

UNIVERZA V NOVI GORICI
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**BIOMETANSKI POTENCIAL TRDNEGA ODPADKA IZ
EKSTRAKCIJE PLODOV ŠIPKA (*Rosa canina* L.) S SOČASNO
RAZGRADNJO DODATNEGA VIRA DUŠIKA**

DIPLOMSKO DELO

Petra MURI

Mentorja: prof. dr. Albin Pintar
dr. Petar Djinović

Nova Gorica, 2013

IZJAVA

Izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Rezultati, ki so nastali v okviru skupnega raziskovanja z drugimi raziskovalci, ali so jih prispevali drugi raziskovalci (strokovnjaki), so eksplicitno prikazani oziroma navedeni (citirani) v diplomskem delu.

Petra Muri

ZAHVALA

Posebno zahvalo namenjam prof. dr. Albinu Pintarju, ki mi je omogočil opravljanje diplomskega dela na Kemijskem inštitutu v sodobnem laboratoriju z izjemnimi raziskovalci. Za svetovanje ter vodenje pri nastajanju diplomskega dela se najlepše zahvaljujem Iliji Gasanu Osojnik Črnivcu. Prav tako hvala obema za strokovno recenzijo dela. Zahvaljujem se tudi vsem ostalim raziskovalcem in sodelavcem laboratorija L-05 na inštitutu za tehnično pomoč, ter vedno prijetno vzdušje na oddelku. Nataši Belšak Šel hvala za vložen trud in čas za narejene poskuse v času moje odsotnosti. Hvala tudi Nastji Jošt, ki me je popeljala v praktični svet laboratorijskih del. Staršema za vse dane možnosti in vzpodbude ter kolegom za neizmerno lepo študentsko obdobje.

POVZETEK

Prehod v nizkoogljično družbo si kot cilj zadaja manjšo odvisnost od fosilnih goriv in s tem zmanjšanje onesnaženja okolja, ki ga le-ta prinašajo. Med tehnologije, ki bodo cilj uresničile, sodi tudi proces anaerobne mikrobne razgradnje, ki izrablja energetski potencial biorazgradljivih odpadkov. Poleg tega anaerobna mikrobna razgradnja zagotavlja uspešno ravnanje z odpadki, ki sicer na odlagališčih zaradi izpiranja hranil in izpustov toplogrednih plinov predstavljajo breme okolju. Trenutno se za substrat, ki ga mikroorganizmi razgradijo do energetsko bogatega bioplina, uporablja veliko različnih organskih odpadkov, ki pa niso nujno najprimernejši za sam proces. V tem primeru tako bioplinarne delujejo pod svojimi zmogljivostmi. Rešitev predstavljajo različni načini optimizacije procesa, ki v osnovi temeljijo na spremembah procesnih parametrov in na poseghih v recepturo vhodne mešanice substratov. V diplomskem delu preverjamo primernost trdnega odpadka iz ekstrakcije plodov navadnega šipka (*Rosa canina* L.), za uporabo v procesu pridobivanja bioplina, saj je tovrstna raba omenjenega substrata doslej razmeroma slabo raziskana. Na podlagi že narejene raziskave, smo se odločili, da bomo za substrat uporabili le presejane plodove odpadnega šipka (v nadaljevanju "odpadni presejani šipek"), t.j. perikarp ločen od pečk, saj pečke v primeru nepresejanih plodov bistveno ne izboljšajo biometanskega potenciala. Poleg tega želimo proces optimizirati s homogenizacijo substrata ter nadaljnjo sočasno razgradnjo odpadka z dodatnim virom dušika. Optimalno delovanje procesa smo želeli zagotoviti z uravnavanjem C/N razmerja substratne mešanice v območje 20:1, saj predvidevamo, da visoka vsebnost ogljika v perikarpu šipka ne zagotavlja dolgoročne stabilnosti procesa. Pri uporabi odpadnega presejanega homogeniziranega šipka smo optimalno C/N razmerje zagotovili z dodatkom dveh različnih virov dušika: (i) odvečnega aktivnega blata iz membranskega biološkega reaktorja za čiščenje z nitratnimi ioni onesnažene vode in (ii) suhega pekovskega kvasa. Odvečno aktivno blato smo sprva koncentrirali, nato pa homogenizirali, medtem ko kvasa pred inkubacijo zaradi dobre homogenosti ni bilo potrebno predobdelati. Vsem substratom smo določili vsebnost suhe snovi (SS), organske snovi (OS), vrednost kemijske potrebe po kisiku (KPK) ter utežno sestavo C, H, N, S elementov. Potencial substratov za produkcijo bioplina smo preizkusili v reaktorskem sistemu AMPTS (avtomatski sistem bioplinskega potenciala), pri čemer smo anaerobno mikrobno biomaso pridobili iz komercialne bioplinske naprave. Presenetljivo je homogenizacija znižala tako biometanski potencial kot tudi upočasnila potek samega procesa anaerobne mikrobne razgradnje. Po drugi strani je optimizacija procesa z uravnavanjem C/N razmerja prispevala k izboljšavi biometanskega potenciala, saj sočasna razgradnja odpadnega presejanega homogeniziranega šipka z odvečnim aktivnim blatom in kvasom doseže višji potencial kot pa odpadni presejani homogeniziran šipek sam.

Ključne besede: nizkoogljična energija, organski odpadki, anaerobna mikrobna razgradnja, predobdelava substratov, sočasna razgradnja, biometanski potencial

SUMMARY

The actions of so called low-carbon society are predetermining lower dependence on fossil fuels and consequently lower overall pollution of the environment. In support of achieving this goal, anaerobic digestion of biodegradable material within waste-to-energy pathways represent crucial and readily available energy potential, and with this gains its importance. Moreover, anaerobic digestion contributes to lower burden of poorly managed organic waste, which otherwise causes nutrient leaching and greenhouse gas emissions. Currently, many types of wastes are being used as feedstocks for biogas production, but in case of unoptimized process, biogas plants operate below maximum capacity. To overcome this problem, changes in operational parameters and/or optimization of feedstock composition can be applied. This thesis evaluates the feasibility of utilizing selected waste materials from various activities for biogas production and determination of their biomethane potential. As a main substrate, dog rose (*Rosa canina* L.) fruit extraction residue was screened for its methane potential, and the effects of process optimization through physical pretreatment and co-digestion were evaluated. Based on the previous research, we used only sieved fruit of dog rose waste (hereinafter referred as "dog rose waste"), i.e. pericarp separated from seeds, as seeds in case of unsieved dog rose waste do not significantly improve biomethane potential. The nutrient balance of carbon rich dog rose waste was adjusted by the addition of different nitrogen based substrates to provide the long-term process stability. For this purpose homogenized dog rose waste has been co-digested with (i) waste activated sludge from membrane biological reactor for denitrification of nitrate-rich potable water and (ii) dried yeast, as surplus material which is easily accessible material in the bakery industry. Waste activated sludge was concentrated and homogenized, whereas pretreatment of yeast was not required. All substrates were measured for their dry matter (DM) and volatile substances (VS) content, chemical oxygen demand (COD) value, and C, H, N, S elemental composition. Potential substrates for biogas production were tested in the reactor system AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) with anaerobic microbial biomass from a local commercial biogas plant being used as inoculum. Surprisingly, homogenization step decreased degradation over time, as well as the biomethane potential. On the other hand, the optimization with co-digestion contributed to improvement of biomethane potential, as co-digested testing samples reached better potential compared to homogenized dog rose waste alone.

Keywords: low-carbon energy, organic waste, anaerobic digestion, substrate pretreatment, co-digestion, biomethane potential

SEZNAM OKRAJŠAV

ALK = alkaliteta [mg/L CaCO₃]

AMPTS = Automatic Methane Potential Test System

C1-C5 = molekule z 1-5 ogljikovimi atomi

CHNS = vsebnost ogljika, vodika, dušika in žvepla [%]

C/N/P/S = razmerje med ogljikom, dušikom, fosforjem in žveplom

C/N = razmerje med ogljikom in dušikom

CSTR = Continuously Stirred Tank Reactor

IEA = International Energy Agency

KPK = kemijska potreba po kisiku [mg/L; g/kg]

K = kvas

MBRa1, 2 = odvečno aktivno blato

MPHŠ = mokri presejani plodovi homogeniziranega šipka (odpadni presejani homogenizirani šipek)

MPŠ = mokri presejani plodovi šipka (odpadni presejani šipek)

MŠ = mokri plodovi nepresejanega šipka (odpadni šipek)

OS = organska snov [g/kg; %]

ρ_{H_2} = parcialni tlak vodika [bar]

SPŠ = suhi presejani plodovi šipka

SS = suha snov [g/kg; %]

UASB = Upflow Anaerobic Sludge Blanket

Podpisano:

v_h = vhod

iz = izhod

red = redukcija

v_z = vzorec

ss = suha snov

os = organska snov

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 Namen dela.....	2
1.2 Hipoteze	2
2 TEORETIČNE OSNOVE.....	3
2.1 Anaerobna razgradnja.....	3
2.1.1 Hidroliza.....	3
2.1.2 Acidogeneza.....	3
2.1.3 Acetogeneza.....	3
2.1.4 Metanogeneza.....	4
2.2 Bioplín.....	5
2.3 Vpliv abiotskih dejavnikov na anaerobno razgradnjo organske snovi.....	6
2.3.1 Parcialni tlak vodika	7
2.3.2 Koncentracija mikroorganizmov	8
2.3.3 Temperatura	8
2.3.4 pH vrednost in puferska kapaciteta	9
2.3.5 Hranila	10
2.3.6 Zaviralci procesa anaerobne razgradnje	10
2.3.7 Substrat.....	12
2.3.8 Opis vhodnih substratov	13
2.3.9 Optimizacija in modifikacija anaerobne razgradnje	15
3 EKSPERIMENTALNI DEL	18
3.1 Vhodni substrati.....	18
3.2 Karakterizacija substratov.....	19
3.2.1 Določanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS).....	19
3.2.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK).....	20
3.2.3 Elementna C, H, N in S sestava.....	22
3.2.4 Karl Fischer kulometrična titracija (KF)	22
3.2.5 Mikroskopiranje na vrstičnem elektronskem mikroskopu (SEM).....	24
3.2.6 Test biometanskega potenciala s sistemom AMPTS	24
3.2.7 pH vrednost testnih mešanic.....	28
3.2.8 Spremljanje sestave bioplina na plinskem kromatografu	28
3.2.9 Alkaliteta	28
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	31
4.1 Karakterizacija inokuluma	31
4.2 Karakterizacija substratov.....	31

4.3	Karakterizacija testnih mešanic	32
4.4	pH vrednosti testnih mešanic.....	33
4.5	Celokupna produkcija bioplina ter bioplinski potencial	34
4.6	Sestava bioplina	36
4.7	Vpliv dušika ter C/N razmerja na produkcijo metana.....	38
4.8	Biometanski potencial	39
4.9	Izplen metana	39
4.10	Energetska bilanca.....	39
4.11	Razprava	40
5	ZAKLJUČKI.....	42
6	VIRI	43

SEZNAM SLIK

<i>Slika 1: Shema anaerobnega razpada organske snovi.....</i>	5
<i>Slika 2: Energetsko okno pri 25 °C, kjer sta produkcija in poraba vodika termodinamsko ugodni</i>	7
<i>Slika 3: Vpliv pH vrednosti in temperature na % amoniaka in amonija.....</i>	11
<i>Slika 4: Membranski biološki reaktor</i>	15
<i>Slika 5: a: odpadni šipek b: odvečno aktivno blato c: kvas.....</i>	19
<i>Slika 6: a: razklopni sistem za merjenje KPK b: kivete z vzorci c: titriranje na avtomatskem titratorju d: spektrofotometrična enota za merjenje KPK</i>	22
<i>Slika 7: AMPTS (z leve proti desni: reaktorji v vodni kopeli, enota za kemično absorpcijo CO₂ in H₂S, enota za merjenje količine nastalega bioplina oz. metana</i>	25
<i>Slika 8: SEM slika a: inokuluma b: odpadnega presejanega homogeniziranega šipka ter c: odpadnega presejanega šipka.....</i>	32
<i>Slika 9: Celokupna produkcija bioplina iz različnih vzorcev.....</i>	34
<i>Slika 10: Stopnja produkcije bioplina iz različnih vzorcev.....</i>	35
<i>Slika 11: Bioplinski potencial vzorcev, izražen na OS</i>	35
<i>Slika 12: Bioplinski potencial vzorcev, izražen na KPK</i>	36
<i>Slika 13: Delež CH₄, CO₂ in N₂ med inkubacijo MBRa2</i>	37
<i>Slika 14: Delež CH₄, CO₂ in N₂ med inkubacijo MPHS+MBRa1.....</i>	37
<i>Slika 15: CH₄/CO₂ razmerje substratov med inkubacijo</i>	38

SEZNAM PREGLEDNIC

<i>Tabela 1: Tipična sestava bioplina.....</i>	5
<i>Tabela 2: Abiotski dejavniki vpliva na anaerobno razgradnjo.....</i>	7
<i>Tabela 3: Lastnosti različnih substratov in delovni pogoji v procesu njihove anaerobne razgradnje</i>	13
<i>Tabela 4: Biometanski potencial za nekaj substratov iz družine Rosaceae</i>	14
<i>Tabela 5: Substrati in načini predobdelave</i>	18
<i>Tabela 6: Sestava testnih mešanic</i>	27
<i>Tabela 7: Lastnosti inokulum za posamezne serije.....</i>	31
<i>Tabela 8: Lastnosti substratov odvečnega aktivnega blata in kvasa</i>	31
<i>Tabela 9: Lastnosti šipkovih substratov, (ne)popravljenih na vsebnost etanola</i>	32
<i>Tabela 10: C, H, N, S analize substratov.....</i>	32
<i>Tabela 11: Karakteristike testnih mešanic</i>	33
<i>Tabela 12: pH vrednosti testnih mešanic na začetku in koncu inkubacije</i>	33
<i>Tabela 13: Vrednosti H₂S za kvas</i>	36
<i>Tabela 14: Alkaliteta testnih mešanic z odvečnim aktivnim blatom</i>	37
<i>Tabela 15: Producija CH₄ glede na različno vsebnost ogljika.....</i>	38
<i>Tabela 16: Biometanski potencial substratov.....</i>	39
<i>Tabela 17: Izplen CH₄ glede na reducirano OS in KPK</i>	39
<i>Tabela 18: Energetska bilanca</i>	40

1 UVOD

Vidik trajnostnega razvoja je v današnji družbi še kako prisoten. Ena večjih skrbi in izzivov je zagotavljanje naraščajoče potrebe po energiji, saj naj bi se po mnenju IEA svetovne potrebe po energiji do leta 2030 povečale za več kot 60 %. To samo po sebi ne predstavlja problema, kar pa ne velja ob dejstvu, da živimo v času globalnega segrevanja, prekomernega onesnaženja naravnih virov ter usihanja fosilnih goriv, ki v današnjem svetu predstavljajo glavni vir energije. Rešitev predstavljajo naložbe v procese izkoriščanja učinkovite rabe in obnovljivih virov energije z nično oziroma nizkoogljično bilanco. Raziskave in razvoj na tem področju izvajajo neodvisne institucije, državni organi in naftne korporacije, ki na različne načine poskušajo zgraditi ekonomijo okolju prijaznih tehnologij. Čeprav se na prvi pogled zdi, da so omejitve izkoriščanja novih alternativnih virov le tehnološke in ekonomske, obstaja veliko različnih organizacij, ki lobirajo za politiko konservativne rabe neobnovljivih virov energije, saj fosilna goriva dominirajo na trgu energetskih virov in tako prinašajo ogromne zaslužke.

Med najučinkovitejše alternativne vire sodi sončna energija, saj je edini vir, ki je neizčrpen in vsem na voljo. Veliko pozornost se ob sončni, vetrni, hidro ter geotermalni energiji namenja tudi bioplinu, z metanom bogatemu emergentu. Bioplín, ki poleg metana vsebuje še ogljikov dioksid s sledovi amoniaka, vodikovega sulfida ter nekaterih drugih plinov, nastaja v procesu anaerobne mikrobne razgradnje (v nadaljevanju "anaerobna razgradnja") organske snovi [Lombardi L. in sod., 2013]. Vhodno snov predstavljajo različni kmetijski, industrijski in komunalni organski odpadki ter v zadnjem času tudi energetske rastline [Amon B. in sod., 2007; Cheng J.J. in sod., 2008]. Pridobljeni bioplín iz organskih odpadkov je iz okoljevarstvenega vidika še posebno zanimiv, saj zmanjšuje (i) njihovo količino, kar je sicer eden glavnih ciljev upravljanja z odpadki, kot tudi (ii) z vgrajevanjem v druge spojine (ponor ogljika) izpuste toplogrednih plinov, ki nastajajo pri razgradnji odpadkov na odlagališčih [Liu X. in sod., 2012]. Nenazadnje pa presnovljeni substrat, ki prav tako nastaja v procesu anaerobne razgradnje, kot surovina, bogata s hranili nadomešča uporabo umetnih gnojil [Berglund M. in Börjesson P., 2006].

Ker ima bioplín podobno sestavo kot naravni plin, se ga lahko z bolj ali manj enostavnimi tehnikami prečiščevanja uporablja za podobne namene, npr. kot gorivo v motornih vozilih ali pa se ga uvaja v javno plinsko omrežje [Harasek M. in sod., 2010]. Glede na razpoložljive količine organskih odpadkov je tehnični potencial za produkcijo bioplina zelo velik, saj naj bi za leto 2020 samo v Nemčiji le-ta znašal približno 72 TWh [Ramesohl S. in sod., 2006]. Kar zadeva Evropsko unijo, je razvoj na področju bioplinskega sektorja iz leta v leto znatnejši, s tem da ne moremo mimo dejstva, da je trenutno tržišče nekoliko omejeno zaradi gospodarske krize ter zakonodaje na tem področju. Napredek je moč prikazati s celotno količino električne energije, pridobljene iz bioplina, ki je v letu 2009 znašala 25,2 TWh in v letu 2011 35,9 TWh [Eurobserv'er 2010; Eurobserv'er 2012]. Ustreznost substrata je pri rabi v procesu anaerobne razgradnje pogojena z njegovimi značilnostmi. To pomeni, da ni vsaka organska snov primerna za izrabo v procesu. Dandanes tako različne tehnološke možnosti v Evropi omogočajo predelavo približno štirih milijonov ton trdnih odpadkov, s čimer se deloma izpolnjuje potreba po trajnostnem upravljanju z različnimi tipi organskih odpadkov, saj je na podlagi zakonskih predpisov potrebno zmanjšati količine biorazgradljivih frakcij odpadkov na odlagališčih. Poseben pomen anaerobne razgradnje pripisujemo tudi obdelavi kmetijskih odpadkov, ki so ob neprimerenem zbiranju, skladiščenju in nadaljnji uporabi potencialni vir (i) izpiranja hranil, predvsem nitratov, nitritov in fosfatov, (ii) izpustov amoniaka, didušikovega oksida, metana in ogljikovega dioksida ter (iii) žarišče patogenih mikroorganizmov in ksenobiotikov (npr. zdravil, rastnih hormonov ...). Kakšna je potreba po primerni obdelavi, govorijo podatki, da kmetijski sektor prispeva 18 % vseh človeških izpustov toplogrednih plinov [Holm-Nielsen J.B. in sod., 2009].

Med tehnologijami izkoriščanja obnovljivih virov energije ima anaerobna razgradnja ključno vlogo na področju izkoriščanja energetskega potenciala organskih odpadnih tokov in sočasnim reševanjem problematike ravnjanja z odpadki. Ob tem je potrebno poudariti, da moramo cilje o varovanju okolja doseči kot družba, kar pomeni, da mora biti javnost seznanjena s problemi kot tudi z idejami in novimi tehnologijami ter spodbujena k doseganju teh ciljev.

1.1 Namen dela

Glede na to, da se šipek v večji meri uporablja v obliki prehranskih dopolnil in kozmetičnih sredstev, ter da raziskave kažejo na njegov potencial pri (i) zdravljenju bolezni, kot so osteoartritis, ateroskleroza, gastrovaskularne bolezni ... in (ii) njegovi uporabi na področju sredstev za daljšo obstojnost živil, lahko pričakujemo, da se bodo količine odpadkov, ki nastajajo pri obdelovanju šipkovih proizvodov, v prihodnje še povečale [Wysocki W.E. in sod., 1999; Demir F. in Özcan M., 2001; Bliddal H. in sod., 2008; Estévez M. in sod., 2012]. Tako je iz okoljevarstvenega kot tudi ekonomskega vidika smiselno razmišljati o uporabi tovrstnih odpadkov za produkcijo bioplina. Poznavanje značilnosti šipka je postavilo vprašanje o morebitnem izboljšanju biometanskega potenciala ter stabilnosti samega procesa s sočasno razgradnjo drugih substratov, saj ima presejani trdni odpadek po ekstrakciji plodov šipka (v nadaljevanju "odpadni presejani šipek"), ki ga sicer sestavlja omeseneli del plodu, visok delež ogljika. Na osnovi primernosti in dostopnosti le-teh smo kot substrata, ki predstavlja dober vir dušika, v sočasni razgradnji z odpadnim presejanim homogeniziranim šipkom uporabili odvečno aktivno blato ter pekovski kvas.

