

Univerza
v Ljubljani

Fakulteta za
*gradbeništvo in
geodezijo*



DOKTORSKI ŠTUDIJSKI
PROGRAM III. STOPNJE
GRAJENO OKOLJE

Kandidatka:

SABINA KOLBL

**IZBOLJŠAVA ANAEROBNE PRESNOVE BLATA IZ
KOMUNALNIH ČISTILNIH NAPRAV IN
LIGNOCELULOZNIH SUBSTRATOV PRI PRIDOBIVANJU
BIOPLINA**

Doktorska disertacija št.: 11/GO

**IMPROVEMENT OF ANAEROBIC DIGESTION OF
MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT PLANT
SLUDGES AND LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATES IN
BIOGAS PRODUCTION**

Doctoral thesis No.: 11/GO

Soglasje k temi doktorske disertacije je dala Komisija za doktorski študij Univerze v Ljubljani
na 30. seji 4. julija 2012.

Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Jože Panjan,
za somentorja doc. dr. Blaž Stres, UL BF.

Ljubljana, 19. junij 2014



Komisijo za oceno ustreznosti teme doktorske disertacije v sestavi:

- izr. prof. dr. Jože Panjan,
- prof. dr. Boris Kompare,
- prof. dr. Franc Steinman,
- doc. dr. Rok Mihelič, UL BF,
- doc. dr. Blaž Stres, UL BF,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 29. redni seji 28. marca 2012.

Poročevalce za oceno doktorske disertacije v sestavi:

- prof. dr. Franc Steinman,
- doc. dr. Rok Mihelič, UL BF,
- doc. dr. Darko Drev, Inštitut za vode in UL FGG,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 10. redni seji 7. maja 2014.

Komisijo za zagovor doktorske disertacije v sestavi:

- prof. dr. Matjaž Mikoš, dekan UL FGG, predsednik,
- izr. prof. dr. Jože Panjan, mentor,
- doc. dr. Blaž Stres, UL BF, somentor,
- prof. dr. Franc Steinman,
- doc. dr. Rok Mihelič, UL BF,
- doc. dr. Darko Drev, Inštitut za vode in UL FGG,

je imenoval Senat Fakultete za gradbeništvo in geodezijo na 11. seji 28. maja 2014.

Univerza
v Ljubljani

Fakulteta za
*gradbeništvo in
geodezijo*



IZJAVA O AVTORSTVU

Podpisana **Sabina KOLBL** izjavljam, da sem avtorica doktorske disertacije z naslovom **Izboljšava anaerobne presnove blata iz komunalnih čistilnih naprav in lignoceluloznih substratov pri pridobivanju bioplina.**

Izjavljam, da je elektronska različica v vsem enaka tiskani različici.

Izjavljam, da dovoljujem objavo elektronske različice v digitalnih repozitorijih.

Ljubljana, 19. maj 2014

.....

(podpis)

Stran z napako	Vrstica z napako	Namesto	Naj bo

BIBLIOGRAFSKO-DOKUMENTACIJSKA STRAN IN IZVLEČEK

UDK:	628.336.6:579:577.15(043)
Avtor:	Sabina Kolbl
Mentor:	izr. prof. dr. Jože Panjan
Somentor:	doc. dr. Blaž Stres, UL BF
Naslov:	Izboljšava anaerobne presnove blata iz komunalnih čistilnih naprav in lignoceluloznih substratov pri pridobivanju bioplina
Obseg in oprema:	206 str., 46 pregl., 51 sl., 98 graf., 23 en.
Ključne besede:	biometanski potencial, anaerobna presnova, šaržni, semi-kontinuirani procesi, encimska predobdelava, ultrazvočna predobdelava, AMPTS II

Izveček:

Namen doktorske disertacije je izboljšati tvorbo metana z mehanskimi in encimskimi predobdelavami substratov. Za anaerobno presnovo različnih substratov in določevanje biometanskega potenciala smo uporabili napravo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II). AMPTS II je analitična naprava laboratorijske skale, ki omogoča meritve ultra nizkih hitrosti tvorbe biometana, proizvedenih med anaerobno presnovo biološko razgradljivih substratov. Donosnost bioplinskih elektrarn je omejena na konkretne primere, ki jih je težko posplošiti na zbrane podatke v literaturi, saj ti zajemajo različno modificirane substrate, ki so jim zmanjšali velikost delcev ali jih kemično predobdelali in s tem posledično spremenili njihove lastnosti in energetski prirastek. Zato za konkretne odločitve na bioplinarnah potrebujemo podatke, ki izhajajo iz inokuluma konkretne bioplinske naprave in substrate v takem stanju, kot se jih dozira v anaerobne reaktorje na realnem modelnem merilu.

Z nadgradnjo komercialnega sistema AMPTS II iz 0,5 l velikosti na 5 l modelno merilo smo razvili in validirali napravo za eksperimente, kjer lahko uporabljamo realni inokulum iz realne bioplinske naprave in realne substrate v takšni obliki kot jih dozirajo v anaerobne reaktorje na bioplinarnah. Na 5 l pilotnem modelnem merilu smo ocenili biometanski donos 24 substratom, ki so bili v trdni in tekoči obliki in jih primerjali z že obstoječimi objavljenimi podatki. Z dodajanjem različnih aditivov v obliki encimov in mikroorganizmov v proces anaerobne presnove, smo ocenili vpliv na nastajanje metana in izboljšali tvorbo metana. S kombinacijo različnih substratov, ki so jih sestavljali papirniško blato iz Kraft procesa, dehidrirano papirniško blato, biološki odpadki in lignocelulozni substrat, smo v šaržnih sistemih optimizirali tvorjenje metana. V semi-kontinuiranih procesih, kjer smo uporabili dehidrirano papirniško blato iz Palome, smo testirali vpliv delovanja encimov na tvorjenje metana, kjer smo dosegli občutno povečanje tvorbe metana, v naslednjem semi-kontinuiranem procesu pa smo testirali ultrazvočno predobdelavo blata iz ČN v kombinaciji z dodajanjem hidrolitskih encimov. Spremljali smo tudi delovanje bioplinske elektrarne (BPE) Vučja vas v obdobju 5 mesecev, ko je sestava vhodnih substratov nihala. S tehniko T-RFLP smo preučili vpliv encimov in čas inkubacije na strukturo bakterijske in arhejske združbe. Z uporabo programske opreme *STATISTICA* smo predvideli optimalne kombinacije substratov pri šaržnem načinu delovanja.

BIBLIOGRAPHIC-DOCUMENTALISTIC INFORMATION AND ABSTRACT

UDK: 628.336.6:579:577.15(043)
Author: Sabina Kolbl
Supervisor: Assoc. prof. Jože Panjan, Ph.D.
Cosupervisor: Assis. prof. Blaž Stres, Ph.D., UL BF
Title: Improvement of anaerobic digestion of municipal wastewater treatment plant sludges and lignocellulosic substrates in biogas production
Scope and tools: 206 p., 46 tab., 51 fig., 98 graph., 23 eq.
Key words: biomethane potencial, anaerobic digestion, batch, semi-continuous processes, enzymatic pretreatment, ultrasound pretreatment, AMPTS II

Abstract:

The aim of this doctoral dissertation was to improve the production of methane by mechanical and enzymatic pretreatments of organic substrates. For anaerobic digestion of different substrates and determination of biomethane potential, Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II) device was used. AMPTS II is an analytical laboratory scale device used in measurements of ultra low speed production of biomethane produced during the anaerobic digestion of biodegradable substrates. Although biogas yields of biogas plants are limited to the specific substrates, methane yields are difficult to generalize from the collected data in published literature due to different modifications of substrates, including particle size reduction or chemical pretreatment all affecting their properties and energy recovery. Therefore, for biogas plant decision making the data need to be derived from inoculum of concrete biogas plant and substrates in such a condition as to be dosed in anaerobic reactors on real industrial scale. By upgrading commercial system AMPTS II from 0.5 liters to 5 liters, a pilot scale device was developed and validated for such real-scale experiments mirroring anaerobic reactors at the biogas plant. On 5 liter pilot scale biomethane yield of 24 substrates in solid or liquid form was assessed and compared with existing published data. By adding a variety of additives in the form of enzymes and micro-organisms in the process of anaerobic digestion, the impact on the production of methane and enhancement of the production of methane was evaluated. A combination of different substrates from paper mill sludge from Kraft process, a dehydrated paper mill sludge, bio-waste and lignocellulosic substrate an optimization of methane production in batch mode was conducted. The effects of the addition of hydrolytic enzymes on the production of methane from dehydrated paper mill sludge from Paloma was further tested in semi - continuous experiments. Significant improvements were detected. In the next following semi - continuous experiments an ultrasonic pre-treatment of sludge from the treatment plant in combination with the addition of hydrolytic enzymes was tested. In addition, the operation of the biogas plant Vučja vas was monitored for a period of 5 months during the substrate fluctuation period. Using T- RFLP technique the effects of enzyme and incubation time on the structure of bacterial and archaea consortium were assessed. By using software STATISTICA an optimal combinations of substrates in a batch mode were determined.

ZAHVALE



»Operacijo delno financira Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007 – 2013, 1. razvojne prioritete: Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti, prednostne usmeritve 1.1.: Strokovnjaki in raziskovalci za konkurenčnost podjetij.«

Zahvaljujem se:

- mentorju **izr. prof. dr. Jožetu Panjanu** za sodelovanje, pomoč in podporo ter kritje stroškov najema ultrazvočne sonde,
- somentorju **doc. dr. Blažu Stresu**, ki si zasluži posebno zahvalo, saj brez njegove pomoči, znanja, požrtvovalnosti, pozitivne energije, vodenja v pravo smer, zorenja idej, učenja in spodbujanja, doktorata ne bi bilo v takšni obliki in obsegu,
- **Marjanu Kolarju, Tomu Begoviču, Denisu Bolčini** in podjetju **Keter Invest d.o.o.**, za sofinanciranje raziskav v okviru MRG in doktorskega študija,
- **prof. dr. Andreju Lavrenčiču, dr. Alenki Levart** in **Marku Kodri** za meritve NDV, KDV in KDL na Oddelku za zootehniko, Biotehniška fakulteta,
- **prof. dr. Gorazdu Avguštinu, Marti Majdič**, Oddelek za Zootehniko, Biotehniška fakulteta, za uporabo laboratorija in opreme za analize mikrobne združbe meritve KPK,
- **prof. dr. Petri Forte-Tavčer** za meritve viskoznosti na NTF,
- **Renatu Babiču** iz FGG za meritve velikosti delcev, dušika in KPK,
- **dr. Nini Pirher** za centrifugiranje vzorcev,
- **Attilu Paloczky-ju** za pomoč v laboratoriju, jutranje kavice in debatiranje o praktičnih izboljšavah,
- **Janiju Božiču** za uvajanje v laboratorijsko delo,
- **dr. Domnu Novaku** za prve korake pri sestavljanju AMPTS,
- **prof. dr. Poloni Žnidaršič Plazl** za usmeritev na Slovenske kemijske dneve,
- **mag. Nataši Uranjek Ževart** in **Alenki Štramcar** za blato iz CČN Šaleške doline,
- **doc. dr. Darku Drevu, prof. dr. Francu Steinmanu** in **doc. dr. Roku Miheliču** za pregled in popravke doktorske disertacije,
- **BPE Šijanec** in **BPE Kolar** za inokulum iz anaerobnih reaktorjev,
- **Kseniji** in **Dušanu** za lektoriranje doktorske naloge,
- **svojim najbližjim:**
 - **Mojci** za pomoč v laboratorij. Hvala, da si prisluhnila mojim problemom in me nasmejala ob najtežjih trenutkih,
 - **očetu in mami** za vsa opoldanska kosila, pomoč v laboratoriju in finančno pomoč,
 - **Mitju, Jerneji in Roku** za lepe trenutke,
- **prijateljem in ostalim sorodnikom,**
- vsem, ki jih nisem omenila in so mi pomagali pri nastajanju doktorata.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 Splošno	1
1.2 Namen in struktura doktorske naloge.....	2
2 TEORIJA PROCESA ANAEROBNE PRESNOVE	5
2.1 Hidroliza.....	5
2.1.1 Hidroliza ogljikovih hidratov	5
2.1.2 Hidroliza proteinov.....	6
2.1.3 Hidroliza lipidov.....	6
2.2 Acidogeneza (fermentacija).....	7
2.2.1 Acidogeneza (fermentacija) ogljikovih hidratov	7
2.3 Acetogeneza	9
2.4 Metanogeneza.....	10
2.5 Bakterije pri anaerobni presnovi in predobdelava z encimi	10
2.6 pH, alkalnost in hlapne kisline	14
2.7 Lignocelulozni substrati	16
2.7.1 Celuloza.....	16
2.7.2 Hemiceluloza.....	16
2.7.3 Lignin	16
2.8 Blato iz čistilnih naprav.....	18
2.8.1 Organska obremenitev anaerobnih reaktorjev	21
2.8.2 Zadrževalni čas v anaerobnem reaktorju.....	21
2.8.3 Vpliv temperature na anaerobno presnovo.....	22
2.8.4 Mešanje v anaerobnih reaktorjih	23
2.9 Predobdelave substratov.....	25
2.9.1 Biološko predčiščenje.....	26
2.9.2 Termalna hidroliza (>100°C)	27
2.9.3 Mehanska predobdelava	27
2.9.4 Kemijska preobdelava	30
2.9.5 Ekonomika predobdelav	30
2.9.6 Raziskave na področju lignoceluloznih substratov in blata iz ČN	32
2.9.7 Raziskave na področju odvečnega blata čistilnih naprav	35
2.10 Višina podpore za električno energijo obnovljivih virov, proizvedene na bioplinskih elektrarnah in elektrarnah na čistilnih napravah v Sloveniji	39
3 MATERIALI IN METODE	42

3.1	Splošne analize	42
3.1.1	Suha in organska snov	42
3.1.2	pH in prevodnost	43
3.1.3	Mletje lignoceluloznih vzorcev	43
3.1.4	Predobdelava blata iz čistilne naprave z ultrazvokom	44
3.1.5	Meritve celotnega fosforja	46
3.2	Kemijska potreba po kisiku (KPK)	46
3.3	Hlapne organske kisline in celotni anorganski ogljik - titracija	48
3.4	Plinska kromatografija za določevanje hlapnih maščobnih kislin	49
3.5	Določevanje strukture mikrobne združbe s hitrimi tipizacijskimi tehnikami	51
3.5.1	Filtriranje vzorcev	51
3.5.2	Izolacija DNA s pomočjo PowerSoil ^R DNA Isolation Kit	51
3.5.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR – polymerase chain reaction)	52
3.5.4	Gelska elektroforeza	54
3.5.5	Restriksijski polimorfizem dolžine končnih fragmentov (T-RFLP, angl. Terminal restriction fragment length polymorphism)	55
3.6	Merjenje biometanskega potenciala (BMP) z Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II)	56
3.6.1	Določevanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS)	57
3.6.2	Priprava inokuluma in substrata	57
3.6.3	Organska obremenitev za BMP	57
3.6.4	Priprava 3 M NaOH raztopine	58
3.6.5	Priprava reaktorjev na 0,5 l modelnem merilu	58
3.6.6	Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu	58
3.6.7	Sestava reaktorjev AMPTS-ja na 0,5 in 5 l modelnem merilu	58
3.6.8	Izračun biometanskega potenciala (BMP)	59
3.6.9	Izračun koeficienta hidrolize	60
3.6.10	Razgradnja organske snovi	60
3.7	Merjenje celotnega dušika, dušika po Kjeldahlu in amonijskega dušika	60
3.8	Merjenje velikosti delcev blata iz čistilne naprave	63
3.9	Merjenje viskoznosti	64
3.10	Analiza lignina, celuloze in hemiceluloze z analizami NDV, KDV, KDL	65
3.10.1	Analiza NDV – določevanje lignina, celuloze in hemiceluloze	65
3.10.2	Analiza KDV – določevanje celuloze in lignina	66
3.10.3	Analiza KDL – določevanje lignina	67
3.11	Računska optimizacija sestave anaerobnih reaktorjev za tvorbo biometana	68

3.12	Priprava eksperimentov za anaerobno presnovo na 0,5 l in 5 l modelnem merilu	70
3.12.1	Priprava reaktorjev na 0,5 l modelnem merilu z uporabo AMPTS za različne eksperimente.....	73
3.12.2	Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu za šaržne eksperimente od št. 3 do št. 12.....	75
3.12.3	Semi-kontinuirani eksperimenti na 5 l modelnem merilu AMPTS II	89
3.12.4	Spremljanje delovanja BPE Vučja vas	93
4	REZULTATI IN DISKUSIJA OPRAVLJENIH EKSPERIMENTOV	95
4.1	Rezultati in diskusija eksperimentov na 0,5 l modelnem merilu.....	95
4.1.1	Rezultati eksperimenta 1: Test uporabe koruzne silaže, peletov slame in njihovih kombinacij za pridobivanje biometana na 0,5 l šaržnem AMPTS II.....	95
4.1.2	Rezultati eksperimenta 2: Test določevanje BMP pripravljene mešanice iz BPE v kombinaciji s koruznim šrotom na 0,5 l AMPTS II	97
4.1.3	Ugotovitve iz eksperimenta 1 in 2.....	99
4.2	Rezultati in diskusija eksperimentov na 5 l modelnem merilu v šaržnem načinu.....	100
4.2.1	Rezultati in diskusija eksperimenta 3: Nadgradnja 0,5 l AMPTS II na 5 l velikost.....	100
4.2.2	Rezultati in diskusija eksperimenta 4: Primerjava metanskega donosa med 0,5 l in 5 l modelnim merilom AMPTS II	101
4.2.3	Rezultati eksperimenta 5: Test uporabe komunalnih odpadkov za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II.....	103
4.2.4	Rezultati eksperimenta 6: Test uporabe industrijskih odpadkov za pridobivanje bioplina na 5 l modelnem merilu AMPTS II.....	106
4.2.5	Rezultati eksperimenta 7: Test uporabe surovin kmetijskega izvora za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II.....	109
4.2.6	Ugotovitve iz eksperimentov 5, 6 in 7.....	110
4.2.7	Rezultati in diskusija eksperimenta 8: Možnost uporabe hidrolitskih encimov za povečanje tvorbe metana iz tritikale in blata iz CČN Šaleške doline na 5 l šaržnem AMPTS II.....	112
4.2.8	Rezultati in diskusija eksperimenta 9: Možnost uporabe BMP blata iz ČN in kombinacija z biološkimi odpadki za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II.....	122
4.2.9	Rezultati eksperimenta 10: Možnost uporabe blata iz CČN Šaleške doline, zelenega odreza ter njihovih kombinacij za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II	126
4.2.10	Rezultati in diskusija eksperimenta 11: Test optimizacije anaerobne presnove s kombiniranjem dehidriranega papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata Paloma, bioloških odpadkov iz gospodinjstev in koruzne silaže s 5 l šaržnim AMPTS II	130
4.2.11	Primerjava izmerjenih BMP z rezultati iz literature.....	135
4.3	Rezultati semi-kontinuiranih eksperimentov na nadgrajenem 5 l AMPTS II	137
4.3.1	Rezultati in diskusija eksperimenta 12: Možnost uporabe ultrazvoka in hidrolitskih encimov za pridobivanje biometana iz blata CČN Šaleške doline na 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II.....	137

4.3.2	Rezultati in diskusija eksperiment 13: Možnost uporabe hidrolitskih encimov za povečanje tvorbe bioplina iz odpadnega dehidriranega blata papirniške industrije v 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II	153
4.4	Rezultati računske optimizacije sestave substratov za določevanje biometanskega potenciala.....	163
4.4.1	Rezultati optimizacije BMP treh kombinacij substratov	163
4.4.2	Modeliranje BMP kombinacije blata iz ČN in bioloških odpadkov	169
4.4.3	Modeliranje BMP kombinacije blata iz ČN in zelenega odreza.....	169
4.4.4	Ugotovitve iz računske optimizacije sestave substratov za določevanje biometanskega potenciala.....	170
4.5	Rezultati spremljanja delovanja BPE Vučja vas.....	171
4.6	Rezultati in diskusija analize mikrobne združbe	191
5	SKLEPI	194
6	SUMMARY	198
	LITERATURA IN VIRI	202
	PRILOGE.....	i

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Hlapne kisline, ki jih najdemo v procesih anaerobne presnove (Gerardi, 2003b).....	9
Preglednica 2:	Acetogena razgradnja osnovnih elementov (Deublein in Steinhauser, 2010a).....	9
Preglednica 3:	Bakterije, ki sodelujejo pri procesu fermentacije v vseh štirih fazah (Deublein in Steinhauser, 2008).....	13
Preglednica 4:	Nekateri glavni encimi pri razgradnji lignoceluloze v monomere (Van Dyk in Pletschke, 2012).....	17
Preglednica 5:	Približna sestava (odstotek) različne biomase iz kmetijskih ostankov, ki jih potencialno lahko uporabimo za proizvodnjo biogoriv (Van Dyk in Pletschke, 2012).....	17
Preglednica 6:	Izboljšanje razgradnje aktivnega blata pri različnih eksperimentih.....	37
Preglednica 7:	Vpliv predobdelave z ultrazvokom na velikost delcev (Yeow in Peng, 2012).....	38
Preglednica 8:	Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalnih podpor za proizvodne naprave obnovljivih virov energije na bioplin, proizveden iz biomase (http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf ; UL RS št. 37/2009:1780).....	40
Preglednica 9:	Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalna podpora za proizvodne naprave obnovljivih virov energije na bioplin, proizveden iz biološko razgradljivih odpadkov (http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf ; UL RS št. 37/2009:1780).....	40
Preglednica 10:	Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalna podpora za proizvodne naprave obnovljivih virov energije – plin iz blata čistilnih naprav odpadnih voda (http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf ; UL RS št. 37/2009:1780).....	40
Preglednica 11:	Razmerje HOK/CAO glede na doziranje substrata (Hach Lange).....	48
Preglednica 12:	Lastnosti kislin in priprava mešanice za standard.....	50
Preglednica 13:	Protokol pomnoževanja gena za 16S rRNA z reakcijo PCR (Robič, 2012).....	54
Preglednica 14:	Primerjava lastnosti restriktijskih endonukleaz <i>HhaI</i> in <i>MspI</i> (Stres, 2013).....	55
Preglednica 15:	Pregled opravljenih eksperimentov za doktorsko nalogo.....	72
Preglednica 16:	Pregled sestave pilotnih reaktorjev za določevanje BMP.....	73
Preglednica 17:	Lastnosti vhodnih substratov in inokuluma iz BPE Vučja vas.....	73
Preglednica 18:	Sestava reaktorjev v treh ponovitvah v eksperimentu 2.....	74
Preglednica 19:	Lastnosti vhodnih substratov in inokuluma iz BPE Vučja vas.....	74
Preglednica 20:	Fizikalno kemijski parametri substratov: biološki odpadki iz restavracij A, B, C, D, E, G.....	79
Preglednica 21:	Lastnosti vhodnih substratov in uporabljenega inokuluma.....	81
Preglednica 22:	Lastnosti vhodnih substratov kmetijskega izvora in uporabljenega inokuluma.....	82
Preglednica 23:	Izmerjeni vhodni parametri substratov in biomase v eksperimentu 8 (Kolbl et al., 2014).....	84
Preglednica 24:	Doziranje substratov v pilotne reaktorje in organska obremenitev pri eksperimentu 9.....	85

Preglednica 25:	Izmerjeni vhodni parametri substratov in biomase za določevanje BMP s standardno napako.....	85
Preglednica 26:	Doziranje blata iz ČN in zelenega odreza in njune kombinacije v eksperimentu 10.	86
Preglednica 27:	Izmerjeni vhodni parametri substrata blata iz ČN in zelenega odreza ter biomasa iz BPE Šijanec.....	86
Preglednica 28:	Izmerjeni vhodni parametri substratov pri določevanju BMP odvečnega dehidriranega blata iz dveh papirniških industrij (blato Kraft in Paloma), bioloških odpadkov iz gospodinjstva in koruzne silaže (Kolbl et al. 2014).....	87
Preglednica 29:	Doziranje reaktorjev za določitev BMP z oznakami črk za substrate blato Kraft, Paloma, koruzna silaža, biološki odpadki in njihove kombinacije.	88
Preglednica 30:	Sestava pilotnih reaktorjev pri kontinuiranem procesu blata iz ČN in predobdelavi z ultrazvokom in dodajanju hidrolitskih encimov.	89
Preglednica 31:	Pogoji predobdelave blata 1 in 2 iz ČN z ultrazvokom pri kontinuiranem eksperimentu.	90
Preglednica 32:	Izmerjeni vhodni parametri blata 1 in 2 iz ČN ter biomase iz BPE Šijanec za kontinuirani eksperiment z ultrazvokom.	90
Preglednica 33:	Izmerjeni vhodni parametri odvečnega dehidriranega blata iz Palome in prašičje gnojevke v eksperimentu 13.	92
Preglednica 34:	Izmerjeni parametri po končanem eksperimentu 2.	98
Preglednica 35:	Izmerjeni različni parametri v anaerobnih reaktorjih po končanem eksperimentu 5 s podano standardno deviacijo (Kolbl et al., 2014).	104
Preglednica 36:	Izmerjeni različni parametri v anaerobnih reaktorjih s substrati kmetijskega izvora po končanem eksperimentu 7 s podano standardno deviacijo.....	110
Preglednica 37:	Biometanski potencial blata iz ČN in zelenega odreza (ZO) ter njune kombinacije glede na razmerje organske snovi po koncu eksperimenta s standardno deviacijo in koeficient hidrolize.	127
Preglednica 38:	Biometanski potencial substratov, koncentracije topnega KPK in koeficienti hidrolize substratov iz papirniške industrije v kombinaciji s koruzno silažo in biološkimi odpadki s standardno deviacijo v reaktorjih na koncu eksperimentov (Kolbl et al., 2014).....	132
Preglednica 39:	Sprememba velikosti delcev blata 1 s suho snovjo 3,5 % pri različnih specifičnih energijah.	139
Preglednica 40:	Sprememba velikosti delcev blata 2 s suho snovjo 1,1 % pri različnih specifičnih energijah.	140
Preglednica 41:	Opažene spremembe med reaktorji , ki smo jim dodajali različne hidrolitske encime.	162
Preglednica 42:	Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata iz Palome, koruzne silaže in bioloških odpadkov.	163
Preglednica 43:	Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij blata iz ČN in bioloških odpadkov.	169
Preglednica 44:	Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij blata iz ČN in zelenega odreza.	169
Preglednica 45:	Izmerjeni in napovedani biometanski potencial kombinacij blata iz čistilne naprave in bioloških odpadkov z modeliranjem s programom STATISTICA.....	170

Preglednica 46: Gradient v značilnostih za postavitev in izpeljavo testnih eksperimentov med objavljeno literaturo in tistih, uporabljenih v tem doktoratu, z namenom, da zagotovimo lažje odločanje na BPE.....	196
--	-----

KAZALO SLIK

Slika 1:	Koraki pri encimski hidrolizi (Batstone in Jensen, 2011).....	5
Slika 2:	Veriga proteina z aminokislinami, povezanimi z amidnimi skupinami (Batstone in Jensen, 2011).	6
Slika 3:	Biokemija pri tvorjenju bioplina (Deublein in Steinhauser, 2010a).	7
Slika 4:	Glavni produkti fermentacije ogljikovih hidratov. Višek elektronov je odstranjen kot vodik (H ₂) (Batstone in Jensen, 2011)	8
Slika 5:	Medvrstni prenos vodika (Ahring, 2003).....	11
Slika 6:	Metanogene bakterije iz rodu <i>methanosarcina</i> (okrogle) in <i>methanothrix</i> bakterije (paličaste), ki sodelujejo pri procesu anaerobne presnove (https://energylopedia.info/wiki/Biogas_Basics).	14
Slika 7:	Zgradba lignoceluloznih substratov (http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdlanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization).....	18
Slika 8:	Mikroskopska slika kosma aktivnega blata (levo) in njegova sestava (desno) (Govoreanu, 2004).	19
Slika 9:	Diagram poteka ravnanja z blatom pri anaerobni presnovi (Appels et al., 2008).	20
Slika 10:	Glavni cilji anaerobne presnove (Ahring, 2003).....	26
Slika 11:	Diagram območja ultrazvoka (Pilli et al., 2011).	28
Slika 12:	Razvoj in kolaps kavitacijskega mehurčka (Pilli et al., 2011).	28
Slika 13:	Izboljšanje tvorjenja metana po dodajanju encimov v različnih eksperimentih (Quiñones et al., 2012).....	34
Slika 14:	Žarilna peč Nabertherm (levo) in sušilnik Binder.	42
Slika 15:	Analitska tehtnica Kern.	42
Slika 16:	Prostostoječi mešalnik Philips HR2096 z močjo 800 W.	43
Slika 17:	Homogeniziranje blata iz čistilne naprave z ultrazvočnim homogenizatorjem UP200H proizvajalca Hielscher.....	45
Slika 18:	Merilnik porabe električne energije Voltcraft Energy Check 3000.	46
Slika 19:	Sušilnik Instrumentaria ST-05 (Hrvaška).	46
Slika 20:	Centrifuga Allegra™ X-12R.....	47
Slika 21:	Titratore TIM 840 proizvajalca Hach Lange.	48
Slika 22:	Plinski kromatograf Agilent 7890 A.....	50
Slika 23:	Power Soil® DNA Isolation Kit, ki smo ga uporabili za izolacijo DNA.	52
Slika 24:	Trije koraki verižne polimerizacije: denaturacija dvojno vijačne DNA, prileganje začetih nukleotidov in sinteza DNA (http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg) (levo) in aparat za verižno reakcijo s polimerazo MyCycler® thermal cycler (BIO-RAD Laboratories, Inc., ZDA)(desno).	53
Slika 25:	Določevanje količine reagentov v reakcijski mešanici za 25 µl alikvot s programom <i>PCR Calculator</i>	54
Slika 26:	Potek elektroforeze (levo) in slika agaroznega gela z vidnimi pomnožki PCR(desno).	55
Slika 27:	Shematičen prikaz tehnike T-RFLP pri tipizaciji genov za 16S rRNA združbe (Güntzig et al., 2002, v Stres, 2006).	56

Slika 28:	AMPTS II na 0,5 l modelnem merilu (levo) in povečano število steklenic za fiksacijo CO ₂ na 5 l modelnem merilu (desno).	59
Slika 29:	AMPTS II na 5 l modelnem merilu.	59
Slika 30:	Skalar San++ za merjenje dušika in amonijskega dušika (levo) in enota za razklop dušika Modelno merilor SA5620 in SA5640 (desno).	61
Slika 31:	Laserski merilnik velikosti delcev Fritsch Analysette 22.	64
Slika 32:	Prikaz rezultatov meritev velikosti delcev. Črta označuje vsoto vseh presevkov, s stolpci je označen odstotek (http://www.fritsch-sizing.com/encyclopedia/introduction-into-particle-sizing/).	64
Slika 33:	Potek meritev viskoznosti z reometrom Rheolab QC (Anton Paar, Nemčija) in prikaz rezultatov meritev s programsko opremo Rheoplus.	65
Slika 34:	Ankom vrečke (levo) in Ankon Fiber Analyzer za določevanje vsebnosti lignina, celuloze in hemiceluloze (desno).	68
Slika 35:	Trikotni grafični prikaz sestavin A, B in C (http://www.statsoft.com/Textbook/Experimental-Design/button/1#mixture).	69
Slika 36:	Grafični prikaz gibanja deleža mešanice sestavin A, B in C v trikotnem grafičnem prikazu (http://www.statsoft.com/Textbook/Experimental-Design/button/1#mixture).	70
Slika 37:	3D in ploščinski prikazi napovedanih vrednosti s programom za modeliranje različnih mešanic (Rao et al., 2011).	70
Slika 38:	Shema eksperimentov, ki smo jih izvedli na laboratorijskem modelnem merilu za optimizacijo delovanja bioplinskih naprav.	71
Slika 39:	Termostatska vodna kopel za 5 l reaktorje, narejena iz vodo nepropustnega stiropora. V kopeli sta grelnika za gretje vode in mešalo za kroženje vode (levo) in podaljšanje mešala v 5 l reaktorju (desno) (Kolbl et al. 2014).	76
Slika 40:	Shema sestave eksperimenta za določanje potrebnega števila 250 ml steklenic 3 M NaOH raztopine za nadgradnjo AMPTS II na 5 l modelno merilo (levo) in steklenice volumna 250 ml napolnjene z 3 M NaOH raztopino za vezanje ogljikovega dioksida iz reaktorjev (desno) (Kolbl et al. 2014).	77
Slika 41:	Tedlar vrečka (Adtech) za shranjevanje plinov in merilnik sestave plinov Dräger X-am 7000 (levo) in merilec plina Sewerin Multitec 410 (desno). (http://www.sewerin.com/cms/en/alt/products/gas/gas-warning-devices/multitec-410.html)	77
Slika 42:	Shema sejalne analize mletih vzorcev iz BPE Vučja vas.	78
Slika 43:	Ločeno zbrani biološki odpadki v biološko razgradljivih vrečkah.	79
Slika 44:	Mehansko obdelani biološki odpadki. Premer posode je 30 cm.	80
Slika 45:	Tehnološka shema Centralne čistilne naprave Šaleške doline. (http://www.kp-velenje.si/index.php?option=com_content&view=article&id=126:centralna-istilna-naprava-aleke-doline&catid=67:odvajanje-in-ienje&Itemid=201).	83
Slika 46:	Pogled na gnilišče CČN Šaleške doline (http://www.kp-velenje.si/index.php?option=com_content&view=article&id=126&Itemid=201).	83
Slika 47:	Dehidrirano papirniško blato iz procesa Kraft (levo) in dehidrirano blato iz Palome (desno) (Kolbl et al. 2014).	87
Slika 48:	Bioplinska elektrarna Vučja vas iz zraka.	93
Slika 49:	Potopni mešali v anaerobnem reaktorji BPE Vučja vas.	94
Slika 50:	Mešalna jama (MJ) za doziranje substratov.	94

Slika 51:	Shematski prikaz postopka analize stroškov in koristi za določitev najmanjšega donosa metana, ki pokrije stroške za predobdelavo substratov s hidrolitskimi encimi na BPE Šijanec in CČN Šaleške doline (Kolbl et al., 2014).....	120
-----------	---	-----

KAZALO GRAFIKONOV

Grafikon 1:	Biometanski potencial določen na 0,5 l pilotnih reaktorjih iz pripravljene mešanice iz mešalne jame (MJ) v kombinaciji s peleti iz slame s podanimi standardnimi deviacijami.....	95
Grafikon 2:	Koeficient hidrolize peletov in koruze silaže iz mešalne jame (MJ) ter njunih kombinacij v eksperimentu 1.....	96
Grafikon 3:	Biometanski potencial koruzne silaže iz mešalne jame in kombinacije koruzne silaže z mokro mletim koruznim zrnjem s podano standardno deviacijo.....	97
Grafikon 4:	Koeficient hidrolize pripravljene koruzne silaže iz mešalne jame, koruznega šrota ter njunih kombinacij v eksperimentu 2.....	98
Grafikon 5:	Določanje zadostnega števila 250 ml steklenic s 3 M NaOH raztopino za učinkovito vezanje ogljikovega dioksida med maksimalno hitrostjo produkcije bioplina v 5 l reaktorjih v nadgrajenem AMPTS II (Kolbl et al., 2014).	100
Grafikon 6:	Razlike v suhi snovi biomase iz BPE Vučja vas nehomogeniziranega (NH) in homogeniziranega (H) vzorca za določitev razlik v proizvodnji metana v 0,5 l in 5 l pilotnih reaktorjih AMPTS (Kolbl et al., 2014).	101
Grafikon 7:	Razlike v proizvodnji metana (normalizirana vrednost) med mehansko obdelanimi in neobdelanimi (realnimi) vzorci pri uporabi 0,5 l in 5 l AMPTS II (Kolbl et al., 2014).	102
Grafikon 8:	Biometanski potencial bioloških odpadkov A, B, C, D, E in G v eksperimentu 5 s standardno deviacijo.	103
Grafikon 9:	Koeficient hidrolize bioloških odpadkov eksperimenta 5 s standardno deviacijo.	104
Grafikon 10:	BMP industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.....	106
Grafikon 11:	Koeficient hidrolize industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana v eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.	106
Grafikon 12:	SS in OS industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.	107
Grafikon 13:	HOK, CAO in HOK/CAO industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.	107
Grafikon 14:	Koncentracija dušika, amonijskega dušika in pH industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.	108
Grafikon 15:	BMP substratov, ki izvirajo iz kmetijstva s standardno deviacijo v eksperimentu 7.....	109
Grafikon 16:	Koeficient hidrolize substratov kmetijskega izvora v eksperimentu 7.....	109
Grafikon 17:	Biometanski potencial blata iz ČN Šaleške doline in predobdelave blata s hidrolitskimi encimi Novozymes in Micropan Bioga s standardno deviacijo pri eksperimentu 8 kot funkcija časa (Kolbl et al., 2014).	112
Grafikon 18:	Koeficient hidrolize k_H blata ČN in dodajanja encimov Micropan Biogas ter Novozymes s standardno deviacijo.	113

Grafikon 19:	Specifični komulativni izplen metana na 5 l modelnem merilu z AMPTS II kot funkcija časa za inokulum iz BPE Šijanec in substrata tritikale z dodajanjem hidrolitičnih encimov Micropan Biogas in Novozymes s standardno deviacijo (Kolbl et al., 2014).....	113
Grafikon 20:	Koeficient hidrolize k_H za inokulum iz BPE Šijanec in substrat tritikala in dodajanja encimov Micropan Biogas ter Novozymes s standardno deviacijo.....	114
Grafikon 21:	Delež celuloze, hemiceluloze in lignina v posameznih reaktorjih pri eksperimentu z inokulumom iz BPE Šijanec, tritikalo in dodajanjem encimov Micropan Biogas in Novozymes po 34 dneh s standardno deviacijo	115
Grafikon 22:	Normalizirana vsebnost celuloze, hemiceluloze in lignina v posameznih reaktorjih pri eksperimentu z inokulumom iz BPE Šijanec, tritikalo in dodajanjem encimov Micropan Biogas in Novozymes po 34 dneh s standardno deviacijo.....	115
Grafikon 23:	Suha snov (SS), organska snov (OS) in pH v pilotnih reaktorjih po 34 dneh procesa anaerobne presnove s standardno deviacijo pri eksperimentu 9.....	116
Grafikon 24:	Vsebnost hlapnih organskih kislin (HOK) in celotnega anorganskega ogljika (CAO) po končani anaerobni presnovi tritikale in blata iz ČN ter dodajanju encimov Micropan Biogas in Novozymes, z uporabo inokuluma iz BPE Šijane in CČN Šaleške doline in podanimi standardnimi deviacijami. Z rumeno so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T), z rdečo pa vzorci z blatom iz ČN (B).	117
Grafikon 25:	Koncentracija celotnega in amonijskega dušika po 34 dneh procesa anaerobne presnove v šaržnih pilotnih reaktorjih eksperimenta s tritikalo in blatom iz ČN ter dodajanja encimov Micropan Biogas in Novozymes z uporabo inokuluma iz BPE Šijanec in CČN Šaleške doline in podanimi standardnimi deviacijami.. Z rumeno so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T) na koncu eksperimenta, z rdečo pa vzorci iz eksperimenta s blatom iz ČN (B).	118
Grafikon 26:	Koncentracija topnega KPK v 5 l pilotnih reaktorjih po 34 dneh v posameznih reaktorjih pri eksperimentu dodajanja hidrolitskih encimov Micropan Biogas in Novozymes tritikali in blatu iz ČN s standardno deviacijo ter koncentracije topnega KPK tritikale, blata iz ČN, inokuluma iz BPE Šijanec in inokuluma iz ČN Šaleške doline pred zagonom eksperimenta. Z rumeno in modrimi stolpci so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T) po koncu eksperimenta, z rumeno in zelenimi stolpci vzorci tritikale in inokuluma iz BPE Šijanec pred zagonom eksperimenta. Z modro so označeni vzorci eksperimenta z blatom iz ČN (B) po koncu eksperimenta, z rdečo pa blata iz ČN in inokuluma iz ČN pred zagonom eksperimenta.	119
Grafikon 27:	Tvorba metana v 32 dneh glede na organsko obremenitev blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.	122
Grafikon 28:	Koeficient hidrolize blata iz ČN, organskih odpadkov in njune kombinacije v eksperimentu 9 s standardno deviacijo.	122
Grafikon 29:	Suha snov (SS), organska snov (OS) in pH v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP blata iz ČN, bioloških odpadkov in njihovih kombinacij po 32 dneh s standardno deviacijo.	123
Grafikon 30:	Hlapne organske kisline (HOK), celotni anorganski ogljik (CAO) in HOK/CAO po 32 dnevih v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.	124

Grafikon 31:	Koncentracija celotnega dušika in amonijskega dušika po 32 dneh v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP kvasa, blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.....	124
Grafikon 32:	Biometanski potencial blata iz ČN ter zelenega odreza (ZO) in njune kombinacije v različnih razmerjih organske snovi kot funkcijo časa in podano standardno deviacijo.....	126
Grafikon 33:	Vsebnost SS, OS in pH v šaržnem eksperimentu z zelenim odrezom in kombinacijami blata iz ČN in zelenega odreza glede na vsebnost organske snovi po 40 dnevih. Podane so standardne deviacije meritev.	127
Grafikon 34:	Koncentracija hlapnih organskih kislin (HOK) in celotnega anorganskega ogljika (CAO) ter razmerje med HOK/CAO s podanimi standardnimi deviacijami za eksperiment z zelenim odrezom in kombinacijami z blatom iz ČN pri različnih deležih organske obremenitve blata iz ČN in zelenega odreza, ki smo ga označili z ZO v šaržnih reaktorjih po 40 dnevih.	128
Grafikon 35:	Koncentracija celotnega dušika, amonijskega dušika in amonijaka po 40 dnevih v anaerobnih reaktorjih pri določevanja BMP v šaržnem sistemu z zelenim odrezom, blatom iz ČN, njunimi kombinacijami pri različnih deležih organske obremenitve blata iz ČN in zelenega odrez, ki smo ga označili z ZO v šaržnih reaktorjih po 40 dnevih, s standardno deviacijo.....	128
Grafikon 36:	Akumulirana tvorba metana kot funkcija časa za različne kombinacije papirniškega odpadnega blata iz dveh papirnic (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) v eksperimentu kofermentacije. Metan, ki se je proizvedel pri izhodiščnem vzorcu (samo inokulum), smo odšteli, zato dobimo negativne vrednosti v reaktorjih z inhibicijo (Kolbl et al., 2014).	131
Grafikon 37:	Kombinacije specifičnih metanskih potencialov s standardno deviacijo za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij (Kolbl et al., 2014).....	131
Grafikon 38:	Vsebnost SS in OS v reaktorjih za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij na koncu eksperimenta 11 s podanimi standardnimi deviacijami.....	132
Grafikon 39:	Hlapne organske kisline (HOK) in celotni anorganski ogljik (CAO) v reaktorjih na koncu eksperimenta 11 za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij.	133
Grafikon 40:	Koncentracija celotnega dušika, amonijskega dušika $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in pH v reaktorjih na koncu eksperimenta 11 za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij.	134
Grafikon 41:	Primerjava variabilnosti BMP znotraj razredov substratov: Meritve iz literature v primerjavi z meritvami iz naših eksperimentov na nadgrajenem 5 l modelnem merilu AMPTS II ter različne šarže substratov znotraj istega razreda substratov. V grafikonu številke pomenijo naslednje substrate: 1 – sekundarno papirniško blato, 2 – koruzna silaža, 3 – tritikala, 4 – pšenični otrobi, 5 – koruzna polenta, 6 – klavnični ostanki, 7 – lizin, 8 – micelij, 9 –	

	pivovarniški kvas, 10 – biološki odpadki, 11 – krmna repa, 12 - muškatna buča, 13 – gnila muškatna buča, 14 – blato iz KČN (Kolbl et al. 2014).	135
Grafikon 42:	Koncentracije celotnega fosforja (TP), celotnega dušika (TN), nitratnega ($\text{NO}_3^- \text{N}$), amonijskega dušika ($\text{NH}_4^+ \text{N}$) in dušika po Kjeldahlu (TKN) vhodnega blata 1 in blata 2 iz ČN pred in po obdelavi z ultrazvokom pred doziranjem v anaerobni reaktor.	137
Grafikon 43:	Porazdelitev velikosti delcev pri prvem sklopu blata 1 z vsebnostjo suhe snovi 3,5 % in različnih časih obdelave z ultrazvokom.	138
Grafikon 44:	Porazdelitev velikosti delcev pri drugem sklopu blata 2 z vsebnostjo suhe snovi 1,1 % in različnih časih obdelave z ultrazvokom.	139
Grafikon 45:	Stopnja razgradnje (DD) blata 1 in sprememba koncentracije topnega KPK blata 1 v odvisnosti od specifične energije (SE).	140
Grafikon 46:	Stopnja razgradnje (DD) blata 2 in sprememba koncentracije topnega KPK blata 2 v odvisnosti od specifične energije (SE).	141
Grafikon 47:	Spreminjanje temperature in pH blata 1 pri obdelavi z ultrazvokom v odvisnosti od specifične energije.	142
Grafikon 48:	Spreminjanje temperature in pH blata 2 pri obdelavi z ultrazvokom v odvisnosti od specifične energije.	142
Grafikon 49:	Gibanje dušika in fosforja supernatanta blata 1 obdelanega z ultrazvokom pri različni specifični energiji.	143
Grafikon 50:	Gibanje dušika in fosforja v supernatantu blata 2 pri različni specifični energiji.	143
Grafikon 51:	Dnevna tvorba metana blata iz ČN, obdelanega z ultrazvokom glede na organsko obremenitev anaerobnega reaktorja.	145
Grafikon 52:	Kumulativna tvorba metana blata iz ČN obdelanega z ultrazvokom.	146
Grafikon 53:	Dnevna tvorba metana blata iz ČN obdelanega z ultrazvokom in hidrolitskimi encimi Novozymes glede na organsko obremenitev anaerobnega reaktorja.	147
Grafikon 54:	Kumulativna tvorba metana blata iz ČN obdelanega s hidrolitskimi encimi in ultrazvokom.	148
Grafikon 55:	Gibanje koncentracije amonijaka (NH_3) v anaerobnih reaktorjih z blatom iz ČN obdelanih z ultrazvokom in encimi Novozymes v 40-dnevem semi-kontinuiranem procesu.	149
Grafikon 56:	Gibanje koncentracije amonijaka (NH_3) v anaerobnih reaktorjih z blatom iz ČN, obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40-dnevem semi-kontinuiranem procesu.	149
Grafikon 57:	Koncentracija hlapnih organskih kislin v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.	150
Grafikon 58:	Koncentracija celotnega anorganskega ogljika (CAO) v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.	151
Grafikon 59:	Razmerje med hlapnimi organskimi kislinami in celotnim anorganskim ogljikom (HOK/CAO) v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.	151
Grafikon 60:	Vrednost pH v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.	152
Grafikon 61:	Dnevna tvorba metana glede na organsko obremenitev papirniškega blata brez predobdelave z encimi in z dodajanjem encimov Novozymes, Novalin, Biofuture, Micropan Biogas in zeolita M.	154
Grafikon 62:	Dnevna kumulativna tvorba metana iz papirniškega blata brez predobdelave z encimi in z dodajanjem encimov Novozymes, Novalin, Biofuture, Micropan Biogas in zeolita M.	155

Grafikon 63:	Gibanje pH skozi čas v reaktorjih brez encimske predobdelave in z encimsko obdelavo.	157
Grafikon 64:	Spreminjanje koncentracije celotnega dušika v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.....	158
Grafikon 65:	Spreminjanje koncentracije amonijskega dušika v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.....	158
Grafikon 66:	Spreminjanje alkalnosti v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.....	159
Grafikon 67:	Spreminjanje koncentracije hlapnih organskih kislin (HOK) v iztokih iz anaerobnih reaktorjev v eksperimentu 13.....	159
Grafikon 68:	Razmerje HOK/CAO v iztokih iz anaerobnih reaktorjev v eksperimentu 13.	160
Grafikon 69:	Prevodnost v anaerobnih reaktorjih, ki smo jim dodajali encime in anaerobnih reaktorjih brez dodajanja encimov v eksperimentu 13.	161
Grafikon 70:	Spreminjanje koncentracije topnega KPK v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.....	161
Grafikon 71:	Specialni kubični model napovedanih vrednosti BMP za mešanice papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata Poloma, koruzne silaže in bioloških odpadkov glede na delež organske obremenitve posameznega substrata. V presečišču vseh krivulj je delež organske snovi vsakega substrata 0,25.	164
Grafikon 72:	3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, bioloških odpadkov in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	165
Grafikon 73:	Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Paloma, bioloških odpadkov in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	165
Grafikon 74:	3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, bioloških odpadkov in papirniškega blata iz procesa Kraft, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	166
Grafikon 75:	Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Paloma, bioloških odpadkov in papirniškega blata iz procesa Kraft, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	166
Grafikon 76:	3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice bioloških odpadkov, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	167
Grafikon 77:	Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice bioloških odpadkov, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	167
Grafikon 78:	Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	168
Grafikon 79:	3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.	168
Grafikon 80:	Gibanje dnevne količine različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.....	172
Grafikon 81:	Gibanje dnevne vsebnosti organske snovi različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.	173

Grafikon 82:	Gibanje dnevne vsebnosti suhe snovi različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.....	174
Grafikon 83:	Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 1, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.	175
Grafikon 84:	Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 2, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.	176
Grafikon 85:	Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 3, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.	177
Grafikon 86:	Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 4, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.	178
Grafikon 87:	Dnevno gibanje nivoja plina v plinohranih nad anaerobnimi reaktorjih F1, F2, F3, F4, F5 in F6 BPE Vučja vas.	179
Grafikon 88:	Dnevno gibanje nivoja plina v plinohranih nad KZ1 in KZ2 na BPE Vučja vas.	180
Grafikon 89:	Povprečna dnevna proizvodnja elektrike Nova1, Nova2, Nova 3, Nova 4 in povprečna dnevna poraba plina na plinskih motorjih na BPE Vučja vas.	181
Grafikon 90:	Spreminjanje deleža SS, OS in pH v anaerobnem reaktorju F1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.....	183
Grafikon 91:	Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO anaerobnega reaktorja F1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.....	184
Grafikon 92:	Spreminjanje deleža SS, OS in pH v anaerobnem reaktorja F4 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.....	185
Grafikon 93:	Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO anaerobnega reaktorja F4 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.....	186
Grafikon 94:	Spreminjanje deleža SS, OS in pH v končnem zalogovniku KZ1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.	187
Grafikon 95:	Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO v končnem zalogovniku KZ1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.	188
Grafikon 96:	Spreminjanje deleža SS, OS in pH v končnem zalogovniku KZ2 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.	189
Grafikon 97:	Prikaz odnosov med mikrobnimi združbami bakterij skozi 45 dni kontinuirane razgradnje blata Paloma v 5 L AMPTS II z dodajanjem različnih encimov (nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS), indeks=Bray-Curtis, stress=0.16 in 0.09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ in 0.82). Središčni črti prikazujeta relativni vpliv dveh dejavnikov, dodajanja različnih encimov in časa inkubacije. Obodni konveksni obrisi predstavljajo geometrijske like, ki vsebujejo vse časovne točke variant z določenim encimom. (Legenda barv: rdeča : Paloma + Micropna Biogas; modra : Paloma + zeolit IPUS M; roza : Paloma + Novozymes; zelena : Paloma + Novalin; črna barva : Inokulum; vijolična : Paloma + Biofuture; flourescentno zelena : Paloma). Rumena puščica prikazuje smer gibanja strukture mikrobne združbe bakterij skozi čas.	192
Grafikon 98:	Prikaz odnosov med mikrobnimi združbami arhej skozi 45 dni kontinuirane razgradnje blata Paloma v 5 L AMPTS II z dodajanjem različnih encimov (nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS), indeks=Bray-Curtis, stress=0.16 in 0.09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ in 0.82). Središčni črti prikazujeta relativni vpliv dveh dejavnikov, dodajanja različnih encimov in časa inkubacije. Obodni konveksni obrisi predstavljajo geometrijske like, ki vsebujejo vse časovne točke variant z določenim encimom. (Legenda barv:	

	rdeča: Paloma + Micropna Biogas; modra: Paloma + zeolit IPUS M; roza: Paloma + Novozymes; zelena: Paloma + Novalin; črna: Inokulum; vijolična: Paloma + Biofuture; flourescentno zelena: Paloma).193
Grafikon E1:	Koncentracija etanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.ix
Grafikon E2:	Koncentracija etanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.ix
Grafikon E3:	Koncentracija propanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.x
Grafikon E4:	Koncentracija propanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.....x
Grafikon E5:	Koncentracija butanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.xi
Grafikon E6:	Koncentracija butanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu.....xi
Grafikon E7:	Koncentracija pentanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu. xii
Grafikon E8:	Koncentracija pentanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnom semi-kontinuiranem procesu..... xii
Grafikon G1:	Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov tretji dan po zagonu eksperimenta 13.xv
Grafikon G2:	Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 25 dan po zagonu eksperimenta 13.xv
Grafikon G3:	Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 35 dan po zagonu eksperimenta 13.xvi
Grafikon G4:	Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 45 dan po zagonu eksperimenta 13.xvi
Grafikon G4:	Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 60 dan po zagonu eksperimenta 13. xvii

LIST OF FIGURES

Figure 1: Steps in enzymatic hydrolysis (Batstone and Jensen, 2011).	5
Figure 2: Protein chain with amino acids linked by amide groups (Batstone and Jensen, 2011).	6
Figure 3: Biochemistry of the methane gas production (Deublein and Steinhauser, 2010a).	7
Figure 4: Major products from C6 monosaccharide fermentation. Excess electrons are removed as hydrogen as shown (Batstone and Jensen, 2011).	8
Figure 5: Interspecies hydrogen transfer (Ahring, 2003).	11
Figure 6: Various types of methanogenic bacteria. The spherically shaped bacteria are of the <i>methanosarcina</i> genus; the long, tubular ones are <i>methanotherix</i> bacteria.	14
Figure 7: Structure of lignocellulosic biomass.	18
Figure 8: Image of an activated sludge floc (left) and its composition (right) (Govoreanu, 2004).	19
Figure 9: Schematic view of sludge management during anaerobic digestion (Appels et al., 2008).	20
Figure 10: Main goals of anaerobic digestion (Ahring, 2003).	26
Figure 11: Diagram of ultrasound range (Pilli et al., 2011).	28
Figure 12: Development and collapse of the cavitation bubble (Pilli et al., 2011).	28
Figure 13: Enhancement of methane yield of various experiments after addition of enzymes (Quiñones et al., 2012).	34
Figure 14: Muffle furnace Nabertherm (left) and drying oven Binder.	42
Figure 15: Analytical balance Kern.	42
Figure 16: Blender Philips HR2096 for mixing of substrates and inocula.	43
Figure 17: Ultrasound pretreatment of wastewater sludge with ultrasound homogenizator UP200H (Hielscher).	45
Figure 18: Electricity consumption meter Volfcraft Energy Check 3000.	46
Figure 19: Drying oven instrumentaria ST-05 (Croatia).	46
Figure 20: Centrifuge Allegra™ X-12R.	47
Figure 21: Hach Lange titrator TIM 840.	48
Figure 22: Gas chromatograph Agilent 7890 A.	50
Figure 23: Power Soil® DNA Isolation Kit used for DNA extraction.	52
Figure 24: 3 steps of chain polymerisation: denaturation of double stranded DNA, annealing of started nucleotides and DNA synthesis (http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg) (left) and polymerase chain reaction device MyCycler® Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (right).	53
Figure 25: Calculation of reagent in reaction mixture for 25 µl aliquots using <i>PCR Calculator</i> .	54
Figure 26: Agarose electrophoresis (left) and agarose gel (right) with PCR amplicons.	55
Figure 27: Illustration of T-RFLP method (Güntzig et al., 2002, v Stres, 2006).	56
Figure 28: 0,5 liter laboratory scale of AMPTS II (left) and increased number of CO ₂ fixing units at upgraded 5 liter scale (right).	59
Figure 29: Upgraded 5 l AMPTS II	59
Figure 30: Skalar San ++ for measurement of total nitrogen and ammonium nitrogen (left) and digestion block (right).	61
Figure 31: Laser particle sizer Fritsch Analysette 22.	64

Figure 32: Particle size distribution measured with Analysette 22. Line represents sum volume, bars represent volume.	64
Figure 33: Measurements of viscosity using rheometer Rheolab QC (Anton Paar, Germany) and output of results with Rheoplus software.	65
Figure 34: Ankom filter bags (left) and Ankom Fiber Analyzer for determination of lignin, cellulose and hemicellulose (right).	68
Figure 35: Triangular scatterplot for mixture of components A, B and C.	69
Figure 36: Graphical outline of changes in the share of mixture of components A, B and C in regular scatterplot.	70
Figure 37: Mixture 3D surface plots and contour plots created with mixture design software (Rao et al., 2011).	70
Figure 38: Experimental outline. Schematic representation of experiments conducted in doctoral dissertation for optimization of functioning of biogas plants.	71
Figure 39: Waterproof thermostatic water bath used for heating 5 l reactors with two water heaters and mixer for circulation of water (left) and mixing shaft extension in 5 l reactor (right) (Kolbl et al. 2014).	76
Figure 40: Schematic outline of number of 250 ml bottles containing 3 M NaOH for CO ₂ stripping from biogas during upgrade of AMPTS II to 5 L scale (Kolbl et al. 2014).	77
Figure 41: Tedlar bag (Adtech) for biogas collecting and gas detection device Dräger X-am 7000 and gas measurement device Sewerin Multitec 410 (right) (http://www.sewerin.com/cms/en/alt/products/gas/gas-warning-devices/multitec-410.html).	77
Figure 42: Sieve analysis of homogenized samples from BGP Vučja vas.	78
Figure 43: Separately collected organic wastes in biodegradable bags.	79
Figure 44: Mechanically homogenized biological wastes. Diameter of container is 30 cm.	80
Figure 45: Technological scheme of central municipal wastewater plant of Šaleška valley.	83
Figure 46: Anaerobic digesters at WWTP Šaleška valley.	83
Figure 47: Dehydrated paper mill sludge from Kraft process (left) and dehydrated sludge from Paloma (right) (Kolbl et al. 2014).	87
Figure 48: Biogas plant Vučja vas from the air.	93
Figure 49: Plungers in anaerobic digester of BGP Vučja vas.	94
Figure 50: Mixing shaft for dosing of substrates.	94
Figure 51: Schematic outline of cost-benefit procedure used to determine the lowest increase in methane yields needed to cover the expenses of hydrolytic enzyme application in agricultural biogas plant Šijanec and MWWTP of Šaleška valley (Kolbl et al., 2014).	120

LIST OF TABLES

Table 1:	Volatile fatty acids that can be found in anaerobic digestion processes (Gerardi, 2003b).	9
Table 2:	Acetogenesis of basic elements (Deublein and Steinhauser, 2010a).	9
Table 3:	Bacteria that are present during all phases of anaerobic digestion (Deublein in Steinhauser, 2008).	13
Table 4:	Basic enzymes needed for degradation of lignocellulose into monomers (Van Dyk and Pletschke, 2012).	17
Table 5:	Approximately composition (percentage) of various biomass from agricultural wastes that can be potentially used for biofuels (Van Dyk and Pletschke, 2012).	17
Table 6:	Degradation improvement of active sludge during various experiments.	37
Table 7:	Effect of ultrasound pretreatment on particle size (Yeow and Peng, 2012).	38
Table 8:	Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced from biomass.	40
Table 9:	Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced from biological wastes.	40
Table 10:	Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced municipal wastewater treatment plants.	40
Table 11:	VOA/TIC ratio due to dosing of substrate (Hach Lange).	48
Table 12:	Acids properties and standard preparation.	50
Table 13:	Amplification of gene 16S rRNA by PCR (Robič, 2012).	54
Table 14:	Comparison of properties of restriction endonucleases <i>HhaI</i> and <i>MspI</i> (Stres, 2013).	55
Table 15:	Review of conducted experiments in doctoral dissertation.	72
Table 16:	Design of pilot reactors for determination of BMP.	73
Table 17:	Characterization of input substrates and inoculum from BGP Vučja vas.	73
Table 18:	Reactor design in triplicates in experiment 2.	74
Table 19:	Characterization of input substrates and inoculum from BGP Vučja vas.	74
Table 20:	Physico-chemical parameters of input substrates: biological wastes from restaurants A, B, C, D, E and G.	79
Table 21:	Characteristics of input substrates and inocula in experiment 6.	81
Table 22:	Characteristics of input substrates and inocula in experiment 7.	82
Table 23:	Characteristics of input substrates and inocula in experiment 8 (Kolbl et al., 2014).	84
Table 24:	Organic loading and dosage of pilot reactors in experiment 9.	85
Table 25:	Input parameters of substrates and inoculum for determination of BMP with standard deviation of experiment 9.	85
Table 26:	Dosing of wastewater sludge, green cuttings and their combinations in experiment 10.	86
Table 27:	Characteristics of input substrates and inoculum from BGP Šijanec in experiment 10.	86
Table 28:	Characteristics of input substrates to determine BMP of paper mill sludges Kraft and Paloma, OFMSW, silo maize and inoculum from BGP Šijanec in experiment 11 (Kolbl et al. 2014).	87
Table 29:	Dosing of reactors with paper mill sludge from Kraft proces and Paloma, silo maize, biological wastes and their combinations.	88

Table 30: Dosing of reactors in semicontinuous process with ultrasound treated and untreated wastewater sludge and enzymatic pretreatment.	89
Table 31: Characteristic of sludge 1 and 2 pretreatment in semi-continuous experiment.	90
Table 32: Characteristics of input wastewater sludge 1, wastewater sludge 2 and inoculums from BGP Šijanec for semi-continuous experiment with ultrasound.	90
Table 33: Characteristics of input substrates of dehydrated paper mill sludge from Paloma and pig slurry in experiment 13.	92
Table 34: Characteristics of anaerobic reactors at the end of experiment 2.	98
Table 35: Various measured parameters of samples from anaerobic reactors at the end of experiment 5 with standard deviations (Kolbl et al., 2014).	104
Table 36: Characteristics of anaerobic digesters amended with agricultural substrates at the end of experiment 7 with standard deviation.	110
Table 37: Biomethane potential and hydrolysis coefficient of wastewater sludge, green cuttings and their combinations relating to organic loadings, at the end of experiment with standard deviation.	127
Table 38: Biomethane potential, soluble COD concentration and hydrolysis coefficient of substrates from paper mill industry with combination of silo maize and organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) with standard deviation (Kolbl et al., 2014).	132
Table 39: Change in particle size of wastewater sludge 1 that contained 3,5 % TS as a function of specific energy.	139
Table 40: Change in particle size of wastewater sludge 2 that contained 1,1 % TS as a function of specific energy.	140
Table 41: Changes in reactors due to pretreatments with different hydrolytic enzymes.	162
Table 42: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP of combinations paper sludge from Kraft process, silo maize and biological wastes.	163
Table 43: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP of combinations wastewater sludge and biological wastes.	169
Table 44: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP from combinations of wastewater sludge and green cuttings.	169
Table 45: Measured and predicted response using STATISTICA for combinations of wastewater sludge and green cuttings for various combinations.	170
Table 46: The gradient in test set-up characteristics between published literature and those used in this dissertation with the purpose to provide on-site decision making support.	196

LIST OF GRAPHS

Graph 1:	Biomethane potential of prepared mixture from biogas plant mixing chamber with combination of straw pellets using 0,5 l AMPTS.	95
Graph 2:	Hydrolysis coefficient of straw pellets, silo maize from mixing chamber and their combinations in experiment 1.	96
Graph 3:	Biomethane potential of prepared mixture from biogas plant mixing chamber, corn meal and their combination using 0,5 l AMPTS with standard deviation.	97
Graph 4:	Hydrolysis coefficient of silo maize from mixing chamber, corn meal and their combinations in experiment 2.	98
Graph 5:	Determination of sufficient number of 250 ml flasks containing 3 M NaOH for efficient carbon dioxide stripping during maximum biogas production rates in 5 l reactors connected to AMPTS II equipment (Kolbl et al., 2014).	100
Graph 6:	The significant differences in particle size distribution of real scale aliquots for fully active Vucja vas biogas plant reactor before (NH) and after (H) mechanical treatment imposed for determination of mismatch in volumes of produced methane in 5 and 0,5 l AMPTS system, respectively (Kolbl et al., 2014).	101
Graph 7:	The resulting mismatch in volumes of produced methane from mechanically pretreated and real-scale aliquots as determined using 0,5 and 5 l AMPTS II equipment and normalized to 5 l real-scale particle size methane production (Kolbl et al., 2014).	102
Graph 8:	Biomethane potential of restaurant biological wastes A, B, C, D and G in experiment 5 with standard deviation.	103
Graph 9:	Hydrolysis coefficient of restaurant solid organic wastes in experiment 5 with standard deviation.	104
Graph 10:	Biomethane potential of industry wastes for biomethane production in experiment 6 where residues of fresh milled slaughterhouse bones is marked as OSMKK.	106
Graph 11:	Hydrolysis coefficient of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 with standard deviation. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.	106
Graph 12:	TS and VS of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.	107
Graph 13:	VOA, TAC and VOA/TAC of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.	107
Graph 14:	Total nitrogen, ammonium nitrogen concentrations and pH of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.	108
Graph 15:	BMP of substrates origin from agriculture in experiment 7 with standard deviation.	109
Graph 16:	Hydrolysis coefficient of substrates origin from agriculture in experiment 7.	109
Graph 17:	Specific methane yield produced in experiment 8 as a function of time from WWTP Šaleška valey amended with municipal wastewater sludge and treated with hydrolytic enzymes Novozymes and Micropan Biogas (Kolbl et al., 2014).	112

Graph 18:	Hydrolysis coefficient of WWS and WWS treated with hydrolytic enzymes Micropan Biogas and Novozymes.	113
Graph 19:	Specific methane yield produced in 5 l AMPTS II test as a function of time from BGP Šijanec inoculum amended with triticale and treated with hydrolytic enzymes Novozymes and Micropan Biogas (Kolbl et al., 2014).	113
Graph 20:	Hydrolysis coefficient of triticale and triticale treated with hydrolytic enzymes Micropan Biogas nad Novozymes.	114
Graph 21:	Cellulose, hemicelulose and lignin share in anaerobic reactors at the end of experiment 9, using inoculum from BGP Šijanec amended with triticale and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas.	115
Graph 22:	Normalized cellulose, hemicelulose and lignin share in anaerobic reactors at the end of experiment 9, using inoculum from BGP Šijanec amended with triticale and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas.	115
Graph 23:	Total solids (TS), volatile solids (VS) and pH in anaerobic pilot reactors at the end of 34 days experiment number 9.	116
Graph 24:	Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TIC) concentrations at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples from experiment with tritical are coloured yellow and marked with (T) and samples of experiment with wastewater sludge (B) are coloured red.	117
Graph 25:	Total nitrogen and ammonium nitrogen concentrations at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples from experiment with triticale are coloured yellow and marked with (T) and samples from experiment are coloured red with wastewater sludge with (B).	118
Graph 26:	Soluble COD concentrations before the start and at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples at the end of experiment with triticale are coloured yellow and have blue column and are marked with (T), samples of triticale and inoculum from BGP Šijanec before the start of experiment are marked yellow and have green columns. Samples marked with blue colour and blue columns are from experiment with wastewater sludge at the end of experiment (B), samples of wastewater sludge and inoculum from wastewater plant before the sta are coloured red with wastewater sludge with (B).	119
Graph 27:	Cumulative methane yield of biological wastes, wastewater sludge and their combination after 32 days with standard deviation.	122
Graph 28:	Hydrolysis coefficient of biological wastes, wastewater sludge and their combination as a function of time in experiment 9 with standard deviation.	122
Graph 29:	Total solids, volatile solids and pH in anaerobic pilot reactors amended with biological wastes, wastewater sludge and their combination after 32 days of experiment 9 with standard deviation.	123
Graph 30:	Volatile organic acids and total anorganic carbon concentrations after 32 days of experiment 9, using inoculum from WWTP Šaleška valey amended with WW sludge and biological waste and their combinations.	124

Graph 31:	Total nitrogen and ammonium nitrogen concentrations at the end of experiment 9, using inoculum from WWTP Šaleška valley amended with WW sludge and biological waste and their combinations with standard deviation.	124
Graph 32:	Cumulative methane yield of wastewater sludge, green cuttings (ZO) and their combinations based on organic loading ratios as function of time and given standard deviation.	126
Graph 33:	Total solids, volatile solids and pH of wastewater sludge, green cuttings and their combinations relating to their organic loading and glucose after 40 days with standard deviations.	127
Graph 34:	Volatile organic acids and total inorganic carbon concentrations and their ratio (HOK/CAO) of wastewater sludge, green cuttings and their combinations and glucose after 40 days in batch reactors. Green cuttings were marked with ZO.	128
Graph 35:	Total nitrogen, ammonium nitrogen and ammonia concentrations of reactors with wastewater sludge, green cuttings and their combinations after 40 days in batch reactors. Green cuttings were marked with ZO.	128
Graph 36:	Accumulated methane produced as function of time from various combinations of dehydrated wastewater sludge from Kraft process (marked as A), dehydrated wastewater sludge from Paloma (marked as B), maize silage (marked as C) and OFMSW (marked as D) in codigestion process. The background methane produced from control (inoculum) was subtracted generating negative values in inhibited reactors (Kolbl et al., 2014).	131
Graph 37:	Biomethane potentials in codigestion experiment of paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), OFMSW (D) and their various combinations (Kolbl et al., 2014).	131
Graph 38:	Total solids and volatile solids of anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.	132
Graph 39:	Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TAC) in anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.	133
Graph 40:	Total nitrogen, ammonia nitrogen and pH in anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.	134
Graph 41:	High variability in methane yields within substrate classes observed in published literature in comparison to methane yields obtained using novel 5 l AMPTS II equipment and different batches of substrates from the same substrate classes. The Graph numbers indicate the following substrates: 1 - secondary sludge of paper mill, 2 - silo maize, 3 - triticale, 4 - wheat bran, 5 - corn meal, 6 - slaughter house wastes, 7 - lysine, 8 - mycelium, 9 - brewing yeast, 10 - OFMSW, 11 - forage turnips, 12 - muscat pumpkin, 13 - Muscovy rotten pumpkin, 14 - sludge from municipal wastewater treatment plant (Kolbl et al., 2014).	135
Graph 42:	Concentrations of total phosphorus (TP), total nitrogen (TN), nitrate (NO_3^- -N), ammonium nitrogen (NO_4^+ -N) and Kjeldahl nitrogen (TKN) of wastewater	

sludge 1 and 2 before and after ultrasound pretreatment and before dosing to anaerobic digesters.	137
Graph 43: Particle size distribution of wastewater sludge 1 that contained 3,5 % TS as a function of ultrasound pretreatment time.	138
Graph 44: Particle size distribution of wastewater sludge 2 that contained 1,1 % TS as a function of ultrasound pretreatment time.	139
Graph 45: Disintegration degree (DD) and changes in soluble COD concentration of WWS-1 as a function of specific energy (SE).	140
Graph 46: Disintegration degree (DD) and changes in soluble COD concentration of WWS-2 as a function of specific energy (SE).	141
Graph 47: Temperature and pH variations of wastewater sludge 1 supernatant as a function of specific energy.	142
Graph 48: Temperature and pH variations of wastewater sludge 2 supernatant as a function of specific energy.	142
Graph 49: Phosphorus and nitrogen concentrations of wastewater sludge 1 supernatant as a function of specific energy.	143
Graph 50: Phosphorus and nitrogen concentrations of wastewater sludge 2 supernatant as a function of specific energy.	143
Graph 51: Daily methane yield of wastewaters sludge and ultrasonically pretreated wastewater sludges relating to organic loading of anaerobic digesters.	145
Graph 52: Cumulative methane yield of wastewater sludge and wastewater sludge pretreated with ultrasound.	146
Graph 53: Daily methane yield of nonpretreated and pretreated wastewater sludge with ultrasound and hydrolytic enzymes Novozymes relating to organic loading of anaerobic digesters.	147
Graph 54: Cumulative methane yield of wastewater sludge pretreated with ultrasound and hydrolytic enzymes Novozymes.	148
Graph 55: Changes in ammonia concentration in anaerobic reactors of non-pretreated and pretreated wastewater sludge with ultrasound and Novozymes enzymes in 40 day semi-continuous process.	149
Graph 56: Changes in ammonia (NH ₃) concentration in anaerobic reactors with combinations of non-pretreated and pretreated wastewater sludge with combination of ultrasound and Novozymes enzymes in 40 day semi-continuous process.	149
Graph 57: Volatile organic acids concentration in anaerobic reactors of experiment 12.	150
Graph 58: Concentration of total inorganic carbon (TIC) in anaerobic reactors of experiment 12.	151
Graph 59: Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TIC) ratio in anaerobic reactors of experiment 12.	151
Graph 60: Value of pH in anaerobic reactors of experiment 12	152
Graph 61: Daily methane yield relating to organic loading of dehydrated paper mill sludge from Paloma with and without enzymatic pretreatment with Novozymes, Novalin, Micropan Biogas and zeolit M.	154
Graph 62: Cumulative methane production relating to organic loading of dehydrated paper mill sludge from Paloma with and without enzymatic pretreatment with Novozymes, Novalin, Micropan Biogas and zeolit M.	155

Graph 63:	Variations in pH in reactors with and without enzymes pretreatment as a function of time.	157
Graph 64:	Variations in total nitrogen concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.	158
Graph 65:	Variations in ammonium nitrogen concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.	158
Graph 66:	Alkalinity changes in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.	159
Graph 67:	Variations in VOA concentrations in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.	159
Graph 68:	VOA/TAC ratio in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.	160
Graph 69:	Conductivity in anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes in experiment 13.	161
Graph 70:	Variations in soluble COD concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.	161
Graph 71:	Trace plot of estimated responses of BMP of Kraft process sludge, paper pulp sludge from Paloma, silo maize and biological wastes. At the intersection of the curves organic proportion of each substrate is 0,25.	164
Graph 72:	Mixture 3D surface plots maize of special cubic model for paper sludge from Paloma, biological wastes and silo maize regarding to fraction of organic matter of each substrate.	165
Graph 73:	Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of paper sludge from Paloma, biological wastes and silo maize regarding to fraction of organic matter of each substrate.	165
Graph 74:	Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture paper sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	166
Graph 75:	Overlaid contour plot of special cubic model for mixture paper sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	166
Graph 76:	Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture of silo maize, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	167
Graph 77:	Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of silo maize, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	167
Graph 78:	Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture of paper pulp sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	168
Graph 79:	Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of paper pulp sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.	168
Graph 80:	Variations in daily amount of different substrates used for anaerobic digesters in BGP Vučja vas.	172
Graph 81:	Daily variations in volatile solids of different substrates used in anaerobic digesters in BGP Vučja vas.	173
Graph 82:	Daily variations in total solids of different substrates used in anaerobic digesters in BGP Vučja vas.	174

Graph 83:	Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 1 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.	175
Graph 84:	Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 2 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.	176
Graph 85:	Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 3 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.	177
Graph 86:	Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 4 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.	178
Graph 87:	Daily variations of biogas level in gasholders on top of F1, F2, F3, F4, F5 and F6 of BGP Vučja vas.	179
Graph 88:	Daily biogas level in gasholders on top of KZ1 and KZ2 of BGP Vučja vas.	180
Graph 89:	Average daily electricity production from Nova1, Nova2, Nova 3, Nova 4 and average daily gas consumption of gas motors at BGP Vučja vas.	181
Graph 90:	Daily changes in TS, VS and pH in anaerobic digester F1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	183
Graph 91:	Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in anaerobic digester F1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	184
Graph 92:	Daily changes of TS, VS and pH in anaerobic digester F4 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	185
Graph 93:	Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in anaerobic digester F4 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	186
Graph 94:	Daily changes of TS, VS and pH in post digester KZ1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	187
Graph 95:	Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in post digester KZ1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	188
Graph 96:	Daily changes of TS, VS and pH in post digester KZ2 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.	189
Graph 97:	The relationship between microbial communities of bacteria through 45 days of continuous decomposition of sludge Paloma in 5 L AMPTS II with the addition of various enzymes (nonmetrical multi dimensional scaling (MDS-NM), index = Bray-Curtis, stress = 00:16 and 00:09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ and 0.82). The center line shows the relative influence of two factors, the addition of various enzymes and incubation time. Circumferential convex contours represent geometric shapes containing all points in time variants of a particular enzyme. (Legend of colors: red color: Paloma + Micropna Biogas, blue color: Paloma + zeolite IPUS M; pink: Paloma + Novozymes; Green: Paloma + Novalin, black color: inoculum; purple color: Paloma + Biofuture; fluorescent green color : Paloma). Yellow arrow shows the movement of microbial communities of bacteria through time.	192
Graph 98:	The relationship between microbial communities of archaea through 45 days of continuous decomposition of sludge Paloma in 5 L AMPTS II with the addition of various enzymes (nonmetrical multi dimensional scaling (MDS-NM), index = Bray-Curtis, stress = 00:16 and 00:09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ and 0.82). The center line shows the relative influence of two factors, the addition of various enzymes and incubation time. Circumferential convex contours represent geometric shapes containing all points in time variants of a particular enzyme. (Legend of colors: red color: Paloma + Micropna Biogas, blue color: Paloma +	

zeolite IPUS M; pink: Paloma + Novozymes; Green: Paloma + Novalin, black color: inoculum; purple color: Paloma + Biofuture; fluorescent green colour : Paloma).

1 UVOD

1.1 Splošno

Anaerobna presnova je zapleten biološki proces, ki poteka v odsotnosti kisika in pri katerem se organski material pretvori v bioplin (Pavlostathis, 2011). V vlažni atmosferi v odsotnosti kisika pride do razgradnje organskega materiala, ki ga aktivno presnavljajo različne skupine anaerobnih mikroorganizmov. V naravi pride do tvorbe metana v močvirjih, prebavnem traktu prežvekovalcev, pri mokrem kompostiranju in poplavljenih riževih poljih, globokomorskih izviroh in jezerih. Biomaso, ki je primerna za anaerobno presnovo, imenujemo substrat (Deublein and Steinhauser, 2010b).

Čistilne naprave imajo lahko največ stroškov z obdelavo in odlaganjem blata. Sveže blato sestavljata predvsem voda (do 96 %) in trdne snovi, ki nastanejo med čiščenjem odpadne vode. Surovo blato je bogato z organskim ogljikom, patogenimi organizmi, lahko pa vsebuje tudi težke kovine in druge okoljske onesnaževalce. Zato je blato pred varnim odlaganjem in nadaljnjo uporabo treba stabilizirati. Eden izmed načinov za stabilizacijo je anaerobna presnova (Yeow and Peng, 2012).

Anaerobna presnova kompleksnih organskih delcev poteka v več korakih in zajema vrsto vzporednih reakcij, ki jih lahko razdelimo na (i) hidrolizo, (ii) acidogenezo, (iii) acetogenezo in (iv) metanogenezo (Pavlostathis, 2011). V posameznih fazah sodelujejo različne skupine mikroorganizmov, ki so deloma v sintrofni medsebojni povezavi in za rast potrebujejo različne okoljske pogoje (Deublein in Steinhauser, 2010a). Hidroliza je zunajcelična encimsko posredovana stopnja, kjer pride do razgradnje delcev polimernih snovi substratov, ki jih anaerobni mikroorganizmi sami direktno ne morejo uporabiti, nastanejo monomeri. Pri acidogenezi ali fermentaciji pride do pretvorbe topnih monomerih derivatov substratov, kot so aminokisliline in sladkorji, nastanejo pa organske kisline in alkoholi. Pretvorba v veliki meri lahko poteka brez zunanjega prejemnika elektrona. Pri acidogenezi nastali produkti se pri acetogenezi razgradijo v acetat. Vodikov ion ali bikarbonat služita kot zunanji prejemnik elektrona. Ta proces je povezan s hidrogenotrofno metanogenezo, kjer se uporablja vodik ali format in pri čemer se vzdržuje nizka koncentracija vodika ali formata (karboksilnih kislin). Pri acetoklastični metanogenezi pride do pretvorbe acetata v metan in ogljikov dioksid (Batstone in Jensen, 2011).

Narava (npr. topni proti netopnim delcem) in kemijska sestava uporabljenih vhodnih substratov narekujeta delovanje procesov razgradnje in prav tako prisotnost vrst mikrobnih združb, ki pri tem sodelujejo. Pred hidrolizo pri anaerobni razgradnji vitalnih bioloških trdnih snovi, kot so alge in aktivno blato iz čistilnih naprav, je potrebna predhodna pretvorba, ki se imenuje smrt ali celična liza (Pavlostathis, 2011). Mikrobnice so po naravi odporne proti celični lizi, ki bi jo povzročile druge celice in so združene v kosme različnih velikosti (Batstone in Jensen, 2011).

Na učinkovitost procesa anaerobne presnove najbolj vpliva ravnotežje med kinetiko različnih bakterij, ki sodelujejo pri procesu. Hidroliza je počasen proces, ki je odvisen od narave neraztopljenih trdnih snovi (angl. particulate matter), ki tako determinirajo oziroma določajo počasnost kinetike celotnega procesa in časoven zamik pri zagonu procesa (Easton in Ferguson, 1981; Gujer in Zehnder, 1983; Li in Noike, 1987; cit po Tomei et al., 2009). Acidogeneza poteče za en hitrostni razred hitreje od metanogeneze, zato bi kakršnakoli motnja, ki bi zmotila metanogeno aktivnost, lahko imela negativen učinek na učinkovitost procesa. Ta problem je še toliko večji, saj so metanogeni mikroorganizmi zelo občutljivi na okoljske razmere (Tomei et al., 2009).

1.2 Namen in struktura doktorske naloge

Raziskave po svetu v zadnjih letih dokazujejo, da se s kemijsko, mehansko (fizikalno) in biološko predobdelavo substratov in njihovimi kombinacijami tvorba metana bistveno poveča (Kolbl et al., 2014; Lindmark et al., 2012; Menardo et al., 2012; Zhang in Banks, 2013). Čeprav je pozitiven vpliv predobdelav na pridobivanje metana očiten za nekatere substrate, neto razmerje med povečanjem tvorbe biometana in porabljenimi energijo za predobdelavo ni očitno, in je odvisno od številnih odločitev v industriji ter realnih parametrov substratov, kot so: vplivi predobdelav, vrsta substrata, letna nihanja v kemijskih lastnostih substratov, porazdelitev velikosti delcev, inhibitorni učinki nekaterih substratov, organska obremenitev in mešanje, karakteristike inokuluma, stroški postavitve naprav za mehansko mletje substratov, obratovalni, vzdrževalni in stroški obrabe opreme ter prihodki bioplinske elektrarne (Kolbl et al., 2014; Lindmark et al., 2012; Menardo et al., 2012; Zhang in Banks, 2013; Herrmann et al., 2012a; Herrmann et al., 2012b). Donosnost bioplinskih elektrarn (BPE) je omejena na konkretne primere, ki jih je težko posplošiti na zbrane podatke v literaturi, saj ti zajemajo različno modificirane substrate, ki so jim zmanjšali velikosti delcev ali jih kemično predobdelali in s tem posledično spremenili njihove lastnosti in energetske prirastek (Kolbl et al. 2014; Lauwers et al., 2013; Palmowski in Muller, 2003; Raposo et al., 2011). Zato za konkretne odločitve na bioplinskih potrebujemo podatke, ki izhajajo iz inokuluma konkretne bioplinske naprave in substrate v takem stanju in pogojih, kot se jih dozira v anaerobne reaktorje na realni bioplinski elektrarni (Angelidaki et al., 2009; Kolbl et al., 2014). Sistematične napake BMP testov ter pomanjkanje enotnosti in odvisnosti od več faktorjev omejuje njihovo uporabo na realnem modelnem merilu (Angelidaki et al., 2009; Izumi et al., 2010; Palmowski in Muller, 2000; Walker et al., 2009; Raposo et al., 2011; Kolbl et al., 2014). Prav tako so zaradi neenotnosti pri pripravi eksperimenta za določevanje BMP in razlik v zadrževalnem času, metanski donosi v kontinuiranem sistemu v splošnem manjši kot v šaržnih sistemih (Modhoo, 2012). Pri standardnih pristopih (Angelidaki et al., 2009; VDI-4630, 2006) za sestavo anaerobnih reaktorjev se biomasa in substrate predhodno obdela s filtracijo ali mletjem, kjer se velikost delcev znatno zmanjša, biomasa se tudi razredči in doda pufer (VDI-4630, 2006). Z odlaganjem bioloških odpadkov na deponije se soočamo z večjim številom okoljskih problemov, kot so tvorba metana, emisije smradu, mineralov in hranil, razmnoževanje različnih mikroorganizmov, insektov in številnih glodavcev ter ptic, ki lahko predstavljajo nevarnost za zdravje ljudi, nevarnost eksplozije in toksičnost za okolico (Pognani et al., 2009). Do sedaj je kompostiranje predstavljalo glavni način ravnanja z biološkimi odpadki. Biološki odpadki pa predstavljajo potencialni vir energije, ki ga lahko z biološkimi procesi pretvorimo v biometan in koristno uporabimo ter s tem povečamo delež energije iz obnovljivih virov. EU spodbuja čim večjo proizvodnjo električne energije iz obnovljivih virov, ki vključuje tudi uporabo bioloških odpadkov, zato je njihova uporaba in popularnost za pridobivanje bioplina v zadnjem času v porastu (Pognani et al., 2009; Gunaseelan, 2004). V Nemčiji na 120 BPE od skupno 7500 BPE uporabljajo kot substrat ali kosubstrat biološke odpadke, v Sloveniji sta taki 2 (Lorenz et al., 2013). Pod pojmom kofermentacija definiramo anaerobno presnovo dveh substratov, ki ju oba doziramo v isti anaerobni reaktor, z namenom, da izboljšamo učinkovitost anaerobne presnove in izboljšamo produkcijo energije. Na področju kmetijstva so take naprave že stalnica, v zadnjem času pa se gradijo BPE, kjer kot kombinacijo substratov uporabljajo odpadno blato in ostanke hrane, čeprav je anaerobna presnova ostankov hrane zahteven proces, kjer so v veliko primerih morali proces prilagoditi z dodajanjem kemikalij, substrate predhodno obdelati in/ali povečati temperaturo v anaerobnih reaktorjih (Iacovidou et al., 2012). Med biološko razgradljive substrate spada tudi del odpadkov iz različnih vrst industrije, kot sta papirna industrija in farmacevtska industrija, kjer kot stranski produkt nastane papirniško blato, ki vsebuje veliko celuloze in micelij gliv iz reaktorjev proizvodnje zdravil (farmacija). Papirniško blato in micelij gliv prav tako lahko uporabimo kot kosubstrata v procesu anaerobne presnove.

Procesa anaerobne presnove blata iz komunalnih čistilnih naprav in lignoceluloznih substratov za pridobivanje bioplina smo se lotili sistematično. Hipoteze, ki smo jih postavili, so naslednje:

- 1) Ho: Mehanske in encimske predobdelave lignoceluloznih substratov nimajo učinka.
H1: Predpostavljamo, da lahko z ustreznimi kombinacijami mehanskega mletja in dodajanja encimov lignoceluloznim substratom izboljšamo učinkovitost anaerobne presnove, v primerjavi z uporabo samo ene izmed metod predhodne obdelave.
- 2) Ho: Mehanske in encimske predobdelave substratov blata čistilnih naprav nimajo učinka.
H1: Predpostavljamo, da lahko s kombinacijo ultrazvoka in dodajanja encimov blatu iz čistilnih naprav izboljšamo učinkovitost anaerobne presnove v primerjavi z uporabo samo ene izmed metod predhodne obdelave.
- 3) Ho: Mehanske in encimske predobdelave substratov obeh skupin in kombinacij nimajo vpliva na mikrobne združbe bakterij in arhej.
H1: Predpostavljamo, da dodajanje encimov vpliva na strukturo bakterijske ne pa arhejske mikrobne združbe na laboratorijskem velikostnem in časovnem modelu eksperimentov.

Doktorsko nalogo smo razdelili na teoretski del, ki je predstavljen v poglavju 2 Teorija procesa anaerobne presnove. Tu smo opisali delovanje procesa anaerobne presnove, lignocelulozne substrate, blato iz čistilnih naprav, pregledali predobdelave za anaerobno presnovo in dosedanje raziskave na tem področju. Tehnike, ki smo jih uporabili za merjenje različnih parametrov in sestavljanje anaerobnih eksperimentov pri določevanju biometanskega potenciala (BMP) in spremljanja dnevne tvorbe metana v semi-kontinuiranih anaerobnih reaktorjih, so predstavljene v poglavju 3 Materiali in metode. Tu so opisane metode sestavljanja eksperimentov št.1 do št.13 z uporabo AMPTS II in meritve parametrov posameznih poskusov. Določevali in izmerili smo naslednje parametre: vsebnost suhe snovi (SS), organske snovi (OS), pH, hlapne organske kisline (HOK), celotni anorganski ogljik (CAO), celotni dušik (N_{celotni}), amonijski dušik ($\text{NH}_4^+ \text{-N}$), fosfor (P), kemijsko potrebo po kisiku (KPK), velikost delcev in mikrobno združbo. Skupno smo izvedli eksperimente na več kot 25 substratih, ki smo jih razdelili v sklope glede na velikostno modelno merilo AMPTS-ja (0,5 l in 5 l) in glede na šaržni ali semi-kontinuirani sistem, kar je prikazano v preglednici 15 v poglavju 3.11 Priprava eksperimentov za anaerobno presnovo na 0,5 l in 5 l modelnem merilu. Disertacijo smo razdelili na poglavja: 4 Rezultati in diskusija raziskav glede na sklope eksperimentov, rezultati in diskusija spremljanja delovanja BPE Vučja vas, rezultati analize mikrobne združbe in 5 Zaključek, 6 Literatura ter 7 Priloge.

Hidrolitske encime, kot pospeševalce prve stopnje anaerobne presnove, smo dodajali v šaržni in semi-kontinuirani sistem, kjer smo kot substrate uporabili blato iz ČN, tritikalo in blato iz papirniške industrije Paloma. Pri semi-kontinuiranem procesu na 5 l pilotnem modelnem merilu z blatom iz ČN smo kot predobdelavo ob encimih uporabili še ultrazvok in spremljali dnevno tvorbo metana. Lastnosti in vrsta uporabljenih encimov v naših eksperimentih so podani v Prilogi C.

Na BPE Vučja vas, ki za delovanje uporablja energetske rastline, prašičjo gnojevko in kravji gnoj, smo spremljali tvorbo bioplina. Pri obratovanju bioplinske elektrarne so se zaradi sušnih razmer soočili s pomanjkanjem koruzne silaže, zato so kot hrano mikroorganizmom v anaerobnih reaktorjih uporabili raznolike substrate kot so koruzni šrot, oljčne tropine, micelij in vinjaso. Preverili smo, kako je takšna dinamična sprememba doziranja različnih substratov vplivala na tvorbo biometana na industrijskem modelnem merilu.

Zelo finega mehanskega mletja z uporabo krogličnih mlinov v eksperimentih na industrijskem modelnem merilu nismo uporabili, saj smo s preučevanjem najnovejše ter najaktualnejše objavljene

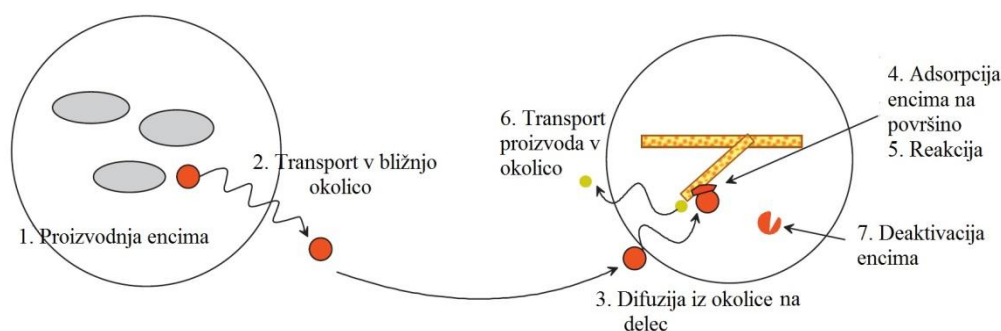
literature in tekom naših eksperimentov ugotovili, da mehanska predobdelava sicer pospeši proces anaerobne presnove, poveča koeficient hidrolize in posledično hidrolizo (Herrmann et al., 2012a; Herrmann et al. 2012b; Hendriks in Zeeman, 2009), vendar opravljene ocene iz industrije kažejo, da mehanska predobdelava pod neko mejo velikosti delcev ni ekonomsko vzdržen proces na industrijski velikosti (Herrmann et al. 2012b). Za realno oceno razmerja med povečano tvorbo metana in porabo energije za predobdelavo bi potrebovali že delujoči sistem na realni industrijski velikosti. Zaradi suše v zadnjih dveh letih, kar je pripomoglo k pomanjkanju substratov na BPE Vučja vas in posledično slabšega ekonomskega položaja BPE, tega dela nismo uspeli pokriti, čeprav je v načrtu bila postavitve naprave za mehansko predobdelavo substratov in biološka predobdelava vhodnih substratov z dodajanjem encimov. Prav tako nismo mogli izvesti ekonomske analize naših predobdelav in jih prenesti na realno modelno merilo, saj so odstopanja, ki se pojavijo zaradi modifikacije uporabljenih substratov, inokuluma in izvajanja meritev na precej manjšem modelnem merilu, ter učinkovitosti mehanskih aparatov za predobdelavo substratov, ki so uporabljene na realnem modelnem merilu in v laboratoriju, prevelika kot to navajajo tudi drugi avtorji (Perez-Elvira et al., 2009). Tako so na primer ultrazvočne sonde na laboratorijskem modelnem merilu manj učinkovite kot na realnem modelnem merilu, prav tako pa se na realnem modelnem merilu za predobdelavo z ultrazvokom uporabi le en del substrata, drugi del ostane neobdelan, z namenom, da se zmanjšajo stroški in poveča zmožnost dehidracije blata (Perez-Elvira et al., 2009).

2 TEORIJA PROCESA ANAEROBNE PRESNOVE

2.1 Hidroliza

Hidroliza je izraz, ki se nanaša na raztapljanje trdnih delcev (particulate materials). Snov lahko štejemo med mešanico osnovnih komponent (ogljikovi hidrati, proteini in maščobe), ali med kompozitno zmes (npr. homogeni material, kot je aktivno blato in kvas). Obstajajo tri glavne poti encimske hidrolize (Batstone in Jensen, 2011):

1. Mikroorganizmi izločajo encime v tekočino, kjer se ti adsorbirajo na delce ali reagirajo s topnimi substrati.
2. Mikroorganizmi se pritrdijo na delce in izločajo encime v svoji neposredni bližini.
3. Mikroorganizem ima pripet encim, ki se lahko podvoji kot transportni receptor v notranjost celice. Pri tem se mora mikroorganizem adsorbirati na površino trdnega delca.



Slika 1: Koraki pri encimski hidrolizi (Batstone in Jensen, 2011).

Figure 1: Steps in enzymatic hydrolysis (Batstone and Jensen, 2011).

Na sliki 1 so prikazani koraki zunajcelične hidrolize. V koraku 1 se proizvajajo encimi. Njihova hitrost tvorbe lahko upade, če je na voljo preveč topnega substrata. V koraku 2, 3 in 6 so prikazani transportni procesi, ki so lahko omejeni zaradi večjih delcev, v sistemih s trdno fazo pa zaradi nezadostnega prenosa tekočine. Adsorpcije encima na površino pride v koraku 4. Procesu adsorpcije so omejeni s površino, ki je na voljo, medtem ko so hitrosti reakcij v koraku 5 omejene s površino in koncentracijo encimov. Do deaktivacije encimov lahko pride, če temperatura in pH nista optimalna (Batstone in Jensen, 2011).

