285 str.
- Chenxi W., Spongberg A.L., Witter J.D. 2008. Determination of the persistence of pharmaceuticals in biosolids using liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 73, 4: 511-518
- Coelho N.M.G., Droste R. L., Kennedy K. J. 2011. Evaluation of continuous mesophilic, thermophilic and temperature phased anaerobic digestion of microwaved activated sludge. *Water Research*, 45: 2822-2834

- Damasceno F.R.C., Cammarota M.C., Freire D.M.G. 2012. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95: 241-246
- DeLong E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5685-5689
- Deublein D., Steinhauser A. 2008. *Biogas from waste and renewable resources*. Weinheim, Wiley-VCH: 443 str.
- Dhar B.R., Youssef E., Nakhla G., Ray M.B. 2011. Pretreatment of municipal waste activated sludge for volatile sulfur compounds control in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 102: 3776-3782
- Direktiva sveta z dne 21. maja 1991 o čiščenju komunalne odpadne vode. 91/271/EGS. 1991. Uradni list evropskih skupnosti, 34, L135: 40-52
- Elagroudy S., El-Gohary F. 2013. Microwave pretreatment of mixed sludge for anaerobic digestion enhancement. *International Journal of Thermal and Environmental Engineering*, 5, 2: 105-111
- Garcia J.L., Patel B.K.C., Ollivier B. 2000. Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe*, 6: 205-226
- Gomes D.R.S., Papa L.G., Cichello G.C.V., Belançon D., Pozzi E.G., Balieiro J.C.C., Monterrey-Quintero E.S., Tommaso G. 2011. Effect of enzymatic pretreatment and increasing the organic loading rate of lipid-rich wastewater treated in a hybrid UASB reactor. *Desalination*, 279: 96-103
- Großkopf R., Janssen P.H., Liesack W. 1998. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3: 960-969
- Hartmann H., Angelidaki I., Ahring B.K. 2000. Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration. *Water Science and Technology*, 41, 3: 145-153
- Heidari M., Nabavi B.F., Khouzani H.S., Amin M.M. 2012. Inhibition effects of antibiotics ampicillin and gentamycin on the methanogenic activity of anaerobic biomass. *International Journal of Environmental Health Engineering*, 1, 3: 1-6
- Holdeman, L. V., Cato, E. P., Moore, W. E. C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*. 4th ed. Blacksburg, VPI: 156 str.
- Jenicek P., Bartacek J., Kutil J., Zabranska J., Dohanyos M. 2012. Potentials and limits of anaerobic digestion of sewage sludge: Energy self-sufficient municipal wastewater treatment plant?. *Water Science and Technology*, 66, 6: 1277-1281

- Kim J., Park C., Kim T.-H., Lee M., Kim S., Kim S.-W., Lee J. 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95, 3: 271-275
- Kuglarz M., Karakashev D., Angelidaki I. 2013. Microwave and thermal pretreatment as methods for increasing the biogas potential of secondary sludge from municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 134: 290-297
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. V: *Nucleic acids techniques in bacterial systematics*. Stackebrand E., Goodfellow M. (eds.). Chichester, Wiley: 115-148
- Luste S., Vilhunen S., Luostarinen S. 2011. Effect of ultrasound and addition of bacterial product on hydrolysis of by-products from the meat-processing industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 318-325
- Marinšek-Logar R. 1992. Vpliv razdalje med sintrofnimi partnerji na metanogeno aktivnost v modelnih alginatnih kroglicah. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 224 str.
- Masse L., Massé D.I., Kennedy K.J. 2003. Effect of hydrolysis pretreatment on fat degradation during anaerobic digestion of slaughterhouse wastewater. *Process Biochemistry*, 38: 1365-1372
- Mshandete A., Björnsson L., Kivaisi A.K., Rubindamayugi S.T., Mattiasson B. 2005. Enhancement of anaerobic batch digestion of sisal pulp waste by mesophilic aerobic pre-treatment. *Water Research*, 39: 1569-1575
- Onyeché T.I. 2007. Economic benefits of low pressure sludge homogenization for wastewater treatment plants. V: *IWA specialist conferences: Moving forward wastewater biosolids sustainability*, Moncton, 24.-27.6.2007. LeBlanc R. J., Laughton P. J., Tyagi R. (eds.). Moncton, Greater Moncton Sewerage Commission: 417-422
- Park B., Ahn J.-H., Kim J., Hwang S. 2004. Use of microwave pretreatment for enhanced anaerobiosis of secondary sludge. *Water Science and Technology*, 50, 9: 17-23
- Park C., Lee C., Kim S., Chen Y., Chase H.A. 2005. Upgrading of anaerobic digestion by incorporating two different hydrolysis processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 2: 164-167
- Park W.-J., Ahn J.-H. 2011. Effects of microwave pretreatment on mesophilic anaerobic digestion for mixture of primary and secondary sludges compared with thermal pretreatment. *Environmental Engineering Research*, 16, 2: 103-109
- Pilli S., Bhunia P., Yan S., LeBlanc R. J., Tyagi R. D., Surampalli R.Y. 2011. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18: 1-18
- Rani R. U., Kumar S. A., Kaliappan S., Yeom I. T., Banu J. R. 2012. Low temperature thermo-chemical pretreatment of dairy waste activated sludge for anaerobic digestion process. *Bioresource Technology*, 103: 415-424

- Standard methods for the examination of water and wastewater. 2005. 2540 Solids. 21st ed. Washington, American Public Health Association: 7 str.
<http://www.standardmethods.org/store/ProductView.cfm?ProductID=63> (18.10.2010).
- Stasinakis A. S. 2012. Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 121: 423-444
- Stephenson R.J., Laliberte S., Hoy P.M. and Britch D. 2007. Full scale and laboratory scale results from the trial of microsludge at the joint water pollution control plant at Los Angeles County. V: IWA specialist conferences: Moving forward wastewater biosolids sustainability, Moncton, 24.-27.6.2007. LeBlanc R. J., Laughton P. J., Tyagi R. (eds.). Moncton, Greater Moncton Sewerage Commission: 739-746
- Stražar M. 2009. Interno poročilo o mikrobiološki analizi gnilišč. Domžale. Centralna čistilna naprava Domžale-Kamnik: 10 str.
- Taherzadeh M. J., Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 1621-1651
- Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. 2003. Wastewater engineering: treatment and reuse. 4th ed. Dubuque, McGraw-Hill: 1848 str.
- Toreci I., Kennedy K.J., Droste R.L. 2009. Evaluation of continuous mesophilic anaerobic sludge digestion after high temperature microwave pretreatment. *Water Research*, 43: 1273-1284
- Tyagi V.K., Lo S.L. 2013. Microwave irradiation: A sustainable way for sludge treatment and resource recovery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 18: 288-305
- Vanyushina A.Y., Nikolaev Y.A., Agarev A.M., Kevbrina M.F., Kozlov M.N. 2012. Anaerobic thermophilic digestion of sewage sludge with a thickened sludge recycle. *Water Science & Technology*, 65, 3: 403-409
- Vítěz T., Haitl M., Karafiát Z., Mach P., Fryč J., Lošák T., Szostková M. 2011. Use of bio-enzymatic preparations for enhancement biogas production. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 59, 26: 203-208
- Warthmann R., Baum S., Baier U., Meier U., Hersener J.-L. 2012. Massnahmen zur Optimierung der Vergärung durch Vorbehandlung, Prozess- und Verfahrenstechnik und Hilfsstoffe. Bern, Bundesamt für Energie: 49 str.
http://www.bfe.admin.ch/php/includes/container/enet/flex_enet_anzeige.php?lang=en&publication=10948&height=400&width=600 (20.6.2013)
- Watanabe K., Kodama Y., Harayama S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 3: 253-262
- Weemaes M., Grootaerd H., Simoens F., Verstraete W. 2000. Anaerobic digestion of ozonized biosolids. *Water Research*, 34, 8: 2330-2336