Študija se tako osredotoča na (i) določitev biometanskega potenciala odpadnega presejanega (homogeniziranega) šipka, odvečnega aktivnega blata ter kvasa s pomočjo laboratorijskega reaktorskega sistema AMPTS (avtomatski test biometanskega potenciala), (ii) karakterizacijo substratov in testnih mešanic glede na vsebnost suhe snovi (SS), organske snovi (OS), kemijske potrebe po kisiku (KPK) in pH vrednosti ter (iii) spremljanje sestave bioplina med potekom fermentacije. Prav tako smo žeeli oceniti (iv) ustreznost sočasne razgradnje odpadnega presejanega homogeniziranega šipka z odvečnim aktivnim blatom ter kvodom za izboljšanje biometanskega potenciala procesne recepture ter (v) učinkovitost zmanjševanja dušikovih spojin v celični biomasi odpadnega aktivnega blata, ki ob neprimerni obdelavi predstavlja vir nastanka toplogrednih plinov, kot sta metan in dušikovi oksidi.

1.2 Hipoteze

Pričakujemo, da bo homogenizacija odpadnega presejanega šipka nekoliko povečala hitrost razgradnje, saj z zmanjšanjem velikosti delcev omogočimo večjo površinsko dostopnost substrata mikroorganizmom.

Nadalje predvidevamo, da bomo z uravnavanjem C/N razmerja testnim mešanicam odpadnega presejanega homogeniziranega šipka in dodatnega vira dušika v območje 20:1 omogočili optimalni potek procesa in posledično izboljšanje biometanskega potenciala v sočasni razgradnji uporabljenih substratov.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 Anaerobna razgradnja

Anaerobna razgradnja je biokemijski proces, pri katerem določeni mikroorganizmi v odsotnosti kisika in pri zadostnih količinah vode razgradijo organsko snov (substrat), pri čemer kot produkt nastaja mešanica plinov, t.i. bioplín, in presnovljeni substrat, ponekod imenovan kot 'digestat' [Ward A.J. in sod., 2008]. Metabolni proces anaerobne razgradnje, ki je predstavljen v nadaljevanju ter prikazan na *sliki 1*, poteka v štirih stopnjah (hidroliza, acidogeneza, acetogeneza in metanogeneza).

2.1.1 Hidroliza

Hidroliza je prva stopnja procesa anaerobne razgradnje, v kateri se netopni organski polimeri s pomočjo ekstracelularnih encimov razgradijo do vodotopnih oligo- in monomerov, ki lahko prehajajo celično membrano [Demirbas M.F. in sod., 2011]. V tej fazi organske makromolekule, kot so ogljikovi hidrati, proteini in maščobe, razпадajo do enostavnih sladkorjev, aminokislin, alkoholov in maščobnih kislin. Bakterije, ki sodelujejo v tem procesu, uvrščamo tako med fakultativne kot tudi striktne anaerobe.

Čas trajanja hidrolize je odvisen od lastnosti substrata. Hidroliza ogljikovih hidratov poteče v nekaj urah, medtem ko hidroliza proteinov in lipidov traja nekaj dni [Deublein D. in Steinhauser A., 2008]. Hidroliza lahko omejuje hitrost anaerobne razgradnje, če substrat vsebuje velike delce z nizkim razmerjem med površino in prostornino, saj je dostopnost substrata mikroorganizmom manjša kot pri manjših delcih [Vavilin V.A. in sod., 1996]. Prav tako hidrolizo omejujejo lignocelulozni substrati, pretežno zgrajeni iz celuloze, hemiceluloze ter lignina, ki so zaradi zapletene in toge strukture počasi in nepopolno razgradljivi [Angelidaki I. in sod., 2010]. Stopnjo razgradnje lahko pospešimo na različne načine, s fizikalno, biološko in kemično predobdelavo ter njihovimi kombinacijami. Predobdelava substratov mora biti čim bolj enostavna in glede na to, da je bioplín obnovljivi vir energije, okolju prijazna [Nakamura Y. in sod., 2006; Angelidaki I. in sod., 2010].

2.1.2 Acidogeneza

Produkti hidrolize prehajajo celično steno mikroorganizmov, kjer poteka acidogeneza in druge stopnje anaerobne razgradnje. Acidogeneza velja za najhitrejšo fazo anaerobne razgradnje [Vavilin V.A. in sod., 1996]. V tej stopnji se monomeri razgradijo do kratko verižnih organskih kislin, C₁-C₅ molekul (npr. maslena kislina, propionska kislina, ocetna kislina,...), alkoholov, H₂ in CO₂. Glavni vmesni produkti te faze so ocetna kislina (51 %) ter H₂ in CO₂ (19 %), medtem ko so druge hlapne maščobne kisline in alkoholi (30 %), manj pogosti [Ahring B.K., 2003]. V procesu sodelujejo bakterije, ki jih uvrščamo tako med fakultativne kot med striktne anaerobe.

2.1.3 Acetogeneza

V naslednji fazi acetogene bakterije, imenovane tudi proton-reducirajoče bakterije, maščobne kisline daljše od dveh enot, alkohole daljše od ene enote, razvejane verige molekul ter aromatske maščobne kisline oksidirajo do acetata, CO₂ in H₂ in v nekaterih primerih tudi do formata [Schink B. in Stams A.J.M., 2006]. Reakcije acetogeneze so sicer termodinamsko ugodne pri nizkem parcialnem pritisku vodika, pri katerem acetogene bakterije tvorijo H₂, CO₂.

ter acetat. Na drugi strani pri visokem parcialnem pritisku vodika v fermentacijski mešanici prevladujejo butanojska, kapronska, propionska, valerianska kislina ter etanol, kar je sicer neugodno za nadaljnje nastajanje metana [Schink B., 1997]. Pri pravilnem poteku procesa so produkti acetogeneze substrati zadnje stopnje anaerobne razgradnje - metanogeneze.

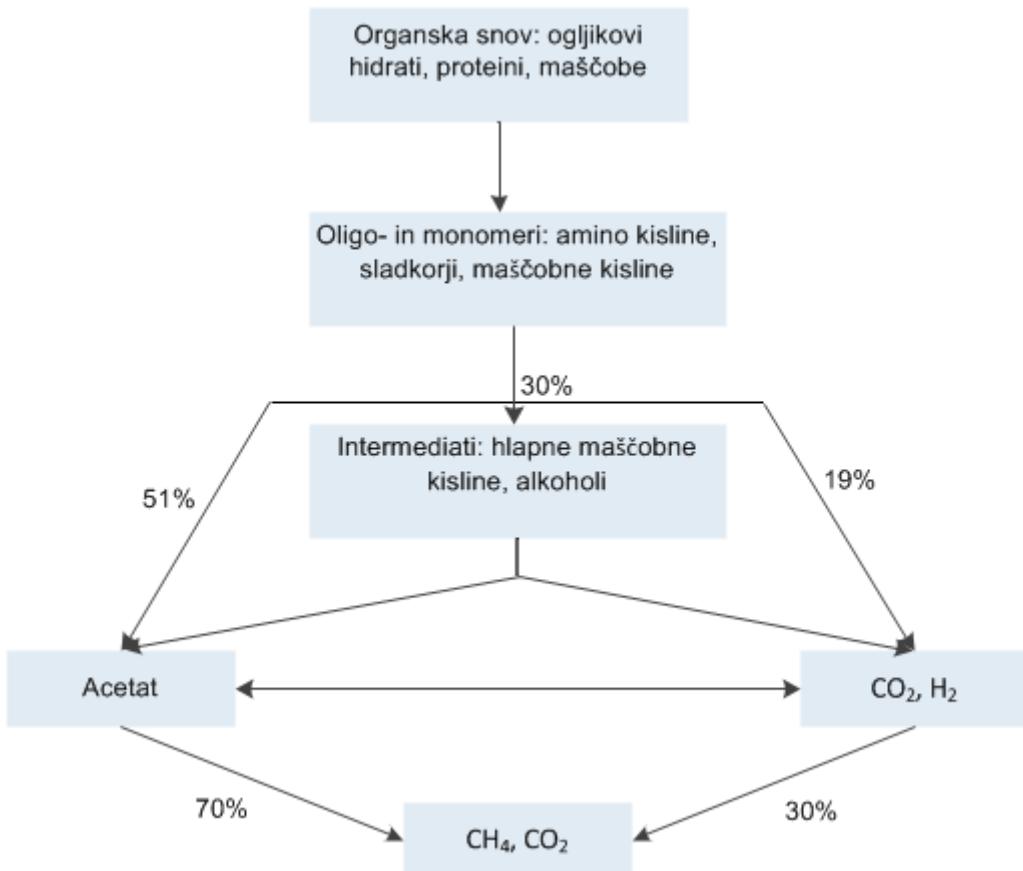
2.1.4 Metanogeneza

Medtem ko v drugih fazah anaerobne razgradnje sodelujejo večinoma bakterije, je metanogeneza izključno domena arhej. Metanogene arheje so sposobne rasti le na določenih substratih. Glede na substrat, ki ga le-te uporabljajo, ločimo acetoklastične, hidrogenotrofne, metil reducirajoče in metilotrofne metanogene arheje z značilnimi reakcijskimi potmi (*reakcije [1] – [4]*):

Acetoklastična metanogeneza: $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	Reakcija [1]
Hidrogenotrofna metanogeneza: $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	Reakcija [2]
Metil reducirajoča metanogeneza: $CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	Reakcija [3]
Metilotrofna metanogeneza: $4CH_3OH + 2H_2O \rightarrow CO_2 + 3CH_4 + 4H_2O$	Reakcija [4]

Acetoklastična redukcijska pot tako zajema redukcijo acetne kisline v CH_4 in CO_2 , hidrogenotrofna pa redukcijo CO_2 v CH_4 in H_2O , preko H_2 kot donorja elektronov [McInerney M.J. in sod., 2010a]. Metilotrofna in metil reducirajoča pot sta si med seboj zelo podobni in kot substrat izrabljata C-1 spojine kot so metanol in metilamini, s tem da metilotrofna redukcija ne uporablja H_2 kot donorja elektronov [Metcalf W.W in Welander P.V., 2005]. V anaerobnem reaktorju skoraj 70 % metana nastane iz acetata, medtem ko preostali del izvira iz H_2/CO_2 [Braun R., 2007]. V običajnem sistemu je obseg metanogeneze, ki poteka preko metiliranih komponent, 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 metabolne produkte acetogenih bakterij [Guiot S.R. in Frigon J.C., 1995]. Metanogene arheje so striktni anaerobi ter so nasploh zelo občutljive na okoljske dejavnike. Imajo izredno počasen metabolizem, zaradi česar pogosto omejujejo hitrost anaerobne razgradnje.

V običajnih komercialnih sistemih vse faze anaerobne razgradnje potekajo v enem reaktorju oz. več zaporedno povezanih reaktorjih, v katerih se vzdržujejo enaki obratovalni pogoji. Nekatere tehnološke izvedbe omogočajo ločitev stopenj hidrolize in acidogeneze od stopenj acetogeneze in metanogeneze, kar lahko v primeru uporabe določenih substratov (celulozni substrati, trdni ostanki proizvodnje olivnega mila, klavnični odpadki ...) omogoča večjo učinkovitost procesa. Tako imenovani dvo-stopenjski procesi v praksi niso pogosti, saj so kljub povečanemu biometanskemu potencialu ter boljši stabilnosti procesa stroški izgradnje in obratovanja teh sistemov precej visoki [Hafez H. in sod., 2012].



Slika 1: Shema anaerobnega razpada organske snovi [povzeto po Ahring B.K., 2003]

2.2 Bioplín

Bioplín je produkt procesa anaerobne razgradnje. Navadno bioplín, katerega sestava je pretežno odvisna od vrste substrata, v največji meri tvorita metan (55 - 70 %) in ogljikov dioksid (30 - 45 %) z manjšim deležem vodikovega sulfida in amoniaka [Demirbas M.F. in sod., 2011]. Občasno so lahko prisotne zelo majhne koncentracije organskih žvepljivih spojin, halogeniranih ogljikovodikov, ogljikovega monoksida ter elementarnega vodika, dušika in kisika. Ponavadi so v plinu prisotni tudi vodna para, prah in v primeru plina, ki nastaja na odlagališčih in bioplina, ki nastajata na komunalnih čistilnih napravah, še siloksi. Vsebnosti nekaterih komponent bioplina so prikazane v tabeli 1 [Arthur R. in sod., 2011].

Tabela 1: Tipična sestava bioplina

Komponenta	Vsebnost (vol. %)
CH ₄	40-75
CO	0-0,1
CO ₂	20-40
H ₂	1-3
H ₂ S	0,1-0,5
N ₂	0,5-2,5
NH ₃	0,1-0,5
O ₂	0,1-1

Anaerobno razgradnjo organske snovi, pri kateri nastaja bioplín, ponazorimo z naslednjo biokemijsko enačbo (enačba [1]), ki so jo opisali Krich K. in sodelavci [2005]:



$$x = 1/8 \cdot (4c + h - 20 - 3n - 2s) \quad \text{Enačba [2]}$$

$$y = 1/4 \cdot (4c - h - 20 + 3n + 3s) \quad \text{Enačba [3]}$$

Iz stehiometrije enačbe je razvidno, da je sestava pridobljenega bioplína odvisna pretežno od lastnosti uporabljenega substrata. Med razgradnjo tako nastanejo naslednji produkti:



Razmerje CH₄/CO₂ v bioplínu je omejeno s stopnjo redukcije organske snovi, ki je odvisno od sestave in biorazgradljivosti substrata. Pri razgradnji ogljikovih hidratov nastaja bioplín z razmerjem CH₄/CO₂=50/50, medtem ko pri substratih, ki vsebujejo več maščob in proteinov, nastaja večja količina metana. Tipično razmerje CH₄/CO₂ za maščobe je 70/30 in za proteine 55/45 [Krich K. in sod., 2005].

Sestava bioplína, ki se ponavadi nanaša na razmerje CH₄/CO₂, je odvisna od naslednjih dejavnikov [Deublein D. in Steinhäuser A., 2008]:

- vsebnost dolgoverižnih ogljikovodikov (npr. substrati, bogati z maščobami, lahko povečajo donos bioplína z upoštevanjem, da kopiranje maščobnih kislin lahko povzroči zakislitev sistema),
- zadrževalni čas (v splošnem se stopnja razgradnje substrata povečuje z zadrževalnim časom substrata v fermentoru),
- fizikalna struktura substrata (proses razgradnje poteka hitreje in bolj uravnovešeno, če je substrat homogen, zaradi česar je zadrževalni čas krajiši),
- način predobdelave lignoceluloznega substrata (pomembna je relokalizacija lignina, ki omogoči encimsko dostopnost substrata),
- vsebnost vode v fermentoru (pri višji vsebnosti vode bo količina CO₂ v plinski fazi manjša, saj bo več CO₂ raztopljenega v vodi),
- temperatura (pri višji temperaturi bo vsebnost CO₂, raztopljenega v vodi, manjša, poleg tega se poveča hitrost razgradnje),
- tlak (pri višjem tlaku bo vsebnost CO₂ raztopljenega v vodi večja),
- stopnja hidroliziranosti substrata,
- predobdelava substrata (le-ta pospeši in poveča stopnjo razpada).

2.3 Vpliv abiotiskih dejavnikov na anaerobno razgradnjo organske snovi

Za stabilnost in učinkovitost procesa anaerobne razgradnje je bistvenega pomena uravnavanje delovnih pogojev (tabela 2), kar je zaradi zapletenosti procesa zahtevno opravilo. V primeru, da vodimo celoten proces v enem reaktorju ozziroma enostopenjsko, morajo biti okoljski dejavniki izpolnjeni v korist metanogenim arhejam, saj le-te zaradi nizke stopnje rasti ter občutljivosti na okoljske dejavnike pri neustreznih pogojih ne preživijo v mešani kulturi mikroorganizmov [Deublein D. in Steinhäuser A., 2008].

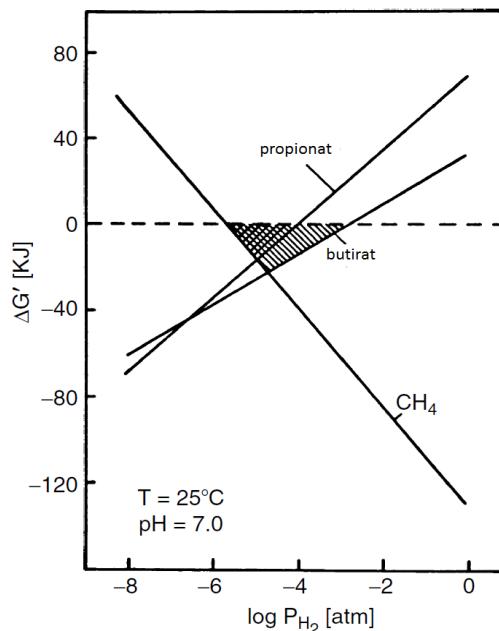
Tabela 2: Abiotski dejavniki vpliva na anaerobno razgradnjo

Parameter	Hidroliza/acidogeneza	Acetogeneza/metanogeneza
C/N	10 - 45	20 - 30
C/N/P/S	500/15/5/3	600/15/5/3
Elementi v sledovih	-	Esencialni: Ni, Co, Mo, Se
pH	5,2 - 6,3	6,7 – 7,5
Redoks potencial	+400 do -300 mV	< -250 mV
SS	< 40 % SS	< 30 % SS
Temperatura	25 – 35 °C	Mezofilni mikroorganizmi: 32 – 42 °C Termofilni mikroorganizmi: 50 – 58 °C

2.3.1 Parcialni tlak vodika

Med procesom anaerobne razgradnje mora koncentracija vodika po eni strani ustrezati acetogenim bakterijam, ki za nastanek acetata ter H_2/CO_2 potrebujejo nizek parcialni tlak vodika, kot tudi metanogenim arhejam, ki za nastanek CH_4 potrebujejo H_2 . Zato je potrebno sintrofično simbiotsko razmerje acetogenih ter metanogenih mikroorganizmov, ki temelji na t.i. medvrstnem prenosu metabolitov pri nizkih koncentracijah ob zelo nizkih spremembah Gibbsove proste energije (ΔG_f) [McInerney M.J. in sod., 2010b] in posledično nizkih energetskih izplenih v respiracijski verigi.

Nizek parcialni tlak vodika je posledica uravnoteženega delovanja mikroorganizmov, ki H_2 proizvajajo, ter mikroorganizmov, ki H_2 porabljajo. Ta mehanizem je ključnega pomena za stabilno delovanje anaerobne razgradnje, saj obenem omogoča sintrofno oksidacijo propionata in butirata. Prav tako je nizek parcialni tlak vodika potreben za nastanek metana iz H_2 in CO_2 . Gre za procese, ki so z energetskega vidika zelo učinkoviti, saj potekajo pri prosti Gibbsovi energiji -20 kJ/mol ali manj (slika 2) [Diamantis V.I. in sod., 2007].



Slika 2: Energetsko okno pri 25 °C, kjer sta produkcija in poraba vodika termodinamsko ugodni

Na drugi strani pa visok parcialni tlak vodika povzroči spremembo metabolnih poti, pri čemer se tvorba acetata zmanjša, poveča pa produkcija bolj reduciranih snovi (npr. laktat, butirat, propionat, alkoholi), kar zmanjša produkcijo metana [Solera R. in sod., 2002].

2.3.2 Koncentracija mikroorganizmov

Čas, ki je potreben za začetek delovanja bioplinarne, zaradi potrebe po ustreznih namnožitvih mikroorganizmov ter počasne rasti metanogenih arhej navadno traja 1 mesec [Gerardi M.H., 2003]. Da bi se izognili izpiranju mikroorganizmov iz reaktorja v zagonskem obdobju, mora biti hidravlični zadrževalni čas sistemov, kjer biomasa ni pritrjena ali kjer ni nameščenega recikla mikrobne biomase, najmanj 10 - 15 dni [Deublein D. in Steinhauser A., 2008], kar je še posebno pomembno pri nižje obremenjenih sistemih, ki se uporabljajo za obdelavo organskih odpadkov.

V času obratovanja reaktorja je mikrobno biomaso potrebno v največji meri zadržati v reaktorju [Ward A. in sod., 2008]. Zmanjšanje izpiranja mikrobne biomase omogoča krajše zadrževalne čase in s tem manjšo delovno prostornino reaktorja oziroma večjo produkcijo bioplina pri nespremenjeni velikosti. Eden od možnih načinov povečanja koncentracije mikroorganizmov v reaktorju je imobilizacija oz. pritrjena rast mikroorganizmov, ki jo med drugimi omogoča anaerobni filter. Medij, na katerega se mikroorganizmi priraščajo, je lahko neaktivni ali pa razgradljiv, ki potem hkrati v reaktorju služi kot substrat. Poleg pritrjene rasti mikroorganizmov lahko v anaerobnem reaktorju izkoristimo tudi lastnosti številnih suspendiranih kultur, ki pri visoki celični gostoti težijo k združevanju v kosmiče, flokule, pelete in granule. Samodejno tvorbo granul iz suspendirane mikrobne biomase izkoriščamo na primer v t.i. reaktorju z muljno posteljico (*UASB, upflow anaerobic sludge blanket*) [McHugh S. in sod., 2003].

2.3.3 Temperatura

Proces anaerobne razgradnje lahko poteka znotraj treh temperturnih območij [El-Mashad H.M. in sod., 2004; Kim S.W. in sod., 2006; Cavinato C. in sod., 2010]:

- psihrofilno območje pri < 25 °C
- mezofilno območje pri 25 - 40 °C (običajno 35 - 37 °C),
- termofilno območje pri 48 - 60 °C (običajno 52 - 56 °C)

Temperatura je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vpliva na aktivnost mikroorganizmov v reaktorju. Povečanje temperature ima na splošno pozitiven vpliv na termodinamiko in kinetiko bioloških procesov [El-Mashad H.M. in sod., 2004; Boe K., 2006].

