

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jure BREČKO

**VPLIV DODAJANJA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ
GLUKOZE V FERMENTACIJSKI MEDIJ NA
PROIZVODNJO BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Domžale, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Jure BREČKO

**VPLIV DODAJANJA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ GLUKOZE V
FERMENTACIJSKI MEDIJ NA PROIZVODNJO BIOPLINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF DIFFERENT GLUCOSE CONCENTRATIONS IN
FERMENTATION MEDIUM ON THE BIOGAS PRODUCTION**

GRADUATION THESIS
University studies

Domžale, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva – zootehnika.

Opravljeno je bilo na CČN Domžale-Kamnik in na Katedri za mikrobiologijo in biotehnologijo Oddelka za zootehniko.

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

Recenzent: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Član: prof. dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Jure BREČKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579(043.2)=163.6
KG	bioplin/anaerobna fermentacija/mikrobiologija/metanogeneza
KK	AGRIS/
AV	BREČKO, Jure
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
KZ	SI – 1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2014
IN	VPLIV DODAJANJA RAZLIČNIH KONCENTRACIJ GLUKOZE V FERMENTACIJSKI MEDIJ NA PROIZVODNJO BIOPLINA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 44 str., 16 pregl., 14 sl., 27 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proizvodnja bioplina postaja vse bolj pomembna iz vidika oskrbe z obnovljivo energijo. Preprečevanje nastajanja in zmanjševanje količine odpadkov postaja pomemben del zmanjševanja onesnaževanja okolja, zmanjševanja toplogrednih emisij in ublažitev globalnih klimatskih sprememb. Z raziskavo smo želeli preveriti, kako se spreminja proizvodnja bioplina ob dodatkih različnih koncentracij glukoze v testu biometanskega potenciala (BMP1, BMP2). Hkrati smo želeli preveriti, kako se ob dnevnih dodatkih standardne raztopine glukoze spreminjajo kemijski ter fizikalni dejavniki poskusa (BMP3). Test biometanskega potenciala smo opravili v treh pet dnevnih intervalih, v katerih smo dodajali standardno raztopino glukoze, opravili smo ga ob štirih različnih obremenitvah mikrobne biomase. Obremenitve z standardno raztopino glukoze so bile Standard 1ml 0,32g KPK/l vsebine v bioreaktorju, Standard 2ml 0,64 g KPK/l, Standard 3ml 0,96 g KPK/l ter Standard 4ml 1,28 g KPK/l. Rezultati so pokazali, da večja količina dodane glukoze povzroči večjo mikrobno proizvodnjo bioplina, saj imajo mikroorganizmi na voljo več substrata. V vseh poskusih BMP je proces proizvodnje bioplina potekal nemoteno, hkrati nismo zaznali znižane vrednosti pH in KMK, kar pomeni da tudi dodatki najvišje koncentracije glukoze niso preobremenili procesa anaerobne fermentacije. To dokazuje, da bi lahko test BMP opravljali tudi pri višjih obremenitvah s substratom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDK 579(043.2)=163.6
 CX Biogas/anaerobic fermentation/microbiology/methanogenesis
 CC AGRIS/
 AU BREČKO, Jure
 AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
 PP SI – 1230 Domžale, Groblje 3
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science
 PY 2014
 TI INFLUENCE OF DIFFERENT GLUCOSE CONCENTRATIONS IN
 FERMENTATION MEDIUM ON THE BIOGAS PRODUCTION
 DT Graduation thesis, (University studies)
 NO IX, 44 p., 16 tab., 14 fig., 27 ref.
 LA sl
 AL sl / en
 AB Biogas production is becoming increasingly important in terms of renewable energy supply. Prevention and reduction of waste deposits is becoming an important part of reducing pollution, reducing greenhouse gas effect emissions and reducing global climate change. The aim of the study was to determine the effect of adding different values of COD loads of standard solutions of glucose to the process of biogas production in biomethane potential test (BMP1, BMP2). In BMP3 test, our aim was to check the effect of daily supplement of standard solutions of glucose on chemical and physical parameters of the experiment. Biomethane potential (BMP1, BMP2) test was carried out in three five days intervals in which we added standard solution of glucose. The test was performed at four different COD loads of microbial biomass. Loads of standard solutions of glucose were Standard 1ml 0,32 g COD/l , Standard 2ml 0,64 g COD/l, Standard 3ml 0,96 g COD/l and Standard 4ml 1,28 g COD/L. The results showed that increasing the amount of added glucose results in increased microbial production of biogas, because microbial biomass has more substrate available to them. The process of biogas production has completed successfully in all tests and we did not record any reduced values of pH or VGA. We conclude that adding our highest concentrations of glucose did not overload the sistem and the process of anaerobic fermentation. This proves that biomethane potential test could be performed at higher substrate loads.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	1
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOPLIN	3
2.2 MIKROBIOLOŠKI PROCES ANAEROBNE FERMENTACIJE	3
2.2.1 Hidroliza	5
2.2.2 Acidogeneza	5
2.2.3 Acetogeneza	5
2.2.4 Metanogeneza	6
2.3 VPLIV POSAMEZNIH DEJAVNIKOV NA ANAEROBNO FERMENTACIJO ORGANSKIH SNOVI	6
2.3.1 pH	6
2.3.2 Temperatura	7
2.3.3 Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)	8
2.3.4 Alkaliteta	8
2.4 BIOREAKTOR Oxitop® Control	9
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Postopek priprave inokuluma	11
3.1.2 Referenčni substrat – glukoza	11
3.1.3 Pufrska raztopina	11
3.1.4 Vodovodna voda	12
3.1.5 Plinasti dušik	12
3.1.6 Steklenice	12
3.1.7 Merilne glave za meritev tlaka	12
3.1.8 Inkubator – stresalnik	12
3.2 METODE	13
3.2.1 Metoda za določanje KPK	13
3.2.2 Metoda za določanje KMK	13
3.2.3 Metoda za določanje alkalitete	13
3.2.4 Metoda za določanje proizvodnje bioplina	14
3.2.5 Izvedba metode BMP in sestava testnih mešanic	14

3.3	MERITVE	18
3.4	IZRAČUNI	19
4	REZULTATI	21
4.1	POSKUSA BMP1 IN BMP2	21
4.1.1	VREDNOSTI pH v poskusih BMP1 in BMP2	21
4.1.2	Količine KPK v poskusih BMP1 in BMP2	22
4.1.3	Koncentracije KMK v poskusih BMP1 in BMP2	23
4.1.4	Alkaliteta v poskusih BMP1 in BMP2	24
4.1.5	Naraščanje tlaka v poskusih BMP1 in BMP2	25
4.1.6	Izmerjeni tlak v intervalu 5 dni v poskusih BMP1 in BMP2	28
4.1.7	Izračunana prostornina bioplina v intervalu 5 dni v poskusih BMP1 in BMP2	29
4.2	POSKUS BMP3	30
4.2.1	Vrednosti pH v poskusu BMP3	30
4.2.2	Vrednosti KPK v poskusu BMP3	31
4.2.3	Koncentracije KMK v poskusu BMP3	31
4.2.4	Alkaliteta v poskusu BMP3	32
4.2.5	Naraščanje tlaka v poskusu BMP3	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
6	POVZETEK	39
7	VIRI	41

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Toplotna območja anaerobne fermentacije	7
Preglednica 2: Sestava testnih mešanic za BMP1, BMP2	17
Preglednica 3: Sestava testne mešanice za BMP3	18
Preglednica 4: Količine KPK na začetku ter koncu poskusa BMP1	23
Preglednica 5: Količine KPK v poskusu BMP2	23
Preglednica 6: Koncentracije KMK na začetku ter na koncu poskusa BMP1	24
Preglednica 7: Koncentracije KMK na začetku ter na koncu poskusa BMP2	24
Preglednica 8: Alkaliteta na začetku ter na koncu poskusa BMP1	25
Preglednica 9: Alkaliteta na začetku, po 5 dnev, po 10 dnev ter na koncu BMP2	25
Preglednica 10: Izmerjeni tlak (hPa) v intervalu (P) 5 dni v poskusu BMP1	28
Preglednica 11: Izmerjeni tlak (hPa) v intervalu (P) 5 dni v BMP2	28
Preglednica 12: Razlika v izmerjenem tlaku v 5 dnevnih intervalih v BMP1 (hPa)	29
Preglednica 13: Razlika v izmerjenem tlaku v 5 dnevnih intervalih v BMP2 (hPa)	29
Preglednica 14: Izračunana prostornina plina (ml) v intervalu 5 dni v BMP1	29
Preglednica 15: Izračunana prostornina plina (ml) v 5 dnevnih intervalih v BMP2.....	29
Preglednica 16: Skupna prostornina proizvedenega plina (ml) v poskusih BMP1 in BMP2 ..	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Mikrobiološki proces anaerobne fermentacije (prirejeno po Parawira, 2004: 10)	4
Slika 2: Izvedba poskusa anaerobne fermentacije v bioreaktorjih OXITOP® CONTROL z merilnimi glavami	9
Slika 3: Primer krivulje anaerobne fermentacije v BMP pri dodatkih 1, 2 in 4 ml glukoze	20
Slika 4: Izmerjene pH vrednosti v poskusu BMP1	21
Slika 5: Izmerjene vrednosti pH v poskusu BMP2	22
Slika 6: Naraščanje tlaka v poskusu BMP1 (direktne meritve)	26
Slika 7: Naraščanje tlaka v poskusu BMP2 (direktne meritve)	26
Slika 8: Naraščanje tlaka v poskusu BMP1 (povprečje po standardih)	27
Slika 9: Naraščanje tlaka v poskusu BMP2 (povprečje po standardih)	27
Slika 10: Dnevno izmerjeni pH v poskusu BMP3	30
Slika 11: Dnevno izmerjeni KPK v poskusu BMP3	31
Slika 12: Dnevno izmerjeni KMK v poskusu BMP3	32
Slika 13: Dnevno izmerjena alkaliteta v poskusu BMP3	33
Slika 14: Naraščanje tlaka pri dnevnem dodajanju standardne raztopine glukoze v poskusu BMP3 - srednje vrednosti Standard 2ml	34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Negativna kontrola	Vzorec anaerobnega blata (slepi vzorec)
Standard 1ml	Vzorec anaerobnega blata + 1 ml glukoze
Standard 2ml	Vzorec anaerobnega blata + 2 ml glukoze
Standard 3ml	Vzorec anaerobnega blata + 3 ml glukoze
Standard 4ml	Vzorec anaerobnega blata + 4 ml glukoze
KPK	Količina kisika, ki je potrebna za kemijsko oksidacijo organske snovi
KMK	Kratkoverižne maščobne kisline
OS	Organska snov
SS	Suha snov
BMP	Test biometanskega potenciala
Obremenitev	Količina organskega substrata, izražena v KPK, na enoto mikrobn biomase ali na prostorninsko enoto bioreaktorja
dP1, dP2,dP3	5 dnevni intervali poskusa BMP1, BMP2
V _g	volumen plinske faze (ml)
R	Plinska konstanta (8,314)
T	Temperatura poskusa (K)
KPK _v	Dejanski KPK v vzorcu (mg KPK/l)

1 UVOD

Nenehno povečevanje količine odpadkov je eden glavnih okoljevarstvenih problemov današnje družbe. Izraba, preprečevanje nastajanja in zmanjševanje količine odpadkov postaja pomemben del zmanjševanja onesnaževanja okolja, zmanjševanja emisij toplogrednih plinov in ublažitev globalnih klimatskih sprememb. Nenadzorovano odlaganje odpadkov, kot je bilo nekoč običajno, ni več zakonsko dovoljeno in ni več sprejemljivo. Nadzorovano odlaganje odpadkov na temu namenjena zemljišča ali sežiganje organskih odpadkov nista najustreznejši rešitvi. S strožimi standardi si prizadevamo za recikliranje organskih hranil ter rekuperacijo energije. Zaradi pretvorbe organskih odpadkov v obnovljiv vir energije in organsko gnojilo je anaerobna fermentacija zelo primerna za ravnanje s celo vrsto organskih odpadkov. Po svetu se vse bolj uveljavljajo obnovljivi viri energije, med katere spada tudi proizvodnja energije iz bioplina s fermentacijo organskih odpadkov.

Svetovna preskrba z energijo je v veliki meri odvisna od fosilnih virov (premog, nafta, zemeljski plin...). To so fosilni ostanki odmrlih rastlin in živali, ki so bili na stotine milijonov let izpostavljeni toploti in velikim tlakom v zemlji, ter so s tem postali neobnovljiv vir energije, saj se zaloge porabijo veliko hitreje, kot se ustvarijo nove. Zamenjava fosilnih goriv z obnovljivimi gorivi, kot je npr. bioplin, pomeni zmanjševanje porabe fosilnih goriv za pridobivanje energije, zmanjšuje globalno segrevanje ter povečuje trajnostno rabo energije.

1.1 NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako dodatki različnih količin glukoze med procesom standardiziranega testa anaerobne razgradljivosti po standardu SIST EN ISO 11734, vplivajo na proizvodnjo bioplina, s tem da različno obremenimo mikrobo biomase. Ugotoviti smo želeli, ali se bo ob večji količini dodane glukoze povečala proizvodnja bioplina. V dodatnem poskusu pa nas je zanimalo, kako se spreminja proizvodnja bioplina ob dnevnem dodajanju glukoze. Zanimalo nas je, ali je možno test biometanskega potenciala (BMP) izvajati pri višjih obremenitvah, ter kako se fizikalni in biokemijski dejavniki spreminjajo ob povečani obremenitvi biomase. Test BMP se namreč po standardu izvaja pri

nizkih obremenitvah kemijske potrebe po kisiku, ki pa običajno ne odražajo realnega stanja v bioplinskih napravah. Zato bi bilo zelo zaželeno test BMP prilagoditi tako, da bi lahko preizkušali tudi večje, bolj realne obremenitve z različnimi substrati.

1.2 HIPOTEZE

Predpostavljamo, da se bo proizvodnja bioplina povečevala skladno s povečevanjem dodane glukoze.