Young M. N., Brown R. K., Liu W., Doyle M.L., Rittmann B.E. 2013. The role of anaerobic sludge recycle in improving anaerobic digester performance. *Bioresource Technology*, 128: 731-737

Zhong W., Zhang Z., Luo Y., Sun S., Qiao W., Xiao M. 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*, 102: 11177-11182

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem:

Svoji mentorici prof. dr. Romani Marinšek-Logar za ves vložen čas in za vso pomoč ter svetovanje pri izvedbi celotne naloge.

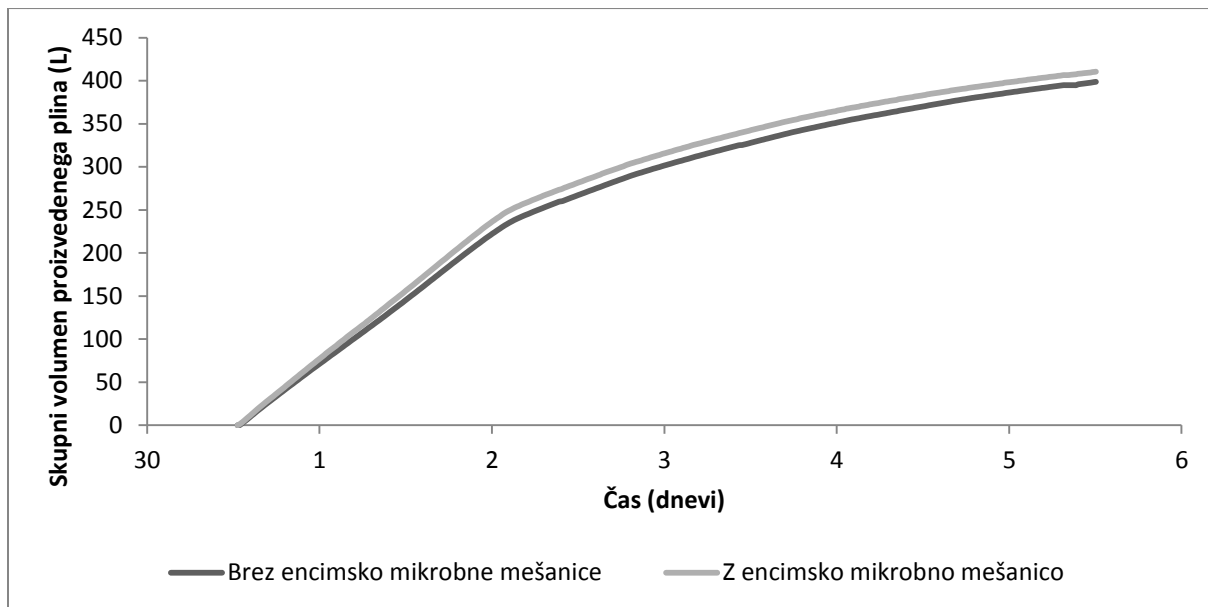
Dr. Marjeti Stražar in vsem zaposlenim na Centralni čistilni napravi Domžale – Kamnik, da so mi omogočili izvedbo eksperimentalnega dela naloge pri njih.

Asistentkama dr. Lijani Fanedl in dr. Maši Zorec ter tehnični sodelavki Marti Majdič za nesebično pomoč in svetovanje pri izvedbi vseh analitskih metod.

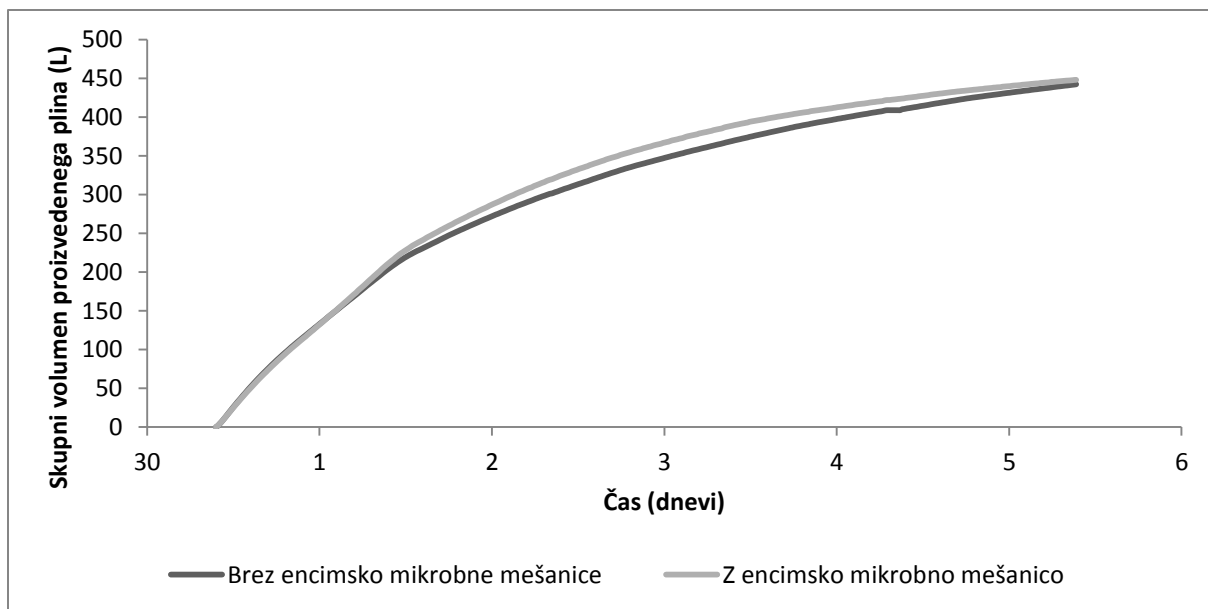
Dr. Alešu Podgorniku za strokovno recenzijo tega dela.