Višja temperatura:

- poveča hitrost biokemičnih reakcij, zaradi česar je razgradnja hitrejša (manjša delovna prostornina reaktorja in/ali krajši zadrževalni čas),
- izboljša fizikalno-kemijske lastnosti organskih snovi (npr. poveča hitrost difuzije med substratom in raztopino, poveča stopnjo prenosa med kapljevino in plinom, zmanjša viskoznost tekočine), ki so zaradi tega bolj dostopne mikroorganizmom,
- poveča učinkovitost uničenja patogenih bakterij ter semen plevela.

Čeprav je aktivnost bakterij v termofilnem temperturnem območju za 25 - 50 % višja v primerjavi z mezofilnim območjem, imajo termofilni anaerobni mikroorganizmi nizko biotsko raznovrstnost. Prav tako ti mikroorganizmi tudi hitreje odmrejo. Termofilni sistemi so tudi bolj občutljivi na spremembe obratovalnih parametrov: za termofilne mikroorganizme je sprejemljivo dnevno nihanje obratovalne temperature znotraj 1 °C, medtem ko lahko v

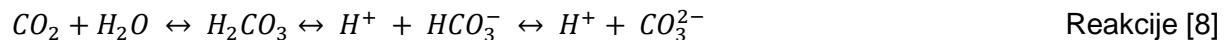
mezofilnem sistemu temperatura niha za 2 ali 3 °C brez bistvenega vpliva na produkcijo bioplina [Gerardi M.H., 2003].

2.3.4 pH vrednost in puferska kapaciteta

Za optimalno encimsko aktivnost mikroorganizmov je potrebna primerna vrednost pH. Čeprav anaerobna razgradnja poteka v območju pH vrednosti med 6,0 in 8,0, je idealno pH območje v primeru enostopenjskega sistema zelo ozko: 6,8 - 7,2, z upoštevanjem, da je optimalno območje odvisno od tipa substrata in operativnih pogojev [Buratti C. in Fantozzi F., 2011]. Aktivnost metanogenih mikroorganizmov se pod pH 6,6 zelo zniža, medtem ko zelo bazičen pH v reaktorjih, kot je UASB, lahko prepreči združevanje mikrobne biomase. Zaradi optimalnega poteka procesa hidrolize/acidogeneze pri pH 5,5 - 6,5 in acetogeneze/metanogeneze pri pH 7,0 je pH vrednost pogosto pomemben razlog ločitve stopenj [Ward A. in sod., 2008].

Hitre ter znatne spremembe pH vrednosti vsebine reaktorja preprečujeta dva puferska sistema: karbonatni ter amonijev.

Karbonatni puferski sistem, ki preprečuje premočno zakislitev, vzdržuje pH vrednost okrog 6,5 in se nanaša na alkaliteto med $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. CO_2 , ki se sprosti ob razgradnji organske snovi z vodo v odvisnosti od pH tvori ogljikovo kislino, bikarbonat ali karbonat. Pri nizki pH vrednosti se bo tako tvorila ogljikova kislina, medtem ko bosta pri visoki pH vrednosti nastajala bikarbonat ali karbonat (*reakcije* [8]).



Amonijev puferski sistem niha okrog pH vrednosti 10 in preprečuje prešibko zakislitev fermentacijske mešanice z ravnotežnimi reakcijami med NH_3 in NH_4^+ (*reakciji* [9] in [10]). Nizek pH povzroča ionizacijo v obliki prostega amonijevega iona, NH_4^+ , medtem ko pri visokem pH nastaja neionizirani NH_3 [Wagner A.O. in sod., 2012].



Omembu vredna je tudi interakcija med NH_3 ter hlapnimi maščobnimi kislinami v odvisnosti od pH vrednosti. V primeru naraščajoče pH vrednosti se koncentracija prostih molekul amoniaka povečuje, kar posledično privede do kopiranja hlapnih maščobnih kislin, kar pa pH vrednost zmanjša. Gre za "inhibicijo stabilnega stanja", pri katerem je proces stabilen, a rezultira v manjšo produkcijo metana [Ahring B.K. in sod., 1998].

Široko območje alkalitetnih vrednosti, v katerem delujejo anaerobni reaktorji, je odvisno od substrata. Álvarez J.A. in sod. [2010] ugotavljajo, da se območje za reaktorje tipov UASB ali CSTR giblje med 2000 in 18000 mg/L CaCO_3 . Alkalitetno vrednost v reaktorju lahko spremenimo z dodatkom različnih kemikalij. Nizko pufersko kapaciteto njenostavneje povečamo z zvišanjem organske obremenitve in dodatkom močne baze ali karbonatnih soli, kar povzroči prehod CO_2 v HCO_3^- [Ward A. in sod., 2008].

Upad alkalitete ponavadi nastopi prej kot padec pH vrednosti. Spremljanje anaerobne razgradnje bo tako z merjenjem alkalitete v primerjavi z merjenjem pH bolj učinkovit, saj bo npr. kopiranje kratkoverižnih maščobnih kislin zmanjšala pufersko sposobnost veliko prej, kot pa se bo znižala pH vrednost.

2.3.5 Hranila

Mikroorganizmi za rast in razvoj potrebujejo makro- (C, N, P, S) in mikrohranila (Fe, Co, Mo, Mg, Ca, Na, Se in Ni). Potreba po hranilih je zelo majhna, saj med procesom ne nastane veliko biomase (3 do 20-krat manj kot pri aerobnih procesih), tako da za potek fermentacije ustreza C/N/P/S razmerje 600/15/5/1. Potrebna koncentracija mikrohranil je zelo nizka, ponavadi v obsegu med 0,05 in 0,06 mg/L. Izjema je železo, katerega koncentracija mora biti med 1,0 in 10,0 mg/L. V primeru anaerobne razgradnje samih energetskih rastlin je za stabilnost procesa in pri doseganju večjih organskih obremenitev mikrohranila potrebno dodajati, medtem ko tovrstni dodatki niso potrebni v primeru sočasne razgradnje npr. z živinskimi gnojili, ki mikrohranila že vsebujejo [Weiland P., 2010].

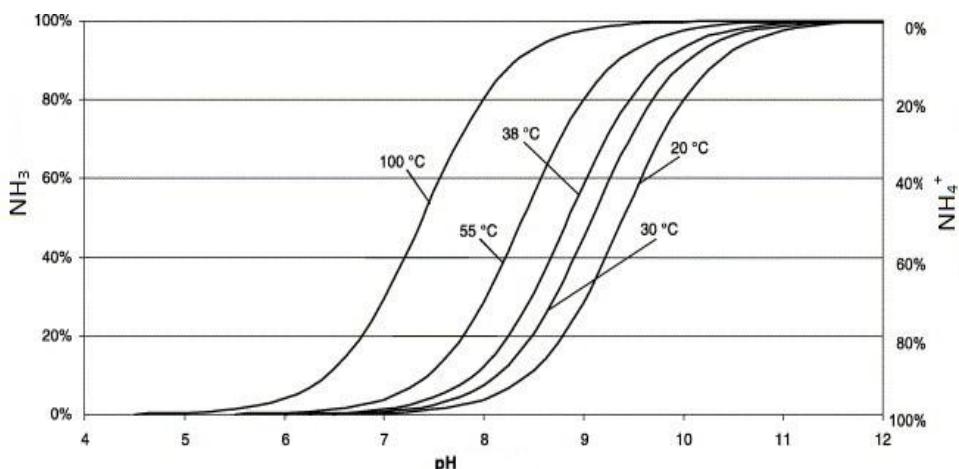
Potreba anaerobnih mikroorganizmov po hranilih je opredeljena z razmerjem med ogljikom in dušikom. Po poročanju različnih avtorjev omogoča C/N razmerje v območju 16 do 25:1 dolgoročno stabilno delovanje anaerobnega reaktrorja. Álvarez J.A. in sod. [2010] poročajo, da so v nekaterih primerih lahko ustrezena tudi nižja C/N razmerja med 6 in 9:1. Producija bioplina običajno začne upadati pri C/N razmerju nad 30:1, čeprav nekateri sistemi delujejo brez težav tudi pri C/N razmerju 70:1 [Sørensen B., 2007]. V konkretnih obratovalnih razmerah je optimalno C/N razmerje namreč odvisno od lastnosti substrata in biodostopnosti C in N.

2.3.6 Zaviralci procesa anaerobne razgradnje

Zaviranje procesa lahko povzroči veliko število organskih in anorganskih snovi, ki so že prisotne v substratu, ali pa nastajajo kot vmesni produkti razgradnje. Zaviranje procesa je odvisno od koncentracije zaviralec, sposobnosti prilagoditve mikroorganizmov na zaviralec, prisotnosti drugih strupenih snovi ter od sestave substrata [Gerardi M.H., 2003].

2.3.6.1 Amoniak

Ionizirana oblika amoniaka je kot vir dušika potrebna za mikroorganizme, medtem ko je prosti amoniak najbolj pogost zaviralec anaerobne razgradnje. Vzrok strupenosti NH_3 je hidrofobnost molekule, kar omogoča vstop v celico, kjer ima sprememba pH in zaviranje nekaterih encimsko spodbujenih reakcij negativen vpliv na metabolizem metanogenih mikroorganizmov [Procházka J. in sod., 2012]. Razmerje med prostim amoniakom in amonijevimi ioni je pretežno odvisno od pH vrednosti in temperature (slika 3). Zaviranje procesa nastopi pri koncentracijah nad 1500 - 3000 mg- $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ /L pri pH > 7,4, medtem ko je koncentracija nad 3000 mg/L strupena pri katerikoli pH vrednosti [Lyberatos G. in Pullammanappallil P.C., 2007].



Slika 3: Vpliv pH vrednosti in temperature na % amoniaka in amonija [Santen H. in sod., 2007]

2.3.6.2 Žveplove spojine

Žveplo je kot hranilo bakterijskim celicam dostopen v obliki hidrosulfidnega iona (HS^-) kot gradnik za nekatere aminokisline. Poleg že omenjenega prostega amoniaka je vodikov sulfid (H_2S) prav tako pogost vzrok zaviranja procesa v anaerobnih reaktorjih, saj tudi ta zavira metabolno aktivnost bakterij. H_2S nastaja pri redukciji sulfata, elementarnega žvepla ter pri razgradnji proteinov, pretežno na račun razgradnje aminokisline cistein [Gerardi M.H., 2003].

Poleg strupenosti za nekatere vrste mikroorganizmov lahko H_2S deluje zaviralno na metanogeno aktivnost tudi zaradi vrstne tekmovalnosti za organski substrat, saj sulfat reducirajoče bakterije za svoje preživetje ne potrebujejo simbioze z drugimi vrstami mikroorganizmov, poleg tega pa so sulfat reducirajoče bakterije zaradi ugodnejših kinetičnih in termodinamičnih lastnosti do nekaterih substratov (vodik in acetat) bolj uspešne od metanogenih arhej [Stahl D.A. in sod., 1996; Fukui M. in sod., 2000].

2.3.6.3 Težke kovine

Čeprav nekatere težke kovine (Cb, Mo, Ni) v zelo majhnih koncentracijah pospešujejo encimsko aktivnost, povišane koncentracije teh elementov delujejo strupeno. V anaerobnih reaktorjih so koncentracije težkih kovin lahko visoke, a ne povzročijo zaviranja procesa, saj je večina težkih kovin vezanih, kar onemogoča njihov transport v celico. Izmed težkih kovin so mikroorganizmom najbolj strupene ionizirane oblike bakra, niklja in cinka [Gerardi M.H., 2003].

2.3.6.4 Hlapne maščobne kisline in dolgoverižne maščobne kisline

Hlapne maščobne kisline (npr. ocetna, propionska, butanojska kislina) lahko v velikih koncentracijah zavirajo aktivnost mikroorganizmov, saj v celici povzročijo strukturne spremembe proteinov. Tako npr. Visvanathan C. in sod., [2011] poročajo, da koncentracija $> 1\text{-}2 \text{ g/L}$ propionske kisline povzroča zaviranje aktivnosti metanogenih arhej, medtem ko koncentracije ocetne ter butanojske kisline do 10 g/L nimajo večjih negativnih vplivov na njihovo aktivnost.

Prav tako metanogeno aktivnost zavirajo dolgoverižne maščobne kisline, ki zaradi adsorpcije na celično membrano pri arhejah ovirajo transport substratov in produktov [Björnsson L. in sod., 2006; Flotats X. in sod., 2010]. Pereira M.A. in sod. [2005] poročajo, da je vpliv vezave reverzibilen, saj se je v njihovih poskusih po znižanju koncentracij dolgoverižnih maščobnih kislin aktivnost mikroorganizmov zopet povišala.

2.3.7 Substrat

Pomemben vir substratov, primernih za anaerobno razgradnjo, so kmetijski odpadki, industrijski odpadki ter nastalo blato pri čiščenju odpadnih voda, komunalni biološki odpadki in namensko pridelane energetske rastline.

Največ surovin primernih za produkcijo bioplina prihaja iz kmetijskega sektorja. Biometanski potencial posameznih substratov na osnovi živilskih gnojil je odvisen od vrste, pasme in fiziološkega stanja živali, uporabljeni krme, stelje in možnih procesov razgradnje, ki potekajo med zbiranjem in skladiščenjem substrata pred začetkom fermentacije. Anaerobna razgradnja živilskega gnoja je zaradi visokih vsebnosti amoniaka pogosto problematična, saj koncentracija v prašičjem in govejem gnuju okrog 4 g/L amoniaka povzroči zaviranje anaerobne razgradnje [Ahring B.K. in sod., 1998]. Visoko vsebnost amoniaka se zato izrablja za sočasno razgradnjo s substrati z nizkimi koncentracijami dušika [Forster C.F. in sod., 2001], kar se ponavadi odraža predvsem v sočasni razgradnji živilskih gnojil z energetskimi rastlinami. Na stabilnost procesa prav tako lahko vpliva uporaba krmnih dodatkov (npr. rastni hormoni) in razkužil, ki v primeru uporabe presnovljenega substrata kot gnojila predstavljajo nevarnost za okolje.

Posebno pozornost kot substratu za anaerobno razgradnjo pripisujemo biološko razgradljivim komunalnim odpadkom, saj je njihovo odlaganje v skladu z določili varstva okolja omejeno. Zadevo zakonsko ureja Uredba o odlaganju odpadkov na odlagališčih (Ur.l. RS. 32/2006, 98/2007, 62/2008 in 53/2009), ki navaja usmeritve v zvezi z zmanjševanjem odlaganja teh odpadkov. Tako bo do konca leta 2019 na odlagališčih mogoče odlagati le 22 % (156 kt) biološko razgradljivih sestavin v komunalnih odpadkih. Ti cilji postavljajo dodatno motivacijo za uporabo tovrstnih substratov v procesu pridobivanja bioplina. Biometanski potencial tovrstnih substratov je odvisen od načina ločevanja odpadkov, regionalnega izvora ter sezonskih značilnosti [Adani F. in sod., 2010]. Pogosto se kot substrat omenjajo kuhinjski odpadki, kot so odpadno sadje in zelenjava, ki imajo majhno vsebnost suhe snovi in velik delež hlapnih snovi z lahko razgradljivo organsko frakcijo (do 40 ut. %) [Ledakowicz S. in sod., 2003; Ward A. in sod., 2008]. Hitra hidroliza, ki lahko povzroči zakislitev ter visoko C/N razmerje, se največkrat uravnava z optimizacijo procesa, lahko s sočasno razgradnjo odvečnega aktivnega blata iz komunalnih čistilnih naprav ali z uporabo živilskih gnojil [García A.I. in sod., 2006; Ward A. in sod., 2008].

Tabela 3 povzema nekatere lastnosti in operacijske parametre pomembnih kmetijskih in komunalnih bioloških odpadkov [Steffen R. in sod., 1998].

Anaerobna razgradnja odvečnega aktivnega blata komunalnih čistilnih naprav je eden najbolj zahtevnih in najdražjih procesov na področju čiščenja komunalnih odpadnih voda [Ağdaş O.N. in Sponza D.T., 2005]. Ker so v splošnem načini anaerobne obdelave odvečnega aktivnega blata usmerjeni le v stabilizacijo ter zmanjšanje prostornine blata, reaktorji v takšnih procesih običajno obratujejo z nizko organsko obremenitvijo, s čimer obratovalne razmere ne omogočajo optimalne produkcije bioplina. V državah, kjer je neposredno odlaganje organske frakcije prepovedano oz. omejeno, je smotrna sočasna razgradnja odpadnega blata čistilnih naprav z organskimi odpadki ustreznih lastnosti [Murto M. in sod., 2004]. Med države, kjer je blato iz komunalnih čistilnih naprav prepovedano odlagati na odlagališča (od 15. 07. 2009), je tudi Slovenija.

Tabela 3: Lastnosti različnih substratov in delovni pogoji v procesu njihove anaerobne razgradnje

Substrat	SS [%]	OS [%]	C/N	Bioplinski potencial [m ³ /kg VS] ³⁾	Zadrževalni čas [dan]	Vsebnost CH ₄ [%]
Goveja gnojevka	5-12 ²⁾	75-85	6-20 ¹⁾	0,20-0,30	20-30	55-75
Kokošji gnoj	10-30 ²⁾	70-80	3-10	0,35-0,60	>30	60-80
Lesni odpadki	60-70	99,6	723		∞	
Odpadna hrana	10	80		0,50-0,60	10-20	
Odpadno sadje	15-20	75	35	0,25-0,50	8-20	
Prašičja gnojevka	3-8 ²⁾	70-80	3-10	0,25-0,50	20-40	70-80
Sirotka	1-5	80-95		0,80-0,95	3-10	60-80
Trava	20-25	90	12-25	0,55	10	
Vrtni odpadki	60-70	90	100-150	0,20-0,50	8-30	

¹⁾odvisno od količine slame ²⁾odvisno od redčitve ³⁾odvisno od zadrževalnega časa

Gojenje rastlin za energetske namene ima kljub precejšnji porabi energije za pridelavo prednost v skladiščenju substrata, saj se rastline lahko silirajo in uporabijo, ko se potreba po energiji poveča oz. ko naraste cena energije. Anaerobna razgradnja samih energetskih rastlin lahko zaradi nizke vsebnosti hranil in neustrezne puferske sposobnosti privede do nižje stopnje razgradnje substrata in nestabilnosti ali zaviranja procesa [Nges I.A. in sod., 2012]. Nadalje je od načina pridelave energetskih rastlin odvisno, ali bo proces zadostil tako ekonomskim kot okoljskim zahtevam.

2.3.8 Opis vhodnih substratov

V naši raziskavi smo med drugim preverili ustreznost sočasne razgradnje odpadnega presejanega homogeniziranega šipka z dodatnim virom dušika. Kot vir dušika smo uporabili dva dobro razpoložljiva odpadna substrata, odvečno aktivno blato iz laboratorijske pilotne čistilne naprave in odpadni kvas iz pekovske industrije.

2.3.8.1 Šipek

Navadni šipek (*Rosa canina* L.) je grmovnica iz družine rožnic (*Rosaceae*), ki raste v zmernem in subtropskem podnebnem pasu. Masa plodu šipka se giblje med 1,25 in 3,25 g, pri čemer 71 ut. % predstavlja perikarp oz. oplodje (omeseneli del) in 29 ut. % seme. Plodove šipka, ki so zelo bogat vir bioflavonoidov (vitamin C, fenoli, karotenoidi) in delujejo kot antioksidanti, veliko uporabljajo v farmacevtski in živilski industriji [Szentmihályi K. in sod., 2002]. Največ šipka pridelajo v državi Čile, saj s 5000 tonami na leto prispevajo k 85 ut. % svetovne proizvodnje. Posledice masovne predelave so velike količine odpadkov, ki se odvisno od procesa lahko uporabijo kot hrana živalim ali pa biomasa za sežig. Zanimivo uporabo odpadnih plodov omenjajo tudi Szentmihályi K. in sod. [2002], ki prikazujejo, kako je mogoče iz odpadnih šipkovi plodov prehrambne industrije ekstrahirati olja, bogata s karotenoidi in nenasičenimi maščobnimi kislinami, ki sicer blagodejno vplivajo na kožne bolezni in imajo antibakterijski učinek.

Maloštevilne raziskave na področju šipka kot substrata za anaerobno razgradnjo so nas spodbudile k določitvi biometanskega potenciala odpadnega šipka iz proizvodnje pijač in s tem ustreznosti za produkcijo bioplina. Pregled literature smo zato opravili na substratih, ki so taksonomsko blizu družini Rosaceae, kot so vrtnice *Rosa Domestica* Miller in granatnega jabolka *Punica granatum* L., katerih izsledke povzema *tabela 4* [Gunaseelan N.V., 2004; Tosun I. in sod., 2004; Qu W. in sod., 2009].