Sočasno predpostavljamo, da se bodo ostali dejavniki poskusa (pH, kemijska potreba po kisiku (KPK), kratkoverižne maščobne kislina (KMK)) spreminjali. Pričakujemo, da se bo KPK zmanjšal, koncentracija KMK povečala, alkaliteta nekoliko povečala, pH pa skozi poskus ustrezno znižal.

Predvidevamo, da bo v testu biometanskega potenciala (BMP), kjer bomo dnevno dodajali glukozo, prišlo do preobremenjenosti sistema in zmanjšanje proizvodnje bioplina. Po standardu se test BMP izvaja pri obremenitvi 0,3 g KPK/g OS biomase.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOPLIN

Anaerobne procese uporabljamo za obdelavo industrijskih odpadkov in odpadne vode že več kot stoletje. Anaerobna fermentacija industrijskih odpadkov in odplak je danes standardna tehnologija za obdelavo različnih industrijskih odpadnih vod iz prehranske, živilsko predelovalne in farmacevtske industrije (Al Seadi in sod., 2010).

Bioplin je vnetljiv plin, ki je sestavljen predvsem iz metana in ogljikovega dioksida. Običajno ga uporabljamo za pridobivanje električne energije in toplote, vendar ga lahko uporabljamo kot plin v gospodinjstvih ali uporabljamo kot gorivo za vozila, v gorivnih celicah ali za druge načine proizvodnje energije (Al Seadi in sod., 2010).

Proces nastajanja bioplina je posledica povezanih procesov, pri katerih se prvotna organska snov stalno razgrajuje na manjše enote (Al Seadi in sod., 2010). Bioplin nastaja v procesu mikrobnе fermentacije organske snovi, ki je prisotna v bioloških odpadkih (Bejan, 1997).

2.2 MIKROBIOLOŠKI PROCES ANAEROBNE FERMENTACIJE

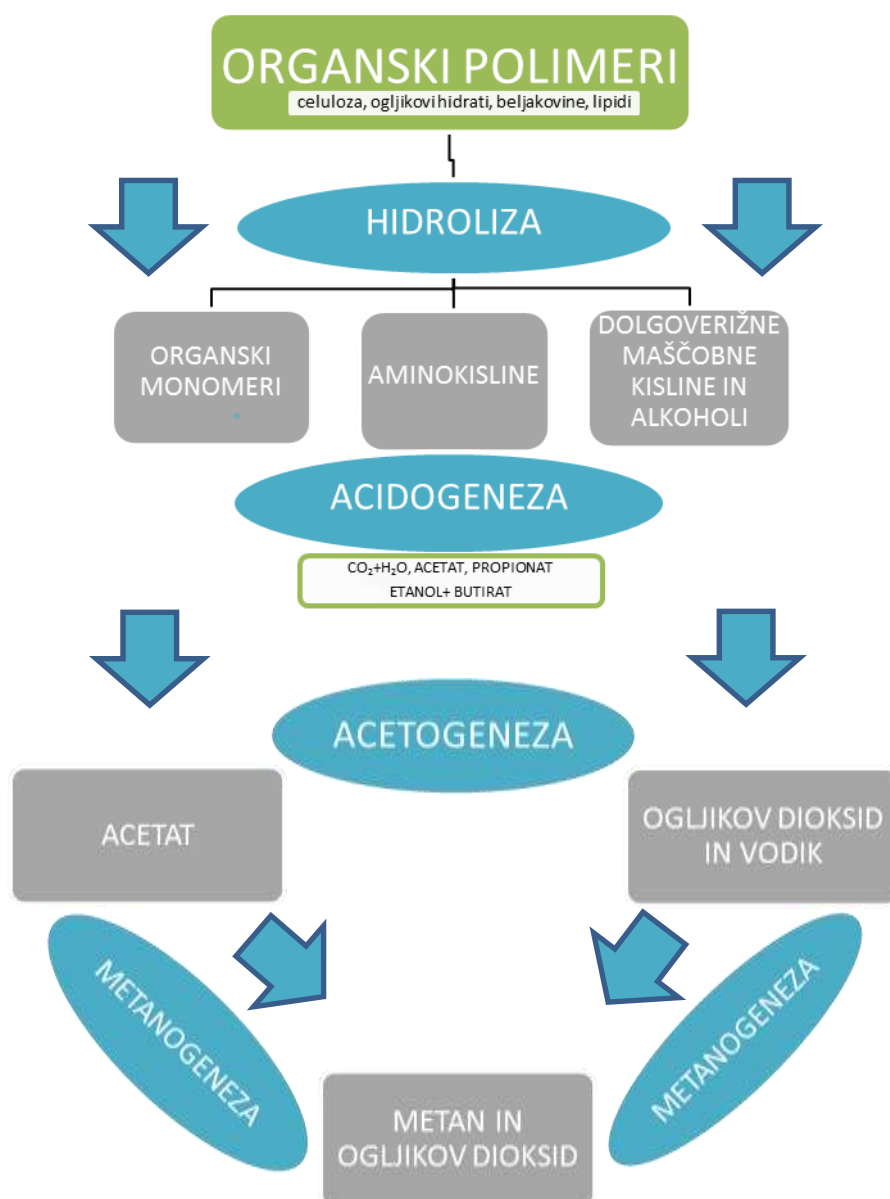
Proces anaerobne fermentacije predstavlja mikrobiološki razkroj organske snovi v odsotnosti kisika. Glavna proizvoda tega procesa sta bioplin in presnovljen substrat, ki ga imenujemo tudi digestat ali bioplinska gnojevka (Al Seadi in sod., 2010).

Proces anaerobne fermentacije izvajajo anaerobne bakterije in arheje. Proces anaerobne fermentacije je vezan na strukturo mikrobnе združbe v digestorju. Na obnašanje ter potek procesa in usodo mikrobnе skupnosti v anaerobnem digestorju vplivajo tudi obratovalni in okoljski (zunanji) dejavniki (Demirel in sod., 2008).

Anaerobna fermentacija je posledica niza presnovnih interakcij med različnimi skupinami mikroorganizmov (Verma, 2002).

V vsak individualen korak so vključene specifične skupine mikroorganizmov. Ti organizmi zaporedno razkrajajo proizvode prejšnjih korakov. Anaerobna fermentacija je kompleksen proces, ki ga lahko v osnovi delimo na štiri faze: hidrolizo, acidogenezo, acetogenezo ter metanogenezo (Al Seadi in sod., 2010).

Inhibicija ali eliminacija ene ali več faz procesa običajno privede do zmanjšanja proizvodnje bioplina ali celo do popolne prekinitve proizvodnje (Chartrain in sod., 1987).



Slika 1: Mikrobiološki proces anaerobne fermentacije (prirejeno po Parawira, 2004: 10)

2.2.1 Hidroliza

V prvi stopnji se biopolimeri hidrolizirajo do biomonomerov. Gliceridi se razgradijo do maščobnih kislin, polisaharidi v monosaharide, beljakovine v aminokisline in nukleinske kisline v purine in pirimidine. Ti monomeri so topni v vodi in jih kot substrate uporabljajo fermentativni mikroorganizmi in anaerobni oksidatorji (Demirel in sod., 2008).

Faza hidrolize lahko poteka različno dolgo, odvisno od vrste substrata. Hidroliza ogljikovih hidratov poteka nekaj ur, hidroliza beljakovin in maščob nekaj dni, fermentacija celuloze in lignina pa poteka zelo počasi in nepopolno (Deublein in Steinhauser, 2008).

2.2.2 Acidogeneza

V fazi acidogeneze se kompleksne organske snovi pretvorijo v kratkoverižne maščobne kisline (Liu in sod., 2012).

Zaradi nastanka kratkoverižnih maščobnih kislin se pH fermentacijskem mediju zniža (Demirel in sod., 2008).

Acidogeneza je navadno najhitrejša reakcija v anaerobni pretvorbi organske snovi (Parawira, 2004).

2.2.3 Acetogeneza

Poleg nastajanja KMK nastajajo tudi vodik in ogljikov dioksid, iz katerih v procesu acetogeneze nastaja acetat (Demirel in sod., 2008).

Reakcije acetogeneze so sicer termodinamsko ugodne pri nizkem parcialnem pritisku vodika, pri katerem acetogene bakterije tvorijo H_2 , CO_2 ter acetat. Na drugi strani pri visokem parcialnem pritisku vodika v fermentacijski mešanici prevladuje butanojska, kapronska, propionska, valerianska kislina ter etanol, kar je sicer neugodno za nadaljnje nastajanje metana. Pri pravilnem poteku procesa so produkti acetogeneze substrati zadnje stopnje anaerobne fermentacije – metanogeneze (Schink in sod., 1997).

2.2.4 Metanogeneza

V metanogenezi nastaja metan na dva načina: s cepitvijo acetata v metan in CO₂ ali pa z redukcijo ogljikovega dioksida z vodikom v metan. Hidrogenotrofni metanogeni mikroorganizmi uporabljajo vodik kot akceptor elektrona pri nastanku metana, medtem ko veliko vodik-porablajočih bakterij uporablja format kot donor elektronov za redukcijo ogljikovega dioksida v metan (Demirel in sod., 2008).

V običajnem sistemu je obseg metanogeneze omejen. Glede na to, da acetogene bakterije preživijo ter rastejo le pri nizkem parcialnem tlaku vodika, morajo acetogeni ter hidrogenotrofni mikroorganizmi živeti v simbiozi. Nizek parcialni tlak vzdržujejo hidrogenotrofne arheje, saj nenehno odstranjujejo produkte metabolizma acetogenih bakterij (Guiot in sod., 1995)

2.3 VPLIV POSAMEZNIH DEJAVNIKOV NA ANAEROBNO FERMENTACIJO ORGANSKIH SNOVI

V procesu anaerobne fermentacije se mikroorganizmi, ki tvorijo kisline oz. metan, zelo razlikujejo glede na fiziologijo, prehranske potrebe, kinetiko rasti, in tudi občutljivost za okoljske dejavnike. Da proces poteka stabilno in učinkovito je potrebno poznati pogoje, ki omogočajo rast in razvoj mikroorganizmov (Chen in sod., 2007).

2.3.1 pH

pH vrednost je pomembna spremenljivka, ki neposredno vpliva na rast mikrobov med poskusom BMP. Lahko nam služi kot merilo za stabilnost mikrobne družbe v fermentacijski mešanici. pH za optimalen proces mora biti med 6,8 in 7,2 ob sprotnem dovajanju hranljivih snovi (Yadvika in sod., 2004).

pH vrednost vpliva na procese anaerobne digestije. Yuan in sod. (2006), so ugotovili, da je nizek pH eden glavnih inhibitorjev metanogeneze, saj mora le ta biti najmanj 6,5.

2.3.2 Temperatura

Temperatura ima vpliv na produkcijo ne le vodika in metana pri anaerobni fermentaciji, temveč tudi na fermentacijo organskih materialov, iz katerih so proizvedeni neposredni metanogeni substrati (Fey in sod., 2000).

Proces anaerobne fermentacije se lahko odvija pri različnih temperaturah, ki jih delimo v tri temperaturna območja: psihofilno (pod 25 °C), mezofilno (25 do 45 °C), in termofilno (45 do 70 °C).

Preglednica 1: Toplotna območja anaerobne fermentacije

	Temperatura	Min. čas zadrževanja
Psihofilno	<20 °C	70 do 80 dni
Mezofilno	30 do 42 °C	30 do 40 dni
Termofilno	43 do 55 °C	15 do 20 dni

Mnoge sodobne bioplinske naprave v Evropi delujejo pri termofilnih toplotnih območjih, ker imajo metanogene arheje večjo stopnjo rasti pri višjih temperaturah. Termofilna anaerobna fermentacija, v primerjavi z mezofilno in psihofilno, prinaša tudi mnoge druge prednosti:

- učinkovito uničenje patogenih mikroorganizmov,
- skrajšan zadrževalni čas, zaradi česar je proces hitrejši in bolj učinkovit,
- boljša fermentacija in razpoložljivost substratov,
- boljša fermentacija trdih substratov in boljše izkoriščanje substratov,
- boljša zmožnost ločevanja tekočine in suspendiranih snovi.

Glavne slabosti procesa v termofilnem toplotnem območju so:

- nestabilnost procesa
- velike zahteve po energiji zaradi visokih temperatur,
- večje tveganje pri povečanih koncentracijah amoniaka (Al Seadi in sod., 2010).

2.3.3 Kratkoverižne maščobne kisline (KMK)

Nenadne spremembe v koncentracijah kratkoverižnih maščobnih kislin so se izkazale kot indikator nestabilnosti procesa (Ahring in sod., 1995). Pfeffer (1980) je dokazal, da kadar proces deluje v neugodnih pogojih za metanogene arheje, ki porabljajo te kisline, ali so arheje prisotne v premajhnem številu, se stopnja porabe kislin upočasni, zato se njihova koncentracija poveča.

Spremljanje koncentracije KMK pogosto uporabljamo kot indikator stresa v procesu anaerobne fermentacije, saj njihovo kopičenje privede do velikega znižanja pH (Gujer in sod., 1983).

2.3.4 Alkaliteta

Alkaliteta ali sposobnost nevtralizacije kislin je definirana kot sposobnost raztopine za nevtralizacijo kislin do referenčne pH točke (pH 7). Postopek določanja alkalitete, ki temelji na titraciji, je bil predlagan kot cenejša alternativa analizam KMK, med anaerobno fermentacijo (Hercog, 2009).

pH odpadnih vod nam pove, kakšna je koncentracija vodikovih ionov, prisotnih v vodi. pH nam pove premalo, če želimo izvedeti, koliko kisline ali baze je potrebno dodati, da nevtraliziramo odpadno vodo. Visoka alkaliteta tekočine v bioplinskem reaktorju omogoča, da kisli industrijski vtoki v bioreaktor ne vplivajo občutneje na proces anaerobne fermentacije. Pod kisle industrijske vtoke štejemo predvsem mlekarniške odpadne vode (Hercog, 2009).