PRILOGE

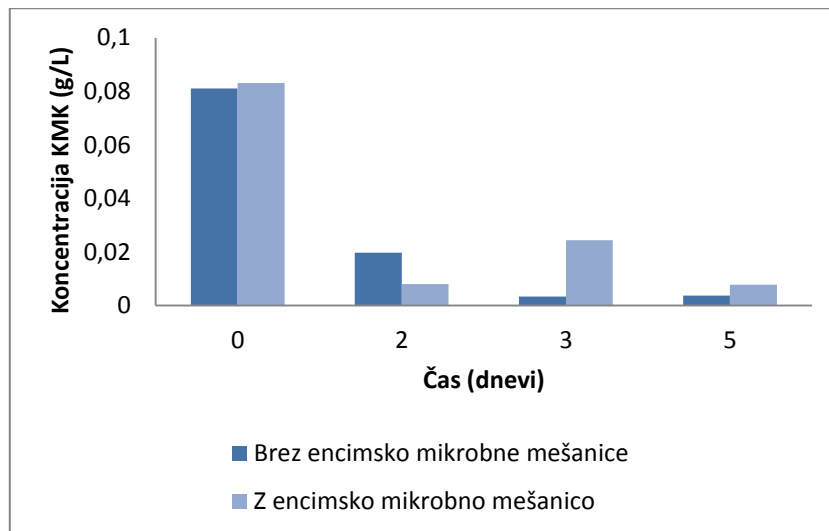
Priloga A: Vpliv dodane encimsko mikrobn mešanice B120 (Bio-Systems) na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju



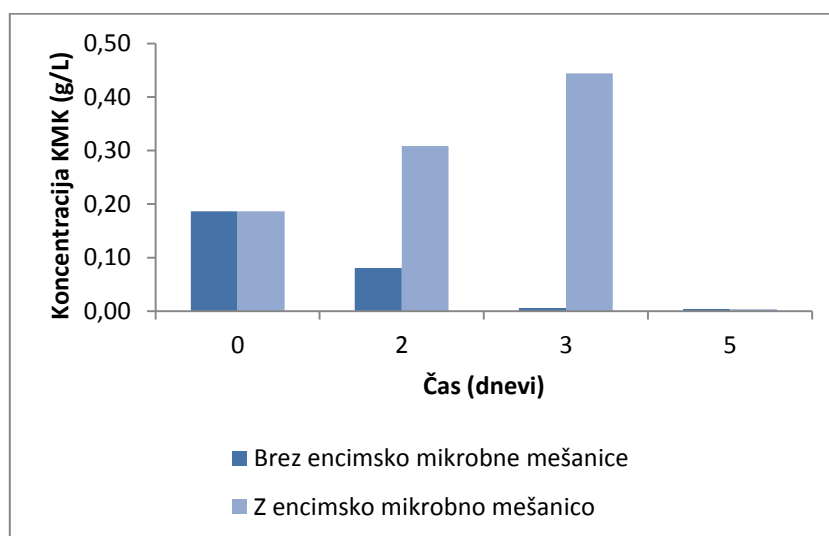
Priloga A1: Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobn mešanico (2. ponovitev)



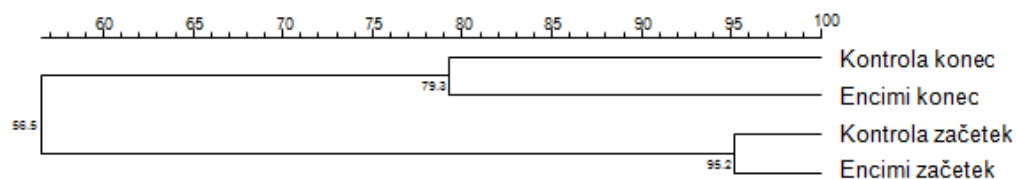
Priloga A2: Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobn mešanico (3. ponovitev)



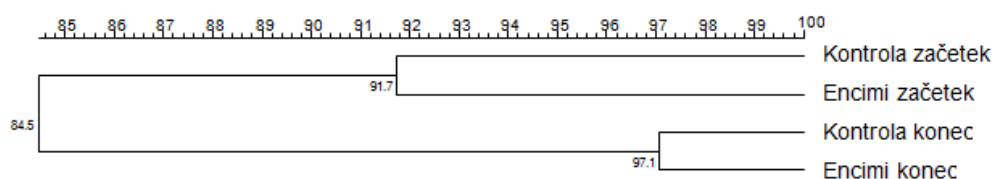
Priloga A3: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico (1. ponovitev)



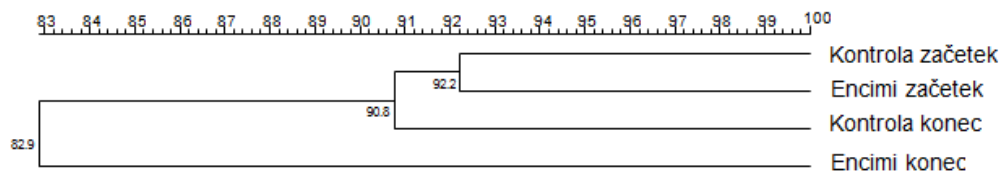
Priloga A4: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodano encimsko mikrobno mešanico (3. ponovitev)



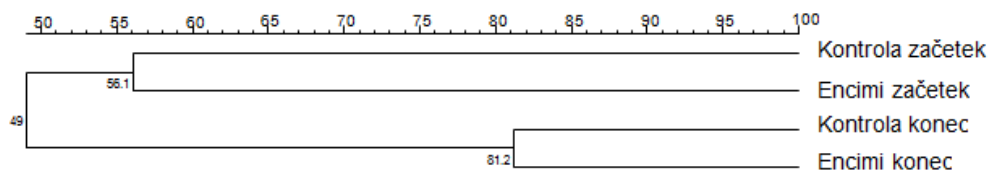
Priloga A5: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice. (1. ponovitev) Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.