2.1.1 Hidroliza ogljikovih hidratov

Ogljikovi hidrati neposredno ali posredno izvirajo iz rastlin. V splošnem je rastlinski material mešanica celuloze (25–60%), hemiceluloze (15–30%) in lignina (15–20%). Lignocelulozni substrati, ki so sestavljeni iz celuloze, hemiceluloze in lignina, predstavljajo organski material, ki ga je v svetovnem merilu v izobilju. Zaradi njegove obnovljive narave se je zanimanje za njegovo izkoriščanje z leti povečalo. Pri razgradnji lignoceluloze je razgradnja lignina hitrostno omejen korak, predvsem zaradi njegove velike obstojnosti. S predobdelavo je lignin treba ločiti od ogljikovih hidratov, ki tako postanejo biološko dostopnejši. Hidroliza celuloze poteka s pomočjo zunajceličnih encimov (celulaz), kot produkt pa nastane celobioza (dimer glukoza) in glukoza. Pentoze, heksoze in uronska kislina so produkti hidrolize hemiceluloze (Pavlostathis, 2011). Ogljikovi hidrati dolgih verig,

ki so prisotni v netopnih strukturah, kot so na primer celuloza, hemiceluloza in škrob, v procesu hidrolize razpadejo na sladkorje kratkih verig (Deublein in Steinhauser, 2010a). Pretvorba lignina s pomočjo anaerobnih bakterij ni znana, visoka vsebnost lignina (skupaj s kristalno celulozo) v splošnem preprečuje hidrolizo spodaj ležečega celuloznega materiala (Yang et al., 2009; cit. po Batstone in Jensen, 2011).

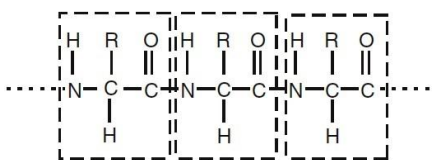
2.1.2 Hidroliza proteinov

Proteini so naravni polimeri različnih aminokislin, ki so med sabo povezane s peptidnimi (amidnimi) vezmi. Hrbtenica proteina je sestavljena iz ponavljajočega se zaporedja enega dušikovega in dveh ogljikovih atomov. V naravi lahko najdemo 20 različnih aminokislin, ki se razlikujejo glede R skupine, ki določa oziroma definira funkcijo aminokislina. Protein ima tri strukturne sestavine (Batstone in Jensen, 2011):

- Sestava aminokislin in zaporedje (primarna struktura).
- 3D oblika, ki jo določajo koti vezi in spiralna oblika vodikovih vezi pri kompleksnih proteinih. V tem primeru gre za sekundarno strukturo.
- Terciarno strukturo definirajo oblike makromolekul, ki se vežejo med di-sulfit skupine, v manjšem obsegu med ostale inter-R vezi.

Za hidrolizo proteinov sta pomembni primarna in terciarna struktura. Sestava aminokislin (primarna struktura) vpliva na produkte. Terciarna struktura definira proteine kot fibrozne (vlaknaste) ali kroglaste. Med vlaknaste proteine prišteva strukturne materiale, kot sta keratin in kolagen. Kroglasti proteini so pogosto kemično dejavni in delujejo kot encimi, hormoni, transportni proteini ali shranjevalni proteini (Batstone in Jensen, 2011). Struktura proteinov je eden izmed glavnih dejavnikov, ki vplivajo na hitrost hidrolize. Hidroliza kroglastih proteinov bo potekla zelo hitro, medtem ko je vlaknaste proteine zelo težko hidrolizirati (McInerney, 1988, cit. po Batstone in Jensen, 2011).

Proteini s pomočjo zunajceličnih proteaz hidrolizirajo v polipeptide in aminokislina (Deublein in Steinhauser, 2010a; Pavlostathis, 2011) Zunajcelične proteaze, znane tudi kot proteinaze, napadejo cel protein (beljakovino), medtem ko znotrajcelične proteaze, imenovane tudi peptidaze odrežejo aminokislina na koncih proteinov ali polipeptidov. Na hitrost in obseg razgradnje in hidrolize proteinov vplivajo topnost, tip terminalne skupine skeleta, terciarna struktura in pH (Pavlostathis, 2011).



Slika 2: Veriga proteina z aminokislinami, povezanimi z amidnimi skupinami (Batstone in Jensen, 2011).

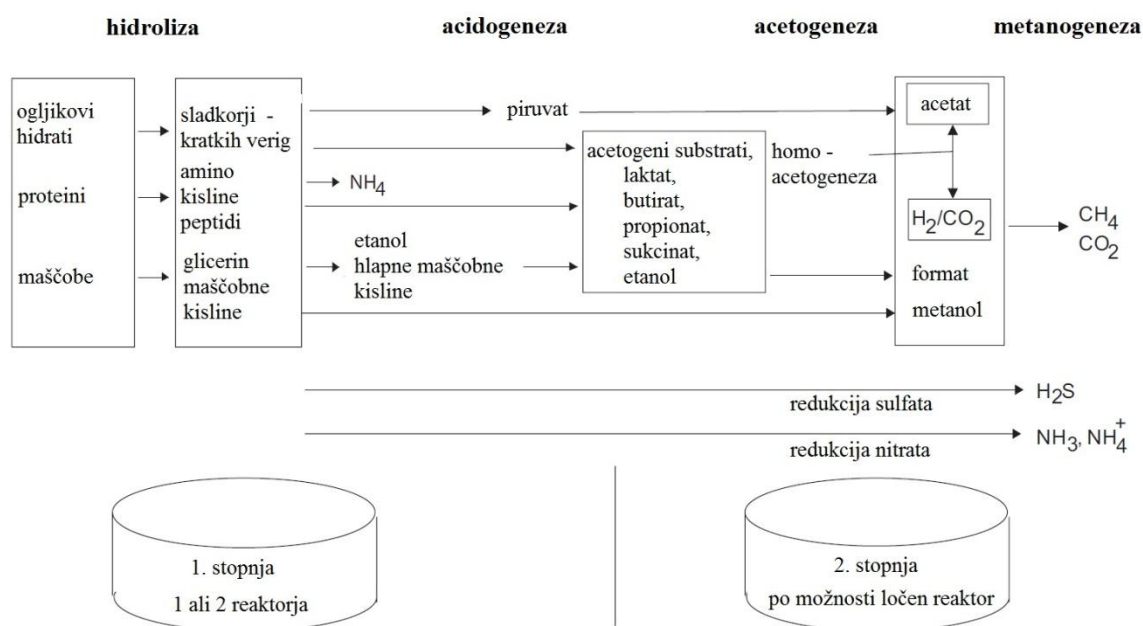
Figure 2: Protein chain with amino acids linked by amide groups (Batstone and Jensen, 2011).

2.1.3 Hidroliza lipidov

Lipidi so gliceroli, vezani na dolgoverižne molekule maščobnih kislin, alkohole in ostale skupine z estrsko ali etrsko vezjo (Batstone in Jensen, 2011). Pri hidrolizi lipidov se najprej z esterazami

(lipazami) maščobe razgradijo na komponente dolgoveržnih maščobnih kislin, galaktoze in glicerol (Pavlostathis, 2011; Deublein in Steinhauser, 2010a). Lipaze delujejo na mejni ploskvi lipid-voda in pomagajo razgraditi netopne reaktante v topne produkte (Batstone in Jensen, 2011). Pri popolni hidrolizi fosfolipidov nastanejo glicerol, fosforjeva kislina in dve maščobni kislini (Pavlostathis, 2011).

Hidroliza ogljikovih hidratov poteče v nekaj urah, hidroliza proteinov in lipidov pa v nekaj dneh. Lignoceluloza in lignin se razgrajujeta počasi, njuna razgradnja je nepopolna (Deublein in Steinhauser, 2010a).



Slika 3: Biokemija pri tvorjenju bioplina (Deublein in Steinhauser, 2010a).

Figure 3: Biochemistry of the methane gas production (Deublein and Steinhauser, 2010a).

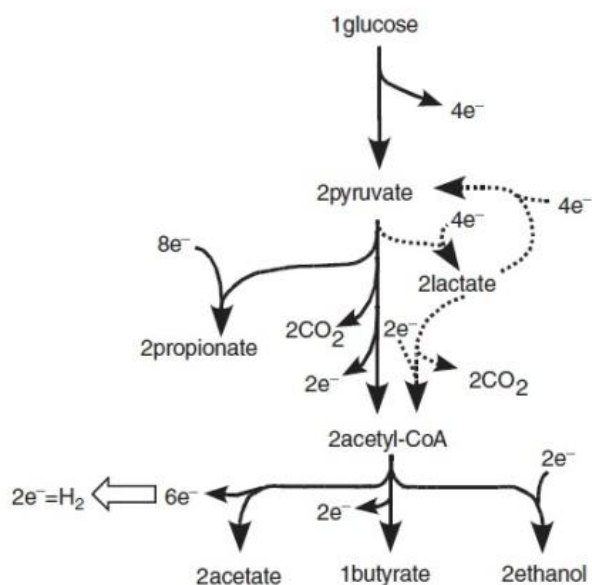
2.2 Acidogeneza (fermentacija)

Produkti, ki so nastali pri hidrolizi (maščobne kisline kratkih verig, aminokisline, maščobne kisline in glicerol), se v fazi acidogeneze s pomočjo različnih fakultativnih in obligatnih bakterij razgradijo v organske kisline kratkih verig, C₁-C₅ molekule (npr. maslena kislina, propanojska kislina, acetat, očetna kislina), alkohole, dušikov oksid, vodikov sulfid, vodik, ogljikov dioksid in amonijak (Pavlostathis, 2011; Deublein in Steinhauser, 2010a). Koncentracija vmesnega formiranja vodikovih ionov vpliva na vrsto fermentacijskih produktov (Deublein in Steinhauser, 2010a). Pri tem organske sestavine služijo kot donatorji in prejemniki elektrona. Hlapne maščobne kisline dolgih verig in alkohol anaerobno oksidirajo v hlapne maščobne kisline, vodik in ogljikov dioksid (Pavlostathis, 2011).

2.2.1 Acidogeneza (fermentacija) ogljikovih hidratov

Ogljikovi hidrati (sladkorji), kot je glukoza, se razgradijo v piruvat, ki se s pomočjo mikroorganizmov *Lactobacillales* pretvori v mlečno kislino (lactic acid), s pomočjo kvasovk pa v etanol (Deublein in Steinhauser, 2010a). Ogljikovi hidrati fermentirajo po Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) poti v piruvat

nato pa v C3 produkte (propionat, laktat) ali C2-C6 produkte preko acetyl-CoA, kot je prikazano na sliki 4 (Batstone in Jensen, 2011). Mešanice produktov, ki nastanejo, so odvisne od okoljskih razmer, pH, koncentracije vodika v plinski fazi, temperature in zadrževalnega časa biomase. Predvideva se, da so reakcije bogate z vodikom (tvorba acetata) pospešene pri nižjih koncentracijah vodika, produkcija alkoholov pa je pospešena pri nizkem pH (Batstone in Jensen, 2011). Tvorba C3 produktov je redka, do njihovega tvorjenja pride pri preobremenitvi in so kot taki dokazani inhibitorji organske preobremenitve. Najbolj pogosti produkti so acetat, butirat in etanol, odpadni ogljik se pretvori v ogljikov dioksid, odvečni elektroni pa v vodikov plin (Angelidaki et al., 2011).



Slika 4: Glavni produkti fermentacije ogljikovih hidratov. Višek elektronov je odstranjen kot vodik (H_2) (Batstone in Jensen, 2011).

Figure 4: Major products from C6 monosaccharide fermentation. Excess electrons are removed as hydrogen as shown (Batstone and Jensen, 2011).

2.2.2 Acidogeneza aminokislin

Razgradnja aminokislin lahko poteka preko direktne oksidacije ali s fermentacijo v parih vzdolž začrtane poti, ki jo imenujemo Stricklandova reakcija. Njene lastnosti so naslednje (Batstone in Jensen, 2011):

- Aminokislina se razgrajuje v parih.
- Ena aminokislina iz para deluje kot sprejemnik elektrona, druga kot donator elektrona.
- Donatorska aminokislina oksidira v amonijak (NH_3), ogljikov dioksid in karboksilno kislino, katere dolžina verige je krajša za en ogljikov atom kot originalna kislina, ki je darovala elektron.
- Aminokislina, ki je sprejela elektron, se reducira v amonijak (NH_3) in karboksilno kislino, katere dolžina verige je enaka kot izvirne aminokislina.
- Aminokislina so lahko tudi prejemnice elektronov, donatorji elektronov ali oboje.
- V splošnem je pri aminokislinah, ki jih najdemo v proteinih, 10% primanjkljaj aminokislin, ki so prejemniki elektronov.

Pri razgradnji aminokislin, ki se razgrajujejo v parih, sodelujejo *Clostridium botulinum*, kjer ena aminokislina služi kot donator vodika, druga pa kot sprejemnik elektrona. Pri tem nastanejo acetat, amonijak in ogljikov dioksid. Pri razdelitvi cisteinov se sprošča vodikov sulfid (Deublein in Steinhauser, 2010a).

Preglednica 1: Hlapne kisline, ki jih najdemo v procesih anaerobne presnove (Gerardi, 2003b).

Table 1: Volatile fatty acids that can be found in anaerobic digestion processes (Gerardi, 2003b).

Hlapne kisline	Kemijska formula	Tališče (°C)	Vrelišče (°C)
Metanojska (mravljična) kislina	H-COOH	+8	100
Etanojska kislina (ocetna)	H ₃ C-COOH	+17	118
Propanojska (propionska) kislina	H ₃ C-CH ₂ -COOH	-20	141
Butanojska (maslena) kislina	H ₃ C-CH ₂ -CH ₂ -COOH	-5	166
Pentanojska (valerianska) kislina	H ₃ C-(CH ₂) ₃ -COOH	-35	187
Heksanojska (kapronska) kislina	H ₃ C-(CH ₂) ₄ -COOH	-3	205

2.3 Acetogeneza

Produkti, ki so nastali v prejšnji fazi acidogeneze, v acetogenezi služijo kot substrati za acetogene bakterije (Deublein in Steinhauser, 2010a).

Preglednica 2: Acetogena razgradnja osnovnih elementov (Deublein in Steinhauser, 2010a).

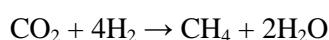
Table 2: Acetogenesis of basic elements (Deublein and Steinhauser, 2010a).

Kemijsko ime	Sinonim	Kemijska reakcija
Ogljikov dioksid/vodik	-	$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$
Metanojska (format)	Mravljična kislina	HCOOH
Etanojska (acetat)	Ocetna kislina	CH ₃ COOH
Propanojska (propionat)	Propionska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CO}_2 + 3\text{H}_2$
Butanojska (butirat)	Maslena kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$
Pentanojska	Valerenska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} + 2\text{H}_2$
Izopentanojska	Izovalerinska kislina	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH} + \text{HCO}_3\text{H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2$
Heksanojska	Kapronska kislina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_3\text{COOH} + 5\text{H}_2$
Glicerin	-	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 3\text{H}_2 + \text{CO}_2$
Laktat	Mlečna kislina	$\text{CH}_3\text{CHOHCOOH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$
Etanol	-	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2$

Organske kisline in alkoholi se z anaerobno oksidacijo pretvorijo v acetat (organske snovi z lihimi številom v verigi v propionat). Vodikovi ioni se porabijo za proizvodnjo vodika v plinski obliki, bikarbonatni ioni pa za proizvodnjo formata (Batstone in Jensen, 2011). Pretvorba dolgoveriznih maščobnih kislin poteka po β-oksidacijski poti. Vodik in ogljikov dioksid se s pomočjo homoacetogenih bakterij pretvorita v acetat (Pavlostathis, 2011).

2.4 Metanogeneza

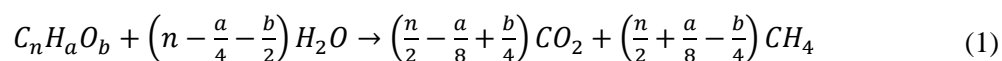
Do tvorbe metana v strogo anaerobnih pogojih pride v četrti fazi, ki se imenuje metanogeneza. Ogljik, ki se nahaja v biomasi, se pretvori v ogljikov dioksid (v vodi raztopljen kot HCO_3^-) in metan (Deublein in Steinhauser, 2010a). Pri metanogenezi ločimo dva mehanizma tvorjenja metana: (i) razkroj očetne kisline in (ii) redukcija ogljikovega dioksida. Ob odsotnosti vodika se pri razkroju očetne kisline ustvari metan in ogljikov dioksid. Metilna skupina (CH_3^-) očetne kisline se reducira (razpade) v metan, medtem ko karboksilna skupina (COOH) oksidira v ogljikov dioksid. Ko je vodik na razpolago, se metan ustvari iz redukcije ogljikovega dioksida. CO_2 je prejemnik vodikovih atomov, ki so bili s pomočjo encimov odstranjeni iz organskih zmesi. Ker je ogljikovega dioksida v anaerobnem reaktorju vedno v izobilju, njegova redukcija v metan ni omejujoči faktor v procesu. Tvorba metana iz redukcije ogljikovega dioksida je naslednja (Chernicharo, 2007):



Metan, ki se ustvari v procesu anaerobne presnove, se hitro loči iz tekoče faze zaradi nizke topnosti v vodi (Bunsenov koeficient). Posledično, ko plin preide oz. zapusti tekoči del biomase in preide v plinasto fazo, je zaradi tega stopnja razgradnje tekočih odpadkov večja. Za razliko od metana je ogljikov dioksid v vodi 100 krat bolj topen in le del preide v plinasto fazo, del pa ga ostane raztopljenega v biomasi (Chernicharo, 2007).

Če tvorba metana poteka brez problemov, odvisno od pH, ionske sestave, mikrobnih procesov, največkrat tudi acetogena faza poteka brez zapletov. Ko je tvorba metana motena, to vodi do zakisanja (Deublein in Steinhauser, 2010a). Do motenj v procesu lahko pride, ko acetogene bakterije namesto z metanogenimi mikroorganizmi živijo v simbiozi z ostalimi mikroorganizmi in porabljajo vodik. Pri čiščenju odpadne vode nastane simbioza med mikroorganizmi, ki reducirajo sulfat v vodikov sulfid. Tako metanogene arheje s sulfat reducirajočimi mikroorganizmi tekmujejo za vodik. Posledično lahko metanogeni dobijo manj vodika in proizvedejo manj metana, nastajajo pa reducirane oblike žvepla. Vodikov sulfid, ki nastaja iz sulfata, pa je za metanogene mikroorganizme toksičen. V fazi metanogeneze 27 % do 30 % metana izhaja iz redukcije ogljikovega dioksida in 70 % iz acetata (Deublein in Steinhauser, 2010a).

Teoretično lahko metanski potencial izračunamo s pomočjo Bushwellove formule (Møller et al., 2004):



2.5 Bakterije pri anaerobni presnovi in predobdelava z encimi

Bakterije, ki jih najdemo pri procesih čiščenja odpadne vode, so razdeljene v skupine glede na odzive (Gerardi, 2003a):

- Odziv na proste molekule kisika
 - *Striktne aerobi* (razgradijo substrat ob prisotnosti prostih molekul kisika).

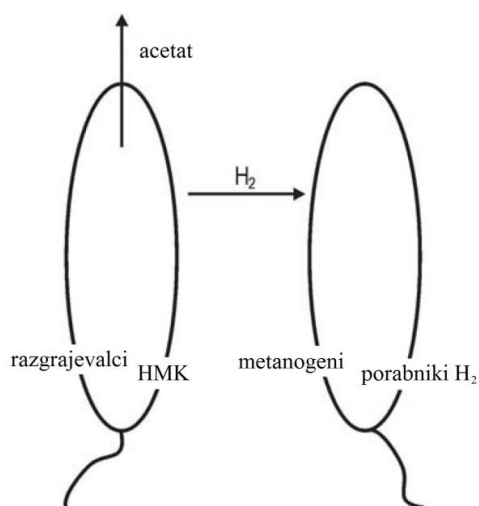
- **Fakultativni anaerobi** (Če je prisoten prosti kisik, ga uporabijo za encimsko aktivnost in razgradnjo snovi, če pa ni prisoten prosti kisik, uporabijo nitratni ion (NO_3^-) za razgradnjo snovi, pri čem pride do denitrifikacije in se proizvaja plin didušik (N_2)).
- **Anaerobi in metanogene arheje:**
 - Tolerantni na kisik
 - Netolerantni na kisik
- Encimsko sposobnost razgradnje substrata v anaerobnem reaktorju.

Kakšne produkte bomo imeli pri fermentaciji je odvisno predvsem od prisotnih bakterij. Spremembe v obratovanju, ki vplivajo na spremembe prevladujočih bakterij, vplivajo tudi na spremembe koncentracij kislin in alkoholov, ki se proizvajajo med fermentacijo. Te spremembe v koncentraciji kislin in alkoholov močno vplivajo na substrat, ki ga uporabljajo metanogene arheje, na njihovo aktivnost in na delovanje procesa anaerobne presnove (Gerardi, 2003a).

Pri anaerobni presnovi nastopajo 3 glavne skupine anaerobnih mikroorganizmov (Ahring, 2003):

1. Hidrolitske fermentativne bakterije (hidrolizirajo in pretvorijo organske sestavine v hlapne maščobne kisline (VFA) in sočasno proizvajajo vodik (H_2) in ogljikov dioksid (CO_2),
2. Acetogene bakterije (pretvorijo hlapne maščobne kisline v očetno kislino (CH_3COOH),
3. Metanogene arheje (iz acetata (CH_3COOH) ali iz vodika (H_2) in ogljikovega dioksida (CO_2) proizvajajo metan (CH_4).

Hidrolizni in fermentacijski mikroorganizmi so odgovorni za začetno razgradnjo polimerov in monomerov, ki se nahajajo v odpadnem materialu (substratu). Proizvajajo predvsem acetat (CH_3COOH) in vodik (H_2), količina hlapnih maščobnih kislin pa niha (propionat, butirat) (Ahring, 2003).



Slika 5: Medvrstni prenos vodika (Ahring, 2003).

Figure 5: Interspecies hydrogen transfer (Ahring, 2003).

Obligatorne acetogene bakterije, ki proizvajajo vodik, pretvorijo propionat in butirat v acetat in vodik. Nato dve skupini metanogenih bakterij *Archaea* iz acetata ali vodika proizvajata metan. Obligatorne acetogene bakterije so odvisne od aktivnosti metanogenih bakterij (odstranjevanje vodika), saj mora biti metabolizem obligatornih acetogenih bakterij termodinamsko mogoč, ker so njihove reakcije endergone (nespontana reakcija; kemijska reakcija, kjer je sprememba v prosti energiji pozitivna, energija se absorbira). Reakcije stečejo, če je vsebnost vodika pod določeno koncentracijo. Zvezo med

obligatornimi acetogenimi bakterijami, ki razgradijo hlapne maščobne kisline (HOK) in metanogenimi bakterijami, ki za tvorbo metana porabljajo vodik, imenujemo sintrofija, proces pa se imenuje medvrstni prenos vodika (Ahring, 2003).

Sintrofne zveze so pomembne pri pretvorbi acetata, ko je delovanje metanogenih bakterij zavrtlo zaradi visoke koncentracije amonijaka ali sulfida. Pri visoki koncentraciji amonijaka je rast metanogenih bakterij zavrtla, zato jih zamenja druga skupina mikroorganizmov – hidrolizni in fermentacijski mikroorganizmi, ki pridobijo energijo z oksidacijo acetata v vodik (H_2) in ogljikov dioksid (CO_2) (Ahring, 2003).

Bakterije razgradijo substrat s pomočjo encimov. Encimi so beljakovinske molekule, ki katalizirajo (pospešijo) biokemijske reakcije (Quiñones et al., 2012; Gerardi, 2003a). Pri razgradnji substratov sodelujeta dve vrsti encimov (Gerardi, 2003a):

- Endoencimi
- Eksoencimi

Endoencimi se proizvajajo v notranjosti celic. Njihova funkcija je razgradnja topnih substratov znotraj celice. Eksoencimi se prav tako proizvajajo znotraj celice. Celico obdaja sluzast ovoj, na katerega so pritrjeni netopni substrati. Preko tega sluzastega ovoja eksoencimi ob kontaktu z netopnimi substrati razgradijo trdne in koloidne delce. Tako lahko razgrajeni substrati do monomerov vstopijo v celico, kjer se s pomočjo endoencimov razgradijo. Tvorba eksoencimov in raztapljanje trdnih ter koloidnih delcev po navadi traja nekaj ur. Vse bakterije proizvajajo endoencime, ne pa tudi eksoencimov. Prav tako lahko vsak eksoencim in endoencim razgradi samo določene substrate ali skupino substratov. Zato je za razgradnjo prisotnih substratov potrebna široka in raznolika bakterijska združba, ki zagotovi primerne vrste encimov (Gerardi, 2003a).

Encimi so zelo selektivni glede izbire substrata in reakcije, ki jo katalizirajo. Obstajajo snovi, ki lahko inhibirajo tvorjenje kompleksa encim – substrat. To naredijo z blokiranjem območja, kjer se substrat pritrdi ali pa se povežejo na različna območja in onemogočajo vezavo substrata (Quiñones et al., 2012).

V vseh fazah razgradnje sodelujeta vrsti *Acetobacter* in *Eubacterium*. Nekatere so homoacetogene (CO_2 reducirajo v acetat in so striktno anaerobni organizmi, ki lahko rastejo kot litotrofi ali kot organotrofi), ki npr. pretvorijo CO_2 in/ali monomere ogljikovih hidratov preko acetyl-CoA poti. Obstajajo indici, da homoacetogene bakterije sodelujejo tudi pri drugih metabolnih procesih, npr. pri delitvi aromatskega obroča substituiranih aromatskih spojin in/ali pri raztapljanju struktur, ki so podobne ligninu (Deublein in Steinhauser, 2008).

Rod *Acetobacterium* zmanjša koncentracijo avtotrofnih polimernih spojin, oligomere in monomere ali CO_2 . Pri tem vodik nastopa kot vir elektrona. Služijo kot partner pri dajanju vodika in omogočijo razgradnjo maščobnih kislin in aromatskih spojin. Pri rodu *Eubacterium* kot stranski produkt presnove nastane butirat. Veliko vrst je sposobnih razgraditi kompleksne substrate preko specialnih poti. Nekatere vrste so avtotrofi, saj so neodvisni od drugih organizmov in lahko svojim energetskim potrebam zadostijo sami, kot edini vir razpoložljivega ogljika pa jim služi CO_2 . V prvi in drugi fazi anaerobne presnove sodeluje vsaj 128 redov mikroorganizmov od 58 vrst in 18 rodov. Najpogosteje se pojavljajo vrste, kot so *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* in *Bacteroides* (Deublein in Steinhauser, 2008).

Preglednica 3: Bakterije, ki sodelujejo pri procesu fermentacije v vseh štirih fazah (Deublein in Steinhauser, 2008).

Table 3: Bacteria that are present during all phases of anaerobic digestion (Deublein in Steinhauser, 2008).

Taksonomija	Vrsta	Opis
Rod: <i>Acetobacterium</i>	<i>A. woodii</i>	Sestavljajo jih homoacetogene, paličaste bakterije.
	<i>A. paludosum</i>	
Rod: <i>Eubacterium</i>	<i>E. rectale</i>	Sestavljajo jih obligatne (ne tolerirajo kisika, preživijo samo v anaerobnem okolju), gram pozitivne bakterije, ki ne ustvarjajo endospor.
	<i>E. siraeum</i>	
	<i>E. plautii</i>	
	<i>E. cylindroides</i>	
	<i>E. branchy</i>	
	<i>E. desmolas</i> (razgradnja steroidov)	
	<i>E. callandrei</i>	
	<i>E. limosum</i>	

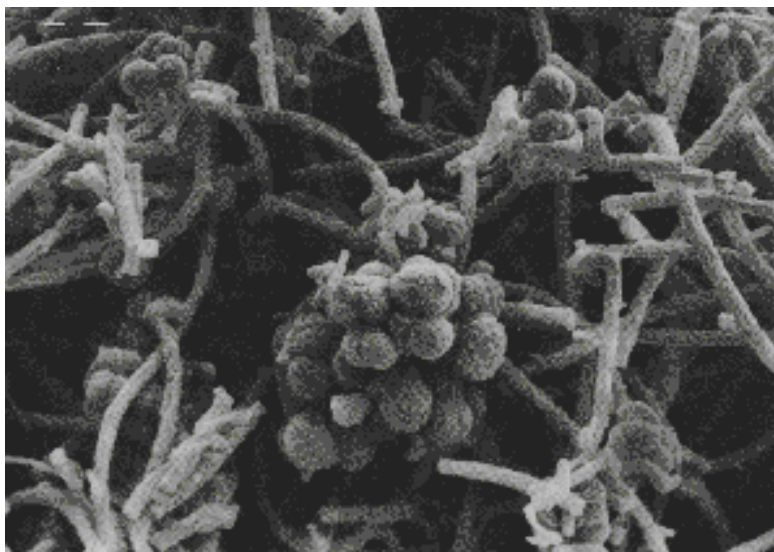
Mikroorganizmi, ki sodelujejo pri metanogenezi, so iz domene *Archea*, vrste *Euryarchaeota*. Do sedaj so identificirali pet redov metanogenov, ki so razdeljeni kot: *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, *Methanococcales* in *Methanopyrales*. Pred kratkim so dodali še šesti rod *Methanocellales*, ki je filogenetsko razvrščen med red *Methanosarcinales* in *Methanomicrobiales* (Angelidaki et al., 2011), kar nakazuje, da je mikrobiologija anaerobne presnove hitro razvijajoče se področje, kjer so z napredkom tehnologije globokega sekvencijaranja možna nova odkritja, ki so nam do sedaj bila le delno dostopna.

Identificirano je bilo omejeno število metanogenov znotraj arhej, ki so zmožne razcepiti acetat. To so (Batstone and Jensen, 2011):

- Člani iz roda *Methanosaeta* znotraj *Methanosaetaceae* (so obligatni cepilci acetata).
- Člani iz roda *Methanosarcina* znotraj *Methanosarcinaceae*. Člani tega roda lahko uporabijo vodik, ogljikov dioksid in metilirane C₁ spojine (Ferry, 1993; cit. po Batstone in Jensen, 2011).

Rod *Methanosaeta* je občutljiva na pH in amonijak, medtem ko rod *Methanosarcina* lahko najdemo pri višjih koncentracijah, predvsem v okolju z veliko koncentracijo amonijaka in kjer je v iztoku veliko organskih kislin (Zinder, 1993; Karakashev et al., 2005; cit. po Batstone in Jensen, 2011). Glede na zadnje raziskave se domneva, da *Methanosarcina* lahko namesto razcepitve acetat v vodik in ogljikov dioksid, oksidira acetat v vodik z naknadno redukcijo s pomočjo sintropnih metanogenih partnerjev v metan (Batstone in Jensen, 2011). V takih pogojih *Methanosarcina* ne deluje kot metanogen, ampak samo zagotovi elektron ostalim metanogenom preko vodika ali alternativnega nosilca elektrona (Batstone in Jensen, 2011).

Delovanje anaerobne presnove je ponavadi ocenjeno kot redukcija organskih snovi. Količina organskih snovi, ki se bo razgradila in pretvorila v bioplin, je odvisna od karakteristik blata, temperature in organske obremenitve (Braguglia et al., 2011).



Slika 6: Metanogene bakterije iz rodu *methanosarcina* (okrogle) in *methanothrix* bakterije (paličaste), ki sodelujejo pri procesu anaerobne presnove (https://energypedia.info/wiki/Biogas_Basics).

Figure 6: Various types of methanogenic bacteria. The spherically shaped bacteria are of the *methanosarcina* genus; the long, tubular ones are *methanothrix* bacteria.

2.6 pH, alkalnost in hlapne kisline

Alkalnost, pH in hlapne kisline so okoljski parametri, ki so med seboj tesno povezani. Vpliv pH na proces anaerobne presnove lahko poteka po dveh poteh (Chernicharo, 2007):

- Direktno: sprememba pH lahko spremeni beljakovinsko strukturo encimov in tako vpliva na encimsko aktivnost.
- Posredno: vpliv na toksičnost številnih sestavin (amonijak).

Optimalen pH za rast metanogenih mikroorganizmov je med 6,6 in 7,4. Stabilna tvorba metana zajema tudi pH območje med 6,0 in 8,0. Višja ali nižja vrednost pH lahko deluje inhibitorno na metanogene mikroorganizme. Optimalen pH je odvisen od vrste mikroorganizmov v procesu anaerobne presnove in vrste substrata (Chernicharo, 2007). Spremljanje in nadzorovanje pH v anaerobnih reaktorjih je zelo pomembno, saj lahko pride do kopičenja maščobnih kislin, ki zavrejo proces tvorjenja metana. Do tvorjenja hlapnih maščobnih kislin (HMK) pride v fazi acitogeneze. Njihova koncentracija je odvisna od karakteristik substrata in ravnotežja med acidogenimi in metanogenimi mikroorganizmi. Koncentracijo hlapnih maščobnih kislin ponavadi izrazimo kot mg $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{l}$. Vrednost pH je odvisna tudi od alkalnosti substrata, ki jo izrazimo kot mg CaCO_3/l . Nizka alkalnost lahko povzroči zakisanje v anaerobnem reaktorju (Fantozzi in Buratti, 2011).

Alkalnost služi kot pufer, ki prepreči nenadne spremembe v pH, saj so encimske aktivnosti in delovanje gnilišča odvisni od pH (Gerardi, 2003).

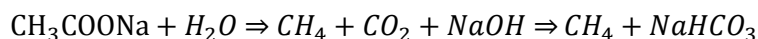
Dva glavna faktorja, ki vplivata na pH in anaerobne procese sta ogljikova kislina (H_2CO_3) in hlapne kisline. Ogljikova kislina je zelo šibka kislina s kemijsko formulo H_2CO_3 . Nastane pri raztapljanju ogljikovega dioksida (CO_2) v vodi. Njene soli se imenujejo karbonati. Ko je pH v območju med 6,0 in 7,5, je puferska kapaciteta anaerobnega sistema skoraj v celoti odvisna od ogljikovega dioksida/bazični sistem, ki v ravnotežju z disociacijo (razpad, razkroj) ogljikove kisline regulira koncentracijo vodikovega iona. Količina ogljikove kisline v raztopini je direktno povezana s količino CO_2 v plinski fazi, ko je vzpostavljeno ravnotežje med količino CO_2 v tekoči in plinski fazi (Chernicharo, 2007).

Močnemu zakisanju se lahko izognemo z ogljikov- dioksid/ hidrogenkarbonat/ karbonatni puferskim sistemom. Med fermentacijo se nenehno razvija ogljikov dioksid, ki uhaja v zrak. S padanjem pH vrednosti je več CO₂ kot molekul brez naboja, raztopljenih v substratu. Z dviganjem pH vrednosti raztopljeni CO₂ tvori ogljikovo kislino (H₂CO₃), ki ionizira. Tako se vodikovi ioni osvobodijo (Deublein in Steinhauser, 2008).

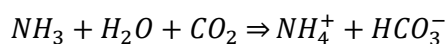
Prešibkemu zakisanju se izognemo z amonijak-amonij puferskim sistemom. S padanjem pH vrednosti pride do tvorjenja amonijevih ionov in sproščanja vodikovih ionov. Z dviganjem pH vrednosti se ustvari več prostih molekul amonijaka (Deublein in Steinhauser, 2008).

Povezava med alkalnostjo in hlapnimi kisljinami v procesu anaerobne presnove temelji na tem, ali alkalnost sistema lahko nevtralizira kisline, ki nastanejo pri procesu in ohranjajo (pufer) pH v primeru akumuliranja hlapnih kislin. Alkalnost in hlapne kisline izhajajo iz razgradnje organskih sestavin med anaerobno presnovo na naslednji način (Chernicharo, 2007):

- Pretvorba vmesnih hlapnih maščobnih kislin. Presnova natrijevega acetata (CH₃COONa) lahko npr. privede do tvorjenja natrijevega bikarbonata – soda bikarbona (NaHCO₃):



- Pretvorba proteinov in aminokislin s formiranjem amonija (NH₄⁻), vodi v nastanek amonijaka (NH₃), katerega oblika je odvisna od pH. Kombinacija med amonijem in ogljikovo kislino (H₂CO₃) v raztopini privede do tvorjenja amonijevega bikarbonata (NH₄⁺):



Presnova ostalih organskih sestavin, ki ne privedejo do kationa (ion s pozitivnim električnim nabojem, ki pri elektrolizi potuje proti katodi) kot končnega produkta, ne proizvaja alkalnosti. To se npr. dogaja pri razgradnji ogljikovih hidratov in alkoholov. Posebej je pomembno zaradi mikrobne sinteze med razgradnjo ogljikovih hidratov, ki lahko povzročijo znižanje v alkalnosti, zato mora biti amonijev bikarbonat, ki je prisoten, uporabljen kot vir dušika za biološko sintezo (Chernicharo, 2007).

Amonijak je končni produkt pri anaerobni presnovi proteinov, sečnine in nukleinskih kislin. Visoke koncentracije lahko inhibitorno vplivajo na delovanje anaerobne presnove in zmanjšajo mikrobno aktivnost. Zaradi inhibicije pride do zmanjšane tvorbe metana, poveča pa se koncentracija hlapnih maščobnih kislin. Do take nestabilne situacije pride v primerih, ko je koncentracija celotnega amonijskega dušika v reaktorju med 1500 in 7000 mg/l, odvisno od drugih parametrov. Do takega razpona pride zaradi razlik v naravi substratov, inokulumov, okoljskih razmer (temperatura, pH) in dobe prilagajanja (Rajagopal et al., 2013; Chen et al., 2008). Ko koncentracija celotnega amonijskega dušika preseže 3000 mg NH₄-N/l, je proces anaerobne presnove inhibiran pri kateremkoli pH. Vendar inhibicije zaradi amonijaka ne moremo direktno povezovati samo s celotnim amonijskim dušikom, ampak s prostim amonijem (NH₃), za katerega se šteje, da je glavni vzrok za inhibicijo metanogene mikroflore (Rajagopal et al., 2013).

2.7 Lignocelulozni substrati

Za anaerobno presnovo in posledično pridobivanje bioplina so primerni organski in v anaerobnih pogojih razgradljivi substrati. Zelo pogosto se uporabljajo rastlinski ostanki z različnimi deleži lignoceluloze, saj ta biomasa nastane kot stranski proizvod v kmetijstvu in predelavi hrane. Sestavljena je iz celuloze, hemiceluloze in lignina, ki so med sabo zelo prepleteni in kemično vezani z nekovalentnimi silami in kovalentnimi vezmi. Le majhen del stranskih produktov iz lignoceluloze se v kmetijstvu uporabi, ostanek pa se zavrže kot odpadek (Sánchez, 2009).

2.7.1 Celuloza

Celuloza je glavna strukturna komponenta lesa in rastlinskih vlaken. Sestavljena je iz D-glukoznih enot, ki so med seboj povezane z 1,4 glikozidnimi vezmi. Mreže celuloznih vlaken so osnova ogrodja za rastlinske celične stene (Bayer et al., 2006; Batstone in Jensen, 2011). Medsebojno povezane verige celuloze tvorijo mikrovlakna, ki so med seboj povezana v snope in tvorijo celulozna vlakna. Število glukoznih enot v dolgih molekulah celuloze se razlikuje; na primer pri celulozi v bombažu znaša okoli 15.000 enot, v lesu do 12.000 enot. Vodikove vezi znotraj celuloznih mikrovlaknen določajo trdnost verige, medtem ko vodikove vezi med verigami odgovarjajo za kristalno ali amorfno strukturo celuloze (Agbor et al., 2011).

2.7.2 Hemiceluloza

Hemiceluloza je drugi najbolj razširjen polimer, ki predstavlja 20 do 50 % lignocelulozne biomase. Od celuloze se razlikuje po tem, da je kemijsko manj homogena. Hemiceluloze so razvejani, heterogeni polimeri pentoz (ksiloz, arabinoze), heksoz (manoze, glukoze, galaktoze) in acetilirani sladkorji. V primerjavi s celulozo imajo manjšo molekularno težo in veje s kratkimi lateralnimi verigami, ki se jih lahko hidrolizira (Fengel in Wegener, 1984; Saha, 2003; cit po Agbor et al., 2011). Verige hemiceluloze so dolge 200 enot, medtem ko dolžina celuloz lahko znaša tudi do 10.000 enot (Batstone in Jensen, 2011). Hemiceluloze se med seboj razlikujejo v zgradbi. Hemiceluloza v kmetijski biomasi, kot so slama in trave, je v glavnem sestavljena iz ksilana. Ksilan zajema skupino polisaharidov (makromolekul), ki so sestavljene iz enot ksiloz (Buslov et al., 2009). Ksilan lahko vsebuje tudi arabinoze, glukuronske kisline ali 4-O-metil eter očetno kislino, ferulične in p-kumarne kisline (Agbor et al., 2011). Hemiceluloza v biomasi blokira stik celulaze s celulozo, saj absorbira encim in fizično prepreči dostop celulaze na površino celuloze (Zhu et al., 2008). Hemiceluloza služi kot vez med ligninom in celuloznimi vlakni in daje celotni mreži celuloza-hemiceluloza-lignin večjo trdnost (Hendriks in Zeeman, 2009).

2.7.3 Lignin

Lignin je tretji najbolj razširjeni polimer v naravi. Prisoten je v celični steni rastlin in nudi togo, neprepustno zaščito pred encimskim mikrobnim napadom in oksidativnim stresom. Je amorfni mrežasti polimer, sestavljen iz fenil propanskih enot (*p-kumaril*, koniferil alkohol in sinapil alkohol), ki so med seboj povezane z etrskimi vezmi in vezmi ogljik-ogljik (C-O-C in C-C) (Hendriks in Zeeman, 2009; Agbor et al., 2011). Lignin je povezan s celulozo in hemicelulozo ter tvori neprepustno oviro v celični steni (Slika 7) (Sánchez, 2009). V splošnem je sprejeto, da je lignin neke vrste lepilo, ki zlepil skupaj različne komponente lignocelulozne biomase in tako prispeva k netopnosti v vodi. Zaradi tesne povezanosti s celuloznimi vlakni, je lignin glavni zaviralec za encimsko in mikrobovno hidrolizo,

lignocelulozne biomase (Agbor et al., 2011). Za razliko od celuloze in hemiceluloze, ki se lahko razgradita aerobno ali anaerobno, je za razgradnjo lignina potreben kisik ter mikroorganizmi kot so filamentozni prokarionti (npr. *Actinomyces Streptomyces*) in glive (npr. *Phanerochaete chrysosporium*, *Bejerkendera adusta* in *Pleturotus ostreatus*), ki proizvajajo zapleteno paleto encimov, ki hidrolizirajo lignin (Sánchez, 2009). Obstojnost lignina močno omejuje dostopnost encimov do komponent celuloze in omejuje hitrost anaerobne razgradnje celuloze. V vsakem primeru je za učinkovito razgradnjo celuloze najprej treba razgraditi oziroma odstraniti lignin (Bayer et al., 2006).

Preglednica 4: Nekateri glavni encimi pri razgradnji lignoceluloze v monomere (Van Dyk in Pletschke, 2012).

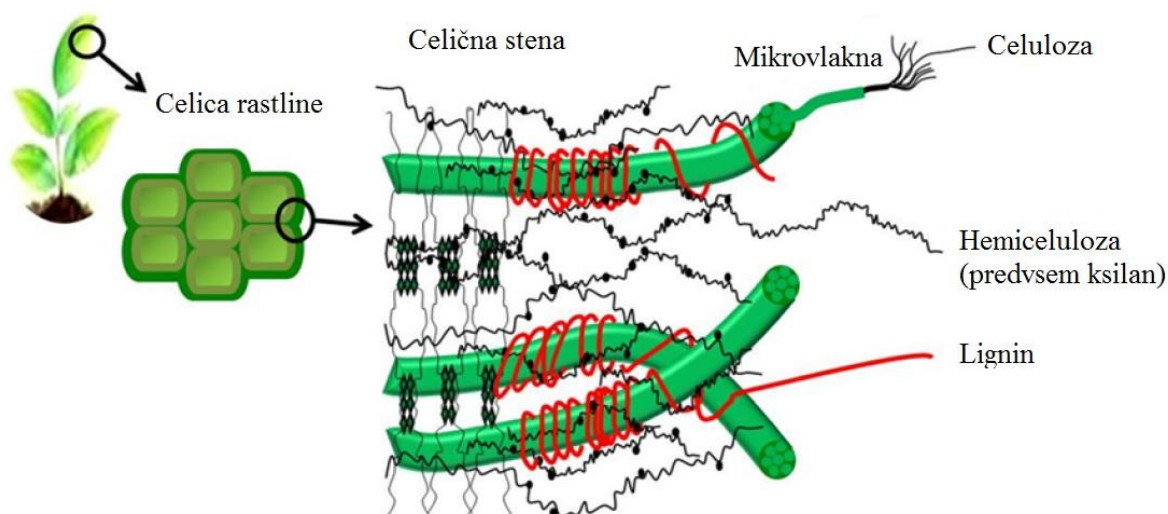
Table 4: Basic enzymes needed for degradation of lignocellulose into monomers (Van Dyk and Pletschke, 2012).

Rastlinski polimer	Encimi
Lignin	Lakaze, mangan peroksidaze (MnP), lignin peroksidaze (LiP)
Pektin	Pektin metil esteraze, pektat liaze, poligalakturonaze, ramnogalakturonan liaze
Hemiceluloza	Endo-ksilanaze, acetil ksilan esteraze, β -ksilozidaze, <i>endo manaze</i> , β -manozidaze, α -L-arabino-furanozidaze, α -glukuronidaze, esteraze ferulne kisline, α -galaktozidaze, esterate p-kumarne kisline
Celuloza	Celobiohidrolaze, endoglukanaze, β -glukozidaze

Preglednica 5: Približna sestava (odstotek) različne biomase iz kmetijskih ostankov, ki jih potencialno lahko uporabimo za proizvodnjo biogoriv (Van Dyk in Pletschke, 2012).

Table 5: Approximately composition (percentage) of various biomass from agricultural wastes that can be potentially used for biofuels (Van Dyk and Pletschke, 2012).

Biomasa	Celuloze (%)	Hemiceluloza (%)	Lignin (%)
Trsje	39,5	29,8	24
Oljna repica (steblo)	27,6	20,2	18,3
Koruzni storž	35-39	38-42	4,5-6,6
Riževi otrobi	24-29	12-14	11-13
Lupine melone	35	19	30
Koruza (steblo)	41,7	20,5	18
Pšenična slama	30-44	23-50	7,7-17
Riževa slama	32-41	15-24	10-18
Sladkorni trs	33-43	25-30	12-24
Lucerna	21,8	12,4	9,7
Trava iz bankin	30,7	15,6	14,1
Kaša iz kave	24	8,9	19,4
Žagovina	45	15,1	25,3
Kokosova vlakna	17,7	2,2	34
Proso (rastlina)	31-45	22-31	12-18
Listi	15-20	80-85	0
Trava (povprečje)	25-40	25-50	10-30
Rž (rastlina, zgodnji listi)	21,3	15,8	2,7



Slika 7: Zgradba lignoceluloznih substratov (<http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdlanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization>)

Figure 7: Structure of lignocellulosic biomass.

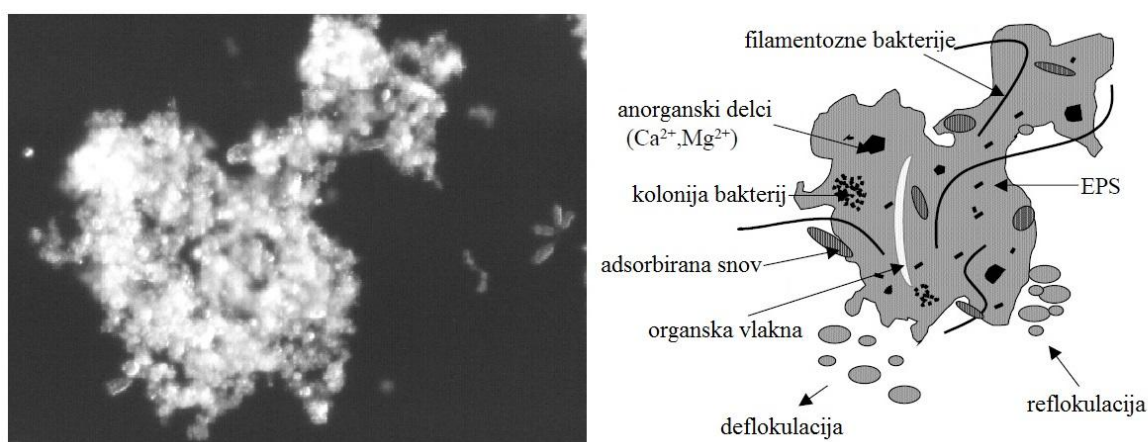
2.8 Blato iz čistilnih naprav

Količina blata, ki se proizvede med procesom čiščenja odpadne vode na komunalnih in industrijskih čistilnih napravah, predstavlja resen in kompleksen problem, kar se tiče odlaganja blata, saj ti stroški lahko znašajo tudi do 60 % celotnih stroškov obratovanja čistilne naprave (Xu et al., 2011; Parawira, 2012). Blato predstavlja kompleksen material, ki je sestavljen iz delcev, bakterij in zunajceličnih polimernih substanc (extracellular polymeric substances - EPS), ki jih proizvajajo in izločajo bakterije. Vsebnost suhe snovi blata iz primarnega in sekundarnega usedalnika se giblje med 0,5 in 5 %, ostalo je voda. Te trdne snovi vsebujejo organske in anorganske snovi v približnem razmerju 60:40, zaradi česar lahko blato uporabimo pri pridobivanju bioplina. Mikrobnna biomasa je glavna trdna sestavina biomase blata, ki nastane med čiščenjem blata (Parawira, 2012). Kosmi aktivnega blata so med sabo povezani s pomočjo komponent EPS. Glavne sile, ki zlepijo komponente kosmov v 3D matrico, so van der Waalove sile, hidrofobne interakcije in polimerne premostitve s pomočjo različnih kationov zaradi elektrostatičnega povezovanja z bivalentnimi kationi. Glavne sestavine EPS so ogljikovi hidrati in proteini, v manjših količinah pa tam najdemo tudi lipide, nukleinske kisline in huminske spojine. Različne organske makromolekule v EPS matrici imajo različne potenciale za medsebojno vezanje v matrice kosmov. Spremembe v sestavi ali odstranitev kakšne določene sestavine lahko privede do zmanjšanja moči vezi v kosmih (Nielsen et al., 1996). V blatu najdemo tudi frakcije lignoceluloznih materialov, ki imajo kompleksno sestavo. Za uničenje strukture kosmov in razbijanje celic, da se sprostijo topne substance in zmanjša velikost delcev, je potrebno biomaso blata kemijsko, mehansko in/ali biološko razgraditi (Parawira, 2012).

Kosmičenje aktivnega blata je zelo kompleksen proces, ki vključuje fizikalne, kemijske in biološke pojave. Tvorjenje večjih kosmov, ki se hitro usedejo in zajemajo tudi diskretne delce, ki se običajno ne bi usedli, predstavlja idealen primer za učinkovit proces bistrenja. Kosme lahko obravnavamo kot posamezne mikro sisteme s posebnimi in interaktivnimi fizikalnimi, kemijskimi in biološkimi funkcijami ali obnašanjem znotraj matrice kosmov. Neprestana interakcija med kosmi in njihovo

okolico zagotavlja energijo, hranilne snovi in kemikalije, ki so potrebni za biološko rast, kemijske reakcije in morfoloških razvoj in zagotavljanje kakovosti vode (Govoreanu, 2004).

Vpliv različnih EPS na kosmičenje ni popolnoma znan. Različne študije, ki jih najdemo v literaturi, poskušajo razložiti vlogo EPS na oblikovanje kosma, vendar pa so včasih predstavljeni nasprotujoči si rezultati. Nekateri avtorji menijo, da na flokulacijo vplivajo površinske lastnosti, hidrofobnost, površinski naboj in sestava EPS in ne količina EPS. EPS igrajo pomembno vlogo pri substratih in prenosu produktov v in iz mikrobnih celic v kosmih. Pri izpostavljanju kosmov večjim organskim obremenitvam, se zmanjšana prisotnost EPS. Divalentni kationi (Ca_2^+ in Mg_2^+) lahko služijo kot mostovi med negativno nabitimi EPS in mikrobnimi celicami in stabilizirajo strukturo omrežja kosmov. Ugotovljeno je bilo, da povečanje koncentracije divalentnih kationov v dotoku povzroči povečanje količine zunajcelične beljakovine in zmanjšanje koncentracij suspendirane trdne snovi v iztoku. V nasprotju s tem, povečanje koncentracije Na^+ ionov, privede do zmanjšanja beljakovin in povečanja koncentracij suspendirane trdne snovi v iztoku. Fizikalne in kemijske lastnosti kosmov aktivnega blata so odvisne od količine in strukture EPS. Gostejše EPS najdemo v notranjosti kosmov, medtem ko so zunanji deli kosmov povezani s šibkejšimi silami in te so zelo občutljive na spremembe okoljskih razmer. V strukturi kosmov so prisotni tudi heterogene zmesi biološko nerazgradljivih organskih snovi ali koloidnih delcev. To se v glavnem nahajajo v celičnih stenah, različnih mineralih, živalskih tkivih in rastlinskih ostankih. Kosmi aktivnega blata lahko vsebujejo približno 30-40 % anorganskih snovi in 60-70 % organskih snovi. Ti delci večinoma pridejo z dotokom in so vdelani v strukturo kosmov. Anorganski delci v splošnem imajo drugačne lastnosti kot drugi materiali v kosmih, zato lahko njihova količina vpliva na lastnosti kosmov (Govoreanu, 2004).



Slika 8: Mikroskopska slika kosma aktivnega blata (levo) in njegova sestava (desno) (Govoreanu, 2004).

Figure 8: Image of an activated sludge flock (left) and its composition (right) (Govoreanu, 2004).

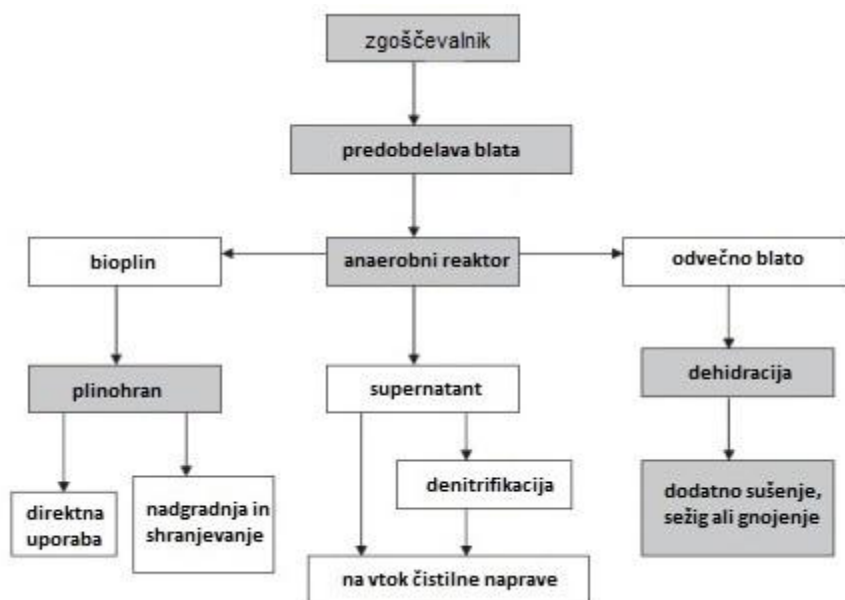
Zaradi heterogene sestave in kompleksne strukture kosmov, na tvorjenje kosmov aktivnega blata vpliva veliko dejavnikov. Zaradi tega je skoraj nemogoče oceniti proces kosmičenja s samo enim mehanizmom, vendar je jasna razlika med mehanizmi, ki so odgovorni za tvorbo kosmov, zelo težavna. Zraven fizikalno-kemijskih dejavnikov je potrebno upoštevati, da se sestava kosmov neprestano spreminja zaradi mikrobne razgradnje in tvorjenja novih produktov. Nekatere lastnosti kosmov se spreminjajo hitro (velikost delcev, kemija na površini delcev), nekatere pa počasneje (struktura, mikrobná združba) (Govoreanu, 2004).

Običajno proces kosmičenja temelji na dveh diskretnih korakih, ki se ukvarjata s prenosom in pritrditvijo trdnih delcev na kosme. Tako pri kosmičenju ločimo tri različne mehanizme (Govoreanu, 2004):

- Perikinetična flokulacija
- Ortokinetična flokulacija
- Diferencialno usedanje

Perikinetična flokulacija temelji na velikosti vključenih delcev. Gre za mikroflokulacijo, ki je značilna za delce, ki so v območju velikosti od 0,001 do 1 μm . Ortokinetična flokulacija in diferencialno usedanje sta opredeljena kot makroflokulacija in se nanašata na skupek delcev, večjih od 1 ali 2 μm . Perikinetična flokulacija nastane zaradi naključnega termičnega gibanja molekul tekočine (Brownovo gibanje). Ortokinetična flokulacija nastane z gradientom hitrosti zaradi mešanja. Delci, ki se premikajo hitreje, prehitijo počasneje se premikajoče delce v hitrostnem polju, trčijo in se zlepijo ter na tak način tvorijo večje delce, ki se hitreje usedejo in jih je lažje odstraniti v gravitacijskih zgoščevalnikih. Mehanizmi flokulacije vključujejo tudi fenomen pritrjevanja, katere učinkovitost je odvisna od trkov med delci, na katere imajo velik vpliv tudi elektrostatične sile, strukturne lastnosti kosmov in hidrodinamičnih interakcij (Govoreanu, 2004).

Blato iz ČN nastaja že v mehanskem delu čiščenja v usedalnikih (primarno blato) ali pri bioloških procesih čiščenja zaradi procesa povratnega blata, in pri katerih se topne sestavine pretvorijo v biomaso (sekundarno čiščenje) (Hogan et al., 2004). Določene sestavine v EPS so odporne proti aerobni in anaerobni razgradnji. Razgradnja blata je tako odvisna od naslednjih delavnikov: ali je na ČN primarni usedalnik, vsebnosti neaktivnih snovi z gor vodnega pritoka čistilne naprave, temperature, aerobne/anoksične frakcije in še posebej starosti blata (Carrere et al., 2010).



Slika 9: Diagram poteka ravnanja z blatom pri anaerobni presnovi (Appels et al., 2008).

Figure 9: Schematic view of sludge management during anaerobic digestion (Appels et al., 2008).

S sušenjem, dodajanjem apna iz železovega klorida, z membransko filtracijo, zadrževalniki, flotacijo, zgoščevalniki ali dehidracijo blata lahko količino blata zmanjšamo za tretjino začetnega volumna, ločeno vodo pa vrnemo na vtok čistilne naprave (Panjan, 2006; Appels et al., 2008). Od tu naprej je

blato potrebno stabilizirati. To lahko naredimo z anaerobno presnovo, kjer s pretvorbo organskega materiala v bioplin pridobimo energijo, zmanjšamo količino končnega blata za odlaganje, uničimo skoraj vse patogene mikroorganizme, ki so prisotni v blatu in omejimo emisije smradu, ki bi nastale z gnitjem blata. Zato lahko rečemo, da anaerobna presnova blata optimizira stroške čistilne naprave. Kljub vsem tem prednostim anaerobne presnove se ne moremo izogniti nekaterim omejitvam (Appels et al., 2008):

- a) delna razgradnja organske frakcije (20-40 %),
- b) nizke hitrosti reakcij in posledično večji volumni anaerobnih reaktorjev in s tem tudi stroški,
- c) ranljivost sistema zaradi različnih inhibicij,
- d) precej slaba kvaliteta nastalega supernatanta,
- e) prisotnost drugih plinov poleg CH_4 , kot so ogljikov dioksid (CO_2), vodikov sulfid (H_2S) in odvečna vlaga,
- f) možna prisotnost hlapljivih siloksanov v bioplinu, ki lahko povzročijo precejšnjo škodo na aparataturah, zaradi tvorbe mikro kristalnega silicijeva oksida,
- g) povečana koncentracija težkih kovin in različnih industrijskih »organskih snovi« v končnem blatu kot posledica zmanjšanja organske frakcije med anaerobno presnovo, kjer ostane mineralni in nerazgradljiv del blata nedotaknjen, kar pa je največkrat pod normativi, ki veljajo za hrano, a nad normativi, ki veljajo za blato iz anaerobne presnove.

2.8.1 Organska obremenitev anaerobnih reaktorjev

Obremenitev z organskimi snovmi se nanaša na maso organskih snovi (OS), ki jih vsak dan doziramo v anaerobne reaktorje, deljeno z delovnim volumnom anaerobnih reaktorjev ($\text{kg VS}/(\text{m}^3 \text{ dan})$). Obremenitev je po navadi določena glede na trajne pogoje obremenitve (maksimalna mesečna produkcija organskih snovi, maksimalna tedenska produkcija organskih snovi) in zagotovi, da se izognemo preveliki obremenitvi v periodah s krajšim časovnim obdobjem. Tipična maksimalna obremenitev z organskimi snovmi je med 1,9 in 2,5 $\text{kg VS}/(\text{m}^3 \text{ dan})$. Zgornja meja obremenitve z organskimi snovmi je določena z akumulacijo toksičnih snovi, predvsem amonija, ali izpiranjem mikroorganizmov, ki so potrebni za pretvorbo v metan v procesu metanogeneze. Mejna vrednost, ki je pogosto uporabljena je 3,2 $\text{kg VS}/(\text{m}^3 \text{ dan})$. Premajhna organska obremenitev poveča stroške za gradbeni del (velik volumen anaerobnih reaktorjev) in obratovanje (nezadostna tvorba plina, da sistemu zagotovimo dovolj toplote za ogrevanje anaerobnih reaktorjev) (Vesilind et al, 2003).

2.8.2 Zadrževalni čas v anaerobnem reaktorju

Velikost anaerobnega reaktorja je odvisna od zadostnega zadrževalnega časa, da lahko poteče proces razgradnje organskih snovi. Kriterij za velikost, bodisi izražen kot zadrževalni čas trdnih snovi oziroma zadrževalni čas blata SRT (Solids retention time) (število dni, izračunanih kot masa trdnih snovi v reaktorju, deljeno z maso trdnih snovi, ki jo odstranimo iz reaktorja v enem dnevu) in hidravlični zadrževalni čas HRT izražen kot: število dni, izračunanih kot delovni volumen, deljeno z volumnom dovedenega blata v reaktor na dan. Če v reaktorju ni sprememb v koncentraciji trdnih snovi, je hidravlični zadrževalni čas enak zadrževalnemu času trdnih snovi (Vesilind et al, 2003)..

Oba zadrževalna časa in obseg vsake izmed treh reakcij med anaerobno presnovo (hidroliza, tvorjenje kislin in tvorjenje metana) so med seboj direktno povezani. Povečanje zadrževalnega časa trdnih snovi poveča obseg vsake reakcije, in obratno zmanjšanje zadrževalnega časa trdnih snovi zmanjša obseg

reakcije. Da proces anaerobne presnove poteka nemoteno, moramo zagotoviti vsaj minimalni kritični zadrževalni čas za vsako reakcijo. V nasprotnem primeru bakterije ne morejo rasti dovolj hitro, da bi ostale v reaktorju, tudi reakcije, ki potekajo s pomočjo teh bakterij prenehajo teči in proces se ustavi (Vesilind et al, 2003).

SRT (solids retention time) je povprečni čas, ko so bakterije (trdne snovi) prisotne v anaerobnem reaktorju. HRT je čas, ko je odpadna voda ali blato v anaerobnem reaktorju. Če v anaerobnem reaktorju ni vračanja blata oz odpadne vode, potem sta SRT in HRT ista. Čas, ki je potreben, da se populacija bakterij podvoji, je za anaerobni reaktor ponavadi večji od 12 dni. Zadrževalni čas, ki je manjši od 10 dni povzroči izpiranje metanogenih mikroorganizmov. To nakazuje, da je SRT veliko bolj pomemben kot HRT. Dolgi SRT maksimirajo kapaciteto odstranjevanja, zmanjšajo potreben volumen reaktorja in zagotovijo pufersko kapaciteto za zaščito pred šok obremenitvami in toksičnimi substancami v odpadni vodi in blatu. Prav tako dolgi SRT pomaga mikroorganizmov, da se aklimatizirajo na toksične sestavine (Gerardi, 2003).

Dolge SRT lahko dosežemo na dva načina. Prvič s povečanjem volumna reaktorja, drugič s povečanjem koncentracije bakterij (trdnih snovi). Pretvorba organskih snovi v plinske produkte v anaerobnem reaktorju je odvisna od HRT. Načrtovanje HRT je funkcija razpoložljivosti pregnitega blata. HRT je lahko relativno velik ali majhen, če se bo pregnito blato apliciralo na zemljo, ali pa če se ga bo sežgalo. Vendar povečanje zadrževalnega časa na več kot 12 dni ne prispeva veliko k povečani razgradnji organskih snovi. HRT vpliva na hitrost in obseg tvorbe metana. Izmed vseh obratovalnih pogojev znotraj anaerobnega reaktorja (temperatura, koncentracija trdnih snovi, vsebnost organskih snovi na vtoku) je HRT morda najbolj pomemben obratovalni pogoj, ki vpliva na pretvorbo organskih snovi v bioplin (Gerardi, 2003).

2.8.3 Vpliv temperature na anaerobno presnovo

Med fizičnimi dejavniki, ki vplivajo na rast mikrobov, je temperatura eden izmed najbolj pomembnih. Mikroorganizmi niso sposobni nadzorovati notranje temperature, zato je temperatura znotraj celice mikroorganizmov določena z zunanjo temperaturo okolice. Razlikujemo tri temperaturna območja, ki so povezana z mikrobovo rastjo v bioloških procesih (Chernicharo, 2007):

- psihofilno temperaturno območje : od 4 do približno 15 °C
- mezofilno temperaturno območje: od 20 do približno 40 °C
- termofilno temperaturno območje : med 45 in 70 °C

Večina anaerobnih reaktorjev je narejena za mezofilno temperaturno območje, čeprav je njihovo delovanje možno tudi v termofilnem območju. Vendar operativne izkušnje pri anaerobnih reaktorjih v termofilnem temperaturnem območju (50 do 55°C) niso najboljše, še vedno je vprašanje zadostna energija, ki je potrebna za ogrevanje anaerobnih reaktorjev na tako visoko temperaturo in nestabilnost procesa. Temperatura vpliva tudi na anaerobne mikroorganizme, disociacijo amonijaka in termodinamiko kemijskih reakcij. Čeprav z večanjem temperature do doseganja idealnega območja, kjer je rast mikroorganizmov optimalna, lahko znatno zmanjšamo volumen anaerobnega reaktorja, je po drugi strani sistem zelo občutljiv na nenadne temperaturne spremembe, ki morajo biti znotraj spremembe ± 2 °C/dan. Pri večjih nihanjih pride do neravnovesja med mikrobnimi populacijami in posledično do slabšanja procesa anaerobne presnove. Temperatura vpliva na biološke procese na dva načina: (i) vpliva na hitrost encimske reakcije in (ii) vpliva na hitrost difuzije substrata (Chernicharo, 2007).

2.8.4 Mešanje v anaerobnih reaktorjih

Učinkovito mešanje je eden izmed najbolj pomembnih dejavnikov, ki vplivajo na delovanje in povečanje velikostne skale bioreaktorjev. Mešanje je pogosto odločilno za učinek fermentacijskih procesov in je povezano s številnimi težavami pri povečevanju velikostne skale reaktorja. Učinek povečanja velikostne skale na učinkovitost mešanja vpliva na procese prenosa in lahko vpliva na koncentracijo, temperaturni gradient in nihanje pH, ki posledično lahko škoduje mikroorganizmom (Bonvillani et al., 2006).

Mešalne naprave se najpogosteje uporabljajo pri različnih tehnoloških postopkih za pospeševanje prenosa snovi in toplote, ki bi sicer potekali počasneje ali pa bi brez mešanja celo zastali. Kvaliteto mešanja, to je predpisano stopnjo pomešanja, pogojujeta intenzivnost oziroma moč pogona mešal (P) in čas pomešanja. Moč mešala in čas pomešanja za določen mešalni proces odločilno vplivata na učinkovitost mešalnega sklopa ter s tem na stroške tega procesa. Moč mešala je pri napravah s standardno geometrijsko konfiguracijo lahko izražena z odvisnostjo naslednjih brez dimenzijskih števil: (1) Reynoldsovo število, (2) Froudovo število in (3) Newtonovo število (Bombač in Lenarčič, 2009).

Moč mešanja izrazimo z Newtonovim številom, kjer je enačba naslednja (Bombač in Lenarčič, 2009):

$$Ne = \frac{P}{n^3 d^5 \rho} \quad (2)$$

Kjer so:

Ne – Newtonovo število

P – moč mešala [W],

n – vrtilna frekvenca mešala [1/s]

d – premer mešala [m]

Moč mešanja je odvisna od vrste mešala (radialno, aksialno, vijačno), dimenzij mešala, mešalne posode, lastnosti vzorca in ga je potrebno mersko določiti (Tchobanoglous et al., 2003).

Vpliv gravitacije na tokovno stanje zajamemo s Froudovim številom, katerega enačba je naslednja (Bombač in Lenarčič, 2009):

$$Fr = \frac{n^2 d}{g} \quad (3)$$

Kjer so:

Fr – Froudovo število,

n – vrtilna frekvenca mešala [1/s]

d – premer mešala [m]

g – zemeljski pospešek [m/s²]

Z Reynoldsovim številom izrazimo vpliv viskoznih sil. Enačba je naslednja (Bombač in Lenarčič, 2009):

$$Re = \frac{n \cdot d^2}{\nu} \quad (4)$$

Kjer so:

Re – Reynoldsovo število,

n – vrtilna frekvenca mešala [1/s]

d – premer mešala [m]

ν – kinematična viskoznost [m^2/s]

Različna območja v mešalni posodi imajo lahko različne pogoje, kjer je režim toka lahko laminaren ($Re < 10$), prehodni ($10 < Re < 10^3$) ali turbulenten ($Re > 10^3$) (Tchobanoglous et al., 2003).

Pomembno je tudi Schmidtovo število, ki ponazarja razmerje med intenzivnostjo prenosa gibalne količine in snovi in je podano z naslednjo enačbo (Zlokarnik, 2002):

$$Sc = \frac{\nu}{D} \quad (5)$$

Kjer so:

Sc – Schmidtovo število,

ν – kinematična viskoznost [m^2/s]

D – difuzivnost [cm^2/s]

Pri ortokinetični flokulaciji na pogostost trkov direktno vpliva hitrostni gradient (število obratov mešala), strižne sile, ki delujejo na kosce, pa ne smejo prekoračiti njihove strižne trdnosti. Povprečni hitrostni gradient G za mešala po Campu in Steinu je podan z naslednjo enačbo (Tchobanoglous et al., 2003):

$$G = \sqrt{\frac{P}{\mu \cdot V}} \quad (6)$$

Kjer so:

G – povprečni gradient hitrosti [$1/\text{s}$]

P – moč mešala [W]

μ – dinamični koeficient viskoznosti [$\text{kg}/(\text{m s})$]

V – volumen reaktorja [m^3]

Prenos podatkov iz meritev na majhnem pilotnem modelnem merilu in prenos eksperimentalno izmerjenih parametrov za načrtovanje in konstrukcijo sistemov na velikem modelnem merilu je težaven proces, ki je odvisen od različnih dejavnikov, ki jih moramo upoštevati pri tako imenovani modelni podobnosti. Pri nadgradnji na večje modelno merilo moramo upoštevati naslednje parametre (Zlokarnik, 2002):

- geometrijski parametri,
- snovni (masni) parametri,
- procesni parametri.

Pri geometrijskih parametrih moramo upoštevati predvsem hitrost mešanja in premer mešala, pomembno pa je tudi, kakšne oblike je mešalna posoda (razmerje dolžin in kotov), da ne dobimo mrtvih kotov, kjer vsebnosti posode ne bomo mogli premešati. Hitrost mešala mora biti minimalna, da zagotovi suspenzijo delcev v turbulentnem režimu, ki je podano s Froudovim številom. Upoštevati moramo tudi snovna parametra, kot sta gostota in kinematična viskoznost tekočine. Pri snovni podobnosti moramo upoštevati, da imamo dve različni materiji, ki se med sabo razlikujeta po gostoti, ki je odvisna od temperature in agregatnega stanja. Pomembna je difuzivnost in kinematična viskoznost, ki je podana kot Schmidtovo število in daje povezavo med hitrostnim in koncentracijskim poljem dveh sistemov. Pri procesnih parametrih moramo upoštevati predvsem moč mešala, mešalni čas in pH tekočine (Zlokarnik, 2002).

2.9 Predobdelave substratov

Ekonomika bioplinske naprave je neposredno povezana s količino nastalega bioplina na enoto surovega materiala, ki ga razgradimo v procesu. Nekateri stroški so fiksni (prevoz materiala do bioplinske naprave), nekateri pa variabilni (stroški gradnje). Potencial za povečanje količine bioplina iz gnojevke ali odpadnega blata je velik, saj se samo polovica organskega materiala pretvori v tak material. Glavni načini s katerimi lahko izboljšamo pridobivanje bioplina na bioplinski napravi so (Ahring, 2003):

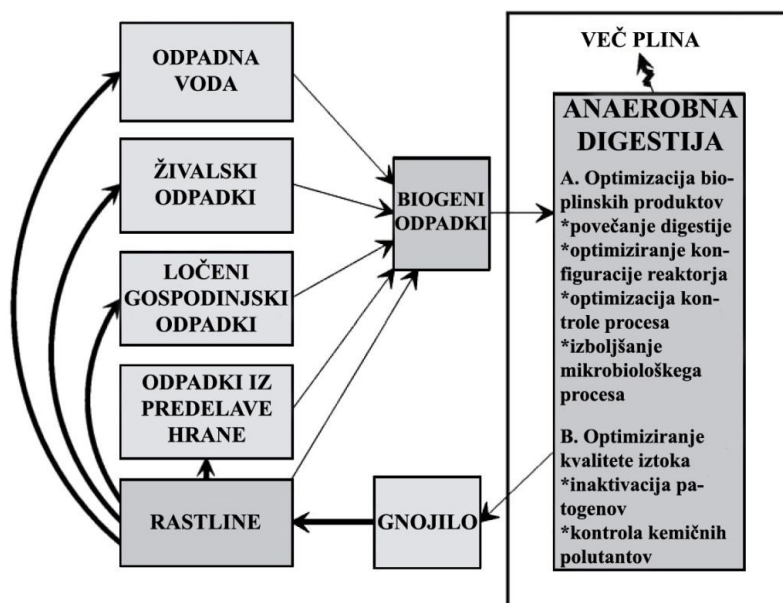
- izboljšanje razgradljivosti odpadkov,
- optimiziranje konfiguracije reaktorja,
- optimiziranje kontrole procesa in stabilnost,
- izboljšanje mikrobioloških procesov in iztoka.

Za izboljšanje biorazgradljivosti blata iz komunalnih čistilnih naprav so bile razvite naslednje metode predobdelave (Carrère et al., 2010b):

- biološka predobdelava,
- termalna hidroliza ($>100^{\circ}\text{C}$),
- mehanska predobdelava:
 - ultrazvok,
 - liza – centrifuga,
 - mletje,
- kemijska predobdelava:
 - oksidacija,
 - predobdelava z alkali.

Dve osnovni lastnosti, ki določata obnašanje blata sta hitrost razgradnje (pogosto definirana s koeficientom prvega reda) in obsega oziroma inertne frakcije (Batstone et al., 2011; v Carrere et al., 2010). Spremembe v kinetiki hitrosti razgradnje in/ali razgradljivosti, bodo povečale tvorbo plina in izboljšale delovanje anaerobnih procesov (Carrère et al., 2010a).

Količina in kakovost plina nam povesta, kako dobro deluje anaerobni reaktor. Nastajanje plina je biokemijsko neposredno povezana s količino organskih delcev, ki so se razgradili in je izražena kot volumen plina na enoto razgrajenih organskih delcev. Količina nastalega plina se giblje od 1,2 do 1,5 m^3/kg organskih snovi (OS) za maščobe, za proteine in ogljikove hidrate pa 0,7 m^3/kg organskih snovi. Tipični anaerobni reaktor, obremenjen s primarnim in aktivnim blatom, proizvede med 0,8 do 1 m^3 plina/kg OS, ki se razgradijo. Količina plina, ki nastane, je funkcija temperature, zadrževalnega časa trdnih snovi in obremenitve z organskimi snovmi. Energijska vrednost nastalega plina je med 20 in 25 MJ/m^3 . Za načrtovanje se uporablja srednja vrednost 25 MJ/m^3 , kar je okrog 2/3 energijske vrednosti čistega metana (39 MJ/m^3) (Vesilind et al, 2003).



Slika 10: Glavni cilji anaerobne presnove (Ahring, 2003).

Figure 10: Main goals of anaerobic digestion (Ahring, 2003).

2.9.1 Biološko predčiščenje

Biološko čiščenje zajema različne aerobne in anaerobne procese. Sem spada tudi biološko čiščenje blata pred anaerobno presnovo, s katerim želimo pospešiti hidrolizo pred glavnim procesom presnove. Najbolj pogosta je temperaturno fazna anaerobna presnova (temperature phased anaerobic digestion – TPAD) pri termofilnih (okrog 55°C) ali hiper termofilnih (med 60 in 70°C) pogojih. Pri termofilnih pogojih ponavadi pride do hitrejše razgradnje organskih trdnih snovi, kar lahko pripišemo pospešeni hidrolitski aktivnosti. Pri primerjavi med termofilno in mezofilno predobdelavo primarnega blata pride do povečanja tvorbe metana in razgradnje organskih trdnih snovi zaradi večjega koeficienta hidrolize namesto povečane notranje biorazgradljivosti (Carrère et al., 2010b).

Z višjo temperaturo predobdelave se poveča količina uničenih patogenih organizmov in splošen porast hitrosti hidrolize pri 70 °C, povečajo pa se stroški porabe energije. Z anaerobno hiper termofilno predobdelavo blata pri 70 °C se poveča vsebnost biološko razgradljivega KPK v obsegu 15 do 50 %, odvisno od vrste blata, ali gre za primarno blato, sekundarno blato ali mešanico obojega (Carrère et al., 2010b, 2010). S termofilnimi pogoji ponavadi dosežemo večjo razgradnjo organskih trdnih snovi kot posledico povečane hidrolitske aktivnosti. Podjetje Degremont je tako na trg poslalo proces z imenom Biolysis®, kjer zgoščeno blato dovedejo v termofilni reaktor v katerem se nahajajo določeni mikroorganizmi (*Bacillus stearothermophilus*), ki proizvajajo encime (proteaze, amilaze in lipaze). Na ta način zmanjšajo tvorbo odvečnega blata za 40 % do 80 %, ne da bi poslabšali kvaliteto odpadne vode (Carrère et al., 2010).

Biološka predobdelava lignoceluloznih substratov poteka z uporabo gliv in mikrobnih konzorcijev. S pomočjo gliv bele, rjave in mehke trohnobe, ki izločajo encime za razgradnjo lignina in hemiceluloze, lahko pospešimo razgradnjo lignoceluloznih substratov in povečamo tvorbo biometana. Večina raziskav na tem področju je bila narejena na laboratorijskem modelnem merilu v sterilnih pogojih. Druga možnost je uporaba različnih mikrobnih združb, ki jih dodamo substratom. V večini primerov substratov ni treba sterilizirati (Zheng et al., 2014).

Za pospešitev hidrolize, ki je hitrostno omejujoč korak v procesu anaerobne presnove, se uporabljajo tudi hidrolitski encimi, ki jih lahko dodajamo v anaerobni reaktor. Najbolj pogosto uporabljeni encimi zajemajo celulaze, hemicelulaze, amilaze, proteaze in lipaze. Pred uporabo biološke predobdelave je treba narediti dodatne eksperimente, kjer ocenimo učinkovitost različnih metod in njihov potencialni strošek (Zheng et al., 2014). Direktno dodajanje encimov v enostopenjski sistem (v enem reaktorju imamo vse 4 faze anaerobne presnove) anaerobnega reaktorja je dobra rešitev, saj ni treba graditi dodatnih reaktorjev ali vgrajevati dodatne opreme (Romano et al., 2009).

2.9.2 Termalna hidroliza (>100°C)

Pri termalni hidrolizi se blato zaradi visoke temperature delno razkroji, kar pospeši anaerobno presnovo. Večina študij na to temo poroča o optimalnih temperaturah med 160 in 180°C in času predobdelave od 30 do 60 minut (Carrère et al., 2010). Povečana tvorba metana je odvisna od začetne biorazgradljivosti blata z večjim vplivom na težko biološko razgradljivih tipih blata. Boljši rezultati so doseženi pri aktivnem blatu kot pri primarnem. Termalna hidroliza zmanjša hidravlični zadrževalni čas blata v reaktorju. Druge prednosti termalne hidrolize so še sanitacija blata, zmanjšanje viskoznosti blata in posledično manjša poraba energije za delo s preginitim blatom in pozitivna energijska bilanca. Slabosti termalne hidrolize se kažejo v povečani topnosti inertne frakcije in barvi končnega iztoka ter povišani vsebnosti amonijaka zaradi povečanega delovanja in velika poraba energije. Več kot 10 naprav uporablja predobdelavo s termalno hidrolizo in rezultati kažejo na povečano tvorbo bioplina in redukcijo organske snovi za okoli 60 %, redukcijo volumna blata in vsebnost celotnih trdnih snovi v pogači blata za 30%, povečano kapaciteto reaktorja z organsko obremenitvijo 5 do 6 kg OS/(m³ dan). Ogrevanje blata poteka z injiciranjem vodne pare (Carrere et al., 2010).

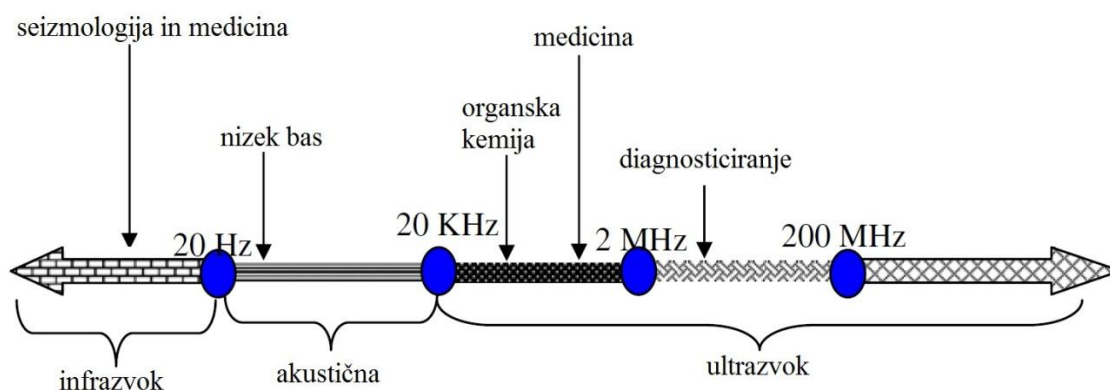
2.9.3 Mehanska predobdelava

2.9.3.1 Ultrazvok

Ultrazvok mehansko razrahlja strukturo celic in matrico kosmov. Pri tem procesu sodelujeta dva ključna mehanizma: kavitacija pri nižjih frekvencah in kemične reakcije zaradi tvorjenja OH, HO₂ in H radikalov pri višjih frekvencah. Pri čiščenju blata je najbolj učinkovita predobdelava pri nizkih frekvencah med 20 in 40 kHz. Mehanski fenomen ultrazvočnega razbijanja pripelje do razpada kosmov in lize (raztapljanje ali razkroj) mikroorganizmov glede na čas predobdelave in moči, kar lahko enačimo z dovedeno specifično energijo (Chu et al., 2002, v Carrere et al., 2010).

Razpad aktivnega blata, ki je obdelano z ultrazvokom, se zgodi v 4 korakih (Wang et al., 2005), kjer tretji in četrti korak lahko zanemarimo pri :

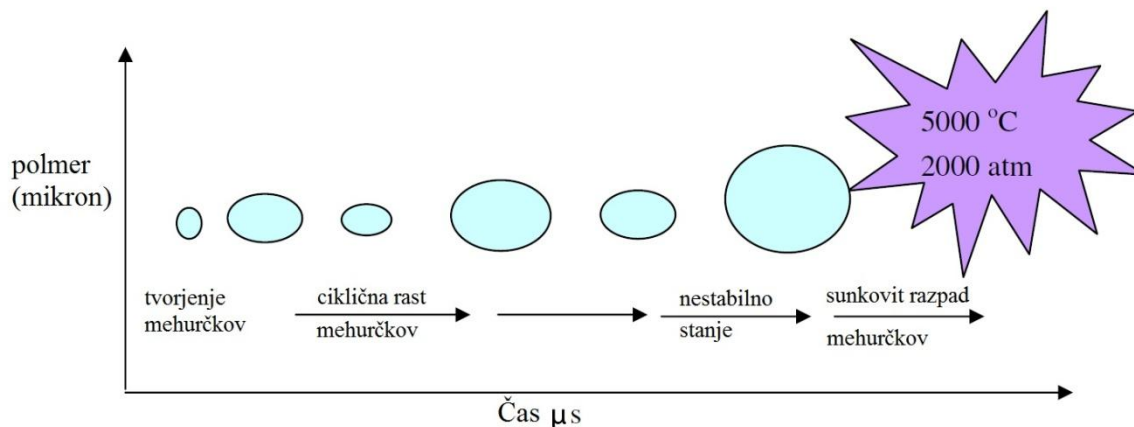
- Hidro mehanske strižne sile,
- Oksidacijski vpliv prostih radikalov •OH, •H, •N in •O, ki nastanejo zaradi ultrazvočnega obsevanja,
- Termalna dekompozicija hlapnih hidrofobnih substanc v blatu,
- Dvig temperature med razpadom aktivnega blata pod vplivom ultrazvoka.



Slika 11: Diagram območja ultrazvoka (Pilli et al., 2011).

Figure 11: Diagram of ultrasound range (Pilli et al., 2011).

Kavitacija, do katere pride med uporabo ultrazvoka, povzroči nenaden in silovit kolaps velikega števila mikro mehurčkov, ki v tekočini, ki obdaja mehurčke, ustvarijo močne hidro mehanske strižne sile. Med kolapsom mehurčka se proizvede visoka temperatura, ki razdre vodo (H_2O) v ekstremno reaktivne vodikove atome (H^+) in hidroksilne radikale ($\bullet OH$). V fazi ohlajanja se ti radikali na novo kombinirajo in tvorijo vodikov peroksid in molekularni vodik. Oksidacijski učinek (vpliv) $\bullet H$, $\bullet N$ in $\bullet O$ je v primerjavi z $\bullet OH$ veliko manjši in se ga lahko med obdelavo z ultrazvokom zanemari (Pilli et al., 2011).



Slika 12: Razvoj in kolaps kavitacijskega mehurčka (Pilli et al., 2011).

Figure 12: Development and collapse of the cavitation bubble (Pilli et al., 2011).

Ko se ultrazvočno valovanje razširi v blato, ustvari kompresijo in razredčitve. Kompresijski cikel deluje na tekočino s pozitivnim tlakom in potiska molekule skupaj, medtem ko redčitveni cikel na tekočino vpliva z negativnim tlakom in vleče molekule narazen. Zaradi prevelikega negativnega tlaka se v območju razredčitve tvorijo mikro mehurčki (kavitacijski mehurčki), ki se z vsakim naslednjim ciklom povečajo in dosežejo nestabilno velikost, ko nenadoma razpadejo (eksplodirajo) in tvorijo udarne valove (pri temperaturi okrog $5000^{\circ}C$ in tlaku 500 atmosfer z življenjsko dobo nekaj mikrosekund) (Pilli et al., 2011). To je prikazano tudi na sliki 12. Predobdelava z ultrazvokom spremeni kemijske, fizikalne in biološke karakteristike blata. Ovrednotenje teh parametrov lahko služi

kot indikator za učinkovitost razgradnje blata z ultrazvokom (Yeow in Peng, 2012). Mehanske sile, ki se ustvarijo z ultrazvočnimi valovi pri več kot 0,44 W/ml, lahko razgradijo porozne kosme v mikrokosme in sprostijo zunajcelične polimere (Jorand et al., 1995; Yeow in Peng, 2012).

Hitrost raztapljanja delcev je odvisna od velikosti delcev v blatu. Tvorba metana v zrelem anaerobnem reaktorju je proporcionalna s hitrostjo raztapljanja velikosti delcev. Z ultrazvokom učinkovito zmanjšamo velikost delcev blata. Učinkovitost je odvisna od dolžine uporabe ultrazvoka, gostote ultrazvoka, moči ultrazvoka, volumna blata in karakteristik blata (Pilli et al., 2011). Pri daljšem času predobdelave z ultrazvokom pride do ponovnega povečanja velikosti delcev, zaradi ponovne flokulacije. Na začetku predobdelave se velikost kosmov zmanjša, vendar podaljšani čas predobdelave z ultrazvokom zaradi lize celic povzroči izločanje več znotrajceličnih polimerov. Kosmi se nato ponovno zlepijo, saj biopolimeri, ki se sprostijo, delujejo kot neke vrste lepilo, ki kosme drži skupaj. Skupaj formirajo skupine, kot sta hidroksilna in negativno nabita karboksilna skupina (Pilli et al., 2011). Pri gostoti predobdelave z ultrazvokom 0,52 W/ml se je velikost delcev zmanjšala iz 51 μm na 15 μm , pri gostoti 0,33 W/ml pa iz 51 μm na 19 μm (Cao et al., 2006; v Pilli et al., 2011). Mikroskopski pregled razkrije, da je strukturna integriteta (neokrnjenost) kosma v celoti uničena po 60 min predobdelave z ultrazvokom, nadaljnje povečanje časa uporabe ultrazvoka ali nivoja moči ne more razkrojiti kosma. Obstaja pa optimalna moč in čas uporabe ultrazvoka, ko lahko blato razkrojimo (Chu et al., 2001; v Pille et al., 2011). Z ultrazvokom so se delci zmanjšali iz 165 μm na 85 μm (Tiehm et al., 1997). Z ultrazvokom razbijemo manjše delce veliko bolj učinkovito kot večje (Pilli et al., 2011). Z zmanjšanjem velikosti delcev v splošnem olajšamo potek hidrolize trdnih snovi v blatu, ki imajo sedaj večjo površino glede na svoj volumen. Zaradi tega pride do pospešene in izboljšane razgradnje organske trdne faze (Muller et al., 2003, v Erden in Filibeli, 2010). Čeprav je porazdelitev velikosti delcev povezana z razgradnjo blata, ta parameter ni primeren za optimizacijo procesa (Muller et al., 2004; Erden in Filibeli, 2010), saj na razgradnjo blata vplivajo tudi pH, starost blata in vsebnost organsko razgradljivih snovi, prisotnost težkih kovin in koncentracija amonijaka (Erden in Filibeli, 2010; Pilli et al., 2011).

2.9.3.3 Razkroj s centrifugo

Razkroj blata iz usedalnika se zgodi s pomočjo dehidracijske centrifuge, ki ga po dehidraciji resuspendirajo v tok tekočine. Take centrifuge, ki blato predobdelajo pred anaerobno presnovo, imajo vgrajene na več čistilnih napravah: Liberec (100.000 PE, Češka), Furstenfeldbruck (70.000 PE, Nemčija) in Aachen-Soers (650.000 PE, Nemčija). Povprečni prirast bioplina je med 15 do 26 % (Carrere et al., 2010).

2.9.3.4 Zmanjševanje velikosti delcev z mletjem ali drobljenjem

Poznamo več načinov zmanjševanja delcev: mletje s pomočjo krogličnih mlinov (stirred ball mill) in mletje s pomočjo rezil (high speed cutter milling). Pri mletju s pomočjo krogličnih mlinov, mlin vsebuje majhne kroglice, ki z vrtenjem bobna zadevajo ena ob drugo in mehansko pretrgajo celične stene. Tako je notranja celična snov lažje dostopna (Wett et al., 2010).

2.9.4 Kemijska predobdelava

Med kemijsko predobdelavo lahko štejemo oksidacijo in predobdelavo z alkali (Carrere et al., 2010).

2.9.4.1 Oksidacija

Najbolj razširjena kemijska predobdelava je obdelava z ozonom. S pomočjo ozona postane del blata topen, z večanjem količine ozona se topnost povečuje. Prevelika doza ozona privede do očitnega padca topnosti blata zaradi oksidacije topnih komponent. Predobdelavo blata z ozoniranjem so najprej uporabili pri aktivnem blatu, kjer so količino nastalega blata, ki so ga pridobili v usedalniku, obdelali z ozonom in poslali nazaj na aerobno linijo procesa aktivnega blata. Pri anaerobni predobdelavi z ozonom se lahko odvečno blato obdela pred doziranjem v anaerobni reaktor, ali pa se odvečno blato iz anaerobnega reaktorja ponovno obdela z ultrazvokom in se ga vrne v anaerobni reaktor (Carrere et al., 2010).

Kot oksidant se lahko uporablja tudi vodikov peroksid (H_2O_2). Raziskave kažejo, da je predobdelava do 20 % odvečnega blata, ki je že bilo anaerobno obdelano v anaerobnem reaktorju in ki ga obdelamo z vodikovim peroksidom, bolj učinkovita od predobdelave odvečnega blata iz linije aerobnega čiščenja (Carrere et al., 2010).

2.9.4.2 Predobdelava z alkali

Učinkovitost predobdelave blata iz ČN z alkali je najboljša z uporabo NaOH, sledi kalijev hidroksid KOH, magnezijev hidroksid $Mg(OH)_2$ in kalcijev hidroksid – gašeno apno - $Ca(OH)_2$. Vendar prevelike koncentracije Na^+ ali K^+ ionov lahko inhibirajo proces anaerobne presnove (Carrere et al., 2010).

2.9.5 Ekonomika predobdelav

Večina metod za predobdelavo substratov je bila narejena na laboratorijskem in pilotnem modelnem merilu, medtem ko je raziskav na realnem modelnem merilu zelo malo. Energija, ki je potrebna za predobdelavo substratov, je na laboratorijskem modelnem merilu drugačna kot na realni industrijski velikosti. Povezava med uporabnostjo mikro in makro skale predobdelanih vzorcev je omejena ali skoraj nemogoča, še posebej pri vplivih na celoten sistem anaerobne presnove. Pogosto uporabljeni šaržni testi za biometanske potenciale, ki sicer podajo vrednost tvorjenja metana substratov pri določenih pogojih, v celoti ne napovejo njihovega odziva na realnem industrijskem modelnem merilu, ki poteka v kontinuiranem procesu. Skupni učinek predobdelav je odvisen od konfiguracije procesa anaerobnega presnove in tako imenovani »black box« pristop ne omogoča, da bi učinke predobdelav lahko uporabili za različne sisteme anaerobne presnove (Carlsson et al., 2012).

Poraba energije za mehansko predobdelavo je odvisna od končne velikosti delcev, vrste substratov (struktura in vsebnost vlage) in števila vrtljajev (Carlsson et al., 2012; Sambusiti, 2013). Čeprav se je pri večini študij, ki so bile narejene na laboratorijskem modelnem merilu, pokazala pozitivna ekonomska bilanca uporabe mehanske obdelave (Lindmark et al., 2012; Hendrik in Zeeman, 2009; Menardo et al., 2012; Thorin et al., 2012) so eksperimenti bili narejeni v šaržnem sistemu, ki pa ne odraža ne semi-kontinuiranega sistema, niti ne industrijskega realnega modelnega merila (Sambusiti, 2013). Čeprav z mletjem zmanjšamo velikost delcev, povečamo tvorbo metana, zmanjšamo

zadrževalni čas (poveča se hitrost hidrolize), je energija, ki jo moramo vložiti za mletje še vedno prevelika. Ker se cene električne energije kontinuirano dvigajo, mletje še vedno ekonomsko ni izvedljivo (Hendriks in Zeeman, 2009). Za oceno ekonomske vzdržnosti in energetskega ravnotežja procesa anaerobne presnove je treba upoštevati tudi ceno opreme, gradnje, stroške vzdrževanja, energijo za ogrevanje in mešanje anaerobnih reaktorjev (Sambusiti, 2013).