Nihanje v vrednostih alkalitete je pokazatelj neravnovesij v procesu anaerobne fermentacije v bioplinskem bioreaktorju (Martin-Gonzales in sod., 2013).

Padec alkalitete ponavadi nastopi prej kot padec pH vrednosti. Spremljanje anaerobne fermentacije bo tako z merjenjem alkalitete v primerjavi z merjenjem pH bolj učinkovit, ker

bo kopičenje kratkoverižnih maščobnih kislin zmanjšalo pufersko sposobnost veliko prej, kot pa se bo znižala pH vrednost (Ward in sod., 2008).

2.4 BIOREAKTOR OXITOP® CONTROL

Anaerobna fermentacija organskih polimerov povzroči nastanek bioplina (mešanica CO₂ in CH₄), ki se kaže kot povečanje tlaka v hermetično zaprtih steklenicah laboratorijskega bioreaktorja OXITOP® CONTROL, s katerimi lahko preizkušamo anaerobno fermentacijo različnih substratov in ocenjujemo obseg proizvodnje bioplina iz različnih substratov. Princip delovanja je merjenje naraščajočega tlaka v zaprtem sistemu (Vankova, 2014). Podatke preračunamo na normalne pogoje, in sicer temperaturo 0 °C in tlak 1 bara. Prednosti sistema OXITOP® CONTROL so preprosta uporaba, kompaktna izdelava in veliko merilno območje. Sistem delovanja OXITOP® CONTROL nam omogoča hkraten zagon, upravljanje, shranjevanje in sledenje procesov v več steklenicah naenkrat. Podatki se grafično izpisujejo v WTW OxiControl merilnih glavah in jih lahko kadarkoli posamezno prenesemo na računalnik (WTW, 2009).



Slika 2: Izvedba poskusa anaerobne fermentacije v bioreaktorjih OXITOP® CONTROL z merilnimi glavami

Namen testa BMP v bioreaktorjih OXITOP® CONTROL z merilnimi glavami je laboratorijska simulacija procesa pridobivanja bioplina v anaerobnih oz. industrijskih bioreaktorjih v velikem merilu. V laboratoriju se lahko spoznamo z vrednostmi vseh dejavnikov (pH, KMK, KPK...), ki se v procesu anaerobne fermentacije spreminjajo, ter določimo optimalne pogoje, da bo naš proces uspešno potekal.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

Osnovni material v našem poskusu je bil mikrobn inokulum – anaerobno blato iz anaerobnih bioreaktorjev CČN Domžale-Kamnik, ki smo mu kot substrat dodajali glukozo, katere razgradljivost je 100 %.

3.1.1 Postopek priprave inokuluma

Iz anaerobnega bioreaktorja CČN smo prenesli v laboratorij 5 l blata v posodi tako, da je do vrha posode ostalo prostih le nekaj cm. Prepihali smo ga z N₂, hermetično zaprli in postavili v termostatirano komoro pri $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Pred pričetkom poskusa smo inokulum hranili na tak način vsaj 5 dni. S tem smo zagotovili ustreznost inokuluma, saj so se morebitne preostale hranljive snovi v vzorcu razgradile in niso vplivale na naš poskus.

Anaerobnega blata nismo nikoli adaptirali na testirani vzorec.

3.1.2 Referenčni substrat – glukoza

Kot referenčni substrat smo uporabljali standardno raztopino glukoze.

Postopek priprave: Zatehtali smo 7,5 g glukoze in jo raztopili v 50 ml. KPK te raztopine je bil približno 160.000 mg/l.

3.1.3 Puferska raztopina

Pufersko raztopino smo uporabljali za vzdrževanje ustrezne vrednosti pH v testnem mediju. Uporabljali smo fosfatni pufer.

Zatehtali smo naslednje sestavine in jih razredčili do 500ml:

- 4,3 g KH₂PO₄
- 10,88 g K₂HPO₄

- 16,7 g $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$
- 0,9 g NH_4Cl

3.1.4 Vodovodna voda

Vodovodno vodo smo uporabljali za pripravo ustrezne razredčitve inokuluma. Predhodno smo jo segreli na temperaturo 50 °C, da smo izločili ves raztopljeni kisik, nato smo jo ohladili na temperaturo 40 °C.

3.1.5 Plinasti dušik

Za vzpostavitev anaerobnega okolja v posameznem testu smo celotno vsebino steklenic prepihali z dušikom. Tako smo iz raztopine izpodrinili večino raztopljenega kisika, ki bi lahko inhibitorno vplival na potek testa.

3.1.6 Steklenice

Za test smo uporabili originalne steklenice WTW za izvajanje anaerobnih poskusov prostornine 1 l.

3.1.7 Merilne glave za meritev tlaka

Za meritev tlaka smo uporabili merilne glave WTW – OXI TOP® C. Največji nadtlak, ki ga merilne glave lahko zabeležijo v poskusu je 400 hPa.

3.1.8 Inkubator – stresalnik

Za zagotovitev ustreznih temperaturnih pogojev smo uporabili inkubator – stresalnik, Kambič d.o.o. Poskus smo opravljali pri temperaturi 40 °C.

3.2 METODE

Pred izvedbo analiz smo morali vzorce ustrezno pripraviti. Zato smo iz vsakega bioreaktorja OXITOP® CONTROL odvzeli po 50 ml vzorca ter ga prenesli v centrifugirke, ki smo jih postavili v centrifugo za 10 minut. Po centrifugi smo pripravljeni vzorec za analize z injekcijo prenesli v čaše.

3.2.1 Metoda za določanje KPK

Za določanje KPK v vzorcu smo uporabili kivete LCK 114. Kivete smo pretresli, dodali 2 ml predhodno centrifugiranega vzorca, ponovno pretresli ter za 15 minut postavili v grelec HT200S na 170 °C. Vsebinsko kivet smo nato ohladili na 19 °C, jih postavili v merilec DR 2800 ter odčitali zabeleženo vrednost. Merilec DR 2800 je spektrofotometer, ki deluje na podlagi merjenja absorbance vzorca pri 605 nanometrih.

3.2.2 Metoda za določanje KMK

Za določanje KMK v vzorcu smo uporabili kivete LCK 365, metoda Dr. Lange. Kivete že vsebujejo pripravljene reagente. Princip določitve je, da KMK reagirajo z dioli (prisotni v reagentu) in tvorijo kislinske estre. Ti se reducirajo z železovimi solmi v drugih reagentih in nastanejo barvni kompleksi, ki jih izmerimo fotometrično. Zmešali smo 0,4 ml vzorca ter 0,4 ml preparata A. Kiveto smo postavili v grelec za 10 minut na 100 °C, ter jo nato ohladili na 19 °C. Nato smo dodali 0,4 ml preparata B, 0,4 ml preparata C ter 2 ml preparata D. Vse skupaj smo pretresli, ter vstavili v merilec DR 2800 ter odčitali zabeleženo vrednost.

3.2.3 Metoda za določanje alkalitete

Alkaliteto določamo z analizno metodo skupne alkalitete s potenciometrično titracijo do pH 4,5, pri čemer zajamemo hidrogen carbonate, carbonate in hidrokside v vodi (ISO 9963 – 1). Za titracijo uporabimo 0,02 N žvepleno kislino (H_2SO_4). Pri dodatku 20 ml kisline je koncentracija alkalitete enaka 200 mg $CaCO_3/l$. Za določanje alkalitete smo vzeli 5 ml predhodno centrifugiranega vzorca ter ga v čašo razredčili z 95 ml destilirane vode. pH meter

smo premaknili v vzorec, dodali magnet za mešanje, pričeli z mešanjem ter na kontrolerju naprave Metrohm titrirne enote (785 DMP titrina) pritisnemo Start. Titracijski program Alkali sam izračuna alkaliteto vzorca v mg CaCO_3/l . Na koncu smo odčitali zabeležen rezultat.

3.2.4 Metoda za določanje proizvodnje bioplina

Osnova za uvedbo naše modificirane metode za merjenje proizvodnje bioplina je bila referenčna metoda SIST EN ISO 11734 – »Vrednotenje končne anaerobne biorazgradljivosti organskih spojin v presnovljenem blatu – Metoda z merjenjem nastalega bioplina« (SIST EN ISO 11734).

Podjetje WTW iz Nemčije je skladno s tem standardom razvilo posebne merilne glave za meritev tlaka in steklenice, s katerimi smo lahko izvajali takšne meritve. Na CČN smo v modificirani metodi združili možnosti izvedbe hitre in enostavne metode za določitev proizvodnje bioplina in inhibicije, ki nam jih ponuja sistem OxiTop® Control, in smernice zgoraj omenjenega standarda s tem, da smo uvedli določene spremembe ali poenostavitve na naslednjih točkah:

- Povečana prostornina plinske in tekoče faze,
- Razmerje med odpadno vodo in inokulumom,
- Dodatek pufrske raztopine,
- Podaljšan čas fermentacije.

Anaerobna fermentacija povzroči nastanek bioplina (CH_4 , CO_2), ki se kaže kot povečanje tlaka v hermetično zaprtih steklenicah. Tlak merimo z OXI TOP glavami (WTW, Nemčija), ki zapirajo steklenice. Vse podatke preračunamo na normalne pogoje, to je na temperaturo 0°C in tlak 1 bar.

3.2.5 Izvedba metode BMP in sestava testnih mešanic

Eksperimentalno delo v diplomski nalogi smo razdelili na dva dela:

- v prvem delu smo naredili dva identična poskusa (BMP1 in BMP2), v katerih smo spremljali proces anaerobne fermentacije 15 dni, pri tem pa smo peti ter deseti dan

poskusa ponovno v medij dodali enako količino glukoze kot na začetku poskusa. Imeli smo 4 različne ponovitve poskusa z 3 paralelkami za vsak poskus. V prvi ponovitvi smo na začetku, peti ter deseti dan, dodali po 1 ml glukoze. V drugi ponovitvi smo po enakem zaporedju dodali 2 ml glukoze, v tretji seriji po enakem principu 3 ml glukoze, v četrti seriji pa smo pred začetkom, peti ter deseti dan poskusa dodali po 4 ml glukoze. Poleg poteka anaerobne fermentacije pa smo spremljali tudi fizikalne in kemijske dejavnike (pH, KMK, KPK, alkaliteta).

- v drugem delu poskusa (BMP3), smo spremljali, kako vsako dnevno dodajanje 2 ml glukoze s koncentracijo 160 mg KPK/ml (dnevna obremenitev biomase z 0,64 g KPK/l biomase) vpliva na proces anaerobne fermentacije ter posledično, kako se fizikalni in kemijski dejavniki spreminjajo ob dnevnem dodajanju 2 ml glukoze.
- Vse poskuse in analize smo opravili v treh paralelkah in rezultate izračunali kot povprečje treh meritev. V primeru, da rezultati katere od analiz niso bili ustrezni (neustrezno tesnilo merilne glave ali kakšna druga napaka), te analize nismo upoštevali pri izračunu povprečja.

3.2.5.1 TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA (BMP1 IN BMP2)

Pred pričetkom izvedbe poskusa smo pripravili vse ustrezne steklenice, inokulum in vodovodno vodo. Ob vsaki seriji analiz smo pripravili:

- test negativne kontrole,
- test Standard 1 ml – dodan 1 ml standardne raztopine glukoze, z koncentracijo 160 mg KPK/ml, obremenitev v bioreaktorju je 0,32 g KPK/l biomase
- test Standard 2 ml – dodana 2 ml standardne raztopine glukoze, z koncentracijo 160 mg KPK/ml, obremenitev v bioreaktorju je 0,64 g KPK/l biomase
- test Standard 3 ml – dodano 3 ml standardne raztopine glukoze, z koncentracijo 160 mg KPK/ml, obremenitev v bioreaktorju je 0,96 g KPK/l biomase
- test Standard 4 ml – dodano 4 ml standardne raztopine glukoze, z koncentracijo 160 mg KPK/ml, obremenitev v bioreaktorju je 1,28 g KPK/l biomase

Vsak test smo opravili v treh paralelkah, da smo zagotovili primerljivost rezultatov.

V vse testne steklenice smo dodali enako količino inokuluma (običajno po 90 ml) in po 10 ml fosfatnega pufra.

V poskusu z negativno kontrolo smo vsebino le razredčili do 500 ml z vodovodno vodo. Pri standardnem testu smo dodali različne standardne raztopine (od 1 ml do 4 ml glukoze) ter do 500 ml razredčili z vodovodno vodo.

Na začetku smo v vseh raztopinah izmerili pH. V steklenice z volumnom 1 l smo odmerili po 500 ml dobro premešane mešanice, 5 minut prepihovali z N₂ ter zaprli z merilnimi glavami.

Steklenice smo postavili v termostatirano komoro pri 40 ± 1 °C ter vklopili mešanje oziroma stresanje. Po referenčni metodi SIST EN ISO 11734 test poteka toliko časa, da se fermentacija ustavi (običajno 7 dni ali več). V našem primeru nas je zanimalo, kaj se dogaja s fermentacijo ob treh dodatkih standardne raztopine glukoze, in sicer na začetku poskusa, po pretečenih 5 dneh od začetka poskusa, ter tretjem dodatku po pretečenih 10 dneh od začetka poskusa. Trajanje poskusa je običajno odvisno od razgradljivosti odpadne vode in adaptiranosti aktivnega blata. Potek fermentacije spremljamo z meritvijo tlaka na merilnih glavah. Po 5 dnevih poskusa smo steklenice vzeli iz komore ter iz vsake odvzeli po 10 ml vzorca za analizo dejavnikov poskusa (pH, alkaliteta, KPK, KMK). Ponovno smo v steklenico, kjer je potekala fermentacija z dodatkom 1 ml standardne raztopine glukoze, dodali nov mililiter. V steklenico, kjer je potekala fermentacija z dodatkom 2 ml standardne raztopine glukoze, smo dodali nova 2 mililitra standardne raztopine glukoze. V steklenico, kjer je potekala fermentacija z dodatkom 3 ml standardne raztopine glukoze, smo dodali nove 3 mililitre standardne raztopine glukoze. V steklenico, kjer je potekala fermentacija z dodatkom 4 ml standardne raztopine glukoze, smo dodali nove 4 mililitre standardne raztopine glukoze. Vse steklenice smo nato prepihali z N₂, zaprli z merilnimi glavami ter postavili nazaj v komoro.