Priloga A6: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice. (3. ponovitev) Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

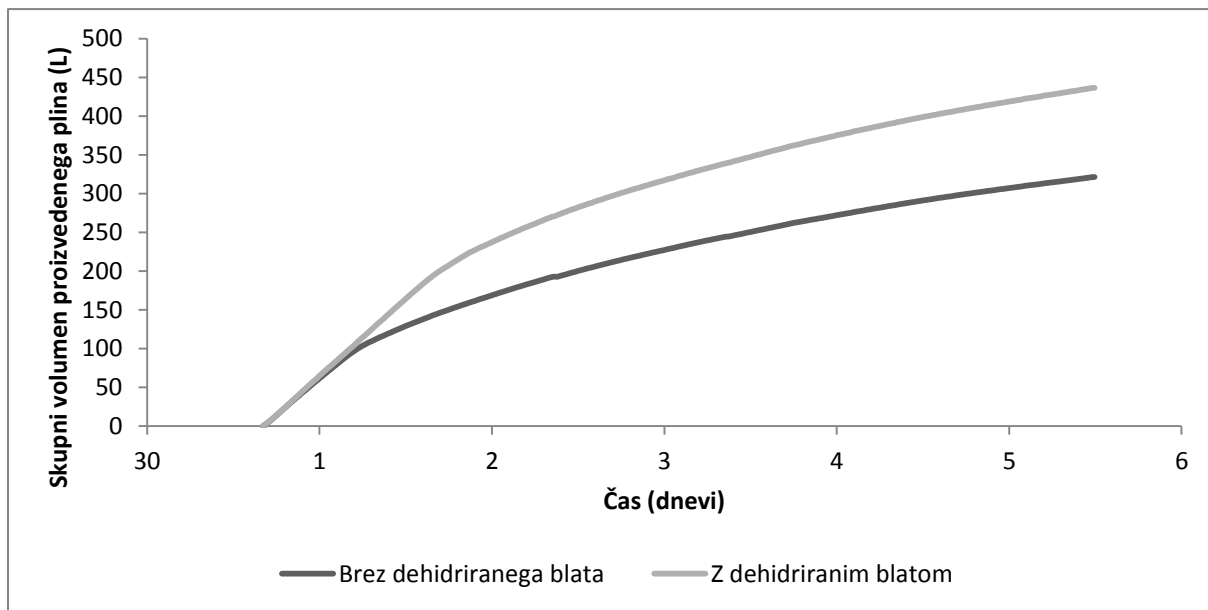


Priloga A7: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice (2. ponovitev). Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

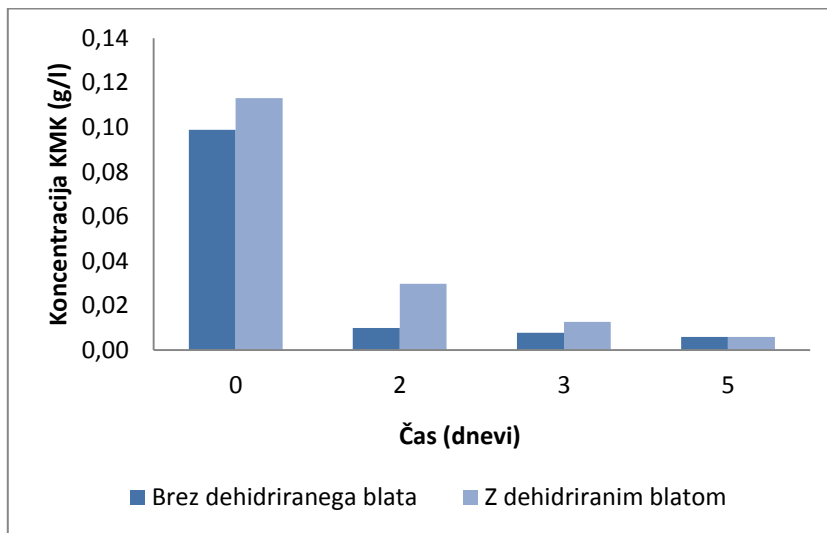


Priloga A8: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z dodajanjem encimsko mikrobne mešanice (3. ponovitev). Oznaka »Encimi« označuje reaktor, v katerega je bila dodana encimsko mikrobna mešanica, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega encimsko mikrobna mešanica ni bila dodana. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

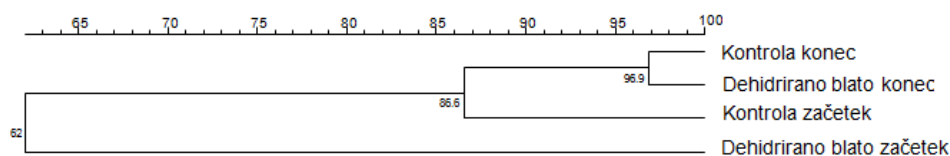
Priloga B: Vpliv vračanja dehidriranega blata na proizvodnjo bioplina in sestavo mikrobne združbe



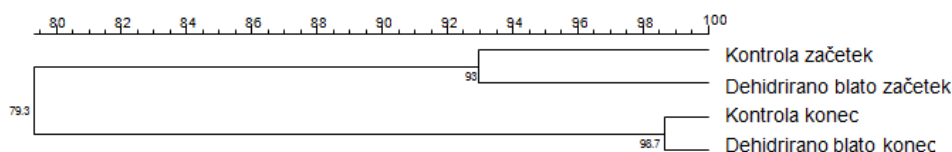
Priloga B1: Kumulativna produkcija bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom (1. ponovitev)



Priloga B2: : Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz surovega blata brez in z dodanim dehidriranim blatom (1. ponovitev)



Priloga B3: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor (1. ponovitev). Oznaka »dehidrirano blato« označuje reaktor, v katerega je bilo to dodano, oznaka »kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega dehidrirano blato ni bilo dodano. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