Müller et al. (2004) so raziskovali učinkovitost naslednjih predobdelav na odvečno blato iz ČN Emschergenossenschaft (Nemčija), velikosti 17.000 PE: kroglični mlin, ultrazvok, lizat centrifuge (lysate centrifuge) in ozon. V vseh primerih so predhodno obdelali celotno blato, ki so ga vnašali v anaerobni reaktor, v primeru ultrazvoka pa so predobdelali le 1/3 blata. Največjo stopnjo razgradnje (DD) so dosegli z ozonom, ki pa je porabil največ energije, sledili so ultrazvok, mehansko mletje in lysate centrifuge, v tem vrstnem redu. Za predobdelave so podali ekonomsko oceno, ki zajema: investicijske stroške, stroške vzdrževanja opreme predobdelave, stroške rezervnih delov, stroške upravljanja predobdelave, porabo energije za predobdelavo, stroške za dodatno kogeneracijo, povečano potrebo po flokulantih, stroške zaradi dodatnega čiščenja povratnega toka, zmanjšanje stroškov zaradi povečane proizvodnje elektrike in zmanjšane stroškov zaradi zmanjšanja količine blata za odlaganje. Predobdelava blata z različnimi postopki je učinkovita oziroma upravičena samo takrat, ko so stroški odlaganja odvečnega blata visoki. Stroški investicije in poraba energije predstavljajo večino stroškov, ki nastanejo, zato je potrebno, da je učinkovitost predobdelav čim boljša. Zaradi specifičnosti vsake posamezne čistilne naprave, je za vsako enoto potrebno pretehtati argumente za in proti nadgradnji s predobdelavo. Pri tem imajo pomembno vlogo problemi, ki se pojavljajo pri delovanju anaerobnih reaktorjev: slaba razgradnja blata, slaba sposobnost dehidracije blata, preobremenjenost anaerobnih reaktorjev, penjenje odvečnega blata zaradi filamentoznih mikroorganizmov in drugi.

Zhang in drugi (2013) so raziskovali vpliv velikosti delcev organskih odpadkov na pridobivanje metana v šaržnem in semi-kontinuiranem procesu. Ugotovili so, da je v reaktorju, kjer so dozirali organske odpadke z bolj fino mletimi delci ($d < 4$ mm), pospešena kinetika tvorbe metana, vendar je skupni bioplinski donos med fino mletimi in grobo mletimi vzorci bil enak. Zato ni nujno, da manjša velikost delcev vedno vodi do izboljšanja delovanja anaerobne presnove. Hitrejša kinetika lahko pogojno omogoča večjo organsko obremenitev in s tem povečanje tvorbe bioplina. Pri organski obremenitvi 6 g OS/l in ob dodajanju fino mletih vzorcev bioloških odpadkov, je v semi-kontinuiranem anaerobnem reaktorju prišlo do penjenja do take mere, da se je zaradi pene zamašila plinska cev na vrhu reaktorja. Pri grobo mletih odpadkih (velikost delcev < 20 mm) do pojava tvorjenja pene ni prišlo.

Ekonomske analize na področju dodajanja encimov, ki bi izhajale iz realnega modelnega merila in bi bila javno objavljena v strokovni in znanstveni literaturi, vsaj po naših vedenjih, še niso bile narejene ali pa nam niso dostopne. Zasedili smo le raziskavo Heiermann-ove in drugih (2011), ki so opravili eksperimente na bioplinski elektrarni Fehrbellin (Nemčija), kjer so kot substrat uporabljali travno silažo, ki so ji dodajali encime in jo po 24 urah dozirali v predfermentor. Naslednja dva meseca so ob travni silaži dozirali še naslednje substrate: gnoj, šrot iz žit, koruzni šrot, koruzno silažo in ostanke krme. Cena encimov je znašala 6 €/kg, kar je v enem mesecu pomenilo 5400 € stroškov. Ob predpostavki, da donos metana, ki je posledica dodajanja encimov, ostane konstanten, je čisti letni profit bioplinske elektrarne 71.000 €, če je električna energija, ki je proizvedena iz metana prodana po ceni 0,19 €/kWh. Prav tako se je za 4 % zmanjšala poraba elektrike za mešanje vsebine reaktorjev, kar

je okrog 2428 €/leto, če je cena električne energije 0,11 €/kWh (Heiermann et al., 2011; Quiñones et al., 2012).

Druge prednosti dodajanja encimov so še naslednje: preprečitev tvorjenja skorje v reaktorju, zaradi povečane tvorbe metana se lahko zmanjša zadrževalni čas v anaerobnih reaktorjih, povečanje organske obremenitve reaktorjev, zmanjšanje porabe substratov in zamenjava s cenejšimi substrati (Quiñones et al., 2012).

2.9.6 Raziskave na področju lignoceluloznih substratov in blata iz ČN

2.9.6.1 Encimska razgradnja

Encimi so kompleksne organske molekule beljakovin in so prisotni v vseh živih celicah. Encimi pospešijo biokemične reakcije. Najbolj obetavni encimi za predobdelavo lignoceluloznih substratov pred procesom anaerobne presnove so hidrolaze. Encimi, ki jih izločajo mikroorganizmi v anaerobnem reaktorju imajo zmanjšano sposobnost razgradnje celičnih sten, zato z dodajanjem hidrolitskih encimov, ki jih proizvedejo v industriji, lahko izboljšamo razgradnjo substratov in posledično povečamo tvorbo metana v procesu anaerobne presnove (Quiñones et al., 2012). S predhodno obdelavo lignoceluloznih substratov osvobodimo sladkorje, ki se nahajajo znotraj celuloznih vlaken, znotraj matrice celične stene rastline (Agbor et al., 2011). Glavni izziv lignoceluloznih substratov pri pretvorbi v energetske vire predstavlja njihova sestava in struktura, kjer so plasti lignina povezane s celulozo in hemicelulozo, kar ovira encimsko hidrolizo (Frigon et al., 2012). Proces, ki pretvori katerikoli vir lignocelulozne biomase iz njene prvotne oblike, ki se zelo dobro upira procesu hidrolize s celuloznim encimskim sistemom, v obliko, kjer je encimska hidroliza učinkovita, se v bioprocenem inženirstvu imenuje predobdelava (Lynd et al., 2002; cit. po Agbor et al., 2011). Encimska hidroliza ali oksidacija lignina pri pridobivanju bioplina še ni raziskana v zadostni meri. Znano je, da so encimi ligninaze (kot so lakaze, lignin peroksidaze in mangan peroksidaze) zmožne delignifikacije lignoceluloze (Ohkuma, 2003; Hatakka, 1994; cit. po Bruni et al., 2010a,b).

Zhong in drugi (2011) so v vseh primerih avtoklavirali fino mleto koruzno slamo (120 min., temperatura 121°C) in kot predobdelavo dodali kompleksne mikrobne dodatke, ki so vsebovale celulitske bakterije *B. licheniformis* sp., *Pseudomonas* sp., *B. subtilis* sp. In *P. florida* sp., ki imajo sposobnost razgradnje lignoceluloznega materiala, *B. licheniformis*, *Pseudomonas* sp., *B. subtilis* sp., ki razgradijo celulozo in hemicelulozo ter *P. florida* sp. za razgradnjo lignina. Rezultati merjenja biometanskega potenciala so pokazali, da se je, v primerjavi s predhodno samo avtoklaviranimi vzorci, ki jim niso dodali bakterij, tvorba metana povečala za 26,7 do 75,57 %, odvisno od dolžine procesa (Zhong et al., 2011).

Povečanje prirastka metana pri procesu anaerobne razgradnje sveže trave *Panicum vergatum* z dodajanjem encimov dveh peroksidaz lignin peroksidaze (LiP), mangan peroksidaze (MnP) ter dveh pektinaz pectate-lyase (PL) in poly-galacturonase (PG) s kombinacijo kemijske predobdelave so proučevali Frigon in drugi (2012). Določili so vpliv blage predobdelave na topnost trave in ocenili tvorbo metana pri anaerobni presnovi. Uporabili so 0,5 l šaržne reaktorje, temperatura procesa je bila 35 °C. Tvorba metana pri neobdelani travi je bila 157 ml CH₄/g OS, pri travi z dodatkom LiP 202,1 ml CH₄/g OS in pri travi z dodatkom MnP 222,9 ml CH₄/g OS. Največji doprinos metana je bil pri kombinaciji alkalne obdelave in obdelave z LiP ter MnP, ki se je v primerjavi z neobdelano travo,

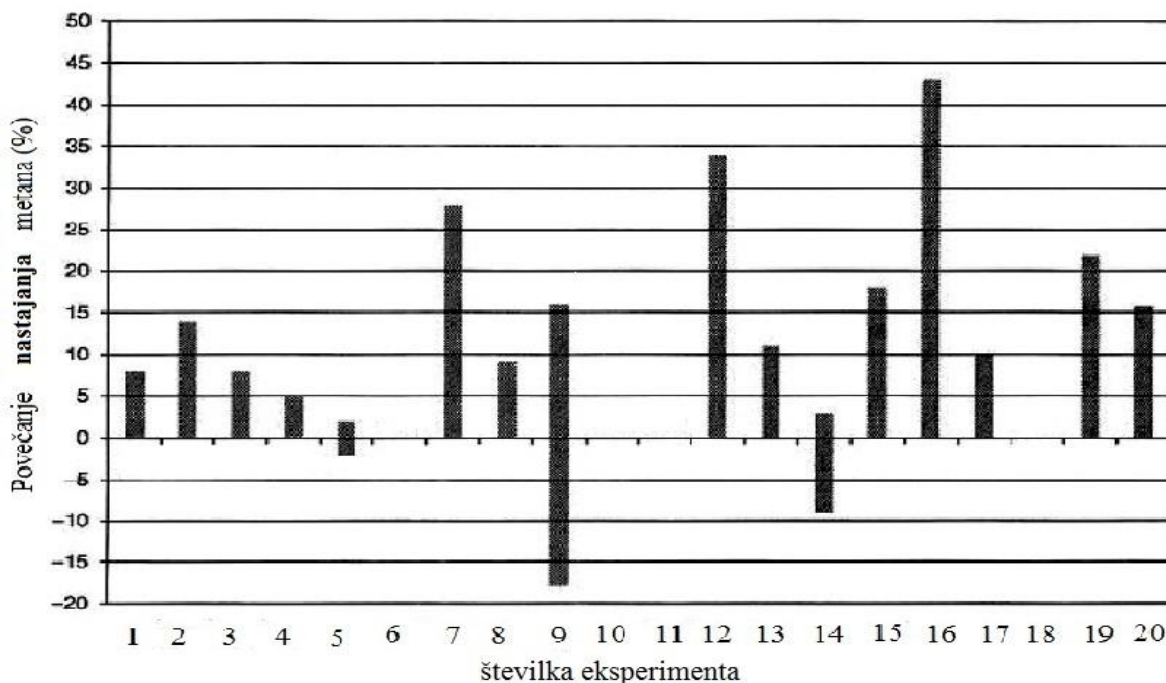
povečal za 55%, vendar ekonomske analize, kjer bi upoštevali stroške predobdelav, niso naredili (Frigon et al., 2012).

Gomez-Tovar in drugi (2012) so v kontinuiranem UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) reaktorju s kombinacijo predobdelav, kot so kislinska hidroliza, alkalna hidroliza in encimska hidroliza s celulazami, določili doprinos metana ovsene trave glede na različne organske obremenitve reaktorja. Maksimalni izplen metana 340 ml CH₄/g KPK je bil dosežen pri organski obremenitvi 2,5 g KPK/l na dan pri uporabi hidrolizata kislín. Pri povečanju obremenitve na več kot 7 g KPK/l na dan, je bilo opaziti 15 % padec prirasta metana. Pri uporabi encimskega hidrolizata je izplen metana dosegel vrednost 360 ml CH₄/g KPK, pri organskih obremenitvah, ki so presegle 8 g KPK/l na dan. (Gomez-Tovar et al., 2012).

Povečanje produkcije bioplina je možno tudi z mezofilnim lignocelulitskim mikrobnim konzorcijem BYND-5, kar so na vzorcih riževe slame preučevali Yang in drugi (2012). Analize mikrobnih združb, ki so jih izvedli z metodo ARDRA, so pokazale, da so v procesu bile prisotne naslednje skupine bakterij: *Firmicutes* (5,96 %), *Bacteroidetes* (40 %), *Deferribacteres* (8,94 %), *Proteobacteria* (16,17 %) ter člani skupin *Lentisphaerae* (2,13 %) in *Fibrobacteraceae* (1,70 %). Količina metana se je v primerjavi z neobdelanim vzorcem riževe slame povečala v povprečju za 10 %, maksimalen delež povečanja metana pa je bil 20 %. Količina celotnega plina se je v primerjavi s kontrolo povečala za 9,3 % (Yan et al., 2012).

Eksperiment s kombiniranjem več različnih substratov, med katerimi so bili kravji gnoj in mešanica biološko razgradljivih kmetijskih in gospodinjskih odpadkov, sta raziskovala Ashekuzzaman in Poulsen (2011). Naredila sta dva seta eksperimentov, in sicer na laboratorijskem modelnem merilu in realnem modelnem merilu na treh majhnih bioplinarnah v Bangladešu. Na laboratorijskem modelnem merilu, kjer sta uporabila 250 ml steklenice in mezofilno temperaturno območje pri 35 °C, sta imela naslednje kombinacije substratov: kravji iztrebki, piščančja stelja, ovčji gnoj, ostanki hrane, listje in trava. Vsem substratom sta pred dodajanjem v anaerobne reaktorje z mehansko predobdelavo zmanjšala velikost delcev pod 0,5 cm. Pri biometanski potencialih posameznih substratov po 37 dneh, je največji izplen 199 ml CH₄/kg OS bil pri odpadni hrani. Sledili so kravji iztrebki z izplenom 133 ml CH₄/kg OS, piščančja stelja in ovčji gnoj s 105 ml CH₄/kg OS ter kombinacija listov in trave s 45 ml CH₄/kg OS. S kombinacijo piščančje stelje, ovčjega gnoja, ostankov hrane ter listov in trave sta uspela doseči biometanski potencial 268 ml CH₄/kg OS. To nakazuje, da presnova s kombinacijo več substratov (kodigestija) lahko poveča izplen metana veliko bolj kot uporaba oziroma presnova samo ene vrste substrata. Vendar metanskega donosa kombinacij več substratov ni mogoče določiti iz podatkov za posamezni substrat. Le tega je treba izmeriti s pripravo kombinacij (Ashekuzzaman in Poulsen, 2011).

Quiñones et al. (2012) so zbrali različne raziskave na področju povečanja produkcije metana z dodajanjem različnih hidrolitskih encimov. Eksperimenti so bili narejeni v šaržnih in kontinuiranih reaktorjih, na laboratorijskem in realnem modelnem merilu. V nekaterih eksperimentih niso zaznali nobenega učinka encimov (št. 6, 10, 11 in 18 na sliki 13), v nekaterih primerih je tvorba metana upadla, v nekaterih primerih pa je narasla. Največje povečanje produkcije metana se je gibalo med 28 % do 43 %, povprečno povečanje metana je znašalo okrog 15 %. Čeprav so najvišje in najnižje metanske donose določili v šaržnih eksperimentih, navajajo, da naj bi obstajal splošen trend med metanskimi donosi med šaržnimi in kontinuiranimi eksperimenti. Rezultati, narejeni na kontinuiranih sistemih, so za iste skupine substratov vedno dali manjše metanske donose.



Slika 13: Izboljšanje tvorjenja metana po dodajanju encimov v različnih eksperimentih (Quiñones et al., 2012).

Figure 13: Enhancement of methane yield of various experiments after addition of enzymes (Quiñones et al., 2012).

Biološko razgradnjo lignoceluloznih substratov pospešujejo encimi kot so celulaze in hemicelulaze. Te encime proizvajajo mikroorganizmi. Hitrostno omejen korak anaerobne presnove lignoceluloznih substratov je hidroliza celuloze in hemiceluloze. Zato je pospešitev hidrolize ključnega pomena pri izboljšanju učinkovite pretvorbe biomase v procesu anaerobne presnove v energijo (Romano et al., 2009). Romano in drugi (2009) so preiskovali vpliv dodajanja eksogenih encimov na delovanje anaerobne presnove. Ključni vprašanja sta bili, če in kdaj dodajanje encimov, kot so celulaze in hemicelulaze izboljšajo hitrost anaerobne presnove in izplen bioplina pri lignoceluloznih substratih. S pomočjo 16S rRNA analize so identificirali bakterijsko populacijo v anaerobnem presnovališču, ki je sposobna presnoviti pšenično travo. Lignocelulozni substrat je bila *Jose Tall* pšenična trava, ki so jo pred eksperimentom na polju posušili in naredili bale. Povprečna dolžina trave je bila 50 cm. V laboratoriju so jo nato zmleli na velikost med 0,23 in 0,38 mm. Za lažje odstranjevanje pšenične trave so le to dali v najlonsko nogavico. Merili so vsebnost organske snovi, suhe snovi, celulozo, hemicelulozo in lignin. Za šaržne eksperimente so uporabili 250 ml in 1000 ml reaktorje. Izvedli so 5 različnih eksperimentov. V prvem in druge, ki sta potekala v okolju s pH = 5 in pH = 7 so določili vpliv encimov na hidrolizo. Glede na to analizo so nato: (1) encime dozirali direktno v enostopenjski reaktor, (2) predhodno obdelali substrat pred doziranjem v enostopenjski proces, kjer potekajo vse faze anaerobne presnove, (3) dozirali encime v prvi reaktor, kjer poteka hidroliza v dvostopenjskem procesu. Eksperimenti so bili izvedeni pri temperaturi 50 °C, saj je to bila temperatura, pri kateri so encimi delovali optimalno, kar je nižje kot pri termofilnih pogojih, ki se jih po navadi raziskuje v temperaturnem območju med 55 in 65 °C. Pri vseh reaktorjih so uporabili citrat fosfatni pufer. Organska obremenitev s substratom je v vseh primerih bila 10 g OS/l. Pri šaržnih eksperimentih z dodajanjem encimov v enostopenjski reaktorski sistem ni bilo bistvene razlike med nastankom bioplina brez dodajanja encimov in z dodajanjem encimov. V eksperimentu s predhodno obdelavo z encimi, so encimi pospeševali hidrolizo prvih 7 dni, nato pa je bil dodan še inokulum. Po preteku 14

dni ni bilo zaznati znatne razlike v proizvodnji metana, redukciji organske snovi med reaktorji s predhodno obdelavo z encimi in reaktorji brez obdelave z encimi. Nizki metanski prirastki in redukcija organske snovi pomenijo, da je za učinkovito razgradnjo pšenične trave potrebna bolj agresivna predobdelava. 16S rRNA sekvenčna analiza je razkrila, da so bile med inokulumi občutne razlike. Nakisan inokulum je imel večjo populacijo vrst *Thermotogae* (Romano et al., 2009).

2.9.7 Raziskave na področju odvečnega blata čistilnih naprav

Hidroliza je hitrostno omejen korak pri procesu anaerobne presnove in poteka najpočasneje v primerjavi z ostalimi tremi koraki. Zato blatu pred anaerobno presnovo lahko zmanjšamo velikost dovedenih delcev blata in na ta način pospešimo hidrolizo in posledično izboljšamo anaerobno presnovo. Podatki različnih avtorjev, ki sta jih zbrala Yeow in Peng (2012), kažejo da se z večanjem gostote predobdelave z ultrazvokom manjša velikost delcev (Preglednica 7), vendar Pilli in drugi (2011) poročajo, da preveč intenzivna predobdelava z ultrazvokom lahko privede do zlepljenja kosmov.

Müller in drugi (1998) so raziskovali vpliv razkroja blata in vpliv na anaerobno presnovo. Imeli so 4 različne predobdelave: kroglični mlin, visokotlačni homogenizator, ultrazvok in »shear gap« homogenizator. Za eksperiment so uporabili 20 l kontinuirane reaktorje. Proces je bil dvostopenjski in je potekal pri temperaturi 35 °C. Odvečno blato iz ČN je vsebovalo 1 do 4 % suspendiranih trdnih snovi (suspended solids) in 70 % organskih suspendiranih trdnih snovi (volatile suspended solids). Mehanske predobdelave blata so pospešile biološko razgradnjo blata, pri tem se je znatno povečala tvorba bioplina in razgradnja organskih snovi. Stopnja razgradnje v primerjavi z neobdelanim blatom je bila višja za 10 do 20 % (Müller et al., 1998).

Neis in drugi (2000) so optimizirali razgradnjo blata iz čistilnih naprav in proučevali anaerobno razgradnjo blata, ki je bilo predhodno obdelano z ultrazvokom. Za eksperiment so uporabili 5 pilotnih reaktorjev volumna 200 l na čistilni napravi Bad Bramstedt, katere velikost je 85000 PE. Temperatura delovanja je bila 37°C (mezofilno območje). Povprečni zadrževalni čas ČN je bil 16 dni, vsebnost suhe snovi blata se je gibala med 0,7 in 2,6 %, koncentracija organske snovi pa je bila 78 %. Visoko zmogljiv ultrazvočni reaktor volumna 1,28 l je deloval na frekvenci 31 kHz z intenziteto med 5 in 18 W/cm² ter imel vgrajenih 48 piezokeramičnih ultrazvočnih sond. V semi-kontinuiranih pilotnih reaktorjih so vsak dan odvzeli in dozirali določen volumen blata. Čas predobdelave z ultrazvokom blata je znašal 90 sekund, izvajali so ga tik pred doziranjem. Določili so stopnjo razgradnje blata glede na specifično energijo in vpliv suhe snovi na potrebno specifično energijo za razgradnjo blata. Specifična energija je definirana kot količina energije, ki je v tesni povezavi s vsebnostjo suhe snovi. Do učinkovitejše razgradnje pride pri višji koncentraciji trdnih snovi v blatu. Več prisotnih trdnih snovi v tekočini lahko pripomore k povečanemu številu kavitacijskih območjih. Mogoče obstaja optimalna koncentracija trdnih snovi, kjer se homogena distribucija akustičnih valov porazdeli z učinkom absorpcije. Povprečna stopnja razgradnje (DD – degree of disintegration), ki so jo dosegli z ultrazvokom, je bila 20 %. Povečane hitrosti razgradnje so vplivale tudi na znatno povečanje produkcije bioplina. Koncentracija metana v bioplinu se je gibala med 67 in 72 %, delež metana je bil nekoliko večji v reaktorjih, ki so imeli opravka z blatom, ki so ga predobdelali z ultrazvokom. Največ bioplina je nastalo pri ultrazvočno obdelanem blatju z zadrževalnim časom blata 4 dni, manj ga je nastalo pri zadrževalnem času 8 dni. Pri zadrževalnem času blata 16 dni je z ultrazvočno predobdelavo nastalo le nekoliko več bioplina v primerjavi s kontrolnim reaktorjem, vendar je ta povečana tvorba bioplina v primerjavi z 8 dnevnim in 4 dnevnim zadrževalnim časom blata bila majhna. S tem so

dosegli večje hitrosti odstranjevanja blata, pospešili so hidrolizo in skrajšali zadrževalni čas blata. Pri skrajšanju zadrževalnega časa iz 16 na 4 dni ni prišlo do poslabšanja učinkovitosti razgradnje (Neis et al., 2000).

Z ultrazvočno predobdelavo aktivnega blata lahko: (1) zmanjšamo količino aktivnega blata, (2) dosežemo izboljšanje dehidracije blata (dewaterability), (3) izzovemo sproščanje topnega KPK iz bioloških trdnih snovi in pretvorbo v biološko razgradljive snovi, (4) uničenje filamentoznih mikroorganizmov, ki povzročajo penjenje blata (Dewil et al., 2006). Dewil in drugi (2006) so proučevali vpliv ultrazvočne predobdelave na aktivno blato. Preizkušali so tri različna blata pri različni vsebnosti suhe snovi (med 3,5 in 14 g SS/l aktivnega blata). Zanimalo jih je, kako čas trajanja predobdelave vpliva na specifično energijo (SE), velikost delcev in KPK v filtratu. Uporabili so 2,3 l šaržne reaktorje. Frekvenca ultrazvoka je bila 20 kHz, čas obdelave pa 30 min. Reaktor je bil med ultrazvočno obdelavo hlajen, tako da temperatura ni narasla čez 20 °C. Minimalna specifična energija, ki so jo morali dovesti blatu, da je prišlo do razgradnje blata, je bila 1500 kJ/kg SS. Manjše vrednosti SE niso imele vpliva na topni KPK. Učinkovitost razgradnje je naraščala s vsebnostjo suhe snovi, manjša je bila SS, manjša je bila sprememba KPK, oziroma z isto dovedeno specifično energijo je vsebnost KPK v blatu z večjim deležem suhe snovi bolj narasla v primerjavi z blatom z manjšim deležem suhe snovi. Pri vsebnosti suhe snovi nad 15 g SS/l je vsebnost KPK v filtratu močno upadla. To je bilo zaradi povečanja viskoznosti blata, kar pa zmanjša vpliv kavitacije. Pri povečani viskoznosti se ultrazvočni valovi zaradi delcev suhe snovi raztresejo in absorbirajo v tekočino, ki jo nato posledično segrevajo, namesto da bi ustvarjali mehurčke, ki so potrebni za kavitacijo. Vpliv ultrazvoka na dehidracijo je lahko negativen. Z ultrazvokom se velikost kosmov zmanjša, kar lahko pripelje do zmanjšane zmožnosti za dehidracijo blata. Za doseganje suhe snovi dehidriranega blata med 22 in 24 % je bilo treba dodati večje količine polielektrolita. Tako se doziranje polielektrolita podvoji, ko SE ultrazvoka naraste iz 5500 na 22000 kJ/kg SS. Do zmanjšanja sposobnosti za dehidriranje pride zaradi večje površine delcev, ki zaradi tega polielektrolitom nudi več mest za njihovo vezavo. Potreba po večjem doziranju polielektrolitov lahko ekonomsko izniči koristi izmerjenih pozitivnih vplivov (povečano izločanje KPK) (Dewil et al., 2006).

Predobdelava blata iz ČN z ultrazvokom pri nizkih gostotah predobdelave z ultrazvokom med 0,04 in 0,1 W/ml je učinkovita metoda za razgradnjo blata. Vodi v povečano anaerobno razgradnjo, vendar zmanjša filtrirne karakteristike biološkega blata (Erden in Filibeli, 2010). V študiji Erdena in Filibeli-ja (2010) je prikazano, kako na biološko blato vpliva obdelava z ultrazvokom pri gostotah med 0,04 in 0,1 W/ml. Na laboratorijskem modelnem merilu sta preučevala sta predvsem velikost delcev, izboljšanje anaerobne presnove in filtrirne karakteristike blata. Za določevanje biometanskega potenciala (BMP) sta uporabila 150 ml reaktorje, proces anaerobne presnove pa je potekal pri temperaturi 36±1 °C. Frekvenca ultrazvočnega homogenizatorja Sonoplus HD 2200 je bila 20 kHz, njegova moč pa 200 W. Za vsak eksperiment sta naenkrat ultrazvočno obdelala 500 ml blata, ne da bi ga hladila. Dovedena specifična energija za BMP je bila 9690 kJ kg⁻¹ SS, čas predobdelave z ultrazvokom pa 40 min. Kumulativno količino nastalega metana sta spremljala 35 dni. Pri blatu, ki je bilo predhodno obdelano z ultrazvokom, je nastalo 44 % več biometana v primerjavi z neobdelanim blatom. Stopnja razgradnje (DD) omogoča oceniti maksimalno topnost blata. Povečana stopnja razgradnje (DD) je določena kot snov, ki je lahko takoj uporabljena za pridobivanje metana med anaerobno presnovo. Dovedena specifična energija je bila med 0 in 15880 kJ kg⁻¹ SS. Suha snov blata je bila 2,14 %, organska snov v suhem vzorcu pa 47,99 %. Maksimalna stopnja razgradnje 57,9 % je bila dosežena pri specifični energiji 9690 kJ kg⁻¹ SS. Pri večji dovedeni SE je stopnja razgradnje začela upadati, kar pomeni, da je pred topnostjo že prišlo do mineralizacije blata. Večje zmanjšanje velikosti delcev je bilo zaznati pri višjih specifičnih energijah. Največje zmanjšanje je bilo pri

specifični energiji 9690 kJ kg⁻¹ SS, kjer je bilo zaznati 62 % zmanjšanje velikost delcev glede na povprečni volumski delež (Erden in Filibeli, 2010).

Minimalna specifična energija za razbijanje celic se giblje med 1000 kJ/kg SS (Bougrier et al., 2005) in 3000 kJ/kg TS (Lehne et al., 2001). Pri večji specifični energiji nad 1000 kJ/kg SS sta se povečali topnost in stopnja razgradnje, in sicer za SS = 15.000 kJ/kg SS se je topnost KPK povečala za 35 %, stopnja razgradnje DD pa je bila 55 % (Bougrier et al., 2005).

Preglednica 6: Izboljšanje razgradnje aktivnega blata pri različnih eksperimentih.

Table 6: Degradation improvement of active sludge during various experiments.

SE [kJ kg ⁻¹ SS]	Čas predobdelave z ultrazvokom [min]	DD [%]	SRT [dan]	Vrsta procesa	Povečanje deleža metana v primerjavi z izhodiščnim vzorcem [%]	Vir
200	(a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40	-	11	Šaržni, volumen reaktorja 0,5 l	(a) 12 (b) 31 (c) 64 (d) 69	(Wang et al., 1999)
-	(a) 7,5 (b) 30 (c) 60 (d) 150	(a) 0 (b) 4,7 (c) 13,1 (d) 23,7	8	Semi-kontinuirani, volumen reaktorja 1 l	(a) 1,11 (b) 4,93 (c) 7,16 (d) 9,71	(Tiehm et al., 2001)
-	(a) 111 W (b) 356 W	-	15	kontinuirani volumen reaktorja 100 l	(a) 6,06 (b) 2,95	(Quarmby et al., 1999)
-	Vse 1 min (a) 0,18 W/ml (b) 0,33 W/ml (c) 0,52 W/ml	-	4	Šaržni, volumen reaktorja 1,5 l	(a) 3,02 (b) 10,9 (c) 12,5	(Pilli et al., 2011, Mao in Show, 2007)
	(a) 10 (b) 20 (c) 30	-	(a) 15 (b) 7,5 (c) 7,5	kontinuirani volumen reaktorja 4 l	(a) 40 (b) 16 (c) 95	(Apul in Sanin, 2010)
(a) 5000 (b) 5000 (c) 2500 (d) 2500	(a) 4 (b) 4 (c) 2 (d) 2	(a) 9 (b) 9 (c) 4 (d) 2,2	(a) 20 (b) 10 (c) 10 (d) 10	Kontinuirani, volumen reaktorja 7 l	(a) 26,70* (b) 21,95* (c) 20,34* (d) 8,12*	(Braguglia et al., 2011)
9690	40	57,9	35	Šaržni, volumen reaktorja 150 ml	44	(Erden in Filibeli, 2010)
(a) 660 (b) 1355 (c) 2700 (d) 6951 (e) 14547	-	(a) 14 (e) 55	16	Šaržni, volumen reaktorja 100 ml	(a) 10,87* (b) 19,92* (c) 20,23* (d) 34,29* (e) 37,5*	(Bougrier et al., 2005)

* povečanje deleža bioplina v primerjavi z izhodiščnim vzorcem

Xing in drugi (2007) so ocenili delovanje ultrazvoka na čistilni napravi v Singapurju na realnem modelnem merilu. Velikost reaktorja za ultrazvočno predobdelavo je bila 3,5 l, frekvenca sonikatorja 20 kHz, moč 6 kW, število sonotrod, ki so med sabo bile oddaljene 5 cm, pa je bilo 6. Z njihovo študijo so želeli tehnično presoditi delovanje izbranega ultrazvočnega sistema na predobdelavo blata za povečanje tvorbe bioplina pri procesu anaerobne presnove. Imeli so kontrolni reaktor in reaktor, v katerega so dovajali blato obdelano z ultrazvokom. Pri blatu, ki je bilo obdelano z ultrazvokom, se je povečala dnevna tvorba bioplina med 13 % in 58 %. Delež metana in ogljikovega dioksida v bioplenu se ni spremenil ne v kontrolnem reaktorju, ne v reaktorju s predobdelavo. Razmerje med neto proizvedeno energijo in neto porabljeno energijo za predobdelavo z ultrazvokom je bilo 2,5, pri predpostavki, da iz 1 m³ metana dobimo 2,2 kWh. S študijo na realnem modelnem merilu so pokazali, da predobdelava z ultrazvokom izboljša proces anaerobne presnove in je energetsko primeren način predobdelave (Xing et al., 2007).

Raziskave Hogana in drugih (2004) na realnem modelnem merilu so pokazale, da se investicija v predhodno obdelavo blata z ultrazvokom povrne v dveh letih in je torej ekonomsko upravičena. Ultrazvok so testno vgradili na naslednjih čistilnih napravah: Anglian Water (Velika Britanija), Kavlinge (Švedska) in Orange County Sanitation District (ZDA) (Hogan et al., 2004).

Preglednica 7: Vpliv predobdelave z ultrazvokom na velikost delcev (Yeow in Peng, 2012).

Table 7: Effect of ultrasound pretreatment on particle size (Yeow and Peng, 2012).

Frekvenca 20 kHz			Zmanjšanje velikosti delcev [μm]		opombe
Vhodna moč (kW)	Gostota (W/ml)	Čas (min)	Začetna	Končna	
2,2	0,67	240	209	32,4	Z večanjem gostote ultrazvoka se je velikost delcev zmanjšala.
	1,28			28,5	
	2,20			22,6	
	3,22			18,1	
1,5	0,18	1	51	29-38	
	0,33			19-29	
	0,52			15-21	
0,11	0,11	120	98,9	97,5	
	0,33			4,0	

Za povišanje razgradnje, zmanjšanje zadrževalnega časa, maksimiranje razgradnje organskih snovi ter njihovo pretvorbo v bioplin bo potrebno nadgraditi sistem čiščenja aktivnega blata na čistilnih napravah (Braguglia et al., 2011). Braguglia in drugi (2011) so raziskovali anaerobno presnovo s predobdelavo blata z ultrazvočno predobdelavo in pregledom ravnovesja med toploto in energijo. Organska obremenitev se je gibala med 0,7 in 2,8 g OS/l dan. Uporabili so UP400S ultrazvočni homogenizator, proizvajalca Dr. Hielscher, s frekvenco 24 kHz in močjo 300 W. Volumen ultrazvočno predobdelanega blata je bil 500 ml. Dovedene specifične energije so se gibale med 0,35 in 1,4 kWh/kg SS, suha snov (SS) blata pa je bila med 2,1 in 5,0 %. Ultrazvočna sonda, ki so jo uporabili v eksperimentu, je namenjena delu na laboratorijskem modelnem merilu, zato njena učinkovitost v smislu kavitacije in stopnje razgradnje ni bila tako dobra kot pri ultrazvočnih sondah, ki so namenjene realnemu modelnemu merilu. To gre pripisati predvsem konstrukciji dezintegratorja, kjer je na realnem modelnem merilu razmerje med volumnom ultrazvočnega reaktorja (posode) in površino emitorja boljše, ter višjo dozo dovedene energije v posodi v tehničnem modulu v primerjavi z laboratorijskim modulom. Uporabili so 2 semi-kontinuirana reaktorja z volumnom 7 l, pri čemer je prvi služil kot kontrolni reaktor. Temperatura, pri kateri je potekala anaerobna presnova, je bila 37 °C, hidravlični zadrževalni čas (HRT) pa 20 dni. Specifična tvorba bioplina (metan in ogljikov dioksid) pri

ultrazvočno predobdelanem blatu se je gibala od 0,29 do 0,37 Nm³kg⁻¹OS_{dozirana}, odvisno od pogojev delovanja. V vseh eksperimentih je pri predhodno obdelanem blatu v primerjavi z neobdelanim nastalo več bioplina. Največja razlika je bila v primeru organske obremenitve 0,7 g OS/l dan in zadrževalnim časom 20 dni. Specifična dovedena energija je bila 5000 kJ/kg TS%, stopnja razgradnje pa 9,0 %. V teh pogojih se je pri kontroli ustvarilo 0,27 Nm³kg⁻¹OS_{dozirana} bioplina, pri predhodno obdelanem blatu pa 0,37 Nm³kg⁻¹OS_{dozirana}, kar potrjuje dve različni prehranjevalni poti, pri kateri so v kontrolni reaktor dozirali neobdelano blato, v drugi pa močno razgrajeno blato. Povečanje v proizvodnji bioplina pri anaerobni presnovi ultrazvočno predobdelanega blata je zadostovalo samo za 10 % energije, ki je potrebna za ultrazvočno predobdelavo. Avtorji poudarjajo, da je blato bilo zelo razredčeno, njegova povprečna koncentracija je bila 23 gl⁻¹ (Braguglia et al., 2011). Različni avtorji so dokazali, da s povečanjem koncentracije blata in konstantno vhodno specifično energijo, povečamo stopnjo razgradnje (Nicke et al., 1999; Eder in Guentert, 2002; v Braguglia et al. 2011). Barber (2005), ki je delal poskuse na ČN v Mannheimu, navaja da 1 kW ultrazvočne energije, ki se porabi za dezintegracijo aktivnega blata pred anaerobno fermentacijo, proizvede 7 kW električne energije vključno z izgubami. S poskusi na realnem modelnem merilu in s suho snovjo blata 10 % je dosegel povečanje bioplina za 35 %, in sicer iz 458 na 591 l bioplina kg⁻¹ OS_{doziranje}.

2.10 Višina podpore za električno energijo obnovljivih virov, proizvedene na bioplinskih elektrarnah in elektrarnah na čistilnih napravah v Sloveniji

V Sloveniji je višina podpore električne energije iz obnovljivih virov energije določena z Uredbo o podporah električni energiji, proizvedeni iz obnovljivih virov energije (OVE) (http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf; UL RS št. 37/2009:1780). Glede na nazivno električno moč se proizvodne naprave OVE po tej uredbi delijo na naslednje velikostne razrede (UL RS št. 37/2009:1780):

1. mikro: nazivne električne moči manjše od 50 kW,
2. male: nazivne električne moči manjše od 1 MW,
3. srednje: nazivne električne moči od 1 MW do vključno 10 MW,
4. velike: nazivne električne moči nad 10 MW do vključno 125 MW,
5. proizvodne naprave OVE nazivne električne moči 125 MW in več.

Električna energija iz proizvodnih naprav na bioplin, proizvedena z večjim deležem gnoja in gnojevke, je upravičena do dodatkov k zagotovljenim cenam ali obratovalnim podporam. Proizvodne naprave obnovljivih virov energije, ki proizvajajo električno energijo iz geotermalne energije, bioplina ali biološko razgradljivih odpadkov, so upravičene do dodatkov k zagotovljenim cenam ali obratovalnim podporam, če na letni ravni koristno izrabijo toploto v zahtevanem obsegu vhodne energije goriva.

Če se letno koristno izrabi toplota v obsegu več kot 15 % vhodne energije bioplina, je proizvodna naprava obnovljivih virov energije upravičena do izplačila dodatka v višini 10 % obratovalne podpore za to proizvodno napravo obnovljivih virov energije. Toplota iz bioplinarne, ki se porabi pri pridobivanju bioplina, se ne šteje za koristno toploto (http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf). Če gnoj in gnojevka letno pomenita prostorninsko več kot 30 % substrata pri pridobivanju bioplina, je proizvodna naprava upravičena do izplačila dodatka v višini 10 % obratovalne podpore za to proizvodno napravo. Če gnoj in gnojevka letno pomenita prostorninsko več kot 70 % substrata pri pridobivanju bioplina, je proizvodna naprava z nazivno električno močjo do 200 kW upravičena do izplačila dodatka v višini 20

% obratovalne podpore za to proizvodno napravo (UL RS št. 37/2009:1780). Za proizvodne naprave na bioplin, ki pri pridobivanju bioplina uporabljajo substrat, ki vsebuje 40 ali več prostorninskih odstotkov glavnega pridelka njiv, v skladu s spremembo Uredbe (Ur.l. RS, št. 43/2011) za naprave priklopljene na omrežje po 1. 7. 2012 velja, da niso upravičene do podpore po tej uredbi.

Preglednica 8: Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalnih podpor za proizvodne naprave obnovljivih virov energije na bioplin, proizveden iz biomase

(http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf; UL RS št. 37/2009:1780).

Table 8: Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced from biomass.

Velikostni razred proizvodne naprava	Nespremenljivi del cene zagotovljenega odkupa [EUR/MWh]	Spremenljivi del cene zagotovljenega odkupa [EUR/MWh]	Cena zagotovljenega odkupa [EUR/MWh]	Obratovalna podpora [EUR/MWh]
mikro (< 50 kW)	118,72	41,33	160,05	102,85
mala (< 1 MW)	111,75	44,00	155,76	96,61
srednja (do 5 MW)	96,18	44,59	140,77	80,97*

*od 1 MW do vključno 10 MW

Za naprave, priklopljene na omrežje po 1. 7. 2012, velja da proizvodne naprave na bioplin, ki pri pridobivanju bioplina uporabljajo substrat, ki vsebuje 40 ali več prostorninskih odstotkov glavnega pridelka njiv, niso upravičene do podpore (UL RS št. 43/2011:2096).

Preglednica 9: Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalna podpora za proizvodne naprave obnovljivih virov energije na bioplin, proizveden iz biološko razgradljivih odpadkov

(http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf; UL RS št. 37/2009:1780).

Table 9: Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced from biological wastes.

Velikostni razred proizvodne naprava	Cena zagotovljenega odkupa [EUR/MWh]	Obratovalna podpora [EUR/MWh]
mikro (< 50 kW)	139,23	101,12
mala (< 1 MW)		99,82
srednja (do 5 MW)	129,15	89,30*

*od 1 MW do vključno 10 MW

Preglednica 10: Cene zagotovljenega odkupa električne energije in obratovalna podpora za proizvodne naprave obnovljivih virov energije – plin iz blata čistilnih naprav odpadnih voda

(http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf; UL RS št. 37/2009:1780).

Table 10: Guaranteed purchase prices and operating support for electricity from renewable energy plants as a fuel using biogas produced municipal wastewater treatment plants.

Velikostni razred proizvodne naprava	Cena zagotovljenega odkupa [EUR/MWh]	Obratovalna podpora [EUR/MWh]
mikro (< 50 kW)	85,84	45,99
mala (< 1 MW)	74,42	34,57
srednja (do 5 MW)	129,15	26,24*

*od 1 MW do vključno 10 MW

Če se letno koristno izrabi toplota v obsegu več kot 15 % vhodne energije plina nastalega iz blata čistilne naprave odpadnih voda, je proizvodna naprava OVE upravičena do izplačila dodatka v višini 10 % obratovalne podpore za to proizvodno napravo OVE. Toplota, ki se porabi pri pridobivanju plina, se ne šteje za koristno toploto.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Splošne analize

Med splošne analize smo prišteli analize vsebnosti suhe snovi, organske snovi, meritve pH in prevodnosti, mletje lignoceluloznih vzorcev in predobdelava blata iz ČN z ultrazvokom.

3.1.1 Suha in organska snov

UPORABLJENA OPREMA

Sušilnik, žarilna peč, analitska tehtnica Mettler Toledo AL204, žarilni lončki.



Slika 14: Žarilna peč Nabertherm (levo) in sušilnik Binder.

Figure 14: Muffle furnace Nabertherm (left) and drying oven Binder.



Slika 15: Analitska tehtnica Kern.

Figure 15: Analytical balance Kern.

POSTOPEK DELA

Suha snov in organsko snov v vzorcih smo določili po metodi 2540 B in 2540 G (APHA, 2005).

Suha snov je definirana kot snov, ki ostane v posodi po segrevanju vzorca (sušenje v pečici pri neki definirani temperaturi) pri temperaturi 105 °C. Za izvedbo meritve smo potrebovali žarilne lončke, sušilnik, žarilno pečico in eksikator. Preden začnemo z izvajanjem meritev, je potrebno prazne lončke segrevati 1h v žarilni peči na temperaturi 550 °C (če merimo tudi organsko snov), oz. 1h na temperaturi med 103 in 105 °C, če merimo samo suho snov. Meritve naših vzorcev smo opravili v treh ponovitvah.

Pred začetkom meritev smo lončke za 1 uro žgali na 550 °C in jih dali hladiti v eksikator. Sledilo je tehtanje praznega žarilnega lončka. Nato smo v stehtan lonček dodali vzorec in stehtali, nato pa ga prenesli v sušilnik, kjer je bila temperatura 105 °C. Vzorce smo po 24 urah vzeli iz sušilnika in jih prenesli v eksikator, da so se ohladili. Nato smo jih stehtali. Postopek smo ponavljali tako dolgo,

dokler nismo zagotovili, da je bila razlika med zadnjo težo vzorca in trenutno težo istega vzorca manjša od 4%. Nato smo po naslednji enačbi določili delež suhe snovi:

$$SS(\%) = \frac{(A-B) \cdot 100}{C-B} \quad (7)$$

Kjer so:

A – teža suhega substrata [mg] + teža lončka [mg]

B – teža lončka [mg]

C – teža svežega substrata [mg] + teža lončka [mg]

D – teža ostanka [mg] + teža lončka po sežigu [mg]

Lončke iz merjenja suhe snovi smo prenesli v žarilno peč na temperaturo 550 °C za 3 ure. Po končanju smo lončke pustili, da so odvedli del toplote, nato pa smo jih prenesli v eksikator. Ko so dosegli sobno temperaturo, smo jih stehali. Postopek smo ponavljali tako dolgo, dokler nismo zagotovili, da je bila razlika med zadnjo težo vzorca in trenutno težo istega vzorca manjša od 4 %. Delež organske snovi določimo po naslednji enačbi:

$$OS(\%) = \frac{(A-D) \cdot 100}{A-B} \quad (8)$$

3.1.2 pH in prevodnost

Za merjenje pH smo uporabili meter HQ40D proizvajalca Hach Lange, ki je bil opremljen s sondo za pH in prevodnost. Pred meritvami smo izvedli kalibracijo po navodilih proizvajalca.

3.1.3 Mletje lignoceluloznih vzorcev

Lignocelulozne vzorce smo mleli z mešalcem Philips blender HR2096 z močjo 800 W. Vzorce smo mleli tako dolgo, dokler njihovi delci niso bili manjši od 2,5 cm. Za pripravo tekočih vzorcev za merjenje dušika smo vzorce zmlleli na velikost manjšo od 1,5 mm.



Slika 16: Prostostoječi mešalnik Philips HR2096 z močjo 800 W.

Figure 16: Blender Philips HR2096 for mixing of substrates and inocula.

3.1.4 Predobdelava blata iz čistilne naprave z ultrazvokom

Za predobdelavo blata smo uporabili ultrazvočni homogenizator UP200H proizvajalca Hielscher, ki deluje na frekvenci 24 kHz in z močjo 200 W. Za vsako predobdelavo smo uporabili čašo volumna 800 ml, ki smo jo napolnili s 500 ml blata. Na ultrazvočnem homogenizatorju smo uporabili sondo S40, ki ima premer 40 mm in dolžino 100 mm in je primerna za obdelavo volumnov do 1000 ml. Sonda je bila v čašo potopljena do globine 2 cm nad dnom. Pri predobdelavi smo z merilnikom porabe električne energije Energy Check 3000 (Volcraft, Nemčija) merili dejansko moč ultrazvočnega homogenizatorja in porabo električne energije. Vzorce smo ultrazvočno obdelali 10, 15, 20 in 25 minut.

Eden izmed glavnih parametrov pri razgradnji blata z ultrazvokom je stopnja razgradnje (DD), ki temelji na topnem KPK. Izračunamo jo po naslednji enačbi (Muller, 2000; Khanal et al., 2007; Erden in Filibeli, 2010):

$$DD = \left(\frac{KPK_{UZ} - KPK_{neobdelan}}{KPK_{NaOH} - KPK_{neobdelan}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Pri tem so:

KPK_{UZ} – koncentracija topnega KPK obdelanega z ultrazvokom [mg/l]

$KPK_{neobdelan}$ – koncentracija topnega KPK surovega blata [mg/l]

KPK_{NaOH} – koncentracija topnega KPK po alkalni razgradnji [mg/l]

DD – stopnja razgradnje [%]

Povečana stopnja razgradnje (DD) je določena kot snov, ki je lahko takoj uporabljena pri pridobivanju metana med anaerobno presnovo (Erden in Filibeli, 2010; Wang et al., 2005).

Za alkalno razgradnjo blato obdelamo 10 minut z 1 M NaOH raztopino v razmerju 1:2 pri temperaturi 90 °C. Supernatant pridobimo z 10 minutnim centrifugiranjem vzorcev pri 30.000 g, ali 20 minutnim centrifugiranjem pri 15.000 g pri temperaturi 4 °C (Khanal et al., 2007; Erden in Filibeli, 2010).

Upadanje stopnje razgradnje (DD) je možno pojasniti z močnim oksidacijskim vplivom radikalov. Do stopnje dovedene specifične energije (SE), ko DD še narašča, hidroksilni radikali selektivno napadajo organske snovi, ki se sproščajo v tekočo fazo in povečajo DD. Nad neko določeno stopnjo SE začne DD padati. Več topnih organskih snovi mineralizira in DD začne upadati. Visoke dovedene ultrazvočne energije pospešujejo oksidacijo zaradi radikalov, kar vodi v mineralizacijo pred topnostjo blata. Drugi razlog za zmanjšanje DD je lahko temperatura. Večje povišanje temperature pri predhodni obdelavi z ultrazvokom privede do večje nasičenosti parnega tlaka, zaradi česar parni mehurčki težje razpadejo in tako zmanjšajo intenziteto kavitacije (Erden in Filibeli, 2010).

Specifična energija je definirana z naslednjo enačbo (Bougrier et al., 2005; Erden in Filibeli, 2010):

$$SE \left[\frac{kJ}{kg SS} \right] = \frac{P \cdot t}{SS_0 \cdot V} \quad (10)$$

Kjer so:

P – moč [W]

t – čas predobdelave z ultrazvokom [s]

V – volumen vzorca [l]

SS_0 – začetna suha snov vzorca [g/l]

A – površina ultrazvočne sonde [cm²]

Pri razgradnji blata z ultrazvokom lahko definiramo tudi ultrazvočno dozo (UD_o [Ws/l]), ki se nanaša na dovedeno energijo na volumen vzorca. Enačba je naslednja (Tiehm et al., 2001; Pilli et al., 2011):

$$UD_o = \frac{P \cdot t}{V} \quad (11)$$

Gostota ultrazvoka (UD [W/l]) je definirana kot dovedena moč na volumen vzorca. Enačba je naslednja (Tiehm et al., 2001; Pilli et al., 2011):

$$UD = \frac{P}{V} \quad (12)$$

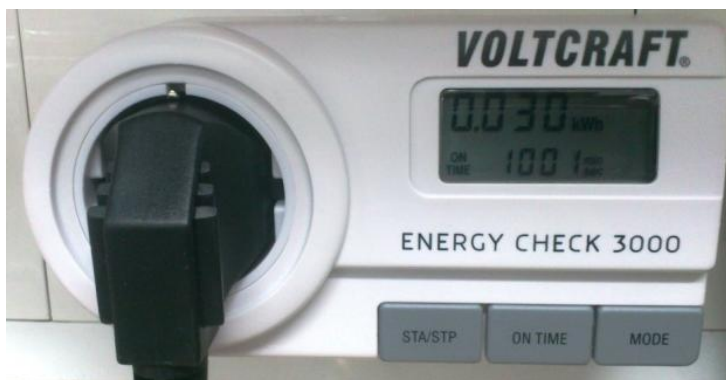
Intenziteta ultrazvoka (UI [W/cm²]) je definirana kot dovedena moč na površino sonde. Enačba je naslednja (Tiehm et al., 2001; Pilli et al., 2011):

$$UI = \frac{P}{A} \quad (13)$$



Slika 17: Homogeniziranje blata iz čistilne naprave z ultrazvočnim homogenizatorjem UP200H proizvajalca Hielscher.

Figure 17: Ultrasound pretreatment of wastewater sludge with ultrasound homogenizator UP200H (Hielscher).



Slika 18: Merilnik porabe električne energije Voltcraft Energy Check 3000.

Figure 18: Electricity consumption meter Voltcraft Energy Check 3000.

3.1.5 Meritve celotnega fosforja

Meritve celotnega fosforja so izvedli na Inštitutu za zdravstveno hidrotehniko na Fakulteti za gradbeništvo in geodezijo v Ljubljani po metodi ISO 6878 – 1.

3.2 Kemijska potreba po kisiku (KPK)

Merili smo celotno in topno kemijsko potrebo po kisiku, ki jo označimo s KPK.

UPORABLJENA OPREMA

Pipeta, centrifuga Hettich UNIVERSAL 320 R, centrifuga Allegra™ X-12R Centrifuge, mikrotiterska plošča, epice, spektrofotometer.



Slika 19: Sušilnik Instrumentaria ST-05 (Hrvaška).

Figure 19: Drying oven instrumentaria ST-05 (Croatia).

Priprava reagentov:

Reagent R1: V 500 ml destilirane vode (dH_2O) raztopimo 10,216 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (sušenega 2h na 105 °C). Dodamo 167 ml koncentrirane H_2SO_4 in dopolnimo z dH_2O do 1000 ml.

Reagent R2: 10 g Ag_2SO_4 raztopimo v 1000 ml koncentrirane H_2SO_4 .

Reagent za KPK: R1 in R2 previdno in počasi zmešamo v razmerju 1,5:3,5 (150 ml R1 + 350 ml R2). To storimo en dan pred uporabo, ker se reagent močno segreje.

R1 za slepi vzorec: v 1,67 ml koncentrirane H_2SO_4 dodamo destilirano vodo do 10 ml.



Slika 20: Centrifuga Allegra™ X-12R.

Figure 20: Centrifuge Allegra™ X-12R.

Slepi vzorec za KPK: Zmešamo 2,5 ml dH_2O , 1,5 ml R1 za slepi vzorec in 3,5 ml R2. Proti slepemu vzorcu merimo absorbance vseh ostalih vzorcev in umeritvenih raztopin na spektrofotometru.

Za umeritveno krivuljo smo pripravili raztopne glukoze v destilirani vodi (koncentracije 0, 100, 300, 500, 700 in 1000 mg/l). 2,5 ml posameznih raztopin dodamo k 5 ml reagenta za KPK in 2 h inkubiramo pri 150 °C. Na spektrofotometru absorbancam umeritvenih krivulj vpišemo direktno ustrezne KPK vrednosti.

OPIS POTEKA DELA

KPK je kisikov ekvivalent za vsebnost organske snovi v vzorcu, ki jo je možno oksidirati z močnim kemijskim oksidantom. Uporabili smo kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$), ki večino organskih snovi oksidira do 95 % – 100 % teoretske vrednosti. KPK se pogosto uporablja kot parameter onesnaženja pri odpadnih vodah. Za merjenje topnega KPK smo uporabili metodo 5220 D (APHA, 2005), ki smo jo prilagodili na manjši vzorec.

Merjenje topnega KPK

Za merjenje topnega KPK smo uporabili supernatant, ki smo ga dobili z 20 min centrifugiranjem vzorcev na 3500 rpm. Nato smo v epico odpipetirali 500 μ l reagenta in 50 μ l supernatanta. Vzorce smo previdno premešali in dali kuhati za 1,3 h na 130 °C. Ohlajene epruvete smo odpipetirali v mikrotitersko in na spektrofotometru odčitali absorbanco pri 545 nm.

Ob merjenju absorbance nam spektrofotometer na podlagi umeritvene krivulje izračuna KPK vrednosti vzorcev.

Merjenje celotnega KPK

Vzorci pri merjenju celotnega KPK smo predhodno ustrezno razredčili (0 krat, 10 krat, 100 krat), da smo rezultate dobili v linearnem merljivem območju umeritvene krivulje. Test smo izvedli v dveh paralelnih ponovitvah. V epruvete HACH LANGE z navojem smo odpipetirali po 5 ml reagenta za KPK. Dodali smo 2,5 ml razredčenega vzorca, zaprli s teflonskim zamaškom in vsebino premešali. Vsako epruveto smo odprli, zaprli in postavili za 2 h na 150 °C. Ohlajene epruvete smo centrifugirali

10 min pri 3000 rpm, da smo odstranili nastalo oborino. Na spektrofotometru smo odčitali absorbanco. Spektrofotometer, ki smo ga uporabili pri kivetnih testih, je bil Hach DR/2800.

3.3 Hlapne organske kisline in celotni anorganski ogljik - titracija

Hlapne organske kisline (HOK) in celotni anorganski ogljik (CAO) smo določili s titracijo s pomočjo titratorja TIM 840 proizvajalca Hach Lange. Razmerje med HOK in CAO je vodilo glede organske obremenjenosti reaktorja (Hach Lange). Meritve smo opravili po navodilih proizvajalca.

UPORABLJENA OPREMA

Pipeta, sito, titrator TIM 840 proizvajalca Hach Lange.



Slika 21: Titrator TIM 840 proizvajalca Hach Lange.

Figure 21: Hach Lange titrator TIM 840.

POTEK DELA

Vzorcju smo najprej preko sita odstranili večje delce. Nato smo v plastično čašo dali magnet, nalili 100 ml destilirane vode in s pipeto dodali 5 ml pripravljenega vzorca. Tako pripravljeno raztopino smo postavili na titrator in izmerili HOK in SAO. Na aparaturi poteče titracija z 0,1 N H₂SO₄ do pH 5, nato pa titracija z 0,1 N H₂SO₄ do pH 4,4.

Preglednica 11: Razmerje HOK/CAO glede na doziranje substrata (Hach Lange).

Table 11: VOA/TIC ratio due to dosing of substrate (Hach Lange).

Razmerje HOK/CAO	Stanje v reaktorju	Ukrep
>0,6	Močno predoziranje substrata	Prenehanje doziranja
0,5 – 0,6	Predožiranje s substratom	Dodaj manj substrata
0,4 – 0,5	Reaktor je močno obremenjen	Spremljaj delovanje naprave
0,3 – 0,4	Tvorba bioplina je na maksimumu	Doziranje substrata naj bo konstantno
0,2 – 0,3	Preslabo doziranje substrata	Počasi povečaj doziranje substrata
<0,2	Občutno preslabo doziranje	Hitro povečaj doziranje substrata

Vrednosti HOK in CAO se izračunajo direktno iz programirane formule na aparaturi. Iz prakse je znano, da je optimalno razmerje HOK/CAO med 0,3 in 0,4, čeprav ima lahko vsaka bioplinska

naprava ali gnilišče svoje optimalno razmerje. Tako imajo npr. naprave, ki kot substrat uporabljajo obnovljive surove materiale, za stabilno delovanje razmerje med 0,4 in 0,6 (Hach Lange).

3.4 Plinska kromatografija za določevanje hlapnih maščobnih kislin

Maščobne kisline so biološke molekule, ki vsebujejo polarno karboksilno skupino (-COOH), vezano na nerazvejano alifatsko verigo. En konec kisline je tako polaren in odvisno od pogojev okolja ionski (karboksilna skupina protonirana/deprotonirana), medtem ko ima drugi konec (ogljikovodikova veriga) nepolarne lastnosti. Vse maščobne kisline so dobro topne v organskih topilih, kot so alkoholi, heksan in dietileter. Topnost maščobnih kislin v vodi pada z dolžino verige (Boyer, 2005). Hlapne maščobne kisline se uvrščajo med maščobne kisline, ki so topne v vodi in jih lahko destiliramo pri atmosferskem tlaku. Iz vodne raztopine jih kljub visokim temperaturam vrelišča, zaradi ko destilacije z vodo, lahko odstranimo z destilacijo. To skupino zajemajo v vodi topne maščobne kisline z do 6 ogljikovimi atomi (APHA, 2005).

Hlapne maščobne kisline kratkih verig smo v naših eksperimentih izmerili s plinskim kromatografom 7890A proizvajalca Agilent.

OPIS SESTAVE APARATURE:

1. Aparat: Plinski kromatograf Agilent 7890A. Aparat smo predhodno ustrezno prilagodili za analize.
2. Kapilarna kolona Agilent J&W GC Columns DB-FFAP, 30 m x 0,530 mm x 1 µm sloj stacionarne faze.
3. Temperatura programa: Temperatura injektorja 200 °C; temperatura detektorja (FIS – plamensko ionizirajoči) 300 °C; začetna temperatura kolone 70 °C; zadrževalni čas 1 min, nato 20 °C/min do 120 °C in naprej 10 °C/min do 200 °C; končna temperatura kolone 200 °C, zadrževalni čas 3 min.
4. Nosilna plina (mobilna faza) He 5 ml/min; N₂ 25 ml/min; detektorska plina: H₂ 30 ml/min; zrak 400 ml/min
5. Volumen vzorca 1 µl. Predvideni čas analize posameznega vzorca je 16 min.

IZVEDBA:

Plinski kromatograf smo umerili z 1 µl kalibracijske raztopine (standard). Na integratorju smo vnesli ustrezne koncentracije za posamezne eluirane kromatografske vrhove. Nato je sledilo vbrizganje vzorcev in preračun koncentracije posameznih kislin s priloženim programom GC Open LAB.

UPORABLJENA OPREMA

Pipeta, epruvete z zamaški, plinski kromatograf 7890 proizvajalca Agilent.

UPORABLJENE KEMIKALIJE:

- Ultra čista voda Milli-Q
- Dietileter
- Žveplena kislina
- Krotonska kislina (2-butenjska) (1 g/l)
- Etanol
- Ocetna kislina

- Butanojska kislina (maslena)
- Propionska kislina (propanojska)
- Valerijanska kislina
- Kapronska kislina

Preglednica 12: Lastnosti kislin in priprava mešanice za standard.

Table 12: Acids properties and standard preparation.

Vrsta kisline	etanol	etanojska	propanojska	butanojska	pentanojska	heksanojska
molekulska masa [g/mol]	46,07	60,05	74,08	88,11	102,13	116,16
gostota [g/l]	790	1049	993	958	939	927
koncentracija [%]	99,8	99,8	99,5	99	99	98,5
agregatno stanje	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče	tekoče
koncentracija kisline [g/l]	790	1049	993	958	939	927
V1 [μl] - kislina	127	95	101	104	106	108
V2 [ml] - ultra čista voda	99,36					
koncentracija za standard [g/l]	1					



Slika 22: Plinski kromatograf Agilent 7890 A.

Figure 22: Gas chromatograph Agilent 7890 A.

Vzorci smo pripravili z etrsko ekstrakcijo:

1. Za vsak vzorec smo pripravili dve čisti epruveti in ju ustrezno označili.
2. V eno epruveto smo za vsak vzorec prenesli 0,4 g NaCl. Drugo epruveto smo ohranili suho za shranjevanje etrske faze po ekstrakciji.
3. V posamezne epruvete smo prenesli 1 ml vzorca in jih pokrili s pokrovčkom.

4. V vsako epruveto smo dali 100 µl internega standarda, ki omogoča preverjanje ponovljivosti postopka. Epruvete smo pokrili s pokrovčkom.
5. Epruvete smo zakisali z dodatkom 200 µl 50 % H₂SO₄ in jih pokrili s pokrovčkom.
6. Nato smo dodali 1 ml etra s stekleno pipeto in s pokrovčkom dobro zaprli epruveto.
7. Sledilo je ekstrahiranje hlapnih maščobnih kislin (HMK) z obračanjem epruвет gor in dol 20-krat.
8. S Pasteurjevo pipeto smo odpipetirali gornjo etrsko fazo v novo, čisto epruveto. Faze smo lažje ločili, če smo jih na hitro centrifugirali (max. 2000 obr/min). Epruveto smo natančno zaprli s pokrovčkom.
9. Etrsko fazo smo prenesli v 2 ml vialo, jim dodali eno spatulo CaCl₂ in jih zaprli s teflonskimi pokrovčki s serijsko številko 5182-0717. Tako pripravljene vialo smo dali na plinski kromatograf, kjer smo jim izmerili vsebnost HMK.

3.5 Določevanje strukture mikrobne združbe s hitrimi tipizacijskimi tehnikami

Deoksiribonukleinska kislina (DNA) shranjuje genetsko informacijo vseh živih organizmov, razen nekaterih virusov. Sestavljena je iz štirih vrst monomernih enot: deoksiadenozin-5'-monofosfata (dAMP), deoksigvanozin-5'-monofosfata (dGMP), deoksicitidin-5'-monofosfata (dCMP) in deoksitimidin-5'-monofosfata (dTMP). Genetska informacija, ki je shranjena v nukleinskih kislinah, je kodirana z zaporedjem nukleotidov. Nukleinske kisline so linearni polimeri, zgrajeni iz štirih različnih monomerov, ki jih imenujemo nukleotidi. Z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR) je mogoče pripraviti več kopij določenega fragmenta DNA v roku nekaj ur (Boyer, 2005).

3.5.1 Filtriranje vzorcev

UPORABLJENA OPREMA:

Za filtriranje vzorcev: vodna vakuumska črpalka, lij, filtrirni papir MN 640 w φ 125 mm, epice.

Vzorci smo filtrirali s pomočjo vakuuma. Uporabili smo filtrirni papir MN 640 w φ 125 mm. Vzorce smo po filtriranju postrgali s filtrirnega papirja in jih prenesli v epice in jih zamrznili na -20°C, kjer so počakali na nadaljnje meritve.

3.5.2 Izolacija DNA s pomočjo PowerSoil[®] DNA Isolation Kit

UPORABLJENA OPREMA:

PowerSoil[®] DNA Isolation Kit, stresalnik Velp Scientifica, stresalnik Vortex Genie 2, centrifuga, led, pipeta.

1. V epice smo prenesli 0,25 gramov filtriranega in po potrebi posušenega vzorca.
2. Epice smo nežno premešali na vibracijskem stresalniku vortex.
3. V epice smo dodali 60 µl raztopine C1 in na kratko pretresli na stresalniku.
4. Nato smo na vortexu epice stresali 15 min.
5. Sledilo je centrifugiranje vzorcev pri 10.000 x g za 3 minute pri sobni temperaturi.
6. Med 400 in 500 µl supernatanta, ki je ostal, smo prenesli v nove epice.

7. V epice smo dodali 250 µl raztopine C2 in pretresli za 5 s, nato pa jih 5 minut inkubirali pri 5°C.
8. Epice smo centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g in sobni temperaturi.
9. 600 µl supernatanta, ki je nastal, smo prenesli v čisto epico.
10. V epice smo dodali 200 µl raztopine C3 in na kratko pretresli, nato pa jih 5 minut inkubirali pri 5 °C.
11. Epice smo centrifugirali pri 10.000 x g za 1 minuto pri sobni temperaturi.
12. 700 µl supernatanta, ki je ostal, smo prenesli v nove epice.
13. V epice smo dodali 1200 µl raztopine C4, ki smo jo prej pretresli. Epico smo za 5 sekund prestresli.
14. 675 µl smo odpipetirali v spin filter in vse skupaj centrifugirali 1 minuto na 10.000 x g in sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo tekočino odlili in korak ponovili še dvakrat.
15. V epice smo nato dodali 500 µl raztopine C5 in 30 sekund centrifugirali pri 10.000 x g in sobni temperaturi.
16. Odlili smo tekočino, ki se je nabrala na dnu epice.
17. Epice smo centrifugirali pri 10.000 x g za 1 minuto pri sobni temperaturi.
18. Spin filtre smo previdno položili v nove epice.
19. V središče bele filtrirne membrane smo odpipetirali 100 µl raztopine C6.
20. Epice smo centrifugirali pri 10.000 x g za 1 minuto pri sobni temperaturi.
21. Iz epice smo odstranili spin filter. DNA je bil tako pripravljen za nadaljne analize.
22. Vzorce DNA smo 10-krat razredčili v vodi za molekularne analize (Sigma-Aldrich, Nemčija). To smo naredili tako, da smo 80 µl vode dodali 20 µl DNA.
23. Epice smo zamrznili na temperaturi -20°C.



Slika 23: Power Soil[®] DNA Isolation Kit, ki smo ga uporabili za izolacijo DNA.

Figure 23: Power Soil[®] DNA Isolation Kit used for DNA extraction.

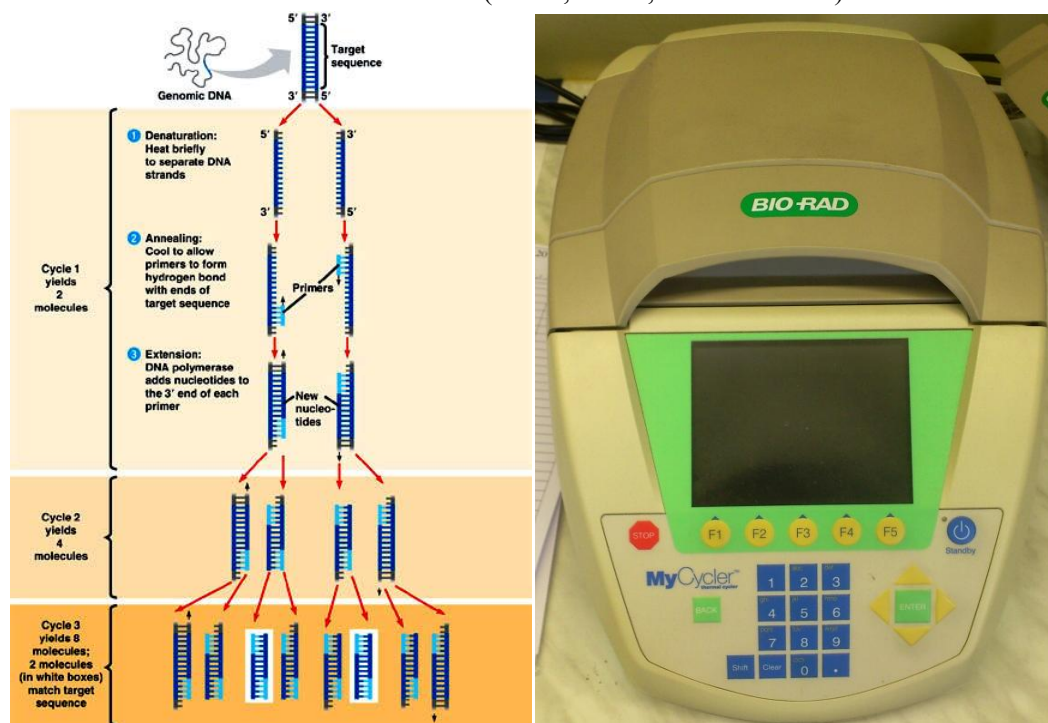
3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR – polymerase chain reaction)

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) se uporablja za pomnoževanje specifičnih DNA fragmentov in vitro in se tudi imenuje »DNA fotokopiranje«. Kopiranje specifičnih DNA fragmentov poteka s pomočjo encima DNA polimeraze. PRC poteka v treh korakih, ki so temperaturno uravnani (McPherson in Moller, 2006):

- Denaturacija dvojno vijačne DNA pri temperaturi do 94 °C, kjer ločimo verigi matrične DNA.
- Ohlajanje, pri katerem pride do vezave začetnih nukleotidov, temperatura med 50 in 70 °C.
- Sinteza DNA s termostabilno polimerazo, pri kateri pride do podaljševanja verige DNA, pri temperaturi okrog 72 °C.

Za PCR potrebujemo (Boyer, 2005):

- Dva sintetična začetna oligonukleotida
- Termostabilno polimerazo
- Vse štiri deoksiribonukleozidtrifosfate (dATP, dGTP, dCTP in dTTP).



Slika 24: Trije koraki verižne polimerizacije: denaturacija dvojno vijačne DNA, prileganje začetih nukleotidov in sinteza DNA (<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>) (levo) in aparat za verižno reakcijo s polimerazo MyCycler® thermal cycler (BIO-RAD Laboratories, Inc., ZDA)(desno).

Figure 24: 3 steps of chain polymerisation: denaturation of double stranded DNA, annealing of started nucleotides and DNA synthesis (<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>) (left) and polymerase chain reaction device MyCycler® Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (right).

V raziskavi smo uporabili dva para široko specifičnih začetnih oligonukleotidov (Pace et al., 2003; Muyzer et al. 1993, v Robič, 2012):

- a) Za bakterije:
- B27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
 - B518r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Dolžina pomnožkov je okoli 500 baznih parov, odvisno od evlucijskih variant gena za 16S rRNA. Uporabili smo jih pri pripravi pomnožkov za LH PCR in T-RFLP metodi tipizacije.

- b) Za arheje:
- A109f: ACKGCTCAGTAACACGT-5'
 - A534r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

B27f in A109f sta bila označena s fluorokromom 6 FAM. Količino reagentov v reakcijski mešanici za 25 µl alikvote smo izračunali s programom *PCR Calculator*, proizvajalca Biometra.

Protocol: enter name here **Biometra** An Analytik Jena Company

PCR mastermix setup

No. of reactions: 20 rxn
 Reaction volume per rxn: 25 µl
 Safety margin: 10 %

Biometra - your source for Biometra products in Germany. You're located elsewhere? Find your local distributor at www.biometra.com.

Reagent	Stock conc.	Final conc. in reaction	Mastermix setup (µl)
Additive 1			Additive 1
BSA	10 mg/mL	0.2 mg/mL	11,00 µl BSA
PCR Buffer	10 X	1.0 X	55,00 µl PCR Buffer
Mg conc of buffer	0 mM	2.5 mM Mg total	55,00 µl separate Mg sol.
separate Mg solution	25 mM		11,00 µl dNTPs
dNTPs	10 mM each	0.2 mM each	11,00 µl Forward primer
Forward primer	10 µM	0.2 µM	11,00 µl Reverse primer
Reverse primer	10 µM	0.2 µM	4,40 µl Polymerase
Polymerase	5.0 U/µl	1.0 U	369,60 µl PCR grade water
Template	10 ng/µl	10 ng	528,00 µl TOTAL MASTERMIX
PCR grade water			

Aliquot per single rxn 24 µl of Mastermix per tube and add 1 µl of Template

Slika 25: Določevanje količine reagentov v reakcijski mešanici za 25 µl alikvotne s programom *PCR Calculator*.

Figure 25: Calculation of reagent in reaction mixture for 25 µl aliquots using *PCR Calculator*.

Preglednica 13: Protokol pomnoževanja gena za 16S rRNA z reakcijo PCR (Robič, 2012).

Table 13: Amplification of gene 16S rRNA by PCR (Robič, 2012).

Vrsta cikla	Čas	Temperatura	Število ciklov
Predcikel	5 min	94 °C	1
Denaturacija DNK	30 s	94 °C	
Prileganje zač. oligonuk.	30 s	57 °C	30
Podaljševanje verige	1 min	52 °C	
Podaljšana polimerizacija	7 min	72 °C	1
Zaustavitev, ohranjanje	∞	4 °C	/

Za pomnoževanje gena za 16S rRNA, ki je potekalo po enakem protokolu, kot je zapisan v Preglednici 13, smo uporabljali aparat za verižno reakcijo s polimerazo MyCycler® thermal cycler (BIO-RAD Laboratories, Inc., ZDA). Produkte smo hranili pri 4 °C (Robič, 2012).

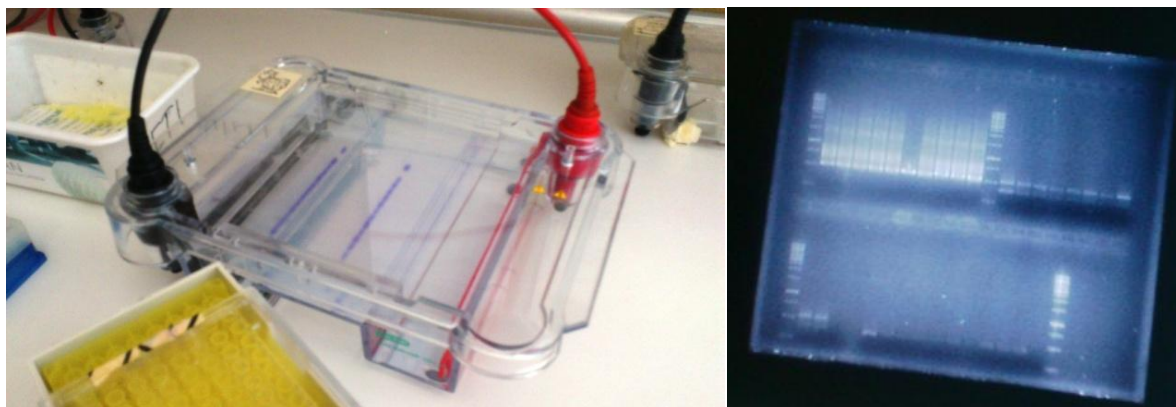
3.5.4 Gelska elektroforeza

Z elektroforezo preverjamo čistost in velikost fragmentov DNA v vzorcu. Ta tehnika omogoča ločevanje molekul na osnovi naboja in velikosti, kjer DNA potuje skozi agarozni gel, ki je v električnem polju. Elektroforeza poteka v eksperimentalnih razmerah (bazični pH), v katerih so vse DNA molekule negativno nabite in zato potujejo proti pozitivni elektrodi (anodi). Zaradi prečne povezanosti molekul gela ta deluje kot molekulska sito, ki dovoljuje majhnim molekulam, da se gibljejo hitreje kot velike. Molekule se pri tem ločujejo tako na osnovi naboja kot tudi velikosti, pri modificirani poliakrilamidni gelski elektroforezi pa samo na osnovi velikosti molekul (Boyer, 2006).

POTEK DELA

Pripravili smo 1 % agarozni gel v 0,5x TBE pufru. Nanašali smo 1 µl 1 kb DNK lestvice GeneRuler™ DNA Ladder Mix (marker) ter 5 µl vzorca, resuspendiranega v 3 µl nalagalnega pufra. Elektroforeza je tekla 25 – 30 minut pri 100 mV in 400 A. Sledilo je 10 minutno barvanje gela v etidijevem bromidu

(EtBr), ki se vključi v vijačnico DNK, nato 10 minut razbarvanja v destilirani vodi. V komori z UZ-transimulatorjem smo vzpodbudili fluoresciranje etidijevega bromida ter z optimizacijo izboljšali ločljivost slike (Robič, 2012).



Slika 26: Potek elektroforeze (levo) in slika agaroznega gela z vidnimi pomnožki PCR(desno).
Figure 26: Agarose electrophoresis (left) and agarose gel (right) with PCR amplicons.

3.5.5 Restriksijski polimorfizem dolžine končnih fragmentov (*T-RFLP*, angl. *Terminal restriction fragment lenght polymorphism*)

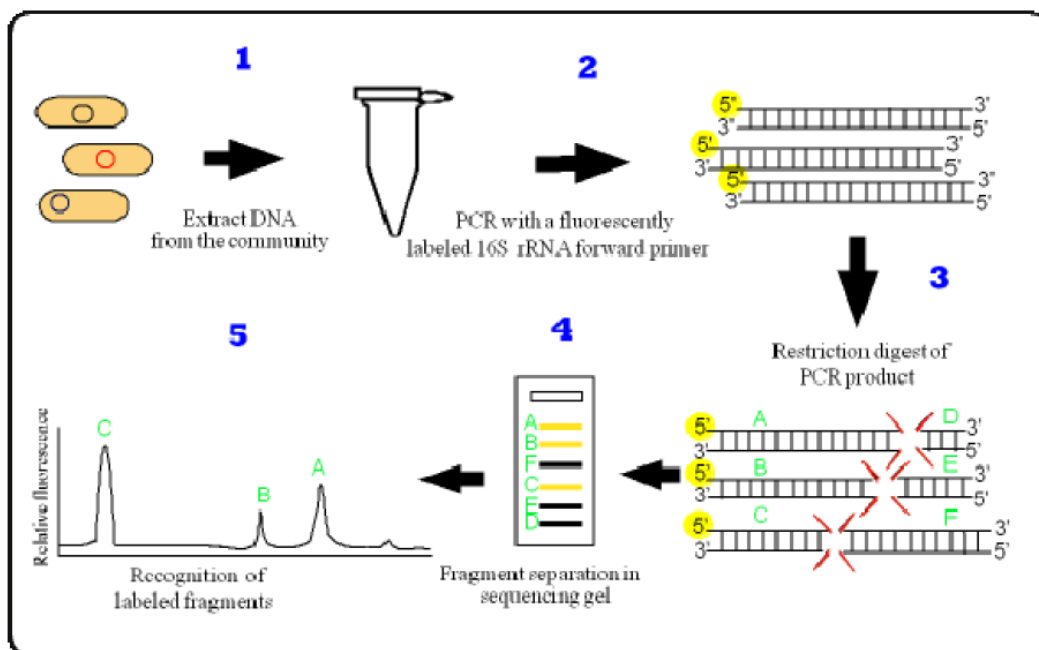
T-RFLP vzorce pridobimo in analiziramo v seriji korakov, ki so kombinacija PCR-ja, restriksijske encimske presnove in kapilarne ali gelske elektroforeze. Vzorec DNA se najprej razgradi z restriksijskimi encimi. Nastali fragmenti DNA se ločijo z gelsko elektroforezo, prenesejo na membrano in hibridizirajo z DNA-sondo, kateri sledi analiza z avtoradiografijo. Ker ima DNA vsakega posameznika edinstveno zaporedje baz, jo restriksijski encimi režejo na različnih mestih, zato nastanejo fragmenti z različnimi dolžinami (Boyer, 2005).

Za vsak vzorec smo pripravili dve restriksijski reakciji z različnima encimoma, *HhaI* in *MspI*.

Preglednica 14: Primerjava lastnosti restriksijskih endonukleaz *HhaI* in *MspI* (Stres, 2013).

Table 14: Comparison of properties of restriction endonucleases *HhaI* and *MspI* (Stres, 2013).

	<i>MspI</i>	<i>HhaI</i>
Mesto restrikcije ↓	5' C↓CGG '3	5' GCG↓C '3
Optimalna temperatura delovanja	37 °C	37 °C
Čas delovanja	1 – 16 h	1 – 16 h
Termalna inaktivacija	Da: inkubacija 20 min pri 80 °C	Ne
Vpliv metilacije DNK na delovanje encima	Ne vpliva	CpG metilacija blokira delovanje encima
vir	<i>Moraxella</i> sp.	<i>Haemophilus haemolyticus</i>



Slika 27: Shematičen prikaz tehnike T-RFLP pri tipizaciji genov za 16S rRNA združbe (Güntzig et al., 2002, v Stres, 2006).

Figure 27: Illustration of T-RFLP method (Güntzig et al., 2002, v Stres, 2006).

Za eno restriksijsko mešanico, v končnem volumnu 30 μ l, smo v naslednjem vrstnem redu v mikrocentrifugirko dodali:

- 5,5 μ l Sigma vode H₂O
- 3 μ l pufra Tango 10x
- 1,5 μ l encima (HhaI/MspI)
- 20 μ l očiščenega produkta PCR

To smo premešali in inkubirali 16 ur pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo restriksijske mešanice z encimom *MspI* inaktivirali z 20-minutno inkubacijo pri 80 °C. Po inaktivaciji smo mešanice očistili s kompletom High Pure PCR Product Purification Kit. Restriksijskih mešanic z encimom *HhaI* nismo inaktivirali, ampak smo jih direktno očistili s kompletom. Razrezanim in očiščenim produktom PCR smo dodali 0,4 μ l standarda GeneScan™ -500 ROX™ SIZE STANDARD (Applied Biosystems, ZDA) in 7 μ l deioniziranega formamida. Pred injiciranjem v kapilarno elektroforezo ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA) smo mešanico 2 minuti denaturirali pri 95 °C in nato ohladili na ledu. Injekcija v kapilare je trajala 27 sekund pri napetosti 1,8 kV. Dobljene podatke smo analizirali s programom R-language (<http://www.r-project.org/>).

3.6 Merjenje biometanskega potenciala (BMP) z Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II)

Biometanski potencial (BMP) predstavlja eksperimentalno določeno vrednost maksimalne količine metana, ki bo nastala na gram organske obremenitve določene biomase s substratom. BMP določamo s testom BMP, kjer za določeno znano količino odpadkov v šaržnem sistemu pri anaerobnih razmerah izmerimo količino nastalega metana ali bioplina (ter njegovo procentno sestavo) (Lesteur et al., 2010). Za anaerobno presnovo različnih substratov in določevanje biometanskega potenciala smo uporabili napravo Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II). AMPTS II je analitična naprava

laboratorijske skale, ki omogoča meritve ultra nizkih hitrosti tvorbe biometana, proizvedenih med anaerobno presnovo biološko razgradljivih substratov. Na ta način lahko lažje določimo optimalni retenzijski čas in uporabno mešanico substratov za anaerobno presnovo in ocenimo potrebo po dodatkih. BMP test se uporablja za določevanje anaerobne biorazgradljivosti in končnega biometanskega potenciala iz odpadnih snovi ali biomase ter določevanja hitrosti razgradnje v procesu anaerobne presnove. AMPTS II je sestavljen iz dveh večjih enot. Prva enota vključuje 15 steklenic volumna 500 ml, ki predstavljajo anaerobne fermentorje. Vsak fermentor je opremljen s plinotesnim gumijastim pokrovom in mehanskim mešalom, ki je vodeno preko mreže in računalnika. Fermentorji so potopljeni v termo regulirano vodno kopel, kjer lahko vzdržujemo mezofilno ali termofilno temperaturno območje. Druga enota zajema 45 manjših steklenic volumna 100 ml, ki vsebujejo 3 M NaOH za fiksacijo CO₂ in napravo za merjenje volumna plina. Merjenje plina poteka na principu izpodrivanja tekočine in vzgona (Bioprocess Control, Švedska).

3.6.1 Določevanje suhe snovi (SS) in organske snovi (OS)

Suho snov in organsko snov smo določili po metodi 2540 B in 2540 G (APHA, 2005).

3.6.2 Priprava inokuluma in substrata

Za BMP test potrebujemo vsaj en substrat in inokulum. Inokulum je biomasa iz bioplinske naprave, ki obratuje na realnem modelnem merilu. Pred zagonom BMP testa moramo izmeriti SS in OS inokuluma in substratov. Inokulum mora biti svež. Da bi zmanjšali tvorbo bioplina, ki nastane iz inokuluma, ga lahko inkubiramo v anaerobnih pogojih za 2 do 5 dni pri temperaturi, pri kateri bomo izvajali določevanje BMP. Ko se ne ustvarja več bistvena količina plina, je inokulum pripravljen. BMP lahko izvedemo tudi brez inkubacije inokuluma. Pri tem moramo količino bioplina/biometana, ki nastane iz inokuluma odšteti od bioplina/biometana, ki je nastal iz mešanice inokuluma in substrata. V naših primerih inokuluma nismo inkubirali in smo nastali metan, ki je nastal zaradi inokuluma, upoštevali pri preračunu biometanskega potenciala. Inokulume smo pridobili iz BPE Šijanec, BPE Vučja vas, BPE Kolar in CČN Šaleške doline. Inokulum smo takoj po odvzemu v 60 l sodih prepeljali v laboratorij, kjer smo čim prej naredili potrebne meritve in preračune ter zagnali AMPTS. Substrat, ki smo ga uporabili za merjenje BMP, smo do zagona shranili v hladilniku na 4 °C, vendar ne dlje kot 5 dni.

3.6.3 Organska obremenitev za BMP

Organsko obremenitev, ki jo predstavljajo lignocelulozni substrati, smo določili glede organske obremenitve, s katero je obremenjena bioplinska elektrarna Vučja vas. Njena povprečna organska obremenitev znaša $10 \text{ gOS}_{\text{substrata}}/\text{l}_{\text{inokuluma}}$ iz fermentorja (če pogledamo obdobje od novembra 2011 do marca 2012). V BMP testih smo izbrali obremenitev realnega modelnega merila omenjene bioplinske elektrarne, kar je znašalo $10 \text{ g OS}_{\text{substrata}}/\text{l}_{\text{inokuluma}}$ (Priloga B).

Organsko obremenitev blata iz ČN smo določili glede obremenitve gnilišča CČN Šaleške doline. Njihova povprečna obremenitev znaša $2,4 \text{ g OS}_{\text{blata}}/\text{l}_{\text{inokuluma}}$. S tako obremenitvijo smo izvajali BMP teste pri substratu iz KČN, starost blata je bila med 2 in 3 dni.

3.6.4 Priprava 3 M NaOH raztopine

3 M NaOH raztopina se uporablja za fiksacijo CO₂. Pripravili smo jo po navodilih proizvajalca na naslednji način:

- a) 240 g čistega NaOH smo pomešali z destilirano vodo do 2 l.
- b) Pripravili smo 0,4 % raztopino timoftaleina, ki je služil kot pH indikator. Pomešali smo 40 mg timoftaleina in 9 ml 99,5 % etanola ter dodali 1 ml destilirane vode.
- c) 10 ml pH indikatorja smo zlili v pripravljeno 2 l raztopino NaOH.
- d) Za BMP-je na 0,5 l modelnem merilu smo s pripravljeno raztopino iz točke c napolnili 100 ml steklenice do višine 80 ml in jim natakneli gumijaste zamaške z dvema cevka, ki smo jih prej namazali s petelinčkovo mastjo in jih zaprli s plastičnimi pokrovi. Za BMP-je na 5 l modelnem merilu smo napolnili 250 ml steklenice do višine 200 ml in podaljšali cevke na gumijastih zamaških.

3.6.5 Priprava reaktorjev na 0,5 l modelnem merilu

Vse meritve določevanja BMP (inokulum, inokulum + vzorec 1, inokulum + vzorec 2...) smo izvajali v treh ponovitvah. Za en vzorec to pomeni, da smo 3 reaktorje napolnili samo z inokulumom in so nam predstavljali izhodiščni vzorec, pozitivno kontrolo smo pripravili v drugih treh, ki smo jim dodali glukozo, v naslednjih 3 reaktorjih je bil inokulum in merjeni substrat. Pred doziranjem v anaerobne reaktorje smo substrate in inokulum zmleli s prostostoječim mešalnikom Philips in tako v 0,5 l reaktorjih zagotovili homogenost vzorca.

3.6.6 Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu

Priprava je enaka kot pri 0,5 l reaktorjih, le da inokuluma nismo zmleli, substrate pa samo na tako velikost, kot bi jih imeli pri doziranju na realni BPE ($d < 20$ mm).

3.6.7 Sestava reaktorjev AMPTS-ja na 0,5 in 5 l modelnem merilu

Vse reaktorje smo napolnili z isto količino inokuluma (4 l, pri uporabi 5 l reaktorjev in 400 ml pri uporabi 0,5 l reaktorjev). Pri 0,5 l reaktorjih smo inokulum zmleli s prostostoječim mešalnikom Philips HR2096, da smo zagotovili homogen vzorec. Pri polnjenju 5 l steklenic smo inokulum pripeljali iz bioplinskih elektrarn v 60 l sodih in jih med polnjenjem reaktorjev nepretrgoma mešali in na tak način zagotovili homogenost inokuluma. Nato smo dodali substrat. Količino dodanega substrata smo izračunali iz suhe in organske snovi, ki smo jih izmerili pred sestavljanjem reaktorjev. Obremenitev reaktorjev pri določevanju BMP lignoceluloznih substratov je bila dnevna obremenitev bioplinske elektrarne Organica Nova in je znašala 10 g OS/l, pri blatu iz ČN pa je bila obremenitev 2,4 g OS/l. Tri steklenice nismo napolnili s substratom in so nam predstavljale izhodiščni vzorec, katere nastali metan smo na koncu odšteli od produkcije metana iz reaktorjev, v katere smo dodali substrat. Sestavljanje reaktorjev je prikazano pri določevanju BMP-jev posameznih substratov. Po polnjenju z inokulumom in substrati smo reaktorje oštevilčili, vratove steklenic namazali s silikonsko mastjo, naredi gumijaste zamaške z mešalom, natakneli plastične navoje z motorčki in zatesnili. Reaktorje smo položili v vodne kopeli, kjer smo pred tem destilirano vodo segreti na 37 °C. Potopljeni grelniki so vzdrževali temperaturo vode na 37°C. Reaktorje smo povezali z enoto za fiksacijo ogljikovega dioksida, kjer smo pri 0,5 l reaktorjih uporabili 1 steklenico 80 ml 3 M NaOH raztopine za en reaktor, za 5 l reaktor pa 4 steklenice z 200 ml 3 M NaOH raztopine. Od tu naprej smo pretok plina povezali na enoto za merjenje količine nastalega metana. Skozi cevko na vratu steklenice smo vsak reaktor 2

minuti preprihivali z N₂ in tako zagotovili anaerobne pogoje. Nato smo na računalniku zagnali program za spremljanje tvorbe metana. Takoj po zagonu smo inokulumu izmerili pH, SS, OS, HOK in CAO. Reaktorje smo tako pustili od 25 do 45 dni in spremljali tvorbo metana. Vmes smo kontrolirali nivo vode v vodni kopeli in delovanje mešal. Po preteku 25 do 45 dni smo reaktorje razdrli in za vsakega izmerili SS, OS, pH, HOK/SAO, celotni dušik in amonijski dušik. Vsako eksperimentalno varianto smo izvedli v treh ponovitvah.

3.6.8 Izračun biometanskega potenciala (BMP)

Biometanski potencial smo izračunali iz količine metana, ki je nastala iz 1 g OS substrata. Uporabili smo naslednjo enačbo:

$$BMP(\text{biometanski potencial}) = \frac{V_{\text{substrat\&inokulum}} - V_{\text{inokulum}}}{OS_{\text{substrat}}} \quad (14)$$

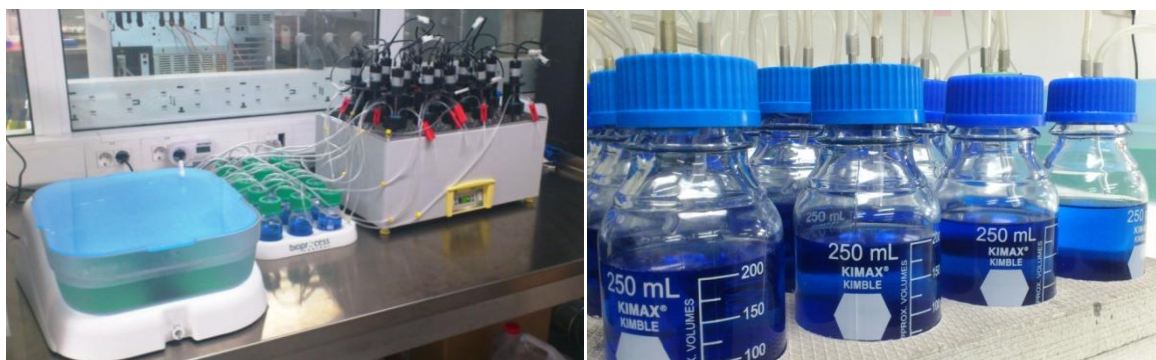
Kjer so:

BMP – normaliziran volumen metana, ki se proizvede iz 1 g OS dodanega substrata [ml CH₄/g OS],

V_{substrat&inokulum} – celotni volumen metana, ki se je proizvedel v reaktorju, kjer je bil inokulum in substrat [ml],

V_{inokulum} – povprečna tvorba celotnega metana, ki je nastala v reaktorjih z izhodiščnim vzorcem (samo inokulum) [ml],

OS_{substrat} – organska snov dodanega substrata [g]



Slika 28: AMPTS II na 0,5 l modelnem merilu (levo) in povečano število steklenic za fiksacijo CO₂ na 5 l modelnem merilu (desno).

Figure 28: 0,5 liter laboratory scale of AMPTS II (left) and increased number of CO₂ fixing units at upgraded 5 liter scale (right).



Slika 29: AMPTS II na 5 l modelnem merilu.

Figure 29: Upgraded 5 l AMPTS II

3.6.9 Izračun koeficienta hidrolize

Hidroliza je omejujoči korak v procesu anaerobne presnove in je merilo, kako hitro se v procesu anaerobne presnove razgradijo suspendirani delci. Iz rezultatov BMP eksperimentov lahko definiramo konstanto hidrolize prvega reda, ki jo napišemo kot (Angelidaki et al., 2009):

$$\ln((B_{\infty}-B)/B)=-k_H t \quad (15)$$

kjer so:

B_{∞} - končna tvorba metana [ml],

B - metan proizveden ob določenem času t [ml],

k_H - konstanta hidrolize prvega reda, ki je definirana kot naklon linearne krivulje [d^{-1}]

t – čas [d]

3.6.10 Razgradnja organske snovi

Razgradnjo organske snovi določimo z naslednjo enačbo (Bioprocess Control):

$$\text{razgradnja OS (\%)} = \frac{OS_{\text{začetek}} - OS_{\text{konec}}}{OS_{\text{začetek}}} \cdot 100 \quad (16)$$

Pri tem so:

$OS_{\text{začetek}}$ – količina organske snovi inokuluma in dodanega substrata v anaerobnem reaktorju na začetku eksperimenta [g],

OS_{konec} – količina organske snovi v anaerobnem reaktorju na koncu eksperimenta [g],

razgradnja OS – delež organske snovi, ki jo razgradijo mikroorganizmi v procesu anaerobne presnove [%].