Iz steklenice, kjer je potekal negativni kontrolni test brez dodatka standardne raztopine glukoze, smo odvzeli 10 ml vzorca za analizo dejavnikov poskusa, jo prepihali z N₂, zaprli z merilnimi glavami ter postavili nazaj v komoro.

Preglednica 2: Sestava testnih mešanic za BMP1, BMP2

	Negativna kontrola	Standard 1ml	Standard 2ml	Standard 3ml	Standard 4ml
Inokulum (ml)	90	90	90	90	90
Substrat (ml)	1				
Substrat (ml)	2				
Substrat (ml)	3				
Substrat (ml)	4				
Fosfatni puffer (ml)	10	10	10	10	10
Voda (ml)	400	399	398	397	396
Skupaj	500	500	500	500	500

Inokulum = blato iz anaerobnega bioreaktorja, Substrat = glukoza

3.2.5.2 TEST BIOMETANSKEGA POTENCIALA 3 (BMP3)

Pred pričetkom izvedbe poskusa smo pripravili vso ustrezno steklovino, inokulum in vodovodno vodo. Ob vsaki seriji analiz smo pripravili:

- test negativne kontrole,
- test Standard 2ml – dodana 2 ml standardne raztopine glukoze z začetno koncentracijo 160 mg KPK/ml, obremenitev 0,64 g KPK/l biomase.

Vsako ponovitev smo opravili v treh steklenicah WTW z merilnimi glavami, da smo zagotovili primerljivost rezultatov.

V vse steklenice smo dodali enako količino inokuluma (običajno po 90 ml) in po 10 ml fosfatnega pufra.

V negativnem kontrolnem poskusu smo vsebino le razredčili do 500 ml z vodovodno vodo.

V ponovitvi BMP3 smo dodali še 2 ml standardne raztopine glukoze ter do 500 ml razredčili z vodovodno vodo. Nato smo vsak dan ob isti uri dodali še 2 ml standardne raztopine glukoze.

Na začetku smo v vseh raztopinah izmerili pH. V steklenice z volumnom 1 l smo odmerili po 500 ml dobro premešane mešanice inokuluma, fosfatnega pufru, glukoze ter vode, 5 minut prepihovali z N₂ ter zaprli z merilnimi glavami.

Steklenice smo postavili v termostatirano komoro pri 40 ± 1 °C ter vklopili mešanje oziroma stresanje. Vsak dan poskusa smo steklenice vzeli iz komore ter iz vsake odvzeli po 10 ml vzorca za analizo dejavnikov poskusa (pH, alkaliteta, KPK, kratkoverižne maščobne kisline). V steklenici, kjer je potekala fermentacija z dodatkom 2 ml standardne raztopine glukoze, smo ponovno dodali nova dva mililitra standardne raztopine glukoze, prepihali z N₂, zaprli z merilnimi glavami ter postavili nazaj v komoro. Dnevno smo spremljali porast tlaka na merilnih glavah (Preglednica 3).

Preglednica 3: Sestava testne mešanice za BMP3

	Negativna kontrola	Standard 2ml
Inokulum (ml)	90	90
Substrat (ml)	0	2
Fosfatni pufer (ml)	10	10
Voda (ml)	400	398
Skupaj (ml)	500	500

Inokulum = blato iz anaerobnega bioreaktorja, Substrat = glukoza

3.3 MERITVE

Ves čas poskusa so merilne glave merile tlak (hPa).

V posameznih testih smo zaradi lažjega vrednotenja rezultatov izvedli še dodatne analize dejavnikov, kot so pH, KPK, analiza kratkoverižnih maščobnih kislin, ter alkaliteto. Analize smo v poskusu BMP1 opravljali na začetku ter na zaključku poskusa (15. dan). V poskusu

BMP2 smo ob začetni ter končni analizi opravljali še dodatne analize po petih ter po desetih dneh poskusa. V poskusu BMP3 smo te analize opravljali vsak dan.

3.4 IZRAČUNI

Na podlagi meritev tlaka v merilnih glavah in ostalih analiz smo lahko izračunali in podali sledeče rezultate:

- Fermentacija blata iz anaerobnega bioreaktorja, ocenjeno s KPK
- Prostornina proizvedenega bioplina
- Prostornina proizvedenega bioplina glede na dodani volumen anaerobnega blata
- Prostornina proizvedenega bioplina glede na vhodni KPK

⇒ Porast tlaka v poskusu smo izračunali po enačbi 1:

$$dP1 = P2 - P1 \quad \dots \text{Enačba 1}$$

⇒ Nastali bioplin v vzorcu (mol) smo izračunali po enačbi 2:

$$n(CO_2 + CH_4) = \frac{dP2 * Vg * 1000}{R * T * 10000} - n(CO_2 + CH_4) \quad \dots \text{Enačba 2}$$

⇒ Nastali bioplin pri negativni kontroli (mol) smo izračunali po enačbi 3:

$$n(CO_2 + CH_4) = \frac{dP2 * Vg * 1000}{R * T * 10000} \quad \dots \text{Enačba 3}$$

⇒ Prostornina bioplina (ml) smo izračunali po enačbi 5:

$$V(CO_2 + CH_4) = \frac{dP1 * Vg}{1013} - V(CO_2 + CH_4) \quad \dots \text{Enačba 4}$$

⇒ Prostornina bioplina pri negativni kontroli (ml) smo izračunali po enačbi 6:

$$V(CO_2 + CH_4) = \frac{dP1 * Vg}{1013} \quad \dots \text{Enačba 5}$$

dP1 – razlika v povečanju tlaka v prvem 5 – dnevnem intervalu (hPa)

P1 – povečanje tlaka v prvem 5 – dnevnem intervalu (hPa)

P2 – povečanje tlaka v drugem 5 – dnevnem intervalu (hPa)

dP2 – razlika v povečanju tlaka v drugem 5 – dnevnem intervalu

Vg – Volumen plinske faze (ml)

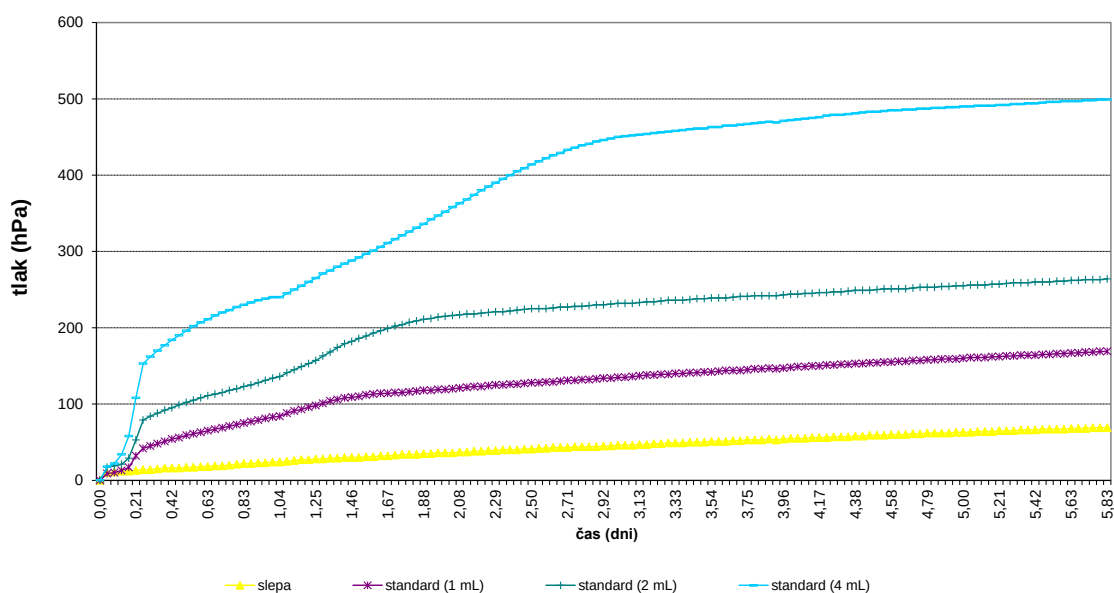
R – plinska konstanta

T – temperatura (K)

$n(\text{CO}_2 + \text{CH}_4)$ – nastanek bioplina v molih v vzorcu (mmol)

$V(\text{CO}_2 + \text{CH}_4)$ – volumen bioplina (ml)

Na podlagi meritve tlaka iz zgoraj predstavljenih izračunov smo narisali krivuljo anaerobne fermentacije, ločeno za vsak posamezni test. Na Slika 3 je prikazan primer krivulje anaerobne fermentacije.



Slika 3: Primer krivulje anaerobne fermentacije v BMP pri dodatkih 1, 2 in 4 ml glukoze

Iz krivulje anaerobne fermentacije (Slika 3) lahko določimo sledeče parametre:

- Lag faza, zakasnitveni čas (t_L , dan): je čas med začetkom testa in časom, ko biološka fermentacija doseže 10 % teoretične vrednosti,
- Čas fermentacije (t_w , dan): je čas med koncem lag faze in tistim, ko biološka fermentacija doseže 90 % maksimalne stopnje biološke fermentacije.

Kriteriji za uspešno opravljen poskus so:

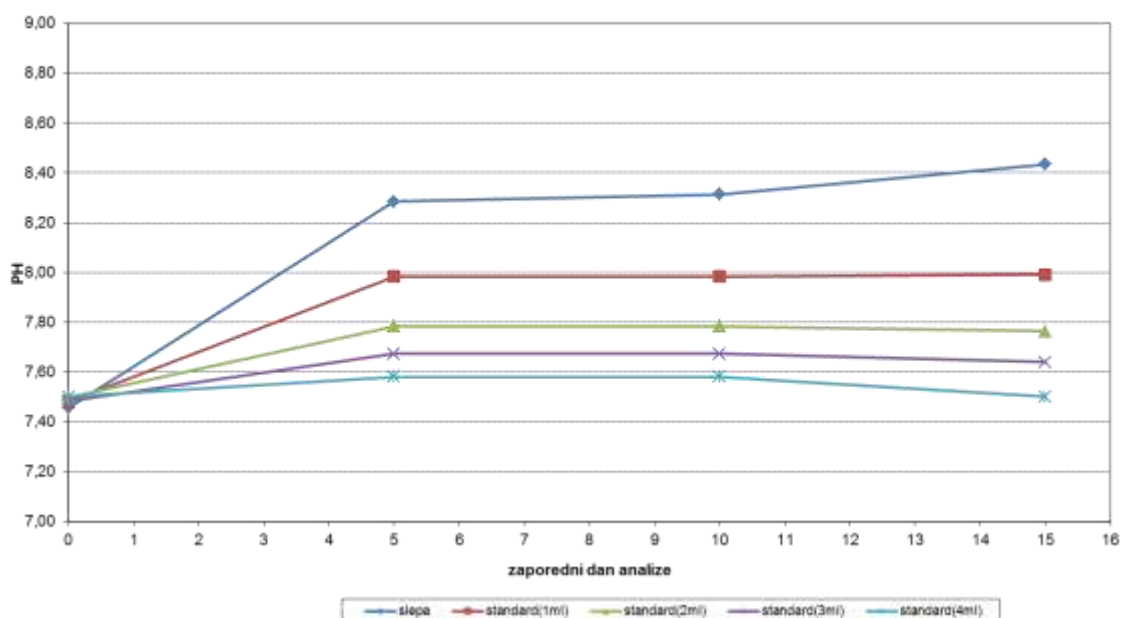
1. Med poskusom ne sme priti do nenadnega zmanjšanja tlaka. Običajno je nenadno zmanjšanje tlaka povezano s puščanjem tesnil.
2. pH se med poskusom ne sme spremeniti za več kot 1 enoto.

4 REZULTATI

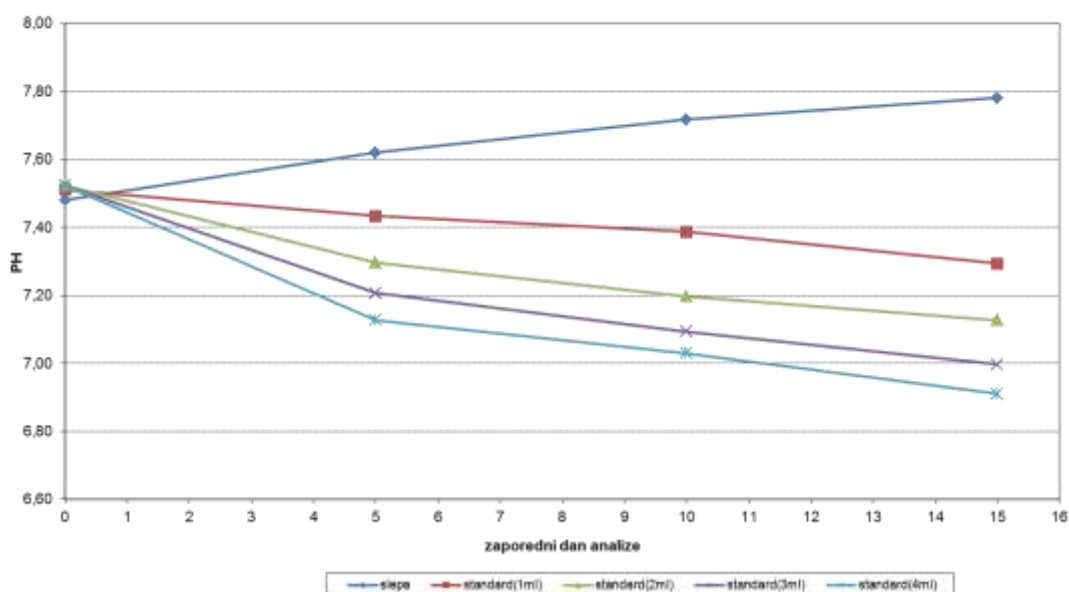
4.1 POSKUSA BMP1 IN BMP2

4.1.1 VREDNOSTI pH v poskusih BMP1 in BMP2

V poskusu BMP1 je bila začetna povprečna vrednost pH 7,5. Pri vseh standardih je v prvih 5 dneh poskusa vrednost narasla, nato pa se do konca poskusa pri vseh, razen pri negativni kontroli (Slika 4) rahlo zmanjševala. Tudi v poskusu BMP2 je bila začetna povprečna vrednost pH 7,5, do konca inkubacije pa se pH standardov z različnimi količinami dodane glukoze zmanjšuje. Večja kot je dodana količina glukoze, bolj se zniža pH vrednost. Najnižji izmerjeni pH je bil pri vzorcu Standard 4ml, pH 6,9 (Slika 5). Iz obeh poskusov je razvidno, da večji, kot je dodatek glukoze, bolj se zniža pH vrednost. V poskusu BMP2 so vrednosti pH malce nižje, vendar je trend zmanjševanja enak kot pri BMP1. Večji kot je dodatek glukoze, nižja je končna pH vrednost (Slika 5).