Tabela 4: Biometanski potencial za nekaj substratov iz družine Rosaceae

Substrat	Biometanski potencial [L CH ₄ /g OS]	% CH ₄
Granatno jabolko:		
celotno gnito sadje	0,342	
gnila semena	0,430	
mokre tropine lupin	0,207	
mokre tropine semen	0,249	
olupki	0,312	
stiskanine	0,420	
suhe tropine lupin	0,213	
suhe tropine semen	0,276	
Vrtnica:		
hidroliziran odpadek	0,28	
surov odpadek proizvodnje olja vrtnic	0,26	72

2.3.8.2 Kvas

Kvas, ki se uporablja v pivovarski in pekovski industriji, je z vsebnostjo od 50 do 60 ut. % proteinov na pripadajočo organsko snov bogat vir dušika. V sklopu raziskav za anaerobno razgradnjo so učinki različnih virov dušika na sam proces dokaj slabo raziskani, čeprav so lahko morebiten zaviralec v fazi hidrolize, kot tudi hranilo metanogenih bakterij pri produkciji metana. Kakorkoli, v študiji Wagnerja A.O. in sod. [2012] so preučevali, kako različni viri dušika (kazein, kazaminska kislina, pepton, mesni ekstrakt, želatina, kvasni ekstrakt ter posneto mleko) s C/N razmerjem 3 - 7,7 vplivajo na produkcijo metana. Izsledki raziskave so pokazali, da je na produkcijo metana pretežno vplival tip dušikovega substrata, vsebnost ogljika in s tem C/N razmerje pa sta imela majhen vpliv. Sicer je med različnimi viri dušika kvasni ekstrakt (C/N=3,9) poleg kazaminskih kislin (C/N=4,05) pokazal največjo produkcijo metana, medtem ko pri posnetem mleku s C/N razmerjem 7,7 zaradi visoke koncentracije vodika ni bilo produkcije metana [Wagner A.O. in sod., 2012].

2.3.8.3 Odvečno aktivno blato iz membranskega biološkega reaktorja

Dolgoročno zagotavljanje ter izboljšanje kakovosti pitne vode v sedanjem svetu predstavlja veliko socialno, tehnološko, ekonomsko kot tudi politično prioriteto. Med drugim onesnaženost vodnih virov s hranili, ki v največji meri izhajajo iz kmetijskega sektorja, povzroča onesnaženje vod z amonijem in nitratom. Čiščenje takih voda je izrednega pomena, saj lahko visoka vsebnost nitrata v površinskih vodah privede do eutrofikacije, v primeru podtalnice, ki je pomemben vir pitne vode, pa visoka koncentracija povečuje število obolelih s povišanim krvnim tlakom, krvnimi boleznimi in rakom. Amoniak pa je na drugi strani strupen za organizme, poleg tega pa njegova oksidacija zmanjša koncentracijo kisika v vodi [Stuckey D.C. in Barber W.P., 2000].

Procesi kot so reverzna osmoza, ionska izmenjava, elektrodializa ter katalitska redukcija sicer omogočajo odstranjevanje nitratov iz pitne vode, pri čemer ne moremo mimo negativnih lastnosti teh sistemov, kot so visoki stroški obratovanja, neželeni stranski produkti ter odpadna voda, ki še vedno vsebuje dušikove spojine [Ravnjak M. in sod., 2011].

Biološki procesi čiščenja vode zaradi ekonomičnosti, možne nadgradnje s tehnologijo membranske separacije, pretvorbe stranskega produkta (odvečna biomasa) v energijo ter nenazadnje zelo učinkovitega čiščenja same vode predstavljajo alternativni način čiščenja vode. Raziskave na tem področju potekajo tudi na Kemijskem inštitutu, kjer na pilotnih reaktorskih sistemih na osnovi procesa biološke denitrifikacije preučujejo odstranjevanje nitrata iz podtalnice ter pitne vode. Reaktorski sistem, prikazan na *sliki 4*, sestavlja anaerobni reaktor, kjer poteka denitrifikacija, ter prezračevani aerobni reaktor, ki je namenjen znižanju alkalitete ter odstranjevanju nepopolno konvertiranih nitritnih (NO_2^-) ionov. Proses biološke denitrifikacije zajema mikrobnno pretvorbo nitrata preko nitrita v plinasti dušik ter nastanek bikarbonata ob prisotnosti lahko razgradljivega organskega substrata, kot sta metanol in acetat. V vodi prisoten nitrat ter organski substrat

omogočata prirast aktivnega blata, ki je služil kot substrat, bogat z dušikom.

Visoka vrednost karbonatne trdote oziroma alkalitete v vodi, ki se med procesom dodatno poviša, spremeni pufersko ravnotežje in poviša pH. Zaradi neugodnega vpliva biološke denitrifikacije na lastnosti vode je sistem nadgrajen z aerobnim reaktorjem, kjer uvajanje HCl zniža alkaliteto, ne da bi porušilo stabilnost biološkega sistema, prezračevanje pa po procesu denitrifikacije, ki lahko poteka le v anaerobnih razmerah, vodo ponovno nasiti s kisikom in omogoči povratno pretvorbo nizkih koncentracij preostalega nitrita v manj strupeni nitrat.



Slika 4: Membranski biološki reaktor

2.3.9 Optimizacija in modifikacija anaerobne razgradnje

Učinkovitost procesa lahko izboljšamo na več načinov: (i) z optimizacijo spremljanja procesnih parametrov; (ii) z različnimi načini predobdelave, ki zagotovijo boljšo biorazgradljivost substrata in (iii) s sočasno razgradnjo dveh ali več vrst odpadkov. V splošnem navedeni postopki omejijo možnost zaviranja procesa in povečajo nastanek bioplina. V raziskavi smo učinkovitost anaerobne razgradnje želeli povečati s fizično predobdelavo homogeniziranja in s sočasno razgradnjo.

2.3.9.1 Predobdelava

Med mehanskimi tehnikami je najbolj pogosta ultrazvočna predobdelava, namenjena predvsem za obdelavo blata iz komunalnih čistilnih naprav. Za obdelavo odpadkov, kot so energetske rastline in komunalni odpadki, katerih velikost delcev je večja, se pogosto uporablja visokotlačna homogenizacija, centrifugiranje, mletje ali pa ekstrudiranje. Čeprav so metode pokazale povečanje produkcije bioplina, je glavna omejitev mehanske predobdelave visoka potreba po energiji [Carlsson M. in sod., 2012].

Učinkovit način predobdelave je tudi termična predobdelava, ki poveča mikrobiološko dostopnost makromolekul in s tem produkcijo bioplina. V primeru, da v sistemu uporabljamo klavnične odpadke in podobne surovine, je substrate pred uporabo v bioplinskem reaktorju potrebno termično higienizirati oz. pasterizirati.

2.3.9.2 Sočasna razgradnja več substratov

Sočasna razgradnja različnih tipov odpadkov optimizira proces anaerobne razgradnje z vidika redčenja potencialnih strupenih snovi, izboljšane bilance hrani, večje raznovrstnosti mikroorganizmov, povečane organske obremenitve in večje produkcije metana [García A.I. in sod., 2006; Samani Z. in sod., 2008]. Pri termofilnih pogojih se v primerjavi z mezofilnimi poleg navedenega poveča še (i) higienska stabilnost, saj je obseg odstranitve patogenih mikroorganizmov zaradi višje temperature boljši ter (ii) stopnja razgradnje [Ağdaş O.N. in Sponza D.T., 2007]. Sočasna razgradnja lahko bistveno izboljša produkcijo metana, kar je odvisno od operacijskih pogojev ter vrste kosubstratov. Različne študije v literaturi poročajo o 50 do 200 % povečanju količine pridobljenega metana [Álvarez J.A. in sod., 2010]. Poleg tega je sočasna razgradnja ekonomsko bolj sprejemljiva zaradi možnosti predelave odpadkov različnih tokov, kar je posebna prednost manjših kmetijskih obratov, kjer včasih stroški delovanja bioplinarne z uporabo samih živinskih gnojil niso pokriti [Kornaros M. in sod., 2009]. Tudi v naši raziskavi smo proces žeeli optimizirati na podlagi uravnavanja C/N razmerja, saj odpadni presejani (homogenizirani) šipek zaradi majhnega deleža dušika nima optimalnega C/N razmerja za anaerobno razgradnjo.

2.3.9.3 Anaerobna razgradnja s simultanim odstranjevanjem dušikovih spojin

Kot že omenjeno v poglavju 2.3.8.3 (stran 14), onesnaženost voda z amonijem in nitratom povzroča marsikatero težavo.

Za najbolj učinkovito in okolju prijazno tehnologijo velja mikrobiološko odstranjevanje dušikovih spojin. Med sistemi, ki temeljijo na mikrobiološkem ciklu dušika in metabolizmu anorganskih dušikovih spojin, je možen dvostopenjski aerobni-anaerobni proces. V aerobni fazi poteka nitrifikacija, kjer bakterije, kot so *Nitrosomonas* in *Nitrobacter*, amonij pretvorijo v nitrat in nitrit, medtem ko v anaerobnih pogojih poteka redukcija nitrata preko nitrita v plinasti dušik (denitrifikacija). Sam proces omejuje (i) nizka učinkovitost odstranjevanja dušika, (ii) visoka potreba po kisiku za proces nitrifikacije, (iii) dolg zadrževalni čas zaradi različnih mikroorganizmov, ki vršijo proces pod različnimi pogoji in (iv) dodaten vir ogljika, potreben za redukcijo nitrata v procesu denitrifikacije. K učinkovitosti sistema je prispeval razvoj novih tehnologij, ki med drugim vključujejo sočasno nitrifikacijo in denitrifikacijo, anaerobno oksidacijo amonija (ANAMMOX), aerobno deammonitifikasijsko, popolno avtotrofno odstranjevanje dušika preko nitrita (CANON) ... [Zhu G. in sod., 2008].

Kot možen način zmanjševanja ogljika in dušika predstavlja tudi združitev procesov denitrifikacije in anaerobne razgradnje, kjer kot produkti nastajajo CH_4 , N_2 , NH_3 , CO_2 , H_2S ter biomasa [Bizeau C. in sod., 1992]. Bernet N. in sod. [1999] poročajo, da v UASB reaktorju

denitrifikacija poteka na dnu v sedimentirani biomasi, medtem ko metanogeneza poteka v srednjem delu v granulirani biomasi, kjer je koncentracija nitrata nizka, ki je za metanogene arheje sicer strupen. Ker pri anaerobni razgradnji proteinov nastaja NH_3 , ki lahko zavre proces, se sistem ponavadi nadgradi z reaktorjem, kjer pri aerobnih pogojih poteka nitrifikacija. Nitrat in nitrit se kot produkta nitrifikacije vračata v anaerobni del sistema, kjer se v procesu denitrifikacije reducirata do plinastega dušika. Težava navedenega sistema je, da glavne redukcijske poti nitrata ne predstavlja denitrifikacija, ampak razgradnja nitrata v amonij. Stopnjo denitrifikacije je sicer mogoče povečati z nizkim razmerjem e⁻ donor/e⁻ akceptor (okolje, revno z ogljikom in bogato z dušikom) in/ali visoko začetno obremenitvijo z nitratom. Prav tako raziskovalci ugotavljajo, da ima pomemben vpliv na pot redukcije nitrata vir ogljika [Bernet N. in sod., 1999].

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 Vhodni substrati

Glavni substrat v procesu predstavlja trdni odpadek iz procesa ekstrakcije plodov šipka v sklopu proizvodnje osvežilnih pijač. Ekstrakcija šipka poteka po spodaj navedenem postopku [Osojnik Črnivec I.G. in Pintar A., 2011]:

- mletje suhih plodov,
- odstranitev dlačic, ki se med mletjem ločijo od plodu in semen,
- ultrazvočna ekstrakcija preostale zmesi s 40 vol. % etanolom,
- separacija ekstrakta s centrifugiranjem.

Ostanek, ki po procesu centrifugiranja ostane v centrifugi, je trdni odpadek, ki smo ga pridobili iz proizvodnje in ga pred uporabo v procesu anaerobne razgradnje različno predobdelali.

Pridobljeni šipek iz proizvodnje je vlažna in nehomogena zmes, ki vsebuje večja semena in manjše delce zmletega omesenelega tkiva plodov. Z uporabo dveh osnovnih načinov predobdelave smo žeeli povečati homogenost našega substrata (*tabela 5*). S presejanjem ($d_{okanca} = 1,5$ mm) sem iz substrata odstranila večje delce, predvsem semena (25 ut. %), medtem ko sem s homogenizacijo dosegla zmanjšanje velikosti delcev v substratu. Pri homogenizaciji sem 50 g vzorca presejanih plodov šipka dodala 150 mL deionizirane vode. Zaradi visoke vsebnosti etanola v substratu sem pazila, da je predobdelava potekala hitro, da se lastnosti vhodnega substrata za določanje biometanskega potenciala niso spremenile.

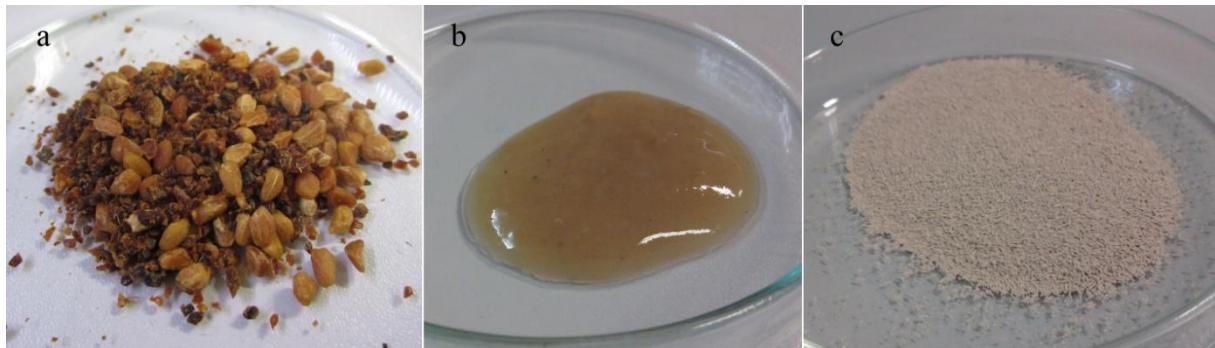
Odvečno aktivno blato sem zbirala dnevno na iztoku anaerobnega dela membranskega biološkega reaktorja. Odvečno aktivno blato sem najprej koncentrirala s 15 minutnim usedanjem v 500 mL čaši, nato pa sem ga ločila iz suspenzije s centrifugiranjem (Hettich zentrifugen, model Universal 32 R) v vseh stopnjah 10 minut pri 1500 obratih na minuto. V prvi fazi sem v centrifugirke prelila po 50 mL vzorca in biomaso centrifugirala. Nato sem centrifugirala supernatant iz dveh centrifugirk prve faze in nazadnje supernatant iz prve in druge faze. V vseh fazah sem po centrifugiranju odpipetirala 25 mL odvečne vode ter nato pred začetkom centrifugiranja za naslednjo fazo dolivala potrebno deionizirano vodo do izravnave vseh mas centrifugirk, ki sem jih v določeni seriji centrifugirala.

Kot drug dodatni vir dušika v poskusih je služil suhi pekovski kvas. Odpadni šipek, odvečno aktivno blato ter kvas prikazuje *slika 5*.

Tabela 5: Substrati in načini predobdelave

Vzorec	Okrajšava	Oznaka	Sejanje	Homogenizacija	Centrifugiranje
Kvas		K			
Mokri plodovi	Odpadni šipek	MŠ			
nepresejanega šipka					
Mokri presejani plodovi	Odpadni presejani	MPHŠ	✓	✓	✓
homogeniziranega šipka	homogenizirani šipek				
Mokri presejani plodovi	Odpadni presejani šipek	MPŠ	✓		
šipka					
Odvečno aktivno blato		MBRa1, MBRa2		✓	✓

Po končani pripravi in predobdelavi sem substrate do uporabe nepredušno zaprla in jih shranila pri -20 °C.



Slika 5: a: odpadni šipek b: odvečno aktivno blato c: kvas

V našem poskusu smo C/N razmerje glavnega substrata, odpadnega presejanega homogeniziranega šipka, uravnavali z dodatkom odvečnega aktivnega blata ali pa odpadnega kvasa, tako da smo v mešanici substratov dosegli C/N razmerje 20:1. Uravnavanje nutrientov smo opravili v skladu z enačbami [4], [5], [6] in [7].

$$\frac{C_1 \cdot m_1 + C_2 \cdot m_2}{N_1 \cdot m_1 + N_2 \cdot m_2} = 20 \quad \text{Enačba [4]}$$

$$m_1 + m_2 = m_x \quad \text{Enačba [5]}$$

$$m_1 = m_x - m_2 = \frac{C_2 - 20 \cdot N_2}{[(C_2 - C_1) - 20 \cdot (N_2 - N_1)]} \cdot m_x \quad \text{Enačba [6]}$$

$$m_2 = m_x - m_1 = \frac{C_1 - 20 \cdot N_1}{[(C_1 - C_2) - 20 \cdot (N_1 - N_2)]} \cdot m_x \quad \text{Enačba [7]}$$

m_1 – masa substrata 1 [g]

m_2 – masa substrata 2 [g]

m_x – skupna masa mešanice substratov [g]

C_1 – utežni delež ogljika substrata 1 [ut. %]

C_2 – utežni delež ogljika substrata 2 [ut. %]

N_1 – utežni delež dušika substrata 1 [ut. %]

N_2 – utežni delež dušika substrata 2 [ut. %]

3.2 Karakterizacija substratov

Substrate smo analizirali na vsebnost suhe in organske snovi (SS in OS), kemijsko potrebo po kisiku (KPK), C, H, N in S elementno sestavo (CHNS), zgornjo kurilno vrednost ter vsebnost vlage. Površinsko morfologijo vzorcev šipka ter inokuluma smo preverili z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).

3.2.1 Določanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS)

Suho in organsko snov sem določala v skladu s standardnimi metodami (Eaton in sod., 2005; DIN38414-9).

Za določitev suhe in organske snovi sem uporabila žarilne lončke, ki sem jih najprej očistila in posušila (6 min, 100 °C) in nato ohladila v eksikatorju. Prazne lončke sem stehtala na analitski tehnici (Mettler Toledo, model XP205/M). Po dodatku vzorca v lončke sem le-te ponovno stehtala in jih prenesla v sušilnik, kjer sem jih sušila pri 105 °C do konstantne mase. Lončke sem nato ohladila v eksikatorju in jih ponovno stehtala. Po zgoraj navedenem postopku lahko izračunamo suho snov (enačbi [8] in [9]). Lončke s suho snovjo sem prenesla

v žarilno peč, kjer sem jih žarila pri 550 °C do konstantne mase. Lončke sem v odprti peči počasi pomikala proti notranjosti (na 20 min za širino žarilnega lončka, 4x), saj bi v primeru takojšnjega zaprtja peči po vnosu žarilnih lončkov z vzorci zaradi pomanjkanja kisika potekla piroliza. Po žarenju sem lončke ponovno prenesla v eksikator in ohlajene stehata. Suho in organsko snov vsakega vzorca sem izvedla v dveh paralelkah z upoštevanjem koeficiente variabilnosti <5. Organska snov je definirana v enačbah [10] in [11].

$$SS(g/g) = \frac{m_{ss}}{m_{vz}} \quad \text{Enačba [8]}$$

$$SS(\%) = \frac{m_{ss}}{m_{vz}} \cdot 100 \quad \text{Enačba [9]}$$

$$OS(g/g) = \frac{m_{ss} - m_{as}}{m_{vz}} \quad \text{Enačba [10]}$$

$$OS(\%) = \frac{m_{ss} - m_{as}}{m_{ss}} \cdot 100 \quad \text{Enačba [11]}$$

m_{vz} – masa vzorca [g]

m_{ss} – masa suhe snovi [g]

m_{as} – masa anorganske snovi [g]

3.2.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Kemijska potreba po kisiku je tista množina kisika, ki je potrebna za oksidacijo organske snovi (in drugih oksidirajočih snovi) v vzorcu. V kislem mediju kalijev dikromat oksidira večino organskih snovi v ogljikov dioksid in vodo, zato lahko dobljene vrednosti KPK enačimo s popolno oksidacijo ogljikovih spojin. Kot oksidant za določanje KPK navadno uporabljamo kalijev dikromat, ki ima veliko oksidacijsko sposobnost (oksidira 95 - 100 % organske snovi).

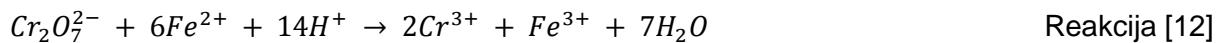
Pred izvedbo analiz smo vzorce homogenizirali z napravo T25 basic ULTRA-TURRAX (IKA).

Po refluktiranju vzorcev v močno kislem mediju s kalijevim dikromatom smo množino kalijevega dikromata, ki se ni porabil za oksidacijo, določili na dva načina, in sicer (i) s titracijo (ISO 6060:1996) in (ii) spektrofotometrično (ISO 15705:2002).

Po prvi metodi smo vzorce refluktirali v močno kislem mediju dve uri na 148 °C ob prisotnosti živosrebrovega (II) sulfata z znano prebitno količino kalijevega dikromata in srebrovim sulfatom kot katalizatorjem na sistemu za razklop KPK Digest System K-437 (Büchi) (*slika 6a*). Organske spojine pri reakciji oksidacije $Cr_2O_7^{2-}$ reducirajo do Cr^{3+} , ki je zelene barve:



Po končani reakciji smo prebitek dikromatnih ionov v vzorcu titrirali s standardno raztopino amonijevega železovega (II) sulfata na avtomatskem titratorju T50 (Mettler Toledo) (*slika 6c*), pri čemer poteče naslednja reakcija:



Določitev KPK smo izvedli po sledečem postopku: 10 mL redčenega vzorca ($V_{vz} = 200$ ali 250 μ L) smo dodali 5,0 mL raztopine kalijevega dikromata. Počasi smo dodali 15 mL raztopine srebrov sulfat - žveplova kislina, premešali in kiveto postavili v razklopno enoto (*slika 6b*). Da se izognemo izgubi hlapnih komponent, smo raztopino srebrov sulfat - žveplova kislina dodali na koncu, ko so vse kivete vsebovale ustrezni vzorec in raztopino kalijevega dikromata. Vse vzorce smo prestavili v razklopno enoto, ki smo jo predhodno segreli na 148 °C. Na kivete smo takoj pritrtili kondenzatorje. Po končanem vretju smo

vzorce pustili 15 min v razklopni enoti, potem pa shladili na podstavku za hlajenje vzorcev, ki smo ga predhodno ohladili v zamrzovalniku. Po 20 min hlajenja smo steklene hladilnike za zračno hlajenje sprali z deionizirano vodo, da ni prišlo do izgub hlapnih komponent ter pričeli s titriranjem.