3.7 Merjenje celotnega dušika, dušika po Kjeldahlu in amonijskega dušika

Automatiziran proces za določevanje celotnega dušika in amonijskega dušika ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) temelji na modificirani Berthelotovi reakciji, kjer je po dializi amonijak zapufiran in kloriran v monokloramin, ki reagira s salicilatom v 5-aminosalicilat. Po oksidaciji in oksidativnem spajanju pride do tvorjenja zeleno obarvanega kompleksa. Absorpcijo tega kompleksa izmerimo pri valovni dolžini 660 nm.

UPORABLJENA OPREMA

Enota za razklop Skalar SA5620 in SA5640, aparaturna za merjenje dušika in amonijskega dušika Skalar San++

PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci smo pripravili po navodilih proizvajalca po metodi NEN 7433.

Če ima vzorec manj kot 15 % suhe snovi, smo 500 g vzorca 5 minut mleli z mešalnikom Philips HR2096. Pri vzorcih, ki so imeli več kot 15 % suhe snovi, smo vzorec razredčili do vsebnosti suhe snovi 15 % in ga mleli 5 minut z mešalnikom Philips HR2096. Vpliv redčenja smo upoštevali pri preračunu koncentracije dušika.

Pri vzorcih, ki so imeli več kot 30 % suhe snovi, smo le te zmleli, da je bila njihova velikost približno 1 mm.



Slika 30: Skalar San++ za merjenje dušika in amonijskega dušika (levo) in enota za razklop dušika Modelno merilor SA5620 in SA5640 (desno).

Figure 30: Skalar San ++ for measurement of total nitrogen and ammonium nitrogen (left) and digestion block (right).

Za amonijski dušik smo tekoče vzorce centrifugirali, da smo jim odstranili večje delce. Supernatant, ki je ostal, smo uporabili za merjenje amonijskega dušika. Vsi vzorci so pred meritvami bili razredčeni za faktor 10. Na Skalarju smo za amonijski dušik uporabili naslednje pufre: A, C, D, E, F in deionizirano vodo namesto pufra G.

PROCEDURA ZA RAZKLOP ZA MERJENJE CELOTNEGA DUŠIKA

Proceduro za razklop smo naredili po navodilih proizvajalca. Njihova metoda sloni na NEN metodah 7430+7431+7433. V bučko smo dali 5 ml ali 1 g vzorca. Nato smo dodali 22 ml žveplene kisline H_2SO_4 (95%) in premešali. Sledilo je dodajanje 5 ml vodikovega peroksida in nežno mešanje bučk. Ko je penjenje v bučkah prenehalo, smo še dvakrat dodali po 5 ml vodikovega peroksida in po vsakem dodajanju bučke premešali. Nato smo dodali še 1 ml 10 g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ raztopine. Bučke smo prenesli v enoto za razklop, kjer smo vzorce toplotno obdelali. Najprej je temperatura pol ure naraščala na 120 °C, nato se je za 10 minut ustavila na 120 °C. Sledilo je kuhanje vzorca pri 330 °C za toliko časa, da se je vzorec razbarval ali pa je postal svetlo zelenomoder. To je po navadi trajalo 2,5 h. Nato smo bučke pustili, da so se ohladile in jih do 250 ml napolnili z deionizirano vodo. Za vsak razklop smo uporabili tudi kontrolo, kjer smo namesto vzorca uporabili deionizirano vodo. Bučke smo premešali in vzorec prelili v epruveto, kjer je bil pripravljen za meritev na Skalarju San++.

UPORABLJENI REAGENTI pri Skalarju SAN++:

- PUFER A
 - Potrebne kemikalije:
 - 33 g kalijevega natrijevega tartrata $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$
 - 24 g tri-natrijevega citrata $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$.
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .
 - 3 ml Brij-a 35 (30 %).
 - Priprava:
 - V 800 ml destilirane vode raztopi kalijev natrijev tartrat. Dodaj tri-natrijev citrat in raztopi. Do 1 litra dopolni z deionizirano vodo. Preveri pH in ga po

potrebi prilagodi na $5,2 \pm 0,1$ z žvepleno kislino (H_2SO_4 , 95-97 %). Dodaj brij in pomešaj. Raztopina mora biti shranjena v temni steklenici v hladilniku in je stabilna največ 1 teden.

- PUFER B

- Potrebne kemikalije:

- 33 g kalijevega natrijevega tartrata $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - 24 g tri-natrijevega citrata $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 4,5 g natrijevega hidriksida NaOH
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .
 - 3 ml Brij-a 35 (30 %).

- Priprava:

- V 800 ml destilirane vode raztopi kalijev natrijev tartrat. Dodaj tri-natrijev citrat in raztopi. Do 1 litra dopolni z deionizirano vodo. Preveri pH in ga po potrebi prilagodi na $5,2 \pm 0,1$ z žvepleno kislino (H_2SO_4 , 95-97 %). Dodaj brij in pomešaj. Potem dodaj natrijev hidroksid in ga raztopi. Raztopina mora biti shranjena v temni steklenici v hladilniku in je stabilna največ 1 teden.

- PUFER C

- Potrebne kemikalije:

- 25 g natrijevega hidroksida NaOH.
 - 80 g natrijevega salicilata $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$.
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .

- Priprava:

- Natrijev hidroksid raztopni v 50 ml deionizirane vode. Dodaj 800 ml deionizirane vode. Nato dodaj natrijev salicilat, do 1 l dopolni z deionizirano vodo ter dobro premešaj. Raztopina mora biti shranjena v temni steklenici v hladilniku in je stabilna največ 1 teden.

- PUFER D

- Potrebne kemikalije:

- 1 g natrijevega nitroprusida $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .

- Priprava:

- V 800 ml deionizirane vode raztopi natrijev nitroprusid. Nato dopolni do 1 l z deionizirano vodo in premešaj. Raztopina mora biti shranjena v temni steklenici in je stabilna največ 1 teden.

- PUFER E

- Potrebne kemikalije:

- 2 g natrijevega dikloroizocianurata $\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .

- Priprava:

- V 800 ml deionizirane vode raztopi natrijev dikloroizocianurat. Nato dopolni do 1 l z deionizirano vodo in premešaj. Raztopina je stabilna največ 1 teden.

- PUFER F

- Potrebne kemikalije:

- 40 g natrijevega hidroksida NaOH.
 - 1000 ml deionizirane vode H_2O .

- Priprava:

- V 800 ml deionizirane vode raztopi natrijev hidroksid. Nato dopolni do 1 l z deionizirano vodo in premešaj. Raztopina je stabilna največ 1 teden.
- PUFER G
 - Potrebne kemikalije:
 - 400 mg Bakrovega (II) sulfata $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 44 ml žveplene kisline H_2SO_4 (95-97 %)
 - 956 ml deionizirane vode
 - Priprava:
 - V 800 ml deionizirane vode dodaj žvepleno kislino in dobro premešaj. Dodaj bakrov (II) sulfat in dobro premešaj.

PRIPRAVA STANDARDA

V 500 ml deionizirane vode raztopi 5,7285 g amonijevega klorida (NH_4Cl). Tako pripravljen standard ima koncentracijo dušika 3000 mg N/l.

MERJENJE DUŠIKA PO KJELDAHLU

Meritve dušika po Kjeldahlu so naredili na Inštitutu za zdravstveno hidrotehniko na Fakulteti za gradbeništvo in geodezijo v Ljubljani po metodi SIST EN 25663.

MERJENJE NITRATNEGA DUŠIKA

Meritve nitratnega dušika (NO_3^- -N) so naredili na Inštitutu za zdravstveno hidrotehniko na Fakulteti za gradbeništvo in geodezijo v Ljubljani po metodi SIST ISO 7890-1.

IZRAČUN PROSTEGA AMONIJAKA NH_3

Količina prostega amonijaka od temperature in pH procesa. Količino prostega amonijaka smo izračunali po naslednji enačbi (Rajagopal et. al., 2013):

$$\text{NH}_3(\text{prosti}) = \text{TAN} \cdot \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-\left(0,090184 + \frac{2729,92}{T(K)}\right)}} \right)^{-1} \quad (17)$$

Kjer so:

NH_3 – prosti amonijak [mg/l]

TAN – celotni amonijski dušik (NH_4^+ -N) [mg/l]

T (°K) – temperatura [°K]

3.8 Merjenje velikosti delcev blata iz čistilne naprave

Velikost delcev blata iz ČN smo izmerili na Fakulteti za gradbeništvo in geodezijo v Ljubljani z Laser Particle Sizer-jem Analysette 22 Wet Dispersion Unit (Fritsch, Nemčija). Merjenje velikosti delcev je potekalo po navodilih proizvajalca, ki zadostujejo standardu ISO 13320. Območje določevanja velikosti delcev s to napravo je med 0,08 in 2000 μm . Vgrajen polprevodni laser zelene barve ($\lambda = 532$ nm, 7 mW) izvaja meritve manjših delcev, medtem ko infrardeči polprevodni laser ($\lambda = 850$ nm, 9 mW) skrbi za meritve velikosti večjih delcev. Pri merjenju smo uporabljali programsko opremo FRITCSH Mas control software.

Pri rezultatih, ki jih dobimo, naslednje oznake pomenijo:

d_{median} – velikost delca, ki razdeli frekvenčno porazdelitev na pol; 50% mase ima delce z večjo velikostjo in 50 % mase ima delce manjše [μm].

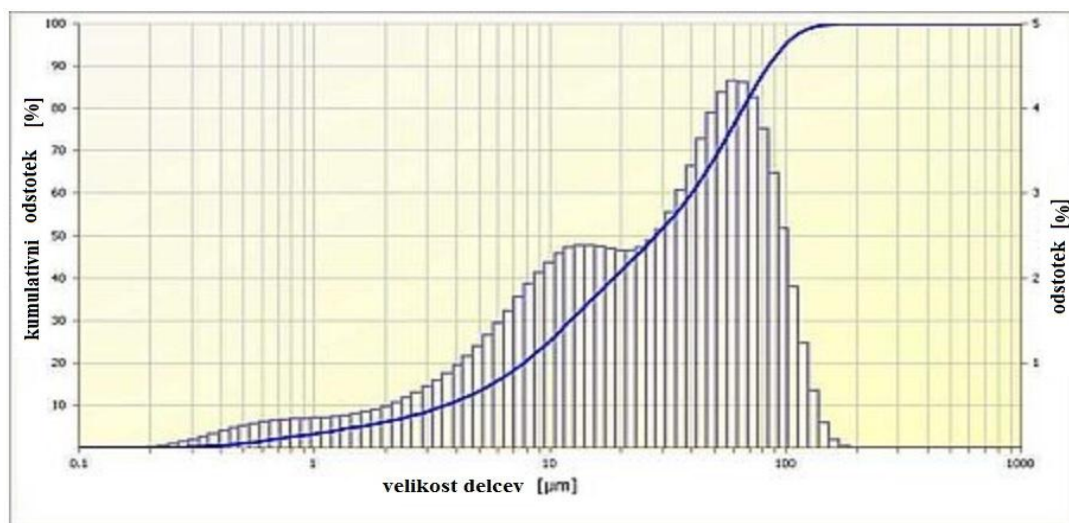
D_{mean} – povprečna velikost delcev [μm]

D_{mode} – velikost delca, ki se najpogosteje pojavi pri porazdelitvi velikosti [μm].



Slika 31: Laserski merilnik velikosti delcev Fritsch Analysette 22.

Figure 31: Laser particle sizer Fritsch Analysette 22.



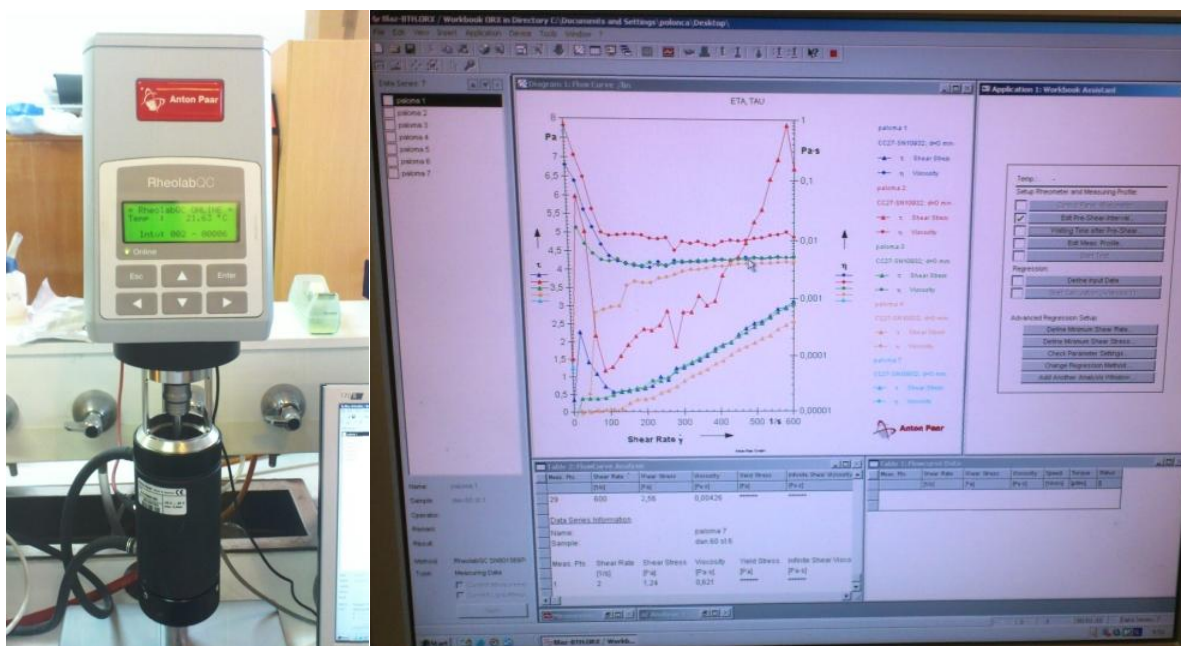
Slika 32: Prikaz rezultatov meritev velikosti delcev. Črta označuje vsoto vseh presevkov, s stolpci je označen odstotek (<http://www.fritsch-sizing.com/encyclopedia/introduction-into-particle-sizing/>).

Figure 32: Particle size distribution measured with Analysette 22. Line represents sum volume, bars represent volume.

3.9 Merjenje viskoznosti

Viskoznost je fizikalna količina, ki podaja odziv tekočine na strižno deformacijo. Določena je kot razmerje med strižno napetostjo in strižno hitrostjo in podaja notranje trenje tekočin. Viskoznost je zelo odvisna od temperature (<http://sl.wikipedia.org/wiki/Viskoznost>). Pri čistih vzorcih je viskoznost dokaj enostavno določiti, medtem ko pri kompleksnih vzorcih, kot so to gošča iz bioplinskih elektrarn

in vhodni substrati, poleg temperature na viskoznost vplivajo tudi velikost in oblika delcev, ekso polisaharidi (EPS), vsebnost ionov in penjenje vzorcev.



Slika 33: Potek meritev viskoznosti z reometrom Rheolab QC (Anton Paar, Nemčija) in prikaz rezultatov meritev s programsko opremo Rheoplus.

Figure 33: Measurements of viscosity using rheometer Rheolab QC (Anton Paar, Germany) and output of results with Rheoplus software.

Viskoznost smo merili na Naravoslovno tehniški fakulteti v Ljubljani. Uporabili smo reometer Rheolab QC proizvajalca Anton Paar (Nemčija). V posodico reometra smo dali približno 15 – 20 ml vzorca in jo nataknili na sondo. Nato smo zagnali program Rheoplus in izmerili viskoznost pri različnih hitrostih vrtenja sonde. Pred meritvijo smo vse vzorce segreli na sobno temperaturo in na ta način izločili napako vpliva temperature na viskoznost.

3.10 Analiza lignina, celuloze in hemiceluloze z analizami NDV, KDV, KDL

3.10.1 Analiza NDV – določevanje lignina, celuloze in hemiceluloze

Z analizo NDV določimo nevtralna detergenska vlakna (Neutral-Detergent Fiber), ki predstavljajo ostanke po razgradnji v detergentu. Vlaknasti ostanki, ki ostanejo, predstavljajo celulozo, hemicelulozo in lignin.

Reagenti za NDV:

- Raztopina nevtralnega detergenta: V 1 l destilirane vode smo dodali 30 g natrijevega dodecil sulfata, 18,61 g etilendiamintetraocetni dinatrijev sol dihidrata, 6,81 g natrijevega borata, 4,56 g dibazičnega, anhidrirnega natrijevega fosfata in 10 ml trieten glikola. Nato smo preverili, če je pH v rangu med 6,9 in 7,1.
- Natrijev sulfit – Na_2SO_3 .

Potek dela:

- 1) Vzorce smo posušili na temperaturi 50 °C in jih s terilnico zmleli na velikost zrn 1 mm.
- 2) Stehtali smo prazne filter vrečke.
- 3) V vsako vrečko smo dodali 0,5 g suhega vzorca.
- 4) Stehtali smo vrečko s suhim vzorcem in vrečko zatesnili 4 mm od zgornjega roba ter vzorec enakomerno porazdelili po vrečki. Za vsako razgradnjo smo uporabili tudi prazno vrečko, ki je služila kot kontrola.
- 5) Sledile so NDV, KDV in KDL analize.
- 6) Na posebne pladnje smo naložili vzorce in jih dali v analizator vlaken. V analizator vlaken smo dodali 1900 do 2000 ml nevtralnega detergenta in 20 g natrijevega sulfita, posodo hermetično zaprli in vklopili mešanje in gretje na 100°C za 75 min.
- 7) Po ekstrakciji smo analizator izklopili, iz posode izpustili vročo tekočino. Nato smo posodo napolnili z vodo in vzorce trikrat prali 5 min pri temperaturi 70 do 90 °C. Po vsakem posameznem pranju smo vodo iz posode izpustili in jo zamenjali s čisto.
- 8) Po pranju smo vzorce vzeli iz posode in jih potopili v aceton za 10 minut.
- 9) Nato smo vzorce pod pipo sprali z vodo in jih čez noč dali sušiti na temperaturo 102 ± 2 °C.
- 10) Suhe vzorce smo zložili v eksikator. Ko so se ohladili na sobno temperaturo smo jih stehtali.
- 11) NDF smo izračunali po naslednji formuli:

$$\%NDF = \frac{(W_3 - (W_1 \cdot C_1))}{W_2} \cdot 100 \quad (18)$$

Kjer so:

W_1 – teža vrečke [mg]

W_2 – teža vzorca [mg]

W_3 – teža suhih vrečk po ekstrakciji [mg]

C_1 – korekcijski faktor prazne vrečke [-]

3.10.2 Analiza KDV – določevanje celuloze in lignina

Z metodo KDV določimo kislila detergentska vlakna po razgradnji s H_2SO_4 in cetil trimetil amonijevim bromidom (CTAB). Vlakna, ki ostanejo, so celuloza in lignin.

Reagenti za KDV:

- Raztopina kislega detergenta v 1 l 1,00N H_2SO_4 dodamo 20 g cetil trimetil amonijevega bromida.

Potek dela, ki je povezan z analizo NDV:

- 12) Na posebne pladnje smo naložili suhe vzorce iz NDV analize in jih dali v analizator vlaken. V posodo smo nalili kisli detergent tako, da smo prekrili vse vrečke. Posodo smo zaprli in vklopili mešanje in gretje na 100 °C za eno uro.
- 13) Po ekstrakciji smo analizator izklopili in iz posode izpustili vročo tekočino. Nato smo posodo napolnili z vodo in vzorce trikrat prali 5 min pri temperaturi 70 do 90 °C. Po vsakem posameznem pranju smo vodo iz posode izpustili in jo zamenjali s čisto.
- 14) Po pranju smo vzorce vzeli iz posode in jih potopili v aceton za 10 minut.
- 15) Nato smo vzorce pod pipo sprali z vodo in jih čez noč dali sušiti na temperaturo 102 ± 2 °C.
- 16) Suhe vzorce smo zložili v eksikator. Ko so se ohladili na sobno temperaturo, smo jih stehtali.
- 17) KDV smo izračunali po naslednji formuli:

$$\%KDV = \frac{(W_3 - (W_1 \cdot C_1))}{W_2} \cdot 100 \quad (19)$$

W_1 – teža vrečke [mg]

W_2 – teža vzorca [mg]

W_3 – teža suhih vrečk po ekstrakciji [mg]

C_1 – korekcijski faktor prazne vrečke [-]

3.10.3 Analiza KDL – določevanje lignina

S to metodo določimo surova vlakna (lignin), ki so organski ostanek po razgradnji z 0,255 N H_2SO_4 in 0,313N NaOH. Pri tem smo uporabili naslednje reagente:

- Raztopina žveplene kisline: 1,25g H_2SO_4 /100 ml
- 0,313N raztopina natrijevega hidroksida: 1,25 g NaOH/100 ml.

Potek dela:

- 18) Na posebne pladnje smo naložili suhe vzorce iz ADF analize in jih dali v analizator vlaken. V posodo smo nalili 1900 do 2000 ml raztopine žveplene kisline tako, da smo prekrili vse vrečke. Posodo smo zaprli in vklopili mešanje in gretje na 100 °C za 40 minut.
- 19) Po ekstrakciji smo analizator izklopili in iz posode izpustili vročo tekočino. Nato smo posodo napolnili z vodo in vzorce trikrat prali 5 min pri temperaturi 50 do 90 °C. Po vsakem posameznem pranju smo vodo iz posode izpustili in jo zamenjali s čisto.
- 20) V posodo smo nalili 1900 do 2000 ml 0,313N NaOH tako, da smo prekrili vse vrečke. Posodo smo zaprli in vklopili mešanje in gretje na 100 °C za 40 minut.
- 21) Po ekstrakciji smo analizator izklopili in iz posode izpustili vročo tekočino. Nato smo posodo napolnili z vodo in vzorce trikrat prali 5 min pri temperaturi 50 do 90 °C. Po vsakem posameznem pranju smo vodo iz posode izpustili in jo zamenjali s čisto.
- 22) Po pranju smo vzorce vzeli iz posode in jih potopili v aceton za 10 minut.
- 23) Nato smo vzorce pod pipo sprali z vodo in jih čez noč dali sušiti na temperaturo 102 ± 2 °C.
- 24) Suhe vzorce smo zložili v eksikator. Ko so se ohladili na sobno temperaturo, smo jih stehali.
- 25) Nato smo vzorce v žarilnih lončkih sežgali v žarilni pečici pri temperaturi 600 °C (2h).
- 26) Žarilne lončke smo zložili v eksikator. Ko so se ohladili na sobno temperaturo, smo jih stehali.
- 27) KDL smo izračunali po naslednji enačbi 14:

$$\% KDL = \frac{(W_3 - (W_1 \cdot C_1))}{W_2} \cdot 100 \quad (20)$$

W_1 – teža vrečke [mg]

W_2 – teža vzorca [mg]

W_3 – teža organske snovi po žarenju (izguba teže po sežigu) [mg]

C_1 – korekcijski faktor prazne vrečke [mg]

Na podlagi vseh meritev (KDL, KDV, NDV) lahko določimo količino posameznih vlaken v vzorcih.



Slika 34: Ankom vrečke (levo) in Ankom Fiber Analyzer za določevanje vsebnosti lignina, celuloze in hemiceluloze (desno).

Figure 34: Ankom filter bags (left) and Ankom Fiber Analyzer for determination of lignin, cellulose and hemicellulose (right).

3.11 Računska optimizacija sestave anaerobnih reaktorjev za tvorbo biometana

Za optimizacijo procesov se pogosto uporabljajo statistične tehnike, kot je design of experiment (DOE), znotraj katere obstaja poseben razred response surface design za načrtovanje različnih mešanic, kjer so pomembni deleži med posameznimi komponentami oziroma faktorji. Povezavo med komponentami mešanic za čim boljši odziv naredimo s pomočjo pristopa mixture design. Pri tem je količina materiala konstanta, saj je odziv odvisen od relativnih razmerij med komponentami (sestavlinami) v mešanici in ne od količine mešanice (Rao et al., 2011).

Za načrtovanje in analizo eksperimentov z mešanico substratov smo izbrali Mixture Design and triangular surfaces, kjer so uporabljeni naslednji modeli: linearni model, kvadratni model, posebno kubični model in polni kubični model (Rao et al., 2011).

Izrazi višjega reda so pri modelih mešanic pogosto potrebni, saj so mešanice kompleksne. Simplex lattice in simplex centroid designs je načrtovanje z mejnimi točkami. Za napovedovanje glede lastnosti mešanic je zaželeno, da je znotraj simplexa že več ponovitev. Uporabili smo metodo Simplex-lattice. Kvadratni in kubični model lahko podobno poenostavimo, kjer dobimo štiri standardne modele, ki se prilegajo podatkom mešanice. Podane so naslednje enačbe za 3 spremenljivke za tri modele (Statsoft):

- *Linearni model:*

$$y = b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 \quad (21)$$

- *Kvadratni model:*

$$y = b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (22)$$

- *Specialni kubični model:*

$$y = b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (23)$$

Pri tem so:

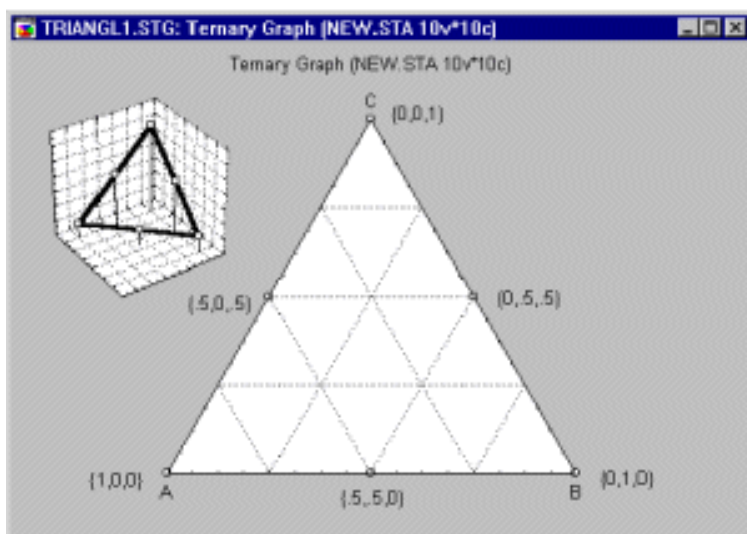
y – odziv BMP v modelu [ml CH₄/(g OS)]

$b_1, b_2, b_3, b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123}$ – koeficienti regresije za odziv BMP pri čisti mešanici [-]

x_1, x_2, x_3 - neodvisne spremenljivke (glej prilogo A) (med 0 in 1, vsota vseh mora biti 1) [-]

Za modeliranje smo uporabili podatke iz kofermentacije različnih substratov, ki so omenjeni že v prejšnjih poglavjih. Za modeliranje optimalne mešanice substratov smo uporabili programsko opremo *STATISTICA* (<http://www.statsoft.com/>). Tabele z vhodnimi podatki za *Statistico* so podane v Prilogi A.

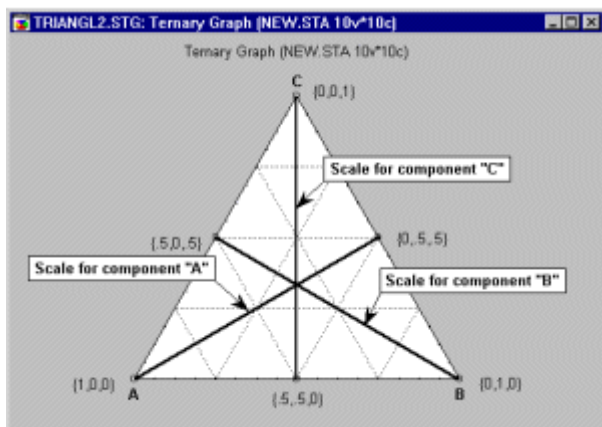
Mešanice in njihova razmerja je mogoče povzeti s pomočjo trikotniškega (tri-komponentni) grafa. Predpostavimo, da imamo zmes, ki je sestavljena iz 3 različnih komponent: A, B in C. Vsako mešanico teh treh sestavin lahko povzamemo z eno točko na trikotnem koordinatnem sistemu, s tremi spremenljivkami. Vsota vsake zmesi je 1,0, tako da je proporcije komponent v vsaki zmesi mogoče razlagati preko takšnih razmerij. Če prikažemo te podatke v 3D razsevnem diagramu (scatterplot), postane jasno, da točke tvorijo trikotnik v 3D prostoru. Le točke znotraj trikotnika, kjer je vsota vrednosti komponent enaka 1, so veljavne mešanice. Zato lahko enostavno grafično prikažemo samo trikotnik, ki povzema vrednosti komponent (strukturni deleži) za vsako mešanico. Za vsak podrobni faktor obstaja na oglišču trikotnika čista mešanica, ki vsebuje samo eno sestavino. Zato so koordinate v oglišču trikotnika 1 (ali 100 %) za ustrezne sestavine, in 0 za vse druge komponente. Pri približevanju nasprotnima ogliščema je vrednost ustrezne sestavine enaka 0 in 0,5 (ali 50 %, itd) za ostale sestavine (Statsoft).



Slika 35: Trikotni grafični prikaz sestavin A, B in C (<http://www.statsoft.com/Textbook/Experimental-Design/button/1#mixture>).

Figure 35: Triangular scatterplot for mixture of components A, B and C.

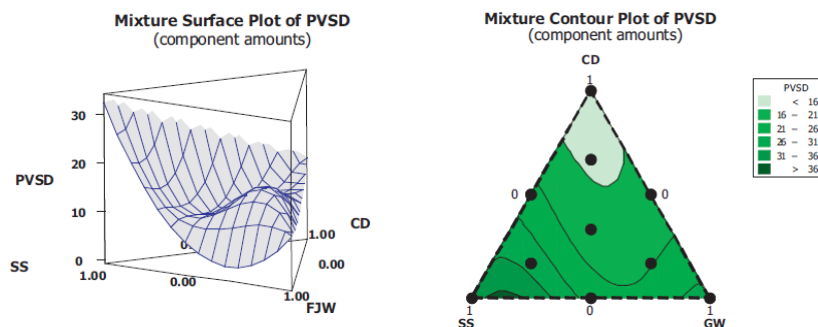
Za premikanje po merilu deležev mešanic se premikamo po premicah, ki so označene na trikotniku Sliki 36.



Slika 36: Grafični prikaz gibanja deleža mešanice sestavin A, B in C v trikotnem grafičnem prikazu (<http://www.statsoft.com/Textbook/Experimental-Design/button/1#mixture>).

Figure 36: Graphical outline of changes in the share of mixture of components A, B and C in regular scatterplot.

Grafi površinskih plastnic nam omogočajo dvodimenzionalni pogled, kjer so vse točke, ki imajo enak odziv, povezane v plastnice konstantnih odzivov (Rao et al., 2011), v našem primeru glede na BMP. 3D površinski grafi omogočajo bolj jasen pogled na odzive pri različnih kombinacijah.



Slika 37: 3D in ploščinski prikazi napovedanih vrednosti s programom za modeliranje različnih mešanic (Rao et al., 2011).

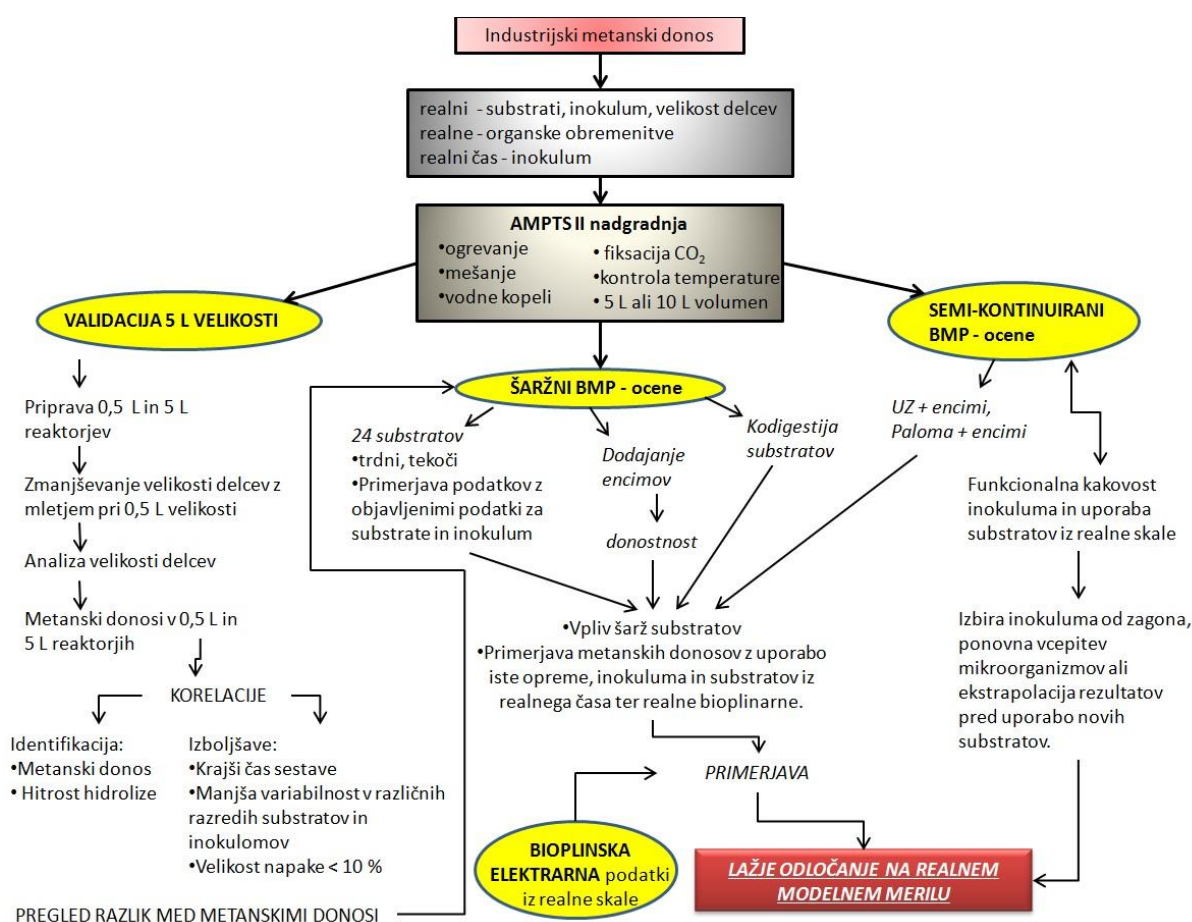
Figure 37: Mixture 3D surface plots and contour plots created with mixture design software (Rao et al., 2011).

3.12 Priprava eksperimentov za anaerobno presnovo na 0,5 l in 5 l modelnem merilu

Za izvedbo vseh eksperimentov, kjer smo merili tvorbo biometana, smo uporabili Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II). Sestavo in delovanje AMPTS smo podali v poglavju 2.6. Pri vseh eksperimentih smo se držali protokola, ki smo ga tam opisali, vsem vhodnim substratom in inokulumu pa smo pred sestavljanjem izmerili suho snov (SS) in organsko snov (OS), da smo lahko izračunali količino substrata, ki ga je treba dozirati v anaerobne reaktorje. Inokulum (biomasa) nam je služila kot vir mikroorganizmov za anaerobno pretvorbo organskih snovi v metan. Na koncu smo od izmerjenih vrednosti odšteli biometan, ki je nastal pri izhodiščnem vzorcu.

Za optimizacijo anaerobne presnove smo najprej definirali uporabljeno biomaso iz različnih bioplinskih elektrarn (BPE) in komunalnih čistilnih naprav (KČN) ter različne substrate, ki smo jih

izbrali glede na potencialne možne substrate iz papirniške industrije in biološke odpadke, ki bi jih v prihodnosti ob pridobljenih okoljskih dovoljenjih na BPE lahko uporabljali kot substrat. Na ta način bi zmanjšali uporabo energetskih rastlin pri pridobivanju bioplina, zmanjšali negativen vpliv na samooskrbo s prehrano ter odvisnost bioplinskih elektrarn od vremenskih pogojev in posledično letine. Lastnosti bioplinskih elektrarn, iz katerih smo pridobili inokulum in substrate, njihova velikost, območje delovanja ter gnilišče CCN Šaleške doline, so podane v Prilogi B.



Slika 38: Shema eksperimentov, ki smo jih izvedli na laboratorijskem modelnem merilu za optimizacijo delovanja bioplinskih naprav.

Figure 38: Experimental outline. Schematic representation of experiments conducted in doctoral dissertation for optimization of functioning of biogas plants.

Za optimizacijo delovanja anaerobnih procesov smo naredili več eksperimentov, ki so podani v preglednici 15 in se med seboj razlikujejo glede na sistem (šaržni ali semi-kontinuirani), vrsto predobdelave, velikost reaktorjev in uporabljene substrate, vse z namenom lažjega odločanja na realnem modelnem merilu. Pri tem smo (glej sliko 38):

- 1) Nadgradili sistem AMPTS II na 5 l velikost, kjer smo uporabili realne substrate, realno organsko obremenitev in realni inokulum ter naredili korelacije med 0,5 l in 5 l metanskimi donosi.
- 2) Na 5 l pilotnem modelnem merilu ocenili biometanski donos 24 substratov, ki so bili v trdni in tekoči obliki in jih primerjali z že obstoječimi objavljenimi podatki.
- 3) Z dodajanjem različnih aditivov v obliki encimov in mikroorganizmov v ocenili vpliv na pridobivanje metana in njihovo donosnost.

- 4) S kombinacijo različnih substratov v šaržnih sistemih optimizirali nastajanje metana.
- 5) S specialnim kubičnim modelom smo predvideli optimalne kombinacije za čim večji BMP za kombinacije različnih substratov.
- 6) V semi-kontinuiranih procesih testirali delovanje encimov na dehidriranem blatu Paloma iz papirniške industrije in učinek ultrazvoka s kombinacijo hidrolitskih encimov na povečanje tvorbe metana blata iz CCN Šaleške doline, kjer smo v obeh primerih uporabili realne substrate in realni inokulum.
- 7) V semi-kontinuiranem procesu z blatom iz Palome smo testirali vpliv delovanja encimov na mikrobnno združbo z uporabo PCR in T-RFLP.
- 8) Spremljali delovanje BPE Vučja vas.

Preglednica 15: Pregled opravljenih eksperimentov za doktorsko nalogo.

Table 15: Review of conducted experiments in doctoral dissertation.

Eksperimenti	Velikostno modelno merilo	Vrsta procesa	Uporabljeni substrati	Uporaba encimov	Kombinacije substratov
1: Test uporabe koruzne silaže, peletov slame in njunih kombinacij	0,5 l	Šaržni	Koruzna silaža, peleti slame	Ne	Da
2: Test uporabe koruzne silaže v kombinaciji s koruznim šrotom	0,5 l	Šaržni	Koruzna silaža, koruzni šrot	Ne	Da
3: Nadgradnja 0,5 l AMPTS II na 5 l modelno merilo	5 l	Šaržni	Inokulum in glukoza	Ne	Ne
4: Primerjava metanskega donosa med 0,5 l in 5 l modelnim merilo na AMPTS II	0,5 in 5 l	Šaržni	Inokulum in glukoza	Ne	Ne
5: Testi uporabe komunalnih odpadkov	5 l	Šaržni	Biološki odpadki	Ne	Ne
6: Test uporabe industrijskih odpadkov za pridobivanje bioplina	5 l	Šaržni	Micelij, lizin, kvas, ostanki sveže mletih klavničnih kosti,	Ne	Ne
7: Test uporabe surovin kmetijskega izvora za pridobivanje bioplina	5 l	Šaržni	Muškatna buča, gnila muškatna buča, krmna repa	Ne	Ne
8: Test uporabe hidrolitskih encimov na povečanje tvorbe metana iz tritikale in blata iz CCN Šaleške doline	5 l	Šaržni	Tritikala	Da	Ne
9: BMP blata iz ČN in kombinacija z biološkimi odpadki	5 l	Šaržni	Blato iz KČN, biološki odpadki	Ne	Da
10: BMP blata iz CCN Šaleške doline in zelenega odreza ter kombinacije	5 l	Šaržni	Blato iz KČN, zeleni odrez	Ne	Da
11: Optimizacija anaerobne presnove s kombiniranjem substratov dehidriranega papirniškega blata, biološkimi odpadki iz gospodinjstva in koruzno silažo	5 l	Šaržni	Paloma, dehidrirano blato – Kraft proces, biološki odpadki, koruzna silaža	Ne	Da
12: Vpliv ultrazvoka in hidrolitskih encimov na pridobivanje biometana blata iz CCN Šaleške doline	5 l	Semi-kontinuirani	Blato iz ČN, obdelava z ultrazvokom	Da	Ne
13: Vpliv hidrolitskih encimov na izplen biometana odpadnega dehidriranega blata iz papirniške industrije v semi-kontinuiranem procesu anaerobne presnove	5 l	Semi-kontinuirani	Odvečno blato iz Palome	Da	Ne
14: Spremljanje delovanje BPE Vučja vas	Realna modelno merilo	Semi-kontinuirani	Koruzna silaža, oljne tropine, gnoj, vinasa, sirek	Ne	Ne
15: Analiza mikrobnne združbe	5 l	Semi-kontinuirani	Odvečno blato iz Palome	Da	Ne

3.12.1 Priprava reaktorjev na 0,5 l modelnem merilu z uporabo AMPTS za različne eksperimente

Za eksperimente na 0,5 l modelnem merilu smo vse inokulume in substrate mehansko obdelali z mešalnikom Philips. Temperaturo v termostatski kopeli smo nastavili na 38 ± 1 °C. Za določitev količine metana, ki ga dobimo iz substrata, smo uporabili napravo AMPTS II proizvajalca Bioprocess Control. Reaktorje volumna 0,5 l smo sestavili, kot je opisano v metodah in meritvah za 0,5 l velikost AMPTS. V dveh ločenih eksperimentih smo uporabili naslednje substrate:

- (1) pripravljena koruzna silaža iz mešalne jame BPE Vučja vas in peleti slame,
- (2) pripravljen substrat iz mešalne jame BPE Vučja vas in koruzni šrot.

3.12.1.1 Priprava eksperimenta 1: Test uporabe koruzne silaže, peletov slame in njihovih kombinacij za pridobivanje biometana na 0,5 l AMPTS II

Za določevanje biometanskega potenciala smo kot substrat uporabili koruzno silažo, ki jo kot surovino uporabljajo na BPE Organica Nova v Vučji vasi ter pelete iz slame. Inokulum smo pridobili iz fermentorja 1 iz zgoraj omenjene BPE. Organska obremenitev v vseh primerih je bila 10 g OS substrata/l inokuluma. Uporabili smo tudi izhodiščni vzorec, v katero nismo dozirali substrata. Sestava pilotnih reaktorjev je podana v tabeli 16. Koruzno silažo smo odvzeli iz mešalne jame (MJ), kjer se nahaja že pripravljena mešanica za doziranje v anaerobne reaktorje bioplinske naprave. Pred sestavljanjem smo inokulumu in substratom izmerili SS, OS in pH (preglednica 17).

Pri tem smo uporabili naslednje okrajšave:

MJ – mešalna jama

Preglednica 16: Pregled sestave pilotnih reaktorjev za določevanje BMP.

Table 16: Design of pilot reactors for determination of BMP.

Substrat	Glukoza	koruzna silaža iz MJ	Peleti
Izhodiščni vzorec	-	-	-
Kontrola z glukozo	10 g OS glukoze/l	-	-
Koruzna silaža iz MJ	-	10 g OS iz MJ/l	
Koruzna silaža iz MJ	-	-	10 g OS iz pelet/l
Koruzna silaža iz MJ + peleti	-	5 g OS iz MJ/l	5 g OS iz pelet/l
Koruzna silaža iz MJ + peleti	-	7,5 g OS iz MJ/L	2,5 g OS iz pelet/L

*razmerje glede na organsko obremenitev

Preglednica 17: Lastnosti vhodnih substratov in inokuluma iz BPE Vučja vas.

Table 17: Characterization of input substrates and inoculum from BGP Vučja vas.

Parameter	koruzna silaža iz MJ	Peleti	Inokulum
suha snov: SS [%]	$8,28 \pm 0,12$	$85,66 \pm 0,33$	$6,50 \pm 0,11$
organska snov: OS [% SS]	$79,32 \pm 0,77$	$90,74 \pm 1,06$	$70,80 \pm 0,52$
organska snov: OS [% SM]	$6,57 \pm 0,24$	$77,73 \pm 0,37$	$4,60 \pm 0,43$
pH	$6,67 \pm 0,02$	-	$7,65 \pm 0,01$

3.12.1.2 Priprava eksperimenta 2: Test uporabe koruzne silaže v kombinaciji s koruznim šrotom za pridobivanje biometana na 0,5 l AMPTS II

Za določevanje biometanskega potenciala smo kot substrat uporabili že pripravljeno mešanico iz mešalne jame (koruzno silažo in kravji gnoj, ki ju kot surovino uporabljajo na BPE Organica Nova v Vučji vasi) ter koruzni šrot. Za določitev količine metana, ki ga dobimo iz substrata, smo uporabili napravo AMPTS I proizvajalca Bioprocess Control. Inokulum smo pridobili iz fermentorja 1 iz zgoraj omenjene BPE. Reaktorje volumna 0,5 l smo sestavili, kot je opisano v metodah in meritvah za 0,5 l velikost AMPTS. Uporabili smo 200 ml inokuluma, ki smo ga razredčili z 200 ml vode. Organska obremenitev v vseh primerih je bila 10 g OS substrata/l inokuluma. Uporabili smo tudi izhodiščni vzorec, v katero nismo dozirali substrata. Sestava pilotnih reaktorjev je podana v preglednici 18.

Koruzno silažo in gnoj smo odvzeli iz mešalne jame (MJ), kjer se nahaja že pripravljena mešanica za doziranje v anaerobne reaktorje bioplinske naprave.

Preglednica 18: Sestava reaktorjev v treh ponovitvah v eksperimentu 2.

Table 18: Reactor design in triplicates in experiment 2.

Reaktor	Inokulum [ml]	Koruzna silaža [g OS]	Koruzni šrot [g OS]	Koruzna silaža [g]	Koruzni šrot [g]
1 - 3	200	0	0	0	0
4 - 6	200	1,5	0,5	24,1	1,2
7 - 9	200	1,8	0,2	28,9	0,5
10 - 12	200	1,9	0,1	30,5	0,2
13 - 15	200	2	0	32,2	0

Preglednica 19: Lastnosti vhodnih substratov in inokuluma iz BPE Vučja vas

Table 19: Characterization of input substrates and inoculum from BGP Vučja vas.

<i>Parameter</i>	<i>Koruzna silaža</i>	<i>Inokulum</i>	<i>Koruzni šrot</i>
SS [%]	8,20 ± 0,23	6,38 ± 0,02	42,83 ± 0,13
OS [% SS]	75,86 ± 0,91	71,88 ± 0,29	93,41 ± 0,03
OS [% SM]	6,22 ± 0,25	4,59 ± 0,03	40,00 ± 0,11
pH	6,82 ± 0,02	8,15 ± 0,01	-
HOK [mg/l]	7800 ± 883	4612 ± 563	-
CAO [mg/l]	8003 ± 152	16677 ± 1808	-
HOK/CAO	0,923 ± 0,012	0,276 ± 0,006	-
N _{celotni} [mg/l]	2942 ± 150	3050 ± 250	-
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	1460 ± 190	2129 ± 90	-

3.12.2 Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu za šaržne eksperimente od št. 3 do št. 12

Zaradi artefaktov glede na industrijsko modelno merilo in neponovljivost ter priprave homogeniziranih substratov in inokuluma, smo se odločili eksperimente izvesti na večjem 5 l eksperimentalnem modelnem merilu. Najprej smo morali nadgraditi AMPTS II na 5 l velikost, kar je opisano v poglavju 3.12.2.1 Eksperiment 3: Nadgradnja 0,5 l AMPTS II na 5 l velikost. Sledila je primerjava biometanskih potencialov med 0,5 l modelnim merilom, kjer smo uporabili standardni postopek in inokulum zmleli, ter 5 l modelnim merilom, kjer inokuluma in biomase nismo mleli.

Za eksperimente na 5 l modelnem merilu smo izbrali substrate, ki so industrijsko pomembni za delovanje bioplinskih elektrarn in katerih vir ni zelo oddaljen, da se po nepotrebnem ne povečajo stroški transporta do lokacije bioplinskih naprav. Substrate smo razdelili v tri skupine:

- substrati, ki izvirajo iz komunalnih odpadkov,
- substrati, ki izvirajo iz industrije,
- substrati, ki izvirajo iz kmetijstva.

Biološki komunalni odpadki so definirani kot organska frakcija odpadkov iz gospodinjstva, kot so kuhinjski odpadki, odpadki od sadja, vrtni odpadki in se zbirajo ločeno od ostalih odpadkov. Danes je znano, da povezovanje in združevanje aerobnega (kompostiranje) in anaerobnega (anaerobna presnova) procesa zmanjšuje negativni vpliv na okolje. Da bi lahko biološke odpadke uspešno vpeljali v proces anaerobne presnove, morajo ti biti dobre kvalitete, narejena pa mora biti tudi strategija njihovega zbiranja. Različne strategije zbiranja vplivajo na lastnosti zbranih bioloških odpadkov. V sistemu zbiranja bioloških odpadkov poznamo (Cecchi et al., 2011):

- mehansko ločene biološke odpadke (angl. Mechanically separated organic fraction of municipal solid wastes (MS-OFMSW)),
- ločeno zbrane biološke odpadke (angl. Separately collected organic fraction of municipal solid wastes (SC-OFMSW)) in
- biološke odpadke, ki jih separiramo na viru (angl. Source sorted organic fraction of municipal solid wastes (SC-OFMSW)).

Raziskave in izkušnje različnih avtorjev kažejo, da so odpadki, ki se zbirajo ločeno ali jih separiramo na viru, dobre kvalitete in imajo visok biometanski potencial, medtem ko je za mehansko ločevanje odpadkov potrebno veliko energije, biometanski potenciali pa so nizki (Cecchi et al., 2011).

V devetih ločenih eksperimentih na 5 l modelnem merilu smo uporabili naslednje substrate:

1. glukoza,
2. biološki odpadki,
3. micelij, lizin, ostanke sveže mletih klavničnih kosti (OSMCK) in kvas
4. muškatna buča, gnila muškatna buča in krmna repa,
5. tritikala in blato iz CCN Šaleške doline,
6. blato iz CCN Šaleške doline in biološki odpadki,
7. blato iz CCN Šaleške doline in zeleni odrez,
8. dehidrirano papirniško blato iz procesa Kraft, dehidrirano papirniško blato iz Palome, koruzna silaža in biološki odpadki.

3.12.2.1 Eksperiment 3: Nadgradnja 0,5 l AMPTS II na 5 l velikost

Zaradi povečanega volumna in pretoka plina je bilo treba prilagoditi volumen in število steklenic z 3 M NaOH raztopino. Za eksperiment določitve števila steklenic napolnjenih z 3 M NaOH raztopino smo uporabili 12 steklenic volumna 5 l, ki so nam služile kot anaerobni reaktorji, kot je opisano v poglavju 3.6.6 Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu. Reaktorje smo napolnili s 3 l inokuluma in jim dodali 10 g glukoze. 3 reaktorje smo direktno povezali z enoto za merjenje metana, ostale pa smo pred povezavo z enoto za merjenje metana v treh paralelkah povezali z 250 ml steklenicami, napolnjenimi s 3 M NaOH raztopino, kot je prikazano na sliki 39. Vse reaktorje smo sestavili v treh ponovitvah. Spremljali smo pridobivanje metana v prvih dneh anaerobne presnove, ko je tvorba metana največja. Pred zagonom nadgrajenega sistema AMPTS II smo reaktorje prepihali z dušikom. Da bi zadržali vse karakteristike inokuluma, ga pred zagonom AMPTS II nismo inkubirali oziroma »razplinili«, kot je to navedeno v navodilih proizvajalca (Kolbl et al. 2014).

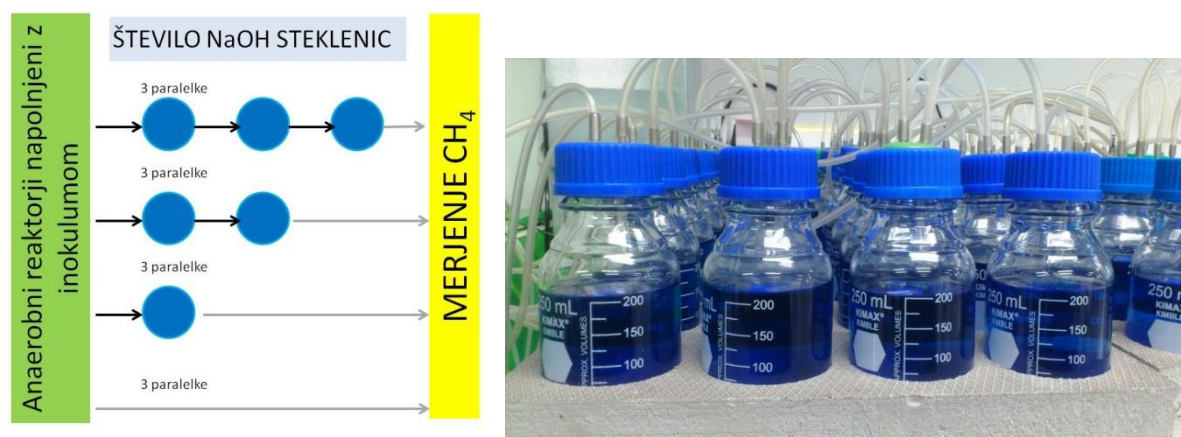
Termostatsko kopel smo naredili iz vodoodpornega stiropora Styrofoam (Synthos XPS). Kopel je vsebovala tudi pokrov z luknjicami za vratove 5 l reaktorjev. Za ogrevanje vode smo uporabili grelnike 3691 Aquarium Heater z močji 300 W proizvajalca Eheim Jäger (Nemčija) in potopna mešala NWA 1.6 adj Newave (Kitajska), ki so omogočala enakomerno distribucijo toplote v termostatski kopeli. Za spremljanje temperature smo uporabili termometre. Za en AMPTS II smo naredili dve vodni kopeli, kamor lahko postavimo do deset 5 l reaktorjev. Za zagotovljeno mešanje vsebine anaerobnih reaktorjev smo podaljšali mešala (Kolbl et al. 2014).



Slika 39: Termostatska vodna kopel za 5 l reaktorje, narejena iz vodo nepropustnega stiropora. V kopeli sta grelnika za gretje vode in mešalo za kroženje vode (levo) in podaljšanje mešala v 5 l reaktorju (desno) (Kolbl et al. 2014).

Figure 39: Waterproof thermostatic water bath used for heating 5 l reactors with two water heaters and mixer for circulation of water (left) and mixing shaft extension in 5 l reactor (right) (Kolbl et al. 2014).

Podaljšali smo tudi cevke na gumijastih zamaških 250 ml NaOH steklenic, da smo preprečili direktni pretok bioplina brez vezanja CO₂. Sestavo plina po odstranjevanju (vezanju) CO₂ smo preverili z merilnikom plina Dräger X-am 7000 in Sewerin Multitech 410, tem da smo plin predhodno posušili tako, da smo ga napeljali skozi hermetično zaprto steklenico, v kateri smo imeli silika gel v obliki zrnec in od tam naprej v posebno plastično vrečko Tedlar bag (Adtech) (Kolbl et al., 2014).



Slika 40: Shema sestave eksperimenta za določanje potrebnega števila 250 ml steklenic 3 M NaOH raztopine za nadgradnjo AMPTS II na 5 l modelno merilo (levo) in steklenice volumna 250 ml napolnjene z 3 M NaOH raztopino za vezanje ogljikovega dioksida iz reaktorjev (desno) (Kolbl et al. 2014).

Figure 40: Schematic outline of number of 250 ml bottles containing 3 M NaOH for CO₂ stripping from biogas during upgrade of AMPTS II to 5 L scale (Kolbl et al. 2014).



Slika 41: Tedlar vrečka (Adtech) za shranjevanje plinov in merilnik sestave plinov Dräger X-am 7000 (levo) in merilec plina Sewerin Multitec 410 (desno).

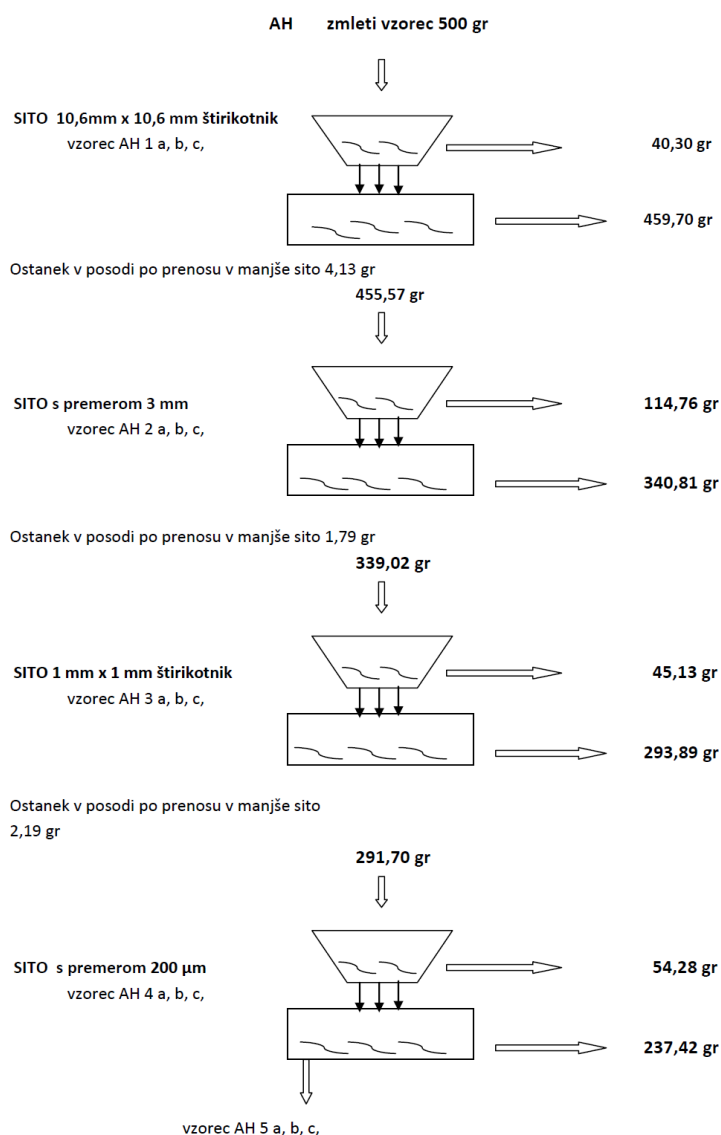
(<http://www.sewerin.com/cms/en/alt/products/gas/gas-warning-devices/multitec-410.html>)

Figure 41: Tedlar bag (Adtech) for biogas collecting and gas detection device Dräger X-am 7000 and gas measurement device Sewerin Multitec 410 (right)

(<http://www.sewerin.com/cms/en/alt/products/gas/gas-warning-devices/multitec-410.html>).

3.12.2.2 Eksperiment 4: Primerjava metanskega donosa med 0,5 l in 5 l modelnim merilom AMPTS II

Za definiranje razlike metanskega donosa na 0,5 in 5 l šaržnem modelu smo uporabili biomaso iz BPE Vučja vas. Za 0,5 l modelno merilo smo biomaso zmleli s prostostoječim mešalnikom Philips HR2096, da smo ji zmanjšali velikost delcev. Za mehansko obdelano in neobdelano biomaso smo določili velikost delcev z mokro sejalno analizo, kot je prikazano na sliki 42. Uporabili smo sita velikosti 10, 3, 1 in 0,2 mm (slika 42). Vse smo naredili v 6 paralelkah. Presejane vzorce smo razdelili v 4 skupine glede na velikost delcev: velikost delcev večja od 10 mm, velikost delcev med 3 in 10 mm, velikost delcev med 1 in 3 mm, ter velikost delcev manjša od 1 mm. Različnim skupinam (glede na velikost delcev) smo določili suho snov in med sabo primerjali predobdelane in neobdelane vzorce (Kolbl et al., 2014). Sedem paralelek zmlete biomase smo napolnili v 0,5 l reaktorje do volumna 0,4 litra, 7 paralelek neobdelane biomase pa smo napolnili v 5 l reaktorje do volumna 4 l in zagnali AMPTS II za merjenje tvorbe biometana (Kolbl et al., 2014).



Slika 42: Shema sejalne analize mletih vzorcev iz BPE Vučja vas.

Figure 42: Sieve analysis of homogenized samples from BGP Vučja vas.

3.12.2.3 Priprava eksperimenta 5: Test uporabe komunalnih odpadkov za pridobivanje biometana na 5 l šaržnem AMPTS II

Za določevanje BMP smo uporabili naslednje komunalne odpadke: biološke odpadke iz restavracij in gospodinjstev, ki smo jih označili z A, B, C, D, E, G in so bili zbrani ločeno. Lastnosti vhodnih substratov so podane v preglednici 20. Kot inokulum smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec. Uporabili smo tudi izhodiščne vzorce, kjer nismo dodajali substrata. Za določevanje parametrov, kot so suha snov, organska snov in dušik, smo vzorce odpadkov iz restavracij mehansko obdelali, da je bila velikost delcev manjša od 15 mm (slika 43 in 44). Sestavljanje in zagon nadgrajenega AMPTS II na 5 l velikost smo izvedli, kot je opisano v poglavju 3.6.6 Priprava reaktorjev na 5 l modelnem merilu.



Slika 43: Ločeno zbrani biološki odpadki v biološko razgradljivih vrečkah.

Figure 43: Separately collected organic wastes in biodegradable bags.

Preglednica 20: Fizikalno kemijski parametri substratov: biološki odpadki iz restavracij A, B, C, D, E, G.

Table 20: Physico-chemical parameters of input substrates: biological wastes from restaurants A, B, C, D, E and G.

Vzorec	Predobdelava	Velikost delcev	SS [%]	OS [% SS]	OS [% SM]	TKN [mg l ⁻¹]	
odpadki iz restavracij	A	mehanska*	< 15 mm	30.90±1.39	78.99±3.71	24.38±0.35	974±13
	B	mehanska*	< 15 mm	28.64±2.41	95.38±0.03	27.33±2.39	1203±72
	C	mehanska*	< 15 mm	38.18±2.87	76.18±3.38	29.13±3.08	2076±12
	D	mehanska*	< 15 mm	44.11±0.53	67.72±1.10	29.87±0.15	2306±12
	E	mehanska*	< 15 mm	28.60±1.20	71.14± 1.08	20.35±1015	2029±32
	G	mehanska*	< 15 mm	57.54±2.30	71.07±1.57	53.38±3.05	4810±100
inokulum	brez	<15 mm	5,59 ± 0,2	71,07 ± 0,72	4,04 ± 0,3	3906 ± 42	

*prostostoječi mešalnik Philips

Biološki odpadki so vsebovali različne vrste hrane, vse od jajčnih lupin, olupkov krompirja, pomaranč, mandarin in jabolčk, do kavnih usedlin, solate, kvašenega testa, smokijev, lupine oreh, čajnih vrečk

in ostale hrane na stopnji fermentacije (Slika 43). Zbrani so bili v biološko razgradljivih vrečkah, v katerih pa ni bilo izcedne vode, ki se ponavadi pojavi pri daljšem zadrževalnem času odpadkov v bioloških zabojnikih. Vse substrate smo mehansko obdelali z mešalnikom Philips, da je njihova velikost delcev bila takšna, kot je na realni bioplinski elektrarni ($d < 25 \text{ mm}$) pred doziranjem v anaerobne reaktorje.



Slika 44: Mehansko obdelani biološki odpadki. Premer posode je 30 cm.

Figure 44: Mechanically homogenized biological wastes. Diameter of container is 30 cm.

3.12.2.4 Priprava eksperimenta 6: Test uporabe industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana na 5 l šaržnem AMPTS II

Industrijski biološko razgradljivi odpadki, ki smo jih uporabili v naših eksperimentih, so bili naslednji: micelij gliv, lizin, pivovarniški kvas, dehidrirano sekundarno blato iz papirniške industrije, ostanke sveže mletih klavničnih kosti (OSMKK) in odpadno blato iz papirniške industrije iz procesa Kraft (za proizvodnjo papirne kaše). Odpadno blato iz papirniške industrije iz procesa Kraft ter dehidrirano sekundarno blato iz papirniške industrije Paloma smo obravnavali v eksperimentu 11: Optimizacija anaerobne presnove s kombiniranjem substratov: dehidrirano papirniško blato, biološki odpadki iz gospodinjstva in koruzna silaža. V tem eksperimentu smo uporabili naslednje substrate:

- micelij gliv,
- ostanke sveže mletih klavničnih kosti (OSMKK),
- lizin in
- pivovarniški kvas.

Micelij gliv smo prejeli iz obrata Lek iz Lendave. Micelij gliv je stranski proizvod, ki nastane pri proizvodnji klavulanske kisline. Lizin je esencialna aminokislina, ki jo ljudje in živali zaužijemo s hrano. Navadno se uporablja in dodaja kot aditiv k prehrani (<http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Lizin>; Boyer, 2005). OSMKK smo pridobili iz mesnopredelovalne industrije. Kot inokulum za OSMKK, micelij in lizin smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec. Pripravili smo tudi negativne kontrole, brez dodatka substrata. Substratov predhodno nismo mehansko obdelali. Velikost delcev OSMKK ni presegala 1 cm. Lizin smo dobili v obliki fino mletega prahu, micelij pa v tekoči obliki. Za kvas iz pivovarniške industrije smo uporabili biomaso iz CČN Šaleške doline. Organska obremenitev reaktorjev v primerih micelija, lizina in OSMKK je bila 10 g OS/l, v primeru kvasa pa 2,4 g OS/l. Zadrževalni čas je znašal 32 dni (okrog 50 % realnega modelnega merila), za pivovarniški kvas pa 32 dni (okrog 91 % realnega modelnega merila). Temperatura delovanja anaerobnih reaktorjev je bila 38 ± 2 °C. Vse reaktorje smo naredili in sestavili v treh ponovitvah. Vsem vhodnim substratom in inokulumu smo izmerili naslednje parametre: SS, OS, pH, HOK/CAO, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in celotni dušik, kar je podano v preglednici 21.

Preglednica 21: Lastnosti vhodnih substratov in uporabljenega inokuluma.

Table 21: Characteristics of input substrates and inocula in experiment 6.

	Inokulum BPE Šijanec	OSMKK	micelij	lizin	Inokulum CČN Šaleške doline	Kvas
Mehanska predobdelava	Ne	Da*	Ne	Ne	Ne	Ne
Velikost delcev	< 20 mm	< 10 mm	Tekočina	Prah	< 2 mm	< 2 mm
SS [%]	6,41 ± 0,06	8,30 ± 0,61	33,95 ± 0,02	86,90 ± 0,02	2,21 ± 0,01	32,55 ± 0,56
OS [% SS]	74,46 ± 0,31	79,3 ± 5,71	95,05 ± 0,12	7,90 ± 0,54	55,08 ± 0,32	93,15 ± 0,07
OS [% SM]	4,77 ± 0,22	6,58 ± 0,39	32,27 ± 0,49	6,86 ± 0,72	1,22 ± 0,13	30,32 ± 0,54
pH	7,47 ± 0,01	-	5,68 ± 0,01	-	7,53 ± 0,02	-
HOK [mg/l]	4027 ± 50	-	-	-	2777 ± 123	-
CAO [mg/l]	11284 ± 54	-	-	-	5671 ± 48	-
HOK/CAO	0,357 ± 0,003	-	-	-	0,490 ± 0,026	-
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ [mg/l]	742 ± 51	-	-	-	2277 ± 61	-
$\text{N}_{\text{celotni}}$ [mg/l]	7380 ± 10	7954 ± 95	6722 ± 224	533 ± 3	5671 ± 38	974 ± 13

*zmleto v mesno predelovalni industriji

3.12.2.5 Priprava eksperimenta 7: Test uporabe surovin kmetijskega izvora za pridobivanje biometana na 5 l šaržnem AMPTS II

V naših eksperimentih, ki smo jih izvedli, so naslednji substrati kmetijskega izvora: muškatna buča, gnila muškatna buča, krmna repa, koruzna silaža in tritikala.

V tem ekseperiment smo kot substrat uporabili naslednje substrate:

- muškatna buča,
- gnila muškatna buča in
- krmna repa.

Eksperiment s tritikalo je podan v poglavju 3.12.2.8 Priprava eksperimenta 8: Test vpliva uporabe hidrolitskih encimov za povečanje proizvodnje metana iz tritikale in blata iz CCN Šaleške doline na 5 l modelnem merilu AMPTS II.

Substrate smo s prostostoječim mešalnikom Philips mehansko obdelali na delce < 20 mm (glej tabelo 22), kot bi jih na bioplinarni pred doziranjem v mešalne jame, kjer je velikost delcev manjša od 25 mm. Krmne repe in koruzne silaže nam ni bilo treba mleti, saj smo jo dobili že v predhodno obdelani obliki. Izmerjeni parametri substratov in velikost delcev so podani v preglednici 22. Kot inokulum smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec. Vse anaerobne reaktorje smo sestavili v treh ponovitvah, organska obremenitev je v vseh primerih bila 10 g OS/l inokuluma.

Preglednica 22: Lastnosti vhodnih substratov kmetijskega izvora in uporabljenega inokuluma.
Table 22: Characteristics of input substrates and inocula in experiment 7.

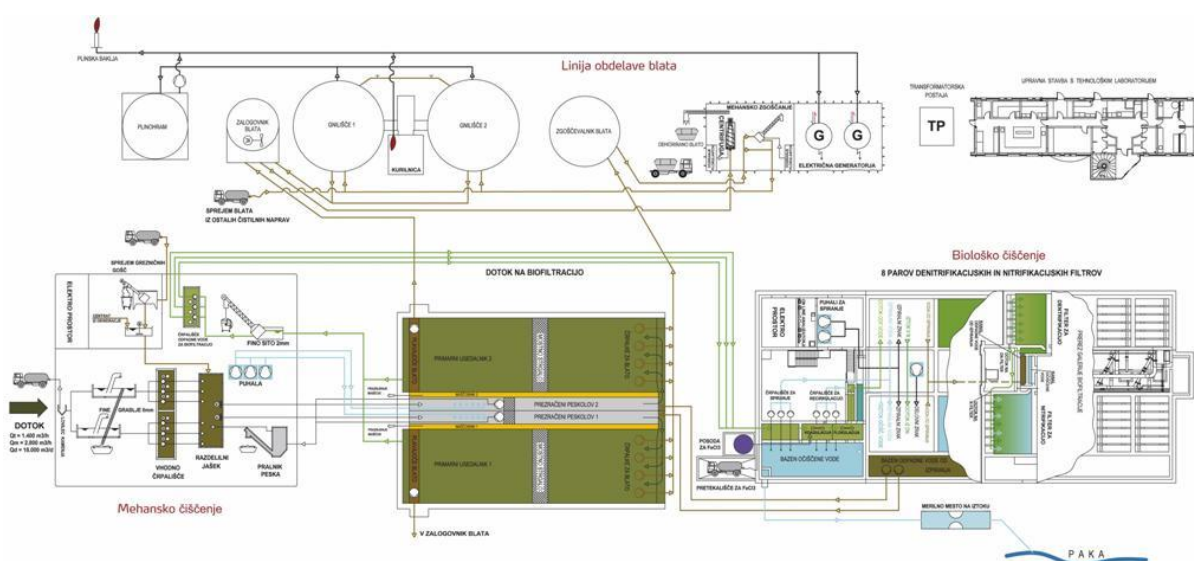
	Inokulum BPE Šijanec	Muškatna buča	Gnila muškatna buča	Krmna repa
Mehanska predobdelava	ne	Da *	Da *	Da **
Velikost delcev	< 20 mm	< 10 mm	< 1 mm	< 15 mm
SS [%]	5,59 ± 0,2	12,10 ± 0,76	9,50 ± 0,01	10,30 ± 0,30
OS [% SS]	71,07 ± 0,72	84,00 ± 0,86	69,50 ± 1,51	92,70 ± 0,41
OS [% SM]	4,04 ± 0,3	10,13 ± 1,24	6,57 ± 0,24	9,58 ± 0,27
pH	7,47 ± 0,01	-	-	-
HOK [mg/l]	4136 ± 213	-	-	-
CAO [mg/l]	11234 ± 58	-	-	-
HOK/CAO	0,368 ± 0,018	-	-	-
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	829 ± 40	-	-	-
N _{celotni} [mg/l]	3906 ± 42	4823 ± 49	5304 ± 15	979 ± 8

*prostostoječi mešalnik Philips

**naribano na rezance

3.12.2.6 Priprava eksperimenta 8: Test uporabe hidrolitskih encimov za povečanje pridobivanja biometana iz tritikale in odvečnega blata iz CČN Šaleške doline na 5 l šaržnem AMPTS II

Blato za predobdelavo smo pridobili iz Centralne čistilne naprave Šaleške doline. Vzorce smo vzeli iz zgoščevalnika (sludge thickener) tik pred vstopom v anaerobno gnilišče. CČN Šaleške doline je velikosti 50.000 PE in zajema mehansko in biološko čiščenje odpadne vode. Odvečno blato iz primarnega in sekundarnega zgoščevalnika se nadalje obdela v gnilišču (slika 45 in 46). Za zgoščevanje blata se uporablja zgoščevalnik, preko katerega se doseže vsebnost suhe snovi v blatu med 2 in 4 %. Gnilišče sestavljata 2 anaerobna reaktorja volumna 960 m³. Proces anaerobne presnove poteka pri temperaturi med 35 in 37°C. Bioplin, ki nastane, se porabi na plinskem motorju z močjo 150 kW. Toplota, ki se pri tem ustvarja, se porabi za ogrevanje gnilišča.



Slika 45: Tehnološka shema Centralne čistilne naprave Šaleške doline. (http://www.kp-velenje.si/index.php?option=com_content&view=article&id=126:centralna-istilna-naprava-aleke-doline&catid=67:odvajanje-in-ienje&Itemid=201).

Figure 45: Technological scheme of central municipal wastewater plant of Šaleška valey.



Slika 46: Pogled na gnilišče CČN Šaleške doline (http://www.kp-velenje.si/index.php?option=com_content&view=article&id=126&Itemid=201).

Figure 46: Anaerobic digesters at WWTP Šaleška valley.

Povečanje prirastka biometana (BMP) smo preizkušali na dveh specifičnih primerih, in sicer za BPE Šijanec in CČN Šaleške doline. Kot inokulum za lignocelulozni substrat tritikalo smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec iz anaerobnega reaktorja 1, kot inokulum za odvečno aerobno blato iz čistilne naprave pa smo uporabili anaerobno biomaso iz CČN Šaleške doline iz prvega anaerobnega reaktorja. V primeru tritikale smo v pilotne šaržne reaktorje dozirali 3000 ml biomase iz BPE Šijanec, v primeru blata iz ČN pa 3000 ml biomase iz CČN Šaleške doline. Organska obremenitev s tritikalo je bila 10 g OS/l, za blato iz ČN pa 2,35 g OS/l. Uporabili smo mešanico encimov proizvajalca Novozymes in encime Micropan Biogas proizvajalca Eurovix, ki smo jih dnevno dozirali glede na vsebnost suhe snovi in organske snovi, po navodilih proizvajalca (Priloga C). Tabela encimov, ki smo jih uporabili v eksperimentih, je podana v Prilogi C. Dnevna količina vsakega posameznega encima proizvajalca Novozymes za blato iz ČN je znašala 114 μ l, količina Micropan Biogas pa 0,15 g. Pri tritikali smo dnevno dozirali 420 μ l posameznega encima Novozymes in 0,30 g Micropan Biogas, ki smo jih raztopili v destilirani vodi. Za doziranje smo uporabili 50 ml brizgo. Pri doziranju skozi cevko na gumijastem zamašku smo le to splaknili še z 10 ml destilirane vode. Skupaj je bilo dozirano 15 ml tekočine. Reaktorjem brez dodajanja encimov smo dnevno dozirali 15 ml destilirane vode. Mešanje v reaktorjih je bilo zagotovljeno z mešali, ki so bila vodena računalniško. Skupaj smo tako uporabili 30 reaktorjev (n = 2 nadgrajena AMPTS II). Lastnosti uporabljenih substratov in inokuluma so podane v preglednici 23.

Preglednica 23: Izmerjeni vhodni parametri substratov in biomase v eksperimentu 8 (Kolbl et al., 2014).

Table 23: Characteristics of input substrates and inocula in experiment 8 (Kolbl et al., 2014).

<i>Parameter</i>	<i>Tritikala</i>	<i>Inokulum BPE Vučja vas</i>	<i>Odvečno aerobno blato</i>	<i>Inokulum iz CČN Šaleške doline</i>
SS [%]	9,01 \pm 0,3	7,44 \pm 0,05	5,34 \pm 0,18	2,18 \pm 0,01
OS [%]	73 \pm 0,63	70,63 \pm 0,28	79,96 \pm 0,18	54,90 \pm 0,26
OS [% SM]	6,62 \pm 0,27	5,30 \pm 0,05	4,27 \pm 0,01	1,20 \pm 0,01
pH	7,6 \pm 0,01	7,54 \pm 0,01	5,80 \pm 0,01	7,50 \pm 0,01
HOK [mg/l]	-	4406 \pm 163	-	-
CAO [mg/l]	-	15071 \pm 249	-	-
HOK/CAO	-	0,292 \pm 0,006	-	-
N _{celotni} [mg/l]	7584 \pm 119	6765 \pm 73	3117 \pm 42	2663 \pm 30
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	1037 \pm 67	856 \pm 39	127 \pm 12	884 \pm 122

3.12.2.7 Eksperiment 9: Test uporabe odvečnega blata iz ČN in kombinacija z biološkimi odpadki za pridobivanje biometana na 5 l šaržnem AMPTS II

Kot inokulum smo uporabili aktivno biomaso iz prvega anaerobnega reaktorja CČN Šaleške doline. Blato, ki je služilo kot substrat, smo vzeli iz zgoščevalnika. Kot kosubstrat smo uporabili biološke odpadke, ki se ločeno zbirajo v gospodinjstvih. Za določitev suhe snovi, organske snovi in ostalih parametrov, ki so prikazani v spodnji preglednici 24 in 25, smo biološke odpadke mehansko obdelali s prosto stoječim mešalnikom Philips, na delce manjše od 15 mm. Na podlagi SS in OS smo izračunali količino substrata, ki ga moramo dozirati v reaktor. Reaktorje in meritve smo izvedli, kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Uporabili smo 5 l reaktorje. Vse meritve smo naredili v treh ponovitvah. Merili smo SS, OS, pH, HOK, CAO, N_{celotni} , amonijski dušik in BMP (preglednica 25). Substrate smo dozirali, kot je prikazano v tabeli 24. Organska obremenitev reaktorjev brez upoštevanja biomase je bila 2,35 g OS/l.

Vsebnost suhe snovi v blatu na začetku eksperimenta je znašala 2,44 %, bioloških odpadkov 32,74 %, biomasa iz CČN Šaleške doline pa je imela 2,21 % suhe snovi. Najmanj organske snovi v svežem vzorcu je vsebovala biomasa, sledijo blato in biološki odpadki. pH blata je znašal 6,81, pH biomase pa 7,53. V blatu je bilo nekoliko več hlapnih organskih kislin (3553 mg/l), v biomasi pa je koncentracija znašala 2777 mg/l. Občutno več celotnega anorganskega ogljika (CAO) je bilo v biomasi (5671 mg/l) kot v blatu (564 mg/l). Razmerje med HOK in CAO je pri blatu 6,343, pri biomasi pa 0,490.

Preglednica 24: Doziranje substratov v pilotne reaktorje in organska obremenitev pri eksperimentu 9.
Table 24: Organic loading and dosage of pilot reactors in experiment 9.

Substrat	Organska obremenitev [g OS/l]	Doziranje [ml ali g]	Voda [ml]
Biomasa	0	3000	0
Glukoza (Sigma Aldrich)	2,35	7,1	150
Blato iz ČN	2,35	405	0
Biološki odpadki	2,35	27,2	170
Blato iz ČN + biološki odpadki	1,175 + 1,175	13,6 g biološki odpadki in 202 ml blata iz ČN	85

Preglednica 25: Izmerjeni vhodni parametri substratov in biomase za določevanje BMP s standardno napako v eksperimentu 9.

Table 25: Input parameters of substrates and inoculum for determination of BMP with standard deviation of experiment 9.

Parameter	Blato	Biološki odpadki	Inokulum iz CČN Šaleške doline
SS [%]	2,44 ± 0,015	32,74 ± 0,60	2,21 ± 0,01
OS [%]	71,20 ± 0,02	79,18 ± 0,98	55,08 ± 0,32
OS [% SM]	1,74 ± 0,12	25,92 ± 3,81	1,22 ± 0,13
pH	6,81 ± 0,01	-	7,53 ± 0,02
HOK [mg CH ₃ COOH/l]	3553 ± 214	-	2777 ± 123
CAO [mg CaCO ₃ /l]	564 ± 41	-	5671 ± 48
HOK/CAO	6,343 ± 0,8	-	0,490 ± 0,026
N_{celotni} [mg/l]	-	-	5671 ± 38
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	-	-	2277 ± 61

3.12.2.8 Eksperiment 10: Test uporabe blata iz ČČN Šaleške doline in zelega odreza ter njihovih kombinacij za pridobivanje biometana na 5 l šaržnem AMPTS II

Blato iz ČČN Šaleške doline, ki je služilo kot substrat, smo vzeli iz zgoščevalnika. Koncentracija suhe snovi v blatu je bila nekoliko višja, zaradi suše, ki je trajala daljše obdobje. Kot kosubstrat smo uporabili sveži zeleni odrez, ki smo ga pridobili iz CRO Puconci. Zeleni odrez je predhodno bil obdelan z mešalcem Mashmaster (Kompotech), velikost delcev na ta način obdelanega zelenega odreza je bila manjša od 25 mm. Zeleni odrez smo takoj po odvzemu dali v plastične vreče, ga pripeljali v laboratorij in vsem vzorcem določili suho snov, organsko snov ter ostale parametre, ki so prikazani v spodnji tabeli. Kot inokulum smo uporabili aktivno biomaso iz prvega anaerobnega reaktorja BPE Šijanec iz Ormoža. BPE Šijanec kot substrat uporablja lignocelulozne substrate. Mikroorganizmi, ki so prisotni v inokulumu BPE Šijanec, so prilagojeni na razgradnjo lignoceluloze, zato smo predpostavljali, da razgradnja zelenega odreza ne bo predstavljala šoka. Na podlagi SS in OS smo izračunali količino substrata za organsko obremenitev reaktorjev. Reaktorje in meritve smo izvedli kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Uporabili smo 5 l reaktorje. Vse meritve smo naredili v treh ponovitvah. Merili smo SS, OS, pH, HOK, CAO, N_{celotni} , $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in BMP. Substrate smo dozirali kot je prikazano v preglednici 26. Organska obremenitev reaktorjev brez upoštevanja biomase je bila 2,35 g OS/l, temperatura delovanja procesa anaerobne presnove pa $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

Preglednica 26: Doziranje blata iz ČČN in zelenega odreza in njune kombinacije v eksperimentu 10.
Table 26: Dosing of wastewater sludge, green cuttings and their combinations in experiment 10.

Delež substrata glede na vsebnost OS	Blato iz ČČN [ml]	Zeleni odrez [g]	Voda [ml]	Skupna organska obremenitev vhodnih substratob [g OS]
100 % zeleni odrez	0	29,6	188	7,05
50 % blato, 50% zeleni odrez	135,7	16,7	95	7,05
75 % blato, 25 % zeleni odrez	203,6	7,4	32	7,05
85 % blato, 15 % zeleni odrez	230,7	4,4	11	7,05
90 % blato, 10 % zeleni odrez	244,3	3	0	7,05
95 % blato, 5 % zeleni odrez	257,9	1,5	0	7,05

Preglednica 27: Izmerjeni vhodni parametri substrata blata iz ČČN in zelenega odreza ter biomasa iz BPE Šijanec.

Table 27: Characteristics of input substrates and inoculum from BGP Šijanec in experiment 10.

Parameter	inokulum BPE Šijanec	Blato iz ČČN	zeleni odrez
SS [%]	$8,42 \pm 0,11$	$3,53 \pm 0,04$	25,74
OS [% SS]	$67,82 \pm 0,27$	$73,02 \pm 0,27$	82,04
OS [% SM]	$5,77 \pm 0,10$	$2,58 \pm 0,04$	21,12
pH	$8,01 \pm 0,01$	$6,78 \pm 0,01$	-
HOK [mg/l]	7030 ± 46	4243 ± 32	-
CAO [mg/l]	30202 ± 630	252 ± 10	-
HOK/CAO	$0,233 \pm 0,073$	$16,837 \pm 3,2$	-
N_{celotni} [mg/l]	6710 ± 250	6629	-
$\text{NH}_4^+\text{-N}$ [mg/l]	-	756	-

3.12.2.9 Eksperiment 11: Test optimizacije anaerobne presnove s kombiniranjem dehidriranega papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata Paloma, bioloških odpadkov iz gospodinjstev in koruzne silaže s 5 l AMPTS II za pridobivanje biometana

Za izboljšanje in optimizacijo blata iz papirniške industrije smo določili biometanske potenciale dehidriranega papirniškega blata iz procesa Kraft ter dehidriranega blata iz Palome. Ob teh substratih smo izmerili BMP še biološkim odpadkom iz gospodinjstev in koruzni silaži, nato pa naredili njihove kombinacije. V tem eksperimentu smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec. Reaktorje volumna 5 l smo napolnili z inokulumom in jih sestavili, kot je opisano v metodah za 5 l velikost za določevanje BMP. Uporabili smo naslednje substrate:

- (A) papirniško blato iz procesa Kraft (Graz, Avstrija), ki ga bomo nadalje imenovali blato Kraft,
- (B) papirniško blato iz Palome,
- (C) koruzna silaža,
- (D) biološki odpadki iz gospodinjstev.



Slika 47: Dehidrirano papirniško blato iz procesa Kraft (levo) in dehidrirano blato iz Palome (desno) (Kolbl et al. 2014).

Figure 47: Dehydrated paper mill sludge from Kraft prces (left) and dehydrated sludge from Paloma (right) (Kolbl et al. 2014).

Preglednica 28: Izmerjeni vhodni parametri substratov pri določevanju BMP odvečnega dehidriranega blata iz dveh papirniških industrij (blato Kraft in Paloma), bioloških odpadkov iz gospodinjstva in koruzne silaže ter inokuluma iz BPE Šijanec v eksperimentu 11 (Kolbl et al. 2014).

Table 28: Characteristics of input substrates to determine BMP of paper mill sludges Kraft and Paloma, OFMSW, silo maize and inoculum from BGP Šijanec in experiment 11 (Kolbl et al. 2014).

Parameter	blato Kraft	Paloma	Biološki odpadki	Koruzna silaža	Inokulum
SS [%]	36,71 ± 0,86	19,66 ± 0,03	25,56 ± 0,28	36,14 ± 1,89	7,47 ± 0,19
OS [% SS]	43,44 ± 0,78	78,37 ± 0,26	93,39 ± 0,31	94,79 ± 2,04	68,99 ± 0,70
OS [% SM]	15,94 ± 0,15	13,31 ± 0,02	23,87 ± 0,31	34,29 ± 2,46	5,16 ± 0,18
pH	-	-	-	-	7,61 ± 0,01
HOK [mg/l]	-	-	-	-	3745 ± 303
CAO [mg/l]	-	-	-	-	11985 ± 41
HOK/CAO	-	-	-	-	0,312 ± 0,024
T _{celotni} [mg/l]	1943 ± 21	1055 ± 35	2112 ± 45	1113 ± 17	7102 ± 105
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	-	-	-	-	1204 ± 59

Organska obremenitev v vseh primerih je bila 10 g OS/l, temperatura obratovanja pa 38 ± 2 °C. Vsak substrat posebej smo dali v tri reaktorje, prav tako devet kombinacij (vse smo izvedli v treh ponovitvah). Enakomerni delež organske obremenitve v razmerjih za posamezen substrat (1), dva substrata (0,5 : 0,5), kombinacijo treh substratov (0,33 : 0,33 : 0,33) in štirih substratov (0,25 : 0,25 : 0,25 : 0,25) smo določili glede na celotno organsko obremenitev 10 g OS/l, ki je enaka dvakratni obremenitvi reaktorjev na BPE (preglednica 28 in 29). Skupaj smo tako sestavili 45 reaktorjev (Kolbl et al., 2014).

Preglednica 29: Doziranje reaktorjev za določitev BMP z oznakami črk za substrate blato Kraft, Paloma, koruzna silaža, biološki odpadki in njihove kombinacije.

Table 29: Dosing of reactors with paper mill sludge from Kraft proces and Paloma, silo maize, biological wastes and their combinations.

	Blato Kraft = A [g]	Paloma = B [g]	Koruzna silaža = C [g]	Biološki odpadki = D [g]	Razmerje organske snovi	Organska obremenitev v [g OS/L]
Inokulum	-	-	-	-	-	-
Glukoza	-	-	-	-	-	10
Blato Kraft	188,1	-	-	-	-	10
Paloma	-	225,3	-	-	-	10
Koruzna silaža	-	-	91,5	-	-	10
Biološki odpadki	-	-	-	125,7	-	10
A + D	94,1	-	-	62,8	0,5:0,5	10
B + D	-	112,7	-	62,8	0,5:0,5	10
A + C	94,1	-	45,8	-	0,5:0,5	10
B + C	-	112,7	45,8	-	0,5:0,5	10
A + B	94,1	112,7	-	-	0,5:0,5	10
C + D	-	-	46	62,8	0,5:0,5	10
A + C + D	62,7	-	30,5	41,9	0,33:0,33:0,33	10
B + C + D	-	75,1	30,5	41,9	0,33:0,33:0,33	10
A + B + C + D	47,0	56,3	22,9	31,4	0,25:0,25:0,25:0,25	10

3.12.3 Semi-kontinuirani eksperimenti na 5 l modelnem merilu AMPTS II

3.12.3.1 Eksperiment 12: Test vpliva ultrazvoka in hidrolitskih encimov na pridobivanje biometana blata iz CČN Šaleške doline na 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II

Vpliv ultrazvoka, hidrolitskih encimov in njunih kombinacij na tvorbo metana pri procesu anaerobne presnove smo preizkušali na primeru blata iz CČN Šaleške doline. Kot inokulum smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec iz anaerobnega reaktorja 1, za substrat smo izbrali odvečno aerobno blato iz CČN Šaleške doline, ki smo ga vzeli iz zgoščevalnika, preden vstopi v anaerobni reaktor. Za mehansko predobdelavo blata smo uporabili ultrazvočni homogenizator UP200H proizvajalca Hielscher, ki deluje na frekvenci 24 kHz in z močjo 200 W. Za vsako predobdelavo smo uporabili čašo volumna 800 ml, ki smo jo napolnili s 500 ml blata. Nato smo UZ sondo potopili v čašo. Sonda je bila potopljena do globine 2 cm nad dnom. Pri predobdelavi smo z merilnikom porabe električne energije Energy Check 3000 (Votcraft, Nemčija) merili dejansko moč ultrazvočnega homogenizatorja in porabo električne energije. Vzorce smo ultrazvočno obdelali 10, 15, 20 in 25 min, kjer je bila gostota predobdelave z ultrazvokom za blato 1 0,174 W/ml in 0,35 W/ml za blato 2. Ultrazvočno predobdelanim vzorcem smo merili temperaturo, pH, skupne neraztopljene snovi, organske neraztopljene snovi, anorganske neraztopljene snovi, skupne raztopljene snovi, organske raztopljene snovi, anorganske raztopljene snovi, KPK, celotni fosfor, celotni dušik in velikost delcev. V pilotne 5 l reaktorje smo dozirali 3000 ml biomase in količino blata iz ČN, ki je ustrezala 7,04 g OS. Po 24 dnevih kontinuiranega delovanja anaerobnih reaktorjev in doziranja blata 1 smo začeli dozirati blato 2 iz CČN Šaleške doline, ki je vsebovalo manj suhe in organske snovi. Volumen substrata za doziranje in volumen odvzemanja biomase nismo povečali. Pilotnim reaktorjem smo vsak dan odvzeli 282 ml biomase, prav tako pa smo dozirali 282 ml blata iz ČN. Sestava pilotnih reaktorjev je podana v preglednici 30. Eksperimentalne variante smo izvedli v duplikatih. Za predobdelavo smo uporabili tudi hidrolitske encime proizvajalca Novozymes, ki smo jih dozirali dnevno po navodilih proizvajalca (Priloga C).

Preglednica 30: Sestava pilotnih reaktorjev pri semi-kontinuiranem procesu blata iz ČN in predobdelavi z ultrazvokom in dodajanjem hidrolitskih encimov.

Table 30: Dosing of reactors in semicontinuous process with ultrasound treated and untreated wastewater sludge and enzymatic pretreatment.

Pilotni reaktor	Količina blata iz ČN	Čas predobdelave z ultrazvokom	Doziranje hidrolitskih encimov Novozymes
Neobdelano blato iz ČN	282 ml	-	-
Blato iz ČN + encimi		-	4 x 100 µl
UZ1		10 min	-
UZ1 + encimi		10 min	4 x 100 µl
UZ2		15 min	-
UZ2 + encimi		15 min	4 x 100 µl
UZ3		20 min	-
UZ3 + encimi		20 min	4 x 100 µl
UZ4		25 min	-
UZ4 + encimi		25 min	4 x 100 µl

Dnevna količina vsakega posameznega encima proizvajalca Novozymes za blato iz ČN je znašala 100 µl. Hidravlični zadrževalni čas v reaktorjih je bil 12 dni. Mešanje v reaktorjih je bilo zagotovljeno z mešali, ki so bila vodena računalniško. Temperaturo v vodni kopeli smo vzdrževali na 37 ± 2 °C.

Lastnosti začetne biomase, blata iz ČN ter predobdelave z ultrazvokom so prikazane v preglednici 31 in 32. Vsak peti dan smo vsebini anaerobnih reaktorjev izmerili SS, OS, pH, HOK/CAO, topen KPK, celotni dušik, amonijski dušik in vsebnost hlapnih maščobnih kislin, dnevno pa smo spremljali tvorbo biometana. Proces anaerobne presnove smo tako skupno spremljali 40 dni.

Preglednica 31: Pogoji predobdelave blata 1 in 2 iz ČN z ultrazvokom pri semi-kontinuiranem eksperimentu.

Table 31: Characteristic of sludge 1 and 2 pretreatment in semi-continuous experiment.

Vzorec	Reakcijski čas [min]	Moč [W]	SE [kJ/kg SS]	Gostota moči [W/mL]
blato 1	0	0	0	0
UZ1 - 1	10	87	3335	0,174
UZ2 - 1	15	87	5002	0,174
UZ3 - 1	20	87	6669	0,174
UZ4 - 1	25	87	8337	0,174
blato 2	0	0	0	0
UZ1 - 2	10	175	18394	0,35
UZ2 - 2	15	175	27590	0,35
UZ3 - 2	20	175	36787	0,35
UZ4 - 2	25	175	45984	0,35

Preglednica 32: Izmerjeni vhodni parametri blata 1 in 2 iz ČN ter biomase iz BPE Šijanec za kontinuirani eksperiment z ultrazvokom.

Table 32: Characteristics of input wastewater sludge 1, wastewater sludge 2 and inoculums from BGP Šijanec for semi-continuous experiment with ultrasound.