Slika 4: Izmerjene pH vrednosti v poskusu BMP1



Slika 5: Izmerjene vrednosti pH v poskusu BMP2

4.1.2 Količine KPK v poskusih BMP1 in BMP2

Za BMP1 smo analizo KPK opravili prvi in zadnji dan poskusa, za BMP2 pa nas je zanimalo še, kakšne so količine 5. in 10. dan poskusa. Začetne količine so se povečevale z večjim dodatkom standardne raztopine glukoze, pri dodatku 1 ml glukoze je bil začetni KPK za BMP1 423 mg KPK/l, pri dodatku 4 ml pa največji, in sicer 1296 mg/l (Preglednica 4). V poskusu BMP2 so začetne vrednosti KPK podobne kot pri BMP1. Z dodatnimi analizami v 5 in 10 dnev, smo želeli spremljati dogajanje med poskusom (Preglednica 5). Zaznali smo trend velikega znižanja KPK v prvih 5 dneh poskusa, nato pa manjše spremembe do zadnjega dne. V BMP1 se končne količine KPK pri različnih količinah dodane standardne raztopine glukoze gibljejo med 197 mg KPK/l in 243 mg KPK/l. Pri BMP2 so končne količine KPK nekoliko večje, gibljejo se v razponu od 258 mg KPK/l do 291 mg KPK/l.

Preglednica 4: Količine KPK na začetku ter koncu poskusa BMP1

Vzorec	Prostornina za analizo (ml)	Začetek (mg/l)	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	2	130	265
Standard 1ml	2	423	197
Standard 2ml	2	743	197
Standard 3ml	2	956	219
Standard 4ml	2	1296	243

Preglednica 5: Količine KPK v poskusu BMP2

Vzorec	Volumen za analizo(ml)	Začetek (mg/l)	5 dni	10 dni	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	2	130	342	332	319
Standard 1ml	2	436	261	298	279
Standard 2ml	2	780	310	324	258
Standard 3ml	2	1052	235	312	278
Standard 4ml	2	1119	333	456	291

4.1.3 Koncentracije KMK v poskusih BMP1 in BMP2

V BMP1 ter BMP2 smo opravili analizo KMK na podoben način kot pred tem analizo KPK. V BMP1 smo zabeležili vsebnosti na začetku ter koncu poskusa. Vsebnosti na začetku poskusa so bile med 31,2 mg KMK/l biomase pri Standard 1ml do 51,2 mg KPK/l pri Standard 4ml. Na koncu poskusa je bila najmanjša izmerjena vsebnost 42,3 mg KMK/l pri Standard 3ml, največja izmerjena vsebnost pa 68,3 mg KMK/l pri Standard 4ml (Preglednica 6). V poskusu BMP2 so vsebnosti med 49 mg KMK/l pri Standard 1ml do 34,6 mg KMK/l pri Standard 4ml. Do konca poskusa so se vsebnosti povečale pri obeh ponovitvah, v BMP1 je razpon od 54,1 mg KMK/l biomase do 68,3 mg KMK/l. Pri BMP2 se vsebnosti do 10 dneva povečujejo, nato se do konca poskusa malce zmanjšajo (Preglednica 7). Končne vsebnosti so nekoliko večje, najmanjša je pri Standard 2ml 61,2 mg KMK/l, največja pa pri Standard 1ml, in sicer 102 mg KMK/l biomase.

Preglednica 6: Koncentracije KMK na začetku ter na koncu poskusa BMP1

Vzorec	Prostornina za analizo (ml)	Začetek (mg/l)	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	0,4	27,3	101
Standard 1ml	0,4	31,2	54,1
Standard 2ml	0,4	44,3	50,6
Standard 3ml	0,4	40,5	42,3
Standard 4ml	0,4	51,2	68,3

Preglednica 7: Koncentracije KMK na začetku ter na koncu poskusa BMP2

Vzorec	Prostornina za analizo (ml)	Začetek (mg/l)	5 dni (mg/l)	10 dni (mg/l)	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	0,4	40,4	95,6	116	114
Standard 1ml	0,4	49	69	106	102
Standard 2ml	0,4	40,3	75,6	85,5	61,2
Standard 3ml	0,4	38,4	57,7	83,3	62,3
Standard 4ml	0,4	34,6	86,4	92,7	74,7

4.1.4 Alkaliteta v poskusih BMP1 in BMP2

Alkaliteto v poskusu BMP1 smo merili na začetku ter koncu poskusa, v BMP2 pa smo dodali tudi meritev po 5 ter 10 dneh. Najmanjša izmerjena alkaliteta pri BMP1 je pri Standard 4ml, in sicer 1781 mg CaCO₃/l. Največjo količino je pokazala analiza pri Standard 2ml, 2020 mg CaCO₃/l (Preglednica 8). Pri BMP2 so začetne količine malce večje kot pri BMP1. Najmanjša začetna količina BMP2 je pri Standard 3ml, in sicer 2089 mg CaCO₃/l, največja pa pri Standard 4ml in sicer 2231 mg CaCO₃/l. Končne količine so pri obeh poskusih primerljive, pri BMP1 med 2116 mg CaCO₃/l (Standard 4ml) in 2264 mg CaCO₃/l (Standard 1ml), pri BMP2 pa med 2127 mg CaCO₃/l (Standard 4ml) in 2235 mg CaCO₃/l (Standard 1ml).

Preglednica 8: Alkaliteta na začetku ter na koncu poskusa BMP1

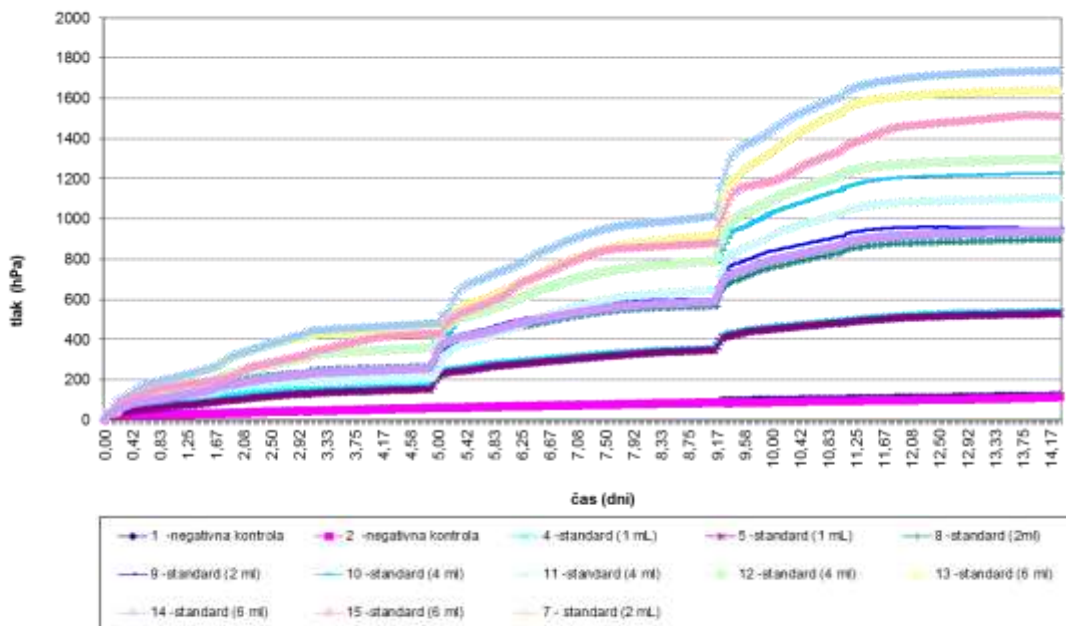
Vzorec	Prostornina za analizo (ml)	Začetek (mg/l)	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	100	1931	2110
Standard 1ml	5	1961	2264
Standard 2ml	5	2020	2194
Standard 3ml	5	1827	2189
Standard 4ml	5	1781	2116

Preglednica 9: Alkaliteta na začetku, po 5 dnevu, po 10 dnevu ter na koncu BMP2

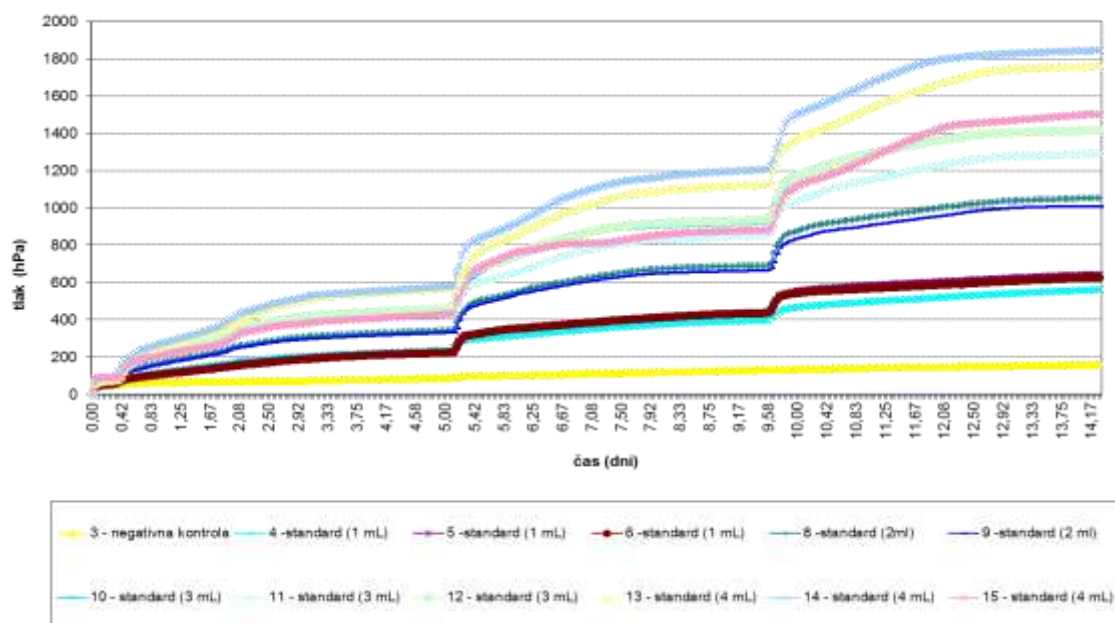
Vzorec	Volumen za analizo (ml)	Začetek (mg/l)	5 dni (mg/l)	10 dni (mg/l)	Konec (mg/l)
Negativna kontrola	100	2092	2357	2253	2219
Standard 1ml	5	2167	1928	2245	2235
Standard 2ml	5	2128	2315	2158	2167
Standard 3ml	5	2089	2311	2165	2157
Standard 4ml	5	2231	2291	2135	2127

4.1.5 Naraščanje tlaka v poskusih BMP1 in BMP2

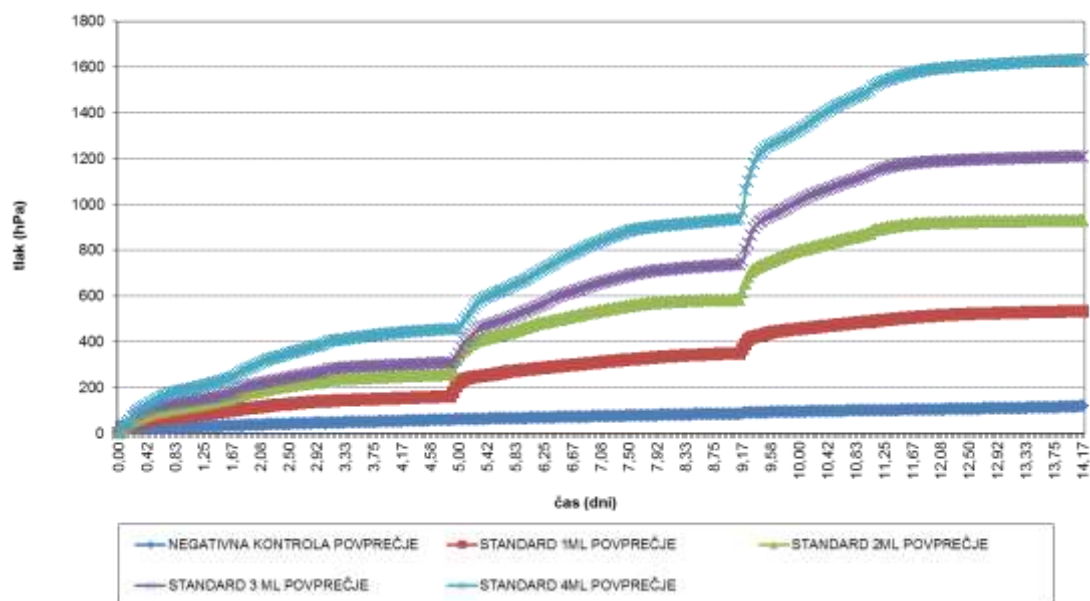
Na Slika 6 je grafično prikazano naraščanje tlaka v poskusu BMP1. Za vsak posamezen standard (od 1 do 4 ml dodatka glukoze) ter negativno kontrolo (brez dodatka glukoze), smo opravili po 3 paralelne meritve. S tem smo zagotovili ustreznost rezultatov tudi v primeru, da katera od paralelk ne bi bila ustrezna (slaba tesnila na merilni glavi, neustrezna steklenica...). Če so bile vse 3 paralelne meritve podobne, smo nato izračunali srednje vrednosti za posamezen standard (Slika 8). Najvišji tlak smo ugotovili pri uporabi Standard 4ml in sicer v povprečju malo nad 1600 hPa.