KPK smo določili samim substratom kot tudi vhodnim ter izhodnim testnim mešanicam. Analizo smo izvajali v dveh paralelnih določitvah. Pri vsaki seriji analiz smo KPK določili tudi standardni raztopini kalijevega hidrogen ftalata ter slepemu vzorcu deionizirane vode. S standardno raztopino, katere teoretični KPK je 500 mg/L, smo preverili, če smo pravilno izvedli postopek. Zadovoljiva meritev standarda je bila v obsegu 480 do 520 mg/L. Splei vzorec namesto vzorca vsebuje deionizirano vodo in nam tako pove porabo FAS-a za titracijo preostalega kalijevega dikromata.

Pred začetkom titriranja smo preverili koncentracijo amonijevega železovega (II) sulfata, saj se le-ta s časom zmanjšuje. Koncentracijo smo določili s titriranjem raztopine titra, ki je pripravljena raztopina kalijevega dikromata ter žveplove kisline. Koncentracijo amonijevega železovega (II) sulfata računamo po enačbi [12].

$$c_m \text{ (mol/L)} = \frac{10,0 \cdot 0,040 \cdot 6}{V} = \frac{2,4}{V} \quad \text{Enačba [12]}$$

c_m – koncentracija amonijevega železovega (II) sulfata

V_m – volumen porabljenega amonijevega železovega (II) sulfata pri titraciji [mL]

KPK smo izračunali po enačbi [13].

$$KPK \text{ (mg/L)} = \frac{8000 \cdot c_m \cdot (V_{sl} - V_{vz})}{V_0} \quad \text{Enačba [13]}$$

KPK – kemijska potreba po kisiku

c_m – koncentracija amonijevega železovega (II) sulfata [mol/L]

V_0 – volumen nerazredčene vzorca [mL]

V_{sl} – poraba amonijevega železovega (II) sulfata za titracijo slepega vzorca [mL]

V_{vz} – poraba amonijevega železovega (II) sulfata zatitracijo vzorca [mL]

Nadalje smo nekaterim vzorcem vrednost KPK določili spektrofotometrično ob tem, da smo prej nekaj vzorcev testirali na obeh sistemih. Zaradi dobre primerljivosti obeh metod smo nadaljnje meritve KPK vrednosti opravljali z uporabo Merckovih spektrofotomeričnih kitov 50 - 500 mg/L KPK (114690 COD Cell Test) in 500 - 10000 mg/L KPK (114555 COD Cell Test). Pri tem postopku smo v viale z reagenti odpipetirali/odtehtali ustrezno količino vzorca. Vzorce testnih mešanic smo morali redčiti (faktor redčenja = 10), da smo dosegli KPK vrednost v merilnem območju izbranega kita. Viale smo nato zaprli, jih pretresli ter za dve uri izpostavili temperaturi 148 °C v grelni komori Spectroquant TR 420 (Merck). Po končanem termostatiranju smo viale ohladili do sobne temperature in jim nato na spektrofotometru Spectroquant NOVA 60 (Merck) izmerili vrednost KPK (slika 6d).



Slika 6: a: razklopni sistem za merjenje KPK b: kivete z vzorci c: titriranje na avtomatskem titratorju d: spektrofotometrična enota za merjenje KPK

3.2.3 Elementna C, H, N in S sestava

Elementna analiza ogljika, vodika, dušika in žvepla je namenjena določitvi osnovnih lastnosti substrata, kot je vsebnost beljakovin, ogljikovih hidratov ter C/N razmerje. Princip analize temelji na preoblikovani Pregl-Dumas metodi.

Pred izvedbo analiz sem vzorce odpadnega presejanega (homogeniziranega) šipka, odvečnega aktivnega blata in kvasa posušila v halogenskem sušilniku (Mettler Toledo, model HR83) in jih nato strla do finega prahu v granitni terilnici.

Meritve smo izvedli na napravi CHNS Analyzer 2400 Series II (Perkin Elmer). V analizi smo za posamezno paralelko uporabili 1 - 2 mg vzorca.

3.2.4 Karl Fischer kulometrična titracija (KF)

Karl Fischer metoda (ASTM E 1064-04) se uporablja za določevanje vode v organskih vzorcih. Metoda omogoča določitev vode v mejah od 0,01 do 2,0 % (m/m) z uporabo avtomatskega kulometričnega titratorja. Končna reakcija metanolne raztopine joda, žveplovega dioksida in organske baze (RN) med titracijo vode v vzorcu je sledeča:



Meritve določanja vode smo izvajali s pomočjo avtomske naprave (Metrohm, model 684 KF Coulometer in 703 Ti Stand) po metodi ASTM E1064 - 04 [140]. Vzorce smo tehtali na analitski tehnici (Mettler Toledo, model AT261 DeltaRange).

Z metodo smo določili vsebnost vode (ut. % H₂O) v šipku, saj odpadni šipek poleg vode vsebuje etanol, uporabljen pri ekstrakciji proizvodnega procesa. Z analizatorjem vlage smo opravili meritve suhe snovi (pridobili smo podatke o masi vzorca z etanolom (m_{vz}) in masi suhe snovi brez etanola (m_{ss})) in po enačbah [14] – [18] izračunali suho ter organsko snov z dodatkom etanola:

1. S pomočjo izmerjene vrednosti o vsebnosti vode v vzorcu po Karl Fischer metodi izračunamo maso vode v vzorcu:

$$m_{H_2O} [g] = \frac{H_2O \cdot m_{vz}}{100} \quad \text{Enačba [14]}$$

m_{H₂O} – masa vode v vzorcu

H₂O – delež vode v vzorcu po Karl Fischer metodi [%]

m_{vz} – masa vzorca [g]

2. Iz meritev o masi vzorca in masi suhe snovi ter izračuna za maso vode v vzorcu izračunamo maso etanola v vzorcu:

$$m_{EtOH} [g] = m_{vz} - m_{ss} - m_{H_2O} \quad \text{Enačba [15]}$$

m_{EtOH} – masa etanola v vzorcu [g]

m_{ss} – masa suhe snovi [g]

3. Za tem izračunamo še maso etanola na gram vzorca:

$$m_{EtOH}/g_{vz} [g/g] = \frac{m_{EtOH} [g]}{m_{vz} [g]} \quad \text{Enačba [16]}$$

m_{EtOH}/g_{vz} – masa etanola na 1 g vzorca

4. Suho snov z etanolom izračunamo tako, da suhi snovi po klasični metodi prištejemo maso etanola:

$$SS_{EtOH} [g/g] = SS_{brez\ EtOH} + m_{EtOH}/g_{vz} \quad \text{Enačba [17]}$$

SS_{EtOH} – suha snov z etanolom

SS_{brez\ EtOH} – suha snov brez etanola [g/g]

5. Organsko snov z etanolom izračunamo po istem principu kot SS:

$$OS_{EtOH} [g/g] = OS_{brez\ EtOH} + m_{EtOH}/g_{vz} \quad \text{Enačba [18]}$$

OS_{EtOH} – organska snov z etanolom

OS_{brez\ EtOH} – organska snov brez etanola [g/g]

Kar zadeva popravke KPK vrednosti odpadnega presejanega (homogeniziranega) šipka na maso vzorca, SS ter OS, upoštevamo, da je KPK etanola 2,08 g/g. Nato preko izračuna o masi etanola na 1 g vzorca (enačba [16]) lahko izračunamo prispevek etanola h KPK vrednosti.

1. KPK na gram vzorca brez etanola bo torej:

$$KPK_{vz\ brez\ EtOH} [g/g_{vz}] = KPK_{vz\ EtOH} - [KPK_{EtOH} \cdot m_{EtOH}/g_{vz}] \quad \text{Enačba [19]}$$

$$KPK_{vz\ brez\ EtOH} = KPK\ vzorca\ brez\ etanola$$

$$KPK_{vz\ EtOH} = KPK\ vzorca\ z\ etanolom\ [g/g_{vz}]$$

$$KPK_{EtOH} = KPK\ etanola\ [g/g]$$

2. KPK na gram SS in OS pa:

$$KPK_{vz\ brez\ EtOH}\ [g/g_{SS\ oz.\ OS}] = \frac{KPK_{vz\ brez\ EtOH}}{SS\ oz.\ OS}$$
Enačba [20]

$$KPK_{vz\ brez\ EtOH} = KPK\ vzorca\ brez\ etanola\ na\ 1\ g\ SS\ oz.\ OS$$

$$SS\ oz.\ OS = delež\ SS\ oz.\ OS\ [%]$$

Ostali izračuni na 1 g SS oz. OS niso prikazani z enačbami, saj je princip izračunov vedno enako (glej enačbo [20]).

3.2.5 Mikroskopiranje na vrstičnem elektronskem mikroskopu (SEM)

Morfološko analizo inokuluma ter odpadnega presejanega (homogeniziranega) šipka smo opravili z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Carl Zeiss, model Supra 35 VP). Pred mikroskopiranjem smo vzorce liofilizirali, da smo iz njih odstranili vodo in pri tem ohranili njihovo strukturo. Pelet predhodno centrifugirane biomase (3×10 min, 3000 rpm) smo zamrznili v tekočem dušiku in ga liofilizirali 24 h pri -110°C (Thermo, model Heto PowerDry LL1500). Posušene vzorce smo pritrtili na ogljikov lepljeni trak, slednjega pa na aluminijeve nosilce, ki smo jih vstavili v vakuumsko komoro mikroskopa.

3.2.6 Test biometanskega potenciala s sistemom AMPTS

Avtomatski test biometanskega potenciala (AMPTS) omogoča določitev bioplinskega oz. biometanskega potenciala organskih substratov pri obremenitvi reaktorskega sistema, ki posnema obratovalne pogoje tipičnih komercialnih bioplinalnih. Njegova največja prednost v primerjavi s klasičnimi manometričnimi sistemi je zelo širok merilni obseg proizvedenega bioplina (15 mL/dan - 25 L/dan), zaradi česar lahko v širokem naboru delovnih prostornin (500 mL do 40 L) ponazarjam visoke organske obremenitve reaktorja. Poleg tega sistem nudi pomoč pri zasnovi testa in preračunavanju obremenitev, omogoča avtomatsko beleženje in normalizacijo ter temperaturne popravke meritev (pretok in prostornino bioplina). Visoka natančnost meritev daje informacijo o procesni dinamiki, kar nam je v pomoč pri določanju optimalnega zadrževalnega časa.

Glavno enoto sistema AMPTS II (BioProcess Control) sestavlja 15 reaktorjev s celotno prostornino 600 mL v termostatirani vodni kopeli (slika 7). Vsak reaktor je opremljen z mehanskim mešalom, ki zagotavlja mešanje substrata in inokuluma ter tako preprečuje nastajanje temperaturnega gradiента. Plin, ki nastaja v posameznem reaktorju, se preko enote za vzorečenje sestave plina odvaja na pripadajočo plovno celico ($V_{celice} = 10$ mL), ki meri količino nastalega plina. Meritve se beležijo na integriranem računalniškem strežniku. V AMPTS sistem je prav tako mogoče namestiti enoto za kemično absorpcijo CO_2 ter H_2S , ki nastajata med procesom, s čimer na plovni celici merimo predvsem količino nastalega CH_4 . Zaradi natančnega spremeljanja sestave bioplina z uporabo plinskega kromatografa absorpcijske enote v našem poskusu nismo uporabili.



Slika 7: AMPTS (z leve proti desni: reaktorji v vodni kopeli, enota za kemično absorpcijo CO_2 in H_2S , enota za merjenje količine nastalega bioplina oz. metana

3.2.6.1 Termostatiranje inokuluma

Inokulum za izvedbo testa smo pridobili iz komercialne bioplinarne, ki obratuje v mezofilnem temperaturnem območju in predeluje biološko razgradljive odpadke kmetijskih in agroživilskih dejavnosti.

Po odvzemu smo inokulum prepihali z dušikom ter ga termostatirali 30 dni pri temperaturi 37 °C, da se je porabila večina organske snovi, ki v inokulumu ne predstavlja mikrobne biomase. Dolžino obdobja termostatiranja smo določili z vzporednim spremeljanjem produkcije plinske faze samega inokuluma na sistemu AMPTS. Po termostatiranju smo za potrebe izvedbe testa AMPTS izmerili SS, OS ter gostoto inokuluma.

3.2.6.2 Izračun sestave testnih mešanic

Omrežni program AMPTS sistema omogoča izračun sestave testnih mešanic pri vnosu ustreznih vhodnih podatkov. V sistem vnesemo OS inokuluma (ut. %), OS substrata (ut. %), potrebno obremenitev reaktorja in maso testne mešanice. Ker je na začetku testa potrebno odvzeti 50 mL vzorca testne mešanice za namen analiz (OS, SS, KPK, alkaliteta, pH ...), je postopek sestavljanja recepture dvostopenjski. V prvi fazi določimo količine vhodnih surovin za sestavo testne mešanice (v našem primeru za 400 mL), nato pa podatke popravimo na dejansko obratovalno prostornino testne mešanice v testu ($V_{delovni} = 400 \text{ mL} - 50 \text{ mL} = 350 \text{ mL}$).

Izračun za primer sočasne razgradnje odpadnega presejanega homogeniziranega šipka MPHŠ ter odvečnega aktivnega blata MBRa1 (15,78 g MPHŠ, 62,54 g MBRa1) je sledeč:

1. celotna masa testne mešanice [g]: 491,44
2. koncentracija inokuluma [ut. % OS v inokulumu] = 1,26
3. koncentracija substrata [ut. % OS v substratu] = 4,431 (enačba [25])
4. razmerje OS inokuluma / OS substrata = 1,5
5. celotna prostornina reaktorja [mL] = 600

Po vnosu podatkov sistem izračuna:

6. maso inokuluma [g] = 413,12 (oz. 400 mL) (enačba [23])

7. maso substrata [g] = 78,32

Gostoto inkuluma izmerimo s tehtanjem 100,0 mL inkuluma v dveh merilnih valjih (enačbi [21] in [22]):

$$\rho [g/mL] = \frac{m}{V} \quad \text{Enačba [21]}$$

ρ – gostota

m – masa [g]

V – volumen [mL]

$$m_1 = 103,29 \text{ g}$$

$$m_2 = 103,26 \text{ g}$$

$$\rho_{inkulum} = \frac{(m_1 + m_2)}{(V_1 + V_2)} = \frac{(103,29 + 103,26) \text{ g}}{(100 + 100) \text{ mL}} = 1,0328 \text{ g/mL} \quad \text{Enačba [22]}$$

Masa 400 mL inkuluma bo torej:

$$m = 1,0328 \text{ g/mL} \cdot 400 \text{ mL} = 413,12 \text{ g} \quad \text{Enačba [23]}$$

Koncentracijo substrata izračunamo s pomočjo enačb [24] in [25]:

$$\frac{m_1 \cdot OS(g/kg)_1 + m_2 \cdot OS(g/kg)_2}{m_x} = \frac{15,78 \text{ g} \cdot 173,163 \text{ g/kg} + 62,54 \text{ g} \cdot 11,8 \text{ g/kg}}{78,32 \text{ g}} = 44,31 \text{ g/kg} \quad \text{Enačba [24]}$$

$$\frac{44,31 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \cdot 100 = 4,431 \% \quad \text{Enačba [25]}$$

m_1 – masa substrata 1 (izračunamo po enačbi [6])

m_2 – masa substrata 2 (izračunamo po enačbi [7])

$m_x = m_1 + m_2$ celotna masa substrata

$OS(g/kg)_1$ – organska snov substrata 1

$OS(g/kg)_2$ – organska snov substrata 2

Na podlagi vnesenih podatkov program izračuna potrebne količine vhodnih materialov po sledečem postopku:

$$\frac{m_I \cdot OS_I}{m_S \cdot OS_S} = \frac{I}{S} \quad \text{Enačba [26]}$$

$$m_I + m_S = m_T \quad \text{Enačba [27]}$$

m_I – masa inkuluma [g]

OS_I – organska snov inkuluma [g/g]

m_S – masa substrata [g]

OS_S – organska snov substrata [g/g]

I/S – razmerje med inkulumom in substratom

m_T – masa testne mešanice [g]

Torej bo npr. za $m_T = 400 \text{ g}$ in $I/S = 1,5$, masa substrata in masa inkuluma:

$$m_I = \frac{600 \cdot OS_S}{OS_I + 1,5 \cdot OS_S} \quad \text{Enačba [28]}$$

$$m_S = 400 - m_I \quad \text{Enačba [29]}$$

AMPTS test smo izvedli v štirih zaporednih poskusih, v katerih so bile testne mešanice inkubirane v dveh paralelkah. V posameznem poskusu smo poleg testnih mešanic s substrati inkubirali še slepo in standardno kontrolo (*tabela 6*). V slepi kontroli v testu spremljamo produkcijo bioplina v samem inkokulumu, kar služi za nadaljnje popravke o količini bioplina, ki nastane v testnih mešanicah z dodanim substratom. Standardna kontrola pa vsebuje dodatek znanega vira lahko razgradljive organske snovi, s katerim preverimo pravilen potek in izvedbo testa. V standardni mešanici smo v ta namen uporabili celulozo.

Tabela 6: Sestava testnih mešanic

Serija	Reaktor	Testna mešanica	Inokulum [g]	Celuloza [g]	MHPŠ [g]	MPŠ [g]	MBRa1 [g]	K [g]	MBRa2 [g]	I/S
1	1	Inokulum	352,17							
	2	Standard	352,17	3,78						1,5
	9,10	MPHŠ	352,17		21,82					1,5
2	1,2	Inokulum	361,48							
	3,4	Standard	361,48	3,04						1,5
	5,6	MPŠ	361,48			5,84				1,5
	9,10	MPHŠ+	361,48		13,81		54,72			1,5
		MBRa1								
	11,12	MPHŠ+K	361,48		13,07			0,9		1,5
3	1,2	Inokulum	353,4							
	3,4	Standard	353,4	3,49						1,5
	5,6	MBRa2	353,4						34,46	6
4	1,2	Inokulum	371,25							
	3,4	Standard	371,25	3,61						1,5
	14,15	K	371,25					4,2		1,5

3.2.6.3 Postopek priprave testnih steklenic

Pred polnjenjem steklenic v digestoriju sem nastavila sistem za prepihovanje z N₂. Inokulum sem odvzemala iz velike steklene čaše (2 L), kjer se je biomasa ves čas priprave poskusa mešala pri sobni temperaturi. Pri odvzemu sem inokulum odmerila z merilnim valjem (400,0 mL), nato pa sem ga prelila v steklenico in dodala zatehtano količino substrata. Nato sem testno mešanico dobro premešala in jo 10 minut prepihovala z N₂, s čimer sem izgnala raztopljeni O₂ iz testne mešanice. Po prepihovanju sem iz steklenice odlila 50,0 mL testne mešanice v serumske stekleničke za namen analiz ter jih po merjenju pH vrednosti gošč shranila v zamrzovalniku. Steklenice sem nato neprodušno zaprla, jih namestila v vodno kopel, povezala s sistemom cevk in nadprostor mešanice v steklenicah 5 minut prepihovala z Ar. Prepihovanje z Ar smo izvedli, da smo med procesom lahko spremljali N₂, ki prav tako nastaja v procesu anaerobne razgradnje. Po prepihovanju sem dovod cevk povezala s pretočnim merilcem bioplina, izpraznila posamezne plovne celice in preko računalniškega sistema vklopila mešanje ter zagnala poskus. Med samim poskusom mora biti v termostatirani komori vedno dovolj vode, t. j. do nivoja gladine testnih mešanic. Ko je krivulja doseglja stacionarno fazo in ko je bila produkcija plina 1 - 2 NmL/dan, sem test ustavila.

3.2.7 pH vrednost testnih mešanic

Na začetku ter na koncu inkubacije sem izmerila pH vrednosti na laboratorijskem pH metru (Metrohm, model 827 pH lab), kalibriranem v območju od 4 do 9.

3.2.8 Spremljanje sestave bioplina na plinskem kromatografu

Med testom smo redno spremljali sestavo pridobljenega bioplina s pomočjo plinskega kromatografa (Agilent Technologies, model 7890A), opremljenega s kapilarnima kolonama HP-PLOT/Q in HP-MOLESIEVE. Vzorce plina smo vbrizgali ročno, pri čemer smo na vzorčnem mestu odvzeli okrog 250 µL plina, injekcijo med prenosom do kromatografa zatesnili, neposredno pred vbrizgavanjem iztisnili vsebino injekcije do 125 µL plina in to prostornino vbrizgali v kromatografski sistem. TCD detektor v plinskem kromatografu je bil kalibriran na ogljikov dioksid, metan, dušik in vodikov sulfid.

3.2.9 Alkaliteta

Alkaliteto, izraženo kot mg/L CaCO₃, sem merila z 0,1 M HCl kot titrantom na avtomatskem titratorju Mettler Toledo. Za dosego meritnega območja sem vzorce redčila, tako da sem 2 mL vzorca dodala 48 mL deionizirane vode.