Parameter	Blato 1	Blato 2	biomasa iz BPE Šijanec
SS [%]	3,23 ± 0,04	1,13 ± 0,14	8,45 ± 0,05
OS [% SS]	71,3 ± 0,27	60,39 ± 0,1	67,42 ± 0,13
OS [% SM]	2,30 ± 0,04	0,68 ± 0,09	5,7 ± 0,08
pH	5,73 ± 0,01	6,89 ± 0,01	8,02 ± 0,02
HOK [mg/l]	4200 ± 160	1088 ± 30	7100 ± 240
CAO [mg/l]	268 ± 37	154 ± 20	30213 ± 390
HOK/CAO	18,82 ± 2	9 ± 1,43	0,235 ± 0,015
N _{celotni} [mg/l]	323 ± 10	1900 ± 30	6630 ± 65
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	165 ± 5	350 ± 15	4680 ± 50

3.12.3.2 Eksperiment 13: Test vpliva hidrolitskih encimov na izplen biometana odpadnega dehidriranega blata iz papirniške industrije v 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II

V papirniški industriji kot stranski produkt nastane veliko odvečnega blata, ki ga je treba stabilizirati ali s kompostiranjem ali z anaerobno presnovo. Čiščenje odpadne vode iz papirniške industrije predstavlja velik strošek, anaerobno presnovo pa otežuje pomanjkanje nutrientov in vsebnost lignina ter žvepla. Obstajajo tudi pozitivne strani uporabe takšnega blata v procesu anaerobne presnove. Blato iz papirniške industrije vsebuje veliko organske snovi, njegov vir nastanka je vedno na isti točki, zato takšnega blata ni potrebno pripeljati od drugje, da bi zadostili količinam, ki so potrebne za anaerobno presnovo. Če tako blato anaerobno predelamo v bližini vira ali v okviru vira njegovega nastanka, se izognemo transportnim in operativnim stroškom in uskladimo koordinacijo vzdrževanja procesa. Od tvorbe bioplina ustvarjamo dohodke, uporabimo pa lahko tudi odvečno toploto, (Hagelqvist, 2013). Za razliko od primarnega blata iz komunalnih čistilnih naprav, je primarno blato iz papirne industrije slabo anaerobno razgradljivo. Zato v realnosti lahko anaerobno razgradimo samo sekundarno blato (Elliott in Mahmood, 2007).

Kot nadaljevanje eksperimenta 11 smo preverili, kako dodajanje različnih hidrolitskih encimov in zeolita z dodanimi mikroorganizmi vpliva na tvorbo metana v 60 dnevnem semi-kontinuiranem anaerobnem procesu anaerobne presnove. Vpliv hidrolitskih encimov na tvorbo metana pri odpadnem dehidriranem blatu iz papirniške industrije pri procesu anaerobne presnove smo preizkušali na primeru blata iz Palome. Podjetje Paloma d.d. ima čistilno napravo velikosti 60.000 PE, kjer letno očistijo okrog 85700 m³ odpadnih voda na leto. Odvečno blato se dehidrira in uporabi za kompostiranje.

Zeolit najdemo v kamninah, ki se nahajajo v bližini aktivnih ali ugaslih vulkanov. Naravni zeoliti so kristalni, hidrirani alumini-silikati alkalov in alkalnih zemeljskih kationov. Naravni zeoliti se med seboj razlikujejo glede na prostorsko razporeditev SiO₄ in AlO₄ (Montalvo et al., 2012). Zeoliti zmanjšujejo koncentracijo amonijaka in amonijevega iona, ki sta prisotna v substratih in produkte, ki se ustvarjajo med procesom anaerobne presnove proteinov, aminokislin in sečnine. Zeolit je učinkovit ionski izmenjevalec, ki iz anaerobnega iztoka ali odpadne vode odstrani amonijev ion. Zeoliti so sposobni tudi dobro absorbirati kovine, kot so baker, kadmij, svinec in cink, ki so v visokih koncentracijah toksične za mikroorganizme. Zaradi velike sposobnosti absorpcije zeolit predstavlja učinkovito oporo mikroorganizmom pri anaerobnih in anaerobnih procesih čiščenja odpadne vode (Montalvo et al., 2012, Montalvo et al., 2005). Zeolite lahko modificiramo tako, da na njihovo površino damo elemente v sledovih (Fe, Ni, Co) v različnih koncentracijah. Te mikroelemente potem lahko metanogeni in acidogeni mikroorganizmi uporabijo pri encimski biosintezi. Posledično se zato zeolite uporablja za stabilizacijo in optimizacijo procesov anaerobne presnove. Z mobilizacijo hemicelulitskih bakterij na zeolit se lahko izboljša tvorba biometana, saj z odstranitvijo hemiceluloze ustvarimo dostop do celuloze in na ta način pospešimo encimsko hidrolizo celuloze v substratih (Weiß et al., 2010).

Kot inokulum smo uporabili biomaso iz BPE Šijanec iz anaerobnega reaktorja 1, kot substrat pa smo uporabili biološko odpadno blato iz Palome iz Sladkega Vrha, ki nastane kot stranski produkt pri proizvodnji papirja in prašičjo gnojevko z bližnje farme prašičev. Po 45 dneh smo reaktorjem začeli dodajati tudi prašičjo gnojevko, ki smo jo dobili iz bližnje farme prašičev.

Uporabili smo 4000 ml inokuluma, dnevna organska obremenitev reaktorjev je znašala 2,2 g OS/l dan. Vsem reaktorjem smo dnevno dozirali 66,1 g blata Paloma in 183,4 ml vode, kar je skupaj nanoslo 230 ml in predstavlja 5,4 % celotnega volumna, ki ga dnevno zamenjamo v posameznem reaktorju. Trije

reaktorji, ki jim nismo dodajali encimov, so nam služili kot kontrola, ostalim smo dodajali hidrolitske encime Novozymes, Micropan Biogas, Novalin, Biofuture in zeolit. Priporočena količina doziranja encimov in dodatkov je podana v Prilogi C. Hidravlični zadrževalni čas v reaktorjih je znašal 18 dni. Temperatura, pri kateri je potekala anaerobna presnova, je bila 37 ± 2 °C (Kolbl et al., 2014). Vhodnemu substratu in inokulumu smo izmerili SS, OS, pH, HOK/CAO, dušik in amonijski dušik. Po zagonu eksperimenta smo vsak peti dan spremljali SS, OS, pH, HOK/CAO, dušik, nitratni dušik, hlapne maščobne kisline, topen KPK in viskoznost, dnevno pa smo spremljali tvorbo metana. V tem eksperimentu smo izvedli tudi analizo mikrobne združbe, predstavljeno pa v poglavju 4. To smo naredili, kot je opisano v poglavju 3.5 Določevanje mikrobne združbe. Po 28 dneh smo začeli dozirati dehidrirano blato 2, ki je bilo prav tako iz Palome, vsebovalo pa je manj organske snovi. Od 28 do 45 dne smo dozirali 71,4 g dehidriranega blata 2 in 179,6 ml vode, po 45 dnevno pa smo začeli dodajati še 60 ml prašičje gnojevke in prav toliko manj vode.

Preglednica 33: Izmerjeni vhodni parametri odvečnega dehidriranega blata iz Palome in prašičje gnojevke v eksperimentu 13.

Table 33: Characteristics of input substrates of dehydrated paper mill sludge from Paloma and pig slurry in experiment 13.

Parameter	Prašičja gnojevka	Dehidrirano blato 1 - Paloma	Dehidrirano blato 2 - Paloma	Inokulum
SS [%]	$0,33 \pm 0,01$	$16,99 \pm 0,02$	$17,64 \pm 0,02$	$8,53 \pm 0,18$
OS [% SS]	$41,03 \pm 1,19$	$78,37 \pm 0,27$	$69,83 \pm 0,12$	$69,17 \pm 0,60$
OS [% SM]	$0,13 \pm 0,01$	$13,31 \pm 0,01$	$12,32 \pm 0,09$	$5,90 \pm 0,16$
pH	$7,24 \pm 0$	$6,60 \pm 0,01$	$6,54 \pm 0,01$	$7,87 \pm 0,01$
HOK [mg/l]	1403 ± 61	3549 ± 494	3212 ± 359	5534 ± 247
CAO [mg/l]	2232 ± 55	15087 ± 2957	14932 ± 3247	13275 ± 175
HOK/CAO	$0,69 \pm 0,38$	$0,237 \pm 0,01$	$0,215 \pm 0,02$	$0,417 \pm 0,01$
T _{celotni} [mg/l]	2500 ± 25	1055 ± 35	905 ± 40	5230 ± 60
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	300 ± 12	-	-	1301 ± 39

3.12.4 Spremljanje delovanja BPE Vučja vas

3.12.4.1 Eksperiment 14: Spremljanje delovanja bioplinske elektrarne Vučja vas

BPE Vučja vas je elektrarna, ki za proizvodnjo električne energije uporablja organsko biomaso, kot je: koruzna silaža, gnojevka, gnoj, vinjasa, micelij, oljčne tropine, koruzni šrot in tritikala. Njena nazivna moč znaša 4 MW. Substrate se preko 4 mešalnih jam dozira v fermentorje in nato naprej v končne zalogovnike (Slika 48). Volumen mešalne jame (slika 50), od katerih je vsaka narejena iz armiranega betona in z notranje strani, zaščitena z neprepustno zaščito iz poliestra, je 235 m³ (premer 10 m, globina 3 m). Za mešanje substrata se uporabljata dve potopni mešali. Substrat se redči z vodo, ki se zbira v jami za zbiranje meteorne vode. Za pridobivanje metana je zgrajenih 6 fermentorjev in 3 končni zalogovniki. Vsak fermentor ima 3.931 m³ celotne prostornine (višina 8,69 m, premer 24 m), njegova spodnja plošča je narejena iz armiranega betona, plašč pa je narejen iz emajlirane pločevine, debeline 8 mm.



Slika 48: Bioplinska elektrarna Vučja vas iz zraka.

Figure 48: Biogas plant Vučja vas from the air.

Za plinotesnost in shranjevanje nastalega plina se uporablja dvoslojni plinohram z volumnom 1490 m³, ki ima 8 cm zunanje izolacije, ki je zaščitena s trapezno pločevino (zaščita pred vremenskimi vplivi). Za homogenizacijo vsebnosti fermentorjev (F1, F2, F3, F4, F5 in F5) se uporabljajo tri mešala (slika 49), od tega sta dve fiksno nameščeni na dno fermentorja in ju je mogoče izvzeti tudi takrat, ko je fermentor poln. Tretje mešalo je montirano v sam fermentor, vendar je pritrjeno na bok fermentorja ter nastavljivo po višini, lahko mu spreminjamo kot oziroma smer mešanja. V zgornjem delu fermentorja je instalirana odvodna cev za biolin, ki je narejena iz legiranega jekla. Za regulacijo tlaka v fermentorju je vgrajen regulator pod in nad tlaka. Vnos substratov poteka s pomočjo črpalke preko

podzemne napeljave. Za avtomatsko pretakanje prevretega substrata iz fermentorja 1 v fermentor 2 (F2), iz fermentorja 2 v fermentor 3 (3), iz fermentorja 4 (F4) v fermentor 5 (F5) in iz fermentorja 5 v fermentor 6 (F6) je narejen preliv. Za vzdrževanje mezofilnih pogojev v fermentorju so na stranski steni v cevni kači montirane ogrevalne cevi iz legiranega jekla, ki so povezane z razdelilcem toplote s predizoliranimi cevmi za toplovod. Kot vir energije se izkorišča odvečna toplota plinskega motorja. Prva dva končna zalogovnika imata 5.350 m^3 celotne prostornine (premer 28 m, višina 8,69 m) in spodnjo ploščo narejeno iz armiranega betona, plašč pa je narejen iz emajlirane pločevine debeline 8 mm. Volumen plinohrana, ki je montiran na vrh končnega zalogovnika, znaša 1490 m^3 . Za mešanje vsebine se uporabljajo štiri mešala. Plin se na motorje odvaja po odvodni cevi za plin. Končni zalogovnik 3 nima plinohrama, njegov volumen znaša 1356 m^3 (premer 15 m, višina 8,69 m). V končnem zalogovniku se hrani tekoči del iz fermentorja, ki se predhodno na separatorju loči na tekočo in trdno fazo (Keter Organica). Na BPE Vučja vas smo 6 mesecev spremljali delovanje procesa. Merili smo predvsem SS, OS, pH vhodnih substratov in pripravljenih mešanic iz mešalnih jam, biomaso v fermentorju F1 in F4, biomaso v končna zalogovnika KZ1 in KZ2 ter nivo nastalega bioplina in proizvedeno električno energijo.



Slika 49: Potopni mešali v anaerobnem reaktorji BPE Vučja vas.

Figure 49: Plungers in anaerobic digester of BGP Vučja vas.



Slika 50: Mešalna jama (MJ) za doziranje substratov.

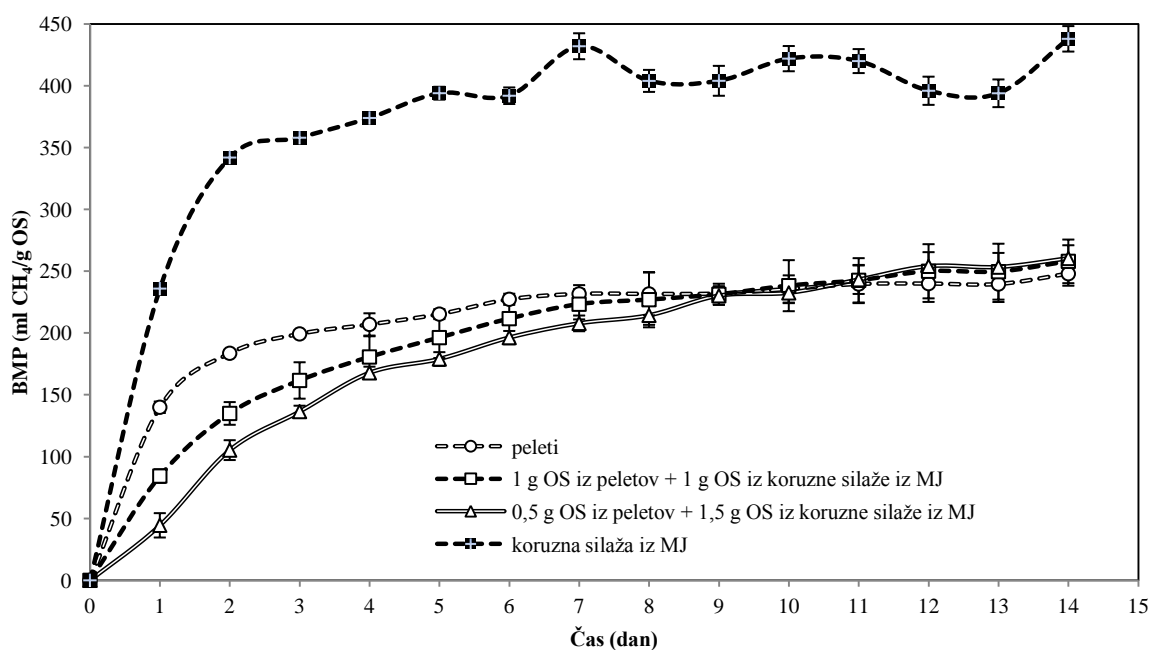
Figure 50: Mixing shaft for dosing of substrates.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA OPRAVLJENIH EKSPERIMENTOV

4.1 Rezultati in diskusija eksperimentov na 0,5 l modelnem merilu

4.1.1 Rezultati eksperimenta 1: Test uporabe koruzne silaže, peletov slame in njihovih kombinacij za pridobivanje biometana na 0,5 l šaržnem AMPTS II

Največji biometanski potencial 438 ± 10 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$ smo opazili pri koruzni silaži iz mešalne jame (MJ), najmanjšega 248 ± 10 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$ pa pričakovano pri peletih (Grafikon 1). Kombinacija substratov pelet in koruzne silaže iz MJ je dala zanemarljivo večji izplen metana kot samo peleti, v primerjavi z mešanico iz MJ pa za okrog 43 % manj metana. Večji del metana je v vseh primerih nastal v prvih dveh dneh poizkusa. Nižji BMP ob prisotnosti peletov lahko pripišemo vsebnosti lignina v peletih, ki je anaerobno nerazgradljiv in ovira proces hidrolize, posledično pa nastane manj biometana. Kontrola z glukozo nam je dala nekoliko manjši BMP, kot je teoretsko možen.

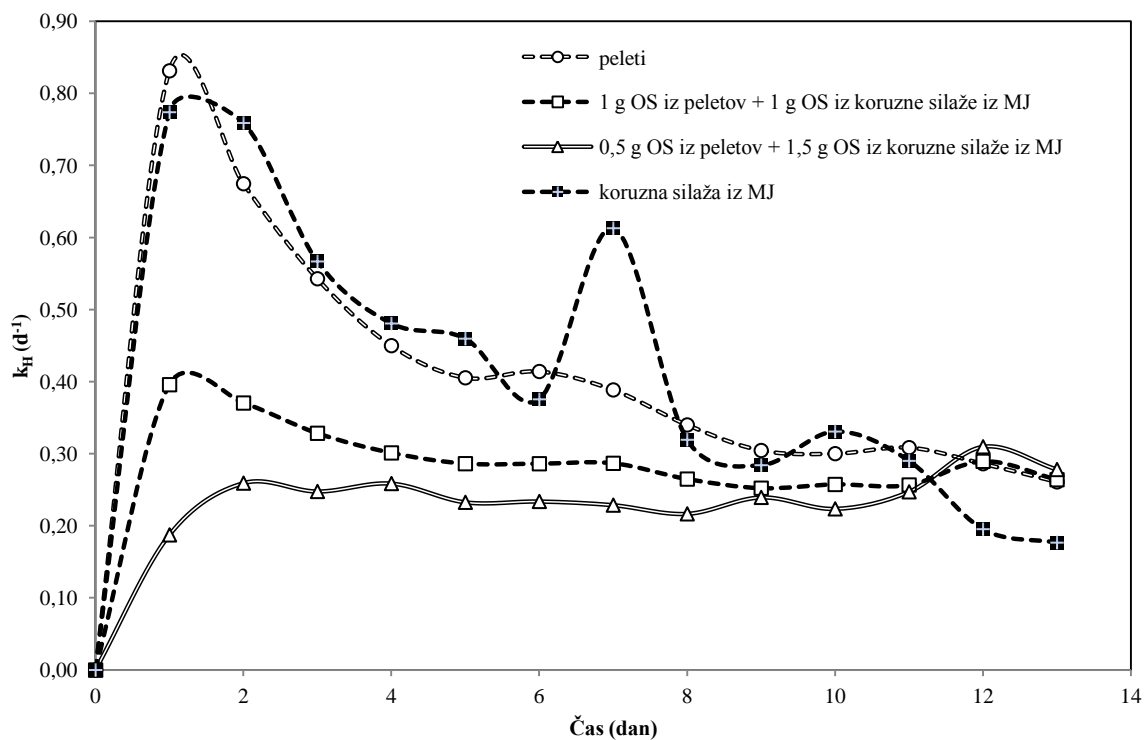


Grafikon 1: Biometanski potencial določen na 0,5 l pilotnih reaktorjih iz pripravljene mešanice iz mešalne jame (MJ) v kombinaciji s peleti iz slame s podanimi standardnimi deviacijami.

Graph 1: Biomethane potential of prepared mixture from biogas plant mixing chamber with combination of straw pellets using 0,5 l AMPTS.

Največji koeficient hidrolize, ki je znašal $k_H = 0,83 \text{ d}^{-1}$ smo opazili pri peletih, sledili so koruzna silaža iz MJ, glukoza, 1 g OS iz peletov + 1 g OS iz koruzne silaže iz MJ in 0,5 g OS iz peletov + 1,5 g OS iz koruzne silaže iz MJ (Grafikon 2). Koeficienti hidrolize potrjujejo, da se je večina biometana ustvarila v prvih dveh dneh, ko je bil koeficient hidrolize največji. Pri koruzni silaži iz MJ je koeficient hidrolize (k_H) spet nekoliko narasel sedmi dan, ko se je tudi nekoliko povečala tvorba metana. Najverjetneje je takrat prišlo do večje pretvorbe dodatnega organskega materiala, ki je po sedmih dneh hidroliziral in se s pomočjo mikroorganizmov pretvoril v biometan. Po sedmih dneh je dnevna tvorba

metana začela upadati, na razpolago je bilo manj lažje dostopnega materiala za metanogene mikroorganizme in posledično je nastalo manj biometana.

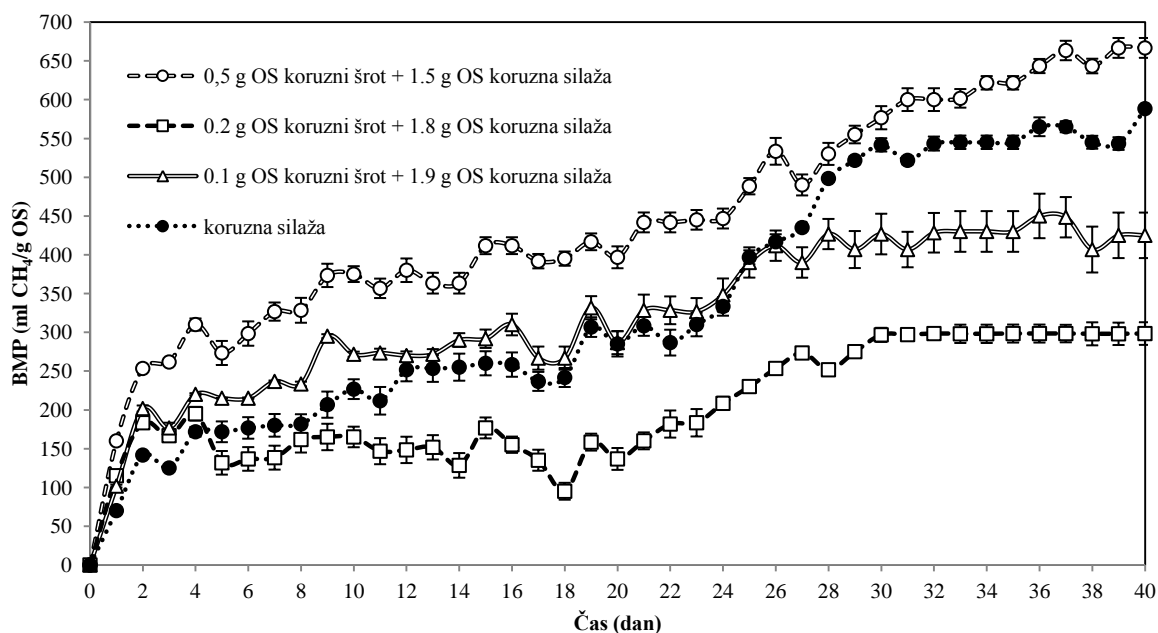


Grafikon 2: Koeficient hidrolize peletov in koruze silaže iz mešalne jame (MJ) ter njunih kombinacij v eksperimentu 1.

Graph 2: Hydrolysis coefficient of straw pellets, silo maize from mixing chamber and their combinations in experiment 1.

4.1.2 Rezultati eksperimenta 2: Test določevanje BMP pripravljene mešanice iz BPE v kombinaciji s koruznim šrotom na 0,5 l AMPTS II

Kombinacija koruzne silaže in koruznega šrota se je izkazala za uspešno pri razmerju organskih obremenitev 0,5 g OS/l iz koruznega šrota in 1,5 g OS/l koruzne silaže iz mešalne jame BPE. V primerjavi z doziranjem samo koruzne silaže iz mešalne jame je BMP narasel iz 588 ± 4 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$ na 667 ± 13 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$, kar je 13 % povečanje. V ostalih primerih je BMP bil bistveno nižji (Preglednica 34, Grafikon 3). V grafikonu 3 in 4 kratica OS pomeni organsko snov.

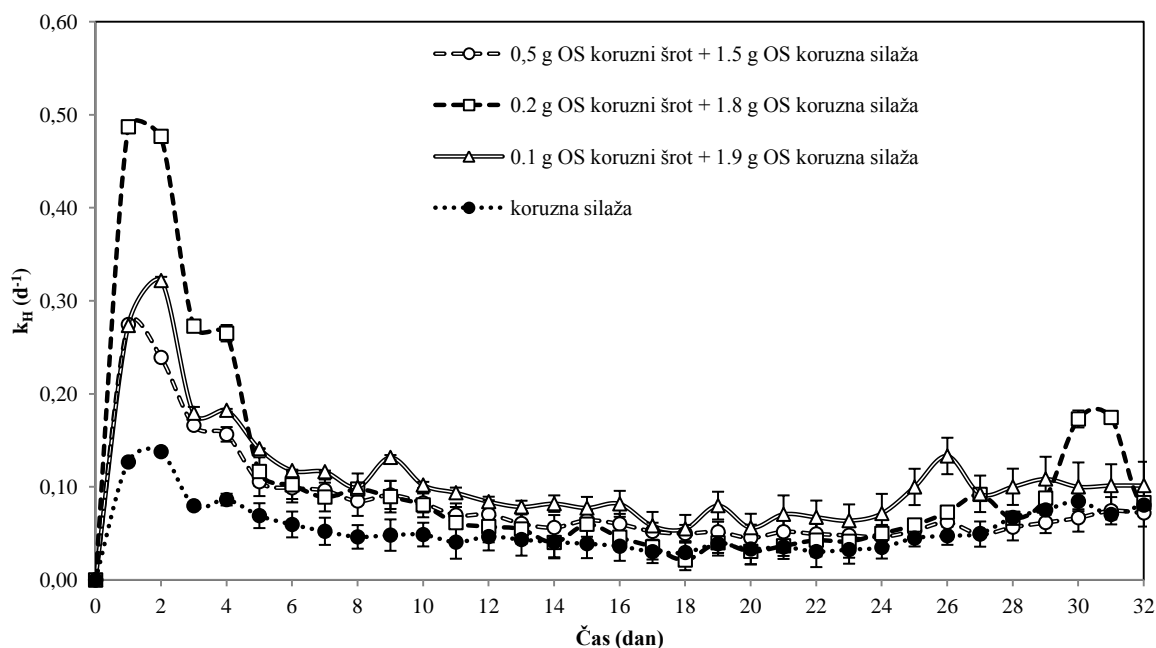


Grafikon 3: Biometanski potencial koruzne silaže iz mešalne jame in kombinacije koruzne silaže z mokro mletim koruznim zrnjem s podano standardno deviacijo.

Graph 3: Biomethane potential of prepared mixture from biogas plant mixing chamber, corn meal and their combination using 0,5 l AMPTS with standard deviation.

V prvih dveh dneh je bila tvorba metana velika, nato se je do okrog 20 dneva tvorba metana nekoliko zmanjšala in nato naprej začela spet nekoliko naraščati pri kombinaciji 0,2 g OS iz koruznega šrota + 1,8 g OS iz koruzne silaže, 0,5 g OS iz koruznega šrota + 1,5 g OS iz koruzne silaže (Grafikon 3).

Največji koeficient hidrolize $0,4869 \text{ d}^{-1}$ je imela mešanica 0,2 g OS iz koruznega šrota + 1,8 g OS iz koruzne silaže. Tukaj se je v prvem dnevu nastalo 38,6 % vsega metana, v drugem dnevu pa že 61 % vsega metana. Pri ostalih substratih in njihovih mešanicah je bil koeficient hidrolize manjši. Pri koruzni silaži je znašal $0,1267 \text{ d}^{-1}$ in v prvih dveh dneh je nastalo samo 24,2 % vsega metana, medtem ko je pri mešanici 0,1 g OS iz koruznega šrota + 1,9 g OS iz koruzne silaže, kjer je bil $k_H = 0,273 \text{ d}^{-1}$, v prvih dveh dneh nastalo 47,5 % vsega metana. Kljub visokemu koeficientu hidrolize mešanice 0,2 g OS iz koruznega šrota + 1,8 g OS iz koruzne silaže iz MJ, je ta imel med vsemi substrati in kombinacijami najmanjši BMP.



Grafikon 4: Koeficient hidrolize pripravljene koruzne silaže iz mešalne jame, koruznega šrota ter njunih kombinacij v eksperimentu 2.

Graph 4: Hydrolysis coefficient of silo maize from mixing chamber, corn meal and their combinations in experiment 2.

Največji BMP kombinacije si lahko razlagamo s tem, da je bilo na razpolago največ zmletega koruznega šrota, ki so ga mikroorganizmi lahko hitreje uporabili za pretvorbo v metan. Razlike v razgradnji organske snovi se med reaktorji niso bistveno razlikovale (preglednica 34). Najmanjša razgradnja je pričakovano bila pri izhodiščnem vzorcu, kjer nismo dodajali nobenih substratov.

Preglednica 34: Izmerjeni parametri po končanem eksperimentu 2.

Table 34: Characteristics of anaerobic reactors at the end of experiment 2.

Reaktor	0,5 g OS koruzni šrot + 1,5 g OS koruzna silaža	0,2 g OS koruzni šrot + 1,8 g OS koruzna silaža	0,1 g OS koruzni šrot + 1,9 g OS koruzna silaža	2 g OS koruzna silaža	izhodiščni vzorec
SS [%]	2,99 ± 0,04	2,97 ± 0,03	3,06 ± 0,08	3,08 ± 0,10	3,32 ± 0,53
OS [% SS]	66,78 ± 0,77	67,10 ± 0,17	67,80 ± 0,68	67,02 ± 0,51	67,48 ± 1,16
OS [% SM]	1,99 ± 0,01	2,00 ± 0,02	2,07 ± 0,03	2,06 ± 0,05	2,25 ± 0,40
pH	7,91 ± 0,02	8,14 ± 0,25	7,99 ± 0,03	7,93 ± 0,02	8,03 ± 0,05
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	1065 ± 40	1084 ± 62	1085 ± 42	1166 ± 37	1053 ± 89
BMP [ml CH ₄ /g OS]	667 ± 13	298 ± 15	450 ± 29	588 ± 4	-
Razgradnja OS [%]	58,4	57,9	56,2	56,3	51,1

4.1.3 Ugotovitve iz eksperimenta 1 in 2

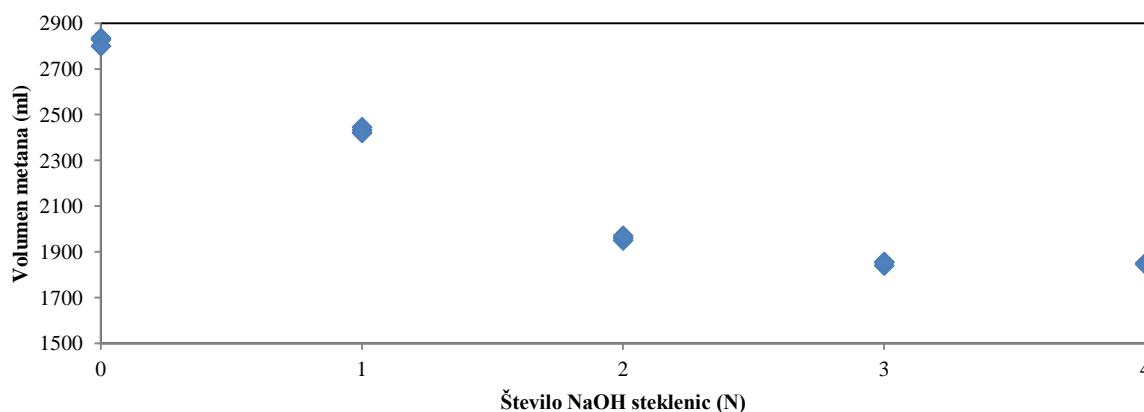
Pri uporabi 0,5 l AMPTS smo morali substrate in inokulum mehansko obdelati, zaradi česar smo jim spremenili lastnosti, posledično je tudi kinetika nastajanja biometana potekala hitreje, kot bi na realnem modelnem merilu. Z dodajanjem peletov iz slame je tvorba metana v vseh primerih drastično upadla, zato njihove uporabe za pridobivanje bioplina ne priporočamo, saj vsebuje velik delež lignina, ki pa je anaerobno nerazgradljiv.

Pri uporabi koruznega šrota v kombinaciji s koruzno silažo smo zaznali povečano tvorbo metana. Dodajanje koruznega šrota je pozitivno vplivalo na proces anaerobne presnove, kar je razvidno tudi iz kinetike produkcije metana. Kombinacija, kjer je koruzni šrot predstavljal 25 % organske obremenitve, je bila najboljša. Pri visokih cenah energetskih rastlin in koruzi v obliki silaže ali zrna, koruzni šrot kratkoročno lahko predstavlja dodaten substrat, ki ga je možno uporabiti za pridobivanje metana, vendar je njegova uporaba za daljše časovno obdobje vprašljiva zaradi visoke nakupne cene in konflikta med uporabo energetskih rastlin za pridobivanje bioplina in samooskrbo ljudi s prehrano.

4.2 Rezultati in diskusija eksperimentov na 5 l modelnem merilu v šaržnem načinu

4.2.1 Rezultati in diskusija eksperimenta 3: Nadgradnja 0,5 l AMPTS II na 5 l velikost

Število in volumen steklenic po navodilih proizvajalca za 0,5 l anaerobne reaktorje v sistemu AMPTS II ni zadoščalo za nadgradnjo na 5 l velikost (Grafikon 5). Da smo lahko zagotovili učinkovito vezanje ogljikovega dioksida pri maksimalnem pretoku bioplina čez mejno plast plin-tekočina in maksimalnem volumnu, smo število steklenic eksperimentalno povečali iz ene 100 ml steklenice na štiri 250 ml steklenice na en anaerobni reaktor in podaljšali cevke na zamaških na notranji strani steklenic. Delež metana, ki je nastal v anaerobnih reaktorjih, ki so bili povezani s štirimi 250 ml steklenicami 3 M NaOH, smo izmerili z merilcem plina Sewerin Multitec 410 in je znašal več kot 99,5 % (Kolbl et al., 2014). Iz tega smo lahko sklepali, da štiri steklenice NaOH zadostujejo za učinkovito vezanje ogljikovega dioksida med maksimalno hitrostjo nastajanja bioplina v 5 l anaerobnih reaktorjih.



Grafikon 5: Določanje zadostnega števila 250 ml steklenic s 3 M NaOH raztopino za učinkovito vezanje ogljikovega dioksida med maksimalno hitrostjo produkcije bioplina v 5 l reaktorjih v nadgrajenem AMPTS II (Kolbl et al., 2014).

Graph 5: Determination of sufficient number of 250 ml flasks containing 3 M NaOH for efficient carbon dioxide stripping during maximum biogas production rates in 5 l reactors connected to AMPTS II equipment (Kolbl et al., 2014).

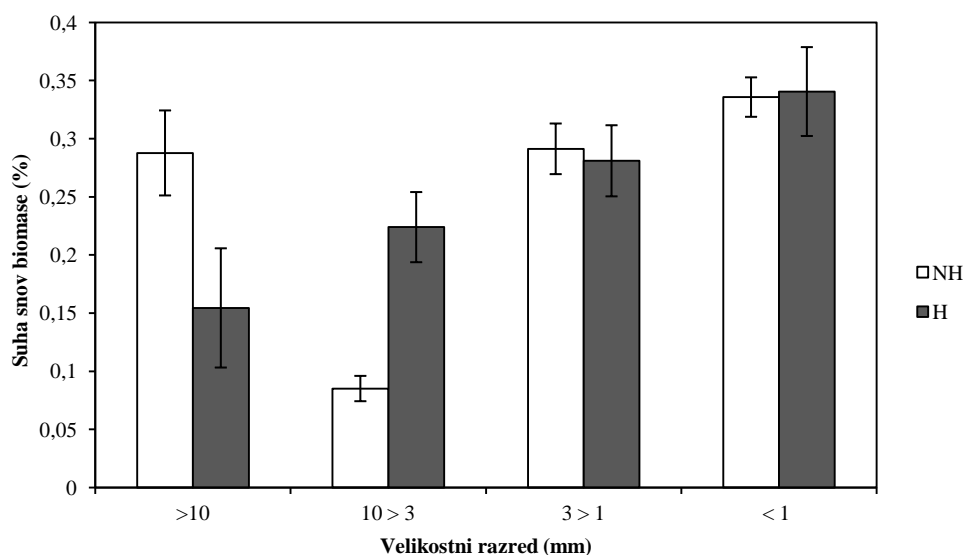
Z uspešno nadgradnjo AMPTS II na 5 l velikost smo vse nadaljnje eksperimente izvajali na nadgrajenih 5 l reaktorjih. Za eksperimente na 0,5 l modelnem merilu smo morali inokulum in substrate zmleti, da smo jih lahko natančno dozirali. S tem smo spremenili lastnosti substratov in inokuluma. Z nadgradnjo komercialnega sistema AMPTS II iz 0,5 l velikosti na 5 l velikost smo razvili in validirali napravo za eksperimente, kjer lahko uporabljamo realni inokulum iz realne bioplinske naprave in realne substrate v takšni obliki kot jih dozirajo v anaerobne reaktorje na bioplinarnah (Kolbl et al., 2014).

Ugotovitve iz eksperimenta 3

S povečanjem velikosti anaerobnih reaktorjev, novo termostatsko kopeljo in grelniki, povečanim številom in volumnom steklenic z 3 M NaOH raztopino in podaljšanimi mešali smo uspešno nadgradili in validirali AMPTS II na 5 l velikost. Pri pripravi eksperimenta sedaj lahko uporabljamo realne substrate in inokulum ter velikost delcev kot na realnem modelnem merilu, zmanjša se čas priprave zaradi opustitve razplinjevanja inokuluma, mletja inokuluma in substratov.

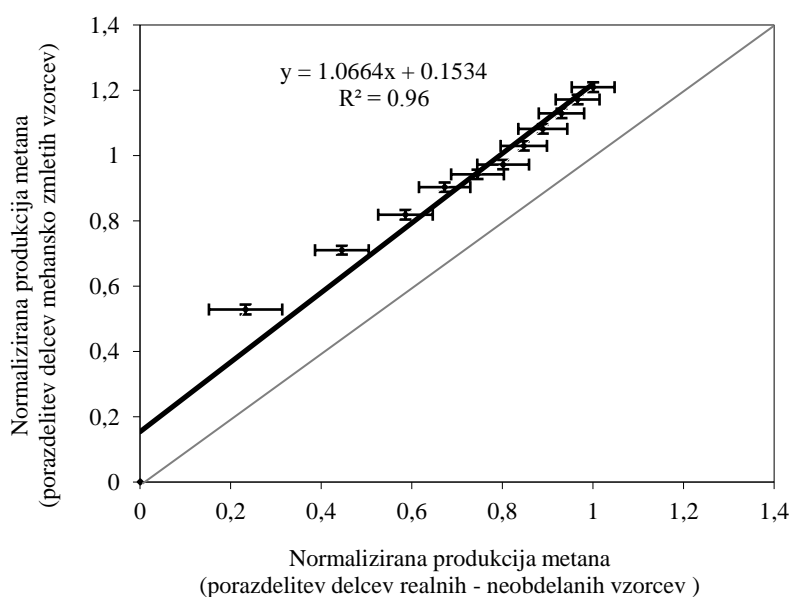
4.2.2 Rezultati in diskusija eksperimenta 4: Primerjava metanskega donosa med 0,5 l in 5 l modelnim merilom AMPTS II

Alikvoti, ki so bili mehansko predobdelani, imajo drugačno porazdelitev delcev v primerjavi z neobdelanimi alikvoti. Razmerje med začetnim in končnim deležem suhe snovi v območju >10 mm je bilo 1,9 v območju 10 > 3 mm pa 0,4 (grafikon 6), kar jasno ponazarja, da je prišlo do bistvenih modifikacij pri mehanski obdelavi pri točno tistih velikostnih razredih, ki jih v zadnjem času povezujejo z bistvenim izboljšanjem produkcije metana že pri siliranju koruzne silaže (Herrmann et al., 2012a; Herrmann et al., 2012b), vendar z omejenim ekonomskim profitom (Kolbl et al., 2014). Proizveden metan v 0,5 l in 5 l reaktorjih smo normalizirali in med sabo primerjali normalizirane vrednosti metana (Grafikon 7). Pri mehansko obdelanih vzorcih v 0,5 l reaktorjih je izplen metana bil za 15 % višji v primerjavi z neobdelanimi vzorci v 5 l reaktorjih, korelacija med 0,5 l in 5 l reaktorji je ostala visoka ($R^2=0,96$) (grafikon 7). Prav tako so se pri mletih vzorcih hitrosti hidrolize povečale tudi do 2,5 krat. Kljub veliki organski obremenitvi reaktorjev v tem eksperimentu ni prišlo do inhibicije zaradi kratko verižnih maščobnih kislin, kot to poročajo Herrmann in drugi (2012a,b) in je v skladu s pozitivnim učinkom zmanjševanja velikosti delcev trdnih bioloških odpadkov za tvorbo bioplina (Bruni et al., 2010a; Herrmann et al., 2012a; Lauwers et al., 2013; Palmowski in Muller, 2003; Raposo et al., 2011; Kolbl et al., 2014). Iz tega lahko sklepamo, da smo z zmanjšanjem velikosti delcev pozitivno vplivali na proces anaerobne presnove, kar ponazarjajo tudi pomembne razlike med donosi metana in kinetika hidrolize med 0,5 l in 5 l modelnim merilom. Vse to kaže na možnost povečanja tvorbe metana na realnem modelnem merilu na BPE Vučja vas z uporabo mehanske predobdelave (Kolbl et al., 2014). Objave Herrmanna in drugih (2012a,b) kažejo, da zmanjševanje delcev pod 8 mm ne zagotavlja niti povračila vložene energije s povečanim izkoristkom tvorbe metana.



Grafikon 6: Razlike v suhi snovi biomase iz BPE Vučja vas nehomogeniziranega (NH) in homogeniziranega (H) vzorca za določitev razlik v proizvodnji metana v 0,5 l in 5 l pilotnih reaktorjih AMPTS (Kolbl et al., 2014).

Graph 6: The significant differences in particle size distribution of real scale aliquots for fully active Vučja vas biogas plant reactor before (NH) and after (H) mechanical treatment imposed for determination of mismatch in volumes of produces methane in 5 and 0,5 l AMPTS system, respectively (Kolbl et al., 2014).



Grafikon 7: Razlike v proizvodnji metana (normalizirana vrednost) med mehansko obdelanimi in neobdelanimi (realnimi) vzorci pri uporabi 0,5 l in 5 l AMPTS II (Kolbl et al., 2014).

Graph 7: The resulting mismatch in volumes of produced methane from mechanically pretreated and real-scale aliquots as determined using 0,5 and 5 l AMPTS II equipment and normalized to 5 l real-scale particle size methane production (Kolbl et al., 2014).

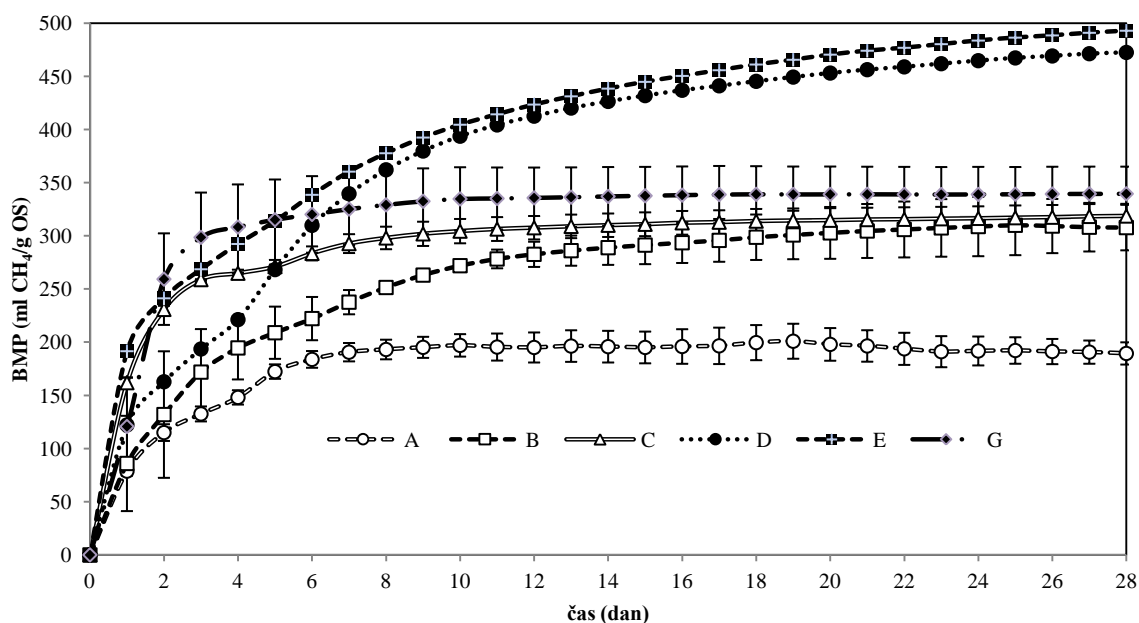
Ugotovitve iz eksperimenta 4

S primerjavo 0,5 l skale, kjer smo vzorce mehansko predobdelali in 5 l skale, kjer nimamo nobenih predobdelav, smo zmanjšali napake, ki se pojavljajo zaradi modifikacij substratov in inokuluma in pokazali, da na majhnih modelnih merilih (0,5 l) s predobdelavami precenimo biometanske potenciale.

4.2.3 Rezultati eksperimenta 5: Test uporabe komunalnih odpadkov za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II

Koncentracija hlapnih organskih kislin v inokulumu pred zagonom eksperimenta je bila 4136 ± 213 mg/l, celotnega anorganskega ogljika 11234 ± 58 mg/l, njuno razmerje HOK/CAO = $0,368 \pm 0,018$, celotnega amonijskega dušika 829 ± 40 mg/l in pH = 7,47.

V odpadkih A, kjer je biometanski potencial (BMP) z $30,90 \pm 1,39$ ml CH₄/g OS bil najmanjši, so se nahajale kavne usedline, jajčne lupine, veliko papirja itd.. Takšni substrati so težje razgradljivi in posledično je BMP pri njih manjši. Največjo tvorbo biometana smo izmerili pri bioloških odpadkih D (473 ± 150 ml CH₄/g OS) in E (493 ± 184 ml CH₄/g OS) (grafikon 8). Višji BMP lahko pripišemo večji količini kuhinjskih olj, ki so jih vsebovali biološki odpadki. V bioloških odpadkih A, B, C in G je večina metana nastala v prvih treh do štirih dneh, medtem, ko je pri odpadkih D in E strmo naraščala prvih sedem do osem dni, nato pa je tvorba metana začela počasi upadati.

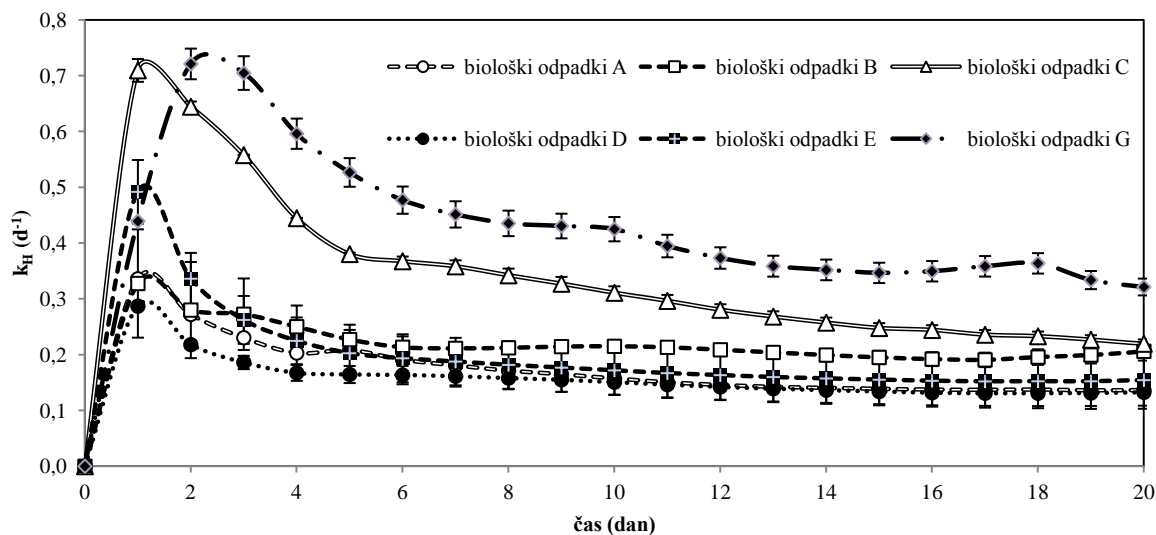


Grafikon 8: Biometanski potencial bioloških odpadkov A, B, C, D, E in G v eksperimentu 5 s standardno deviacijo.

Graph 8: Biomethane potential of restaurant biological wastes A, B, C, D and G in experiment 5 with standard deviation.

Vsi biološki odpadki so najvišji koeficient hidrolize dosegli prvi dan, biološki odpadki G so maksimalni k_H dosegli v drugem dnevu (grafikon 9). Najvišji koeficient hidrolize so imeli biološki odpadki G, kjer je prvi in drugi dan dnevna tvorba metana glede na organsko obremenitev bila najvišja in je dosegla vrednost 120 BMP/dan in 139 BMP/dan, v tem vrstnem redu, kar je okrog 75 % celotnega BMP bioloških odpadkov G. Pri bioloških odpadkih C je v prvih dveh dneh nastalo okrog 72 % BMP. To lahko pripišemo hitro razgradljivim sestavinam v bioloških odpadkih, ki so jih mikroorganizmi lahko hitreje uporabili za hrano in pretvorbo v metan. Najmanjši koeficient hidrolize smo zaznali pri bioloških odpadkih D. V tem primeru je v prvih dveh dneh nastalo okrog 33 %

biometanskega potenciala. Koeficient hidrolize ni kazalnik, kateri substrati bodo imeli najvišji BMP, ampak kazalnik, pri katerih substratih bo hidroliza hitreje potekla in posledično v kolikšnem času se bo BMP približal maksimalnemu BMP-ju. Na hitrost hidrolize vpliva tudi delež lignina v substratu in prisotnost maščob. V našem primeru smo imeli različne vrste bioloških odpadkov, ki so vsebovali različne deleže lignina, celuloze in hemiceluloze ter različne deleže maščob v obliki olj ali masla, zato so različni tudi koeficienti hidrolize in izmerjeni BMP-ji, ki so podani v preglednici 35.



Grafikon 9: Koeficient hidrolize bioloških odpadkov eksperimenta 5 s standardno deviacijo.

Graph 9: Hydrolysis coefficient of restaurant solid organic wastes in experiment 5 with standard deviation.

Preglednica 35: Izmerjeni različni parametri v anaerobnih reaktorjih po končanem eksperimentu 5 s podano standardno deviacijo (Kolbl et al., 2014).

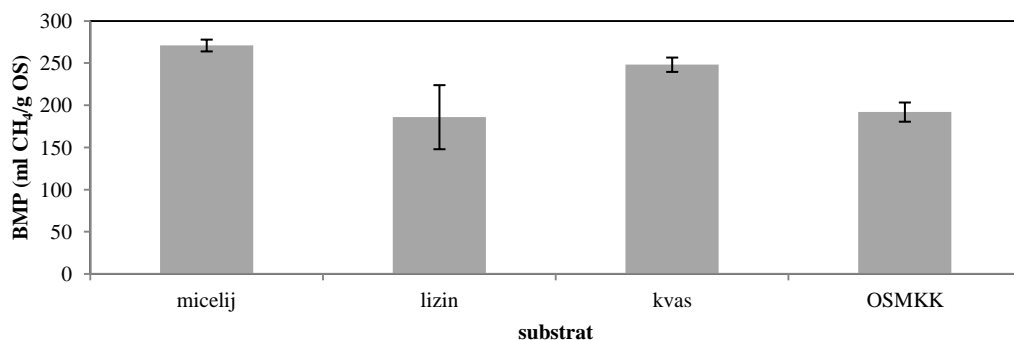
Table 35: Various measured parameters of samples from anaerobic reactors at the end of experiment 5 with standard deviations (Kolbl et al., 2014).

Vzorec	Odpadki iz restavracij						Izhodiščni vzorec
	A	B	C	D	E	G	
BMP [CH ₄ g ⁻¹ OS ⁻¹]	201 ± 10,5	310 ± 21,4	319 ± 11,5	473 ± 150	493 ± 184	340 ± 25,5	-
SS [%]	5,34 ± 0,03	5,49 ± 0,07	5,67 ± 0,1	5,61 ± 0,13	5,60 ± 0,07	5,53 ± 0,09	5,53 ± 0,05
OS [% SS]	75,05 ± 0,37	67,76 ± 0,35	74,81 ± 0,40	74,55 ± 0,19	62,62 ± 0,39	76,16 ± ,044	68,38 ± 0,24
OS [% SM]	4,01	3,72	4,24	4,18	3,51	4,21	3,78
pH	7,45 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,44 ± 0,01	7,45 ± 0,01	7,45 ± 0,01	7,44 ± 0,00
HOK [mg/l]	2934 ± 25	2861 ± 7	2991 ± 23	3014 ± 24	2870 ± 6	2869 ± 54	3203 ± 57
CAO [mg/l]	9867 ± 54	9628 ± 74	9985 ± 59	9973 ± 342	9650 ± 45	10046 ± 149	9652 ± 113
HOK/CAO	0,297 ± 0,001	0,297 ± 0,002	0,300 ± 0,001	0,304 ± 0,009	0,298 ± 0,002	0,286 ± 0,007	0,333 ± 0,010
Ntotal [mg/l]	4331 ± 20	4325 ± 10	4448 ± 1	4437 ± 59	4381 ± 18	4112 ± 68	4126 ± 65
NH₄⁺-N [mg/l]	1020 ± 28	1171 ± 1	1010 ± 29	930 ± 48	1065 ± 18	852 ± 48	1040 ± 40
Razgradnja OS [%]	10,6	16,2	8,5	9,5	10,6	17,7	6,9

Deleži suhe snovi, organske snovi in pH po koncu eksperimenta se med različnimi biološkimi odpadki niso bistveno razlikovali. To velja tudi za koncentracije hlapnih maščobnih kislin, ki so bile v reaktorjih s substrati v nekoliko višjih koncentracijah kot pri kontrolnem reaktorju, kjer se je nahajal samo inokulum. Koncentracije amonijskega dušika in amonijaka so bile izven inhibitornega območja, koncentracije celotnega dušika pa med 4100 in 4500 mg/l. Največjo razgradnjo organske snovi so imeli odpadki G, najmanjšo pa odpadki C in izhodiščni vzorec (preglednica 35). Zaključki iz eksperimenta 5 so podani v poglavju 4.2.6.

4.2.4 Rezultati eksperimenta 6: Test uporabe industrijskih odpadkov za pridobivanje bioplina na 5 l modelnem merilu AMPTS II

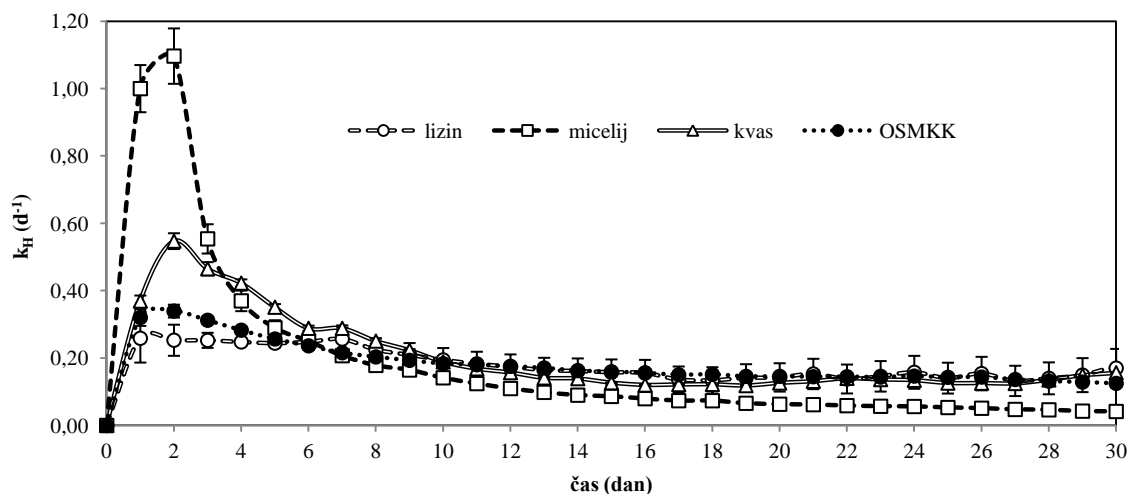
Industrijski odpadki so se med seboj razlikovali v vsebnosti SS, OS, koncentraciji dušika, velikosti delcev in glede na to ali so bili v trdni ali tekoči obliki, posledično smo pričakovano izmerili tudi različne metanske potenciale. Z OSMKK smo označili ostanke sveže mletih klavničnih kosti.



Grafikon 10: BMP industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.

Graph 10: Biomethane potential of industry wastes for biomethane production in experiment 6 where residues of fresh milled slaughterhouse bones is marked as OSMKK.

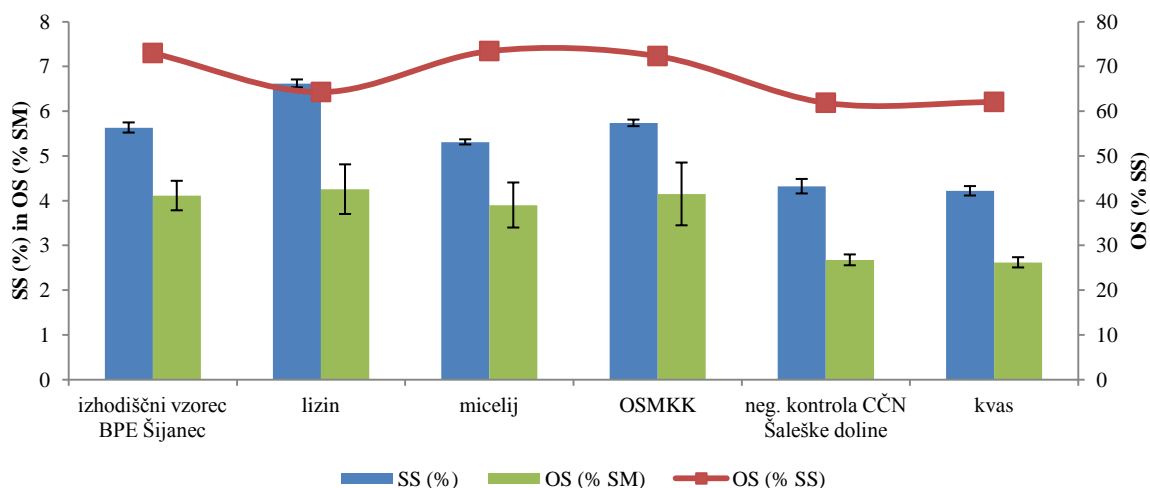
V vseh primerih je tvorba metana potekala najhitreje v prvih treh dnevih, ko je nastalo največ metana, kar nakazuje, da je bila mikrobná združba uporabljene biomase sposobna brez večjih prilagoditev uporabiti nove substrate za pridobivanje bioplina. Največji BMP smo izmerili pri miceliju 271 ± 7 ml CH₄/g OS, kjer je večina biometana nastala v prvih štirih dnevih, najmanjšega 186 ± 38 ml CH₄/g OS pa pri lizinu (glej grafikon 10).



Grafikon 11: Koeficient hidrolize industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana v eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.

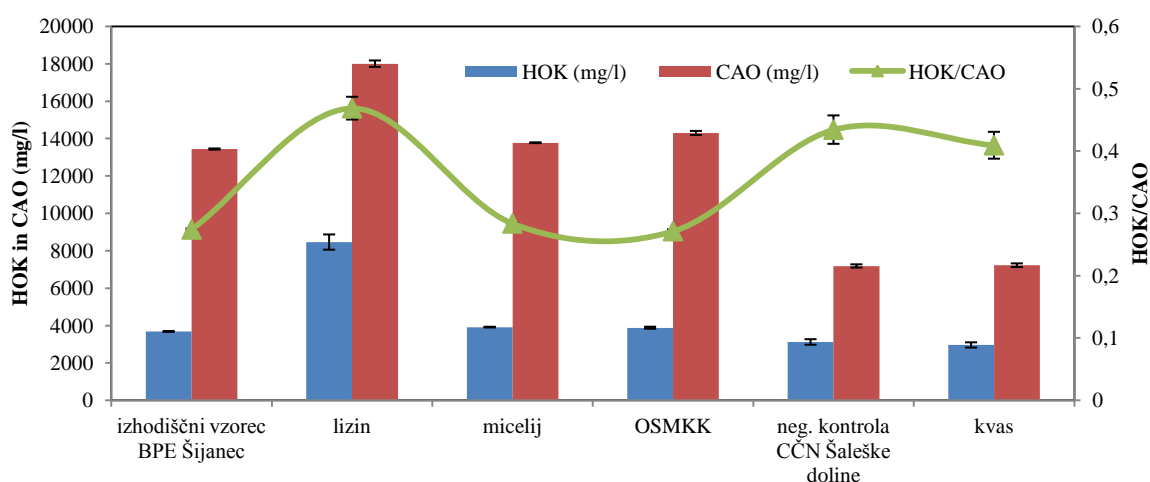
Graph 11: Hydrolysis coefficient of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 with standard deviation. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.

Največji koeficient hidrolize $k_H = 1,0965 \text{ d}^{-1}$ so imeli anaerobni reaktorji z micelijem. V prvih dveh dnevih je tukaj hidroliza potekala najhitreje, tvorba metana je prvi dan dosegla že 47 % celotne tvorbe metana. Pri OSMKK je prvi dan BMP dosegel 27 % končnega BMP-ja. Dnevni biometanski potencial kvasa je prvi dan znašal 88,5 BMP/dan, kar je 35,4 % končnega BMP, koeficient hidrolize pa je bil 0,5472. Najmanjši koeficient hidrolize $k_H = 0,2588 \text{ d}^{-1}$ je imel substrat lizin, kjer je prvi dan dnevni BMP znašal 25 BMP/dan, kar je 13 % končnega BMP-ja (Grafikon 11).



Grafikon 12: SS in OS industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.

Graph 12: TS and VS of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.



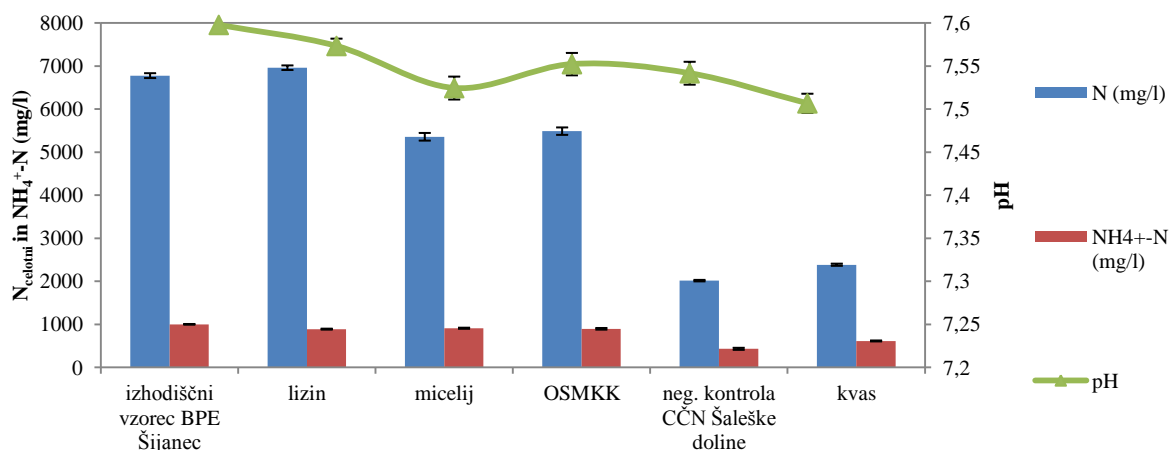
Grafikon 13: HOK, CAO in HOK/CAO industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.

Graph 13: VOA, TAC and VOA/TAC of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.

Deleži SS in OS se po končanem eksperimentu med različnimi anaerobnimi reaktorji niso bistveno razlikovali. Pri lizinu smo zaznali nekoliko višjo koncentracijo hlapnih organskih kislin, ki so se povečale zaradi dodajanja lizina, ki je aminokislina. Vendar do inhibicije ni prišlo, saj je sistem imel zadostno alkalnost, ki pomaga pri uravnavanju pH. Alkalnost je znašala okrog 18.000 mg/l. Kvas in izhodiščni vzorec CČN Šaleške doline sta imela manjši HOK in CAO v primerjavi z ostalimi industrijskimi odpadki, med sabo se pa bistveno nista razlikovala (glej grafikon 13).

Največjo razgradnjo organske snovi smo opazili pri kvasu (19,9 %), sledi izhodiščni vzorec CČN Šaleške doline s 17 %, nato micelij s 14,6 %, OSMKK s 13,5 %, izhodiščni vzorec BPE Šijanec s 13,8 % in lizin s 11,5 %.

Koncentracije amonijskega dušika so bile v vseh primerih izven inhibitornega področja in se med seboj niso bistveno razlikovale. Nižjo koncentracijo amonijskega dušika sta imela le izhodiščni vzorec CČN Šaleške doline in kvas, kjer je kot inokulum bila uporabljena biomasa iz omenjene ČN. Pri anaerobnih reaktorjih z micelijem in OSMKK po končanem eksperimentu je koncentracija celotnega dušika znašala med 5357 ± 89 mg/l in 5487 ± 86 mg/l, v tem vrstnem redu, kar je za približno 20 % manj kot pri izhodiščnem vzorcu BPE Šijanec (glej grafikon 14).



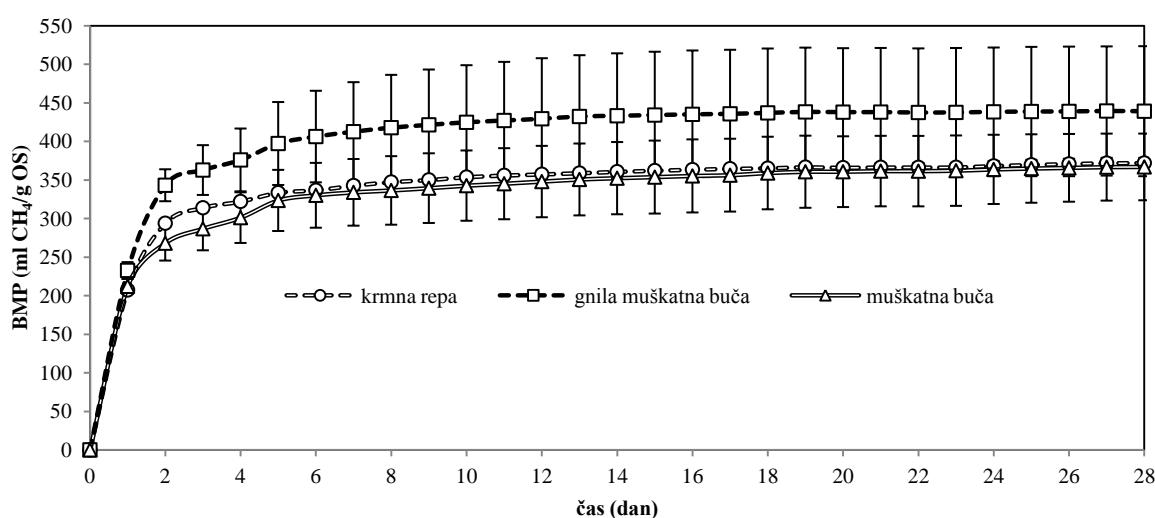
Grafikon 14: Koncentracija dušika, amonijskega dušika in pH industrijskih odpadkov za pridobivanje biometana po končanem eksperimentu 6 s standardno deviacijo, kjer OSMKK predstavlja ostanke sveže mletih klavničnih kosti.

Graph 14: Total nitrogen, ammonium nitrogen concentrations and pH of various industrial wastes for biomethane production used in experiment 6 at the end of anaerobic process. OSMKK represents residues of fresh milled slaughterhouse bones.

4.2.5 Rezultati eksperimenta 7: Test uporabe surovin kmetijskega izvora za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II

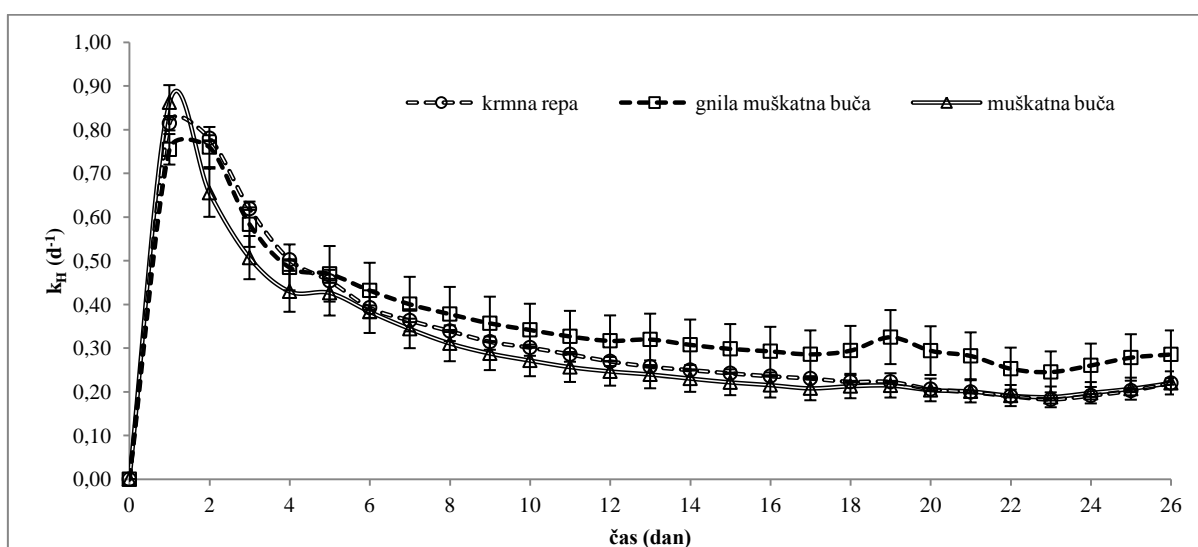
Biometanski potencial kmetijskih substratov je prikazan na grafikonu 15. Med vsemi substrati sta podoben BMP imeli muškatna buča in krmna repa, in sicer $366,2 \pm 43$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$ in $371,9 \pm 4,2$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Največji BMP, ki je znašal $439,2 \pm 84$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$, smo opazili pri gnili muškatni buči.

Koeficienti hidrolize substratov kmetijskega izvora se med seboj niso bistveno razlikovali in so se gibali med 0,7600 in 0,8625 (grafikon 16). Vsi substrati so že po prvem dnevu dosegli med 53 in 58 % končnega BMP-ja, po drugem dnevu pa med 73 in 79 % končnega BMP-ja. Nato je dnevna tvorba metana začela upadati in se po desetem dnevu ni več bistveno spremenila.



Grafikon 15: BMP substratov, ki izvirajo iz kmetijstva s standardno deviacijo v eksperimentu 7.

Graph 15: BMP of substrates origin from agriculture in experiment 7 with standard deviation.



Grafikon 16: Koeficient hidrolize substratov kmetijskega izvora v eksperimentu 7.

Graph 16: Hydrolysis coefficient of substrates origin from agriculture in experiment 7.

Preglednica 36: Izmerjeni različni parametri v anaerobnih reaktorjih s substrati kmetijskega izvora po končanem eksperimentu 7 s podano standardno deviacijo.

Table 36: Characteristics of anaerobic digesters amended with agricultural substrates at the end of experiment 7 with standard deviation.

Parameter	Krmna repa	Gnila muškatna buča	Muškatna buča	Inokulum BPE Šijanec
SS [%]	5,20 ± 0,11	5,13 ± 0,04	5,25 ± 0,16	5,29 ± 0,20
OS [% SS]	75,40 ± 0,35	74,60 ± 0,25	75,10 ± 0,84	71,07 ± 0,72
pH	7,39 ± 0,01	7,47 ± 0,01	7,43 ± 0,01	7,47 ± 0,01
HOK [mg/l]	2878 ± 18	3126 ± 20	2950 ± 20	4136 ± 213
CAO [mg/l]	9561 ± 104	10777 ± 143	10293 ± 54	11233 ± 57
HOK/CAO	0,301 ± 0,004	0,290 ± 0,01	0,287 ± 0,003	0,370 ± 0,020
N _{total} [mg/l]	4270 ± 67	4618 ± 250	4503 ± 116	3906 ± 42
NH ₄ ⁺ -N [mg/l]	866 ± 36	894 ± 90	1047 ± 74	829 ± 41
Razgradnja OS [%]	8,6	7,1	11,4	7,2

Nastajanje metana se je najverjetneje upočasnilo, ker so lažje dostopne organske snovi mikroorganizmi že razgradili, težje dostopne razgradljive snovi pa jim še niso bile na razpolago v taki obliki, da bi jih lahko porabili. Po končanem eksperimentu je v reaktorjih, ki smo jim dodali substrate, ostalo nekoliko več OS (% SS) kot v izhodiščnem vzorcu, delež SS pa je bil manjši, saj smo substratom na začetku dodali tudi vodo. Vsebnost HOK in CAO se med substrati ni bistveno razlikovala, nekoliko višjo koncentracijo HOK smo zaznali pri izhodiščnem vzorcu. Koncentracije amonijskega dušika so bile v vseh primerih pod toksičnimi koncentracijami, koncentracija celotnega dušika pa je znašala 3906 ± 42 mg/l za izhodiščni vzorec in 4618 ± 250 mg/l za reaktorje, ki so vsebovali gnilo muškatno bučo. Razgradnja organske snovi se je pri substratih na koncu eksperimenta gibala med 7,1 in 11 % (glej preglednico 36).

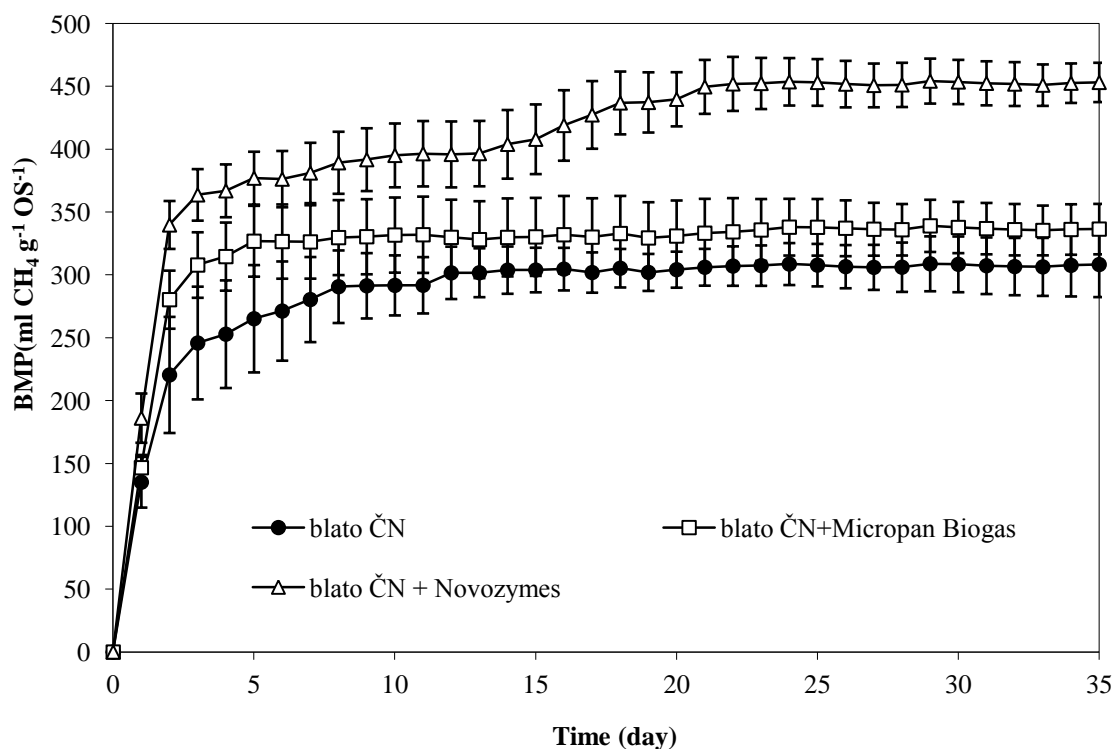
4.2.6 Ugotovitve iz eksperimentov 5, 6 in 7

Biološki odpadki predstavljajo dobro alternativo energetskim rastlinam za pridobivanje bioplina v procesu anaerobne presnove. Anaerobna presnova, kjer kot substrat uporabljamo biološke komunalne odpadke, je zelo zahteven proces. Biološki odpadki iz različnih virov se med seboj razlikujejo. Na količino metana, ki se bo proizvedla, tako vplivajo: vrsta odpadkov, vsebnost soli, vsebnost maščob, vsebnost vlaken, organska obremenitev anaerobnih reaktorjev, velikost delcev, temperatura procesa in drugi vplivi. Največji problem predstavlja nehomogenost odpadkov, zaradi česar lahko pride do preobremenjenosti in kopičenja maščobnih kislin, kar upočasni proces tvorjenja metana. Zato je potrebno dnevno spremljanje delovanja reaktorjev, da čim bolj zmanjšamo dnevna nihanja v proizvodnji metana, ki se jim zaradi narave bioloških odpadkov ne moremo izogniti. Namesto mezofilnega temperaturnega območja lahko preidemo na termofilno območje, kjer razgradnja poteka hitreje, velikost anaerobnih reaktorjev se zmanjša, prav tako pa se zaradi višje temperature zmanjša število patogenih mikroorganizmov. Vendar pa je zaradi občutljivosti mikroorganizmov na spremembe v temperaturi proces težje voditi. Biološki odpadki lahko vsebujejo tudi primesi kot so; les, plastika, kovina in steklo, zato je nujno, da se take odpadke že zbira ločeno. Prav tako je pred doziranjem v anaerobne reaktorje potrebna groba mehanska predobdelava, kjer se velikost delcev zmanjša, saj se v biološke odpadke odlagajo organsko razgradljivi materiali, ki so lahko tudi večjih dimenzij.

Pri substratih industrijskega izvora smo v primeru lizina opazili povečano koncentracijo hlapnih kislin, zato tega substrata ne priporočamo za pridobivanje bioplina. Posebna pozornost je potrebna tudi pri uporabi micelija, saj v anaerobnih reaktorjih pri uporabi večje količine tega substrata prihaja do penjenja, kar pa lahko zamaši plinske cevi na bioplinskih elektrarnah, v najslabšem primeru pa uhajanje pen iz anaerobnega reaktorja.

4.2.7 Rezultati in diskusija eksperimenta 8: Možnost uporabe hidrolitskih encimov za povečanje tvorbe metana iz tritikale in blata iz ČČN Šaleške doline na 5 l šarženm AMPTS II

Vpliv dodajanja hidrolitski encimov tritikali in blatu iz ČN smo prikazali na grafih 17 in 18. Z mešanico encimov Novozymes smo pri tritikali dosegli 38 % povečanje tvorbe metana glede na izhodiščni vzorec in 22 % povečanje metana pri reaktorjih, ki so vsebovali blato s ČN in smo jim dodajali encime Novozymes v primerjavi z izhodiščnim vzorcem. Pri dodajanju encimov Micropan Biogas ni prišlo do bistvenega povečanja tvorbe biometana, čeprav je povprečno povečanje znašalo med 6 in 8 %. Encime in žive kulture, ki se nahajajo v dodatkih za povečanje tvorbe metana, je v nekaterih primerih potrebno dozirati daljše časovno obdobje, da bi lahko videli njihov učinek (Kolbl et al., 2014). Razlike, ki smo jih zaznali v našem eksperimentu, so v okviru že prej opaženih razlik pri drugih avtorjih (Quiñones et al., 2012; Ziemiński et al., 2012; Bruni et al., 2010b). Naši eksperimenti so bili izvedeni z realnimi velikostmi delcev, kot se jih dozira v fermentorje na bioplinarnah, zato so tudi razlike, ki so nastale med encimsko obdelanimi in neobdelanimi reaktorji v okviru realnega modelnega merila.

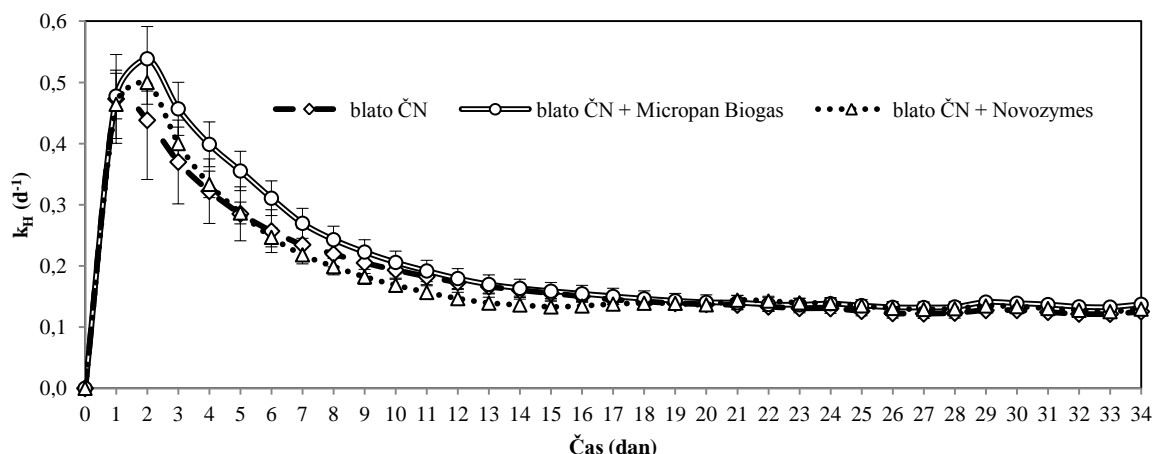


Grafikon 17: Biometanski potencial blata iz ČČN Šaleške doline in predobdelave blata s hidrolitskimi encimi Novozymes in Micropan Bioga s standardno deviacijo pri eksperimentu 8 kot funkcija časa (Kolbl et al., 2014).

Graph 17: Specific methane yield produced in experiment 8 as a function of time from WWTP Šaleška valey amended with municipal wastewater sludge and treated with hydrolytic enzymes Novozymes and Micropan Biogas (Kolbl et al., 2014).

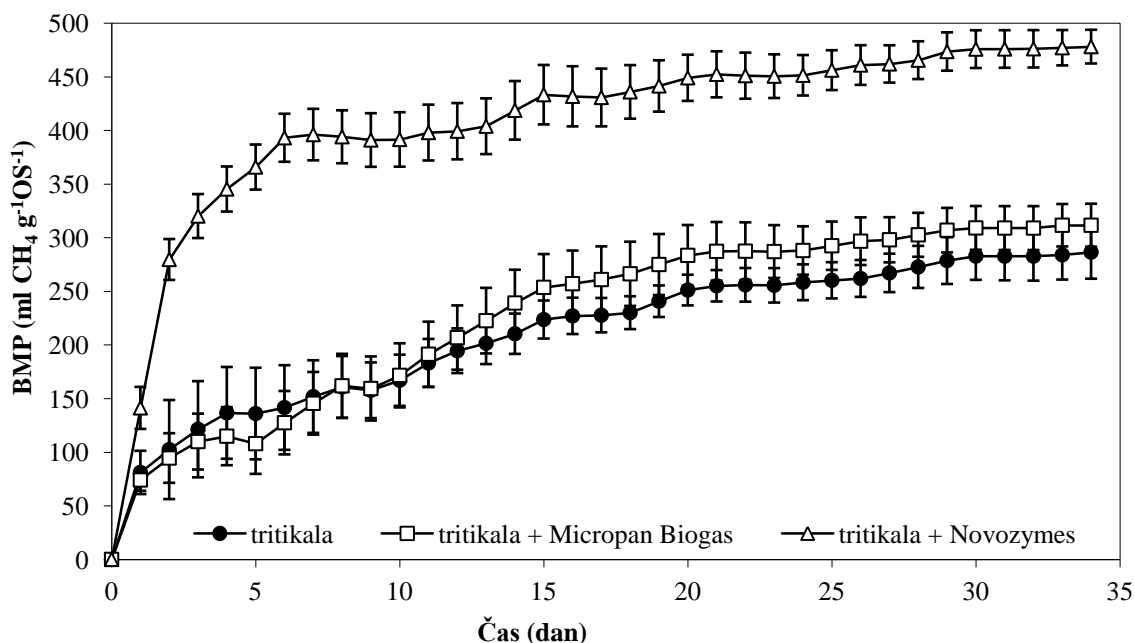
Iz biometanskih potencialov smo izračunali tudi koeficiente hidrolize. Koeficient hidrolize se je za reaktorje z dodajanjem encimov v primeru blata iz ČČN v primerjavi s kontrolo brez dodajanja encimov povečal. Za encime Micropan v eksperimentu z blatom iz ČČN je znašal $0,539 \pm 0,1 \text{ d}^{-1}$, za encime

Novozymes pa $0,500 \pm 0,06 \text{ d}^{-1}$, kar tudi prikazuje, da se je večina metana v obeh primerih proizvedla že drugi dan po zagonu eksperimenta (grafikon 17 in 18). V eksperimentu s tritikalo je koeficient hidrolize znašal $0,282 \pm 0,024 \text{ d}^{-1}$. Če smo tritikali dodali encime Micropan Biogas, je koeficient hidrolize znašal $0,256 \pm 0,018 \text{ d}^{-1}$, bistveno pa se je povečal pri dodajanju encimov Novozymes, in sicer na $0,332 \pm 0,013 \text{ d}^{-1}$ (glej grafikona 19 in 20).



Grafikon 18: Koeficient hidrolize k_H blata ČN in dodajanja encimov Micropan Biogas ter Novozymes s standardno deviacijo.

Graph 18: Hydrolysis coefficient of WWS and WWS treated with hydrolytic enzymes Micropan Biogas and Novozymes.

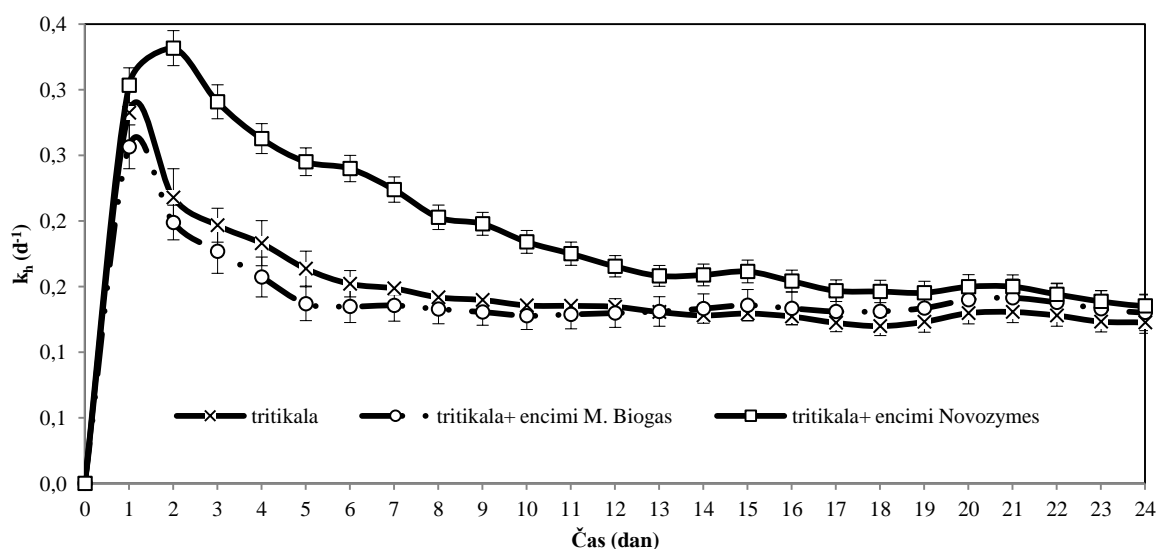


Grafikon 19: Specifični kumulativni izplen metana na 5 l modelnem merilu z AMPTS II kot funkcija časa za inokulum iz BPE Šijanec in substrata tritikale z dodajanjem hidrolitičnih encimov Micropan Biogas in Novozymes s standardno deviacijo (Kolbl et al., 2014).

Graph 19: Specific methane yield produced in 5 l AMPTS II test as a function of time from BGP Šijanec inoculum amended with tritikale and treated with hydrolytic enzymes Novozymes and Micropan Biogas (Kolbl et al., 2014).

V primeru tritikale koeficienta hidrolize z encimi Novozymes in z encimi Micropan Biogas po vrednosti nista veliko odstopala od pozitivne kontrole. Do takih majhnih razlik med reaktorji z izhodišnim vzorcem in reaktorji, obdelanimi z encimi, je najverjetneje prišlo zaradi narave lignoceluloznega substrata tritikale, kjer celuloza ni dostopna zaradi ovoja lignina in hemiceluloze, ki delujeta kot ščit pred mikrobnimi napadi. Lignin je anaerobno skorajda nemogoče razgraditi, enostavnejši dostop do hemiceluloze in celuloze pa ovira sama zgradba tritikale. Delovanje dodatka Micropan Biogas najverjetneje ni bilo tako učinkovito, da bi se hitrost hidrolize in s tem koeficient hidrolize bistveno povečala. Na drugi strani je viden le za 6 do 8 % večji izplen biometana v primerjavi z izhodišnim vzorcem, kar lahko pripišemo temu, da so se lažje razgradljive snovi ob dodajanju Micropan Biogas prej in lažje razgradile oziroma so encimi Micropan Biogas pospešili razgradnjo lažje razgradljivih in dostopnejših snovi, kar je še bolj očitno za encime Novozymes, kjer je tvorba metana občutno narasla.

Z analizami NDV, KDL in KDV, ki so opisane v poglavju 2.9, smo določili tudi deleže lignina, celuloze in hemiceluloze v primeru tritikale. Odstotki lignina, celuloze in hemiceluloze se med reaktorji bistveno niso razlikovali. Dodatno dozirani lignin, hemiceluloza in celuloza v obliki tritikale, so se s pomočjo mikroorganizmov razgradili do te mere, da je njihovo razmerje bilo podobno razmerju pri izhodiščnem vzorcu, kjer ni bil doziran noben substrat. Vsebnost celuloze v anaerobnih reaktorjih je bila med 14,5 in 16,6 %, hemiceluloze med 25,1 do 27,9 % in lignina med 57,4 in 58,5 %. Delež hemiceluloze pri tritikali, ki smo ji dodajali encime Novozymes, je v primerjavi z izhodiščnimi vzorcem manjši za 2,8 %, deleža celuloze in hemiceluloze se bistveno nista spremenila. Rezultati meritev so prikazani na grafikonu 21 in 22. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da se zaradi doziranja encimov deleži lignina, hemiceluloze in celuloze v primerjavi s pozitivno kontrolo niso spremenili. Doziranje encimov ni pripomoglo k boljši razgradnji lignina, celuloze in hemiceluloze do te mere, da bi to v našem eksperimentu lahko zaznali, saj smo imeli zaprt sistem in količinsko okrog 6,6 krat več inokuluma kot substrata (grafikon 21).

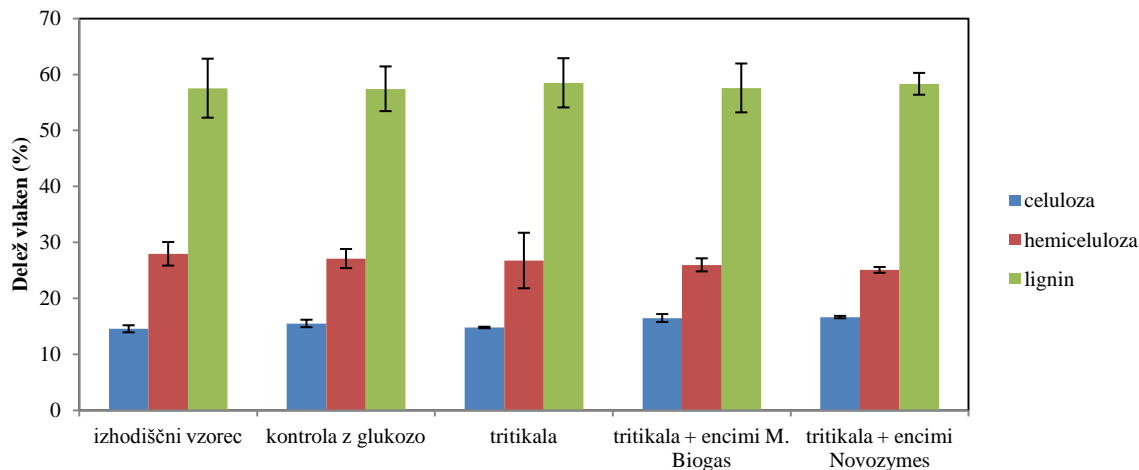


Grafikon 20: Koeficient hidrolize k_H za inokulum iz BPE Šijanec in substrat tritikala in dodajanja encimov Micropan Biogas ter Novozymes s standardno deviacijo.

Graph 20: Hydrolysis coefficient of triticale and triticale treated with hydrolytic enzymes Micropan Biogas nad Novozymes.

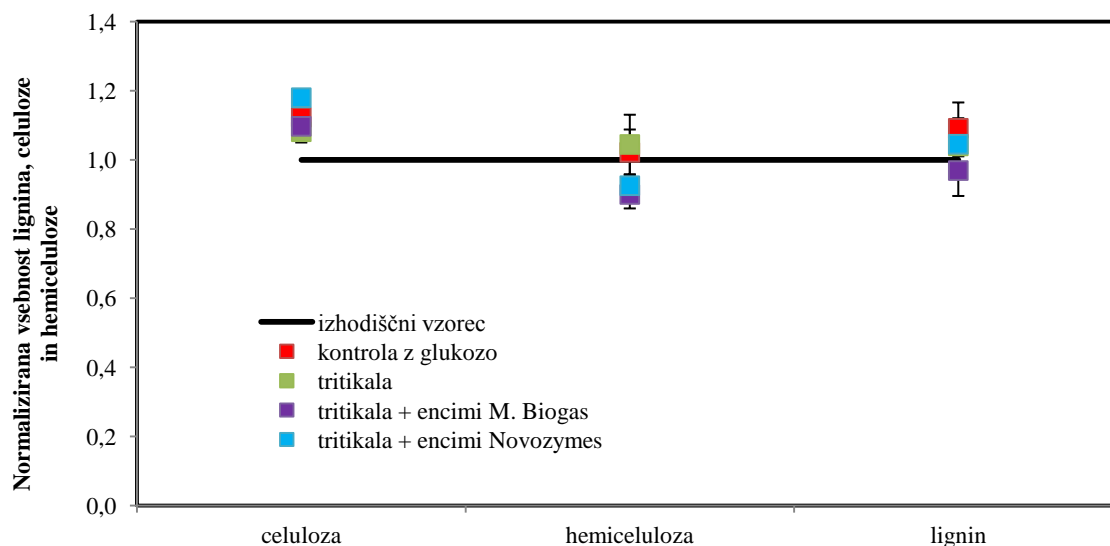
Razlike v spremembah celuloze, hemiceluloze in lignina so zelo majhne tudi pri normaliziranih vrednostih (grafikon 22), predvidevamo da so zakrite zaradi ozadja lignoceluloznega inokuluma

(biomase). Zato so za opazovanje sprememb lignina, celuloze, hemiceluloze, vpliva encimov in produkcije metana pomembne študije na kontinuiranih reaktorjih, kjer se lahko približamo realnemu delovanju anaerobnega procesa.