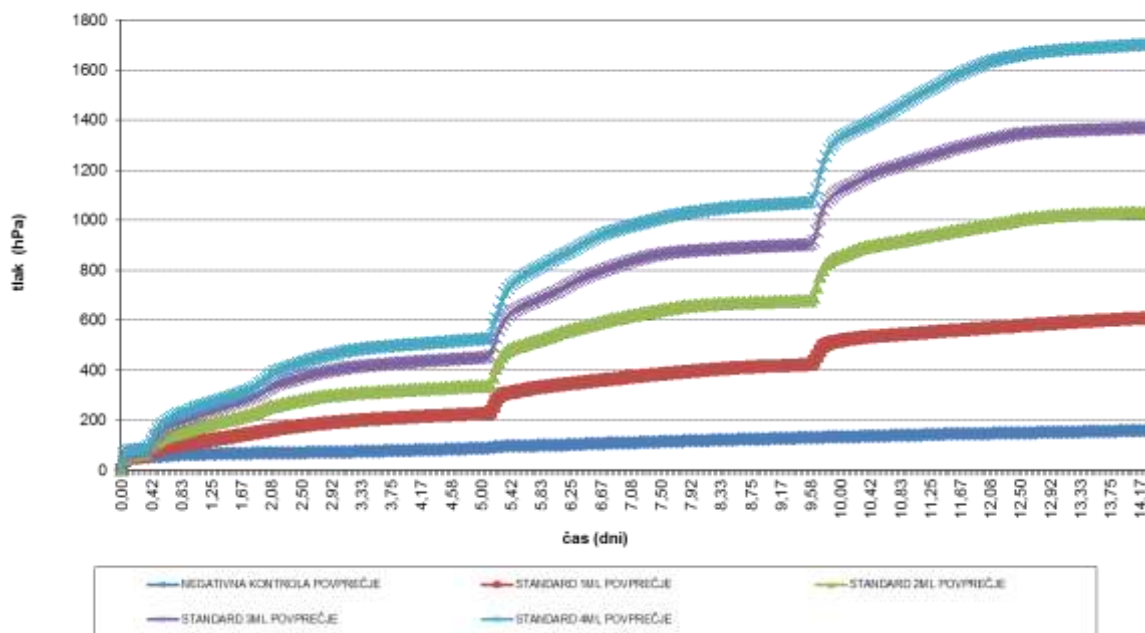
Slika 6: Naraščanje tlaka v poskusu BMP1 (direktne meritve)



Slika 7: Naraščanje tlaka v poskusu BMP2 (direktne meritve)



Slika 8: Naraščanje tlaka v poskusu BMP1 (povprečje po standardih)



Slika 9: Naraščanje tlaka v poskusu BMP2 (povprečje po standardih)

4.1.6 Izmerjeni tlak v intervalu 5 dni v poskusih BMP1 in BMP2

V poskusih BMP1 in BMP2 smo izračunali razliko v nastalem tlaku v treh intervalih. Interval od začetka poskusa do petega dneva smo označili z P1, interval od petega do desetega dneva je označen z P2, interval od desetega dneva do konca poskusa pa je označen z P3. Pri vseh količinah smo odšteli količine nastalega tlaka pri negativni kontroli. Opažamo trend povečevanja nastanka plina s povečevanjem dodane glukoze. Skupno je bilo največ plina v BMP1 proizvedenega pri Standard 4ml in sicer je v celotnem poskusu tlak narasel na 1514 hPa (Preglednica 10). V poskusu BMP2 je pri tem dodatku glukoze tlak narasel na 1544 hPa plina (Preglednica 11).

Preglednica 10: Izmerjeni tlak (hPa) v intervalu (P) 5 dni v poskusu BMP1

	P1 (1.-5. dan)	P2 (5.-10. dan)	P3 (10.-15. dan)
Standard 1ml	108	284	417
Standard 2ml	198	498	814
Standard 3ml	250	652	1092
Standard 4ml	395	852	1514

Preglednica 11: Izmerjeni tlak (hPa) v intervalu (P) 5 dni v BMP2

	P1 (1.-5. dan)	P2 (5.-10. dan)	P3 (10.-15. dan)
Standard 1ml	143	308	451
Standard 2ml	250	548	871
Standard 3ml	365	773	1211
Standard 4ml	440	941	1544

V poskusih BMP1 in BMP2 smo nato izračunali, kolikšno je povečanje tlaka v vsakem od treh intervalov poskusa (P1, P2 in P3). V skladu s pričakovanji je povsod najmanjše povečanje tlaka v prvem intervalu (P1), ko se anaerobna fermentacija šele začne. V drugem ter tretjem intervalu poskusa je povečanje tlaka precej višja kot v prvem. Pri različnih dodatkih standardne raztopine glukoze v poskusu BMP1 največ tlaka nastane v zadnjem delu procesa (P3) (Preglednica 12). V poskusu BMP2 (Preglednica 13) pa se v drugem (P2) ter tretjem intervalu (P3) poskusa povečanje tlaka bistveno ne razlikuje. Največja produkcija tlaka v procesu je zabeležena v tretjem intervalu poskusa BMP1, za fermentacijo Standard 4 ml, saj smo izmerili povečanje tlaka za 662 hPa.

Preglednica 12: Razlika v izmerjenem tlaku v 5 dnevni intervalih v BMP1 (hPa)

	P1 (hPa)	P2 (hPa)	P3 (hPa)
Standard 1ml	108	176	133
Standard 2ml	198	300	316
Standard 3ml	250	402	446
Standard 4ml	395	457	662

Preglednica 13: Razlika v izmerjenem tlaku v 5 dnevni intervalih v BMP2 (hPa)

	P1 (hPa)	P2 (hPa)	P3 (hPa)
Standard 1ml	143	165	143
Standard 2ml	250	298	323
Standard 3ml	365	408	438
Standard 4ml	440	501	603

4.1.7 Izračunana prostornina bioplina v intervalu 5 dni v poskusih BMP1 in BMP2

Na podlagi izmerjenega povečanja tlaka v posameznih intervalih poskusov BMP1 in BMP2 (Preglednica 12) smo lahko izračunali, koliko mililitrov plina je nastalo v vsakem od treh posameznih intervalov poskusov BMP1 ter BMP2. Najmanj plina je nastalo v poskusu BMP1 z fermentacijo Standard 1ml, in sicer 67 ml. Največ plina je nastalo z fermentacijo Standard 4ml v poskusu BMP1, in sicer 437 ml (Preglednica 14). Pri obeh poskusih je v intervalu P1 nastalo najmanj plina. Enačbe, po katerih smo izračunali prostornino plina, so predstavljene v poglavju IZRAČUNI.

Preglednica 14: Izračunana prostornina plina (ml) v intervalu 5 dni v BMP1

	P1 (ml)	P2 (ml)	P3 (ml)
Standard 1ml	71	116	101
Standard 2ml	131	198	209
Standard 3ml	165	266	294
Standard 4ml	261	302	437

Preglednica 15: Izračunana prostornina plina (ml) v 5 dnevni intervalih v BMP2

	P1 (ml)	P2-P1 (ml)	P3-P2 (ml)
Standard 1ml	95	109	95
Standard 2ml	165	197	214
Standard 3ml	241	270	290
Standard 4ml	291	331	399

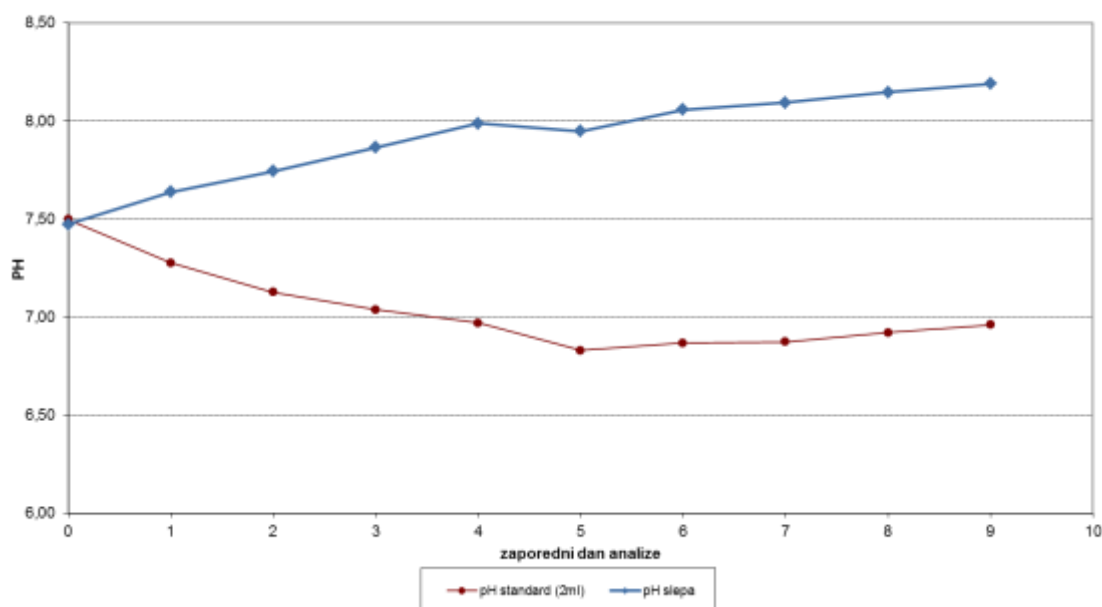
Preglednica 16: Skupna prostornina proizvedenega plina (ml) v poskusih BMP1 in BMP2

	BMP1 (ml)	BMP2 (ml)
Standard 1ml	288	299
Standard 2ml	538	576
Standard 3ml	725	801
Standard 4ml	1000	1021

4.2 POSKUS BMP3

4.2.1 Vrednosti pH v poskusu BMP3

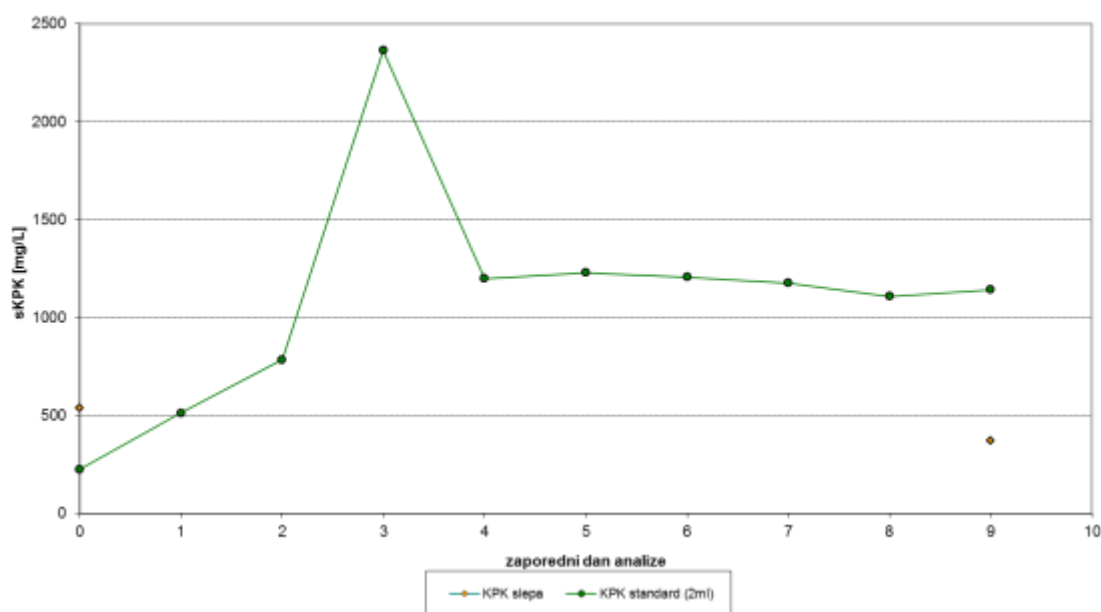
V poskusu BMP3 smo spremljali spremembe pH ob dnevnem dodajanju standardne raztopine glukoze (Slika 10). Na začetku poskusa je bil pH raztopine 7,5, nato pa se je ob dnevnem dodatku 2 ml standardne raztopine glukoze glukoze zmanjševal. Najnižje se je pH spustil 5. dan poskusa, ko se je ustavil pri 6,8, nato pa se je do konca poskusa ustalil malo pod nevtralnim območjem pH 7.