3.2.10 Redukcija OS ter KPK

Redukcija OS in KPK na koncu samega procesa je rezultat pretvorbe organske snovi v bioplín, novo biomaso in presnovljeni substrat. Redukcijo obeh parametrov računamo po naslednjem postopku (prikazani so izračuni za redukcijo OS):

$$OS_{red} [g/kg] = (OS_{mvh} - OS_{miz}) - (OS_{ivh} - OS_{iiz}) \quad \text{Enačba [30]}$$

$$OS_{red} [\%] = \frac{OS_{red} \cdot 100}{OS_{svh} \cdot OS_{ivh}} \quad \text{Enačba [31]}$$

OS_{red} – redukcija OS [g/kg]

OS_{red} – delež redukcije [%]

OS_{mvh} – začetna organska snov testne mešanice [g/kg]

OS_{miz} – končna organska snov testne mešanice [g/kg]

OS_{ivh} – začetna organska snov inokuluma [g/kg]

OS_{iiz} – končna organska snov inokuluma [g/kg]

3.2.11 Bioplinski in biometaski potencial

Merilo o ustreznosti substrata za pridobivanje bioplina je določeno z njegovim bioplinskim oziroma biometanskim potencialom. Ker nastaja bioplín pri razgradnji organske snovi, celokupno produkcijo bioplina navadno izražamo na maso vhodne OS ali vhodne KPK vrednosti uporabljenega substrata (enačbi [32] in [33]).

$$BPP [NL/kg KPK] = \frac{V_b}{KPK} \quad \text{Enačba [32]}$$

$$BMP [NL CH_4/kg KPK] = \frac{V_{CH_4}}{KPK} \quad \text{Enačba [33]}$$

BPP – bioplinski potencial

BMP – biometanski potencial

V_b – celokupni volumen bioplina [NL bioplina/ L testne mešanice]

V_{CH₄} – celokupni volumen metana[NL CH₄/L testne mešanice]

KPK – vhodna KPK vrednost substrata [kg KPK/L testne mešanice]

3.2.12 Izplen metana

Izplen metana (*enačba [34]*) računamo na osnovi biorazgradljivosti organske snovi in sicer tako, da količino metana izrazimo na reducirano količino OS ali KPK. Delež izplena (*enačba [35]*) pa izračunamo kot razmerje med eksperimentalno izmerjeno produkcijo metana iz 1 kg KPK in teoretično produkcijo metana iz 1 kg reduciranega KPK. Teoretična vrednost sicer predpostavlja, da iz 1 kg razgrajenega KPK pri standardnih pogojih nastane 350 L metana.

$$\text{Izplen } CH_4 \left[NL CH_4/kg_{redOS/KPK} \right] = \frac{V_{CH_4}}{m_{redOS/KPK}} \quad \text{Enačba [34]}$$

$$\text{Izplen } [\%] = \frac{I_{eks} \cdot 100}{I_t} \quad \text{Enačba [35]}$$

Izplen CH₄ – izplen metana

Izplen – delež izplena

V_{CH₄} – volumen celokupnega bioplina na liter testne mešanice [NL]

m_{redOS/KPK} – masa reducirne OS oz. KPK na liter testne mešanice [kg]

I_{eks} – eksperimentalni izplen [NL/kg]

I_t – teoretični izplen [350 NL/kg]

3.2.13 Energetska bilanca

Energetsko bilanco izračunamo preko kurilne vrednosti samega vzorca ter kurilne vrednosti metana, pridobljenega iz vzorca s procesom anaerobne razgradnje po sledečem postopku:

1. Izračunamo prostornino metana glede na gram vzorca [NmL CH₄/g_{vz}]

2. Molsko maso nastalega metana iz grama vzorca za 1 NmL testne mešanice:

$$n_{CH_4} [mol CH_4/g_{vz}] = \frac{V_{CH_4}}{V_m} \quad \text{Enačba [36]}$$

n_{CH₄} – molska masa CH₄ glede na 1 g vzorca

V_{CH₄} – volumen metana glede na 1 g vzorca [NmL CH₄/g_{vz}]

V_m – molska prostornina pri normalnih pogojih [22400 NmL/mol]

3. Maso metana iz grama vzorca [g CH₄/g_{vz}]

$$m_{CH_4} [g] = n_{CH_4} \cdot M_{CH_4} \quad \text{Enačba [37]}$$

M_{CH₄} – molska masa metana (16,04 g/mol)

4. Kurilno vrednost metana, ki nastane pri procesu anaerobne razgradnje:

$$\Delta H_c^\circ \text{ metana } [kJ/kg_{substrata}] = m_{CH_4} \cdot 10^{-3} \cdot H_{CH_4} \quad \text{Enačba [38]}$$

H_{CH₄} – kurilna vrednost metana [50014 kJ/kg]

5. Izkoristek:

$$\eta [\%] = \frac{\Delta H_c^\circ_{metana}}{\Delta H_c^\circ_{vzorca}} \quad \text{Enačba [39]}$$

$\Delta H_c^\circ_{vzorca}$ – kurilna vrednost vzorca [kJ/kg]

Pri izračunih kurilne vrednosti različnih vzorcev šipka brez etanola je potrebno upoštevati prispevek etanola, ki ga ima odpadni šipek iz proizvodnje pijač:

$$\Delta H_c^\circ_{vzorca brez EtOH} = \Delta H_c^\circ_{vzorca} - \Delta H_c^\circ_{EtOH v vzorcu}$$

Pri čemer je kurilna vrednost etanola v vzorcu:

$$\Delta H_c^\circ_{EtOH v vzorcu} = m_{EtOH}/kg_{vz} [kg/kg] \cdot \Delta H_c^\circ_{EtOH} \quad \text{Enačba [40]}$$

$\Delta H_c^\circ_{EtOH}$ – kurilna vrednost etanola [29700 kJ/kg]

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Karakterizacija inokuluma

Rezultate določitve SS, OS ter gostote za namen nastavitev poskusa testnih mešanic povzema *tabela 7*. Lastnosti inokuluma se razlikujejo zaradi sprememb v sestavi vhodnega substrata bioplinarne, kjer smo inokulum pridobili. Lastnosti inokuluma so deloma spremenjene tudi zaradi manjših odstopanj v trajanju termostatiranja (vselej okrog enega meseca). Sicer se rezultati ujemajo s študijami, kjer so pri določitvi biometanskega potenciala prav tako uporabili inokulum bioplinarne, ki za substrat izrablja prašičjo gnojevko. Kim S.H. in sod. [2013] tako navajajo 2,5 % za SS in 1,2 % za OS, medtem ko Carbala M. in sod. [2012] poročajo vrednost 1,0 g/mL za gostoto.

SEM prikaz inokuluma je viden na *sliki 8a*, preko katere na levi vidimo del minerala ter na desni del substrata.

Tabela 7: Lastnosti inokuluma za posamezne serije

Serija	SS [g/kg]	OS [g/kg]	% OS	Gostota [g/mL]
1	29,4	16,1	54,8	1,0062
2	23,9	12,6	52,5	1,0328
3	26,2	14,8	56,3	1,0097
4	27,0	14,6	54,2	1,0607

4.2 Karakterizacija substratov

Vrednosti merjenih parametrov posameznih substratov so navedeni v *tabelah 8 in 9*. SS in OS šipkovih substratov (*tabela 9*) je popravljena na vsebnost etanola, določenega s Karl Fischer kulometrično titracijo. MPŠ in MPHŠ imata delež etanola v tekoči fazi 8,63 ter 2,88 ut. %. Iz *tabele 9* je razvidno, da so vrednosti za navedene parametre šipkovih vzorcev z etanolom višje od tistih brez dodanega etanola.

Najvišjo vsebnost OS ter posledično visoko vrednost KPK vzorca glede na navedene substrate ima substrat K. Zaradi dodatka vode pred homogenizacijo se OS in KPK vrednost homogeniziranega vzorca ustrezno zmanjšata. Odvečno aktivno blato kot tudi MPHŠ+MBRa1 imajo nizko koncentracijo OS, saj je delež vode v teh substratih visok. Kurilne vrednosti vzorcev K in MPŠ so primerljive lesni biomasi, ki ima sicer kurilno vrednost približno 17 MJ/kg [Grünther B. in sod., 2011].

Tabela 8: Lastnosti substratov odvečnega aktivnega blata in kvasa

Substrat	SS [g/kg]	OS [g/kg]	OS [%]	KPK [g/kg _{vz}]	KPK [g/kg _{ss}]	KPK [g/kg _{os}]	ΔH _c [°] [MJ/kg]
K	914	861	94	1200	1313	1274	18,05*
MBRa1	13	12	89	30	2288	34	-
MBRa2	28	25	92	41	1477	44	

*Meritev izvedel Ilya Gasan Osojnik Črnivec [Osojnik Črnivec I.G. in Pintar A., 2011]

Tabela 9: Lastnosti šipkovi substratov, (ne)popravljenih na vsebnost etanola

Substrat	SS [g/kg]	OS [g/kg]	OS [%]	KPK [g/kg _{vz}]	KPK [g/kg _{os}]	ΔH _c [°] [MJ/kg]
MPHŠ	183	173	95	220	231	6,10
MPHŠ_{z EtOH}	212	202	95	280	296	6,95
MPHŠ+K	230	218	94	283	300	6,87
MPHŠ+K_{z EtOH}	257	244	95	339	359	7,67
MPHŠ+MBRa1	48	44	92	69	74	-
MPHŠ+MBRa1_{z EtOH}	53	50	90	81	90	-
MPŠ	550*	520*	95*	661	699	18,30
MPŠ_{z EtOH}	636	606	95	840*	889*	20,86*
Pečke šipka	-	-	-	-	-	22,71

*Meritve izvedel Ilya Gasan Osojnik Črnivec [Osojnik Črnivec I.G. in Pintar A., 2011]

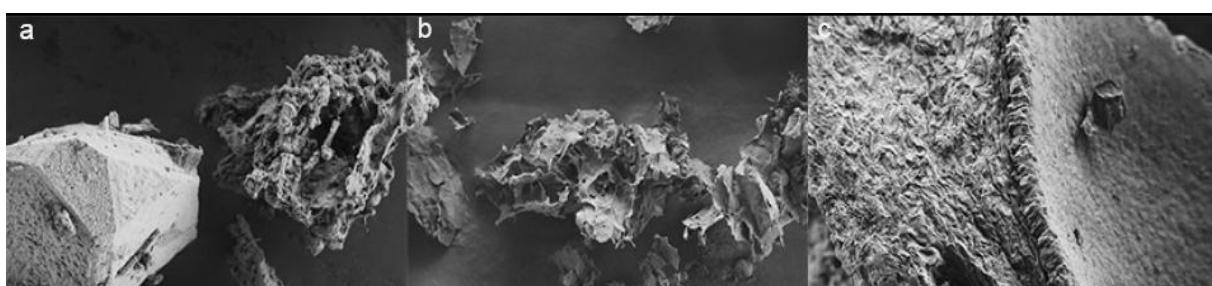
Analize CHNS so zbrane v tabeli 10. SPŠ ima zaradi nizke vrednosti dušika glede na ogljik v primerjavi z MBRa in K vzorcema precej višje C/N razmerje. Tako nizka vsebnost dušika v presejanih plodovih šipka bi verjetno ovirala dolgoročno stabilnost procesa. Na drugi strani pa relativno visoka vsebnost dušika, ki zadovolji potrebe mikroorganizmov po rasti, substratoma odvečnega aktivnega blata ter kvasa daje nizko C/N razmerje. Visoka vsebnost ogljika pri vseh vzorcih se odraža pri visokih KPK vrednostih, izračunanih na suho snov.

Tabela 10: C, H, N, S analize substratov

Vzorec	C [%]	H [%]	N [%]	S [%]	C/N
K	45,7	7,12	7,44	0,54	6
MBRa	45,6	6,37	8,98	0,45	5
SPŠ	42,37	6,02	0,62	0,64	68

*Meritve CHNS izvedla Špela Božič

Iz slik 8b in c je razvidno, da je homogenizacija zmanjšala velikost delcev ter povečala homogenost in s tem dostopnost substrata mikroorganizmom.



Slika 8: SEM slika a: inokuluma b: odpadnega presejanega homogeniziranega šipka ter c: odpadnega presejanega šipka

4.3 Karakterizacija testnih mešanic

Rezultati meritev testnih mešanic so navedeni v tabeli 11. Kar zadeva testne mešanice, ki so vsebovale šipkove substrate, so vsi rezultati v nadaljevanju popravljeni na vsebnost etanola. Vhodne vrednosti OS kot tudi KPK testnih mešanic so odraz razmerja med inokulumom ter substratom. V vseh serijah testne mešanice kontrol s skoraj popolno redukcijo OS in KPK dokazujejo ustrezno aktivnost inokuluma. Ob predpostavki, da je razmerje med inokulumom ter substratom vedno 1,5 (razen za MBRa2 = 6), so vhodne vrednosti OS in KPK MPHŠ zaradi homogenizacije višje glede na MPŠ. Višje izbrano razmerje med inokulumom in

substratom na vrednost 6, vhodne lastnosti v primeru MBRa zniža. Visoka OS in KPK vrednost kvasa kot substrata nekoliko poveča vhodne vrednosti K v primerjavi z MPHŠ+K.

MPHŠ glede na MPŠ doseže višjo redukcijo, čeprav je produkcija bioplina, izražena na OS, pri MPHŠ nekoliko nižja od MPŠ. MPHŠ+MBRa1 ter MBRa2 imata dokaj identično produkcijo bioplina, s to razliko, da je bila izbrana obremenitev za MBRa2 precej nižja. Pri MBRa2 ter K vzorcih opazimo zelo visoko redukcijo. Testna mešanica K ima sicer glede na MPHŠ+K precej višjo redukcijo. Substrat K ima tudi daleč najvišjo produkcijo bioplina, izraženo na NmL/g_{os}.

Tabela 11: Karakteristike testnih mešanic

Serija	Vzorec	OS _{vh} [g/kg]	OS _{iz} [g/kg]	KPK _{vh} [mg/L]	KPK _{iz} [mg/L]	OS _{red} [%]	KPK _{red} [%]	V bioplina [NmL/g _{os}]
1	Slepa	13,3	13,4	20476	21119			
	Kontrola	24,1	14,2	33274	22507	92	84	226,8
	MPHŠ	25,9	15,7	37932	26716	81	64	246,6
2	Slepa	12,4	11,9	17853	17226			
	Kontrola	20,1	12,3	27772	17141	95	101	332,7
	MPŠ	22,5	15,0	31869	23659	69	54	310,8
	MPHŠ+MBRa1	22,2	15,6	33659	19630	63	85	334,3
	MPHŠ+K	20,8	15,9	31025	26757	52	28	297,7
3	Slepa	14,1	13,1	25350	24200			
	Kontrola	24,0	13,3	37166	23667	98	105	483,3
	MBRa2	15,2	12,0	27300	21350	198	246	283,2
4*	Slepa	17,3	16,3	29650	26875			
	Kontrola	26,4	16,8	39925	26150	95	107	420,6
	K	26,2	14,6	41500	25167	119	114	469,9

*Meritve serije 4 izvedla Nataša Belšak Šel

4.4 pH vrednosti testnih mešanic

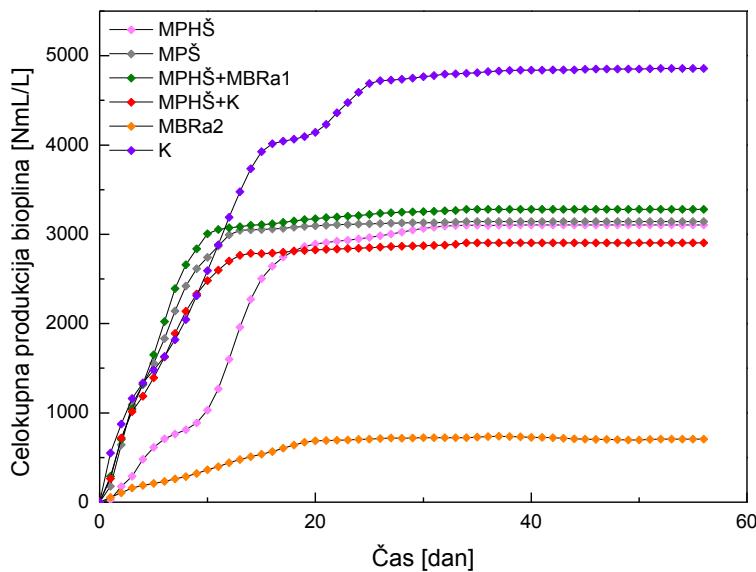
Začetna pH vrednost je v vseh vhodnih testnih mešanicah nekoliko višja od predvidenega optimalnega območja, a je glede na kinetiko, predstavljeno na *slikah 9 in 10*, razvidno, da v nobenem primeru ni prišlo do zaviranja produkcije bioplina, razen v primeru MBRa2. Testne mešanice s substrati imajo v vseh primerih nižjo vhodno pH vrednost glede na slepo, kar npr. v primeru testnih mešanic z odpadnim presejanim (homogeniziranim) šipkom, zavisi od v njem prisotnih maščobnih kislin, ki so se v procesu fermentacije razgradile do CH₄ in CO₂, kar je v sistemu izhodno pH vrednost nekoliko znižalo.

Tabela 12: pH vrednosti testnih mešanic na začetku in koncu inkubacije

Serija	Vzorec	pH _{vh} [I]	pH _{iz} [I]
1	Slepa	8,58	8,46
	MPHŠ	8,51	8,10
2	Slepa	8,35	8,35
	MPŠ	8,22	8,01
	MPHŠ+MBRa1	8,19	7,89
3	Slepa	8,20	7,98
	MBRa2	8,36	8,27
	K	8,26	7,93
4	Slepa	8,47	8,44
	K	8,40	8,34

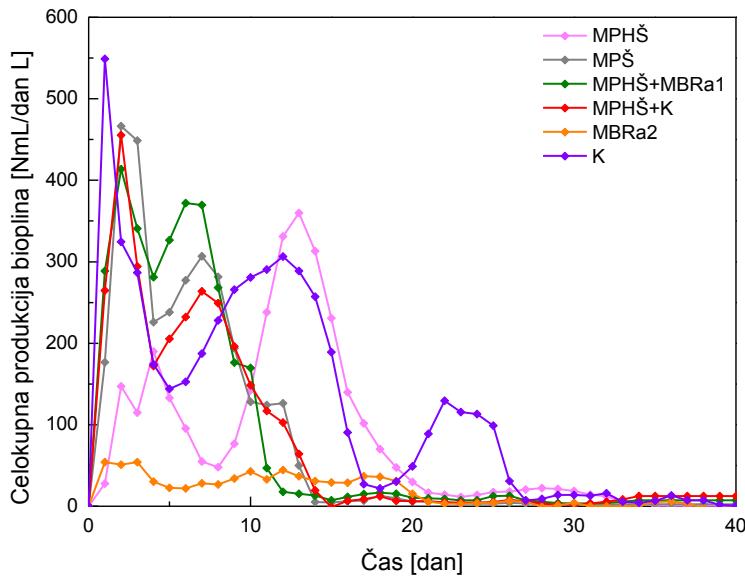
4.5 Celokupna produkcija bioplina ter bioplinski potencial

Najvišjo celokupno produkcijo bioplina glede na dodano količino substrata je v AMPTS testu dosegel vzorec K, najnižjo pa vzorec MBRa2. Kot je razvidno iz slike 9, je nastajanje bioplina pri ostalih substratih precej podobno, s tem, da dinamika produkcije bioplina pri MPHŠ kaže na počasnejšo produkcijo predvsem v prvem tednu inkubacije, kar bi lahko pripisali kopičenju hlapnih maščobnih kislin v sistemu, saj je homogenizacija prispevala k večji dostopnosti topnih komponent substrata mikroorganizmom. Tako je znižanje pH vrednosti na začetku inkubacije zavrllo proces metanogeneze, saj so, še posebno metanogene arheje, občutljive na spremembe pH vrednosti.