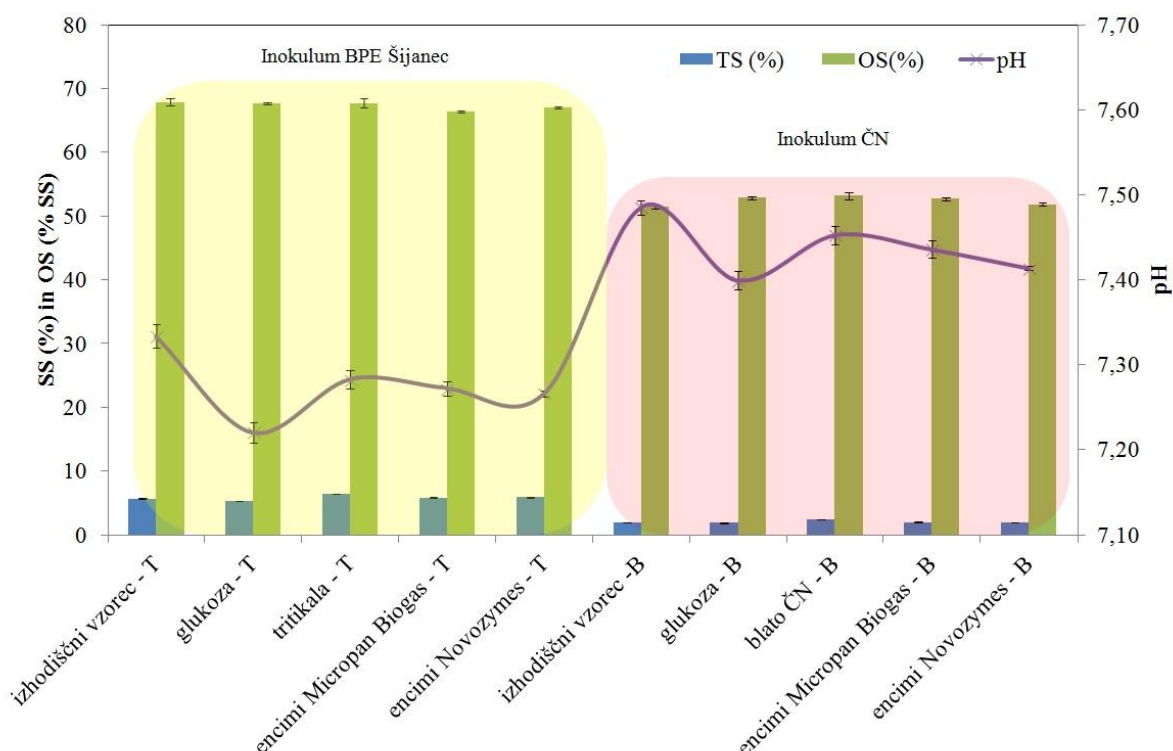
Grafikon 21: Delež celuloze, hemiceluloze in lignina v posameznih reaktorjih pri eksperimentu z inokulumom iz BPE Šijanec, tritikalo in dodajanjem encimov Micropan Biogas in Novozymes po 34 dneh s standardno deviacijo.

Graph 21: Cellulose, hemicellulose and lignin share in anaerobic reactors at the end of experiment 9, using inoculum from BGP Šijanec amended with triticale and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas.



Grafikon 22: Normalizirana vsebnost celuloze, hemiceluloze in lignina v posameznih reaktorjih pri eksperimentu z inokulumom iz BPE Šijanec, tritikalo in dodajanjem encimov Micropan Biogas in Novozymes po 34 dneh s standardno deviacijo.

Graph 22: Normalized cellulose, hemicellulose and lignin share in anaerobic reactors at the end of experiment 9, using inoculum from BGP Šijanec amended with triticale and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas.

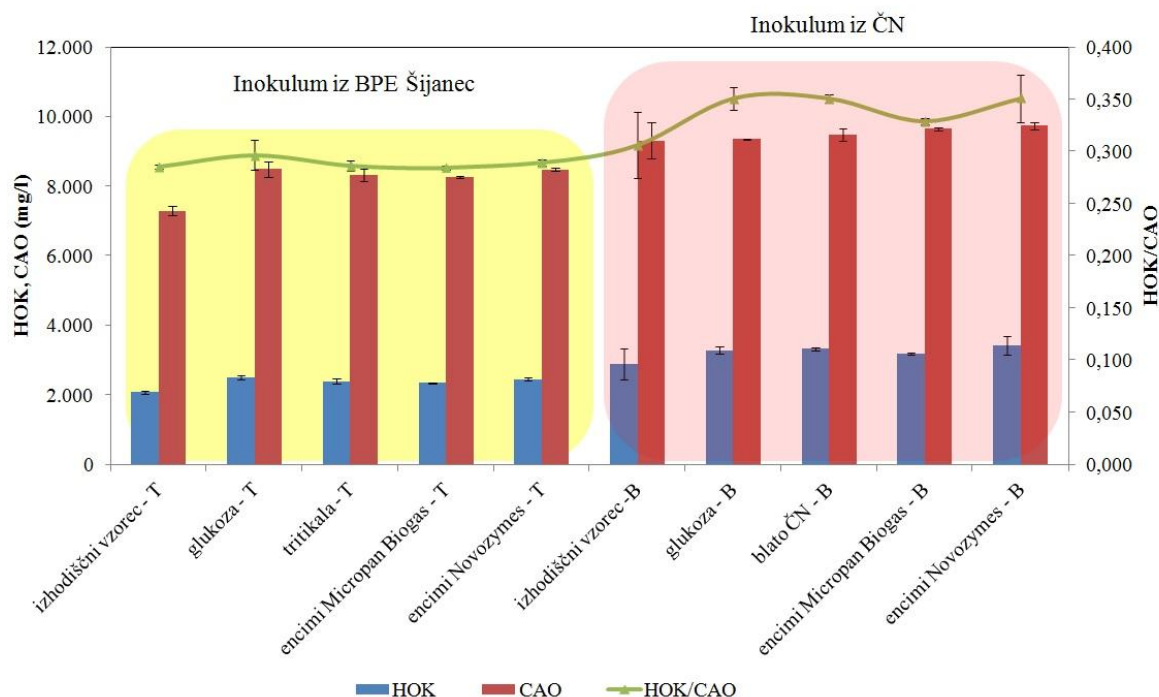


Grafikon 23: Suha snov (SS), organska snov (OS) in pH v pilotnih reaktorjih po 34 dneh procesa anaerobne presnove s standardno deviacijo pri eksperimentu 9.

Graph 23: Total solids (TS), volatile solids (VS) and pH in anaerobic pilot reactors at the end of 34 days experiment number 9.

V reaktorjih, kjer smo dodajali encime, je prišlo do boljše razgradnje organske snovi v primerjavi z reaktorji z izhodiščnim vzorcem (biomasa + substrat), saj je bila vsebnost organske snovi glede na SS nekoliko nižja. Z dodajanjem encimov Micropan Biogas smo pri tritikali dosegli 17 % razgradnjo organske snovi, z dodajanjem encimov Novozymes pa 15,8 %. Brez encimske obdelave je razgradnja organske snovi pri tritikali bila samo 7,9 %. Podobno smo zaznali pri blatu iz ČN, kjer je razgradnja OS samo blata znašala 9,6 %, pri dodajanju encimov Micropan Biogas in Novozymes pa se je povečala na 25 % in 27,2 % v tem vrstnem redu. Večja razgradnja organske snovi pomeni, da se je organska masa pretvorila v bioplina, vendar v različne deleže ogljikovega dioksida in metana, kar je tudi razvidno iz biometanskih potencialov, kjer je največ metana nastalo pri reaktorjih, ki smo jim dodajali encime Novozymes, pri podobni organski razgradnji dodajanja Micropan Biogas pa je metana nastalo bistveno manj. Vrednost pH pri eksperimentu s tritikalo se je gibala med 7,20 in 7,35, pri eksperimentu z blatom iz ČN pa je bila med 7,35 in 7,50 ter je bila znotraj ugodnih pogojev za proces anaerobne razgradnje (grafikon 23).

Razmerje med hlapnimi organskimi kislinami (HOK) in celotnim anorganskim ogljikom (CAO) se med reaktorji pri eksperimentu s tritikalo ni bistveno razlikovalo in se je gibalo okrog 0,300. Pri eksperimentu z blatom iz ČN je bilo to razmerje nekoliko višje, med 0,320 in 0,350. Tako razmerje nakazuje, da je reaktor ustrezno organsko obremenjen (grafikon 24).



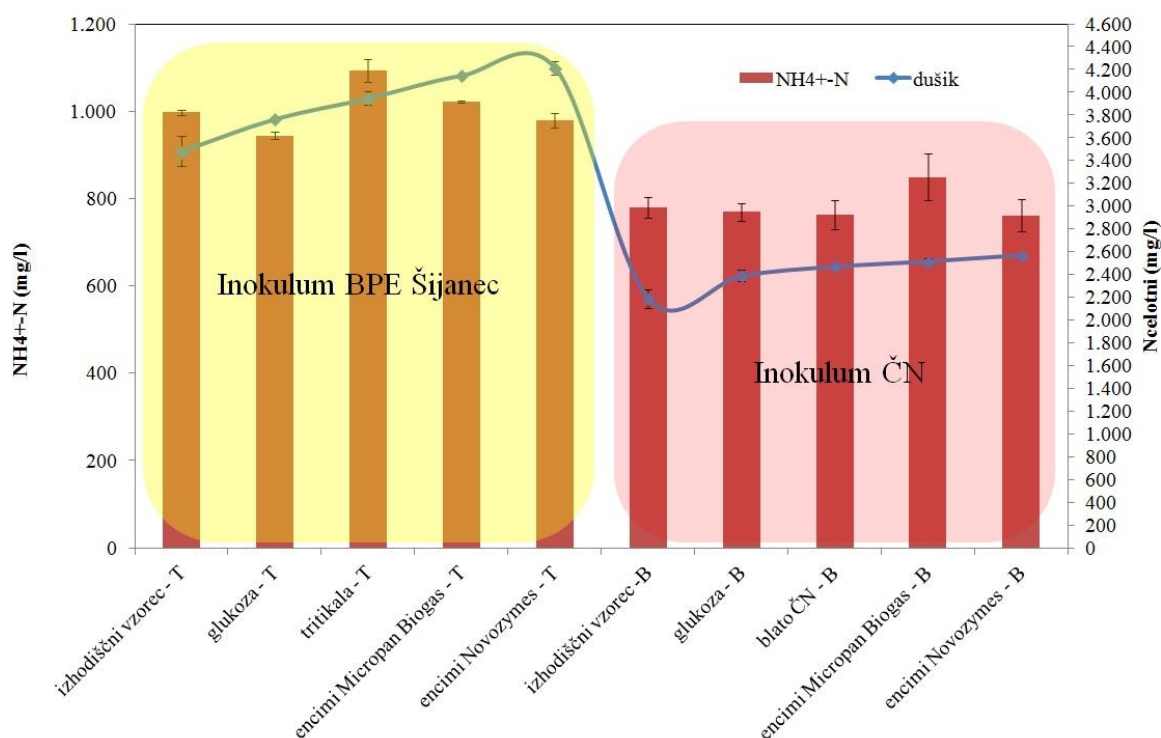
Grafikon 24: Vsebnost hlapnih organskih kislin (HOK) in celotnega anorganskega ogljika (CAO) po končani anaerobni presnovi tritikale in blata iz ČN ter dodajanju encimov Micropan Biogas in Novozymes, z uporabo inokuluma iz BPE Šijane in CČN Šaleške doline in podanimi standardnimi deviacijami. Z rumeno so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T), z rdečo pa vzorci z blatom iz ČN (B).

Graph 24: Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TIC) concentrations at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples from experiment with triticale are coloured yellow and marked with (T) and samples of experiment with wastewater sludge (B) are coloured red.

Po končanem eksperimentu se koncentracije celotnega dušika pri tritikali niso bistveno razlikovale. Največjo koncentracijo med 4145 in 4212 mg/l so imeli šaržni reaktorji s tritikalo, ki smo jim dodajali encime Micropan Biogas in Novozymes, najmanjšo pa kontrola z glukozo (grafikon 25). Koncentracija amonijskega dušika se je v vseh naših primerih gibala pod mejo 1500 mg/l, ki je toksična za mikroorganizme (Chernicharo, 2007).

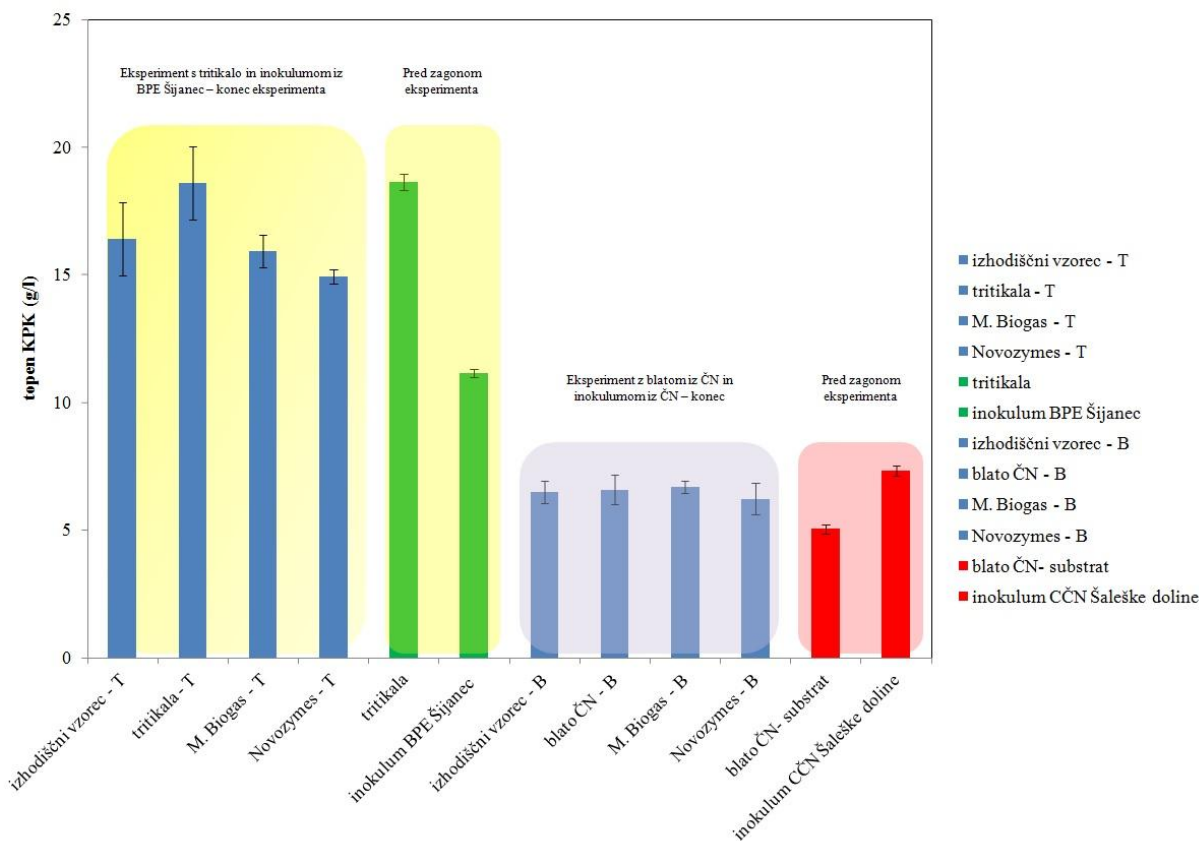
V anaerobnih reaktorjih smo po 34 dneh izmerili tudi koncentracijo topnega KPK (grafikon 26). Največja vrednost topnega KPK pred eksperimentom je bila pri tritikali in je znašala 18,65 g KPK/l, pri inokulumu iz BPE Šijanec, ki smo ga uporabili za tritikalo, pa 11,13 g KPK/l. Po 34 dneh je največja koncentracija KPK, ki je znašala 18,57 g KPK/l, bila pri reaktorju, ki je vseboval tritikalo. Najmanj topnega KPK na koncu eksperimenta pri tritikali je bilo v primeru dodajanja encimov Novozymes, kar bi lahko nakazovalo da so mikroorganizmi substrate, ki so se raztopili v vodi, delno že porabili za pridobivanje metana. Koncentracija se je gibala okrog $14,8 \pm 0,27$ g KPK/l. Nekoliko višja je bila koncentracija KPK pri doziranju encimov Micropan Biogas. Rezultati za tritikalo in blato iz ČN so podani na grafikonu 26. Koncentracija topnega KPK blata iz ČN pred eksperimentom je bila 5,03 g KPK/l, inokuluma pa 7,31 g KPK/l. Po 34 dneh med različnimi reaktorji ni bilo zaznati večje razlike v koncentraciji KPK. Nekoliko pri eksperimentu s tritikalo izstopa topen KPK pri predobdelavi s hidrolitskimi encimi Novozymes, ki je v primerjavi z Micropan Biogas manjši za 7 %. V primeru

blata iz ČN so reaktorji, ki so bili predobdelani z encimi Novozymes, po 34 dneh imeli največji biometanski potencial in najmanjšo koncentracijo topnega KPK.



Grafikon 25: Koncentracija celotnega in amonijskega dušika po 34 dneh procesa anaerobne presnove v šaržnih pilotnih reaktorjih eksperimenta s tritikalo in blatom iz ČN ter dodajanja encimov Micropan Biogas in Novozymes z uporabo inokuluma iz BPE Šijanec in CČN Šaleške doline in podanimi standardnimi deviacijami. Z rumeno so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T) na koncu eksperimenta, z rdečo pa vzorci iz eksperimenta s blatom iz ČN (B).

Graph 25: Total nitrogen and ammonium nitrogen concentrations at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples from experiment with triticale are coloured yellow and marked with (T) and samples from experiment are coloured red with wastewater sludge with (B).

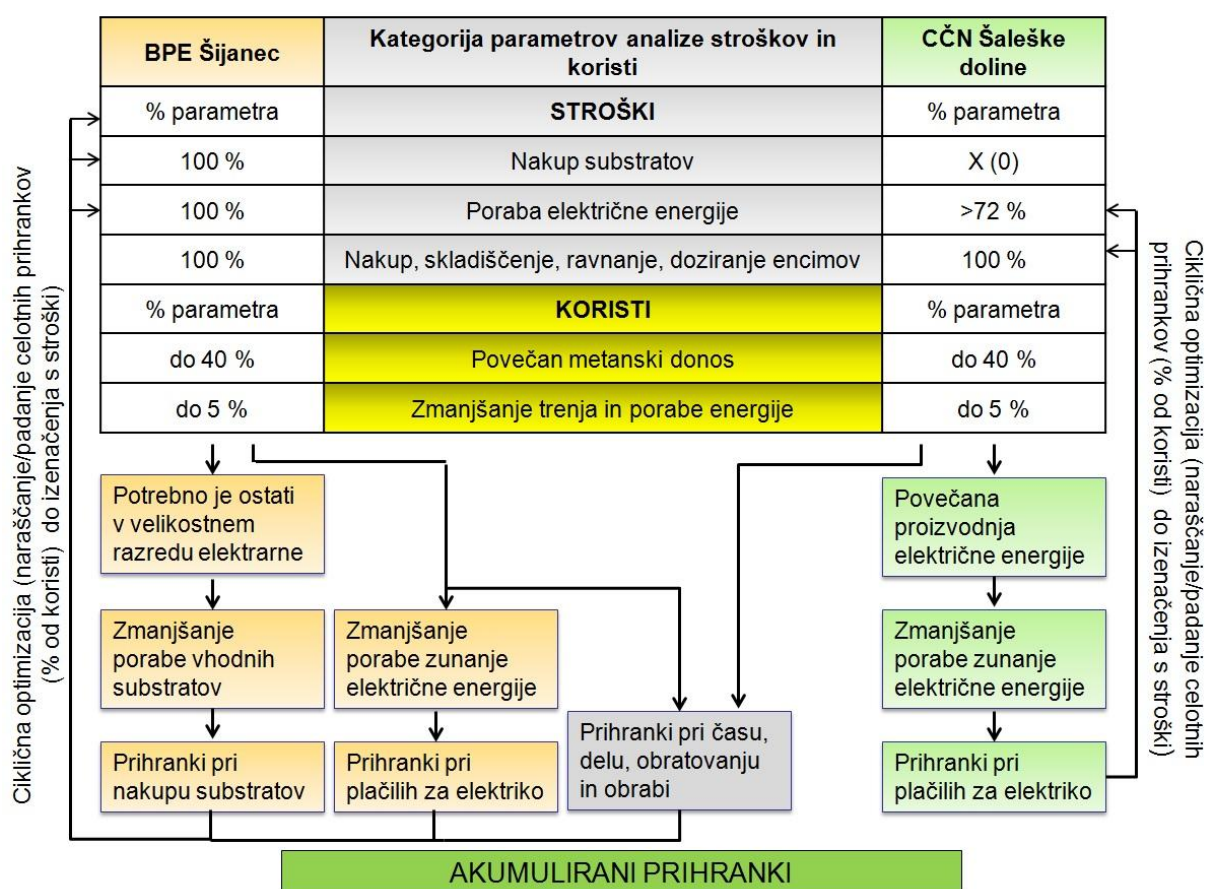


Grafikon 26: Koncentracija topnega KPK v 5 l pilotnih reaktorjih po 34 dneh v posameznih reaktorjih pri eksperimentu dodajanja hidrolitskih encimov Micropan Biogas in Novozymes tritikali in blatu iz ČN s standardno deviacijo ter koncentracije topnega KPK tritikale, blata iz ČN, inokuluma iz BPE Šijanec in inokuluma iz ČN Šaleške doline pred zagonom eksperimenta. Z rumeno in modrimi stolpci so označeni vzorci eksperimenta s tritikalo (T) po koncu eksperimenta, z rumeno in zelenimi stolpci vzorci tritikale in inokuluma iz BPE Šijanec pred zagonom eksperimenta. Z modro so označeni vzorci eksperimenta z blatom iz ČN (B) po koncu eksperimenta, z rdečo pa blata iz ČN in inokuluma iz ČN pred zagonom eksperimenta.

Graph 26: Soluble COD concentrations before the start and at the end of experiment 9, using inocula from BGP Šijanec and WWTP Šaleška valley amended with triticale and WW sludge and pretreated with Novozymes and Micropan Biogas, where samples at the end of experiment with triticale are coloured yellow and have blue column and are marked with (T), samples of triticale and inoculum from BGP Šijanec before the start of experiment are marked yellow and have green columns. Samples marked with blue colour and blue columns are from experiment with wastewater sludge at the end of experiment (B), samples of wastewater sludge and inoculum from wastewater plant before the start are coloured red with wastewater sludge with (B).

Za oceno stroškov in koristi obeh bioplinskih elektrarn smo uporabili model stroškov in koristi, ki je prikazan na sliki 51. Izbrali smo podoben postopek, kot so ga uporabili Herrmann in drugi (2012b). Za izračun smo uporabili najmanjšo porast v proizvodnji metana zaradi dodajanja hidrolitskih encimov, pod katero bi bioplinarna delovala z izgubo. Porast obratovalnih stroškov zaradi nakupa, skladiščenja, ravnanja in doziranja se uravnateži s povečano tvorbo metana in prihranki, ki izhajajo iz zagotovljene odkupne cene električne energije v istem tarifnem razredu (količinsko proizvajamo enako količino električne energije, zaradi manjše zagotovljene cene odkupa glede na velikostni razred bioplinske elektrarne). Zato so prihranki povezani z zmanjšanjem količine potrebnega substrata (v primeru BPE Šijanec) in zmanjšanju porabe zunanje električne energije (BPE Šijanec in CČN Šaleške doline).

Preračune smo naredili tudi za realno modelno merilo, katerih podrobnosti zaradi poslovnih razlogov ne smemo objaviti v doktorski nalogi. Celotno pokritje stroškov, ob dodajanju hidrolitskih encimov na realnem modelnem merilu, bi dosegli pri 8 % večji produkciji metana (5 krat manjša tvorba kot smo jo opazili v šaržnih eksperimentih), kar nakazuje na velik potencial za očitno učinkovito izboljšanje pretvorbe substratov na obeh bioplinskih elektrarnah, kljub razlikam v uporabljenih substratih. Dodatni vplivi na zmanjšanje viskoznosti in posledično manjšo porabo električne energije so predstavljali dodatne prihranke, ki bi se jih splačalo raziskati na BPE Šijanec in CCN Šaleške doline (Kolbl et al., 2014).



Slika 51: Shematski prikaz postopka analize stroškov in koristi za določitev najmanjšega donosa metana, ki pokrije stroške za predobdelavo substratov s hidrolitskimi encimi na BPE Šijanec in CCN Šaleške doline (Kolbl et al., 2014).

Figure 51: Schematic outline of cost-benefit procedure used to determine the lowest increase in methane yields needed to cover the expenses of hydrolytic enzyme application in agricultural biogas plant Šijanec and MWWTP of Šaleška waley (Kolbl et al., 2014).

Ugotovitve iz eksperimenta 8

Stopnja povečanja prirastka metana v našem eksperimentu je podobna eksperimentom drugih avtorjev (Mudhoo, 2012; Carlsson et al., 2012), ki so pri šaržnih reaktorjih dosegli med 8 in 45 % povečanje tvorbe metana. V eksperimentu smo prikazali naslednje izboljšave (Kolbl et al., 2014):

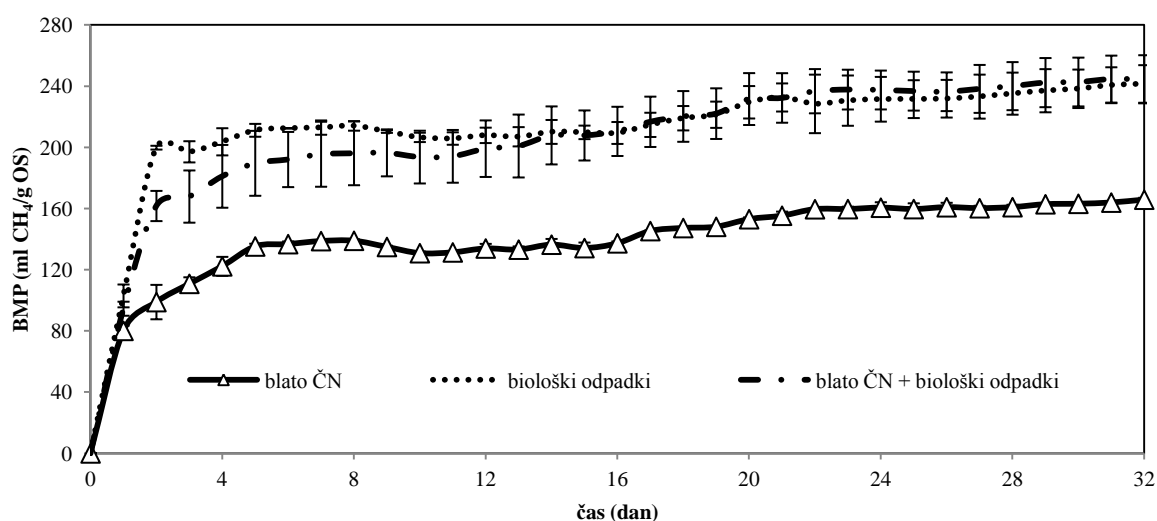
1. Z uporabo inokulumov iz realnega modelnega merila, brez modifikacij, kot so razplinjevanje, dodajanje mikroelementov, redčenje in mletje ali filtriranje, smo minimizirali vpliv izbire

inokuluma in s tem zagotovili, da je inokulum ohranil tako funkcionalno kvaliteto, kot jo ima v anaerobnem reaktorju na realnem modelnem merilu v času vzorčenja. Edina modifikacija pri takem sistemu je transport inokuluma do laboratorija in polnjenje pilotnih reaktorjev.

2. Substrati, ki smo jih testirali v našem eksperimentu, se uporabljajo na teh dveh bioplinskih napravah, zaradi česa nam ni treba uvesti dobe aklimatizacije.
3. Da bi posnemali in imeli take pogoje, kot so na realnih bioplinskih napravah, je naša organska obremenitev in velikost delcev substratov v 5 l pilotnih reaktorjih bila takšna, kot je v realnih anaerobnih reaktorjih, iz katerih smo pridobili inokulum.
4. Ker substratov in inokuluma predhodno nismo mleli, smo skrajšali čas priprave eksperimentov.
5. Z uporabo hidrolitskih encimov smo v obeh primerih občutno povečali tvorbo biometana.
6. Ocene iz analize stroškov in koristi kažejo, da že 8 % povečana tvorba metana vrne stroške predobdelave substratov s hidrolitskimi encimi.

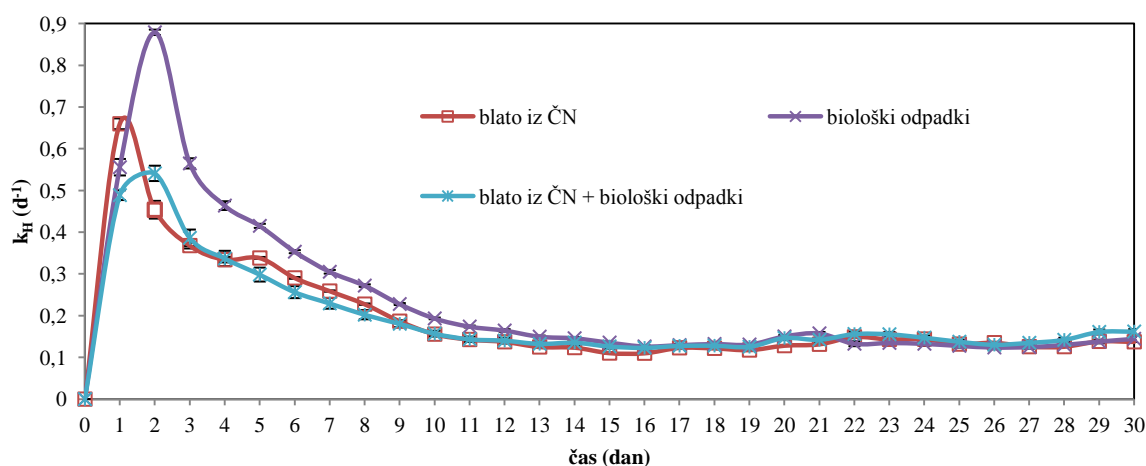
4.2.8 Rezultati in diskusija eksperimenta 9: Možnost uporabe BMP blata iz ČN in kombinacija z biološkimi odpadki za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II

Po zagonu AMPTS II je proces anaerobne presnove deloval. Anaerobna presnova je potekala 32 dni. Večina biometana se je v vseh primerih ustvarila v prvih 3 dneh, nato je nastajanje metana počasi naraščalo. Največji BMP so dosegli biološki odpadki, ta je znašal $241,5 \pm 15,7$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$, medtem ko je BMP blata iz ČN bil le $165,9 \pm 1$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Kljub 31 % manjšemu BMP blata iz ČN smo pri kombinaciji blata iz ČN in bioloških odpadkov dosegli $244,7 \pm 12,3$ ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Iz tega lahko sklepamo, da iz BMP posameznih substratov ni mogoče napovedati kakšen bo BMP kombinacij substratov in s kombiniranjem substratov z manjšim BMP lahko dosežemo povečanje BMP-ja (grafikon 27).



Grafikon 27: Tvorba metana v 32 dneh glede na organsko obremenitev blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.

Graph 27: Cumulative methane yield of biological wastes, wastewater sludge and their combination after 32 days with standard deviation.

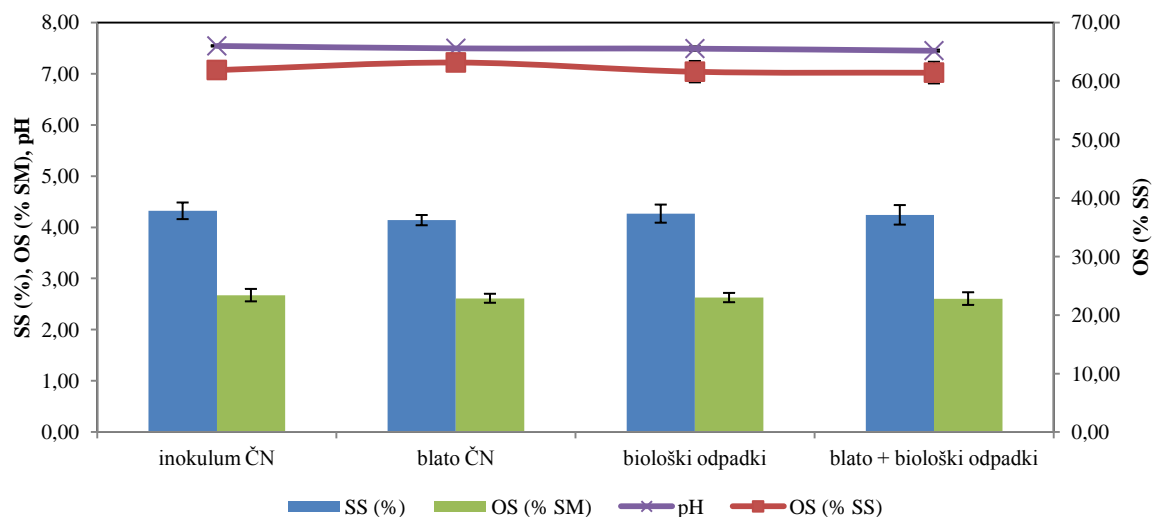


Grafikon 28: Koeficient hidrolize blata iz ČN, organskih odpadkov in njune kombinacije v eksperimentu 9 s standardno deviacijo.

Graph 28: Hydrolysis coefficient of biological wastes, wastewater sludge and their combination as a function of time in experiment 9 with standard deviation.

Največji koeficient hidrolize je pri bil blatu iz ČN dosežen že prvi dan in je znašal $0,659 \pm 0,012 \text{ d}^{-1}$. Pri ostalih substratih je bil maksimum dosežen drugi dan. Največji koeficient hidrolize so dosegli biološki odpadki ($0,879 \pm 0,020 \text{ d}^{-1}$), približno enakega pa kombinacija blata iz ČN in bioloških odpadkov ($0,541 \pm 0,012 \text{ d}^{-1}$) (grafikon 28).

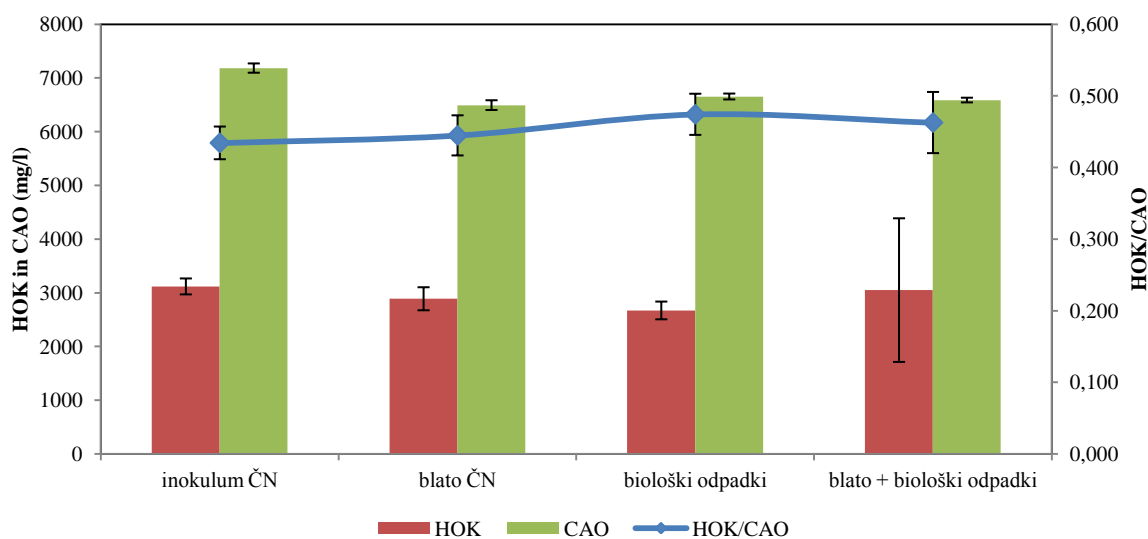
Vsebnosti suhe snovi, organske snovi in pH po 34 dnevih se med posameznimi reaktorji niso bistveno razlikovale, kar je prikazano na grafu 29. pH se je gibal v območju 7,5, vsebnost SS okrog 4,2 % , OS v suhi snovi okrog 65 % in OS v sveži masi okrog 2,8.



Grafikon 29: Suha snov (SS), organska snov (OS) in pH v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP blata iz ČN, bioloških odpadkov in njihovih kombinacij po 32 dneh s standardno deviacijo.

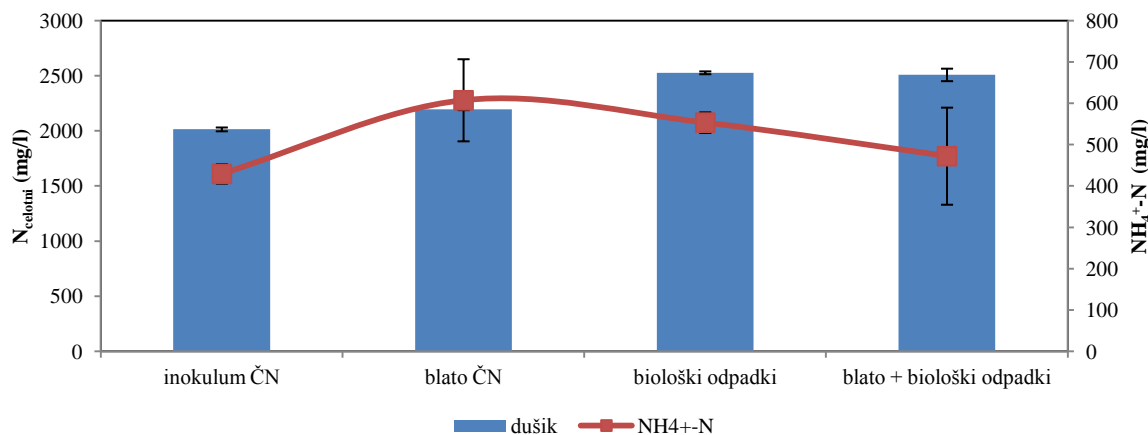
Graph 29: Total solids, volatile solids and pH in anaerobic pilot reactors amended with biological wastes, wastewater sludge and their combination after 32 days of experiment 9 with standard deviation.

Pri merjenju HOK, CAO in HOK/CAO nismo zaznali bistvenih razlik (grafikon 30). Najmanjša koncentracija hlapnih maščobnih kislin (HMK) je bila pri bioloških odpadkih. Do večje standardne deviacije je najverjetneje prišlo zaradi same narave bioloških odpadkov, ki vsebujejo različne oblike dostopne hrane in vsebujejo večje delce v primerjavi s tekočim blatom iz ČN. Slaba lastnost bioloških odpadkov je, da lahko vsebujejo tudi nezaželene anorganske snovi, kot so plastika, les, kovine. Te snovi lahko poškodujejo črpalke, zamašijo cevi, v anaerobnih reaktorjih sproščajo toksične snovi. Zato je pred doziranjem bioloških odpadkov treba le te sortirati in take tujke odstraniti. Višje razmerje med HOK/CAO v vseh primerih nakazuje, da bi na realnem modelnem merilu organsko obremenitev morali nekoliko zmanjšati, da ne bi prišlo do prenasičenosti. Posledično bi se lahko porušilo ravnovesje med mikroorganizmi, proces hidrolize bi potekal počasneje, kopičiti pa bi se pričele kisline, kar bi pomenilo padec pH, umiranje metanogenih mikroorganizmov in posledično vedno slabšo tvorbo metana ali celo zaustavitev procesa nastajanja metana.



Grafikon 30: Hlapne organske kisline (HOK), celotni anorganski ogljik (CAO) in HOK/CAO po 32 dnevih v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.

Graph 30: Volatile organic acids and total anorganic carbon concentrations after 32 days of experiment 9, using inoculum from WWTP Šaleška valey amended with WW sludge and biological waste and their combinations.



Grafikon 31: Koncentracija celotnega dušika in amonijskega dušika po 32 dneh v anaerobnih reaktorjih pri eksperimentu določevanja BMP kvasa, blata iz ČN in bioloških odpadkov s standardno deviacijo.

Graph 31: Total nitrogen and ammonium nitrogen concentrations at the end of experiment 9, using inoculum from WWTP Šaleška valley amended with WW sludge and biological waste and their combinations with standard deviation.

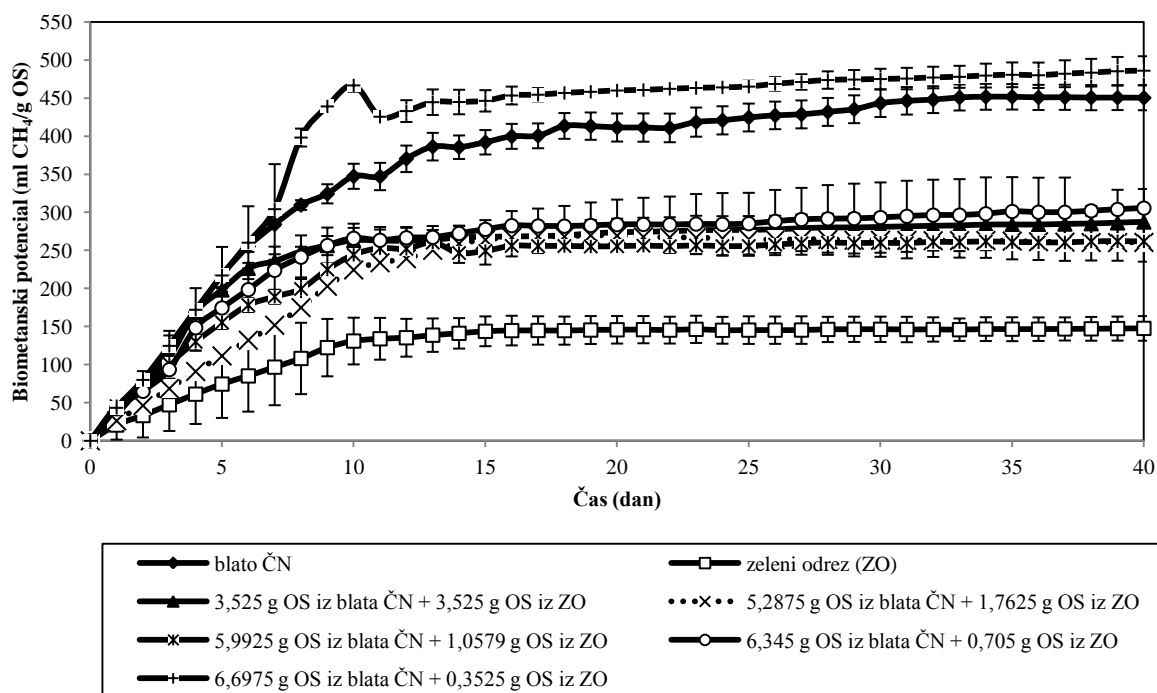
Najmanjša koncentracija dušika in amonijskega dušika po 32 dnevih je bila v biomasi (inokulumu ČN), malenkost je narasla v ostalih anaerobnih reaktorjih, kar je podano na grafikonu 31, vendar večjih bistvenih razlik med reaktorji nismo zaznali. Največjo koncentracijo amonijskega dušika smo izmerili pri blatu iz ČN (607 mg/l). Koncentracije NH₄⁺-N so bile pod 1500 mg/l, pri katerih pride do toksičnosti za anaerobne mikroorganizme in posledično ustavitve procesa anaerobne presnove (grafikon 31).

Ugotovitve iz eksperimenta 9

Kombinacija bioloških odpadkov in blata iz ČN se je izkazala kot zelo dobra. Koncentracija amonijskega dušika je po pričakovanjih ostala pod mejo toksičnosti. S predhodno anaerobno presnovo bioloških odpadkov proizvedemo bioplin, digestat pa lahko naprej uporabimo kot kompost, ob predpostavki, da ne presega zakonsko predpisanih koncentracij težkih kovin in drugih toksičnih snovi. Za bolj podrobno analizo tvorjenja biometana in vpliv sestave bioloških odpadkov na izplen metana bi bilo potrebno izvesti kontinuirani anaerobni proces na pilotni napravi. Prav tako je treba upoštevati tudi stroške transporta bioloških odpadkov na bioplinsko elektrarno.

4.2.9 Rezultati eksperimenta 10: Možnost uporabe blata iz ČČN Šaleške doline, zelenega odreza ter njunih kombinacij za pridobivanje bioplina na 5 l šaržnem AMPTS II

Rezultati tvorbe metana so prikazani na grafikonu 32. Največ metana je nastalo v reaktorjih, kjer smo imeli 95 % organske snovi blata iz ČČN in 5 % organske snovi zelenega odreza. V tem primeru je biometanski potencial znašal 487 ± 23 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Vse ostale kombinacije so imele bistveno manjši biometanski potencial, ki se je gibal med 264 ± 27 in 309 ± 43 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Najmanjši BMP 148 ± 30 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$ je pričakovano bil pri zelenem odrezu. Zeleni odrez vsebuje večji delež lignina, ki je anaerobno nerazgradljiv, zato je posledično tudi BMP manjši. Največ metana se je v vseh primerih ustvarilo prvih 8 do 10 dni, nato je dnevna tvorba metana začela upadati in se umirjati. To nastajanje metana je nekoliko bolj postopno v primerjavi z ostalimi eksperimenti, kjer se je večina metana ustvarila že v prvih petih dnevih, zato so tudi koeficienti hidrolize v vseh primerih nekoliko nižji kot so bili pri ostalih eksperimentih. Vzroke za to lahko najdemo v povečani koncentraciji amonijskega dušika in višjemu pH ter posledično povečani koncentraciji prostega amonijaka NH_3 , ki ovira delovanje metanogenih arhej in s tem zmanjša nastajanje metana.



Grafikon 32: Biometanski potencial blata iz ČČN ter zelenega odreza (ZO) in njune kombinacije v različnih razmerjih organske snovi kot funkcijo časa in podano standardno deviacijo.

Graph 32: Cumulative methane yield of wastewater sludge, green cuttings (ZO) and their combinations based on organic loading ratios as function of time and given standard deviation.

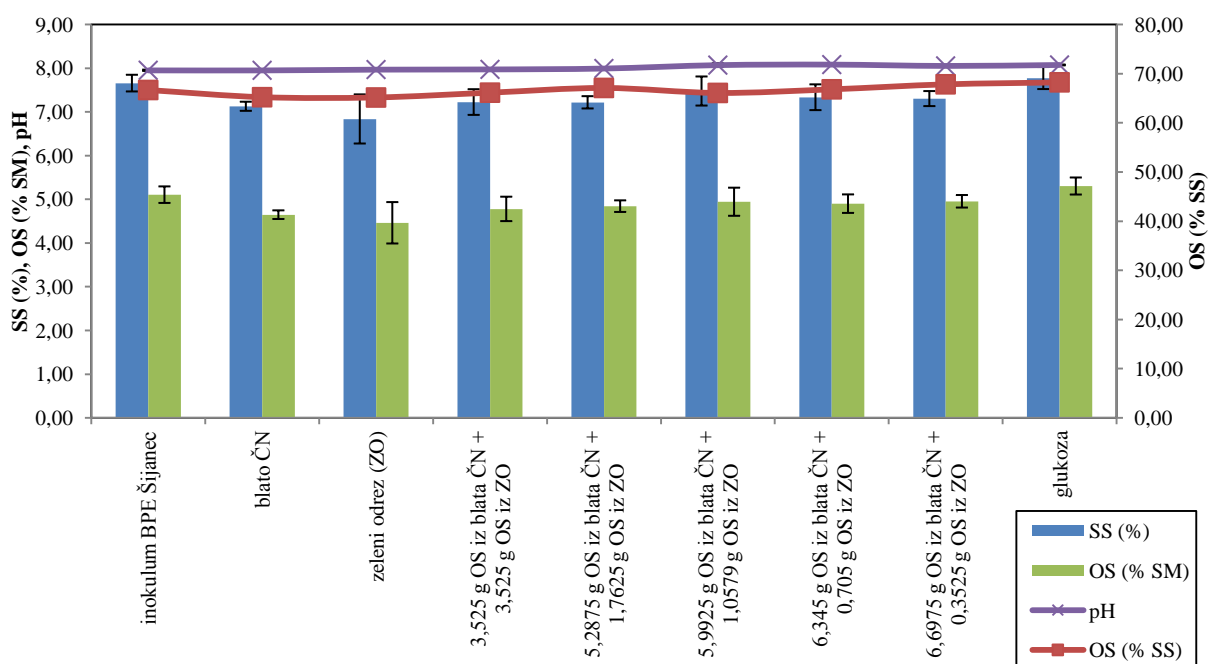
Zaradi postopne produkcije metana v vseh primerih so si podobni tudi koeficienti hidrolize. Iz koeficientov hidrolize lahko razberemo, da je bila tvorba metana največja prvi dan po zagonu eksperimenta, razen pri kombinaciji 95 % blata iz ČČN in zelenega odreza, ki je maksimum dosegla osmi dan. Drugi in tretji dan je dnevna tvorba metana v vseh primerih nekoliko upadla, nato pa spet narasla. Njihova vrednost se je gibala od $0,19713 \text{ d}^{-1}$ do $0,383712 \text{ d}^{-1}$. Po dvanajstem dnevu je tvorba metana začela počasi upadati (preglednica 37).

Vsebnosti suhe snovi, organske snovi in pH se med reaktorji niso bistveno razlikovale (grafikon 32). Najvišjo vsebnost suhih snovi po 40 dneh so imeli reaktorji z glukozo ($7,77 \pm 0,25$ %), najmanjšo pa zeleni odrez ($6,84 \pm 0,56$ %), ki je prav tako imel najmanjšo vsebnost organskih snovi ($65,13$ % oziroma $4,46$ %).

Preglednica 37: Biometanski potencial blata iz ČN in zelenega odreza (ZO) ter njune kombinacije glede na razmerje organske snovi po koncu eksperimenta s standardno deviacijo in koeficient hidrolize.

Table 37: Biomethane potential and hydrolysis coefficient of wastewater sludge, green cuttings and their combinations relating to organic loadings, at the end of experiment with standard deviation.

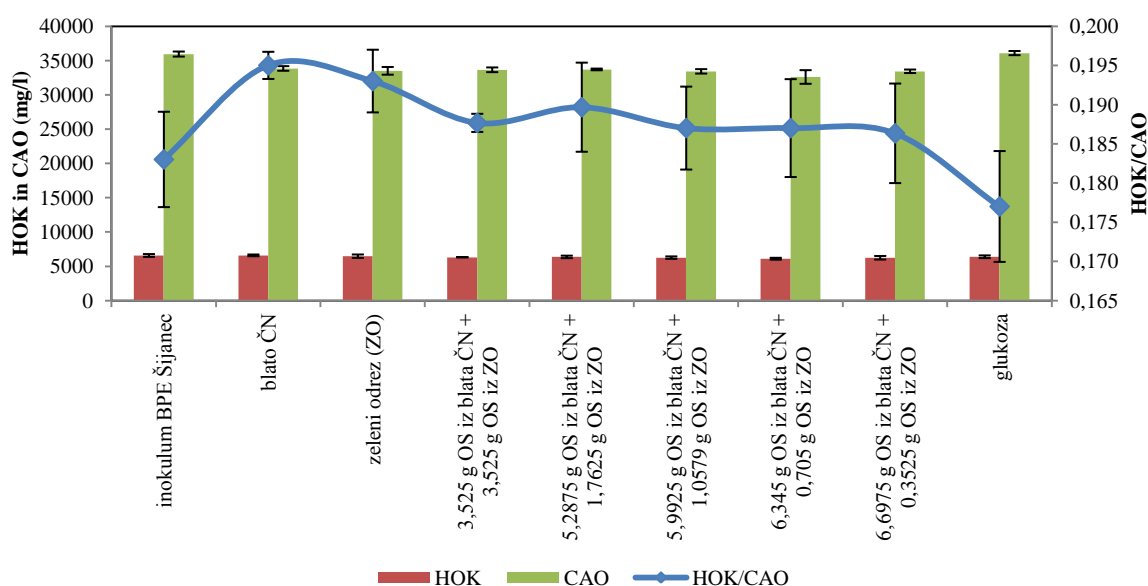
Substrat	BMP [ml CH ₄ /g OS]	k _H [d ⁻¹]
zeleni odrez (ZO)	148 ± 30	0,238377
3,525 g OS iz blata ČN + 3,525 g OS iz ZO	264 ± 27	0,329677
5,2875 g OS iz blata ČN + 1,7625 g OS iz ZO	270 ± 42	0,383712
5,9925 g OS iz blata ČN + 1,0579 g OS iz ZO	287 ± 16	0,259219
6,345 g OS iz blata ČN + 0,705 g OS iz ZO	309 ± 43	0,197131
6,6975 g OS iz blata ČN + 0,3525 g OS iz ZO	487 ± 23	0,317916
blato ČN	452 ± 17	0,213277



Grafikon 33: Vsebnost SS, OS in pH v šaržnem eksperimentu z zelenim odrezom in kombinacijami blata iz ČN in zelenega odreza glede na vsebnost organske snovi po 40 dneh. Podane so standardne deviacije meritev.

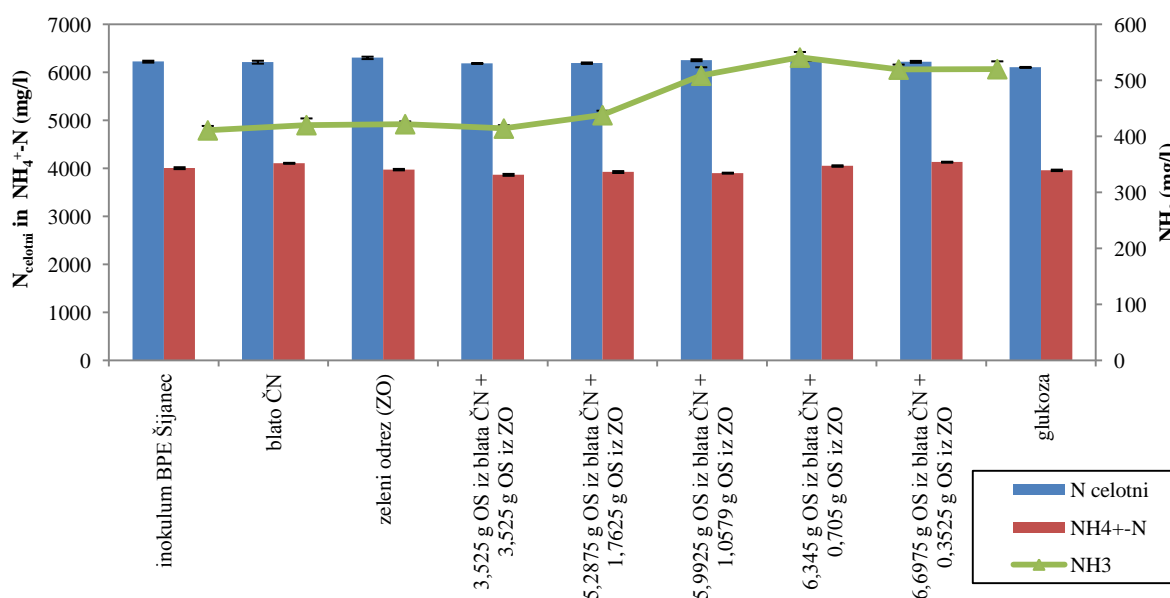
Graph 33: Total solids, volatile solids and pH of wastewater sludge, green cuttings and their combinations relating to their organic loading and glucose after 40 days with standard deviations.

Vsebnost HOK in CAO se pri vseh reaktorjih ni bistveno razlikovala. Rezultati so podani na grafikonu 34. Koncentracija HOK je bila med 6096 mg/l in 6569 mg/l, koncentracija celotnega anorganskega ogljika (CAO) med 32596 mg/l in 35937 mg/l, njuno razmerje pa med 0,177 in 0,195.



Grafikon 34: Koncentracija hlapnih organskih kislin (HOK) in celotnega anorganskega ogljika (CAO) ter razmerje med HOK/CAO s podanimi standardnimi deviacijami za eksperiment z zelenim odrezom in kombinacijami z blatom iz ČN pri različnih deležih organske obremenitve blata iz ČN in zelenega odreza, ki smo ga označili z ZO v šaržnih reaktorjih po 40 dnevih.

Graph 34: Volatile organic acids and total inorganic carbon concentrations and their ratio (HOK/CAO) of wastewater sludge, green cuttings and their combinations and glucose after 40 days in batch reactors. Green cuttings were marked with ZO.



Grafikon 35: Koncentracija celotnega dušika, amonijskega dušika in amonijaka po 40 dnevih v anaerobnih reaktorjih pri določevanju BMP v šaržnem sistemu z zelenim odrezom, blatom iz ČN, njunimi kombinacijami pri različnih deležih organske obremenitve blata iz ČN in zelenega odreza, ki smo ga označili z ZO v šaržnih reaktorjih po 40 dnevih, s standardno deviacijo.

Graph 35: Total nitrogen, ammonium nitrogen and ammonia concentrations of reactors with wastewater sludge, green cuttings and their combinations after 40 days in batch reactors. Green cuttings were marked with ZO.

Manjši BMP zelenega odreza smo pričakovali zaradi same strukture tega substrata, saj je lignin tisti, ki upočasnjuje proces anaerobne presnove. Lignin deluje kot zaščita, ki onemogoča razgradljivim delom substrata, da bi se hidrolizirali (Hendriks and Zeeman, 2009).

Ugotovitve iz eksperimenta 10

Pri uporabi zelenega odreza moramo biti pozorni na sledeče:

- starost zelenega odreza,
- delež lignina v zelenem odrezu (lignin ni anaerobno razgradljiv),
- velikostne frakcije zelenega odreza so prevelike za takojšnje doziranje v anaerobni reaktor, zato ga je treba predhodno mehansko obdelati,
- treba je upoštevati transportne stroške za košnjo in transport zelenega odreza,
- če uporabljamo zeleni odrez, ki smo ga pridobili iz obcestnih jarkov, lahko vsebuje povečane koncentracije težkih kovin,
- veje, ki jih ponavadi vsebuje, je potrebno odstraniti,
- če želimo zeleni odrez uporabljati kot kosubstrat na ČN, je treba modificirati dozirni sistem in črpalke,
- glede majhnega prirastka metana je ekonomska upravičenost uporabe zelenega odreza vprašljiva,
- količina zelenega odreza je odvisna od letnega časa in ni vedno na razpolago, zato ni letoletni vir substrata za BPE.

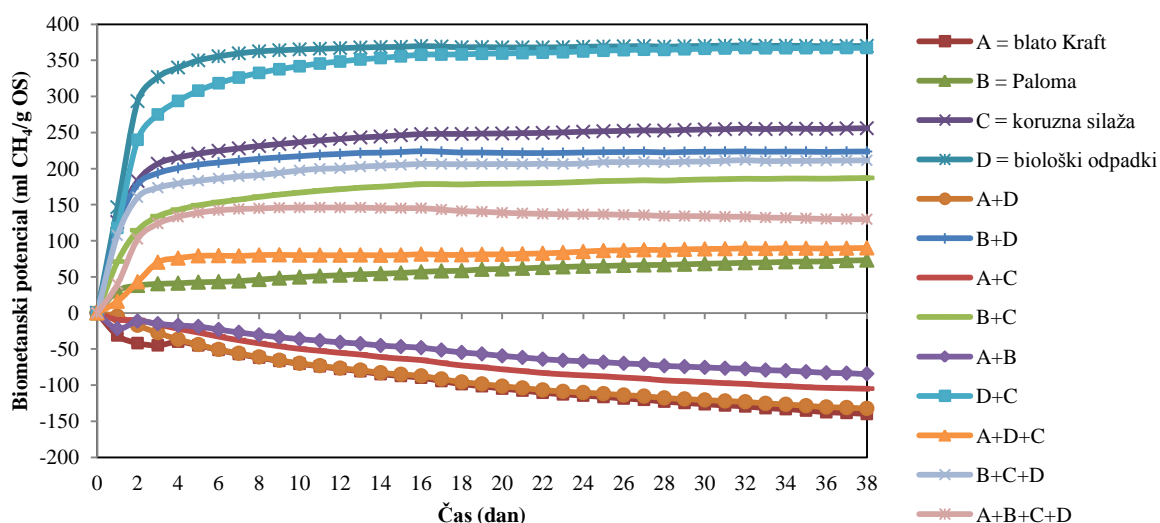
4.2.10 Rezultati in diskusija eksperimenta II: Test optimizacije anaerobne presnove s kombiniranjem dehidriranega papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata Paloma, bioloških odpadkov iz gospodinjstev in koruzne silaže s 5 l šaržnim AMPTS II

V eksperimentu so oznake substratov naslednje:

- A = dehidrirano blato iz procesa Kraft,
- B = dehidrirano blato iz Palome,
- C = koruzna silaža,
- D = biološki odpadki,
- A + B = dehidrirano blato iz procesa Kraft + dehidrirano blato iz Palome
- A + C = dehidrirano blato iz procesa Kraft + koruzna silaža
- A + D = dehidrirano blato iz procesa Kraft + biološki odpadki
- B + C = dehidrirano blato iz Palome + koruzna silaža
- B + D = dehidrirano blato iz Palome + biološki odpadki
- D + C = koruzna silaža + biološki odpadki
- A + C + D = dehidrirano blato iz procesa Kraft + koruzna silaža + biološki odpadki
- B + C + D = dehidrirano blato iz Palome + koruzna silaža + biološki odpadki
- A + B + C + D = dehidrirano blato iz procesa Kraft + dehidrirano blato iz Palome + koruzna silaža + biološki odpadki

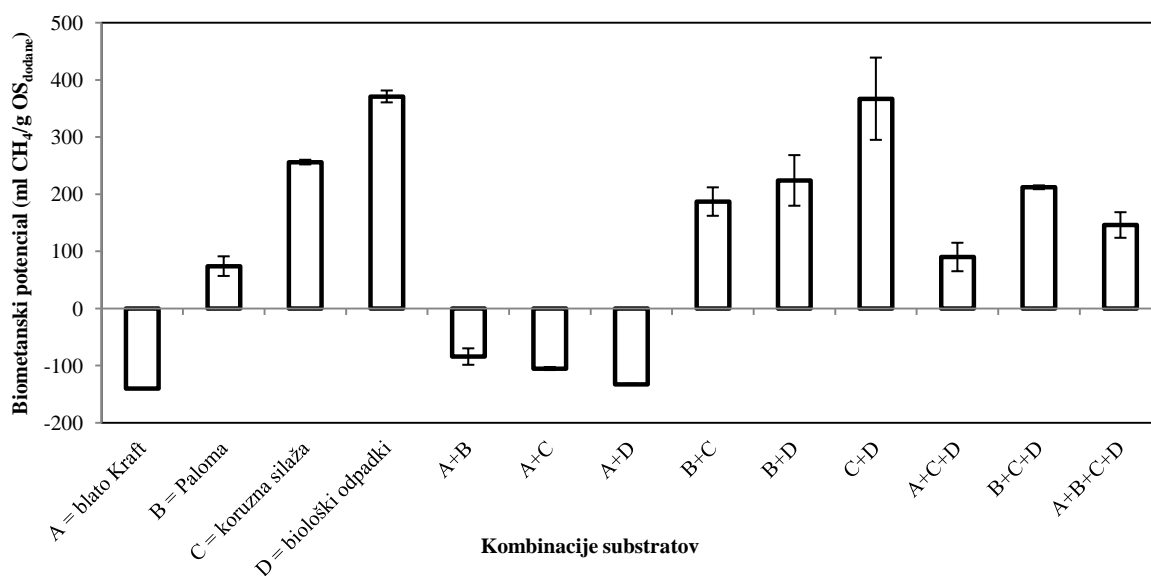
Biometanski potencial odpadnega papirniškega dehidriranega blata iz procesa Kraft (A) in dehidriranega blata iz Palome (B) (grafikon 36) je v primerjavi s klasičnimi substrati, kot sta koruzna silaža (C) in biološki odpadki (D), občutno manjši. Pri blatu iz Palome dobimo iz 1 tone substrata 3,5 krat manj metana v primerjavi s koruzno silažo, v primeru dehidriranega blata iz procesa Kraft (A) pa se proces anaerobne presnove ustavi. Količina metana, ki se je proizvedla v reaktorjih z dehidriranim blatom (A), je bila manjša od količine metana, proizvedene v kontrolnih reaktorjih brez dodajanja substrata. Pri reaktorjih, ki so vsebovali dehidrirano blato, smo izmerili tudi do štiri krat višjo koncentracijo topnega KPK kot pri ostalih, kar potrjuje, da je bil proces metanogneze inhibiran. Manjšo inhibicijo smo zaznali tudi pri ostalih reaktorjih, ki so vsebovali dehidrirano blato s kombinacijo z ostalimi substrati (preglednica 38). Z zmanjševanjem deleža dehidriranega blata (A) v reaktorjih se je tudi zmanjšala inhibicija (Kolbl et. al., 2014).

Narejene so bile tudi kombinacije omenjenih substratov, ki so podane v preglednici 38. Največji izplen metana pri kofermentaciji s Palomo, kjer je bilo razmerje med organskimi obremenitvami med substrati 1:1, je bil v primeru bioloških odpadkov in blata iz Palome, vendar še vedno občutno manjši kot pri fermentaciji bioloških odpadkov in nekoliko manjši od fermentacije koruzne silaže, če primerjamo BMP glede na količino vhodnega substrata. Največji $BMP = 367 \pm 72 \text{ ml CH}_4/\text{g OS}$ smo izmerili pri kombinaciji koruzne silaže in organskih odpadkov. Med posameznimi substrati je bil po pričakovanjih največji izplen BMP dosežen pri bioloških odpadkih, kjer se je večina metana proizvedla že v prvih šestih dneh. Substrati Paloma, biološki odpadki ter koruzna silaža inokulumu niso predstavljali nobenih bistvenih problemov glede njihove razgradnje v metan. Tako je na primer pri blatu Paloma v obdobju 15 dni, med 20 in 35 dnevom nastalo še dodatnih 32 % metana, kar nakazuje na primernost inokuluma kljub temu, da ga nismo prej inkubirali nekaj dni pri temperaturi 38 °C in na njegovo sposobnost, da lahko razgradi nov lignocelulozni substrat pri organski obremenitvi 10 g OS/l. Na splošno velja, da sekundarnemu dehidriranemu blatu iz papirniške industrije primanjkuje hranilnih snovi, kot to navajajo različni avtorji (Bayr in Rintala, 2012; Hagelqvist, 2013; Karlsson et al., 2011), vendar v našem primeru blata iz Palome tega nismo opazili (Kolbl et al., 2014).



Grafikon 36: Akumulirana tvorba metana kot funkcija časa za različne kombinacije papirniškega odpadnega blata iz dveh papirnic (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) v eksperimentu kofermentacije. Metan, ki se je proizvedel pri izhodiščnem vzorcu (samo inokulum), smo odšteli, zato dobimo negativne vrednosti v reaktorjih z inhibicijo (Kolbl et al., 2014).

Graph 36: Acumulated methane produced as function of time from various combinations of dehydrated wastewater sludge from Kraft process (marked as A), dehydrated wastewater sludge from Paloma (marked as B), maize silage (marked as C) and OFMSW (marked as D) in codigestion process. The background methane produced from control (inoculum) was subtracted generating negative values in inhibited reactors (Kolbl et al., 2014).



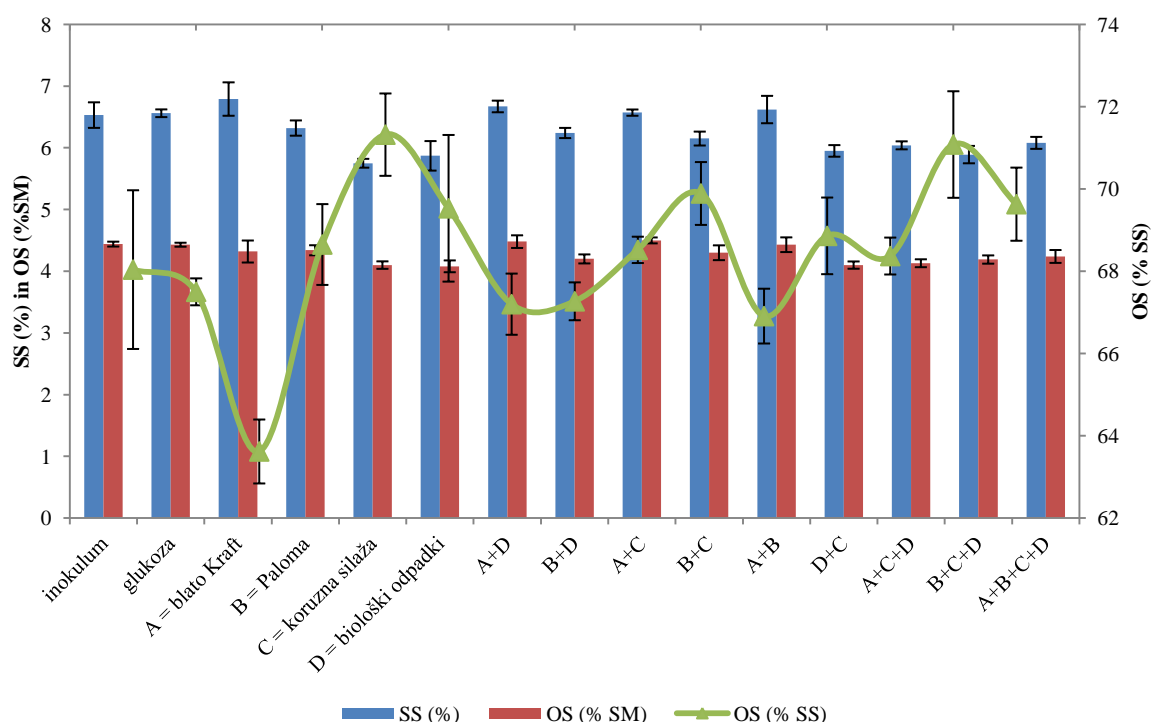
Grafikon 37: Kombinacije specifičnih metanskih potencialov s standardno deviacijo za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij (Kolbl et al., 2014).

Graph 37: Biomethane potentials in codigestion experiment of paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), OFMSW (D) and their various combinations (Kolbl et al., 2014).

Preglednica 38: Biometanski potencial substratov, koncentracije topnega KPK in koeficienti hidrolize substratov iz papirniške industrije v kombinaciji s koruzno silažo in biološkimi odpadki s standardno deviacijo v reaktorjih na koncu eksperimentov (Kolbl et al., 2014).

Table 38: Biomethane potential, soluble COD concentration and hydrolysis coefficient of substrates from paper mill industry with combination of silo maize and organic fraction of municipal solid wastes (OFMSW) with standard deviation (Kolbl et al., 2014).

Substrat	BMP [ml CH ₄ /g OS]	Topen KPK [g/l]	k _H [d ⁻¹]
A = dehidrirano blato iz procesa Kraft	-140,4 ± 0,6	92,97	-
B = dehidrirano blato iz Palome	74 ± 17,2	14,32	0,540585
C = koruzna silaža,	256,1 ± 4,1	22,88	0,676756
D = biološki odpadki	371 ± 10,4	30,02	0,78483
A+B	-84,3 ± 14,4	61,80	-
A+C	-105,2 ± 2,7	69,28	0,156503
A+D	-132,7 ± 0,9	64,42	-
B+C	187 ± 24,9	32,84	0,478363
B+D	224 ± 44,3	25,23	0,79227
C+D	367 ± 72	26,20	0,52944
A+C+D	90 ± 24,9	57,84	0,501811
B+C+D	212 ± 3,3	31,06	0,708125
A+B+C+D	146 ± 22,4	35,09	0,663812

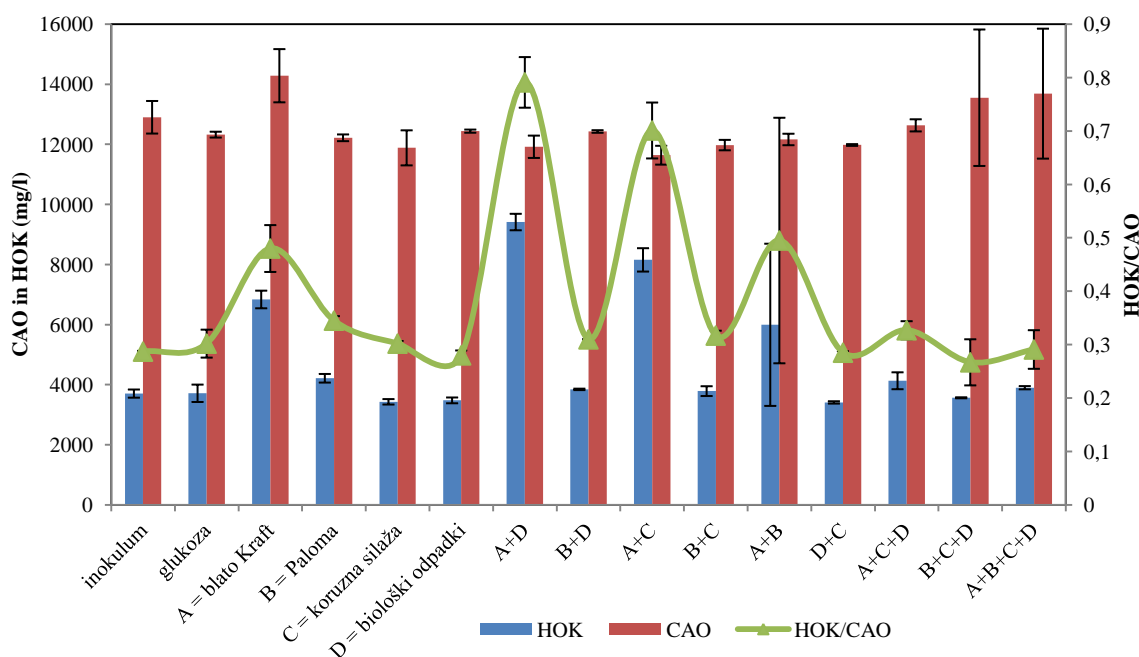


Grafikon 38: Vsebnost SS in OS v reaktorjih za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij na koncu eksperimenta 11 s podanimi standardnimi deviacijami.

Graph 38: Total solids and volatile solids of anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.

Med določanjem suhe snovi, organske snovi in merjenjem količine nastalega metana je bilo v primeru dehidriranega papirniškega blata Kraft (A) zaznati izrazitejši vonj po žveplu (H_2S) in gnilih jajcih. Žveplo lahko v preseženih mejnih koncentracijah zavre proces anaerobne presnove in poškoduje plinski motor.

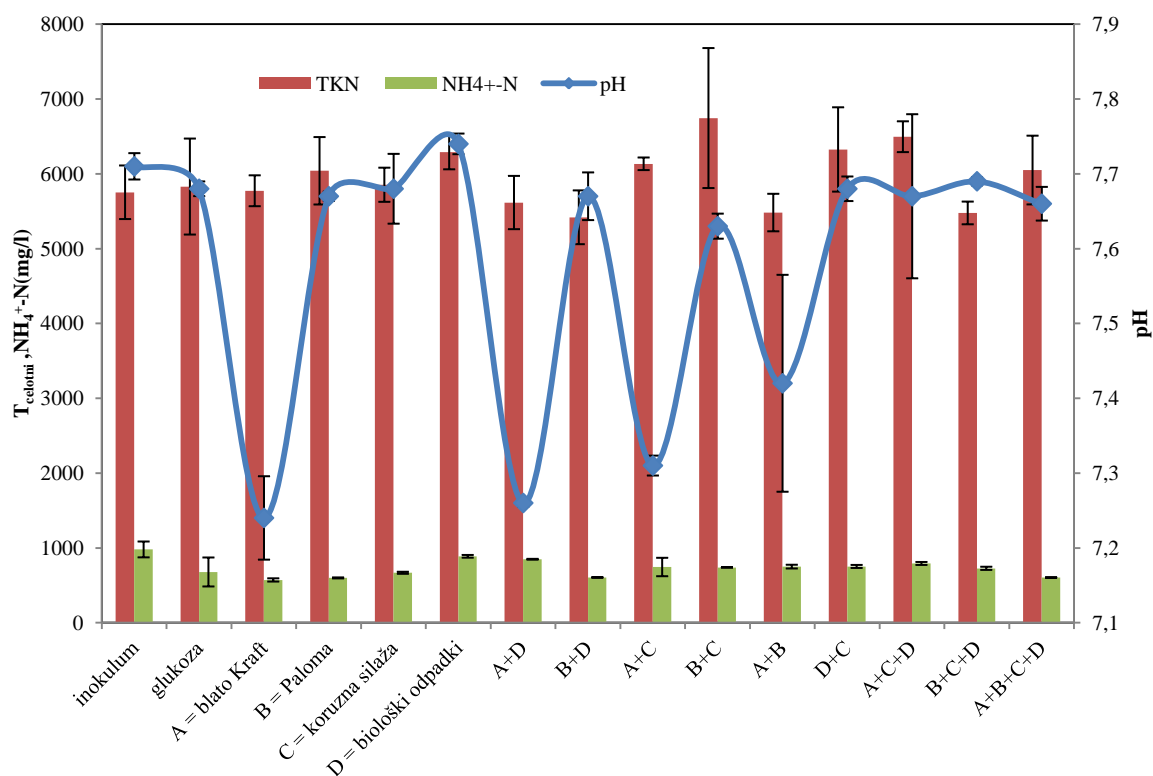
Pri kombinacijah s papirniškim blatom iz procesa Kraft smo opazili tudi višjo koncentracijo hlapnih organskih kislin v primerjavi s kombinacijami brez papirniškega blata Kraft. Koncentracija HOK je v primerih A+D in A+C dosegla 9415 in 8156 mg/l, takrat smo zaznali tudi močno inhibicijo, z zmanjševanjem deleža blata pa se je koncentracija HOK zmanjšala na podobno koncentracijo, kot so jo imele kombinacije ostalih substratov (grafikon 39).



Grafikon 39: Hlapne organske kisline (HOK) in celotni anorganski ogljik (CAO) v reaktorjih na koncu eksperimenta 11 za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij.

Graph 39: Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TAC) in anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.

Z zmanjševanjem deleža papirniškega blata (A) je pH v reaktorjih iz 7,24 narasel na 7,66, ki je v izven inhibitornega območja za anaerobne arheje. Koncentracija amonijskega dušika je v vseh primerih bila zunaj inhibitornega območja (grafikon 40).



Grafikon 40: Koncentracija celotnega dušika, amonijskega dušika $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in pH v reaktorjih na koncu eksperimenta 11 za dve vrsti papirniškega odpadnega blata (oznaka A in B), koruzne silaže (označeno s C) in bioloških odpadkov (označeno z D) in njihovih različnih kombinacij.

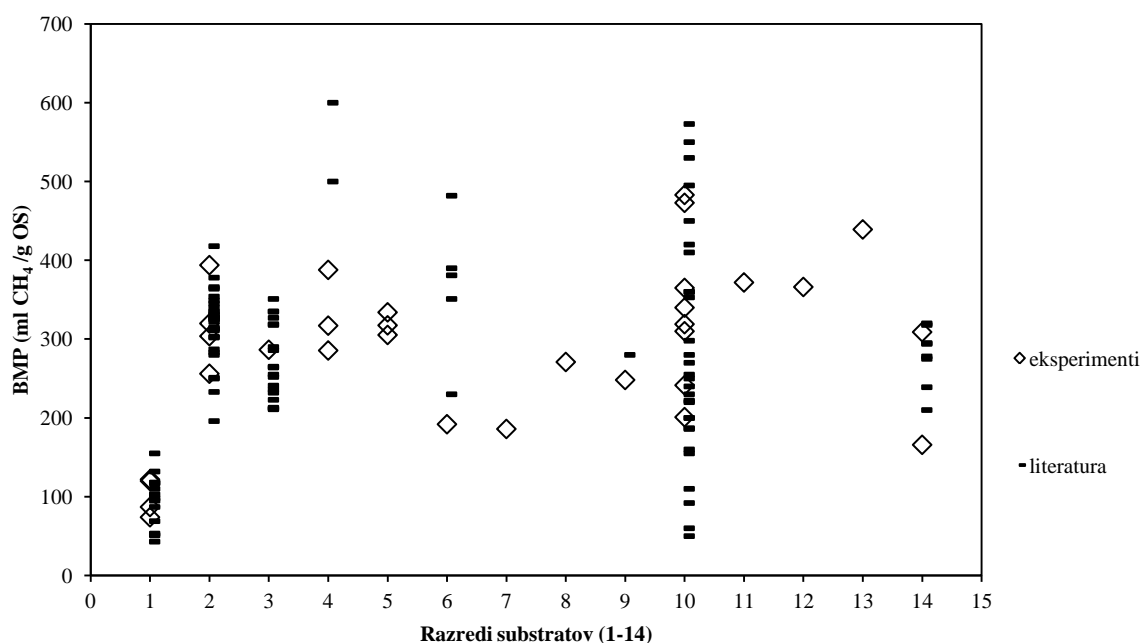
Graph 40: Total nitrogen, ammonia nitrogen and pH in anaerobic reactors containing paper pulp sludges (A and B), silo maize (C), organic fraction of municipal solid wastes - OFMSW (D) and their combinations at the end of experiment 11 with standard deviations.

Ugotovitve iz eksperimenta 11

- Kombinacija različnih substratov je lahko na eni strani rešitev za povečanje prirastka biometana in na drugi strani možnost za zmanjšanje odvisnosti od uporabe energetskih rastlin za pridobivanje bioplina in uporabe samo enega substrata.
- Koruzna silaža in ostale energetske rastline po našem mnenju nimajo dolgoročne perspektive za pridobivanje bioplina zaradi tekmovanja s hrano in etičnih meril uporabe.
- Kofermentacija lahko predstavlja učinkovit postopen način, kako opustiti energetske rastline in za pridobivanje bioplina uporabiti sicer energetsko manj učinkovite biološko razgradljive substrate, ki v okolici predstavljajo ostanke iz različnih industrij in kmetijstva.
- Pred uporabo določenega substrata in kombinacij substratov je smiselno njihov medsebojni odziv, kar se tiče produkcije metana in potencialno toksičnih snovi, eksperimentalno preveriti ter določiti njihov optimum, glede na količino substrata, ki nam bo na razpolago.
- Največji biometanski potencial smo v našem eksperimentu dosegli z biološkimi odpadki ter s kombinacijo bioloških odpadkov in koruzne silaže.

4.2.11 Primerjava izmerjenih BMP z rezultati iz literature

Biometanski potenciali substratov iz naših eksperimentov so bili primerljivi z BMP substratov iz literature (Grafikon 41). Velika nihanja v produkciji metana pri substratih istega razreda, ki smo jih zaznali v naših eksperimentih (na primer pri bioloških odpadkih), so se pojavila tudi pri meritvah drugih avtorjev, kjer so bile uporabljene tudi različne metode pri sestavljanju reaktorjev. Vendar se variabilnost izmerjenih metanskih donosov med šaržami za organske odpadke ni bistveno razlikovala od raztrosa metanskih donosov bioloških odpadkov, ki jih najdemo v literaturi, kot so to podali Raposo in drugi (2011). Razpršenost objavljenih podatkov lahko pripišemo različnim pristopom k pripravi AMPTS, predobdelavam, dodatkom, modelnemu merilu in stradanju, ki se med posameznimi študijami razlikujejo in predstavljajo vir variabilnosti ocene metanskega donosa. Nasprotno pa naše analize različnih šarž istega substratnega razreda na 5 l nemodificirane pilotnem modelnem merilu kažejo, da so razlike znotraj istega substratnega razreda dejansko lahko zelo velike, tudi do $\pm 80\%$ (npr. substratni razred št. 10 na grafikonu 41) (Kolbl et al., 2014). Tabela zbranih metanskih potencialov, ki smo jih zbrali iz literature, je podana v Prilogi D.



Grafikon 41: Primerjava variabilnosti BMP znotraj razredov substratov: Meritve iz literature v primerjavi z meritvami iz naših eksperimentov na nadgrajenem 5 l modelnem merilu AMPTS II ter različne šarže substratov znotraj istega razreda substratov. V grafikonu številke pomenijo naslednje substrate: 1 – sekundarno papirniško blato, 2 – koruzna silaža, 3 – tritikala, 4 – pšenični otrobi, 5 – koruzna polenta, 6 – klavnični ostanki, 7 – lizin, 8 – micelij, 9 – pivovarniški kvas, 10 – biološki odpadki, 11 – krmna repa, 12 – muškatna buča, 13 – gnila muškatna buča, 14 – blato iz KČN (Kolbl et al. 2014).

Graph 41: High variability in methane yields within substrate classes observed in published literature in comparison to methane yields obtained using novel 5 l AMPTS II equipment and different batches of substrates from the same substrate classes. The Graph numbers indicate the following substrates: 1 - secondary sludge of paper mill, 2 - silo maize, 3 - triticale, 4 - wheat bran, 5 - corn meal, 6 - slaughter house wastes, 7 - lysine, 8 - mycelium, 9 - brewing yeast, 10 - OFMSW, 11 - forage turnips, 12 - muscat pumpkin, 13 - Muscovy rotten pumpkin, 14 - sludge from municipal wastewater treatment plant (Kolbl et al., 2014).

Ugotovitve primerjav izmerjenih BMP z rezultati iz literature

Razlike v metanskih donosih pri uporabi 5 l AMPTS II in enaki pripravi eksperimentov ter analiz smo zaznali samo pri substratih istega razreda. Zaradi takih razlik med substrati istega razreda, različnimi pripravami, velikostnimi modelnimi merili eksperimentov, različnimi viri inokulumov in posledično različnimi lastnostmi vhodnih komponent, je za bolj objektivne odločitve na realnem modelnem merilu treba izvesti eksperimente, ki vsebujejo realni inokulum in substrate, da se izmerjeni BMP čim bolj približajo tistim na realnem modelnem merilu. Z BMP določimo, kakšen bi potencialno lahko bil biometanski izplen nekega substrata, vendar dolgoročno ne moremo predvideti obnašanja procesa, kot če bi določeno vrsto substrata v anaerobni reaktor dozirali dnevno. Zato so potrebne raziskave na semi-kontinuiranem pilotnem modelnem merilu, ki jih podajamo v naslednjem poglavju.

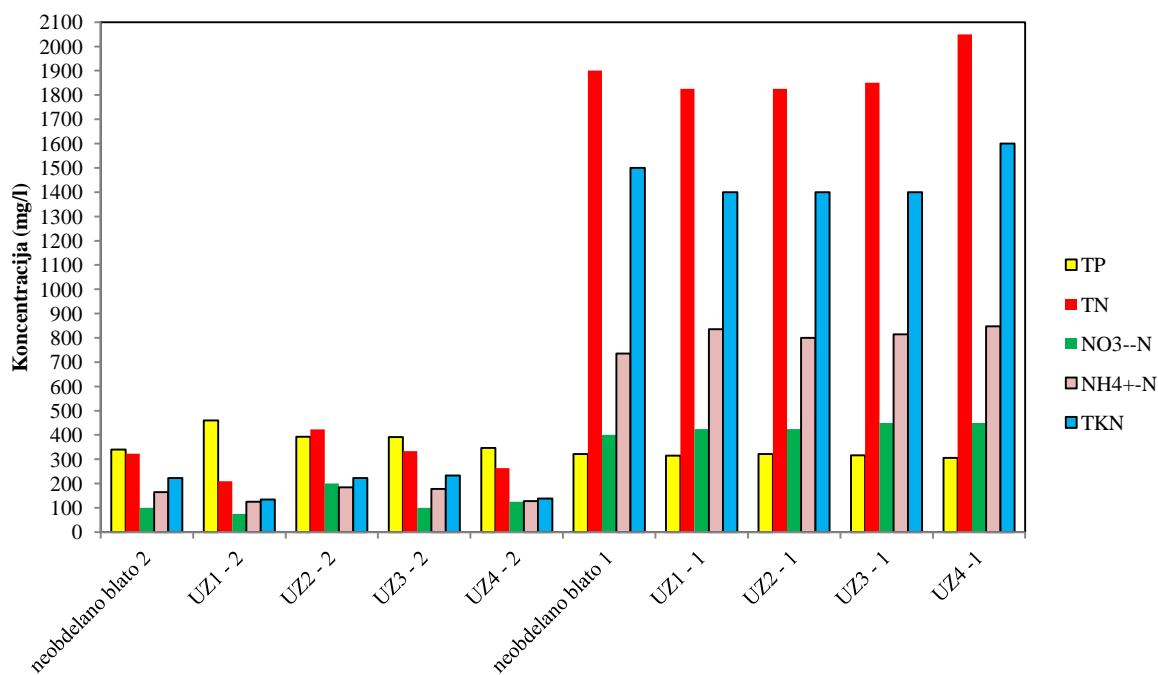
4.3 Rezultati semi-kontinuiranih eksperimentov na nadgrajenem 5 l AMPTS II

4.3.1 Rezultati in diskusija eksperimenta 12: Možnost uporabe ultrazvoka in hidrolitskih encimov za pridobivanje biometana iz blata CCN Šaleške doline na 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II

V prvem delu podajamo rezultate sprememb lastnosti blata 1 in blata 2 iz CCN Šaleške doline zaradi predobdelave z ultrazvokom.

4.3.1.1 Vpliv ultrazvoka na spremembo dušika in fosforja v blatu ČN

Ultrazvočno obdelanemu blatu 2 (kot substratu) se je koncentracija celotnega fosforja v primerjavi z neobdelanim blatom (340 mg/l) v vseh primerih povečala. Koncentracija fosforja je najbolj narasla pri specifični energiji 18394 kJ kg⁻¹ SS (to je pri UZ1-2) in sicer na 460 mg/l. Pri UZ2-2 in UZ2-3 je koncentracija celotnega fosforja padla na 393 in 392 mg/l, pri najdaljšem času predobdelave z ultrazvokom pa je znašala 346 mg/l. Vrednost celotnega dušika pri neobdelanem in ultrazvočno obdelanem blatu 2 se je gibala med 210 in 423 mg/l. Največ nitratnega dušika 200 mg/l pri blatu 2, je bilo pri 15 minutni predobdelavi z ultrazvokom, najmanj pa pri 10 minutni predobdelavi. Vsebnost dušika po Kjeldahlu se je pri vzorcih z blatom 2 gibala med 135 in 233 mg/l. Rezultati meritev so prikazani na grafikonu 42.

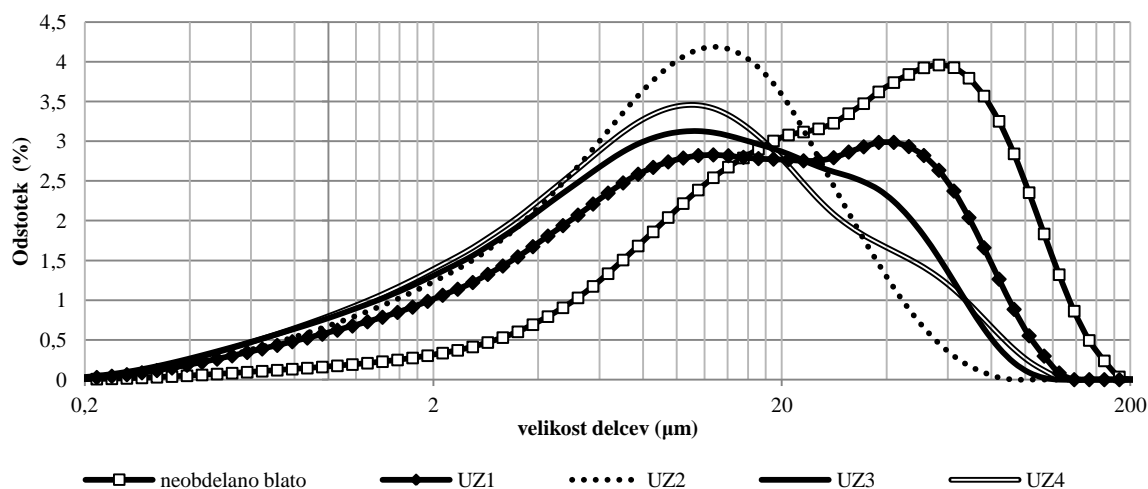


Grafikon 42: Koncentracije celotnega fosforja (TP), celotnega dušika (TN), nitratnega (NO₃⁻N), amonijskega dušika (NH₄⁺-N) in dušika po Kjeldahlu (TKN) vhodnega blata 1 in blata 2 iz ČN pred in po obdelavi z ultrazvokom pred doziranjem v anaerobni reaktor.

Graph 42: Concentrations of total phosphorus (TP), total nitrogen (TN), nitrate (NO₃⁻N), ammonium nitrogen (NH₄⁺-N) and Kjeldahl nitrogen (TKN) of wastewater sludge 1 and 2 before and after ultrasound pretreatment and before dosing to anaerobic digesters.

Pri predobdelavi z ultrazvokom smo izmerili tudi velikost delcev. Z ultrazvokom so se delci zmanjšali, v manjši meri pa so se sprostile tudi znotrajcelične snovi, ki so botrovale k povečanju topnega KPK (grafikona 45 in 46). Večje zmanjšanje delcev smo dosegli pri višjih dovedenih specifičnih energijah ultrazvoka oziroma pri daljšem času predobdelave z ultrazvokom. V preglednici 39 in 40 so prikazane spremembe v velikosti delcev pri različnih specifičnih energijah. Oznake d10, d50 in d90 pomenijo, da ima 10 %, 50 % in 90 % delcev (glede na volumen) manjši ali enak premer kot je pri d10, d50 in d90.

Pri blatu 1 smo največje zmanjšanje velikosti delcev dosegli pri specifični energiji $5002 \text{ kJ kg}^{-1} \text{ SS}$. Povprečna velikost delca se je v tem primeru zmanjšala za 67,4 %. Pri podaljševanju časa predobdelave z ultrazvokom se je povprečna velikost delcev nekoliko povečala, kar nakazuje, da je prišlo do blagega ponovnega zlepljenja delcev in je 15 minutna predobdelava z ultrazvokom predstavljala mejno velikost, do katere so se delci v blatu 1 lahko zmanjšali. Show in drugi (2007) navajajo, da so vezne sile v mikro kosmih (celicah) mnogo bolj močne kot tiste v makro kosmih, ki so sestavljene iz rahlih združenih vezi. Najverjetneje je površina makro kosmov, ki je izpostavljena ultrazvoku, večja in zato pride do večjega obsega raztrganja in zmanjšanja delcev. Tudi pri predobdelavi blata 2 z ultrazvokom je bila že 10 minutna predobdelava zadostna za zmanjšanje delcev. Velikost delcev neobdelanega blata 1 in 2 v našem primeru je bila za 65 % manjša od velikosti delcev blata v eksperimentih Erdena in Fillibeija (2010), prav tako velikost delcev obdelanih z ultrazvokom.



Grafikon 43: Porazdelitev velikosti delcev pri prvem sklopu blata 1 z vsebnostjo suhe snovi 3,5 % in različnih časih obdelave z ultrazvokom.

Graph 43: Particle size distribution of wastewater sludge 1 that contained 3,5 % TS as a function of ultrasound pretreatment time.

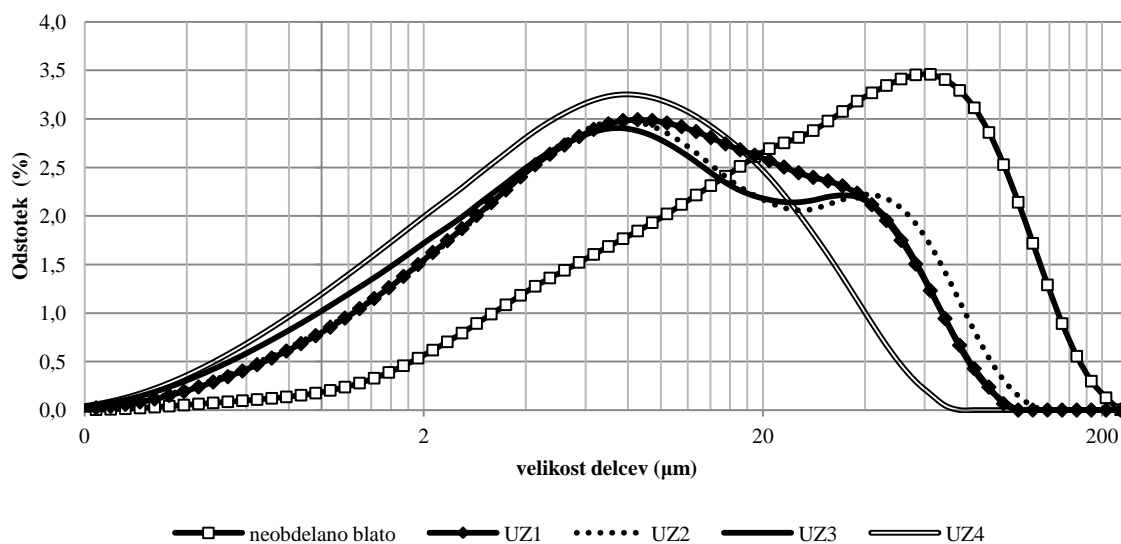
Pri blatu 2 smo z ultrazvokom velikost delcev glede na srednjo velikost delca (mean particle size based on volume weight) zmanjšali za 75 %. Pri blatu 1 smo opazili nakazovanje na ponovno zlepljanje delcev pri predobdelavi daljši od 10 minut (UZ3-1; preglednica 39). Pri ultrazvočni obdelavi blata 2 smo pri porazdelitvi velikosti delcev UZ2-2 in UZ3-2 opazili dva vrhova, ki sta najverjetneje nastala zaradi učinkovitejšega zmanjševanja manjših delcev kot večjih, kar navajajo tudi Pilli et al. (2011).