Slika 10: Dnevno izmerjeni pH v poskusu BMP3

4.2.2 Vrednosti KPK v poskusu BMP3

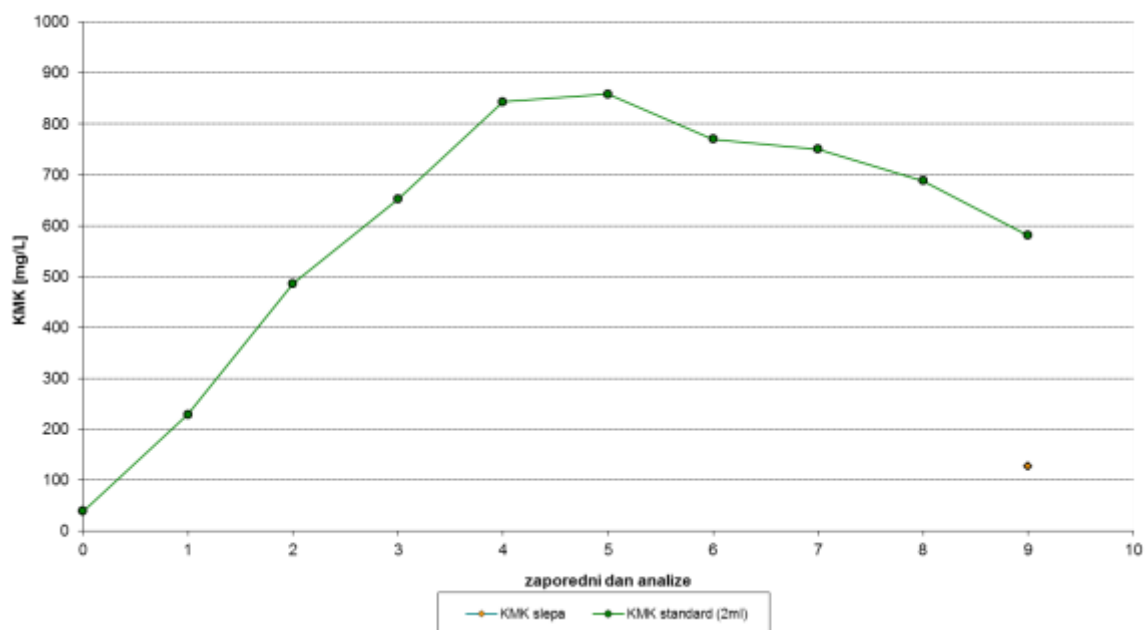
V poskusu BMP3 smo spremljali, kako se je dnevno spreminjala količina KPK ob vsakodnevnem dodajanju 2 ml standardne raztopine glukoze. Z začetnih 224 mg KPK/l biomase se je do 3. dne poskusa povzpelo na najvišjo količino, 2363 mg KPK/l. Četrty dan se je vrednost spustila na okoli 1200 mg KPK/l in do konca poskusa se količine KPK niso več veliko spreminjale, zadnji dan je bila količina 1150 mg KPK/l.



Slika 11: Dnevno izmerjeni KPK v poskusu BMP3

4.2.3 Koncentracije KMK v poskusu BMP3

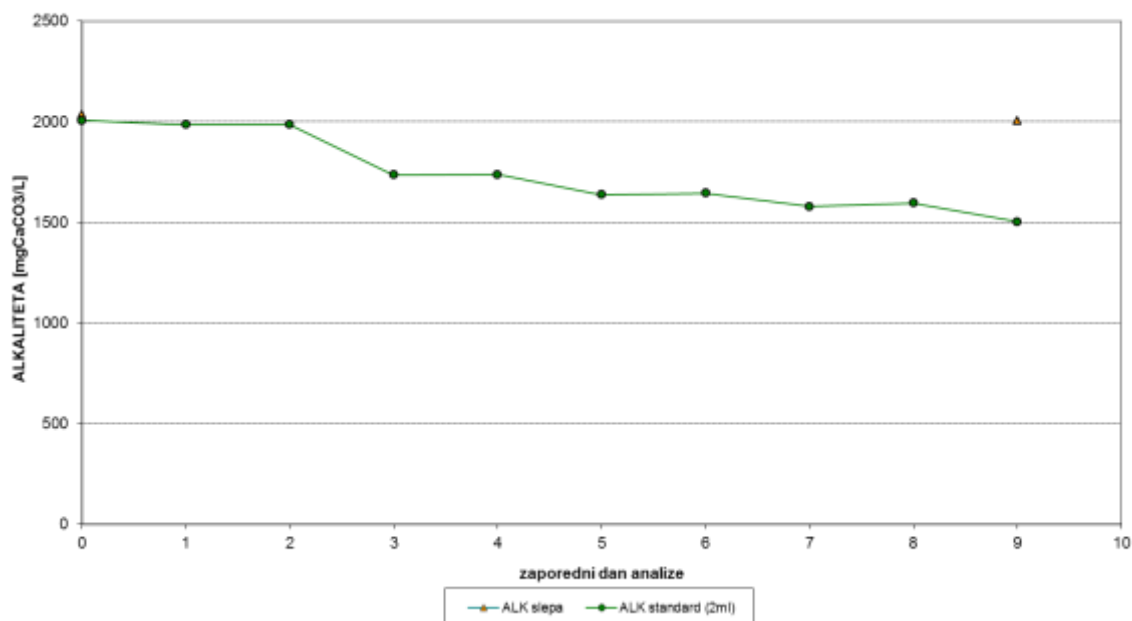
V poskusu BMP3 smo spremljali, kako so se dnevno spreminjale koncentracije KMK ob vsakodnevnem dodajanju 2 ml standardne raztopine glukoze. Ob začetku poskusa je bila izmerjena vsebnost 38 mg KMK/l biomase, nato pa se je vsebnost do 5 dne analize povečevala. Največja izmerjena vsebnost na peti dan je bila 838 mg KMK/l. Potem se je koncentracija KMK do zaključka poskusa zmanjševala, ob koncu je bila koncentracija 581 mg KMK/l. Začetna vsebnost negativne kontrole je bila 38 mg KMK/l, na koncu poskusa pa se je povzpela na 127 mg KMK/l.



Slika 12: Dnevno izmerjeni KMK v poskusu BMP3

4.2.4 Alkaliteta v poskusu BMP3

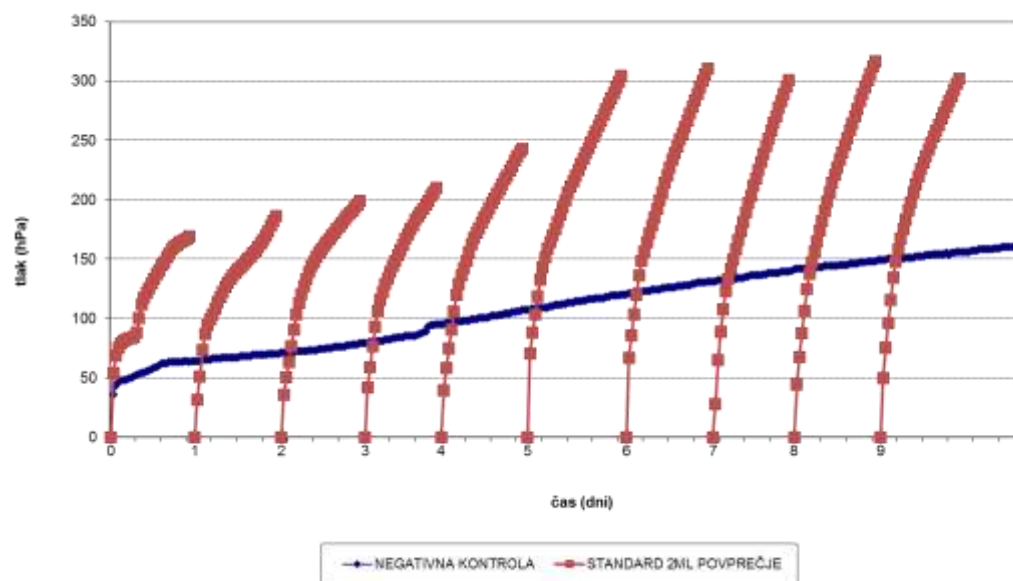
V poskusu BMP3 smo spremljali, kako se je dnevno spreminjala alkaliteta ob vsakodnevnem dodajanju 2 ml standardne raztopine glukoze. Ob začetku poskusa je bila alkaliteta približno 2000 mg CaCO_3/l , skozi poskus pa je opaziti trend zmanjševanja in na zadnji dan je bila najnižja, 1502 mg CaCO_3/l .



Slika 13: Dnevno izmerjena alkaliteta v poskusu BMP3

4.2.5 Naraščanje tlaka v poskusu BMP3

V poskusu BMP 3 smo ugotavljali vpliv dnevnega dodajanja standardne raztopine glukoze na proizvodnjo bioplina v anaerobnih reaktorjih OxiTop®. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah. Rezultati za paralelko 8 – Standard 2ml so v prvih štirih dneh odstopali od povprečja, za kar je bilo krivo slabo tesnenje merilnih glav. Od začetka do petega dneva poskusa smo zabeležili naraščanje tlaka. Prvi dan se je tlak na račun proizvedenega bioplina povprečno povečal za okoli 160 hPa bioplina, peti dan pa se je pritisk povzpел na 305 hPa (Slika 14). Do konca poskusa se smo dnevno beležili produkcijo tlaka okoli 300 hPa. Vse tri paralelke so primerljive, večjih odstopanj, razen prve štiri dni paralelke 8 – Standard 2ml - ni bilo.



Slika 14: Naraščanje tlaka pri dnevnem dodajanju standardne raztopine glukoze v poskusu BMP3 - srednje vrednosti Standard 2ml

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V raziskavi smo kot inokulum uporabili blato iz bioplinke naprave (anaerobnega bioreaktorja) CČN Domžale-Kamnik, ki smo ga pred pričetkom poskusa stabilizirali 5 dni pri 40 °C brez dodanega substrata. Kot substrat za proizvodnjo bioplina smo v raziskavi uporabili standardno raztopino glukoze z začetno koncentracijo 160 mg KPK/l glukoze. Glukozo običajno uporabljamo v raziskavah anaerobne razgradljivosti različnih organskih substratov kot referenčni substrat v topni obliki. Glukoza je namreč lahko razgradljiv substrat, za katerega lahko teoretično izračunamo, koliko bioplina bo iz nje nastalo ob popolni in s tem idealni anaerobni fermentaciji.

V poskusih BMP1 ter BMP2 smo prepihanemu blatu iz anaerobnega bioreaktorja kot substrat dodali glukozo v različnih obremenitvah biomase (Standard 1ml – 0,32 g KPK/l biomase, Standard 2ml – 0,64 g KPK/l biomase, Standard 3ml – 0,96 g KPK/l biomase, Standard 4ml – 1,28 g KPK/l biomase) ter opazovali spremembe v fizikalnih in kemijskih dejavnikih. Pričakovali smo, da večja količina dodane standardne raztopine glukoze povzroči večjo mikrobno proizvodnjo bioplina, saj imajo anaerobni mikroorganizmi na razpolago več substrata. Obenem smo predvidevali, da bo ob dodatkih višjih koncentracij standardne raztopine glukoze prišlo do preobremenitve sistema, ki bi povzročila prenehanje proizvodnje bioplina. To smo pričakovali, saj procesi hidrolize, acidogeneze in acetogeneze v procesu anaerobne fermentacije potekajo hitreje kot poteka sama metanogeneza, ki predhodno ustvarjene produkte porablja. Posledično pride do nakopičenja kratkoverižnih maščobnih kislin in padca pH, kar inhibira metanogenezo (Deublein in Steinhauser, 2008).

Rezultati v testih BMP1 in BMP2 so primerljivi med seboj in pričakovani. Pri obeh poskusih je pričakovano najmanj bioplina nastalo, ko smo dodali najmanjšo količino glukoze in največ bioplina, ko smo dodali največjo količino glukoze. Najmanjša količina bioplina je tako nastala ob dodatku Standard 1ml v prvem petdnevem intervalu, in sicer 71 ml v BMP1 ter 95 ml v BMP2. Največja količina bioplina je v obeh poskusih nastala ob dodatku Standard 4ml v zadnjem petdnevem intervalu, in sicer je nastalo 437 ml bioplina v BMP1 (Preglednica 14), ter 399 ml bioplina v BMP2 (Preglednica 15). V celotnem poskusu smo

največ bioplina pridobili pri dodatku Standard 4ml, in sicer smo v BMP1 pridobili skupno 1000 ml bioplina, v BMP2 pa 1021 ml bioplina (Preglednica 16).

Sandberg in Ahring (1992) navajata, da proces anaerobne fermentacije optimalno poteka pri pH vrednostih od 6,8 do 7,2 ter da pretirano kislo okolje lahko povzroči razpad mikrobnih celic ter posledično destabilizacijo in končno ustavitev procesa. V poskusih BMP1 ter BMP2 je proces proizvodnje bioplina potekal nemoteno, saj v nobenem primeru nismo zaznali znižane vrednosti pH (Slika 4). Dodana najvišja količina glukoze očitno ni preobremenila procesa anaerobne fermentacije, kar dokazuje, da bi test BMP lahko relevantno izvajali tudi pri večjih obremenitvah s substratom. V poskusu BMP3 je proces proizvodnje bioplina potekal pri optimalnih vrednostih pH (Slika 10). Z večkratnim dodajanjem glukoze smo poskušali ugotoviti, ali bo prišlo do preobremenitve bioreaktorja ter zakisanja in posledično do zaustavitve procesa. Kljub dnevnim dodatkom in posledično še večjim KPK obremenitvam kot v poskusu BMP1 in BMP2, je proces potekal normalno, pri optimalnih vrednostih pH. To še enkrat potrjuje, da bi test BMP lahko izvajali tudi pri višjih obremenitvah kot jih predpisuje standardni postopek SIST EN ISO 11734.

Lv in sod. (2014) ugotavljajo, da lahko drastične spremembe v vrednostih pH ter koncentracijah KMK negativno vplivajo na proces anaerobne fermentacije organskih snovi in proizvodnjo bioplina. Ugotavljajo, da se ob dodajanju substrata v obstoječi proces proizvodnje bioplina, vrednosti omenjenih dejavnikov vedno spremenijo.

Murto in sod. (2004) navajajo, da lahko visoke koncentracije KMK povzročijo velik padec pH in s tem toksične pogoje v reaktorju. V anaerobnih digestorjih z majhno pufersko kapaciteto so zanesljivi indikatorji procesnih neravnovesij pH, alkaliteta ter vrednosti KMK. V digestorjih z veliko pufersko kapaciteto so spremembe pH lahko zelo majhne, tudi če je proces zelo obremenjen, in so vrednosti KMK edini zanesljiv indikator za spremljanje procesa.