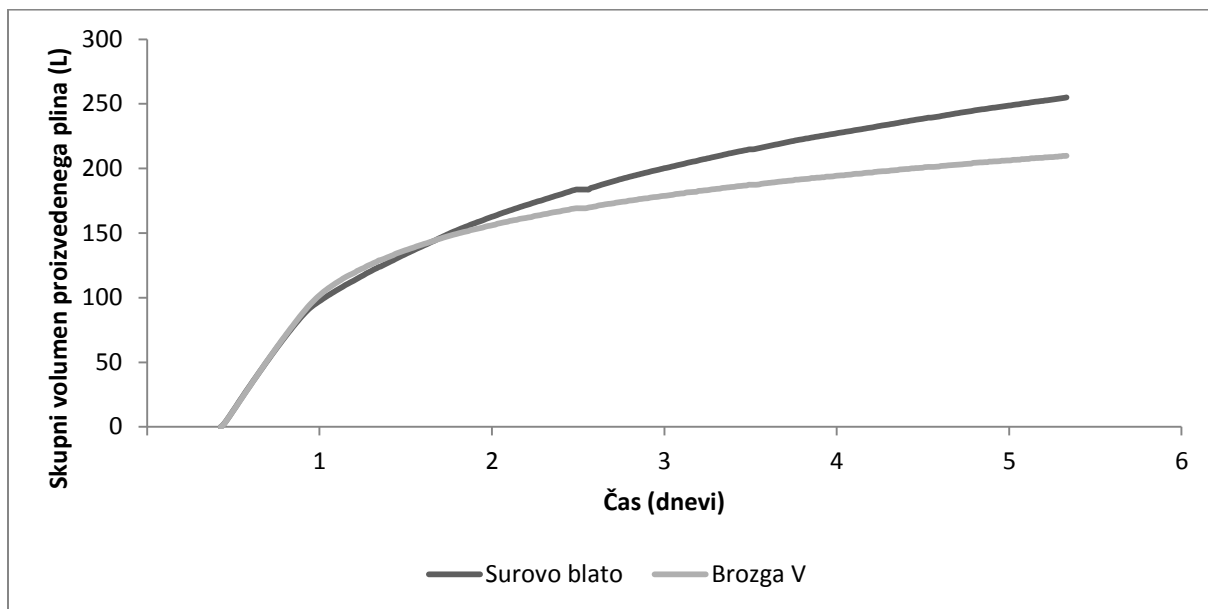


Priloga B4: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu z vračanjem dehidriranega blata v bioplinski reaktor (1. ponovitev). Oznaka »dehidrirano blato« označuje reaktor, v katerega je bilo to dodano, oznaka »kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerega dehidrirano blato ni bilo dodano. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

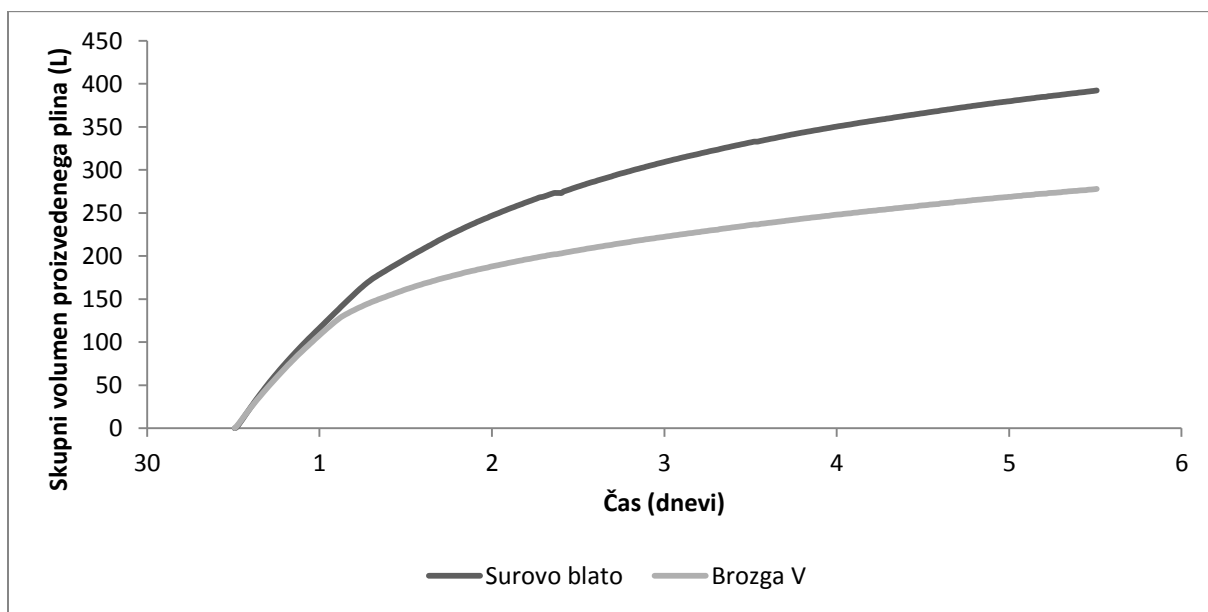
Priloga B5: Dodatne analize rezultatov

Reaktor in ponovitev	Skupna produkcija (L)	Čas trajanja poskusa (h)	Povprečna produkcija na uro	Produkcija po 100 urah	Produkcija (100h) glede na dodan KPK (L/g)
Brez deh. blata, 1. ponovitev	321,4	115,75	2,78	272,0	0,25
Brez deh. blata 2. ponovitev	297,5	127,25	2,34	274,5	0,40
Deh. blato 1. ponovitev	436,5	115,75	3,77	412,4	0,24
Deh. blato 2. ponovitev	413,7	127,25	3,25	386,5	0,41

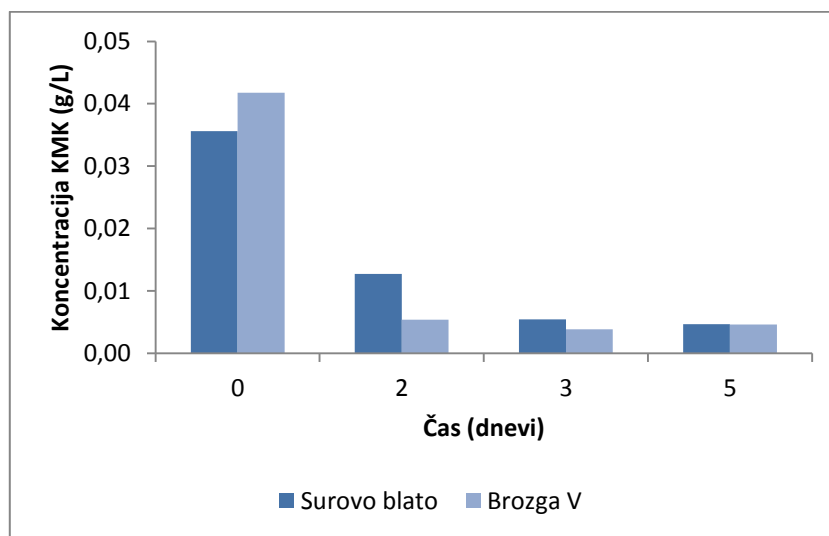
Priloga C: Proizvodnja bioplina iz odpadne fermentacijske brozge V iz farmacevtske industrije in njen vpliv na sestavo mikrobne združbe v bioreaktorju



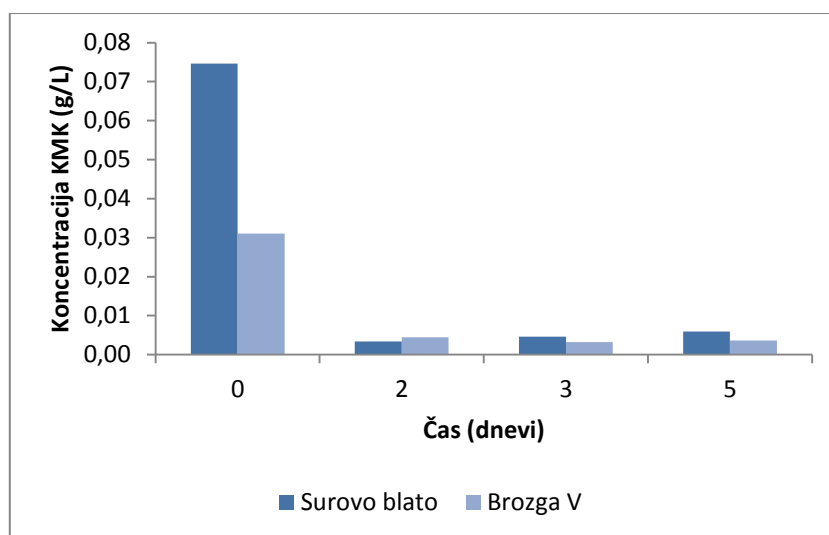
Priloga C1: Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom (4. ponovitev)