Preglednica 39: Sprememba velikosti delcev blata 1 s suho snovjo 3,5 % pri različnih specifičnih energijah.

Table 39: Change in particle size of wastewater sludge 1 that contained 3,5 % TS as a function of specific energy.

	Specifična energija [kJ kg ⁻¹ SS]	d10 [μm]	d50 [μm]	d90 [μm]	D(4,3) [μm] – povprečje	velikost z najvišjo frekvenco [μm]
Blato 1	0	5,7	28,5	83,9	37,7	54,02
UZ1 - 1	3335	2	13,4	54,7	21,8	37,79
UZ2 – 1	5002	1,8	9,3	27,1	12,3	12,12
UZ3 – 1	6669	1,5	9,7	40	15,8	10,65
UZ4 – 1	8337	1,5	8,9	38	15	10,65

Pri blatu 2 ni prišlo do ponovnega zlepljenja delcev. Povprečna velikost delcev se je zmanjšala za 75,1 %, in sicer iz 38,5 μm na 9,6 μm, kar je prikazano v preglednici 40. Porazdelitev velikosti delcev je prikazana v grafikonu 44.



Grafikon 44: Porazdelitev velikosti delcev pri drugem sklopu blata 2 z vsebnostjo suhe snovi 1,1 % in različnih časih obdelave z ultrazvokom.

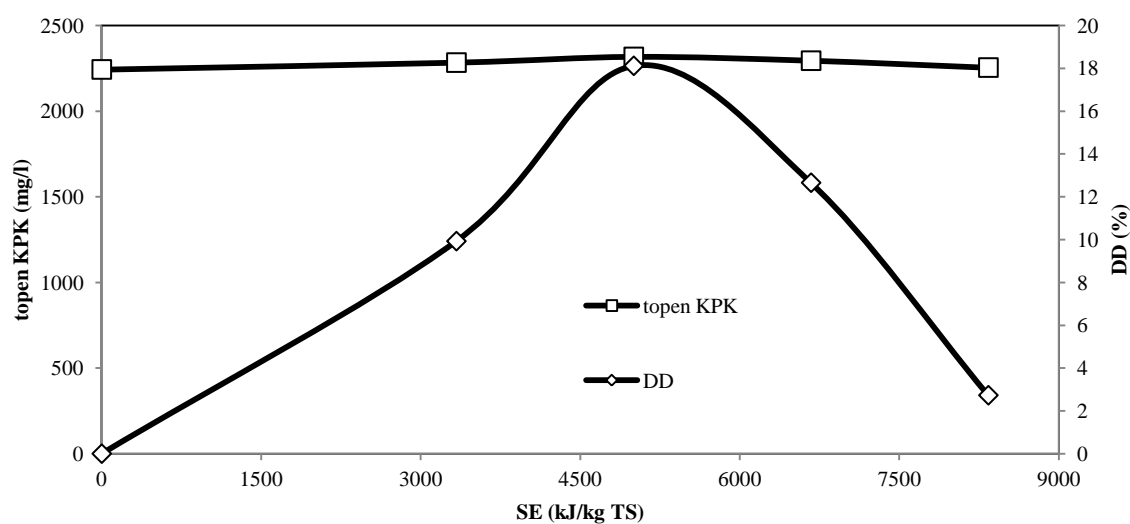
Graph 44: Particle size distribution of wastewater sludge 2 that contained 1,1 % TS as a function of ultrasound pretreatment time.

S predobdelavo blata z ultrazvokom smo vplivali tudi na razgradnjo blata (DD). Na grafikonu 45 je prikazana stopnja razgradnje blata 1, ki se je spreminjala glede na specifično energijo. Največjo stopnjo razgradnje blata 1, ki je znašala 18,11 %, smo dosegli pri specifični energiji 5002 kJ kg⁻¹ SS. Z večanjem specifične energije je stopnja razgradnje začela upadati. Podoben, a obraten vpliv smo zaznali tudi pri velikosti delcev. Tam, kjer se je velikost delcev zmanjševala, je stopnja razgradnje naraščala. Maksimalno stopnjo razgradnje in najmanjšo povprečno velikost delcev smo dosegli pri enaki specifični energiji. Pri pojavu ponovnega šibkega zlepljenja delcev se je začela zmanjševati tudi stopnja razgradnje blata 1.

Preglednica 40: Sprememba velikosti delcev blata 2 s suho snovjo 1,1 % pri različnih specifičnih energijah.

Table 40: Change in particle size of wastewater sludge 2 that contained 1,1 % TS as a function of specific energy.

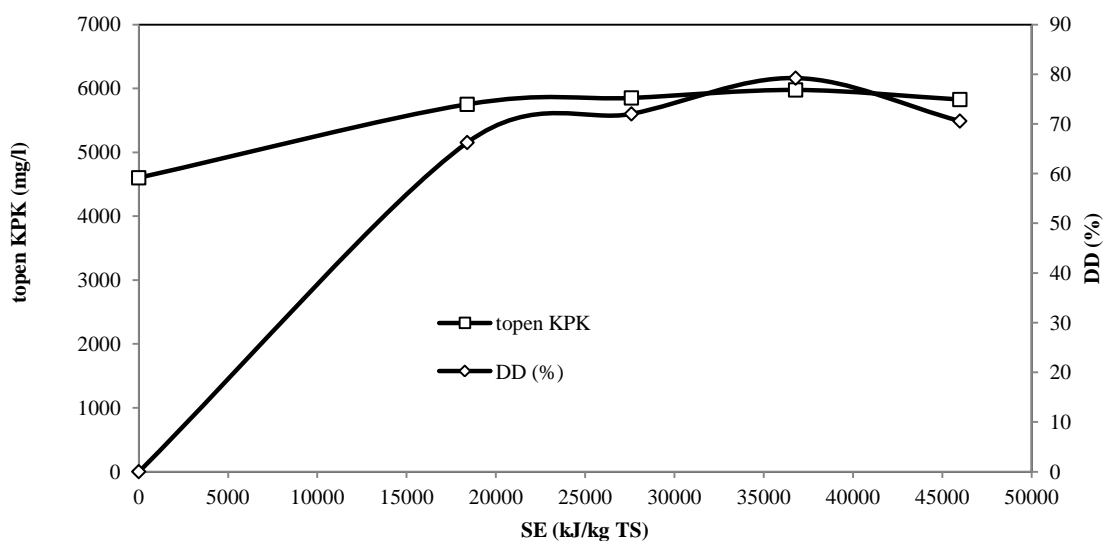
	Specifična energija [kJ kg ⁻¹ SS]	d10 [μm]	d50 [μm]	d90 [μm]	D(4,3) [μm] – povprečje	velikost z najvišjo frekvenco [μm]
Blato 2	0	3,9	26,7	91,4	38,5	57,64
UZ1 - 2	18394	1,5	8,6	39,6	15,2	8,21
UZ2 - 2	27590	1,5	8,5	46,5	16,9	7,21
UZ3 - 2	36787	1,2	7,5	39,7	14,5	7,21
UZ4 - 2	45984	1,1	6	23,6	9,6	7,45



Grafikon 45: Stopnja razgradnje (DD) blata 1 in sprememba koncentracije topnega KPK blata 1 v odvisnosti od specifične energije (SE).

Graph 45: Disintegration degree (DD) and changes in soluble COD concentration of WWS-1 as a function of specific energy (SE).

Stopnja razgradnje blata 1 je sovpadala tudi s koncentracijo topnega KPK. Pri specifični energiji 5002 kJ kg⁻¹ SS (UZ1-2) smo dosegli koncentracijo topnega KPK 2316 mg/l, kar še dodatno potrjuje, da smo v tem območju dosegli bolj intenzivno raztrganje trdnih snovi. Z večanjem specifične energije je koncentracija topnega KPK v blatu 1 začela upadati. Torej je do neke mere koncentracija topnega KPK naraščala, nato pa je začela upadati, kar je prikazano tudi v raziskavah Erdena in Fillibeli-ja (2010). Zmanjševanje stopnje razgradnje si lahko razlagamo z močnim oksidativnim vplivom radikalov, kot to omenjata že Erden in Fillibeli (2009).

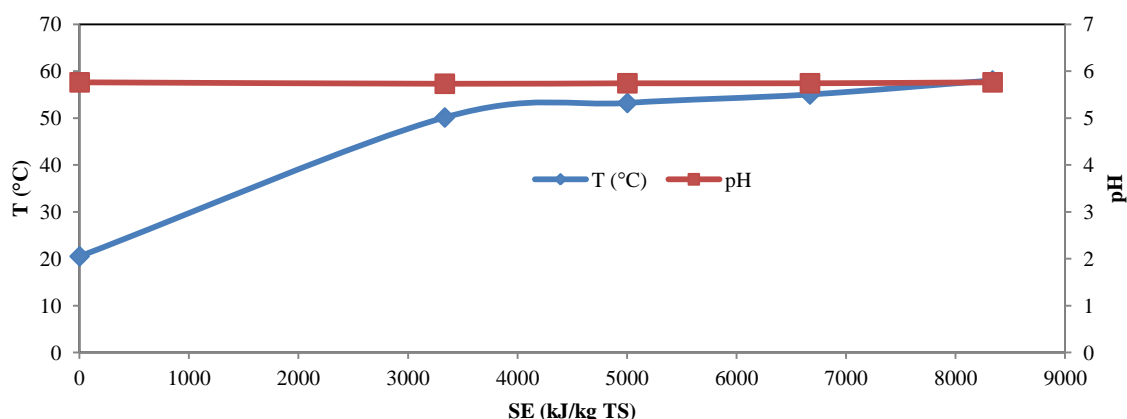


Grafikon 46: Stopnja razgradnje (DD) blata 2 in sprememba koncentracije topnega KPK blata 2 v odvisnosti od specifične energije (SE).

Graph 46: Disintegration degree (DD) and changes in soluble COD concentration of WWS-2 as a function of specific energy (SE).

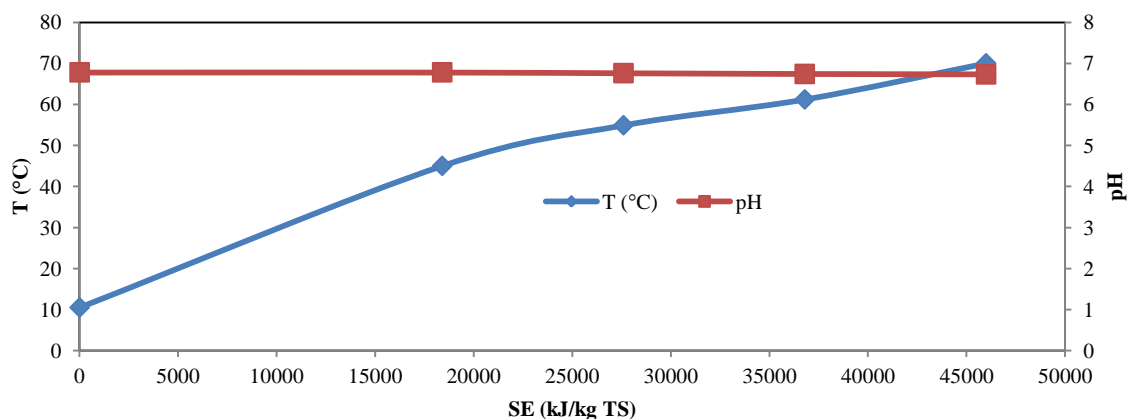
Pri predobdelavi blata z ultrazvokom, le tega nismo hladili, zato se je posledično s podaljšanjem časa obdelave začelo segrevati. Temperatura obdelanega blata je začela naraščati, v nasprotju z rezultati Erdena in Fillibelija (2010) pa se pH vrednost ni spreminjala. Pri predobdelavi blata-1 z ultrazvokom ni bilo zaznati spremembe v pH, začetni pH neobdelanega blata in končni pH z ultrazvokom obdelanega blata je znašal 5,76. Temperatura je iz 20,5 °C po 25 minutni predobdelavi z ultrazvokom narasla na 58 °C. Pri blatu 2 tudi nismo opazili nobene večje bistvene spremembe. Zaradi manjše gostote blata 2 je temperatura po dovedeni največji specifični energiji, ki je bila za 551 % višja od SE dovedene pri blatu 1, narasla na 70 °C. Zaradi narave blata se najverjetneje iz lipidov niso sprostile aminokisliline, posledično pa tudi ni prišlo do zmanjšanja pH. Pri tako nizkem pH je do te pretvorbe mogoče že prišlo brez predobdelave oziroma je bila koncentracija aminokislin v vzorcih blata že tako visoka, da nadaljnje izločanje le teh ni spremenilo pH.

Pri višjih temperaturah hitrost hidrolize naraste, kar lahko privede od povečane produkcije organskih kislin (Batstone in Jensen, 2011). Vendar tudi toplota, ki se je sprostita pri predobdelavi z ultrazvokom ni bistveno zmanjšala pH v blatu 1 in blatu 2. Wang et al., (2005) so raziskovali mehanizem razgradnje blata z ultrazvokom. Pri blatu z višjim pH in enako dolžino predobdelave z ultrazvokom so opazili, da se sprosti več topnega KPK kot pri blatu z nižjim pH. Pri kinetičnem modelu, kjer je bila odvisna spremenljivka stopnja razgradnje, so ugotovili, da ima koncentracija blata (SS) majhen vpliv na stopnjo razgradnje, velik vpliv pa imajo pH, intenziteta ultrazvoka in gostota ultrazvoka. Na podlagi tega lahko za naš eksperiment predvidevamo, da je blato 1 brez predobdelave že bilo na meji maksimalne topnosti oziroma se topnost kljub predobdelavi z ultrazvokom ni dosti povečala, zato tudi vpliv na anaerobno presnovo ni bil tako izrazit. K temu je najverjetneje pripomogel tudi nizek pH, saj povečanje izločanja topnega KPK narašča z večanjem pH, kaj so predstavili tudi Wang et al. (2005).



Grafikon 47: Spreminjanje temperature in pH blata 1 pri obdelavi z ultrazvokom v odvisnosti od specifične energije.

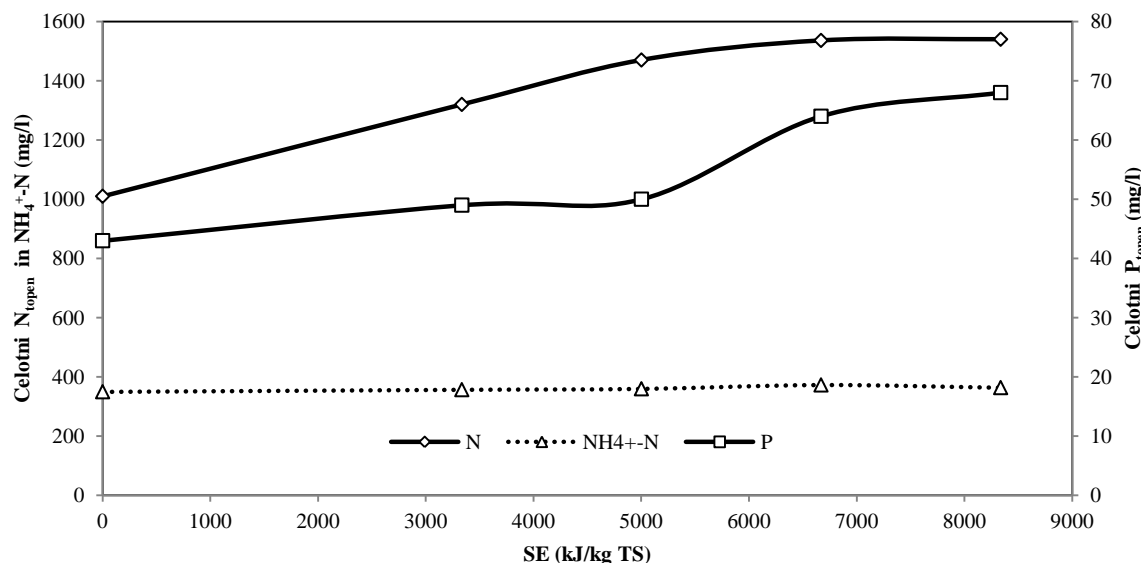
Graph 47: Temperature and pH variations of wastewater sludge 1 supernatant as a function of specific energy.



Grafikon 48: Spreminjanje temperature in pH blata 2 pri obdelavi z ultrazvokom v odvisnosti od specifične energije.

Graph 48: Temperature and pH variations of wastewater sludge 2 supernatant as a function of specific energy.

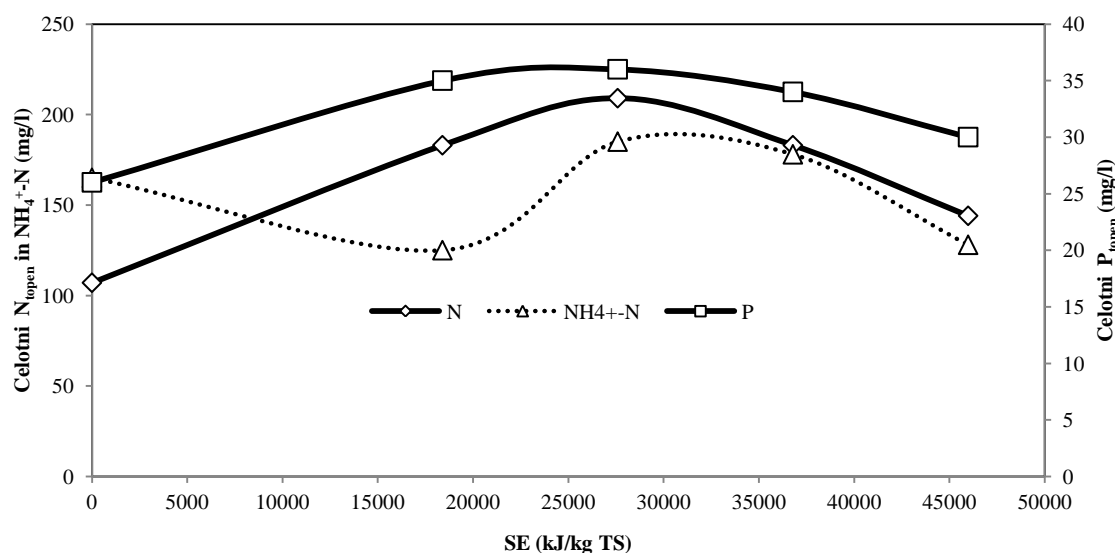
Pri blatu 1 je koncentracija dušika v supernatantu naraščala z naraščanjem specifične energije, in sicer iz 1010 mg/l na 1540 mg/l, kar je 52,5 % povečanje pri specifični energiji 8337 kJ kg⁻¹ SS in reakcijskem času 25 minut. Koncentracija fosforja v supernatantu blata 1 je do specifične energije 5002 kJ kg⁻¹ SS in reakcijskega časa 15 minut počasi naraščala iz 43 mg/l na 50 mg/l, nato je koncentracija začela strmo naraščati in pri specifični energiji 8337 kJ kg⁻¹ SS in reakcijskem času 25 minut dosegla najvišjo vrednost 68 mg/l, kar je 58,1 % povečanje koncentracije v primerjavi z neobdelanim blatom, kar je prikazano tudi na grafikonu 49.



Grafikon 49: Gibanje dušika in fosforja supernatanta blata 1 obdelanega z ultrazvokom pri različni specifični energiji.

Graph 49: Phosphorus and nitrogen concentrations of wastewater sludge 1 supernatant as a function of specific energy.

Pri blatu 2 sta koncentraciji dušika in fosforja v supernatantu naraščali do specifične energije 27590 kJ kg⁻¹ SS in reakcijskega časa 15 minut in dosegli vrednost 209 mg/l (celotni topen dušik) in 36 mg/l (celotni topen fosfor). Koncentracija dušika je narasla za 95 %, koncentracija fosforja pa za 38,5 %. Z večanjem specifične energije sta koncentracija dušika in fosforja v supernatantu začeli upadati, kar je prikazano na grafikonu 50.



Grafikon 50: Gibanje dušika in fosforja v supernatantu blata 2 pri različni specifični energiji.

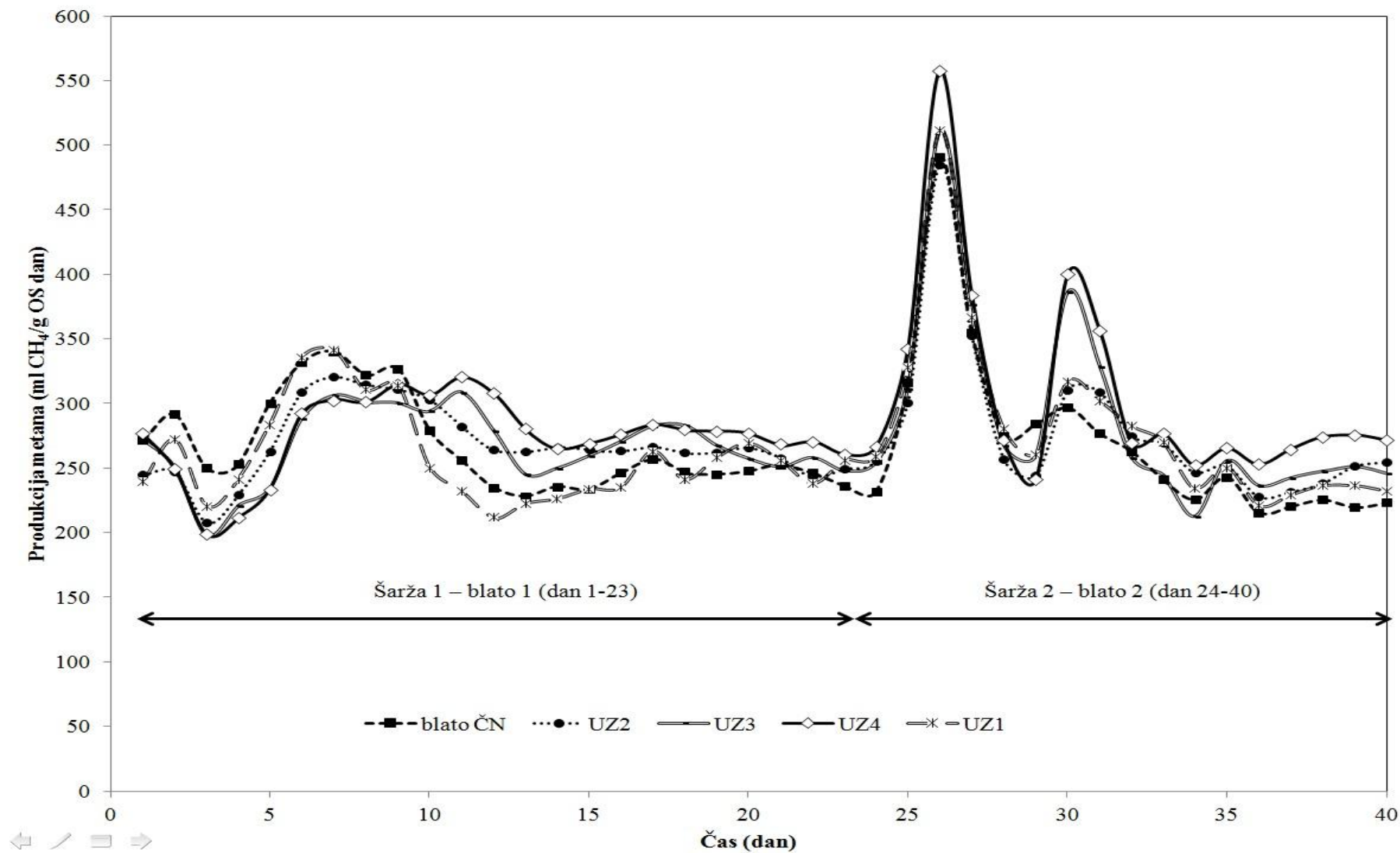
Graph 50: Phosphorus and nitrogen concentrations of wastewater sludge 2 supernatant as a function of specific energy.

4.3.1.2 Vpliv ultrazvoka in encimov na nastajanje metana

Dnevno tvorbo metana glede na organsko obremenitev in kumulativno tvorbo metana smo spremljali 40 dni, kar je prikazano na grafih 51, 52, 53 in 54. Večja nihanja pri dnevni produkciji metana glede na gram dozirane organske snovi smo zaznali pri zagonu eksperimenta. Prvih 10 dni, ko smo v reaktorje dozirali neobdelano in obdelano blato 1, je bila tvorba metana v reaktorjih z obdelanim blatom 1 v primerjavi z neobdelanim blatom manjša. V petem dnevu je v obdelanih reaktorjih, ki smo jih obdelali z ultrazvokom in dozirali hidrolitske encime (UZ4 + Novozymes) tako nastalo do 40 % manj metana. Povprečna specifična tvorba metana neobdelanega blata 1 v obdobju med dnevi 1 in 24 je bila 265 ± 35 ml CH₄/g OS. Med dnevi 7 in 10 so vsi predobdelani vzorci dohiteli neobdelane vzorce. Dnevna tvorba metana glede na organsko obremenitev pri vzorcih UZ1 je bila v območju kontrole z neobdelanimi vzorci. Največjo kumulativno tvorbo metana 7320 ml CH₄/g OS za obdobje od dneva 1 do 24 smo izmerili pri vzorcu UZ2+Novozymes, ki je bila za 14,9 % višja od kontrolnih reaktorjev. Sledili so reaktorji z UZ1+Novozymes in UZ4+Novozymes. Povečana tvorba metana pri vzorcih blata 1, ki so bili obdelani samo z ultrazvokom v obdobju od dneva 1 do 24, je bila v primerjavi z neobdelanimi vzorci blata 1 zanemarljiva. Deublein in Steinhauser (2010) navajata, da se čas za regeneracijo metanogenih mikroorganizmov giblje med 5 in 16 dnevi. Povečano kumulativno tvorbo metana v našem primeru smo opazili od dneva 16 naprej.

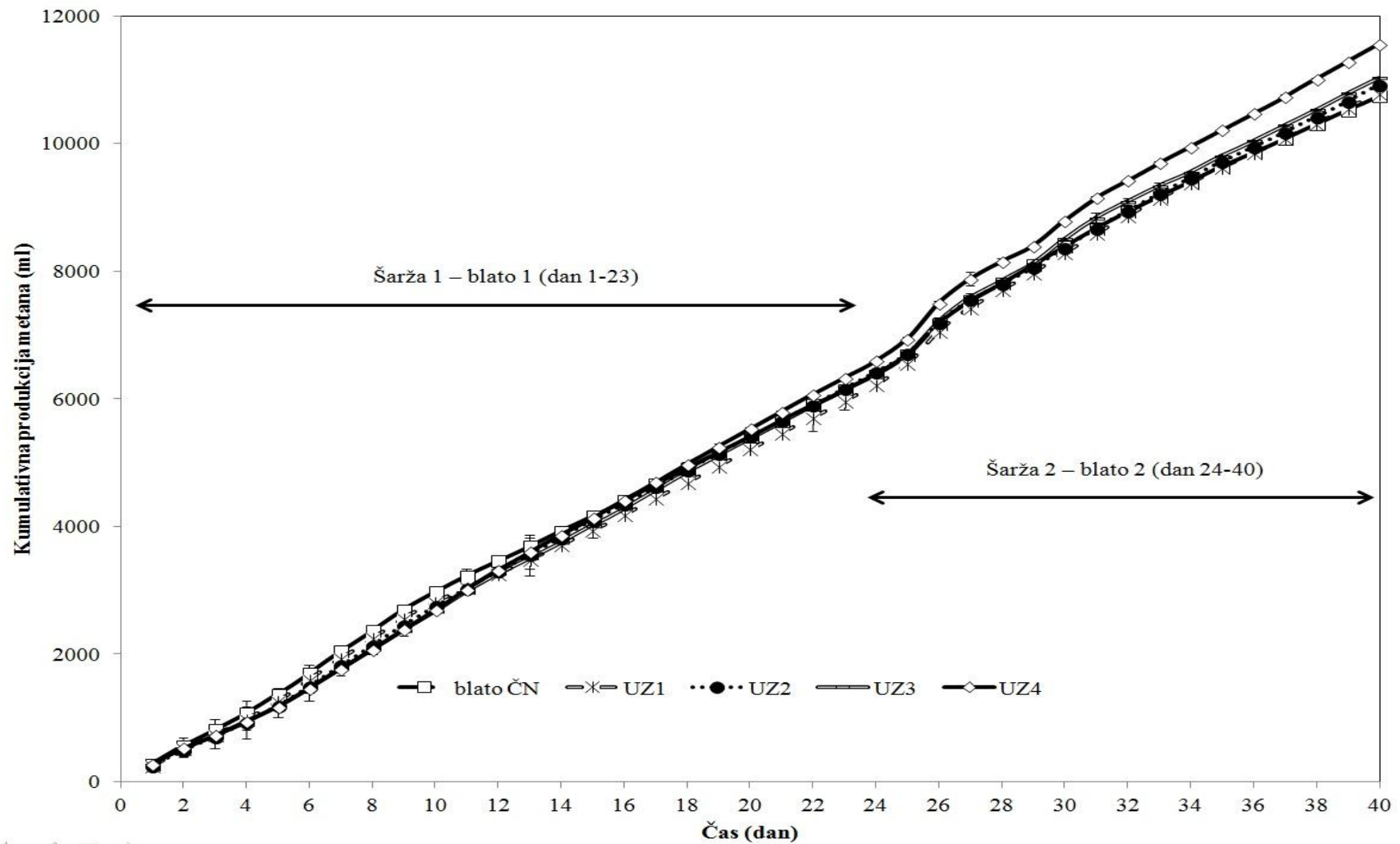
Vpliv amonijaka smo zmanjšali z doziranjem blata 1, ki je vsebovalo nižje koncentracije dušika in nižji pH kot perutninski gnoj. Vpliv predobdelave z ultrazvokom in encimi je postal očiten, vendar ne pa tudi vpliv obdelave samo z ultrazvokom. V našem primeru tvorba metana vzorcev obdelanih samo z ultrazvokom ni bila očitno večja od neobdelanih vzorcev, kar je v nasprotju z drugimi raziskavami na laboratorijskem in realnem modelnem merilu (Apul in Sanin, 2010; Barber, 2005; Braguglia et al., 2011; Erden in Filibeli, 2010; Hogan et al., 2004; Tiehm et al., 2001; Neis et al., 2000; Xing et al., 2007). Vzrok temu je lahko v manjši topnosti KPK in inhibiciji s prostim amonijakom, ki smo ga pridobili z inokulumom iz BPE Šijanec, kjer so kot substrat uporabljali tudi piščančji gnoj. Po 16 dneh, kar je okrog 1,33 kratnik hidravličnega zadrževalnega časa, se je večina biomase v reaktorjih že delno zamenjala z novo biomaso. Posledično so se zmanjšale koncentracije dušika in inhibitorni vpliv amonijaka na mikroorganizme. Na to sta najverjetneje vplivala tudi starost in pH blata.

Po 24 dnevih smo v reaktorje začeli dozirati blato 2, ki smo ga predhodno obdelali na enak način kot blato 1. Po 40 dnevih semi-kontinuiranega eksperimenta je v vzorcih, ki so bili obdelani samo z ultrazvokom, nastalo le 7,5 % več biometana kot pri neobdelani vzorci blata. Pri vzorcih, ki smo jim dodajali samo encime, smo izmerili 14,4 % več biometana kot pri izhodiščnih vzorcih, kar je tudi več od vzorcev obdelanih z ultrazvokom. Največji donos biometana smo dosegli s kombinacijo ultrazvoka in encimov, in sicer v primerih UZ2+Novozymes in UZ4+Novozymes, kjer je nastalo 24,4 % in 25,2 % več biometana v primerjavi z neobdelanimi vzorci. Z ultrazvočno predobdelavo smo blatu zmanjšali velikost delcev, s čimer smo olajšali difuzijo hidrolitskih encimov v matrico blata in izboljšali kontakt med blatom in encimi. Zaradi tega je prišlo do boljše razgradnje blata in posledično tudi večje tvorbe biometana pri kombinacijah z ultrazvokom in encimi.



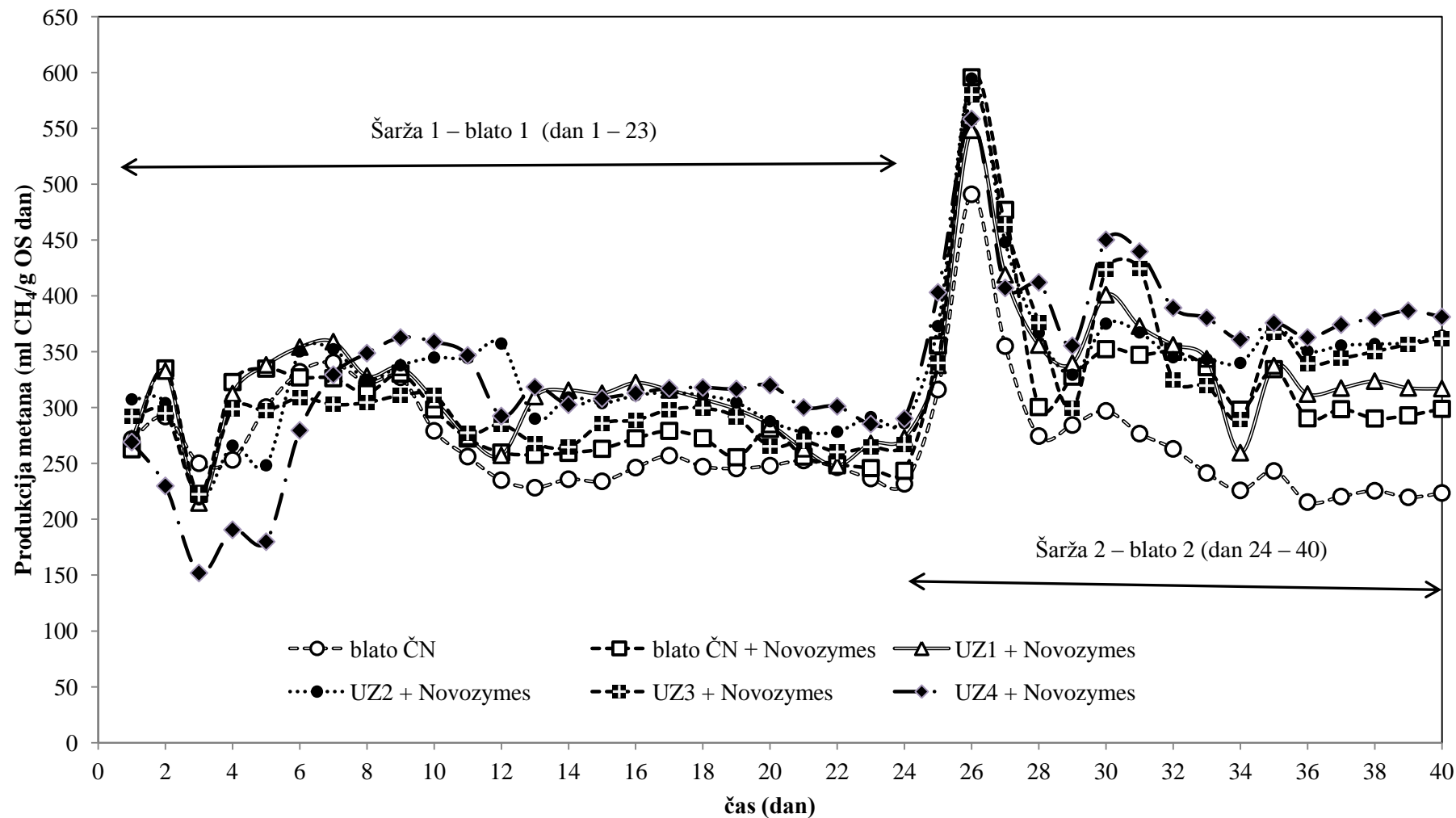
Grafikon 51: Dnevna tvorba metana blata iz ČN, obdelanega z ultrazvokom glede na organsko obremenitev anaerobnega reaktorja.

Graph 51: Daily methane yield of wastewaters sludge and ultrasonically pretreated wastewater sludges relating to organic loading of anaerobic digesters.



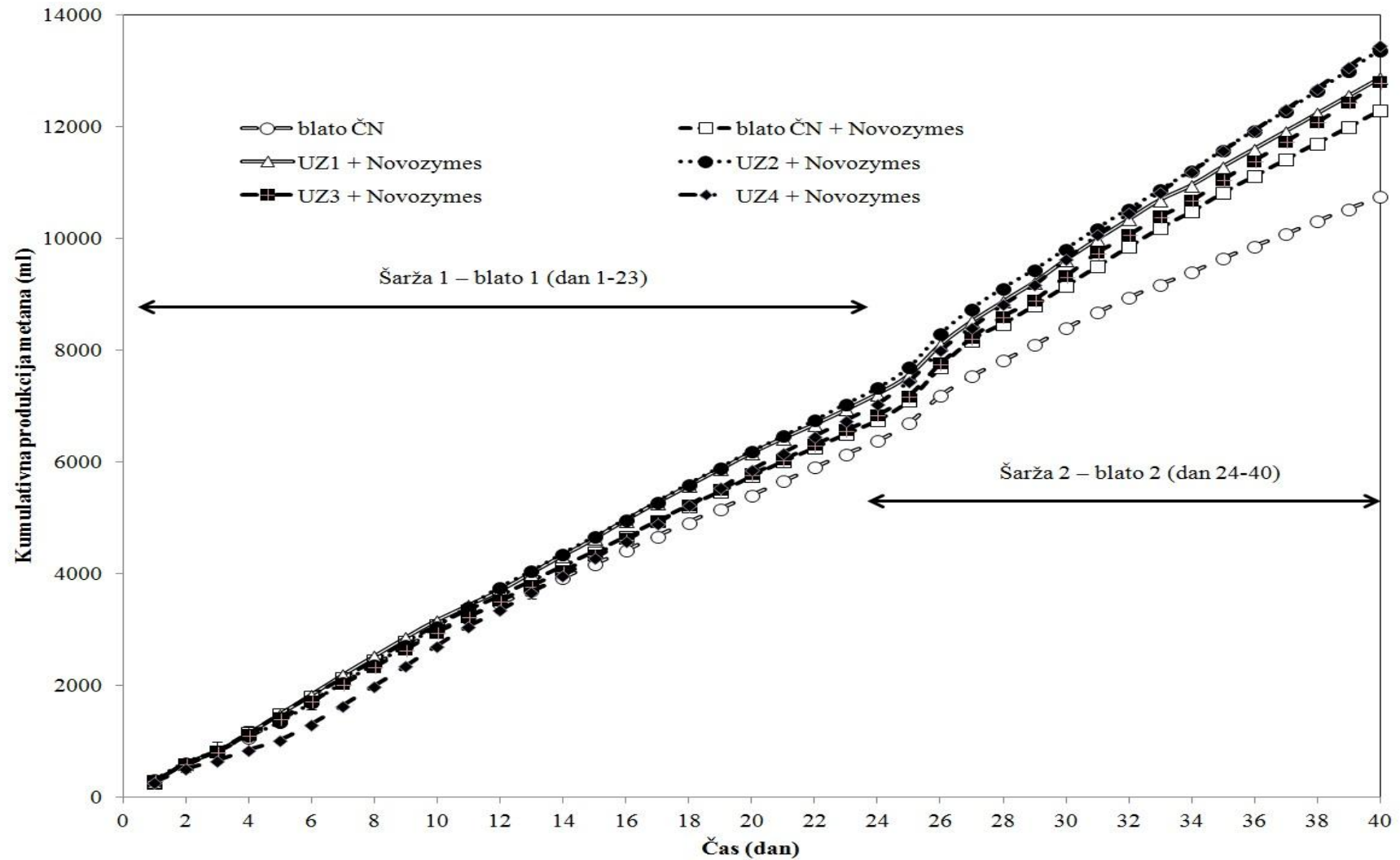
Grafikon 52: Kumulativna tvorba metana blata iz ČN obdelanega z ultrazvokom.

Graph 52: Cumulative methane yield of wastewater sludge and wastewater sludge pretreated with ultrasound.



Grafikon 53: Dnevna tvorba metana blata iz ČN obdelanega z ultrazvokom in hidrolitskimi encimi Novozymes glede na organsko obremenitev anaerobnega reaktorja.

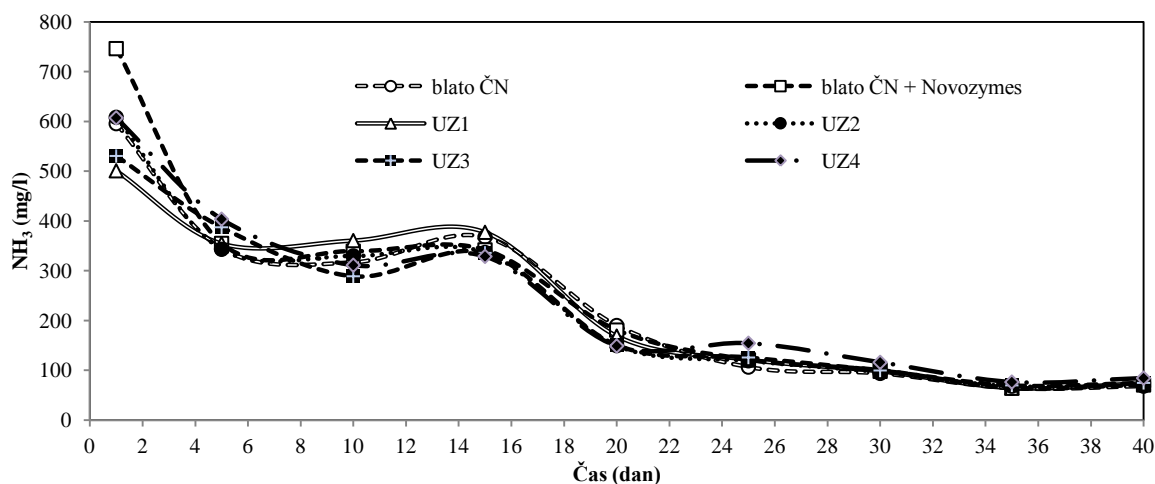
Graph 53: Daily methane yield of nonpretreated and pretreated wastewater sludge with ultrasound and hydrolytic enzymes Novozymes relating to organic loading of anaerobic digesters.



Grafikon 54: Kumulativna tvorba metana blata iz ČN obdelanega s hidrolitskimi encimi in ultrazvokom.

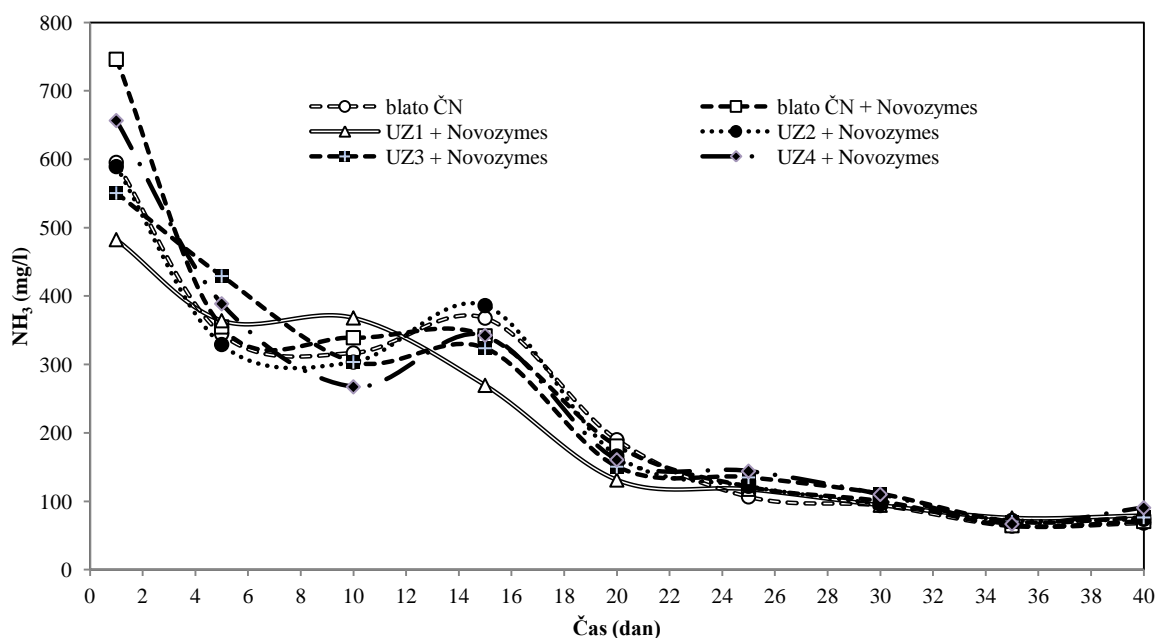
Graph 54: Cumulative methane yield of wastewater sludge pretreated with ultrasound and hydrolytic enzymes Novozymes.

Koncentracije očetne, propanojske, valerianske in maslene kisline, ki smo jih izmerili s plinskim kromatografom, so bile prvih 15 dni nekoliko višje, predvidevamo da zaradi inhibicije z amonijakom. Po 15 dnevih je njihova koncentracija padla in ostala nizka do konca 40 dnevnega semi-kontinuiranega eksperimenta. Koncentracije etanola in heksanojske kisline so bile ves čas eksperimenta nizke (Priloga E).



Grafikon 55: Gibanje koncentracije amonijaka (NH_3) v anaerobnih reaktorjih z blatom iz ČN obdelanih z ultrazvokom in encimi Novozymes v 40-dnevnem semi-kontinuiranem procesu

Graph 55: Changes in ammonia concentration in anaerobic reactors of non-pretreated and pretreated wastewater sludge with ultrasound and Novozymes enzymes in 40 day semi-continuous process.

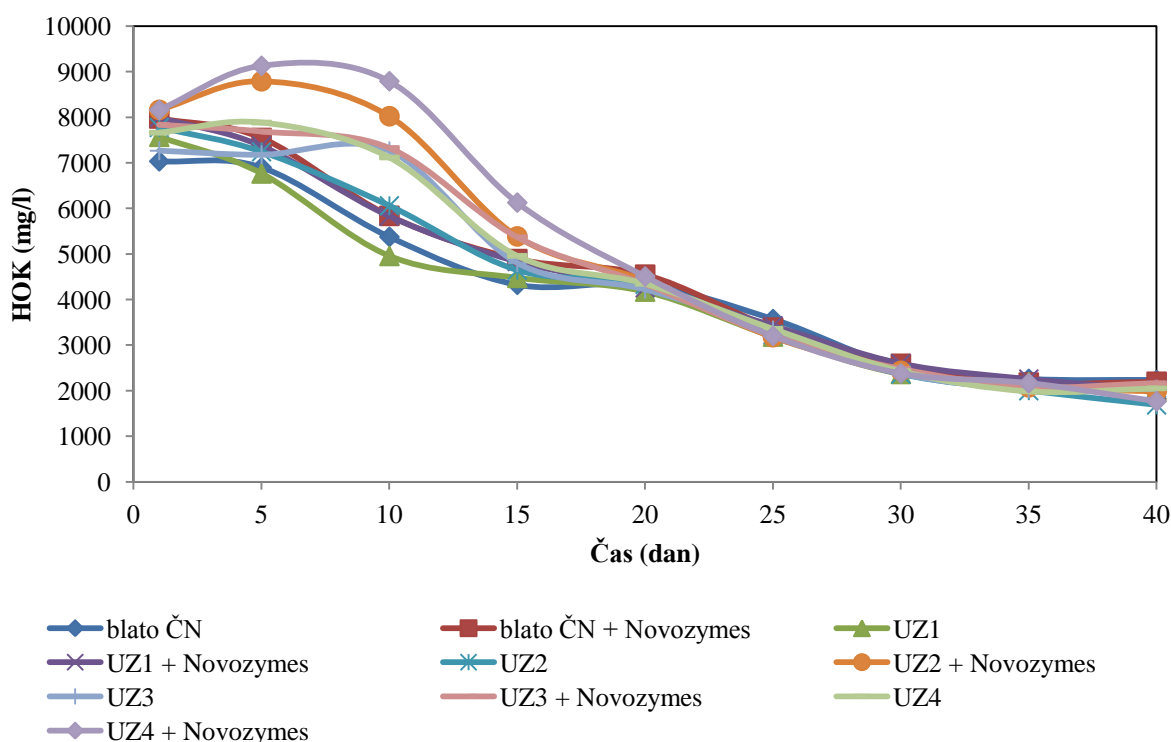


Grafikon 56: Gibanje koncentracije amonijaka (NH_3) v anaerobnih reaktorjih z blatom iz ČN, obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40-dnevnem semi-kontinuiranem procesu.

Graph 56: Changes in ammonia (NH_3) concentration in anaerobic reactors with combinations of non-pretreated and pretreated wastewater sludge with combination of ultrasound and Novozymes enzymes in 40 day semi-continuous process.

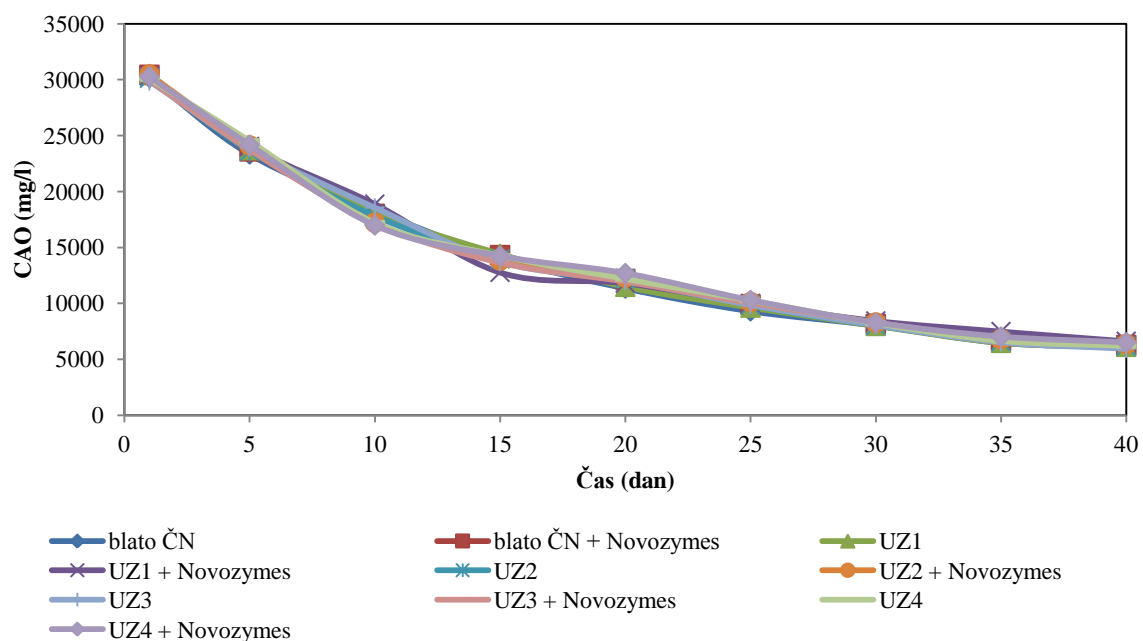
Wang et al. (2005) so na podlagi eksperimentalnega kinetičnega modela, pri katerem so uporabili blato iz ČN, zaključili da pH in koncentracija blata močno vplivata na razgradnjo. Pri modelu, kjer je bil topen KPK po predobdelavi z ultrazvokom odvisna spremenljivka, so podali velikostno merilo vpliva. Na KPK ima največji vpliv pH blata, sledijo koncentracija blata, intenziteta ultrazvoka in gostota ultrazvoka (Wang et al., 2005). Z ultrazvočno predobdelavo se pH blata v našem eksperimentu ni bistveno spremenil, kar bi lahko nakazovalo, da je to lahko tudi eden izmed vzrokov za počasnejšo izboljšavo produkcije metana v vseh primerih naših vzorcev, saj je koncentracija prostega amonijaka do 16 dne v reaktorjih preseгла mejno koncentracijo toksičnosti za anaerobne arheje v primerjavi z eksperimenti, ki so jih opravili drugi avtorji. Po znižanju koncentracije amonijaka si je sistem opomogel do te mere, da smo očitno zaznali vplive obeh predobdelav.

Podobno lahko izberemo tudi iz analiz s titratorjem, kjer smo spremljali koncentracijo hlapnih organskih kislin in puferško kapaciteto (celotni anorganski ogljik - CAO). V prvih desetih dnevih je koncentracija hlapnih organskih kislin naraščala (Grafikon 57), kar je skladno z visoko koncentracijo amonijaka, katerega posledica je zakisanje v anaerobnih reaktorjih. Ker se je puferška kapaciteta manjšala, bistvenih sprememb v pH v anaerobnih reaktorjih ni bilo (Grafikon 60) in posledično je bilo povečano tudi razmerje med HOK in CAO. Prvi dan je naraslo iz 0,22 na 0,5 deseti dan pa je začelo spet upadati do vrednosti okrog 0,3 (Grafikon 59), pri kateri je ostalo celoten nadaljnji semi-kontinuirani proces, kar je znotraj optimalnega področja. Ker je koncentracija hlapnih maščobnih kislin po 10 dneh padla, prav tako se je zmanjšala koncentracija amonijskega dušika in amonijaka pod toksično koncentracijo, se je stanje v anaerobnih reaktorjih stabiliziralo. Vse to na račun upada koncentracije hlapnih maščobnih kislin, puferške kapacitete, njunega razmerja, amonijskega dušika in amonijaka ter vrednosti pH, katerih vrednost se je gibala v mejah normale. Izmerjene vrednosti se med različno obdelanimi eksperimentalnimi variantami niso bistveno razlikovale.



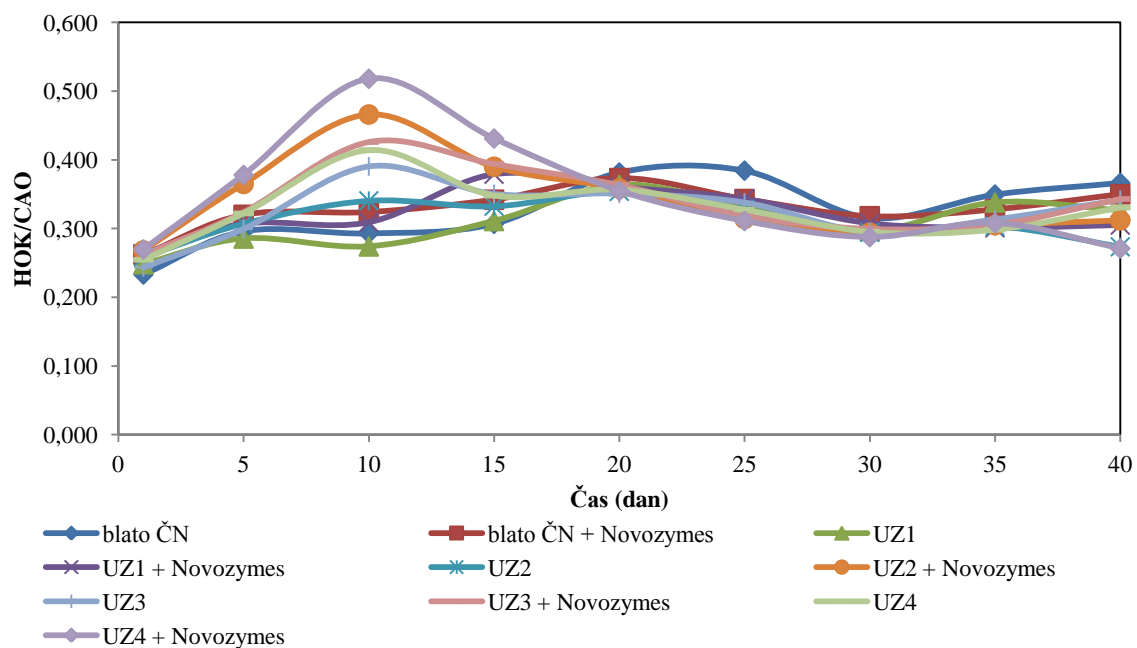
Grafikon 57: Koncentracija hlapnih organskih kislin v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.

Graph 57: Volatile organic acids concentration in anaerobic reactors of experiment 12.



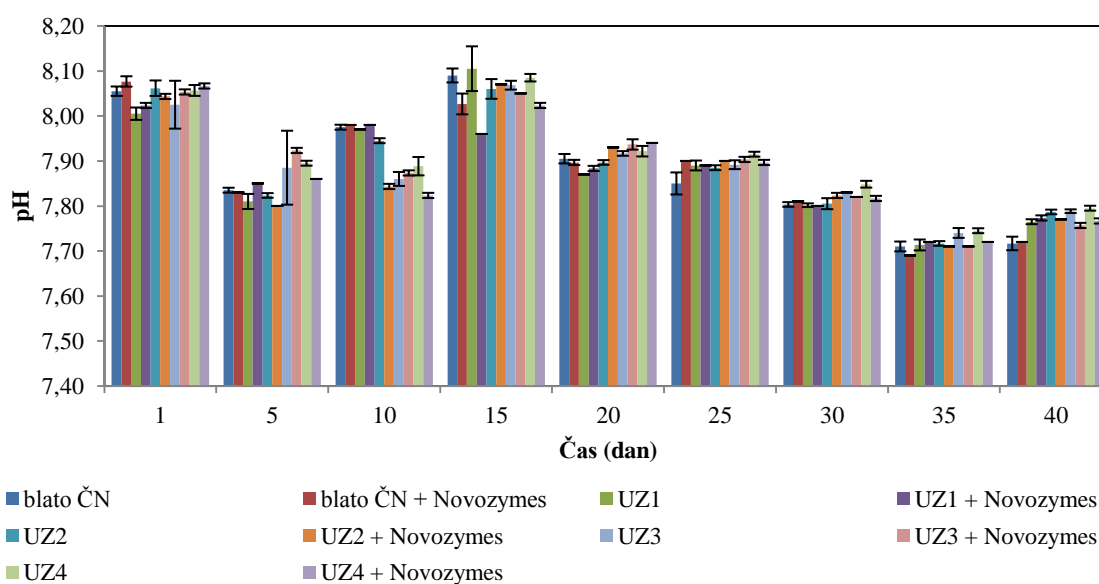
Grafikon 58: Koncentracija celotnega anorganskega ogljika (CAO) v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.

Graph 58: Concentration of total inorganic carbon (TIC) in anaerobic reactors of experiment 12.



Grafikon 59: Razmerje med hlapnimi organskimi kislinami in celotnim anorganskim ogljikom (HOK/CAO) v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.

Graph 59: Volatile organic acids (VOA) and total inorganic carbon (TIC) ratio in anaerobic reactors of experiment 12.



Grafikon 60: Vrednost pH v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 12.

Graph 60: Value of pH in anaerobic reactors of experiment 12

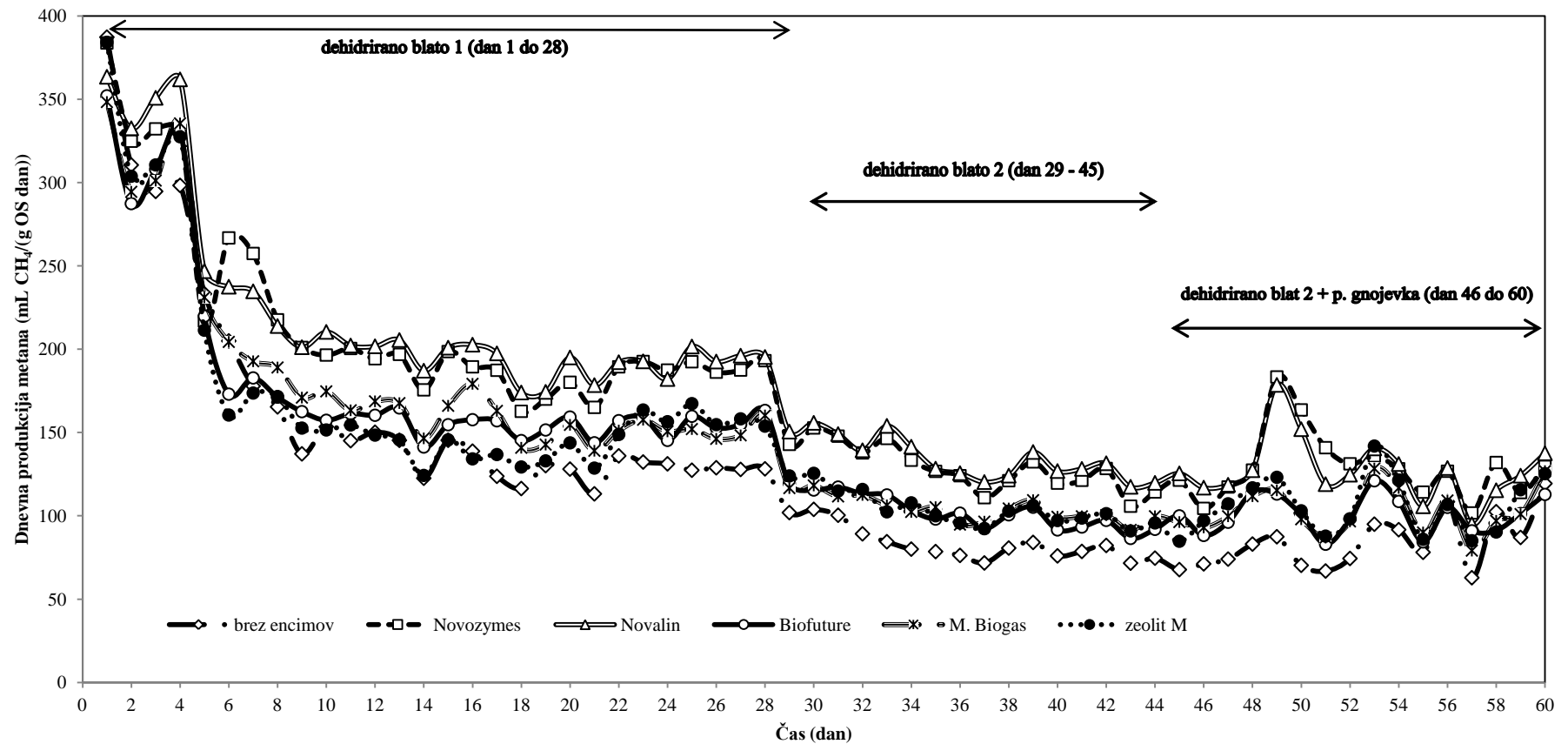
Ugotovitve iz eksperimenta 12

- Pri obdelavi blata samo z ultrazvokom smo izmerili 7,5 % več bioplina kot pri neobdelanih vzorcih.
- Učinek predobdelav samo z ultrazvokom je bil manjši, kot so jih imeli različni avtorji (Zielewicz in Sorys, 2008; Hogan, 2004, Pilli et al., 2011; Braguglia et al., 2011; Xing et al., 2007), ki so se ukvarjali s tem področjem.
- Z encimsko predobdelavo blata je nastalo 14,4 % več biometana kot v izhodiščnem vzorcu.
- S kombinacijo ultrazvočne in encimske predobdelave s hidrolitskimi encimi Novozymes je bila tvorba metana v obdobju 40 dni v primerjavi s kontrolo večja za 25,2 %.
- Vzroke za slabšo učinkovitost ultrazvočne predobdelave lahko pripišemo: starosti blata, pH blata in povečani koncentraciji amonijaka v inokulumu.
- Predobdelave niso učinkovite, če so v procesu različne inhibitorne snovi, ki presegajo mejo normalnega delovanja. Pogoj za učinkovitost predobdelav je, da je proces anaerobne presnove brez predobdelav stabilen in znotraj območja normalnega delovanja.
- V eksperimentu je amonijak prvih 17 dni deloval inhibitorno na metanogene arheje, zato kljub predobdelavam blata z ultrazvokom in encimi ni prišlo do nobenih sprememb v tvorbi metana. Opazili smo celo, da se je nastajanje metana ob predobdelavi s hidrolitskimi encimi v nekaterih primerih zmanjšalo v primerjavi z izhodiščnim vzorcem.
- Iz zgoraj naštetih razlogov lahko sklepamo, da samo z zmanjševanjem velikosti delcev ni možno z gotovostjo trditi, da se bo tvorba metana občutno povečala, saj je to v veliki meri odvisno tudi od biokemijskih parametrov znotraj procesa anaerobne presnove.
- Perez-Elvira et al. (2009) navajajo, da so ultrazvočne sonde na laboratorijskem modelnem merilu manj učinkovite kot na realnem modelnem merilu, prav tako pa se na realnem modelnem merilu za predobdelavo z ultrazvokom uporabi le en del substrata, drugi del ostane neobdelan, z namenom, da se zmanjša stroške in poveča zmožnost dehidracije blata. To je lahko tudi eden izmed vzrokov za slabši prirastek metana v našem eksperimentu.

4.3.2 Rezultati in diskusija eksperiment 13: Možnost uporabe hidrolitskih encimov za povečanje tvorbe bioplina iz odpadnega dehidriranega blata papirniške industrije v 5 l semi-kontinuiranem AMPTS II

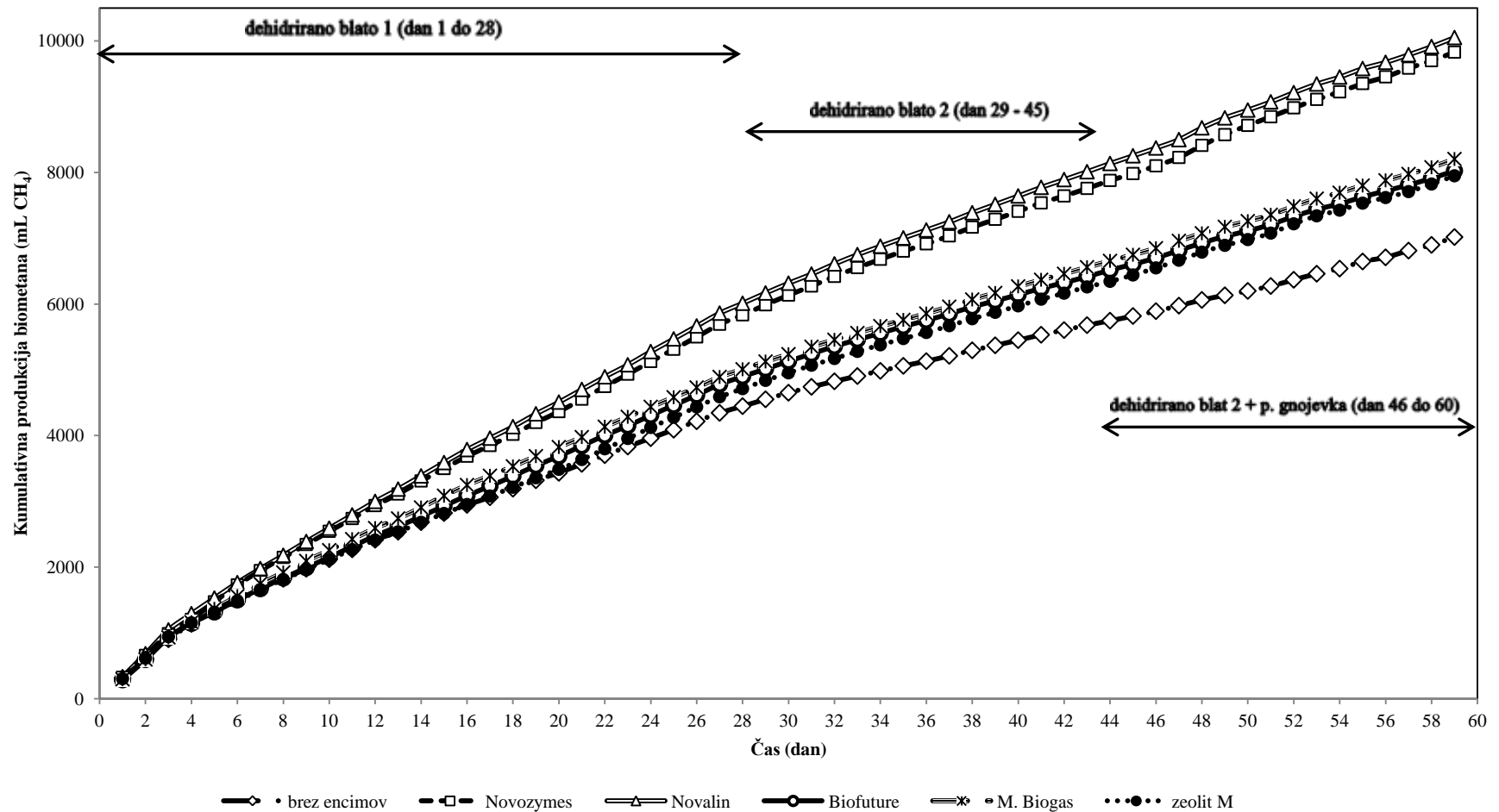
Dnevna tvorba metana glede na organsko obremenitev ($\text{ml CH}_4/(\text{g OS dan})$) je podana na grafikonu 61. Pri dehidriranem blatu, ki mu nismo dodajali encimov, je povprečna dnevna tvorba metana med osmim in osemindvajsetim dnevom znašala $134,6 \pm 12,7 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$, pri reaktorjih, ki smo jim dodajali dodatke v obliki encimov in mikrobnih združb pa $188,7 \pm 12 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$ za encime Novozymes, $195,1 \pm 10,9 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$ pri encimih Novalin, $156,1 \pm 7,5 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$ pri Biofuture, $158,7 \pm 13 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$ pri Micropan Biogas in $147,7 \pm 13 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$ pri zeolitu M. Vsi dodatki so imeli pozitiven vpliv na pridobivanje metana. Na začetku med 1 in 5 dnevom je opazen velik padec v produkciji metana. Inokulum, ki smo ga uporabili, je bil na bioplinski elektrarni dnevno organsko obremenjen z 10 g OS/l . Predvidevamo, da se je med prvim in tretjim dnevom še porabljal organska snov, ki je izvirala iz inokuluma, po tretjem dnevu pa je prišla do le prišla izraza za 4,5 krat manjša organska obremenitev z dehidriranim blatom, zato je tudi tvorba metana upadla. Razlike med posameznimi reaktorji v prvih petih dnevih niso bile očitne. Po 28 dneh, ko smo začeli dozirati dehidrirano blato 2 iz Palome, ki je vsebovalo manj organske snovi, je tvorba metana upadla za približno 25 % v vseh primerih. Najmanj metana je nastalo pri blatu, ki mu nismo dodajali encimov, največ metana pa z dodajanjem encimov Novozymes in Novalin. Povprečna dnevna tvorba metana blata brez dodajanja encimov je v obdobju od dneva 29 do 45 znašala $82,4 \pm 10,7 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$, največjo tvorbo pa smo opazili pri dodajanju encimov Novozymes ($128,6 \pm 13,5 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$) in Novalin ($133,9 \pm 12,5 \text{ ml CH}_4/(\text{g OS dan})$). Od 46 dne naprej, ko smo začeli dodajati prašičjo gnojevko, ki nam je predstavljala vir dušika, je dnevna tvorba metana v vseh primerih začela nihati. Pri dodajanju encimov Novozymes in Novalin smo med dnevom 50 in 51 opazili skokovit porast v tvorjenju metana, nakar se je stanje vrnilo nazaj na nivo pred skokom, še vedno pa so se pojavljala večja nihanja (grafikon 61). Povprečna dnevna tvorba metana od 46 dne naprej se v vseh anaerobnih reaktorjih ni spremenila bistveno in je bila podobna obdobju med 29 in 45 dnem. Razlike med tvorbo metana med dehidriranim blatom, ki mu nismo dodajali encimov in blatom z dodanimi encimi so prikazane na grafikonu 62. Največjo tvorbo metana v primerjavi z izhodiščnimi vzorci smo opazili pri encimih Novozymes in Novalin, manjši izplen, a še vedno večji kot pri izhodiščnih vzorcih pa pri dodatkih Biofuture, Micropan Biogas in zeolitu M. Z Novozymes in Novalin encimi smo tako v 60-ih dneh glede na izhodiščni vzorec proizvedli od 40 do 43 % več metana, z Micropan Biogas, Biofuture in zeolit-om M pa od 13 do 17 % več metana (grafikon 62).

Iz literature je znano, da tvorba metana pri različnih vrstah papirniškega blata zelo niha in se od primera do primera lahko zelo razlikuje. Tako je na primer vrednost BMP primarnega papirniškega blata pri mezofilnih in termofilnih pogojih okrog 210 in 230 $\text{ml CH}_4/\text{g OS}$, v tem vrstnem redu in za sekundarno papirniško blato pa okrog 50 in 100 $\text{ml CH}_4/\text{g OS}$ v tem vrstnem (Bayr in Rintala, 2012). Pri drugih avtorjih, ki so prav tako izvajali podobne eksperimente s papirniškim blatom, se vrednosti BMP za primarno papirniško blato 45 $\text{ml CH}_4/\text{g OS}$ in med 85 do 200 $\text{ml CH}_4/\text{g OS}$ za sekundarno papirniško blato (Bayr in Rintala, 2012, Karlsson et al., 2011). V našem eksperimentu smo opazili podobne vrednosti, ki so se spreminjale glede na šaržo blata od približno 82 do 188 $\text{ml ml CH}_4/\text{g OS}$. To nakazuje, da je tvorba metana odvisna tudi od vrste procesa v papirniški industriji in od tega ali gre za primarno ali sekundarno blato kot v primeru Bayr in Rintala (2012). V našem primeru je uporaba hidrolitskih encimov pozitivno vplivala na metanski donos.



Grafikon 61: Dnevna tvorba metana glede na organsko obremenitev papirniškega blata brez predobdelave z encimi in z dodajanjem encimov Novozymes, Novalin, Biofuture, Micropan Biogas in zeolita M.

Graph 61: Daily methane yield relating to organic loading of dehydrated paper mill sludge from Paloma with and without enzymatic pretreatment with Novozymes, Novalin, Micropan Biogas and zeolit M.



Grafikon 62: Dnevna kumulativna tvorba metana iz papirniškega blata brez predobdelave z encimi in z dodajanjem encimov Novozymes, Novalin, Biofuture, Micropan Biogas in zeolita M.

Graph 62: Cumulative methane production relating to organic loading of dehydrated paper mill sludge from Paloma with and without enzymatic pretreatment with Novozymes, Novalin, Micropan Biogas and zeolit M.

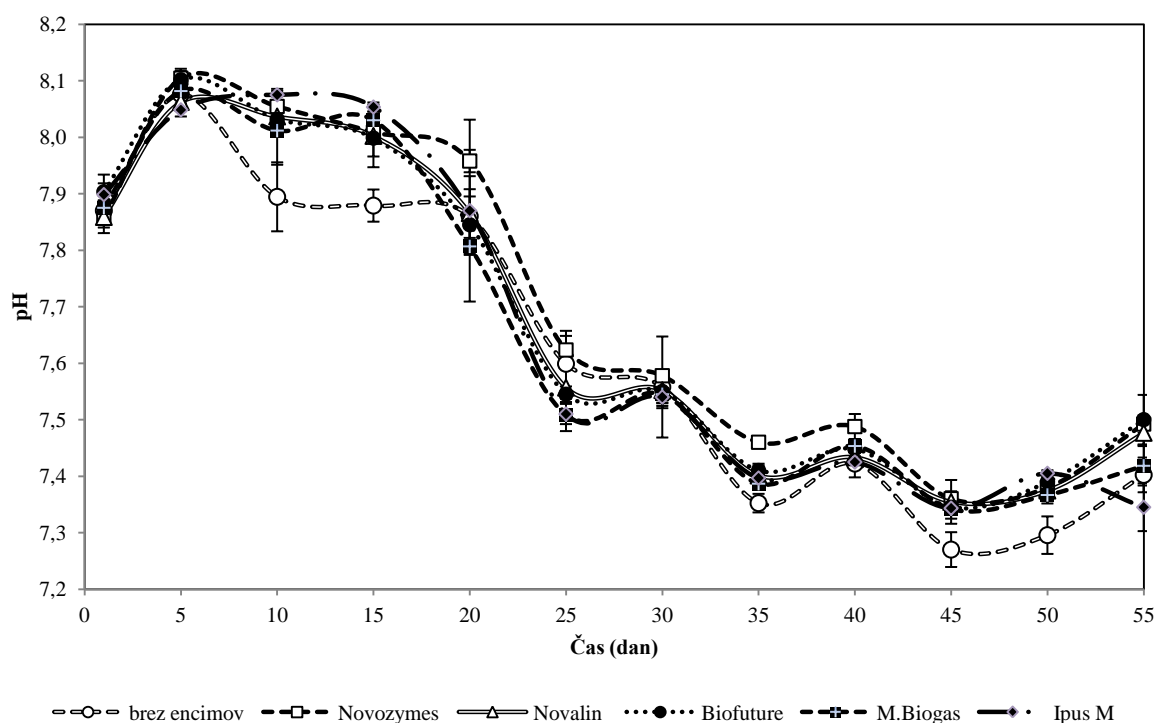
Iz literature je znano, da tvorba metana pri različnem papirniškem blatu zelo niha in se od primera do primera lahko zelo razlikuje. Tako je na primer vrednost BMP primarnega papirniškega blata pri mezofilnih in termofilnih pogojih okrog 210 in 230 ml CH₄/g OS, v tem vrstnem redu, za sekundarno papirniško blato pa okrog 50 in 100 ml CH₄/g OS v tem vrstnem (Bayr in Rintala, 2012). Pri drugih avtorjih, ki so prav tako izvajali podobne eksperimente s papirniškim blatom, se vrednosti BMP za primarno papirniško blato 45 ml CH₄/g OS in med 85 do 200 ml CH₄/g OS za sekundarno papirniško blato (Bayr in Rintala, 2012, Karlsson et al., 2011). V našem eksperimentu smo opazili podobne vrednosti, ki so se spreminjale glede na šaržo blata od približno 82 do 188 ml CH₄/(g OS dan). To nakazuje, da je tvorba metana odvisna tudi od vrste procesa v papirni industriji in od tega, ali gre za primarno ali sekundarno blato, kot v primeru Bayr in Rintala (2012).

S plinskim kromatografom smo vsak peti dan izmerili tudi vsebnost hlapnih maščobnih kislin v reaktorjih. V vseh primerih koncentracija nobene izmed očetne, propanojske, maslene, valerijanske in kapronske kisline in etanola ni preseгла koncentracije 25 mg/l. Nizke koncentracije hlapnih maščobnih kislin pri anaerobni presnovi papirniškega blata so pri organski obremenitvi 2,2 g OS/l izmerili tudi Karlsson et al. (2011), pri večjih organskih obremenitvah pa je koncentracija hlapnih maščobnih kislin narasla.

Vrednost pH se je prvi dan eksperimenta v vseh primerih gibala okrog 7,9, nakar je do petega dne pH narastel na 8,0 do 8,1. Do dvajsetega dne se je pH pri izhodiščnem vzorcu, kjer smo imeli samo dehidrirano blato Paloma, ustalil med 7,9, pri vseh ostalih reaktorjih, ki smo jim dodajali encime pa pri 8,1 (grafikon 63). Od dvajsetega dne naprej je pH začel postopoma padati, vse do okrog 7,4. Trend padanja se je ustavil in obrnil navzgor šele pri 45. dnevu, ko smo v anaerobne reaktorje začeli dodajati tudi prašičjo gnojevko.

Vsak peti dan smo izmerili tudi suho snov in organsko snov v vseh reaktorjih. Vsebnost suhe snovi je v vseh primerih iz 8,76 %, kot je bila na začetku eksperimenta, do petinštiridesetega dneva padala na 4,46 %, nato se je ustalila na tem nivoju. Podoben trend smo zaznali tudi pri vsebnosti organske snovi, glede na svežo maso (OS (% SM)), ki je iz okrog 6,15 % zdrsnila na okrog 3,05 % pri vseh anaerobnih reaktorjih. Razlike pa smo zaznali v vsebnosti organske snovi v suhih vzorcih reaktorja z zeolitom. Do petintridesetega dneva se je vsebnost organske snovi v suhi snovi v vseh primerih, razen pri reaktorjih, ki smo jim dodajali zeolit M (Ipus M), gibala med 68,8 in 71,8 %, do petinpetdesetega dneva pa se je zmanjšala na 65 do 66 %. Pri reaktorjih z zeolitom M je delež OS (% SS) iz 70,13 % dvajseti dan padel na 66,98 %, do petinpetdesetega dneva pa na 61,6 % (priloga F, grafikon F1).

V prvih dneh eksperimenta smo opazili največjo hitrost razgradnje organske snovi, ki pa je po desetem dnevu močno padla in se nato dvajseti dan pri kontrolnih reaktorjih in reaktorjih z encimi Novozymes spet dvignila, pri drugih pa je še vedno padala. Velik padec smo opazili tudi trideseti dan, ko se je razgradnja približala 2 %, nato pa je začela spet nekoliko naraščati do petintridesetega dne. Sledi neenakomerno padanje in naraščanje razgradnje, vendar se vse krivulje gibljejo med 5 % in – 1,9 %, kar pomeni, da se v nekaterih primerih dodana organska snov ni razgradila (Priloga F, grafikon F1).

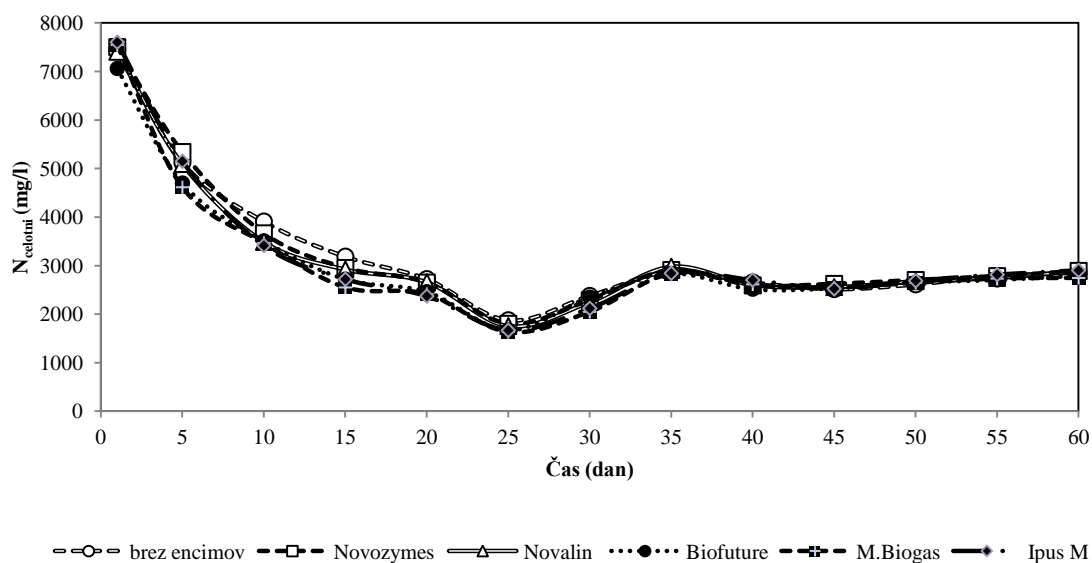


Grafikon 63: Gibanje pH skozi čas v reaktorjih brez encimske predobdelave in z encimsko obdelavo.
Graph 63: Variations in pH in reactors with and without enzymes pretreatment as a function of time.

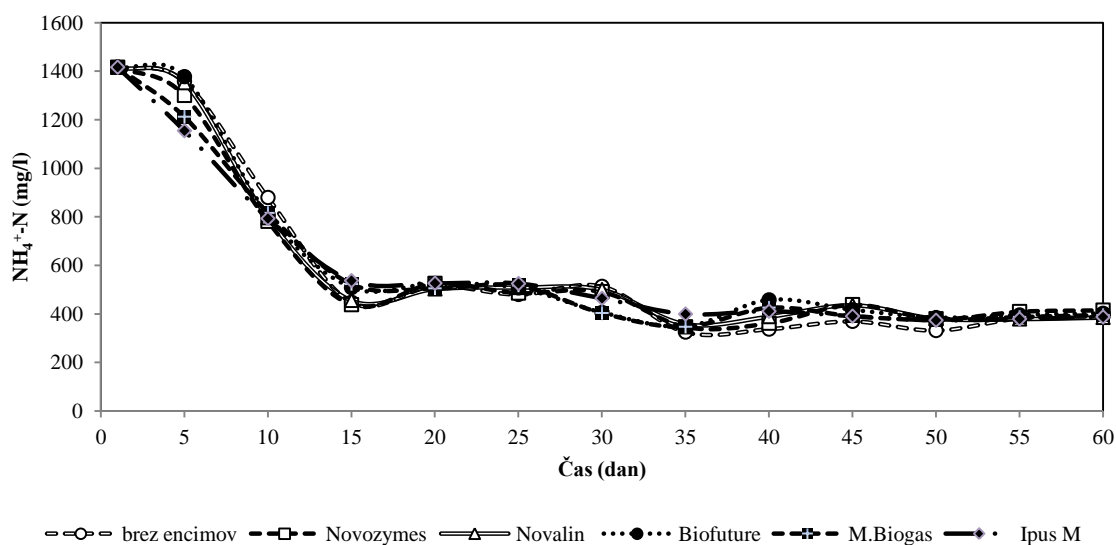
Do slabše produkcije metana je najverjetneje prišlo zaradi slabše razgradnje organske snovi v blatu in najverjetneje zaradi pomanjkanja nutrientov. Ko smo dodali prašičjo gnojevko, je tvorba metana začela nihati, kar lahko nakazuje na spremembe, na katere so se mikroorganizmi prilagajali. Sekundarno blato je v glavnem sestavljeno iz mikrobne biomase, ki je slabše razgradljiva zaradi niti glikana, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi v mikrobnih celičnih stenah, medtem ko primarno blato vsebuje več celuloze in je zato tvorba metana v tem primeru lahko večja (Appels et al., 2008; Bayr in Rintala, 2012).

Kumulativni delež razgradnje organske snovi je bil po 55-ih dneh v vseh primerih podoben. Kontrolni reaktor, ki smo mu dodajali samo blato Paloma, je v 55-ih dneh dosegel 64,4 % razgradnjo organskih snovi. Za 3,7 % večjo razgradnjo smo dosegli z dodajanjem encimov Novozymes, encimi Novalin so razgradnjo v primerjavi z izhodiščnim vzorcem povečali za 1,4 %, encimi Biofuture pa za 2,9 %. Pri dodajanju Micropan Biogas smo opazili za 2,3 % manjšo razgradnjo kot pri izhodiščnem vzorcu, pri dodajanju zeolita M pa za 0,3 % manjšo razgradnjo organske snovi (Priloga F, grafikon F3).

Vsak peti dan smo v anaerobnih reaktorjih izmerili tudi koncentracijo celotnega dušika in amonijskega dušika. Rezultati so prikazani na grafikonu 64 in 65. Koncentracija celotnega dušika je iz okrog 7500 mg/ postopoma v 25 dneh v vseh primerih padla na okrog 1900 mg/l, nakar je začela postopoma spet rasti in se ustalila med 2500 in 2900 mg/l. Podobna situacija je bila tudi pri amonijskem dušiku, katerega koncentracija je iz začetne 1400 mg/l v petnajstih dneh padla na 550 mg/l in se do 60 dne ustalila med 380 in 400 mg/l. Koncentracija amonijskega dušika se je skozi celi eksperiment gibala pod mejo toksičnosti in kljub dodajanju prašičje gnojevke ni narasla. Posledično so bile tudi koncentracije amonijaka (NH_3) pod mejo toksičnosti. Iz tega lahko sklepamo, da dodajanje prašičje gnojevke kot vira dušika ni negativno vplivalo na proces anaerobne presnove.

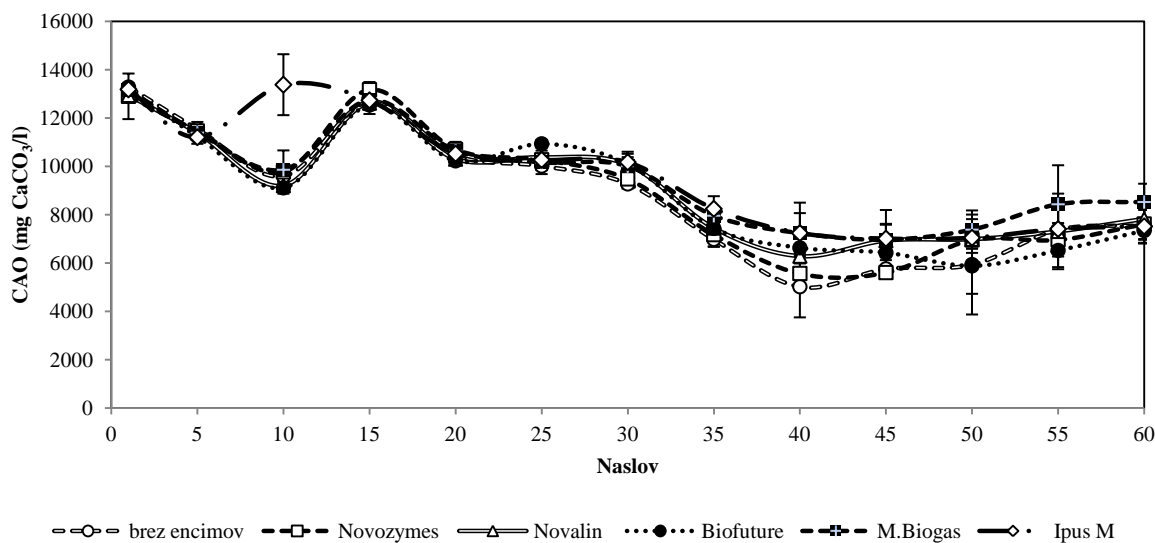


Grafikon 64: Spreminjanje koncentracije celotnega dušika v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.
Graph 64: Variations in total nitrogen concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.

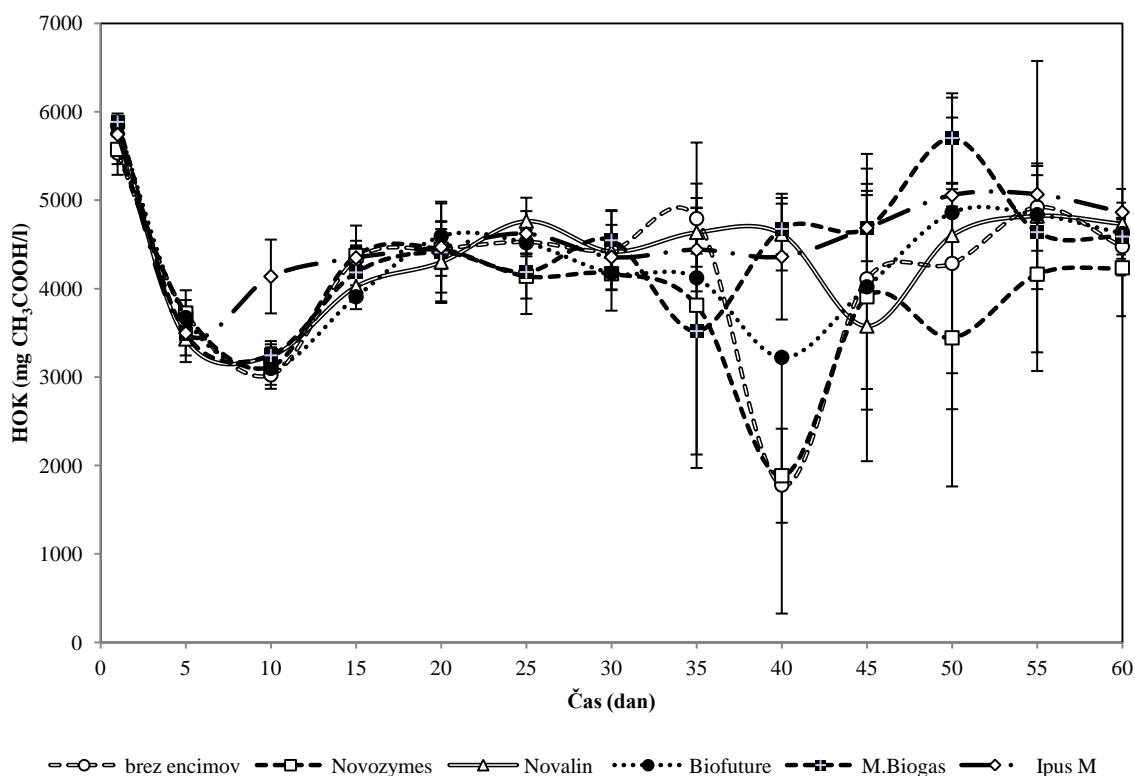


Grafikon 65: Spreminjanje koncentracije amonijskega dušika v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.
Graph 65: Variations in ammonium nitrogen concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.

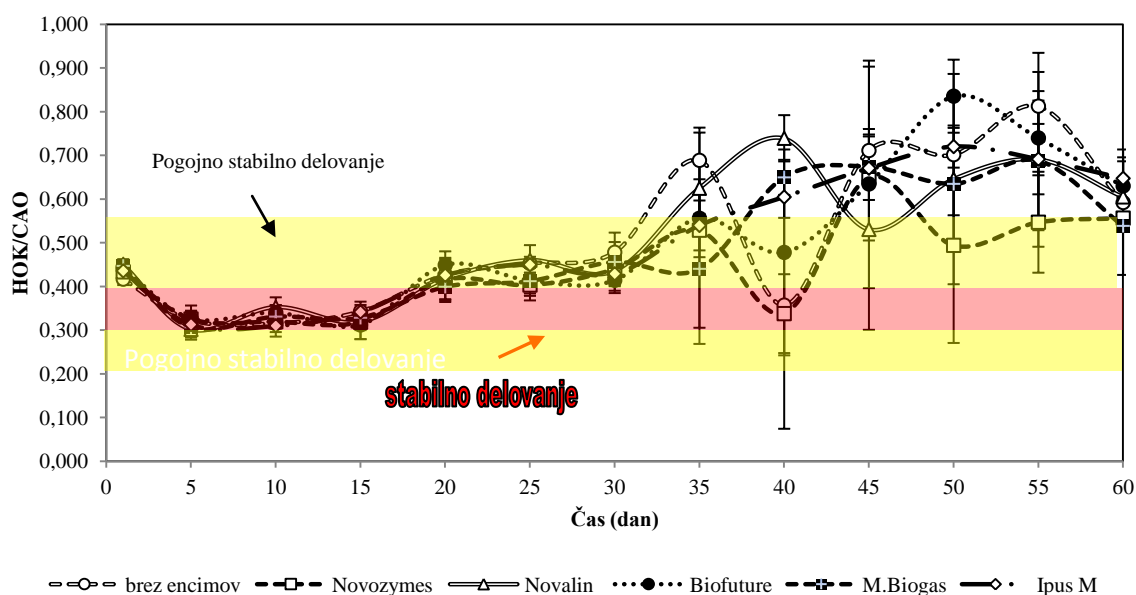
S titracijo smo spremljali in vsak peti dan izmerili alkalnost (koncentracijo celotnega anorganskega ogljika) ter koncentracijo hlapnih organskih kislin.



Grafikon 66: Spreminjanje alkalnosti v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.
Graph 66: Alkalinity changes in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.



Grafikon 67: Spreminjanje koncentracije hlapnih organskih kislin (HOK) v iztokih iz anaerobnih reaktorjev v eksperimentu 13.
Graph 67: Variations in VOA concentrations in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.



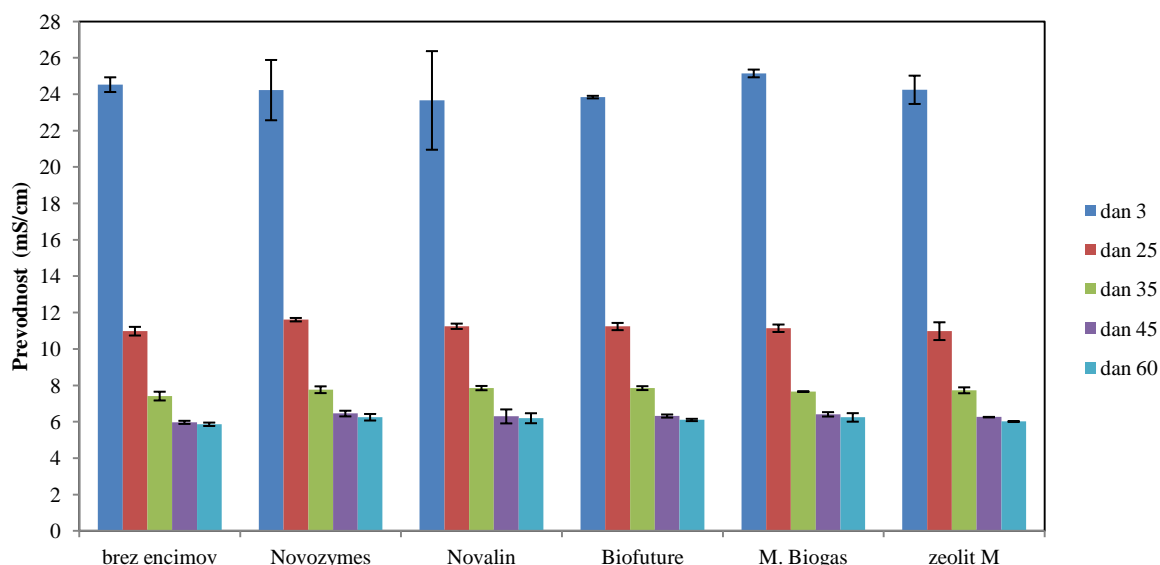
Grafikon 68: Razmerje HOK/CAO v iztokih iz anaerobnih reaktorjev v eksperimentu 13.