V poskusih BMP1 in BMP2 so bile KMK pri vseh vzorcih že prisotne v manjših koncentracijah, kar pomeni, da so že nastale v procesu skladiščenja v anaerobnem bioreaktorju. Po dodatku različnih koncentracij standardne raztopine glukoze v BMP so se

koncentracije KMK do desetega dne poskusa povečevale, kar je posledica anaerobne pretvorbe glukoze (Preglednica 7). Zadnjih pet dni pa se je koncentracija KMK nekoliko zmanjšala, ker so se kisline pretvorile v bioplin. V obeh poskusih, tako BMP1 kot BMP2, pa so bile vsebnosti KMK v območjih običajnih koncentracij, ki so prisotne v bioplinskih reaktorjih in v nobenem primeru niso dosegle inhibitornih količin (Deublein in Steinhauser, 2008). Največja razlika v koncentraciji KMK med začetno ter končno vrednostjo je bila pri obeh poskusih pri dodatku Standard 1ml. Razpon koncentracij na koncu poskusa BMP2 je znašal od najvišje vrednosti 102 mg KMK/l pri Standard 1ml, do najnižje vrednosti 61,2 mg KMK/l pri Standard 2ml.

V poskusu BMP3 smo dnevno dodajali 2 ml standardne raztopine glukoze z obremenitvijo 0,64 g KPK/l biomase. Pričakovali smo, da se bo v nekem trenutku proizvodnja bioplina ustavila zaradi preobremenjenosti mikrobne združbe v bioreaktorju, pH v bioreaktorju naj bi se znižal, koncentracija KMK pa precej povečala. Rezultati so pokazali, da se je proizvodnja bioplina, ki jo posredno beležimo z produkcijo tlaka, do petega dne povečevala, nato pa je do konca poskusa proizvodnja bioplina ostajala na podobni ravni. Najmanjša izmerjena vsebnost je bila prvi dan poskusa, in sicer 169 hPa. Najvišje izmerjena vsebnost je bila deveti dan poskusa 317 hPa.

Skladno s povečevanjem proizvodnje bioplina, se je povečevala tudi koncentracija KMK v sistemu. Do petega dne se je iz začetnih 38,7 mg KMK/l povečala na 858 mg KMK/l, kar je največja izmerjena vsebnost (Slika 12). Do konca poskusa se je nato vsebnost postopoma zmanjševala, na končnih 581 mg KMK/l. Največja izmerjena količina že nakazuje, da bi lahko prišlo do destabilizacije anaerobne fermentacije (Deublein in Steinhauser, 2008), vendar se to ni zgodilo, saj je koncentracija KMK padla, kar kaže, da je mikrobna združba dokaj prilagodljiva in še uspe razgraditi tako količino organske snovi, tudi če smo jo dodajali na dnevni bazi. Rezultati poskusa BMP3 dokazujejo, da bi test BMP lahko izvajali tudi kot simulacijo kontinuiranega procesa, kar je največkrat praksa v bioplinskih reaktorjih v velikem merilu. S tem bi se pri testiranju anaerobne razgradljivosti oz. pri določanju bioplinskega potenciala različnih substratov lahko še bolj približali dejanskemu stanju na področju proizvodnje bioplina.

Iz pridobljenih rezultatov smo za posamezne 5-dnevne intervale preračunali, koliko bioplina je nastalo v določenem obdobju. V poskusih BMP1 ter BMP2 se proizvodnja bioplina povečuje. Pri vseh paralelkah, razen pri Standard 1ml, je največ bioplina nastalo v zadnjem petdnevem obdobju (P3). Najmanjša izmerjena količina je bila pri BMP1, Standard 1ml, in sicer 71 ml proizvedenega bioplina (Preglednica 14), v prvem petdnevem obdobju (P1). Največjo količino proizvedenega bioplina smo izmerili prav tako v poskusu BMP1, in sicer v obdobju P3, in sicer 437 ml proizvedenega bioplina (Preglednica 14 Preglednica 12). Ti rezultati kažejo tudi na to, da bi poskus BMP lahko potekal več kot 15 dni, torej toliko časa, da bi se večji del substrata pretvoril v bioplin in bi se krivulja proizvodnje bioplina zravnila v plato.

Ugotavljamo, da je kljub dnevnom dodajanju 2 ml standardne raztopine glukoze in obremenitvi sistema z 0,64 g KPK/l v poskusu BMP3, proizvodnja bioplina potekala nemoteno. Predvidevamo, da bi lahko ob dodatku še večje količine standardne raztopine glukoze povzročili preobremenitev sistema in s tem porušenje poskusa. Povečanje tlaka v zadnjih dneh je preseglo 300 hPa na dan, kar preračunano pomeni okoli 200 ml proizvedenega bioplina na dan. Omejeni smo tudi z bioreaktorjem OXITOP® CONTROL, saj nam omogoča beleženje rezultatov le do tlaka 400 hPa. Ob dodatkih večjih količin standardne raztopine glukoze bi se produkcija tlaka povečala nad vrednost 400 hPa, kar bi otežilo analiziranje podatkov. Ko se vrednosti 400 hPa produciranega tlaka v merilnih glavah približamo, moramo nastali bioplin iz bioreaktorja OXITOP® CONTROL izpustiti, da lahko rezultate beležimo naprej, pri tem pa lahko pride do napak. Končne rezultate nato preračunamo za celoten proces.

Delovne hipoteze, da se bo proces zaustavil zaradi prevelike obremenitve sistema nismo dosegli. Ustavitev procesa bi najverjetneje dosegli ob večjih obremenitvah.

6 POVZETEK

V današnjem času je pomanjkanje energije in nastajanje toplogrednih plinov z izgorevanjem fosilnih goriv globalen problem, zato je potreba po raziskovanju in izkoriščanju obnovljivih virov energije, ki so okolju prijazna, nujna.

Bioplin nastaja v procesu anaerobne fermentacije organskih snovi. Anaerobna fermentacija poteka v štirih fazah: hidroliza, acidogeneza, acetogeneza ter metanogeneza, ki jih izvajajo anaerobni mikroorganizmi.

Kot inokulum pri proizvodnji bioplina uporabljamo blato iz anaerobnih bioreaktorjev čistilne naprave CČN Domžale – Kamnik. Kot substrat za proizvodnjo bioplina pa smo dodali standardno raztopino glukoze v različnih koncentracijah. V naši raziskavi smo želeli preizkusiti, kakšen vpliv imajo dodatki različnih količin standardne raztopine glukoze na proizvodnjo bioplina, ter zabeležiti spremembe kemijskih dejavnikov med procesi BMP.

Izvedli smo tri teste biometanskega potenciala (BMP). BMP1 ter BMP2 sta bila testa, v katerih smo spremljali spremembe proizvodnje bioplina ob dodatkih različnih količin glukoze v petnajstih dneh. Imeli smo štiri različne dodatke glukoze, ki smo jih poimenovali standardi. Standard 1ml je bil dodatek 1 ml glukoze z obremenitvijo 0,32 g KPK/l biomase v bioreaktor OXITOP® CONTROL, Standard 2ml dodatek 2 ml glukoze z obremenitvijo 0,64 g KPK/l biomase, Standard 3ml dodatek 3 ml glukoze obremenitvijo 0,96 g KPK/l biomase ter Standard 4ml dodatek 4 ml glukoze z obremenitvijo 1,28 g KPK/l biomase.

V poskusih BMP1 in BMP2 je bilo največ bioplina proizvedenega pri dodatku največje koncentracije glukoze – Standard 4 ml. V BMP1 smo tako v 15 dnevnem poskusu pridobili 1000 ml bioplina, v poskusu BMP2 pa 1021 ml bioplina. V posameznih petdnevnih obdobjih je najmanj bioplina v obeh poskusih nastalo v prvem delu (P1), največ pa v zadnjem delu (P3). V BMP1 je tako v P1 nastalo 71 ml, v BMP2 pa 95 ml. V P3 je v BMP1 nastalo 399 ml bioplina, v BMP2 pa 437 ml bioplina.

Ob spremljanju sprememb fizikalnih dejavnikov celotnega poskusa, ter beleženju proizvedenega bioplina, smo lahko naknadno preračunali, koliko mililitrov bioplina je dejansko nastalo v posameznem obdobju. V treh petdnevni intervalih so se vrednosti za Standard 1ml gibale med 71 ml ter 116 ml pridobljenega bioplina na interval. Pri Standard 2ml so se vrednosti gibale med 131 ml ter 214 ml pridobljenega bioplina na interval. Za Standard 3ml smo izračunali vrednosti 165 ml bioplina kot najmanjšo vrednost, ter 294 ml kot največjo vrednost v posameznem intervalu. Pri Standard 4 ml pa se vrednosti gibljejo med 261 ml ter 437 ml nastalega bioplina (Preglednica 14).

V poskusu BMP3 se kljub dnevnemu dodajanju standardne raztopine glukoze proizvodnja bioplina, ki se kaže kot povečanje tlaka, ni zmanjšala ali ustavila. V zadnjih dnevih poskusa je vsak dan nastalo približno 200 ml bioplina.

V zadnjih dneh poskusa se vsebnosti KMK znižajo, kar kaže na to, da je mikrobna združba v bioreaktorju sposobna razgraditi večje količine organskih snovi, dodanih na dnevni bazi. Rezultati BMP3 kažejo, da bi lahko test izvajali kontinuirano pri dodatku takšnih količin glukoze.

V kolikor želimo rezultate testov BMP prenesti na industrijsko raven proizvodnje, je potrebno prej opraviti še pilotno testiranje večjih prostornin.

7 VIRI

Ahring B.K., Sandberg M., Ingelidaki I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 559–565

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

http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2717/Katedra_za_kmetijsko_tehniko/Prirocnik_o_bioplinu.pdf (20. mar. 2014)

Bejan A. 1997. *Advanced Engineering Thermodynamics*. 2. Edition. New York, Wiley: 920 str.

Chartrain M., Bhatnagar L., Zeigus J.G. 1987. Microbial Ecophysiology of Whey Biomethanation: Comparison of Carbon Transformation Parameters, Species Composition, and Starter Culture Performance in Continuous Culture. *Applied and environmental microbiology*, 53: 1147-1156

Chen Y., Cheng J.J. Creamer K.S. 2007. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Tehnology*, 99, 10: 4044-4064

Demirel B., Scherer P. 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science Biotechnology*, 7: 173-190

Deublein D., Steinhauser A. 2008. *Biogas from waste and renewable resources: An introduction*. Weinheim, WILEY VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 472 str.

Fey A., Conrad R. 2000. Effect of temperature on carbon and electron flow and on the archeal community in methanogenic rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4790–4797

Guiot S.R., Frigon J.C. 1995. Impact of liquid-to-gas transfer hydrogen mass transfer on substrate conversion efficiency of an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 17: 1080-1086

Gujer W., Zehnder A.J.W. 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science Technology*, 15: 127–167

Hercog J. 2009. Ocena možnosti izboljšave delovanja ČN mlekarske industrije. Diplomski naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo: 82 str.

ISO 9963 – 1. Water quality – Determination of alkalinity – Part 1: Determination of total and composite alkalinity. 1994: 6 str.

Liu Y., Zhang Y. 2012. Optimization of anaerobic acidogenesis by adding Fe⁰ powder to enhance anaerobic wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 192: 179 –185

Lv Z., Leite A.F., Harms H., Richnow H.H., Liebetrau J., Nikolausz M. 2014. Influences of the substrate feeding regime on methanogenic activity in biogas reactors approached by molecular and stable isotope methods. *Anaerobe*, 29: 91-99

Martin-Gonzales L., Font X., Vicent T. 2013. Alkalinity ratios to identify process imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. *Biochemical Engineering Journal*, 76: 1–5

Murto M., Björnsson L., Mattiasson B. 2004. Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management*, 70: 101-107

Parawira W. 2004. Anaerobic treatment of agricultural residues and wastewater, Doctoral Dissertation, Lund, Lund University Department of Biotechnology: 53 str.

Pfeffer J.T. 1980. Anaerobic digestion processes. London, Applied Science Publishers Ltd: 250 str.

Sandberg M., Ahring B.K. 1992. Anaerobic treatment of fish-meal process wastewater in a UASB reactor at high pH. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36: 800–804

Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 262-280

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

Vankova M. 2014. Biodegradability analysis of pharmaceuticals used in developing countries; screening with OxiTop® C-110. Tampere, Tampere University of Applied Sciences: 73 str.

<https://publications.theseus.fi/bitstream/handle/10024/23236/Vankova%20Magdalena.pdf?sequence=1> (20. jul. 2014)

Verma S. 2002. Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes. Columbia University : Foundation School of Engineering & Applied Science.

<http://www.seas.columbia.edu/earth/vermathesis.pdf> (15. apr. 2014)

Ward A.J., Hobbs P.J., Holliman P.J., Jones D.L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99: 7928-7940

WTW BOD measuring system OxiTop -C 110. 2009. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten.

<http://www.wtw.de/index.php?id=913&L=1> (15. jul. 2014)

Yadvika S., Sreekrishnan T.R., Kohli S., Vineet R. 2004. Enhancement of biogas production from solid substrates using different techniques – a review. *Bioresource Technology*, 95: 1-10

Yuan H.Y., Chen Y.G., Zhang H.X., Yiang S., Zhou Q., Gu G.W. 2006. Improved bioproduction of short-chain fatty acids (SCFAs) from excess sludge under alkaline conditions. *Environmental Science and Technology*, 40, 6: 2025–2029

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno oporo, razlage, potrpežljivost in spodbudo, ki mi jo je nudila v času nastajanja diplomskega dela.

Dr. Meti Levstek se zahvaljujem za praktične napotke, veliko mero potrpežljivosti ter pomoč pri eksperimentalnem delu.

Zahvala gre tudi celotnemu osebju CČN Domžale – Kamnik.

Zahvaljujem se prof. dr. Andreju Lavrenčiču za recenzijo dela.

Iskrena hvala moji najdražji, Valentini, za vso razumevanje, potrpežljivost ter pomoč, ki mi jo je dajala v času študija.

Posebna zahvala tudi mojim staršem, ki so mi omogočili študij ter me med njim podpirali ter spodbujali.

Še enkrat, hvala vsem!