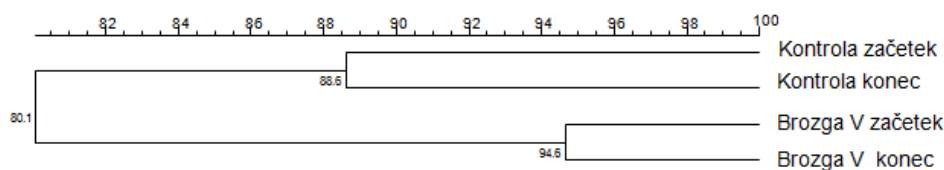
Priloga C2: Kumulativna produkcija bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom (1. ponovitev)



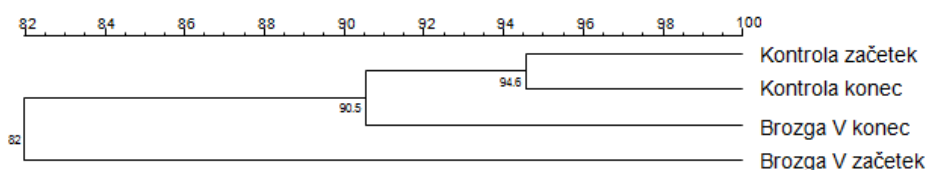
Priloga C3: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (2. ponovitev)



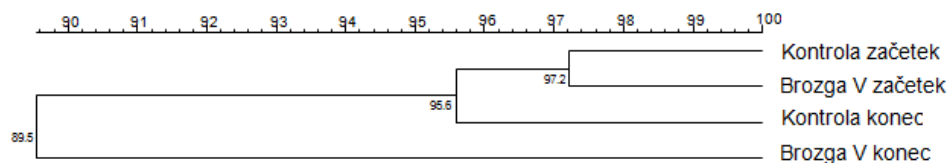
Priloga C4: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz brozge V v primerjavi s surovim blatom. Prikazani so rezultati najbolj reprezentativnega poskusa (3. ponovitev)



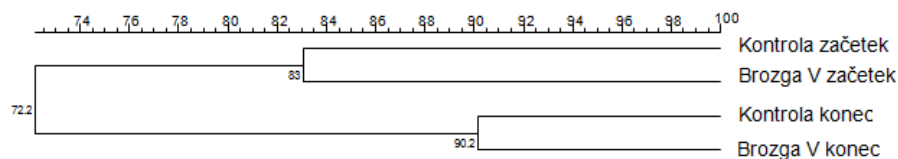
Priloga C5: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V (1. ponovitev). Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.



Priloga C6: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V (2. ponovitev). Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

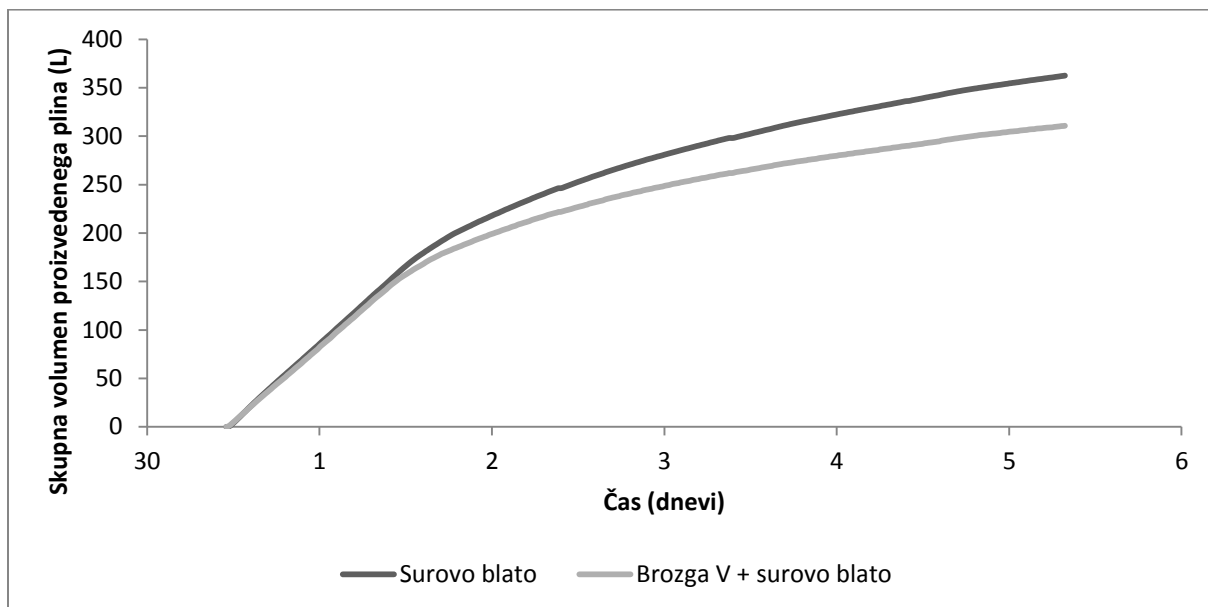


Priloga C7: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V (1. ponovitev). Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem je ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