Slika 9: Celokupna produkcija bioplina iz različnih vzorcev

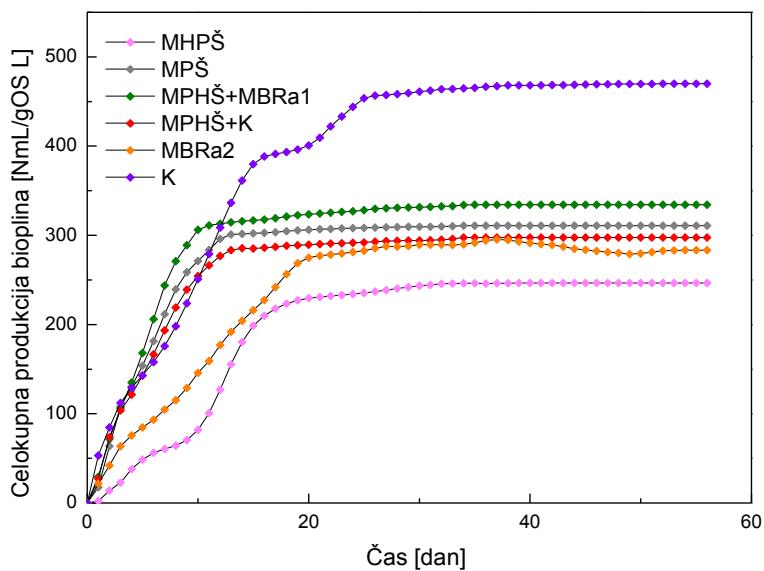
Računalniški strežnik AMPTS-sistema med drugim meri tudi časovni pretok bioplina. Razvidno iz slike 9 je po časovnem obdobju 30 dni produkcija bioplina za vse substrate nekaj mL na dan, kar bi iz energetskega vidika pomenilo premajhen prispevek energije proizvedenega bioplina v primerjavi s potrebno energijo za delovanje samega sistema. Ključnega pomena za proces anaerobne razgradnje je pozitivna energetska bilanca, kar pomeni, da moramo substratu z dovolj visokim biometanskim potencialom določiti časovno obdobje, v katerem je pretok bioplina visok, s čimer določimo zadrževalni čas substrata/-ov v reaktorju. Glede na dinamiko produkcije bioplina v šaržnih poskusih lahko predvidimo, da je potreben zadrževalni čas vzorcev MPŠ, MPHŠ+MBRa1 in MPHŠ+K okrog 10 dni, za MPHŠ 15 dni in za K med 20 -in 25 dnevi. Substrat K sicer kasneje doseže še en manjši porast produkcije v primerjavi s predhodnima, ki pa je časovno dokaj neugoden, saj običajno stremimo k čim krajšim zadrževalnim časom ter čim višji organski obremenitvi, s tem da moramo do neke mere upoštevati učinkovitost redukcije organske snovi ter dejstvo, da je v plinu, ki nastaja, na koncu večinoma prisoten metan. MBRa2 ima zaradi visokega razmerja med inokulumom in substratom nizke pretoke, zaradi česar optimalni zadrževalni čas težko ocenimo. Primer MBRa2 tako kaže na potrebo določevanja optimalnega zadrževalnega časa substratov pri različnih organskih obremenitvah. Optimalni zadrževalni čas pri tako nizki obremenitvi bi sicer lahko določili v UASB reaktorju.



Slika 10: Stopnja produkcije bioplina iz različnih vzorcev

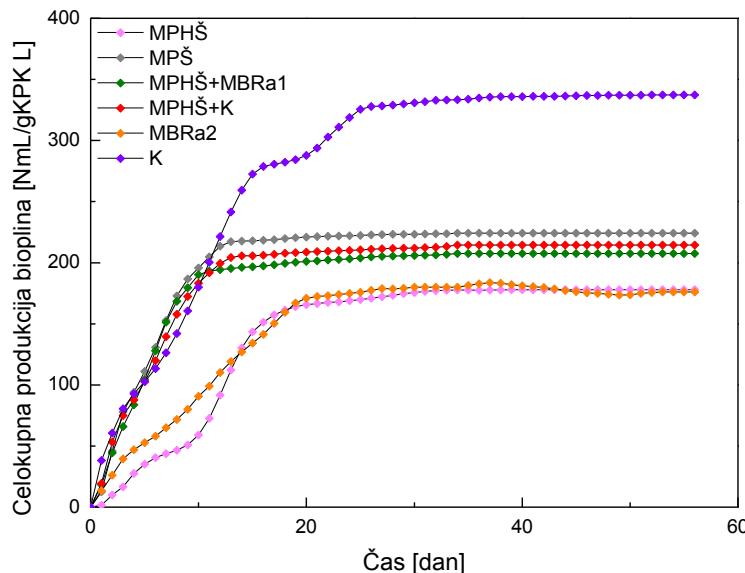
Bolj relevanten prikaz rezultatov podaja bioplinski potencial, pri katerem upoštevamo (i) količino uporabljeni organske snovi substrata oz t.i. organsko obremenitev reaktorja (*slika 11*) ali (ii) vhodni KPK substrata (*slika 12*) v testni mešanici, kar v končni fazi omogoča primerljivost rezultatov z drugimi študijami. Največjo celokupno produkcijo bioplina opazimo pri substratu K, ki pri koncentraciji organske snovi 10,3 g/L po končani inkubaciji vodi do 469,9 mL/gos vzorca bioplina ter s tem potrdi že prej narejene raziskave o uspešnem delovanju anaerobne razgradnje pri nizkem C/N razmerju [Álvarez J.A. in sod, 2010]. MPŠ ima nepričakovano pri organski obremenitvi 10,1 g/L s 310,8 mL/gos vzorca višjo produkcijo bioplina v primerjavi z MPHŠ, ki z organsko obremenitvijo 12,6 g/L proizvede 246,6 mL bioplina/gos vzorca. Primer sočasne razgradnje MPHŠ+MBRa1 ima pri 334,3 mL bioplina glede na MBRa2 z 283,2 mL/gos vzorca bioplina navidezno višjo produkcijo, saj je bila organska obremenitev prvega substrata (9,8 g/L) precej višja od drugega (2,5 g/L). MBRa2 z nepričakovanim rahlim nihanjem produkcije bioplina v zadnji tretjini fermentacije kaže na morebitno nestabilnost sistema. Glede na to, da MBRa v nobenem primeru ni bila sterilizirana, je najverjetnejše poleg fermentacije prišlo do denitrifikacije, kar nakazujejo tudi meritve vsebnosti sestave bioplina, katerih nenavadno visok vol.

% N₂, prikazan na *sliki 13*, sovpada z zaviranjem produkcije bioplina. Možnost preživetja denitrifikacijskih bakterij v odvečnem aktivnem blatu potrjujeta dejstvi, da (i) sem biomaso hranila v hladilniku, kjer mikroorganizmi ponavadi ne odmrejo, ampak zaradi nizke temperature stagnirajo ter (ii) večina denitrifikacijskih bakterij v aerobnih pogojih lahko preživi, s tem, da namesto N₂ proizvajajo N₂O [Shoun H. in sod., 2003].



Slika 11: Bioplinski potencial vzorcev, izražen na OS

Najvišjo produkcijo bioplina (337,3 mL), izraženo glede na vhodni KPK (14,4 g-KPK/L), ima substrat K. Zelo podobne produkcije bioplina dosežejo MPŠ (14,0 g-KPK/L), MPHŠ+K (13,5 g-KPK/L) in MPHŠ+MBRa1 (15,8 g-KPK/L) s produkcijo 224,2, 214,5 in 207,6 mL bioplina. MBRa2 ter MPHŠ imata s 176,1 ter 177,9 mL bioplina skoraj isto produkcijo, s tem da je vhodni KPK MBRa2 s 4,0 g-KPK/L veliko nižji od MPHŠ s 17,5 g-KPK/L.



Slika 12: Bioplinski potencial vzorcev, izražen na KPK

4.6 Sestava bioplina

Spremljanje sestave bioplina, ki je potekalo na vseh reaktorjih, z izjemo slepih in standardnih kontrol, je v vseh primerih pokazalo na visok celokupni odstotek metana. Glede na to, da so naše meritve sestave bioplina za MPHŠ potekale le do 18. dneva z vmesnim daljšim premorom, bi bila ocena povprečne sestave bioplina z uporabo naših podatkov neustrezna. Z ozirom na to, da je bioplinski potencial MPŠ precej podoben MPHŠ, lahko predpostavimo, da je delež CH_4 za MPHŠ enak deležu MPŠ (75 vol. %). Najvišji delež metana so dosegli substrati MPŠ, K in MPHŠ+MBRa1 z 75, 74 ter 72 vol. %. Malenkost nižje deleže sta imela substrata MPHŠ+K (68 vol. %) in MBRa2 (62 vol. %).

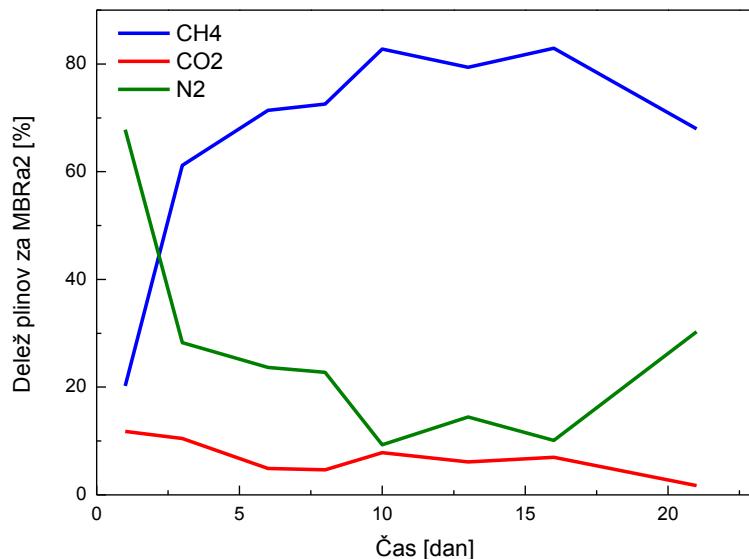
V vseh primerih (razen MBRa2) je prišlo tudi do tvorjenja H_2S . Za testno mešanico K so vrednosti prikazane v tabeli 13. Opazimo lahko, da do nastajanja H_2S prihaja le v prvih dneh ter da se količine postopoma znižujejo. Veliko avtorjev poroča o zmanjšani učinkovitosti metanogeneze zaradi večjih vsebnosti H_2S , s tem, da v primeru naših substratov do tega ni prišlo. Nizke koncentracije kažejo le na razgradnjo žveplovih spojin v substratih, ki pa v nobenem primeru niso bile visoke. Poleg tega je disociacijo HS^- onemogočala visoka začetna pH vrednost (tabela 12).

Kot že prej omenjeno, imajo testne mešanice, ki vsebujejo odvečno aktivno blato, neobičajno sestavo bioplina. Kot je razvidno iz slik 13 in 14, delež N_2 pri MPHŠ+MBRa1 substratu ni tako velik kot pri substratu MBRa2. To je razumljivo, saj višja vsebnost OS MBRa2 pomeni večje število denitrifikacijskih bakterij, ki so proizvajale N_2 . Sestava bioplina je v primeru

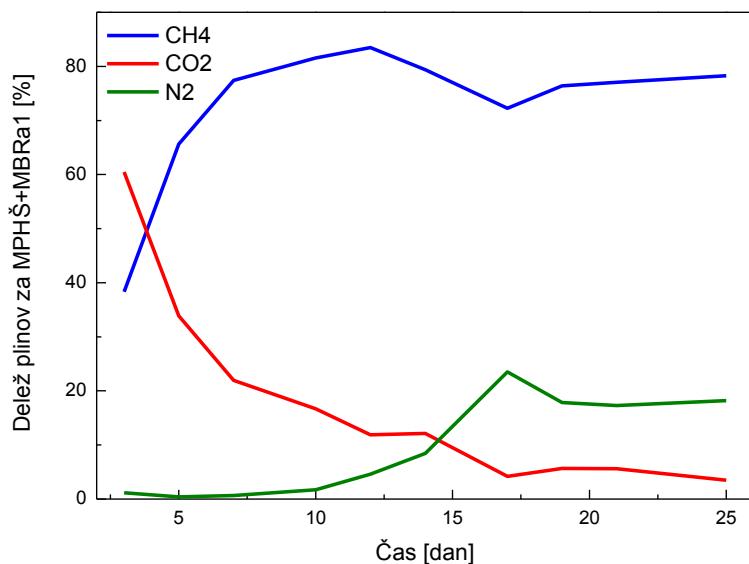
Tabela 13: Vrednosti H_2S za kvas

Čas [dan]	H_2S [vol. %]
1	0,19
2	0,11
3	0,09
4	0,05

MHPŠ+MBRa1 substrata prikazana le do 21. dneva, v primeru MBRa2 pa do 25. dne, saj se sestava plina kasneje ni bistveno spreminja.



Slika 13: Delež CH₄, CO₂ in N₂ med inkubacijo MBRa2



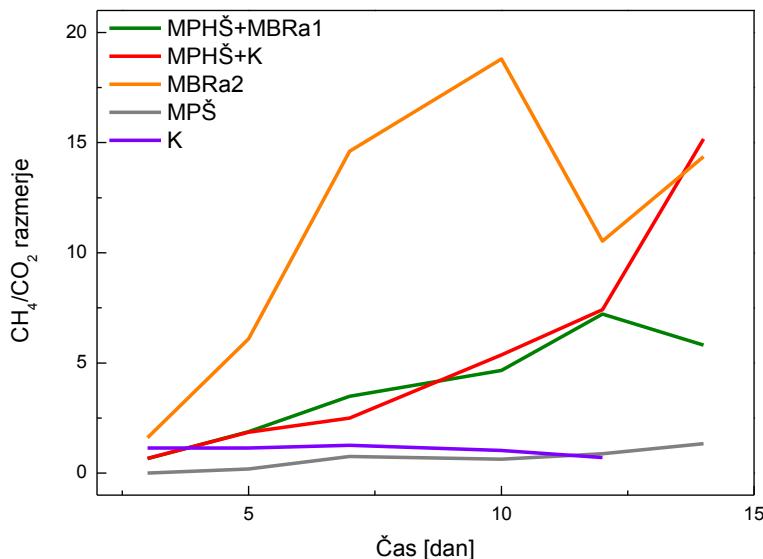
Slika 14: Delež CH₄, CO₂ in N₂ med inkubacijo MPHŠ+MBRa1

Glede na to, da je analiza sestave bioplina pokazala visoke vrednosti N₂ ter nižje vrednosti CH₄ in CO₂, meritve alkalitete potrjujejo, da je poleg metanogeneze med preučevanim procesom anaerobne razgradnje potekala tudi denitrifikacija. Iz *tabele 14* je razvidno, da se je v obeh primerih na koncu inkubacije alkaliteta povečala, s tem, da je višji porast viden pri MBRa2 substratu, kar sovpada z večjim deležem N₂ MBRa2 glede na MPHŠ+MBRa1.

Tabela 14: Alkaliteta testnih mešanic z odvečnim aktivnim blatom

Substrat	ALK _{vh} [mg/L CaCO ₃]	ALK _{iz} [mg/L CaCO ₃]
MBRa2	14238	15925
MPHŠ+MBRa1	12413	12975

V stabilnem procesu, ki obratuje v kontinuiranem načinu obratovanja, se CH_4/CO_2 razmerje trenutno nastalega bioplina bistveno ne spreminja in vzdržuje sestavo, ki je pogojena z značilnostmi uporabljenih substratov. Slika 15 kaže, da se CH_4/CO_2 razmerje najmanj spreminja pri substratih K in MPŠ. CH_4/CO_2 razmerje pri substratu K se sicer približa značilnemu razmerju za proteine ($\text{CH}_4/\text{CO}_2=55/45$), kar je glede na visoko vsebnost proteinov v kvasu razumljivo. Razmerje pri MPHŠ+K substratu vseskozi narašča, česar vzrok je v stalnem upadu deleža CO_2 . Velika nihanja v CH_4/CO_2 razmerju so vidna v primeru MBRa2 vzorca, ter nekoliko manjša nihanja pri MPHŠ+MBRa1 substratu, kar ponovno kaže na nestabilnost procesa.



Slika 15: CH_4/CO_2 razmerje substratov med inkubacijo

4.7 Vpliv dušika ter C/N razmerja na produkcijo metana

Tabela 15 prikazuje koncentracijo ogljika v testnih mešanicah in produkcijo metana, izraženo v NmL CH_4 glede na vsebnost dušika v substratih. Razvidno je, da imata substrata MPHŠ+MBRa1 in MPHŠ+K, z najnižjo koncentracijo ogljika, najvišjo produkcijo metana. Na drugi strani substrati MPHŠ, MPŠ in K z višjimi koncentracijami ogljika dosežejo precej nižjo produkcijo metana. Prvi razlog za to je lahko uravnavanje C/N razmerja v primerih MPHŠ+MBRa1 in MPHŠ+K, saj samo uravnavanje prispeva k večji stabilnosti procesa anaerobne razgradnje in višjem deležu metana v izhajajočem bioplinu. Nadalje pa lahko tudi vidimo, da imata MPHŠ in MPŠ dokaj podobno produkcijo metana, K pa kljub zelo podobni koncentraciji ogljika proizvede veliko manj metana, iz česar bi lahko sklepali, da na produkcijo metana vpliva tudi vir dušika. MPHŠ in MPŠ substrata namreč vsebujeta enake dušikove spojine, saj se razlikujeta samo v predpripravi substrata, medtem ko je sestava in izvor dušikovih spojin (beljakovin) v substratu K drugačna.

Tabela 15: Producija CH_4 glede na različno vsebnost ogljika

Substrat	Vsebnost C, mol/L	NmL $\text{CH}_4/\text{mol N}$
K	0,457	289
MPHŠ	0,497	1545
MPHŠ+K	0,012	20930
MPHŠ+MBRa1	0,011	23575
MPŠ	0,432	1660

4.8 Biometanski potencial

Tabela 16 prikazuje biometanske potenciale za obravnavane substrate za različna časovna obdobja fermentacije. Biometanski potencial MPŠ, določen v AMPTS testu, je lepo primerljiv z vrednostmi iz literature. Qu W. in sod [2009] namreč navajajo, da je biometanski potencial mokrih lupin granatnega jabolka po 20 dneh 207 L CH₄/kg OS, medtem ko je biometanski potencial granatnega jabolka po ekstrakciji antioksidantov 148 L CH₄/kg OS. Podoben biometanski potencial, kot ga ima granatno jabolko brez ekstrakcije antioksidantov, s 0,23 L CH₄/kg OS doseže MPŠ. Tosun I. in sod. [2004] so pokazali, da je biometanski potencial vrtnic, iz katerih pridobivajo olja, 0,29 L CH₄/g OS. Glede na to, da je bilo C/N razmerje odpadnih vrtnic 13,6 ter odpadnega presejanega šipka 68, je verjetno vzrok za nižji biometanski potencial MP(H)Š substratov zelo visoko C/N razmerje.

Tabela 16: Biometanski potencial substratov

Substrat	Biometanski potencial	Biometanski potencial [NL	Delež CH ₄	Čas anaerobne razgradnje
	[NL CH ₄ /kg OS]	CH ₄ /kg KPK]	[%]	[dan]
K	348	250	74	56
MBRa2	176	110	62	56
MPHŠ	185	134	75	41
MPHŠ+K	202	145	68	39
MPHŠ+MBRa1	242	150	72	39
MPŠ	234	168	75	39

4.9 Izplen metana

Izplen metana, ki je bil dosežen pri razgradnji preučevanih substratov, je prikazan v tabeli 17. Najvišji delež izplena s 154 % doseže MPHŠ+K. Visok delež izplena sta dosegla tudi substrata MPŠ in K z 89 ter 76 %. Sočasna razgradnja MPHŠ+MBRa1 z 51 % da boljši izplen kot pa sam MBRa2 s 26 %. Precej boljši izplen, kot pa ga ima substrat MBRa2, sicer dosežejo Lin J.G. in sod. [1997] pri hidravličnem zadrževalnem času 20 dni z 253 L CH₄/kg KPK ter Forster C.F. in Lafitte-Trouqué S. [2002] pri času 8 in 12 dni s 150 in 230 L CH₄/kg KPK. Prav tako ima vzorec MPHŠ+K precej višji izplen kot pa substrata K in MPHŠ posamično.

Tabela 17: Izplen CH₄ glede na reducirano OS in KPK

Substrat	Izplen AMPTS [NL	Izplen AMPTS [NL CH ₄ /kg	Delež
	CH ₄ /kg reducirana OS]	reducirani KPK]	izplena [%]
K	341	266	76
MBRa2	191	92	26
MPHŠ	228	208	60
MPHŠ+K	453	540	154
MPHŠ+MBRa1	387	177	51
MPŠ	338	311	89

4.10 Energetska bilanca

Iz tabele 18 je razvidno, da imata substrata MPHŠ in MPŠ z 19 ter 24 % podoben energetski izkoristek. Prav tako je tudi tu razvidno, da sočasna razgradnja optimizira proces, saj ima vzorec MPHŠ+K s 23 % glede na vzorec MPHŠ z 19 % višji energetski izkoristek. Najvišji izkoristek s kar 60 % doseže substrat K.

Tabela 18: Energetska bilanca

Substrat	ΔH_c° [kJ/g _{substrata}]	ΔH_c° [kJ CH ₄ /g _{substrata}]	Izkoristek [%]
K	18,05	10,75	60
MPHŠ	6,95	1,34	19
MPHŠ+K	7,67	1,77	23
MPŠ	20,86	5,07	24

4.11 Razprava

Številne raziskave s področja anaerobne razgradnje so usmerjene na določanje biometanskega potenciala organskih substratov in s tem primernosti za njihovo izkoriščanje s tem procesom. Kar zadeva substrate, uporabljene v tej raziskavi, so šipkovi in njemu podobni substrati manj, in na drugi strani odpadna aktivna blata in kvasni substrati, bolj raziskani. Maloštevilni avtorji sicer potrjujejo primernost substratov iz družine Rosaceae za pridobivanje bioplina. Med njimi ustreznost različno pripravljenih vzorcev šipka dokazujeta Osojnik Črnivec I.G. in Pintar A. [2011]. Ugotavljata, da na bioplinski potencial vplivajo: frakcija šipka (presejani plodovi šipka imajo višji potencial kot nepresejani, saj semena zaradi ligninske ovojnice predstavljajo anaerobno težko razgradljiv del substrata), sušenje (suhi plodovi šipka ne vsebujejo etanola kot ekstrakcijskega topila, zaradi česar imajo vzorci višjo KPK vrednost in biometanski potencial) ter mletje (z mletjem se poveča izpostavljenost notranjosti semen šipka).