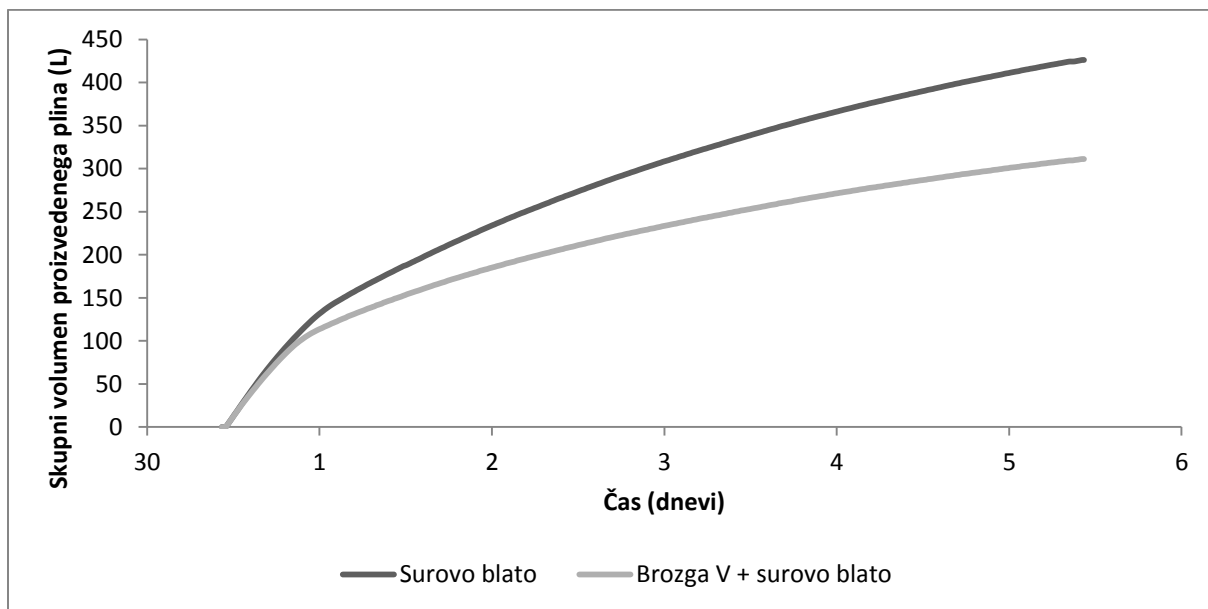


Priloga C8: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz brozge V (2. ponovitev). Oznaka »Brozga V« označuje reaktor, v katerem je ta služila kot substrat, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

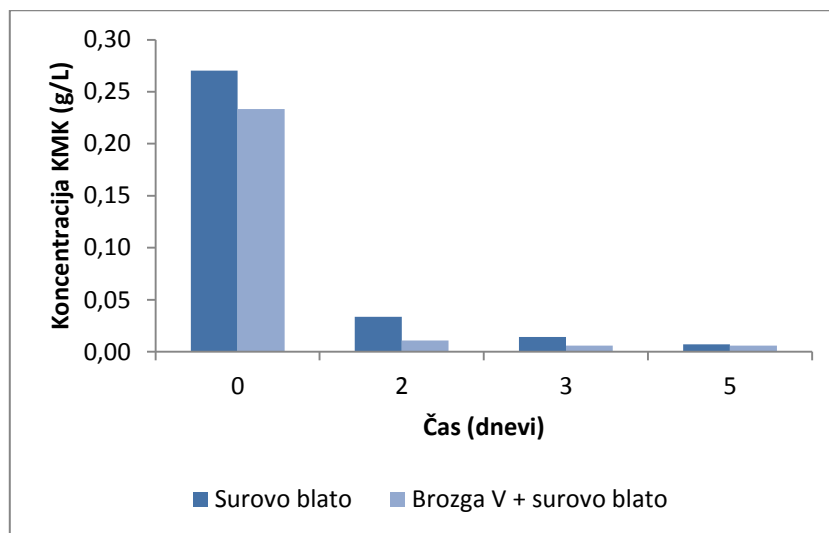
Priloga D: Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge V in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe



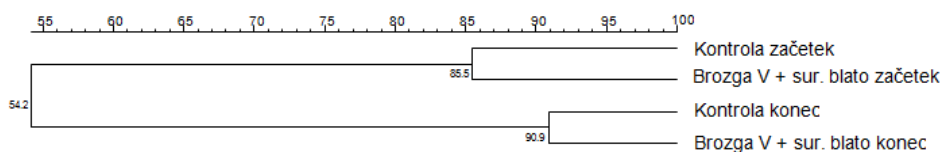
Priloga D1: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom (3. ponovitev)



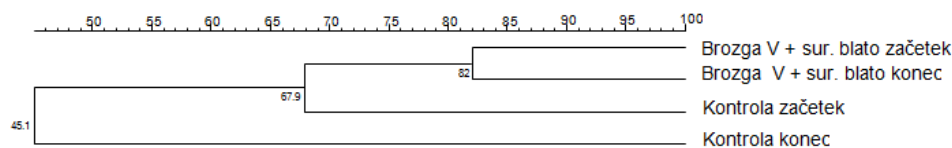
Priloga D2: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. Predstavljenih je prvih 5 dni podaljšane poskusa s kombinacijo brozge V in surovega blata. V tem obdobju je zasnova poskusa enaka kot pri ostalih poskusih s kombiniranjem brozge V in surovega blata.



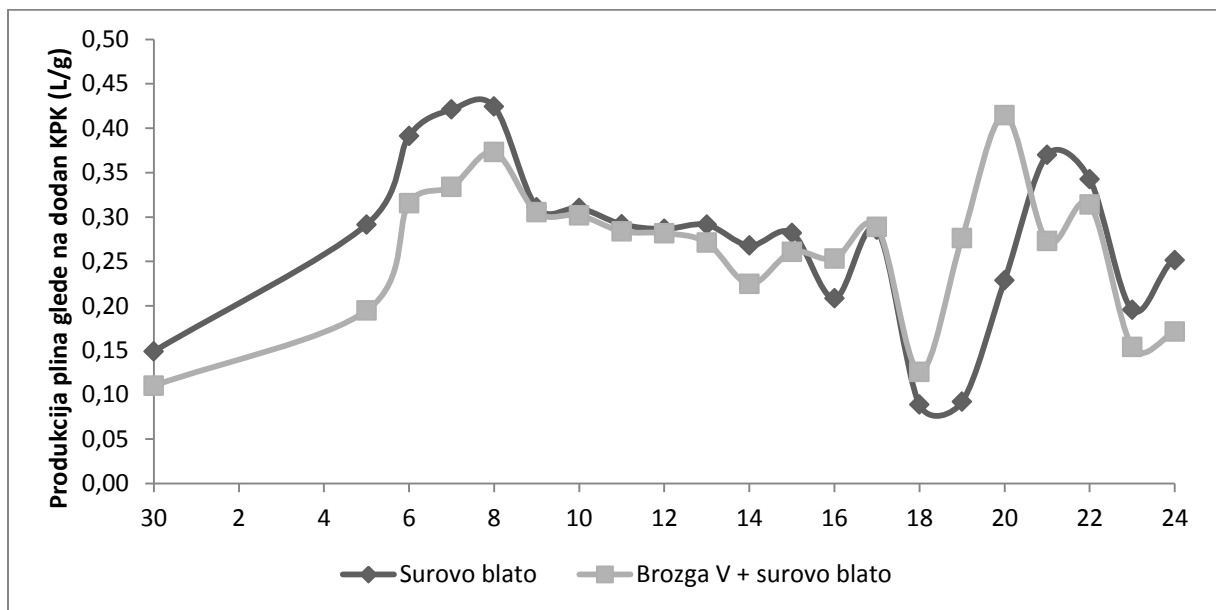
Priloga D3: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom (3. ponovitev)



Priloga D4: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom (1. ponovitev). Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem sta nam kot substrat služila brozga V in surovo blato, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

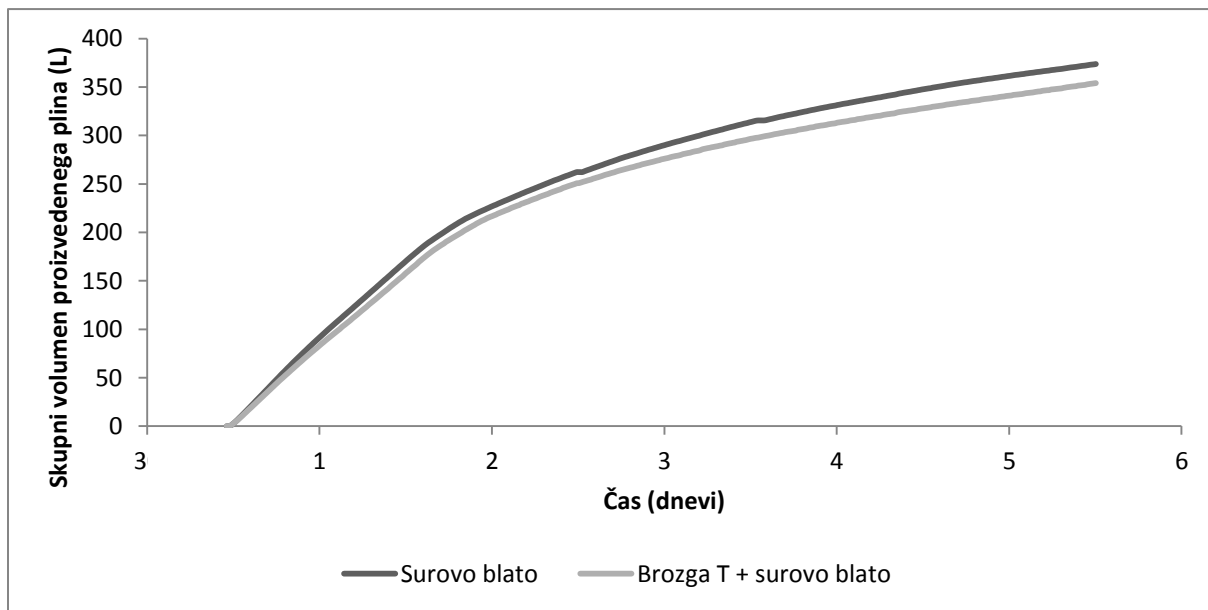


Priloga D5: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge V s surovim blatom (3. ponovitev). Oznaka »Brozga V + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge V in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.

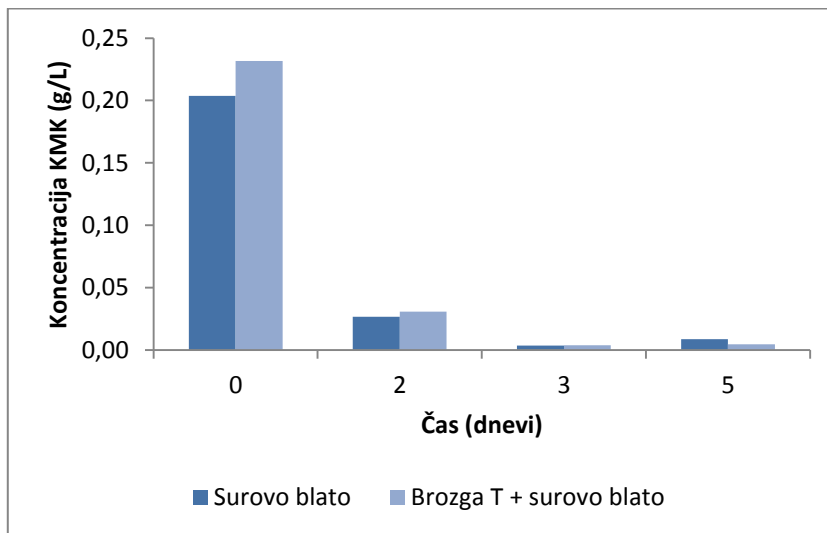


Priloga E: Produkcija bioplina iz brozge V in surovega blata v primerjavi s surovim blatom glede na količino dodanega KPK v 24 urah po zadnjem dodajanju substrata v reaktor.

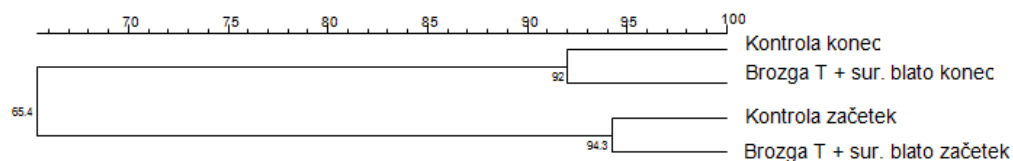
Priloga F: Proizvodnja bioplina iz mešanice brozge T in surovega blata ter njen vpliv na sestavo mikrobne združbe



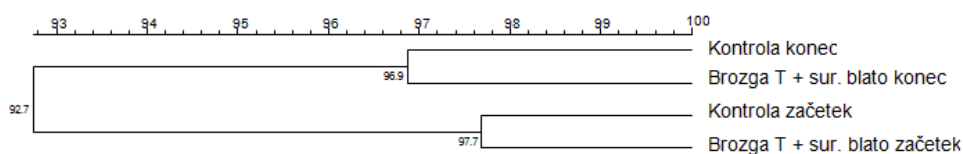
Priloga F1: Kumulativna produkcija bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom. (2. ponovitev)



Priloga F2: Koncentracije KMK v bioplinskem reaktorju pri proizvodnji bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom v primerjavi s surovim blatom (1. ponovitev)



Priloga F3: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom (1. ponovitev). Oznaka »Brozga T + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge T in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.



Priloga F4: Dendrogram profilov tipizacije arhejske združbe v poskusu proizvodnje bioplina iz kombinacije brozge T s surovim blatom (2. ponovitev). Oznaka »Brozga T + sur. blato« označuje reaktor, v katerem nam je kot substrat služila mešanica brozge T in surovega blata, oznaka »Kontrola« pa kontrolni reaktor, v katerem je bil substrat le surovo blato. »Začetek« označuje vzorce iz začetka, »konec« pa vzorce iz konca poskusa – po petih pretečenih dneh. Vrednosti na osi in razvejiščih so % podobnosti.