Kot je razvidno iz *slike 8*, sam namen homogenizacije ni bil dosežen, saj je splošno znano, da zmanjšanje velikosti delcev bio-plinski/metanski potencial ponavadi poveča. O tem poročata tudi Osojnik Črnivec I.G. in Pintar A. [2011], ki sta ugotovila, da imajo suhi plodovi zmletega šipka nekoliko višji biometanski potencial kot suhi plodovi nezmletega šipka. Vzrok za nižji bio-plinski/metanski potencial odpadnega presejanega homogeniziranega šipka (MPHŠ) je najbrž v večji dostopnosti topnih komponent substrata, ki so zaradi kopičenja hlapnih maščobnih kislin upočasnile hitrost procesa anaerobne razgradnje ter prav tako tudi zmanjšale bio-plinski/metanski potencial glede na odpadni presejani šipek (MPŠ). Slednje potrjuje tudi višja redukcija OS ter KPK odpadnega presejanega homogeniziranega šipka (MPHŠ), ki sta se zaradi večje dostopnosti substrata glede na odpadni presejani šipek (MPŠ) pretvorila v novo biomaso. Rezultat tega je že prej omenjeno kopičenje hlapnih maščobnih kislin ter nekoliko nižji biometanski potencial, saj je padec pH vrednosti v reakcijski mešanici zaviral proces metanogeneze.

Nenavadno visok delež N₂ v primeru odvečnega aktivnega blata MBRa2 ter nekoliko nižji v primeru MPHŠ+MBRa1 kaže na morebitno prisotnost procesa denitrifikacije. V obeh primerih je delež CO₂ preko celotne fermentacije nizek, kar je glede na to, da denitrifikacija ustvarja alkaliteto, relativno. Prisotnost procesa denitrifikacije in njegov vpliv na izmerjene vrednosti potrjujeta tudi nizka produkcija bioplina glede na vhodno organsko snov ter na drugi strani visoka redukcija organske snovi, saj denitrifikacija zajema nastanek bikarbonata ob prisotnosti organskega substrata. S substratom MBRa2 z višjo začetno alkaliteto dosežemo precej velik porast (*tabela 14*), ki pa je delno odraz tudi daljše fermentacije v primerjavi s substratom MPHŠ+MBRa1. Tako bi bila za dologoročno stabilnost procesa anaerobne razgradnje potrebna sterilizacija odvečnega aktivnega blata, saj tako proces denitrifikacije ne bi vplival na produkcijo metana.

Sama kakovost bioplina ni odvisna le od vsebnosti CH₄, ampak tudi od njegove čistosti. Metan se iz bioplina pridobiva ali s čiščenjem (separacijo) drugih plinov ali pa s tehnologijami, ki povišajo njegovo kalorično vrednost. V splošnem energetsko učinkovitost lahko povečamo, če nastale komponente ne jemljemo kot nečistoče, ampak kot reaktante, uporabne za izrabo v drugih procesih, med katere spada tudi H₂S. H₂S, ki je v metabolizmu

anaerobne razgradnje stranski produkt skoraj vsakega substrata, lahko zaradi strupenosti na metanogene bakterije zavira proces, povzroča pa tudi korozijo in neprijetne vonjave [Peu P. in sod., 2012]. V primeru naših substratov je pri inkubaciji šipkovi in/ali kvasnega substrata prišlo do produkcije H₂S, a le v nizkih koncentracijah na začetku inkubacije. To kaže le na splošen metabolizem mikroorganizmov in ne na kompeticijo sulfid reducirajočih bakterij z metanogenimi bakterijami. S tem tudi odstranjevanje H₂S iz bioplina ne bi bilo potrebno. CO₂, ki je v bioplincu poleg CH₄ najbolj zastopan plin, zaradi njegove inertnosti na izgorevanje znižuje energetsko vrednost bioplina. Vključujoč tudi naše substrate, je nastali CO₂ smiselno uporabiti, saj s tem zmanjšamo izpuste CO₂, poleg tega pa so procesi čiščenja precej dragi. Možna je npr. biološka fiksacija CO₂ v gojiščih alg ali pa katalitski proces suhega reforminga, v katerem se metan in ogljikov dioksid pretvorita v sintezni plin, ki ima 25 do -30 % višjo kurilno vrednost od nastalega bioplina [Caprara C. in sod., 2010; Djinović P. in sod., 2011].

Rezultati so v kontekstu anaerobne razgradnje pokazali primerne biometanske potenciale za izrabo anaerobne razgradnje. Sočasna razgradnja odpadnega presejanega homogeniziranega šipka (MPHŠ) z odvečnim aktivnim blatom (MBRa1) in kvasom (K) se je po pričakovanjih izkazala za uspešno, saj se je biometansi potencial glede na sam odpadni presejani homogenizirani šipek (MPHŠ) povečal. Med testnimi mešanicami odvečno aktivno blato (MBRa2) pokaže najnižji potencial za izrabo anaerobne razgradnje. Visoko razmerje med inokulumom in substratom je v tem primeru namreč rezultiralo v nizko vsebnost SS (2,7 g/L), kar bi bil lahko zelo verjeten vzrok za nižjo produkcijo metana. *Bolzonella D.* in sod. [2005] namreč poročajo, da je pri substratu odpadnega aktivnega blata za anaerobno razgradnjo najprimernejša koncentracija SS >4 ut. %. Poleg tega številni avtorji poročajo o izboljšanem biometanskem potencialu z različnimi načini predobdelave, ki temeljijo na uporabi visoke temperature, ultrazvoka ali bazičnih oziroma kislih kemičnih reagentov [Kim S. in sod., 2003; Ray B.M. in sod., 2012].

5 ZAKLJUČKI

Na podlagi narejenih meritev lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- vsi izbrani substrati, z izjemo MBRa2, so pokazali primernost za izrabo s procesom anaerobne razgradnje;
- v primeru, da bi vzorec MBRa2 pred inkubacijo sterilizirali, bi tudi s tem substratom najverjetneje dosegli ustrezen biometanski potencial ter dolgoročno stabilnost, saj denitrifikacija ne bi zavirala procesa;
- sočasna razgradnja, narejena na podlagi uravnawanega C/N razmerja odpadnega presejanega homogeniziranega šipka z odvečnim aktivnim blatom ali kvasom, se izkaže za uspešno, saj je v obeh primerih biometanski potencial višji od potenciala, ki ga ima odpadni presejani homogenizirani šipek sam;
- sočasna razgradnja prav tako pripomore k dolgoročni stabilnosti procesa;
- homogenizacija odpadnega presejanega šipka ni prispevala k optimizaciji procesa, saj je zmanjšala tako hitrost anaerobne razgradnje kot tudi biometanski potencial.

6 VIRI

Adani F., Schievano A., D'Imporzano G., Malagutti L., Fragali E., Ruboni G. 2010. Evaluating inhibition conditions in high-solids anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 101: 5728-5732

Ağdaş O.N., Sponza D.T. 2005. Co-digestion of industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. *Process Biochemistry*, 40: 1871-1879

Ağdaş O.N., Sponza D.T. 2007. Co-digestion of mixed industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. *Journal of Hazardous Materials*, 140: 75-85

Ahring B.K. 2003. Perspectives for anaerobic digestion. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 81: 1-30

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

Álvarez J.A., Otero L., Lema J.M. 2010. A methodology for optimising feed composition for anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*, 101: 1153-1158

Amon B., Amon T., Kryvoruchko V., Machmüller A., Hopfner-Sixt K., Bodiroza V., Hrbek R., Friedel J., Pötsch E., Wagentristl H., Schreiner M., Zollitsch W. 2007. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresource Technology*, 98: 3204-3212

Angelidaki I., Bruni E., Jensen A.P. 2010. Comparative study of mechanical, hydrothermal, chemical and enzymatic treatments of digested biofibers to improve biogas production. *Bioresource Technology*, 101: 8713-8717

Arthur R., Baidoo M.F., Antwi E. 2011. Biogas as a potential renewable energy source: A Ghanaian case study. *Renewable Energy*, 36: 1510-1516

Berglund M., Börjesson P. 2006. Assessment of energy performance in the life-cycle of biogas production. *Biomass and Bioenergy*, 30: 254-266

Bernet N., Percheron G., Moletta R. 1999. Interactions between methanogenic and nitrate reducing bacteria during the anaerobic digestion of an industrial sulfate rich wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 341-350

Bizeau C., Akunna J.C., Moletta R. 1992. Denitrification in anaerobic digesters: possibilities and influence of wastewater COD/N-NO_x ratio. *Environmental Technology*, 13: 825-836

Björnsson L., Cirne D.G., Paloumet X., Alves M.M., Mattiasson B. 2007. Anaerobic digestion of lipid-rich waste-Effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, 32: 965-975

Bliddal H., Christensen R., Bartels E.M., Altman R.D., Astrup A. 2008. Does the hip powder of *Rosa canina* (rosehip) reduce pain in osteoarthritis patients? - a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16: 965-972

Boe K. 2006. Online monitoring and control of the biogas process. Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark, DTU tryk

Bolzonella D., Pavan P., Battistoni P., Cecchi F. 2005. Mesophilic anaerobic digestion of waste activated sludge: influence of solid retention time in the wastewater treatment process. *Process Biochemistry*, 40: 1453-1460

Braun R. 2007. Improvement of crop plants for industrial end uses. *Anaerobic digestion: a multi-faceted process for energy, environmental management and rural development*, 335-416

Buratti C., Fantozzi F. 2011. Anaerobic digestion of mechanically treated OFMSW: Experimental data on biogas/methane production and residues characterization. *Bioresource Technology*, 102: 8885-8892

Caprara C., Colla L., Stoppiello G., Zanella D., Zucchi G. 2010. Microalgae photobioreactors integrated with biogas cogeneration plants: Preliminary analysis for CO₂ capture, nitrogen removal and energy recovery. *Journal of Biotechnology*, 150: 164

Carballa M., Regueiro L., Álvarez J.A., Lema J.M. 2012. Enhanced methane production from pig manure anaerobic digestion using fish and biodiesel wastes as co-substrates. *Bioresource Technology*, 123: 507-513

Carlsson M., Lagerkvist A., Morgan-Sagastume F. 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, 32: 1634-1650

Cavinato C., Fatone F., Bolzonella D., Pavan P. 2010. Thermophilic anaerobic co-digestion of cattle manure with agro-wastes and energy crops: Comparison of pilot and full scale experiences. *Bioresource Technology*, 101: 545-550

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

Demir F., Özcan M. 2001. Chemical and technological properties of rose (*Rosa canina* L.) fruits grown wild in Turkey. *Journal of Food Engineering*, 47: 333-336

Demirbas M.F., Balat M., Balat H. 2011. Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*, 52: 1815-1828

Deublein D., Steinhauser A. 2008. *Biogas from waste and renewable resources*, Wiley-vch

Diamantis V.I., Vaiopoulou E., Aivasidis A. 2007. Fundamentals and applications of anaerobic digestion for sustainable treatment of food industry wastewater. *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*, 3: 73-97

Djinović P., Osojnik Črnivec I.G., Batista J., Levec J., Pintar A. 2011. Catalytic syngas production from greenhouse gasses: Performance comparison of Ru-Al₂O₃ and Rh-CeO₂ catalysts. *Chemical Engineering and Processing*, 50: 1054-1062

El-Mashad H.M., Zeeman G., Loon W.K.P., Bot G.P.A., Lettinga G. 2004. Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 95: 191-201

Estévez M., Vossen E., Utrera M., De Smet S., Morcuende D. 2012. Dog rose (*Rosa canina* L.) as a functional ingredient in porcine frankfurters without added sodium ascorbate and sodium nitrite. *Meat Science*, 92: 451-457

Eurobserv'er. Biogas barometer, 200, 2010
URL [10.5.2013] <http://www.eurobserv-er.org/pdf/baro200b.pdf>

Eurobserv'er. Biogas barometer, 212, 2012
URL [10.5.2013] <http://www.eurobserv-er.org/pdf/baro212biogas.pdf>

Flotats X., Palatsi J., Illa J., Prenafeta-Boldú F.X., Laureni M., Fernandez B., Angelidaki I. 2010. Long-chain fatty acids inhibition and adaptation process in anaerobic thermophilic digestion: Batch tests, microbial community structure and mathematical modelling. *Bioresource Technology*, 101: 2243-2251

Forster C.F., Callaghan F.J., Wase D.A.J., Thayanithy K. 2001. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable waste and chicken manure. *Biomass and Bioenergy*, 22: 71-77

Forster C.F., Lafitte-Trouqué S. 2002. The use of ultrasound and γ -irradiation as pre-treatment for the anaerobic digestion of waste activated sludge at mesophilic and thermophilic temperatures. *Bioresource Technology*, 84: 113-118

Fukui M., Suh J.I., Urushigawa Y. 2000. *In situ* substrates for sulfidogens and methanogens in municipal anaerobic sewage digesters with different levels of sulfate. *Water Research*, 34: 1515-1524

García A.I., Gómez X., Cuetos M.J., Cara J., Morán A. 2006. Anaerobic co-digestion of primary sludge and the fruit and vegetable fraction of the municipal solid waste: Conditions for mixing and evaluation of the organic loading rate. *Renewable Energy*, 31: 2017-2024

Gerardi M.H. 2003. The microbiology of anaerobic digesters. *Wastewater Microbiology Series*. Wiley-Interscience

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

Gunaseelan N.V. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26: 389-399

Günther B., Gebauer K., Barkowski R., Rosenthal M., Bues C.T. 2012. Calorific value of selected wood species and wood products. *European Journal of Wood and Wood Products*, 70: 755-757

Hafez H., Nasr N., Elbeshbishi E., Nakhla G., El Naggar M.H. 2012. Comparative assessment of single-stage and two-stage anaerobic digestion for treatment of thin stillage. *Bioresource Technology*, 111: 122-126

Harasek M., Makaruk A., Miltner M. 2010. Membrane biogas upgrading processes for the production of natural gas substitute. *Separation and Purification Technology*, 74: 83–92

Holm-Nielsen J.B., Al Seadi T., Oleskowicz-Popiel P. 2009. The future of anaerobic digestion and biogas utilization. *Bioresource Technology*, 100: 5478-5484

Kim S.H., Kafle G.K., Sung K.I. 2013. Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics. *Bioresource Technology*, 127: 326-336

Kim S.W., Kim J.K., Oh B.R., Chun Y.N. 2006. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 328-332

Kim S., Kim J., Park C., Kim T.H., Lee M., Kim S.W., Lee J. 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95: 271-275

Kornaros M., Dareioti M.A., Dokianakis S.N., Stamatelatou K., Zafiri C. 2009. Biogas production from anaerobic co-digestion of agroindustrial wastewaters under mesophilic conditions in a two-stage process. *Desalination*, 248: 891-906

Krich K., Augenstein D., Batmale J.P., Benemann J., Rutledge B., Salour D. 2005. Biomethane from dairy waste. A source book for the production and use of renewable natural gas in California, Western United Dairymen: str. A-1

Ledakowicz S., Sosnovski P., Wieczorek A. 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste. *Advances in Environmental Research*, 7: 609-616

Lin J.G., Chang C.N., Chang S.C. 1997. Enhancement of anaerobic digestion of waste activated sludge by alkaline solubilization. *Bioresource Technology*, 62: 85-90

Liu X., Gao X., Wang W., Zheng L., Zhou Y., Sun Y. 2012. Pilot-scale anaerobic co-digestion of municipal biomass waste: Focusing on biogas production and GHG reduction. *Renewable Energy*, 44 :463-468

Lombardi L., Baciocchi R., Carnevale E., Corti A., Costa G., Olivieri T., Zanchi L., Zingaretti D. 2013. Innovative process for biogas upgrading with CO₂ storage: Results from pilot plant operation. *Biomass and Bioenergy*, 53: 128-137

Lyberatos G., Pullammanappallil P.C. 2007. *Environmental Biotechnology. Handbook of environmental engineering. Anaerobic digestion in suspended growth bioreactors*. Springer Science and Business media, str: 395-438

McInerney M.J., Hoehler T., Gunsalus R.P., Schink B. 2010a. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Biochemistry of biogenesis. Introduction to microbial hydrocarbon production: bioenergetics*, str: 319-335

McInerney M.J., Sieber J.R., Plugge C.M., Schink B., Gunsalus R.P. 2010b. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Methanogenesis: Syntrophic metabolism*, str: 337-355

McHugh S., O'Reilly C., Mahony T., Colleran E., O'Flaherty V. 2003. Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2: 225-245

Metcalf W.W., Welander P.V. 2005. Loss of mtr operon in *Methanosarcina* blocks growth on methanol, but not methanogenesis, and reveals an unknown methanogenic pathway. *PNAS*, 102: 10664-10669

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

Nakamura Y., Take H., Andou Y., Kobayashi F., Kurimoto Y., Kuwahara M. 2006. Production of methane gas from Japanese cedar chips pretreated by various delignification methods. Biochemical Engineering Journal, 28: 30-35

Nges I.A., Escobar F., Fu X., Björnsson L. 2012. Benefits of supplementing an industrial waste anaerobic digester with energy crops for increased biogas production. Waste Management, 32: 53-59

Osojnik Črnivec I.G., Pintar A. 2011. Bioplinski potencial trdnih odpadkov iz ekstrakcije plodov navadnega šipka (*Rosa canina* L.). V: Slovenski kemijski dnevi 2011. Portorož, 14-16 september. Kravanja Z. (ur.), Brodnjak-Vončina D. (ur.), Bogataj M. (ur.). Maribor, FKKT: 1-6

Pereira M.A., Pires O.C., Monta M., Alves M.M. 2005. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. Biotechnology and Bioengineering, 92: 15-23

Peu P., Picard S., Diara A., Girault R., Béline F., Bridoux G., Dabert P. 2012. Prediction of hydrogen sulphide production during anaerobic digestion of organic substrates. Bioresource Technology, 121: 419-424

Procházka J., Dolejš P., Máca J., Dohányos M. 2012. Stability and inhibition of anaerobic processes caused by insufficiency or excess of ammonia nitrogen. Applied Microbiology and Biotechnology, 93: 439-447

Qu W., Pan Z., Zhang R., Ma H., Chen X. 2009. Antioxidant extraction and biogas production from pomegranate marc. An ASABE meeting presentation, Paper number: 096378. USA

Ramesohl S., Arnold K., Kaltschmitt M., Scholwin F., Plättner A., Kalies M., Lulies S., Schröder G., Althaus W., Urban W., Burmeister F. 2006. Analyse und Bewertung der Nutzungsmöglichkeiten von Biomasse. Untersuchung im Auftrag von BGW und DVGW. Band 1: Gesamtergebnisse und Schlussfolgerungen (Wuppertal Institut)

Ravnjak M., Vrtovšek J., Pintar A. 2011. Hibridni membranski reaktorski sistem: čiščenje z nitratnimi ioni onesnažene podtalnice

Ray M.B., Dhar B.R., Nakhla G. 2012. Techno-economic evaluation of ultrasound and thermal pretreatments for enhanced anaerobic digestion of municipal waste activated sludge. Waste Management, 32: 542-549

Samani Z., Macias-Corral M., Hanson A., Smith G., Funk P., Yu H., Longworth J. 2008. Anaerobic digestion of municipal solid waste and agricultural waste and the effect of co-digestion with dairy cow manure. Bioresource Technology, 99: 8288-8293

Santen H., Fricke K., Wallmann R., Hüttner A., Dichtl N. 2007. Operating problems in anaerobic digestion plants resulting from nitrogen in MSW. Waste Management, 27: 30-43

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

Schink B., Stams A.J.M. 2006. The prokaryotes. Syntrophism among prokaryotes. Springer, str: 309-335

Shoun H., Takaya N., Catalan-Sakairi M.A.B., Sakaguchi Y., Kato I., Zhou Z. 2003. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. Applied and Environmental Microbiology, 69: 3152-3157

Solera R., Romero L.I., Sales D. 2002. The evolution of biomass in a two-phase anaerobic treatment process during start-up. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 16: 25-29

Sørensen B. 2007. Renewable energy conversion, transmission and storage. Biological conversion into gaseous fuels. Elsevier, str: 195-206

Stahl D.A., Raskin L., Rittmann B.E. 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3847-3857

Steffen R., Szolar O., Braun R. 1998. Feedstocks for anaerobic digestion. Institute for agrobiotechnology Tulln. University of agricultural sciences Vienna

Stuckey D.C., Barber W.P. 2000. Nitrogen removal in a modified anaerobic baffled reactor (ABR): 1, denitrification. Water Research, 34: 2413-2422

Szentmihályi K., Vinkler P., Lakatos B., Illés V., Then M. 2002. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. Bioresource Technology, 82: 195-201

Tosun I., Gönüllü M.T., Günay A. 2004. Anaerobic digestion and methane generation potential of rose residue in batch reactors. Journal of Environmental Science and Health, A39: 911-921

Uredba o odLAGANju odpadkov na odLAGALIščih, Ur.l. RS. 32/2006, 98/2007, 62/2008 in 53/2009

Vavilin V.A., Rytov S.V., Lokshina L.Y. 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. Bioresource Technology, 56: 229-237

Visvanathan C., Wijekoon K.C., Abeynayaka A. 2011. Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. Bioresource Technology, 102: 5353-5360

Wagner A.O., Hohlbrugger P., Lins P., Illmer P. 2012. Effects of different nitrogen sources on the biogas production-a lab-scale investigation. Microbiological Research, 167: 630-636

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

Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology, 85: 849- 860

Wysokinski W.E., Gosk I., Rabczynski J., Kowal-Gierczak B. 1999. Atherosclerosis is different by extract from *Rosa canina* fruit. 71st annual European Atherosclerosis Society congress in Athens, Atherosclerosis, 144: 200

Zhu G., Peng Y., Li B., Guo J., Yang Q., Wang S. 2008. Biological removal of nitrogen from wastewater. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 192: 159-195