Graph 68: VOA/TAC ratio in effluent for anaerobic reactors in experiment 13.

Vsebnost dušika v dehidriranem blatu iz Palome, kot substratu, je bila okrog 1055 mg/l, kar je za polovico manj kot pri papirniškem blatu, ki sta ga za anaerobno presnovo uporabila Bayr in Rintala (2012). Čeprav v našem primeru koncentracija amonijskega dušika ni padla pod 200 mg/l, kot v primeru Prochazka in drugih (2012), smo vseeno zaznali večji upad pH iz 8,1 na 7,4, kar je najbrž tudi posledica manjšanje puferske kapacitete in zmanjšanje koncentracije celotnega dušika. Lin in drugi (2009) navajajo, da pH ni dobro merilo za stabilnost anaerobnega procesa, če imamo visoko pufersko kapaciteto. Do majhnih sprememb v pH pride, ko se v procesu zgodijo večje spremembe. Zato lahko alkalnost uporabimo kot direkten kazalnik procesa. V našem primeru je dodajanje prašičje gnojevke, kot vira dušika, obrnilo tudi trend padanja celotnega anorganskega ogljika (alkalnosti), ki je spet začel počasi naraščati (grafikon 66). Tako kot v eksperimentu Prochazka in drugih (2012), smo tudi pri nas zaznali manjše metanske donose, najverjetneje zaradi nizke koncentracije amonijskega dušika, vendar je v našem primeru dodajanje prašičje gnojevke ustavilo padanje pH, prav tako pa povprečna dnevna tvorba metana v obdobju dodajanja gnojevke ni upadla v primerjavi z obdobjem med 29 in 45 dnev, čeprav je še vedno nihala.

Vzrok za slabo pufersko kapaciteto in posledično padanje vrednosti pH ter akumuliranje hlapnih maščobnih kislin je lahko tudi v pomanjkanju dušika (Bayr in Rintala, 2012, Lin et al., 2009). Alkalnost stabilnega procesa anaerobne presnove blata se giblje med 1000 in 5000 mg CaCO₃/l (Lin et al., 2009), medtem ko nekateri avtorji poročajo o stabilnem procesu tudi pri 10.000 mg CaCO₃/l pri uporabi bioloških odpadkov (Banks et al., 2011). V našem primeru je zaradi zmanjševanja koncentracije dušika, nižanja pH in padanja alkalnosti, ki sicer ni bila na meji stabilnosti procesa, tvorba metana začela upadati, vendar smo z dodajanjem prašičje gnojevke priskrbeli nov vir dušika, ki je stabiliziral pH, ustavil padanje alkalnosti in produkcije metana. Na slabšo stabilnost procesa je nakazalo razmerje HOK/CAO (grafikon 68), ki se je po 30 dneh krepko dvignilo čez 0,400. K takemu razmerju ni botrovalo kopičenje hlapnih organskih kislin, ampak padec alkalnosti, kar je verjetno povezano tudi z zmanjševanjem prevodnosti v anaerobnih reaktorjih. Scano in drugi (2014) navajajo, da vrednost pH v njihovih eksperimentih z biološkimi odpadki nikoli ni padla pod 7 zaradi dobre puferske kapacitete, kljub temu, da je razmerje med HOK/CAO seglo tudi do 0,65 ob organski

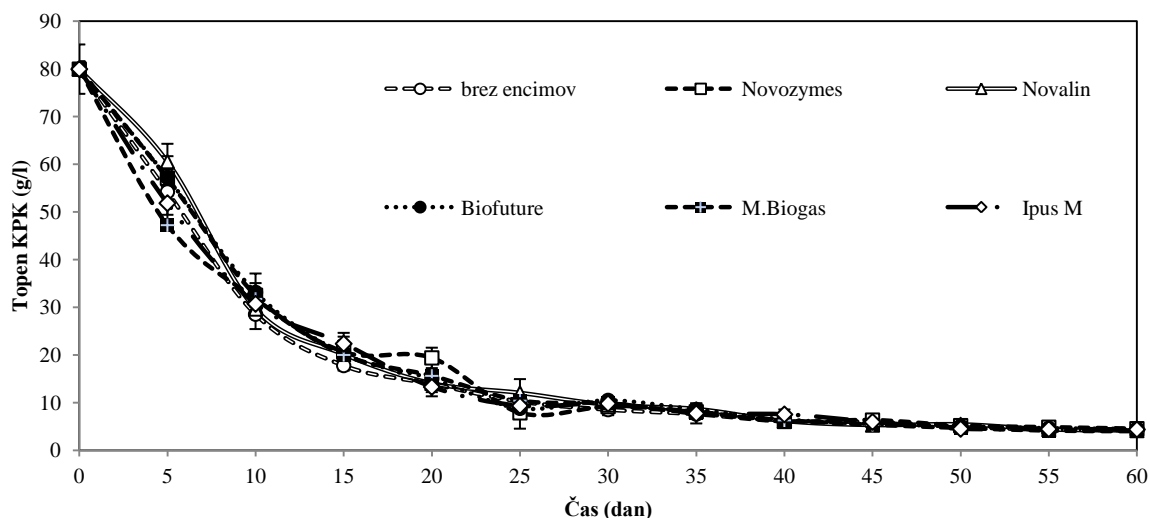
obremenitvi 5 kg OS/m³ dan. Organsko obremenitev so potem znižali na 2,5 do 3 kg OS/m³ dan, da so ostali znotraj stabilnega območja.



Grafikon 69: Prevodnost v anaerobnih reaktorjih, ki smo jim dodajali encime in anaerobnih reaktorjih brez dodajanja encimov v eksperimentu 13.

Graph 69: Conductivity in anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes in experiment 13.

Na grafikonu 69 je predstavljena prevodnost v anaerobnih reaktorjih ob različnih dnevih. V vseh primerih smo največjo prevodnost izmerili takoj na začetku eksperimenta, tretji dan se je gibala med 24 in 25 mS/cm. Do 25 dne smo zabeležili velik upad na okrog 11 mS/cm, petinštirideseti in šestdeseti dan pa se je prevodnost v vseh anaerobnih reaktorjih ustalila pri okrog 6 mS/cm. Razlike med posameznimi reaktorji so bile zanemarljive, zato lahko sklepamo, da dodajanje encimov ni imelo vpliva na prevodnost. Glavni vpliv na prevodnost je imel način ogrevanja reaktorjev.



Grafikon 70: Spreminjanje koncentracije topnega KPK v anaerobnih reaktorjih v eksperimentu 13.

Graph 70: Variations in soluble COD concentrations in anaerobic reactors in experiment 13.

Začetna koncentracija topnega KPK v vseh anaerobnih reaktorjih je znašala okrog 80 g/l (grafikon 70). Do petnajstega dneva je ta še naprej strmo padala v vseh primerih, nakar se je padanje do šestdesetega dneva počasi umirilo in za vse primere ustavilo okrog koncentracije med 3,97 in 4,52 g/l. Zmanjšanje koncentracije topnega KPK bi lahko pomenilo, da je dehidrirano blato Paloma slabše topno, organska snov je težje dostopna mikroorganizmom, posledično se je tvorba metana čez čas zmanjšala. Zaradi upadanja tvorbe metana smo izmerili tudi viskoznost kot funkcijo deformacijske hitrosti iztoka iz anaerobnih reaktorjev. Grafi so prikazani v prilogi G. Iz rezultatov meritev je možno sklepati, da encimi niso imeli vpliva na viskoznost. Višja viskoznost na začetku eksperimenta izvira iz viskoznosti uporabljenega inokuluma.

Ugotovitve iz eksperimenta 13

Dehidrirano blato iz papirniške industrije tudi po dehidraciji vsebuje veliko vode. Njegovo odstranjevanje z odvozom na primerna odlagališča ali v sežigalnico predstavlja okrog 60 % celotnih stroškov za čiščenje take odpadne vode. Pričakovati je, da se bodo stroški v Evropi in ZDA zaradi zaostrovanja standardov pri čiščenju odpadne vode, višanja cen goriv in zmanjševanja razpoložljivih površin za odlaganje blata, povečali (Wood et al., 2009). Zato stabilizacija z anaerobno presnovo odpira drugačno možnost ravnanja s tem organsko razgradljivim odpadkom, katerega stranski produkt je naravni vir energije v obliki bioplina. V našem eksperimentu smo uspeli šestdeset dni nepretrgoma proizvajati biometan iz dehidriranega blata iz Palome. Kljub nihanju različnih parametrov tvorba metana za različne šarže ni nihala, čeprav je zelo počasi upadala. Z dodajanjem prašičje gnojevke smo trend počasnega padanja uspeli zaustaviti. Razmerje HOK/CAO nakazuje na nizko alkalnost, ki je s časom padla in koncentracijo kislin, ki je sicer na začetku upadla, potem pa začela močno nihati, kar nakazuje, da je treba količinsko zmanjšati vnos dehidriranega blata. Po drugi strani se je koncentracija topnega KPK čez čas zmanjšala in stabilizirala med 3,9 in 4,5 g/l. Iz tega lahko sklepamo, da je dehidrirano blato v vodi slabo topno in kot tako nedostopno kot vir hrane mikroorganizmom in posledično slabo razgradljivo. Najverjetneje mineralne snovi, ki jih je vsebovalo dehidrirano blato v vodi niso bile topne, zato je tudi prevodnost po šestdesetih dnevih močno padla (Preglednica 41). Z encimi smo v obdobju 60-ih dni uspeli povečati tvorbo biometana za 43 %. Uporaba encimov je enostavna, ni nam potrebno vgrajevati dodatne strojne opreme za predobledalo substratov, prav tako nimamo dodatnih stroškov s servisiranjem, vzdrževanjem in obrabo morebitne dodatne strojne opreme. Ekonomsko se uporaba encimov izplača v primeru, če so stroški nakupa, skladiščenja, ravnanja in doziranja encimov v anaerobne reaktorje manjši od prihodka, ki ga ustvarimo zaradi povečane tvorbe metana na račun dodajanja hidrolitskih encimov.

Preglednica 41: Opažene spremembe med reaktorji, ki smo jim dodajali različne hidrolitske encime.
Table 41: Changes in reactors due to pretreatments with different hydrolytic enzymes.

Parameter	Razlike med reaktorji	Spremembe v obdobju od t_0 do $t_{končni}$
prevodnost	ni bistvenih razlik	padec za 75 %
NH_4^+ -N	ni bistvenih razlik	padec za 70 %
$N_{celotni}$	ni bistvenih razlik	padec za 55 %
topen KPK	ni bistvenih razlik	padec za 90 %
pH	majhne razlike v obsegu med 7,3 in 7,55	padec za 8 % (iz 7,9 na 7,3)
CAO	opazne manjše razlike med reaktorji	zmanjšanje med 30 % in 40 %
HOK	velike razlike med reaktorji, nihanje	velika nihanja, padec tudi do 70 %
CAO/HOK	velike razlike med reaktorji, nihanje	velika nihanja, dvig za 46 %
BMP	opazne razlike med reaktorji	povečanje tvorbe metana za 43 % pri dodajanju encimov Novozymes in Novalin

4.4 Rezultati računske optimizacije sestave substratov za določevanje biometanskega potenciala

Z uporabo programske opreme *STATISTICA* smo naredili grafe površinskih plastnic in 3D površinske grafe, ki prikazujejo optimalno kombinacijo mešanic za podane substrate glede na delež organske snovi, ki jo prispevajo. Najboljše rezultate smo dobili pri uporabi specialnega kubičnega modela, zato v nadaljevanju prikazujemo samo te rezultate. Za vse kombinacije smo v tabelah podali tudi statistiko. Vrednost R^2 predstavlja merilo prilaganja premice, ki jo dobimo iz regresijske enačbe. Primernost modela smo ocenili z determinacijskim koeficientom R^2 , ki odraža povezavo med eno ali več napovedanimi spremenljivkami. Bližje številki 1 je ta vrednost, boljše je prilaganje. Vrednost p je definirana kot najmanjši nivo pomembnosti, ki zavrne ničto hipotezo, da ni razlik. Zaželeno je, da so vrednosti p majhne, kar pomeni, da imajo korespondenčni koeficienti pomemben vpliv (Rao et al., 2011). Ustreznost modelov smo prav tako testirali s F – testom, s katerim testiramo razlike med variancami. F -test za testiranje regresijskega modela pove, da manjša, kot je vrednost F , boljši je regresijski model.

4.4.1 Rezultati optimizacije BMP treh kombinacij substratov

Za modeliranje smo uporabili naslednje substrate: blato iz procesa Kraft, blato iz papirniške industrije Paloma, koruzna silaža in biološki odpadki. Na 3D in ploščinskih grafih smo naenkrat lahko prikazali kombinacije za samo 3 substrate, zato smo prikazali naslednje grafe kombinacij:

- blato iz papirniške industrije Paloma + koruzna silaža + biološki odpadki
- blato iz procesa Kraft + blato iz papirniške industrije Paloma + biološki odpadki
- blato iz procesa Kraft + koruzna silaža + biološki odpadki
- blato iz procesa Kraft + blato iz papirniške industrije Paloma + koruzna silaža

Preglednica 42: Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata iz Palome, koruzne silaže in bioloških odpadkov.

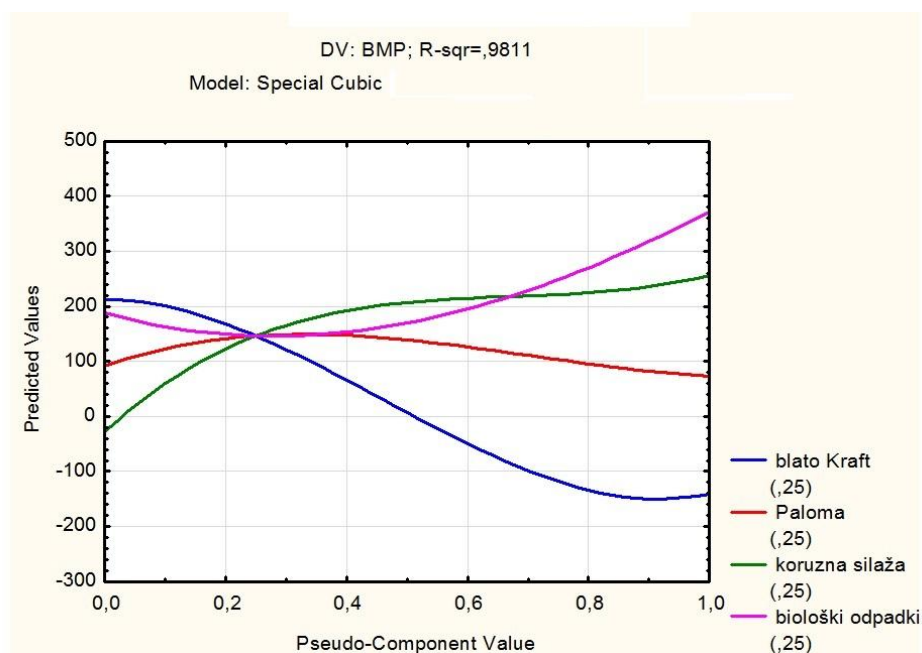
Table 42: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP of combinations paper sludge from Kraft process, silo maize and biological wastes.

Koeficient		Modeli – koeficienti regresije			Odziv BMP	
		Linearni	Kvadratni	Specialni kubični	Izmerjeni	Napovedani
(A) blato Kraft	b_1	-264,813	-154,527	-140,40	-140,400	-140,400
(B) Paloma	b_2	94,576	70,674	73,50	73,500	73,500
(C) koruzna silaža	b_3	252,253	248,728	256,47	256,100	256,467
(D) biološki odpadki	b_4	331,775	363,295	371,03	370,600	371,033
AB	b_{12}	-	-76,981	-184,60	-132,700	-132,667
AC	b_{13}	-	-456,881	-652,93	-79,600	-79,600
AD	b_{14}	-	-795,881	-991,93	-105,200	-105,200
BC	b_{23}	-	81,493	88,87	187,200	187,200
BD	b_{24}	-	-0,041	7,33	224,100	224,100
CD	b_{34}	-	295,926	214,87	367,300	367,467
ABC	b_{123}	-	-	5634,23	90,400	90,400
ACD	b_{134}	-	-	2346,90	212,00	212,000
BCD	b_{234}	-	-	-1518,20	146,100	146,233
p		0	0,00003	0,00003	-	-
R^2		0,822957	0,944773	0,981115	-	-
F		54,23	10,66	16,67	-	-

$$\begin{aligned} \text{odziv BMP} = & -140,4x_1 + 73,5x_2 + 256,47x_3 + 371,03x_4 - 184,60x_1x_2 - 652,93x_1x_3 \\ & - 991,93x_1x_4 + 88,87x_2x_3 + 7,33x_2x_4 + 214,87x_3x_4 + 5634,23x_1x_2x_3 \\ & + 2346,9x_1x_3x_4 - 1518,2x_2x_3x_4 \end{aligned}$$

Z uporabo ANOVA smo statistično preverili primernost modelov. V vseh primerih modeliranja kombinacij papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata iz Palome, koruzne silaže in bioloških odpadkov se je izkazalo, da je najboljši specialni kubični model, katerega napovedane vrednosti se najbolj prilegajo izmerjenim vrednostim ($R^2 = 0,981115$) in je model statistično pomemben ($p < 0,05$, $F = 16$).

Največji BMP z uporabo modeliranja smo napovedali pri kombinaciji, kjer uporabljamo samo koruzno silažo in biološke odpadke, ostalih dveh substratov pa ne dodajamo. Dodajanje blata Kraft in blata iz Palome v vseh primerih tako v modelu kot v eksperimentu zmanjša biometanski potencial. Na grafikonu 71 smo podali odziv vseh 4 substratov na napovedani biometanski potencial, ob pogoju, da v presečišču vseh krivulj vsi substrati prispevajo 25 % organske snovi. Z zmanjševanjem organske snovi posameznega substrata, krivulje ostalih substratov prikazujejo enakomerno porazdeljeno organsko obremenitev med te tri substrate. Tako v primeru doziranja samo bioloških substratov dobimo napovedano vrednost BMP 371 ml $\text{CH}_4/\text{g OS}$. Z zmanjševanjem deleža bioloških odpadkov na organsko obremenitev 0, so organske obremenitve ostalih substratov 0,33:0,33:0,33 (vsota štirih je 1), pri 25 % organski obremenitvi (0,25) pa so tudi pri ostalih v razmerju 0,25:0,25:0,25 (vsota vseh 4 je enaka 1).

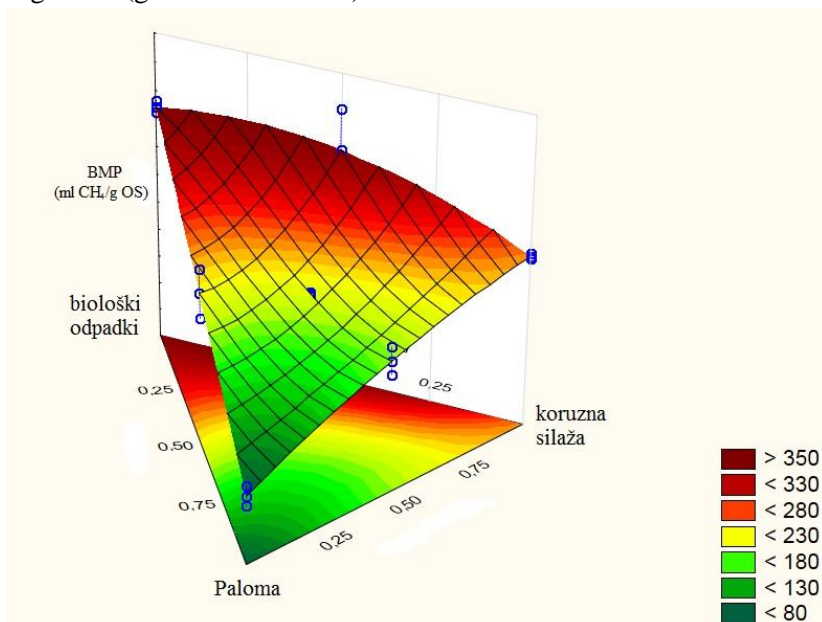


Grafikon 71: Specialni kubični model napovedanih vrednosti BMP za mešanice papirniškega blata iz procesa Kraft, papirniškega blata Poloma, silo maize in bioloških odpadkov glede na delež organske obremenitve posameznega substrata. V presečišču vseh krivulj je delež organske snovi vsakega substrata 0,25.

Graph 71: Trace plot of estimated responses of BMP of Kraft process sludge, paper pulp sludge from Paloma, silo maize and biological wastes. At the intersection of the curves organic proportion of each substrate is 0,25.

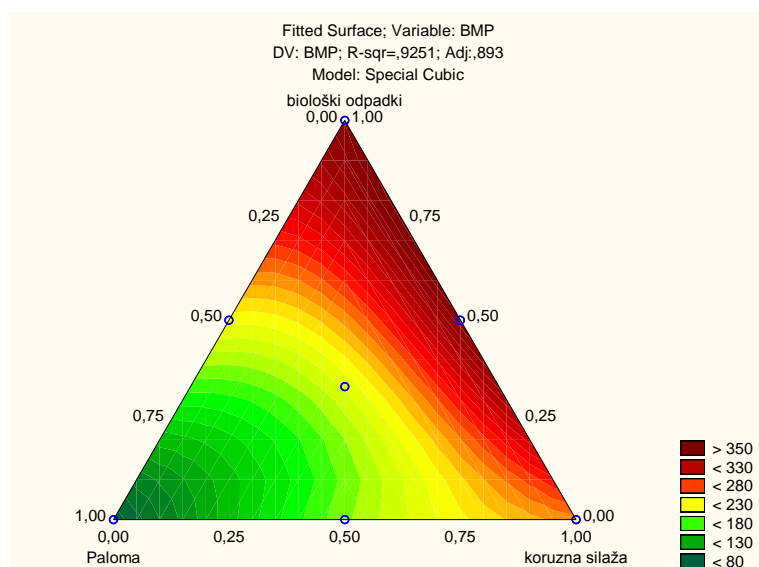
Iz enačbe odziva smo izračunali, da je najboljši odziv BMP, ki znaša 382,67 ml CH₄/g OS, pri kombinaciji, kjer imamo 0,25 deleže koruzne silaže in 0,75 delež bioloških odpadkov.

Na 2D in 3D grafih kombinacij lahko lažje razberemo katere kombinacije so se izkazale za najboljše. Območja, ki so obarvana s temno rdečo barvo, imajo najboljši odziv BMP. V vseh primerih, kjer kombiniramo tudi blato Kraft, se odziv BMP ob večanju deleža tega blata zmanjšuje in je lahko tudi negativen (grafikoni 74 do 79).



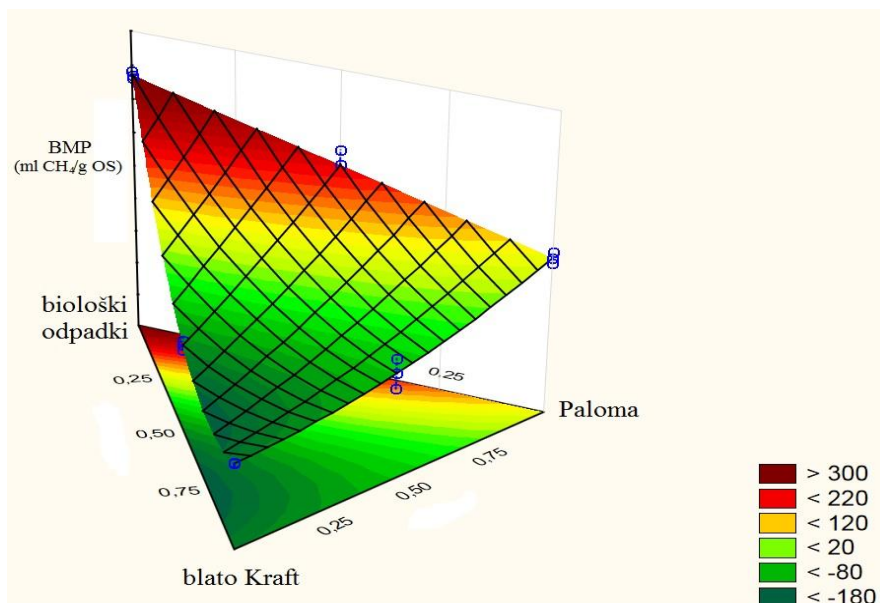
Grafikon 72: 3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, bioloških odpadkov in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 72: Mixture 3D surface plots maize of special cubic model for paper sludge from Paloma, biological wastes and silo maize regarding to fraction of organic matter of each substrate.



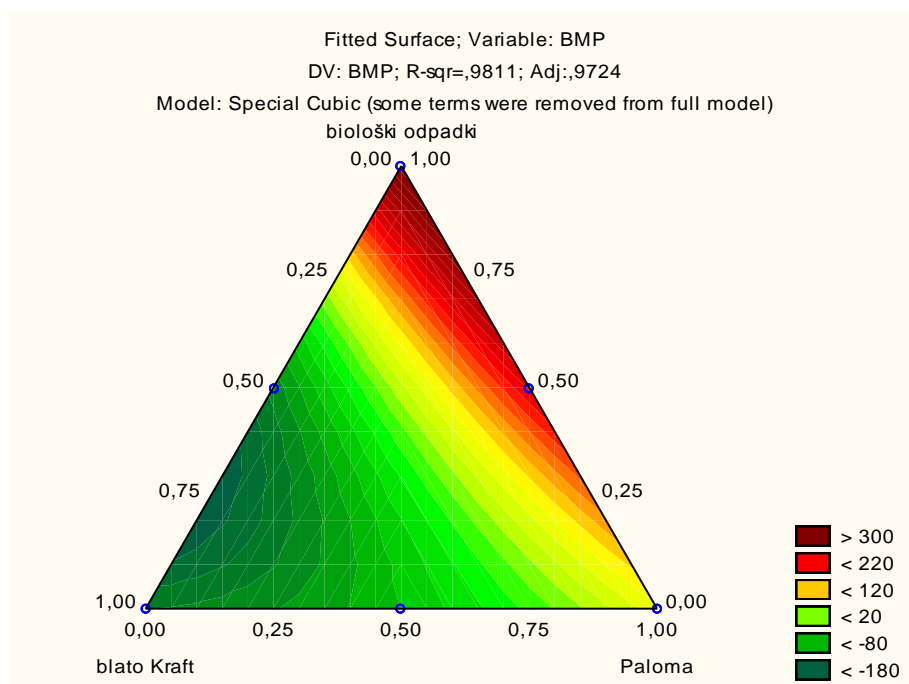
Grafikon 73: Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Paloma, bioloških odpadkov in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 73: Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of paper sludge from Paloma, biological wastes and silo maize regarding to fraction of organic matter of each substrate.



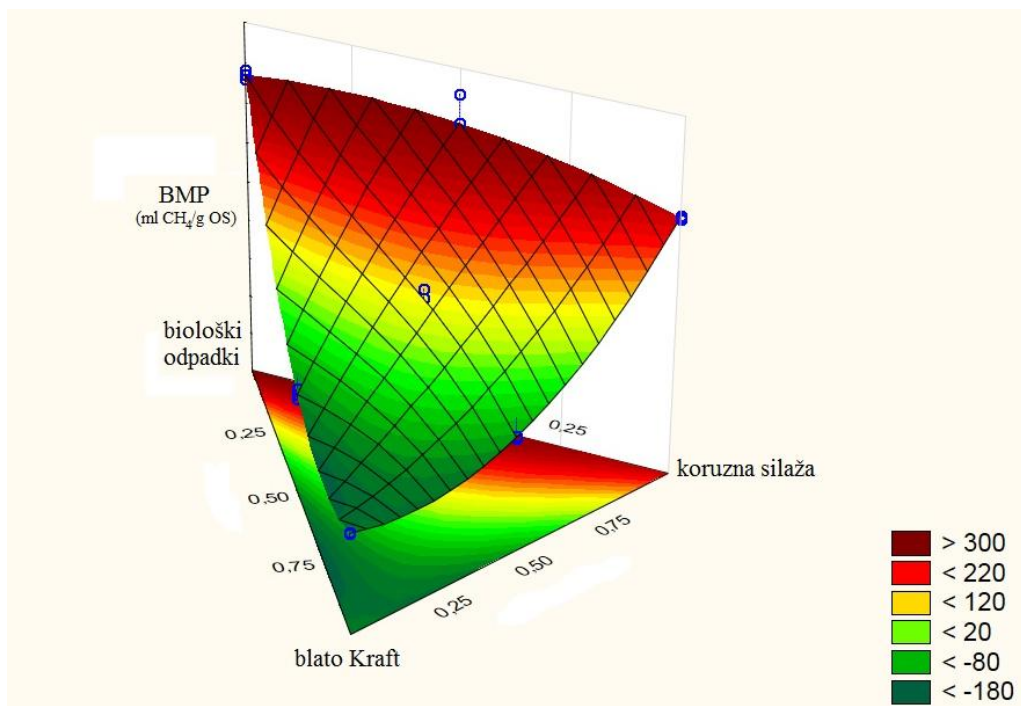
Grafikon 74: 3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, bioloških odpadkov in papirniškega blata iz procesa Kraft, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 74: Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture paper sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.



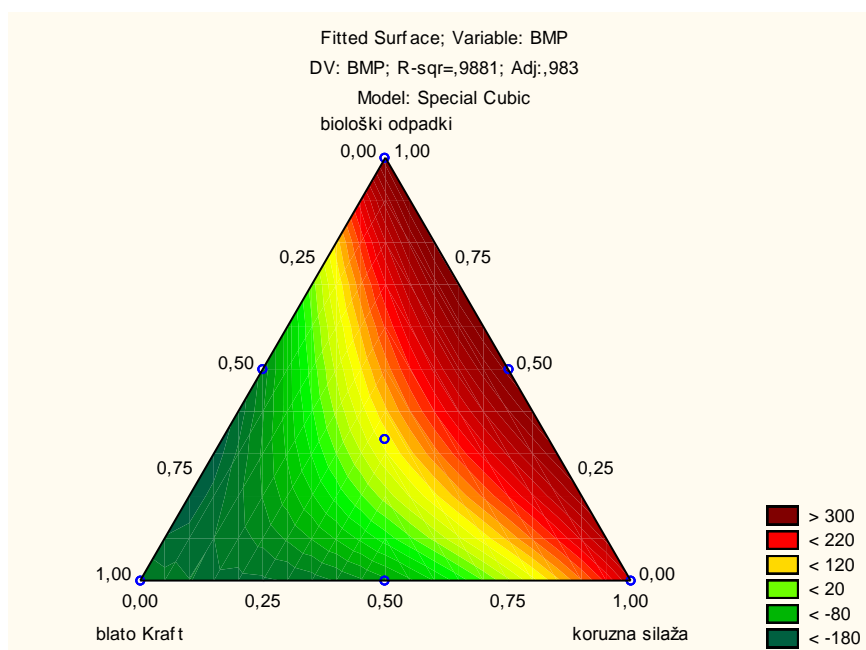
Grafikon 75: Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Paloma, bioloških odpadkov in papirniškega blata iz procesa Kraft, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 75: Overlaid contour plot of special cubic model for mixture paper sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.



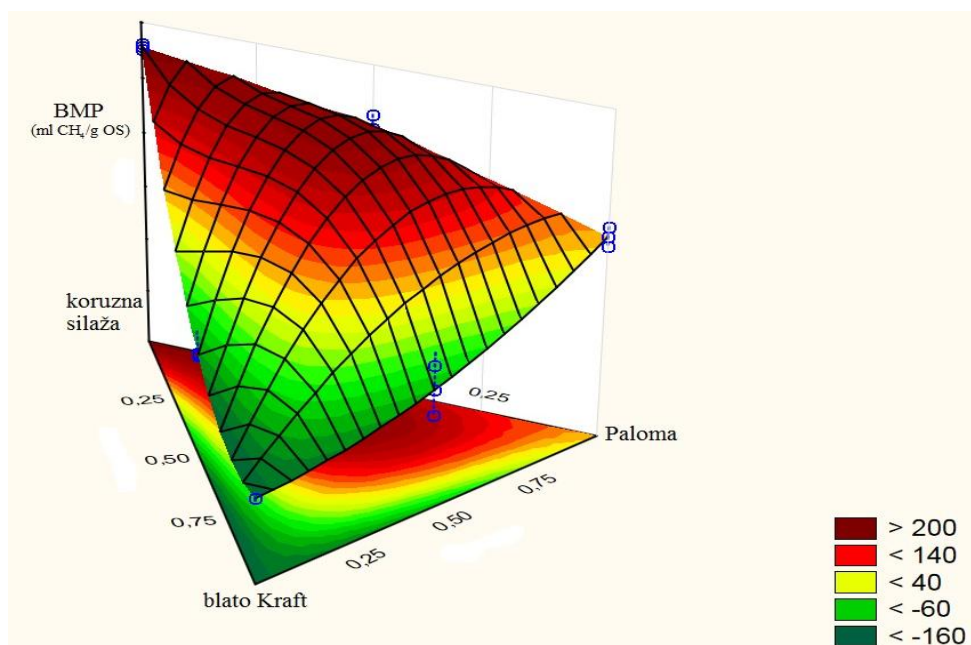
Grafikon 76: 3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice bioloških odpadkov, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 76: Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture of silo maize, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.



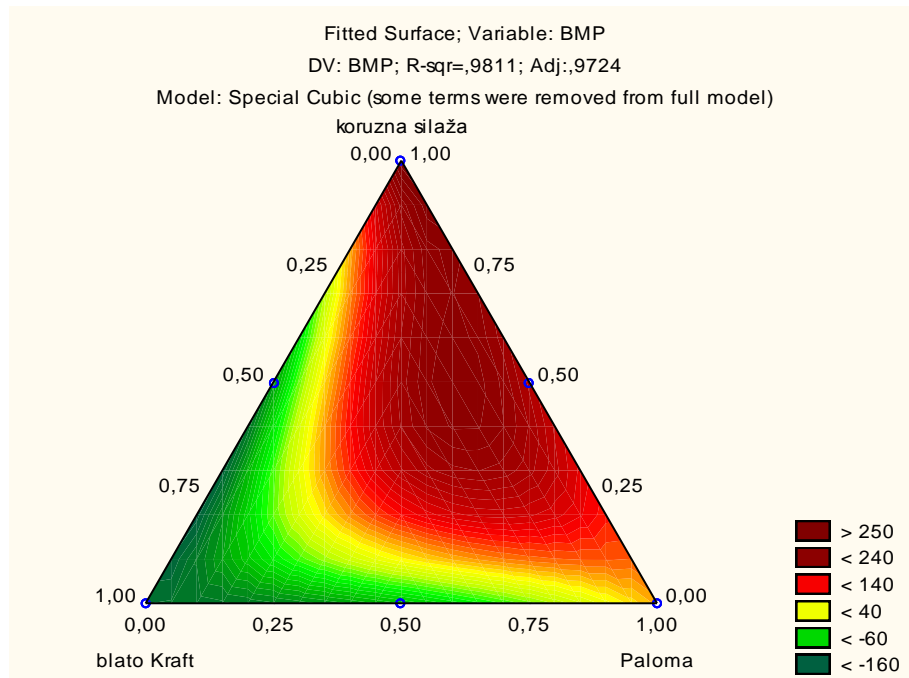
Grafikon 77: Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice bioloških odpadkov, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 77: Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of silo maize, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.



Grafikon 78: Ploščinski prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 78: Mixture 3D surface plots of special cubic model for mixture of paper pulp sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.



Grafikon 79: 3D prikaz napovedanih vrednosti BMP specialnega kubičnega modela za mešanice Palome, papirniškega blata iz procesa Kraft in koruzne silaže, glede na delež organske obremenitve posameznega substrata.

Graph 79: Overlaid contour plot of special cubic model for mixture of paper pulp sludge from Paloma, biological wastes and paper pulp sludge from Kraft process regarding to fraction of organic matter of each substrate.

4.4.2 Modeliranje BMP kombinacije blata iz ČN in bioloških odpadkov

Za modeliranje kombinacije dveh substratov smo lahko uporabili kvadratni model, program pa nam ne omogoča, da bi rezultate grafično prikazali, zato je podana samo preglednica. Ker imamo samo dve neodvisni spremenljivki, specialnega kubičnega modela nismo mogli uporabiti. Pri modeliranju kombinacij blata iz ČN in bioloških odpadkov se je izkazalo, da ne linearni in ne kvadratni model nista najboljša za napovedovanje odziva BMP, saj je bilo prileganje slabo ($R^2 = 0,79297$; $F = 6,5879$), kljub temu, da je kvadratni model statistično pomemben ($p < 0,05$). Enačbo odziva BMP smo podali pod preglednico 43.

Preglednica 43: Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij blata iz ČN in bioloških odpadkov.

Table 43: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP of combinations wastewater sludge and biological wastes.

Koeficient		Modeli – koeficienti regresije			Odziv BMP	
		Linearni	Kvadratni	Specialni kubični	Izmerjeni	Napovedani
(A) biološki odpadki	b_1	305,7383	318,637	-	308,8700	318,6367
(B) blato iz ČN	b_2	235,2551	248,153	-	248,1534	248,1534
AB	b_{12}	-	-154,780	-	244,7000	244,7000
p		0,019405	0,042524	-	-	-
R^2		0,565655	0,792970	-	-	-
F		9,116213	6,587902	-	-	-

Enačba odziva BMP:

$$\text{odziv BMP} = 318,637x_1 + 248,153x_2 - 154,78x_1x_2$$

4.4.3 Modeliranje BMP kombinacije blata iz ČN in zelenega odreza

Za modeliranje kombinacije blata iz ČN in zelenega odreza smo lahko uporabili kvadratni model. Program ne omogoča, da bi rezultate grafično prikazali, zato je podana samo preglednica 44. Ker imamo samo dve neodvisni spremenljivki, specialnega kubičnega modela nismo mogli uporabiti.

Preglednica 44: Regresijski koeficienti za linearni, kvadratni in specialni kubični model za pričakovani odziv BMP kombinacij blata iz ČN in zelenega odreza.

Table 44: Regression coefficient for linear and quadratic model for expected response of BMP from combinations of wastewater sludge and green cuttings.

Koeficient		Modeli – koeficienti regresije			Odziv BMP	
		Linearni	Kvadratni	Specialni kubični	Izmerjeni	Napovedani
(A) blato iz ČN	b_1	408,5727	440,621	-	470	440,62
(B) zeleni odrez	b_2	137,3489	167,981	-	154	167,99
AB (1:1)	b_{12}	-	-315,210	-	299	225,49
p		0,000033	0,093181	-	-	-
R^2		0,604707	0,663468	-	-	-
F		29,06563	3,14291	-	-	-

Pri modeliranju kombinacij blata iz ČN in zelenega odreza se je izkazalo, da ne linearni in ne kvadratni model nista najboljša za napovedovanje odziva BMP, saj je bilo prileganje slabo ($R^2 = 0,663468$; $F = 3,14291$), kvadratni model statistično nepomemben ($p > 0,05$).

Enačba odziva BMP je naslednja:

$$\text{odziv BMP} = 440,621x_1 + 167,981x_2 - 315,21x_1x_2$$

V preglednici 45 so podani napovedani odzivi BMP v primerjavi z izmerjenimi BMP. Iz podatkov je možno razbrati, da se vrednosti izmerjenega in napovedanega BMP precej razlikujejo.

Preglednica 45: Izmerjeni in napovedani biometanski potencial kombinacij blata iz čistilne naprave in bioloških odpadkov z modeliranjem s programom STATISTICA.

Table 45: Measured and predicted response using STATISTICA for combinations of wastewater sludge and green cuttings for various combinations.

Razmerje organske obremenitve		Izmerjeni	Napovedani
blato iz ČN	zeleni odrez	BMP (ml CH ₄ /g OS)	BMP (ml CH ₄ /g OS)
1	0	470	440,62
0	1	154	167,99
0,5	0,5	299	225,49
0,75	0,25	280	313,36
0,85	0,15	275	359,53
0,9	0,1	321	384,99
0,95	0,05	507	412,02

4.4.4 Ugotovitve iz računske optimizacije sestave substratov za določevanje biometanskega potenciala

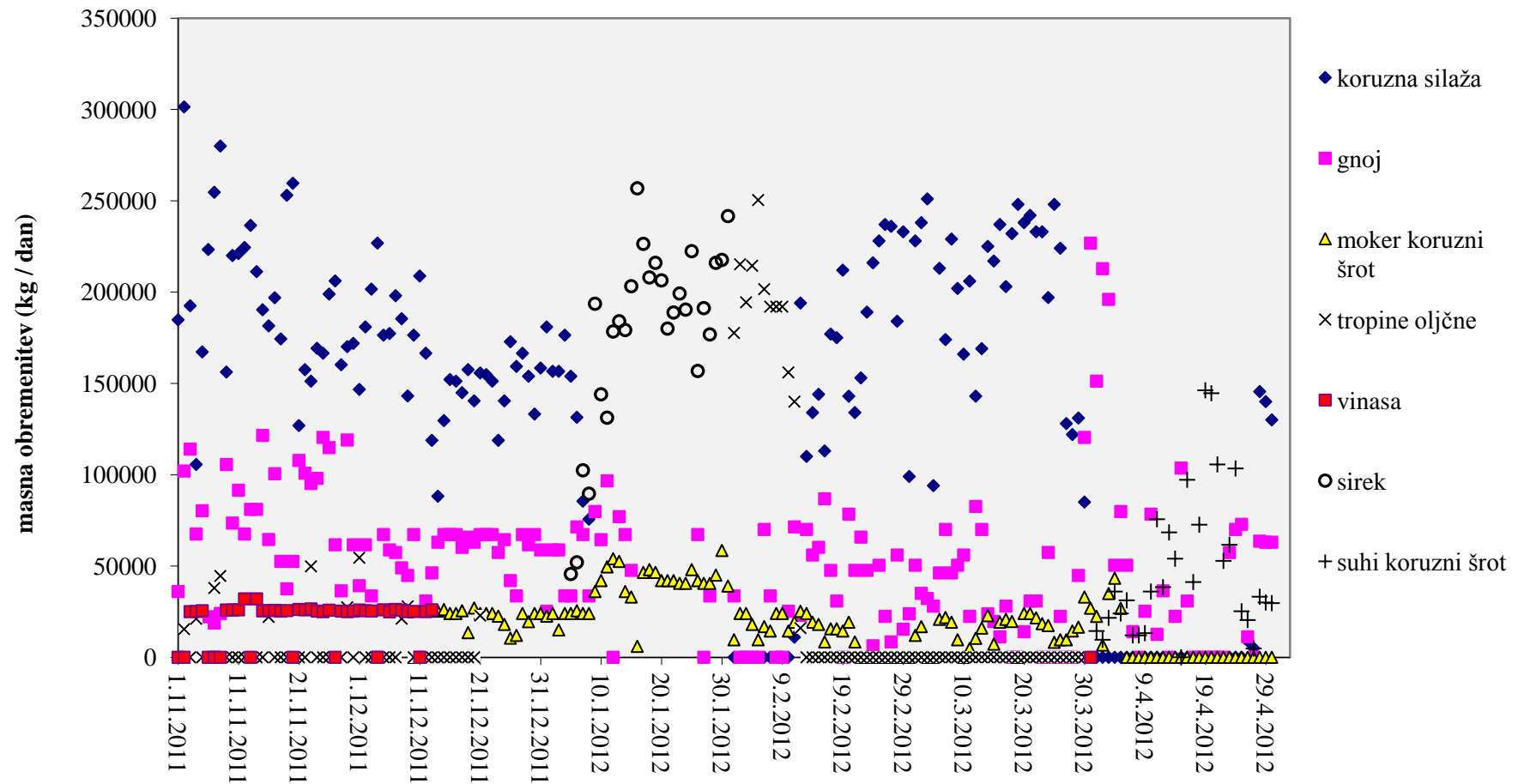
Za modeliranje kombinacije različnih substratov smo uporabili program *STATISTICA* in metodo Simplex-lattice. V primeru, kjer smo uporabili tri substrate, je največji vpliv na odziv BMP imelo blato Kraft in blato Paloma. Z manjšanjem njune količine, je odziv BMP naraščal. Oba substrata sta organsko slabše razgradljiva, blato Kraft pa je delovalo tudi inhibitorno na proces anaerobne presnove, kar je prikazano tudi v eksperimentu 11. Optimalni odziv BMP smo dosegli, če smo kombinirali koruzno silažo in biološke odpadke. Najboljše prileganje smo dosegli s specialnim kubičnim modelom, medtem ko linearni in kvadratni model nista primerna za napovedovanje optimalne kombinacije substratov za optimizacijo BMP.

4.5 Rezultati spremljanja delovanja BPE Vučja vas

Na BPE Vučja vas smo spremljali delovanje naprave. Lastnosti vhodnih pripravljenih substratov v štirih mešalnih jamah so prikazane v prilogi H na grafikonih H1 do H4. Povprečna suha snov v pripravljenih mešanicah v mešalnih jamah (MJ) je bila med 9,4 in 9,8 %, organska snov (v suhem vzorcu) med 76 in 77 %, vrednost pH pa okrog 7. Vsebnosti suhe snovi in organske snovi v mešalnih jamah skozi čas nista nihali, medtem ko je bilo nihanje pH precejšnje, kar je najverjetneje posledica doziranja različnih substratov (oljčne tropine, vinasa, sirek, koruzna silaža, koruzni šrot in gnoj) ob različnih dnevih (grafikon 84) in dodajanja različne količine vode in mešanja vsebine v mešalni jami pred doziranjem v anaerobni reaktor. Dnevna sestava doziranih substratov je podana v grafikonu 80. V mesecu novembru se je na bioplinarni kot substrat ob koruzni silaži, gnoju in oljčnih tropinah uporabljala tudi vinjasa, ki je stranski proizvod pri pridelavi sladkorja iz sladkornega trsa. Od sredine decembra 2011 do konca aprila 2012 so dozirali tudi povprečno 22880 kg suhega in mokrega koruznega šrota na dan. Oba sta poleg koruzne silaže vsebovala največ organske snovi v suhem vzorcu (grafikon 81). Vsebnost organske snovi gnoja je nihala zaradi različne vsebnosti slame, ki se uporablja kot nastilja za živino. Skupaj so tako v mesecu februarju iz vseh substratov, katerih mešanice so sestavili v mešalnih jamah in jih prečrpali v anaerobne fermentorje, dozirali med 9 in 11 t OS/m³ dan, kar je enako povprečju 10 g OS/l, kot v eksperimentih na pilotnem modelnem merilu. Substrati v mešalni jami so bili pripravljene, ko je delež dodane vode, ki so jo črpali iz zbiralnikov, dosegel okrog 93,5 %, (pripravljen substrat iz mešalnih jam je vseboval okrog 6,5 % SS) (grafikoni od 83 do 85). Organska snov v mešalnih jamah je prav tako nihala zaradi različne vrste doziranih substratov, načina mešanja, količine dodane vode, dolžine mešanja substrata v mešalni jami, segrevanja mešalnih jam na 30°C in produkcije metana, ki se je že pričela v mešalnih jamah.

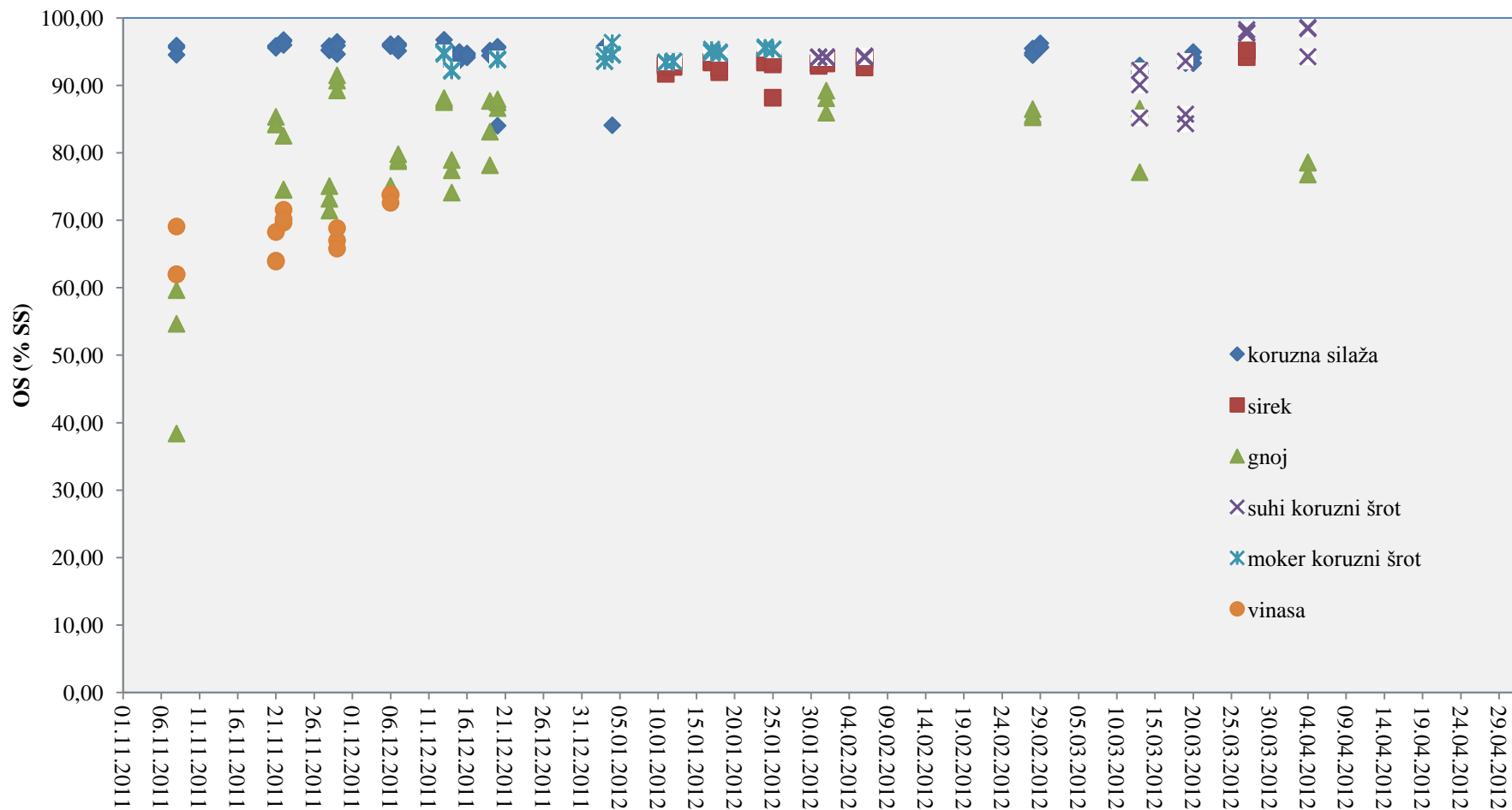
Zaradi sušnega obdobja, ki je nastopilo poleti 2011, je količina koruzne silaže, ki BPE Vučja vas predstavlja primarni substrat za tvorbo bioplina, bila omejena, po mesecu aprilu 2012 pa je doziranje substratov skorajda prekinjeno, zato smo monitoring prekinili v mesecu aprilu 2012. V anaerobnih fermentorjih in končnem zalogovniku 1 in 2 smo spremljali tudi dnevni nivo plina. Iz grafov 83 in 84 vidimo, da je tudi nivo plina skozi čas nihali, saj so ga kontinuirano porabljali plinski motorji, ki so proizvajali električno energijo in odvečno toploto. V mesecu aprilu, ko je začelo zmanjkovati substratov, vidimo da je nivo plina v fermentorju 3 in 6 padel pod 10 %. V končnih zalogovnikih je tudi nastajal plin, čeprav v ta dva anaerobna reaktorja nismo dozirali svežega substrata, ampak biomaso iz fermentorjev 3 in 6, vendar je količina metana v primerjavi s fermentorji od 1 do 6 bila majhna.

Sestavo plina nam na BPE Vučja vas niso dovolili prikazati, podajamo pa povprečno proizvedeno električno energijo (kW) in povprečno dnevno porabo plina na 4 plinskih motorjih, vsak nazivne moči 1 MW (grafikon 89). Povprečna dnevna elektrika na BPE Vučja vas (označeno kot Nova1, Nova 2, Nova 3 in Nova 4) se je gibala malo nad 1 MW. V mesecu januarju 2012 je prišlo do upada proizvodnje električne energije zaradi zamenjave koruzne silaže s sirkom, ki ima v primerjavi s koruzno silažo manjši biometanski izplen in posledično iz iste količine substrata dobimo manj metana. Po dodajanju oljčnih tropin, ki vsebujejo večji delež maščob, in koruzne silaže (od februarja 2012 naprej), je povprečna dnevna proizvedena električna energija spet narasla nazaj na 1 MW, vendar je v mesecu aprilu 2012 začela nihati zaradi pomanjkanja substratov. Podoben trend smo opazili tudi pri povprečni dnevni porabi plina na plinskih motorjih 1, 2, 3 in 4.

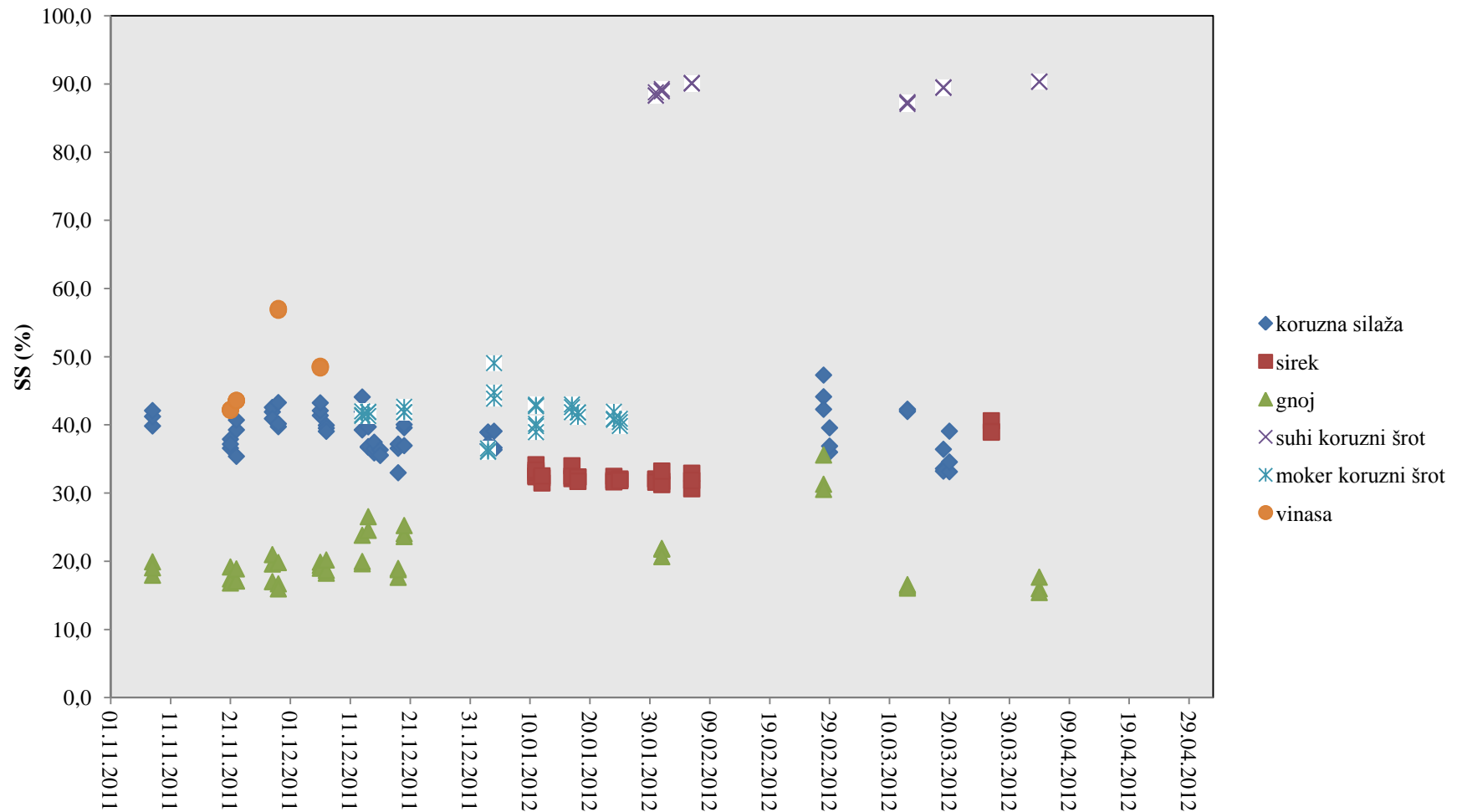


Grafikon 80: Gibanje dnevne količine različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.

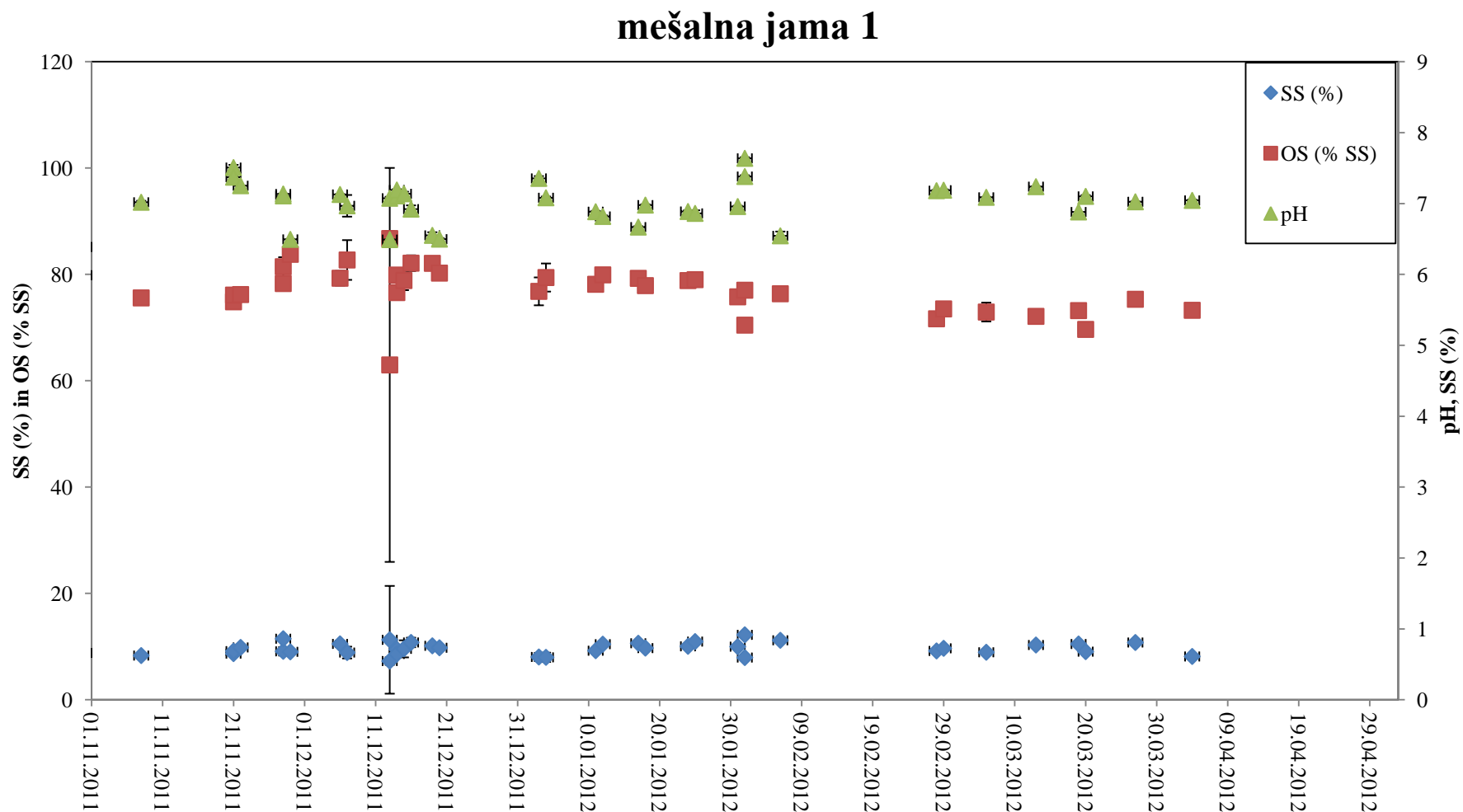
Graph 80: Variations in daily amount of different substrates used for anaerobic digesters in BGP Vučja vas.



Grafikon 81: Gibanje dnevne vsebnosti organske snovi različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.
 Graph 81: Daily variations in volatile solids of different substrates used in anaerobic digesters in BGP Vučja vas.

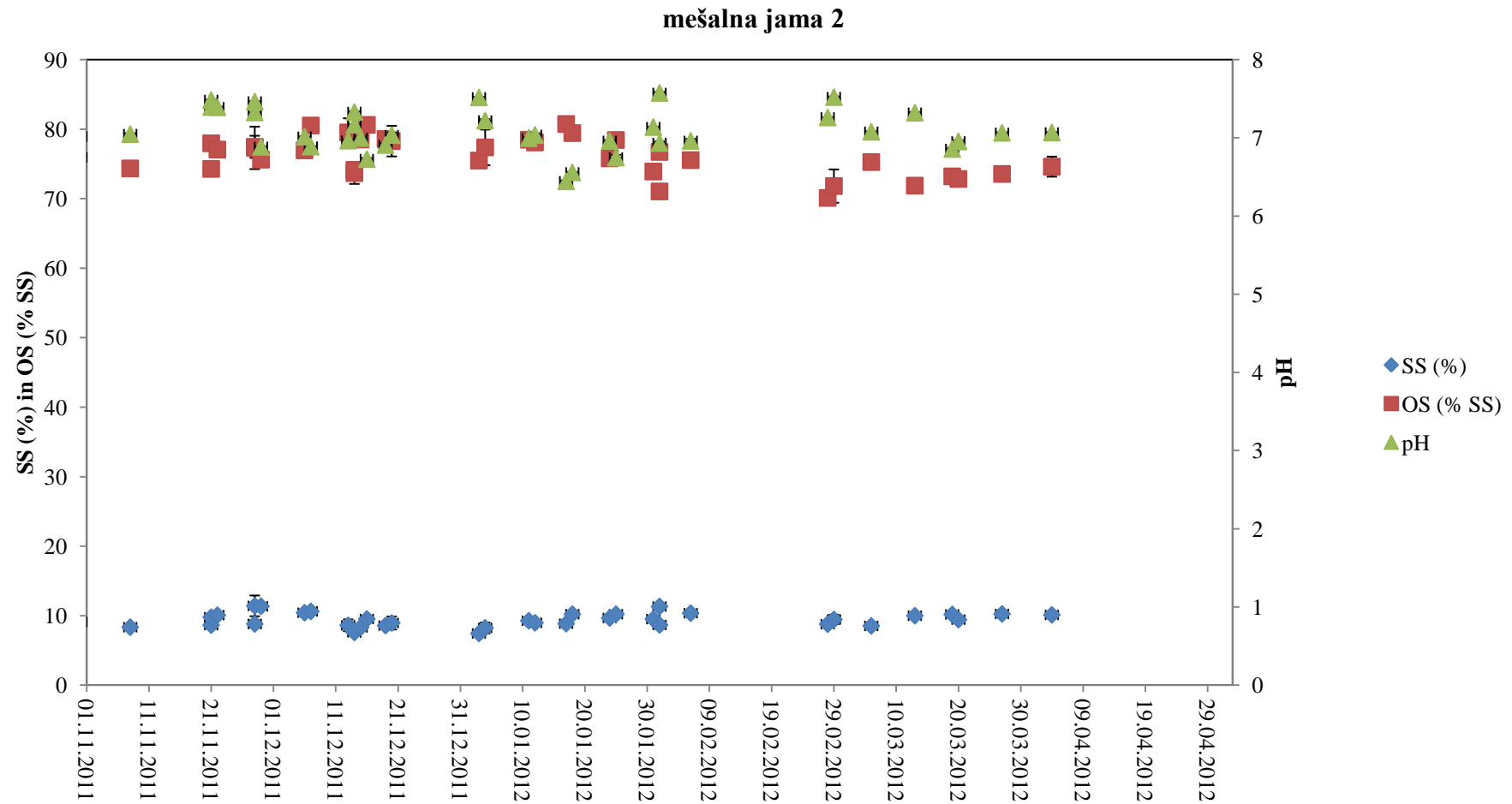


Grafikon 82: Gibanje dnevne vsebnosti suhe snovi različnih substratov, ki smo jih dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas.
 Graph 82: Daily variations in total solids of different substrates used in anaerobic digesters in BGP Vučja vas.



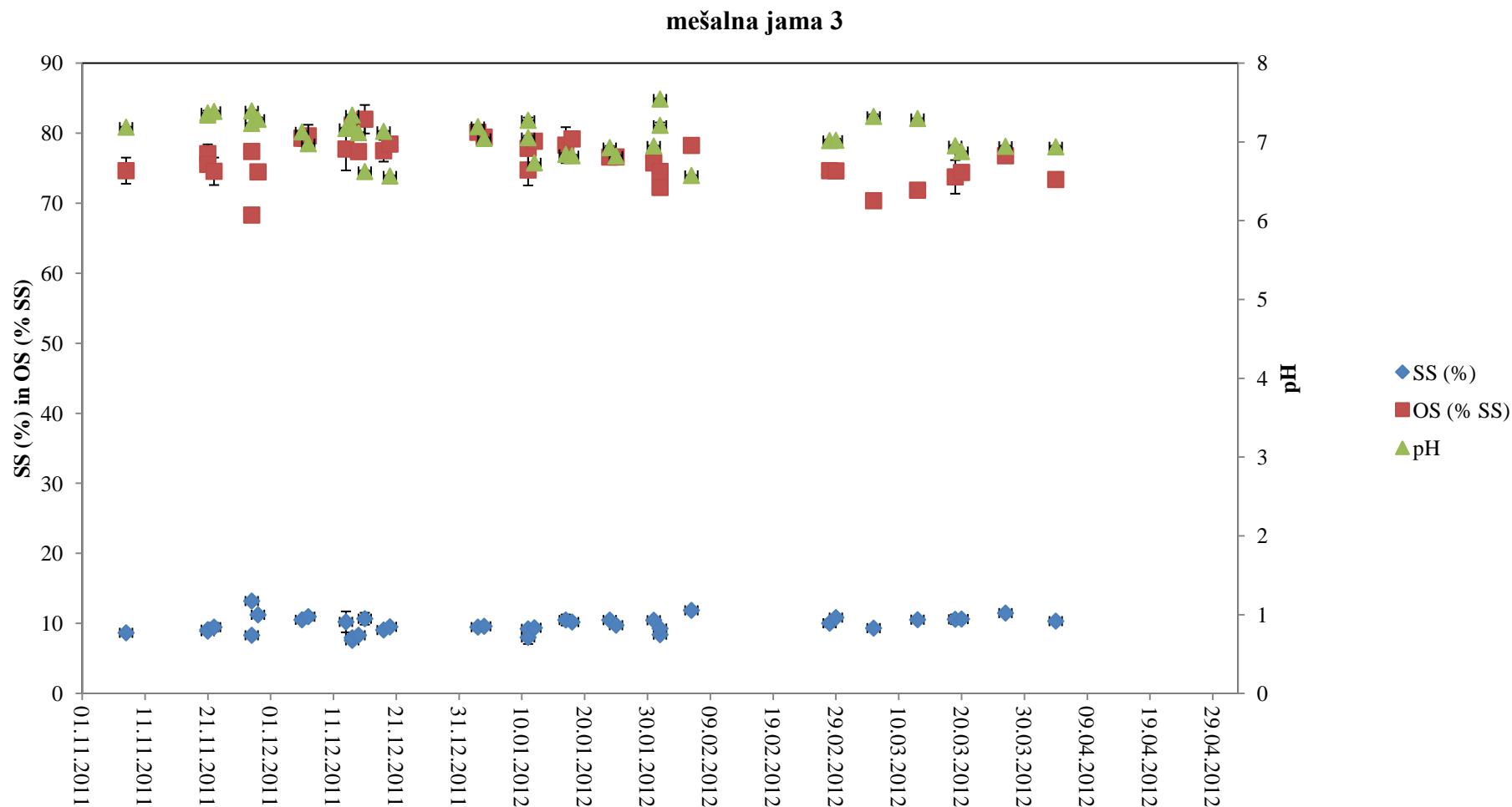
Grafikon 83: Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 1, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.

Graph 83: Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 1 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.



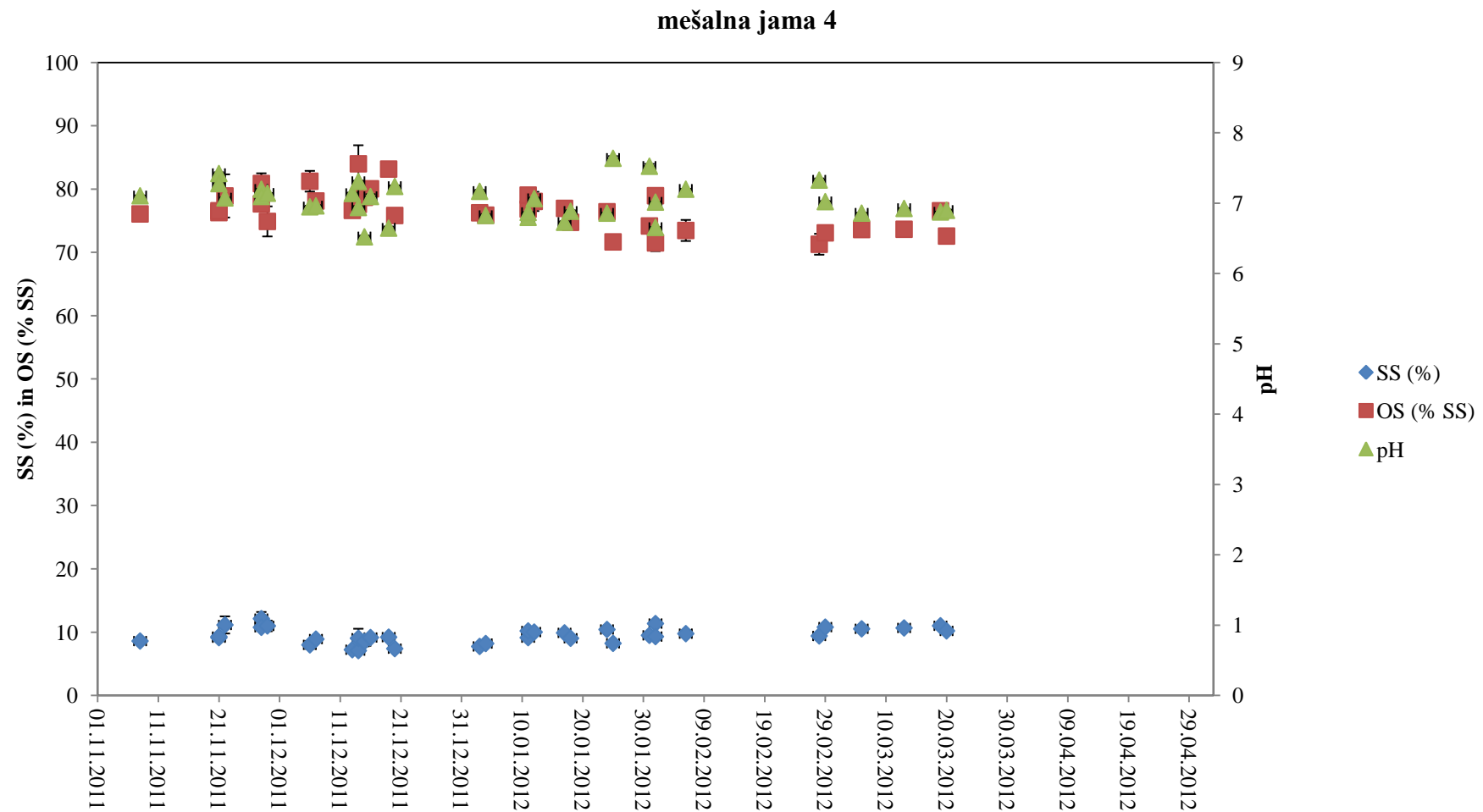
Grafikon 84: Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 2, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.

Graph 84: Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 2 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.



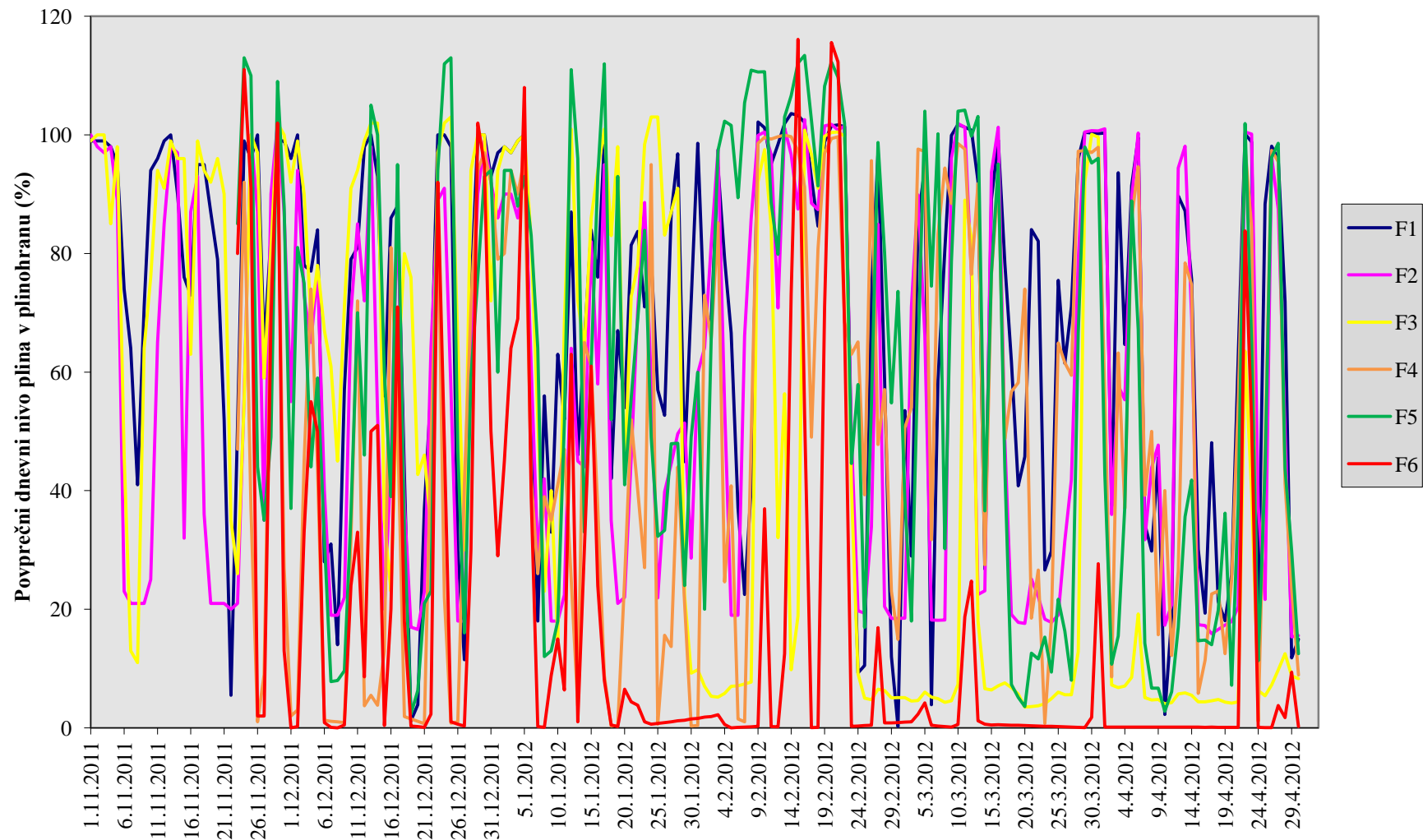
Grafikon 85: Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 3, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.

Graph 85: Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 3 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.



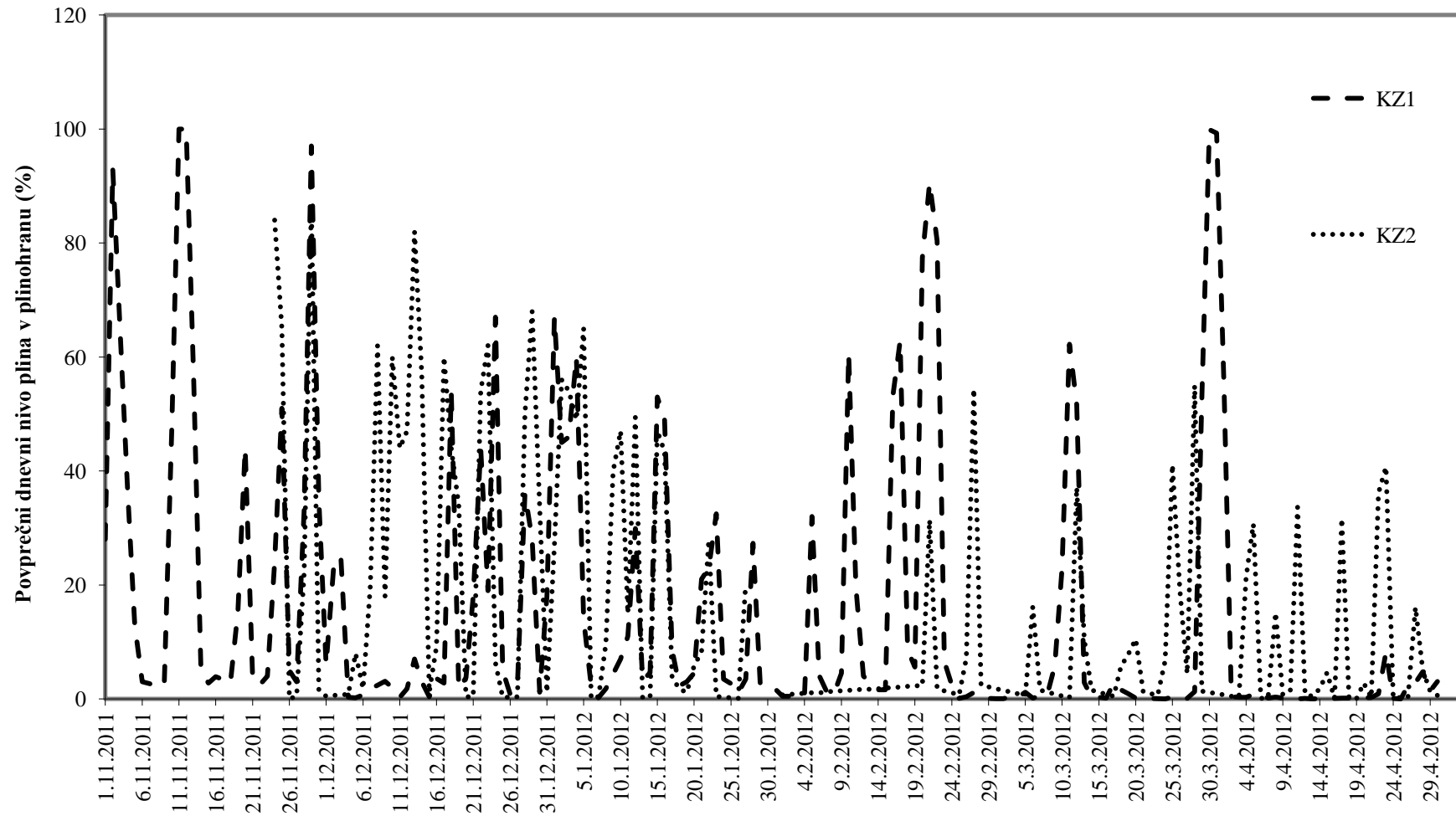
Grafikon 86: Izmerjena SS, OS in pH mešalne jame 4, preko katere smo substrate dozirali v anaerobne reaktorje BPE Vučja vas. Podanes so standarne deviacije meritev.

Graph 86: Daily changes in TS, VS and pH in mixtures of mixing chamber 4 that is used for dosing anaerobic digesters of BGP Vučja vas with standard deviations.



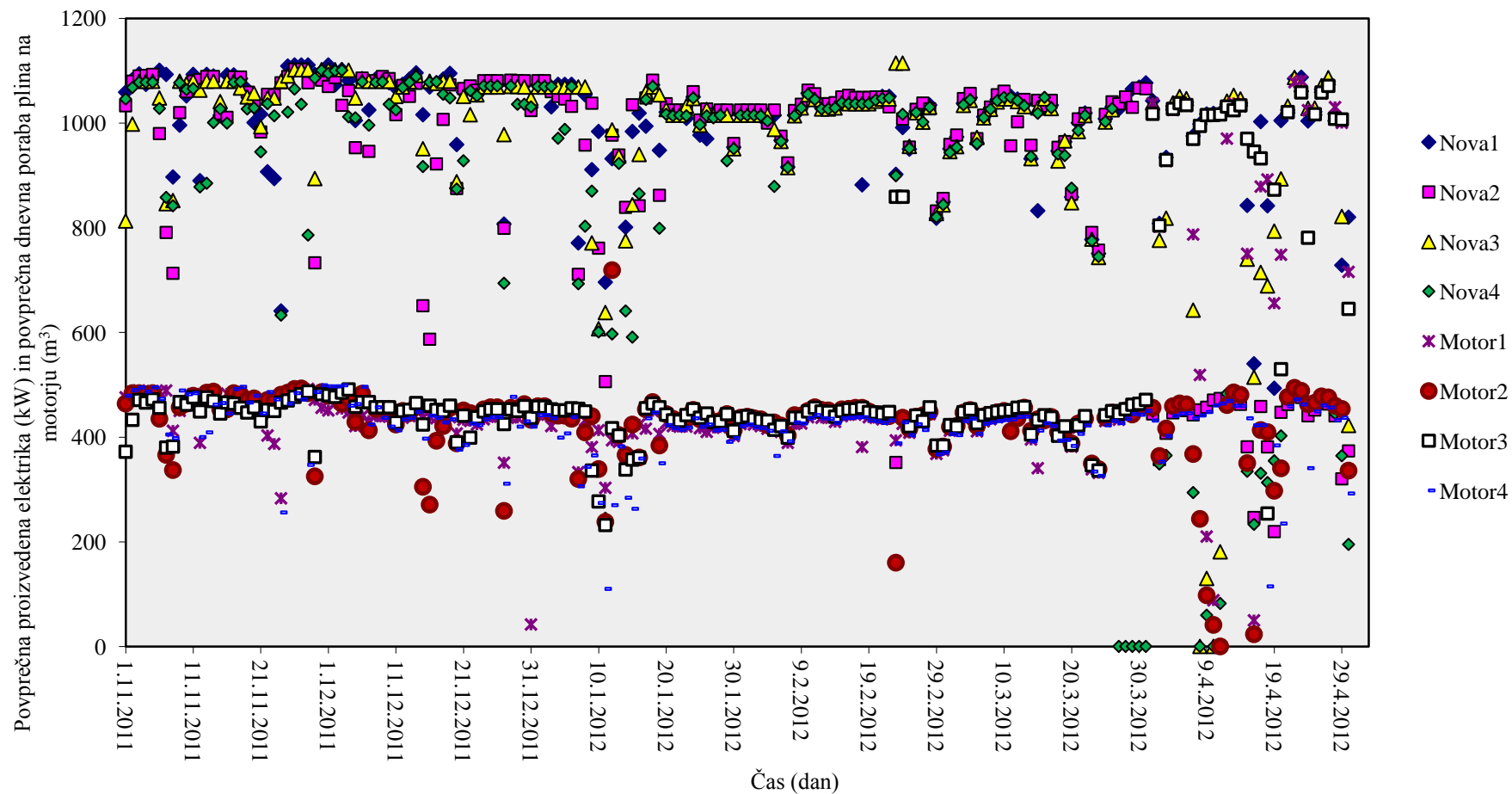
Grafikon 87: Dnevno gibanje nivoja plina v plinohranih nad anaerobnimi reaktorjih F1, F2, F3, F4, F5 in F6 BPE Vučja vas.

Graph 87: Daily variations of biogas level in gasholders on to of F1, F2, F3, F4, F5 and F6 of BGP Vučja vas.



Grafikon 88: Dnevno gibanje nivoja plina v plinohranah nad KZ1 in KZ2 na BPE Vučja vas.

Graph 88: Daily biogas level in gasholders on top of KZ1 and KZ2 of BGP Vučja vas.



Grafikon 89: Povprečna dnevna proizvodnja elektrike Nova1, Nova2, Nova 3, Nova 4 in povprečna dnevna poraba plina na plinskih motorjih na BPE Vučja vas.

Graph 89: Average daily electricity production from Nova1, Nova2, Nova 3, Nova 4 and average daily gas consumption of gas motors at BGP Vučja vas.

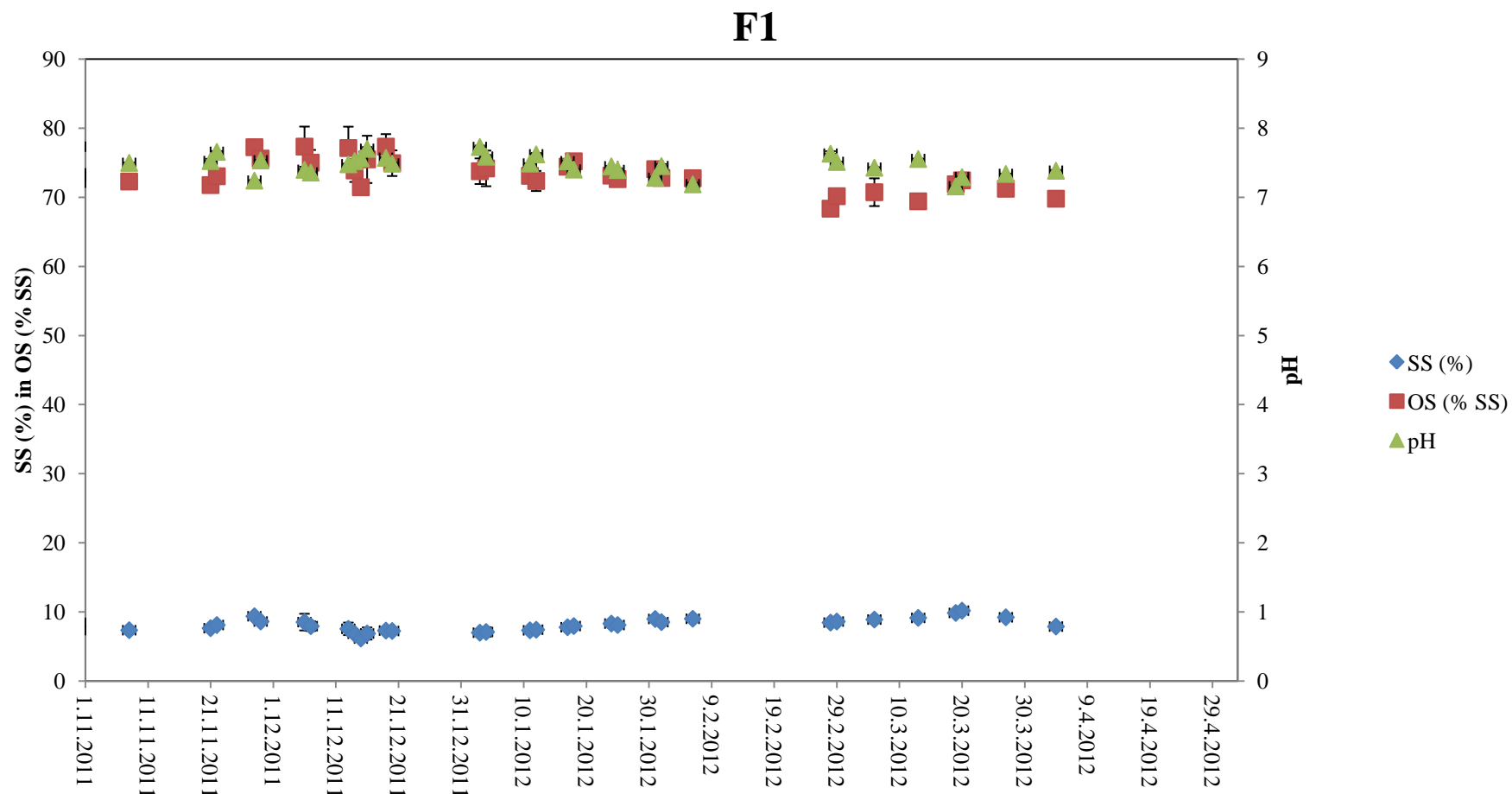
V mesecu januarju 2012, ko je padel tudi plinski nivo v plinohranih, kar pomeni, da je bila tvorba metana zmanjšana, je bila dnevna poraba plina na plinskih motorjih tudi manjša in zato tudi proizvodnja električne energije. Podobno je bilo tudi v mesecu aprilu 2012. V obdobju od novembra 2011 do marca 2012 se je v povprečju mesečno na BPE Vučja vas proizvedlo 2865 MW električne energije. V mesecu aprilu je mesečna proizvodnja padla na 1824 MW.

Organska obremenitev anaerobnih reaktorjev je tako od novembra 2011 pa do marca 2012, ko je bilo na razpolago dovolj substratov, znašala med 9 in 10 kg OS/m³ dan, v mesecu aprilu 2012, ko na voljo ni bilo dovolj substratov, je padla na 3,6 kg OS/m³ dan, posledično se je tudi tvorba bioplina zmanjšala. Povprečni hidravlični zadrževalni čas na BPE Vučja vas je znašal 100 dni (Priloga B).

Delovanje procesa anaerobne presnove smo spremljali v anaerobnem fermentorju 1 in 4, v katera smo tudi dnevno dozirali substrat. Delež suhe snovi v fermentorju 1 (F1) in 4 (F4) se je gibal okrog 8 %, delež organske snovi glede na suhi vzorec pa med 70 in 80 % v obeh primerih. Vrednost pH je bila v razponu med 7 in 7,7 (glej grafikon 90 in 91). Večja nihanja smo zaznali pri vsebnosti hlapnih organskih kislin (HOK) in celotnem anorganskem ogljiku – alkalnosti (CAO) in razmerju med njima v fermentorju 1 in 4 (Grafikon 92 in 93). Razmerje HOK/CAO je tako segalo od 0,25 do 0,6 v fermentorju 1 in od 0,25 do 0,55 v fermentorju 4, vendar se je večino časa gibalo med 0,25 in 0,4, kar je znotraj optimalnega območja. To nakazuje, da je kljub raznoliki sestavi substratov proces anaerobne presnove deloval brez problemov in se hitro prilagodil na spremembe različne hrane.

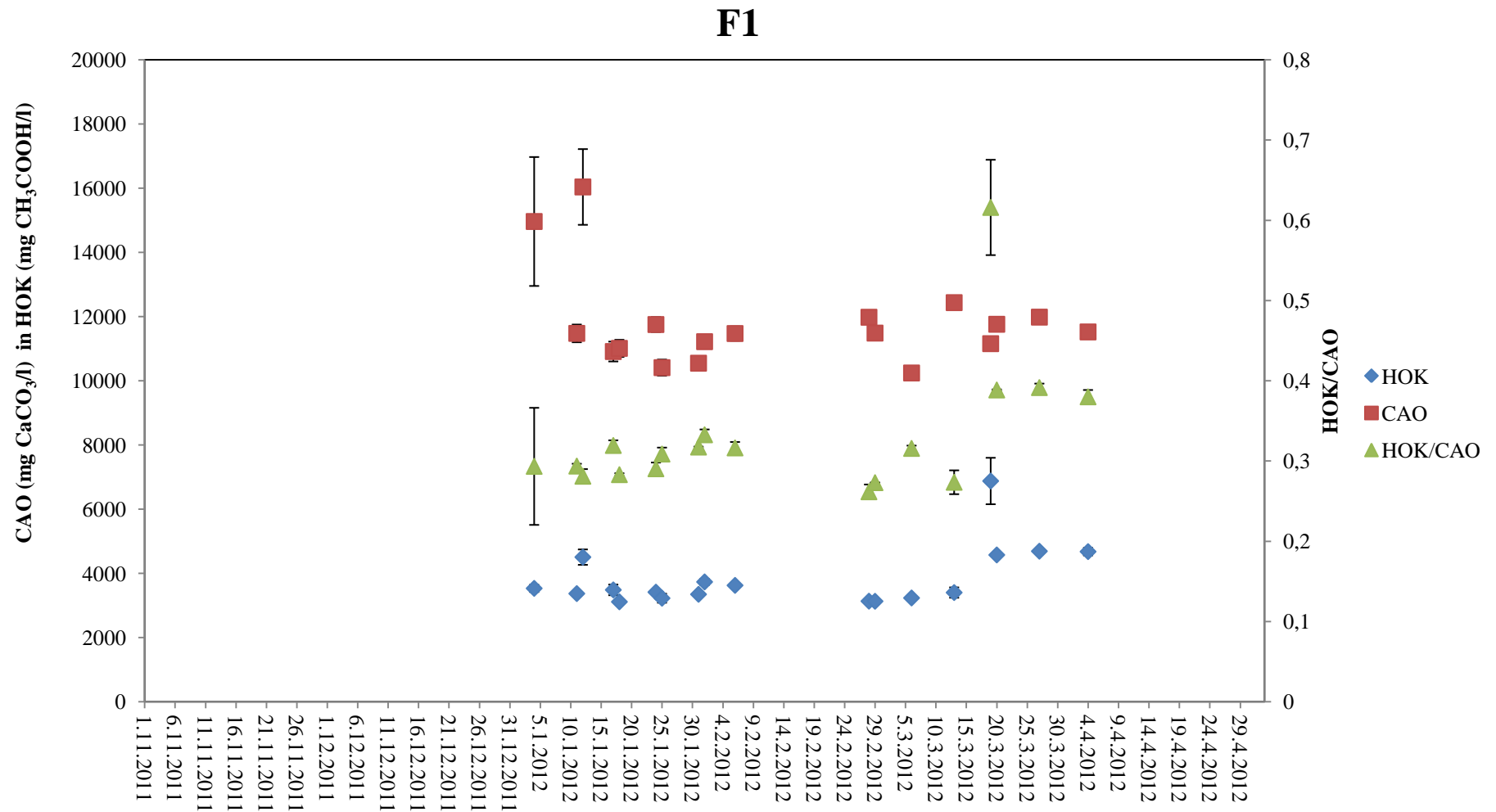
Biomasi iz KZ1 in KZ2 smo prav tako izmerili suho snov, organsko snov, pH in razmerje HOK/CAO. Vsebnost suhe snovi se je gibala med 5 % in 8 %, vsebnost organske snovi glede na suhi vzorec pa od 65 % do 76 % (Grafikon 90 in 92), kar je manj kot v F1 in F4 in kar nakazuje, da se je del organske snovi iz fermentorjev pretvoril v bioplin. Razmerje med HOK/CAO se je gibalo med 0,25 in 0,29. Koncentracija HOK ni presegla 4000 mg CH₃COOH/l, puferska kapaciteta je bila glede na koncentracijo kislin zadostna, da ni prišlo do težav v procesu (Grafikon 95). Vrednost pH je ostala znotraj varnega in optimalnega območja za delovanje anaerobnih mikroorganizmov.

Temperatura v anaerobnih reaktorjih in končnem zalogovniku 1 in 2 se je gibala v mezofilnem temperaturnem območju 38 ± 2 °C.



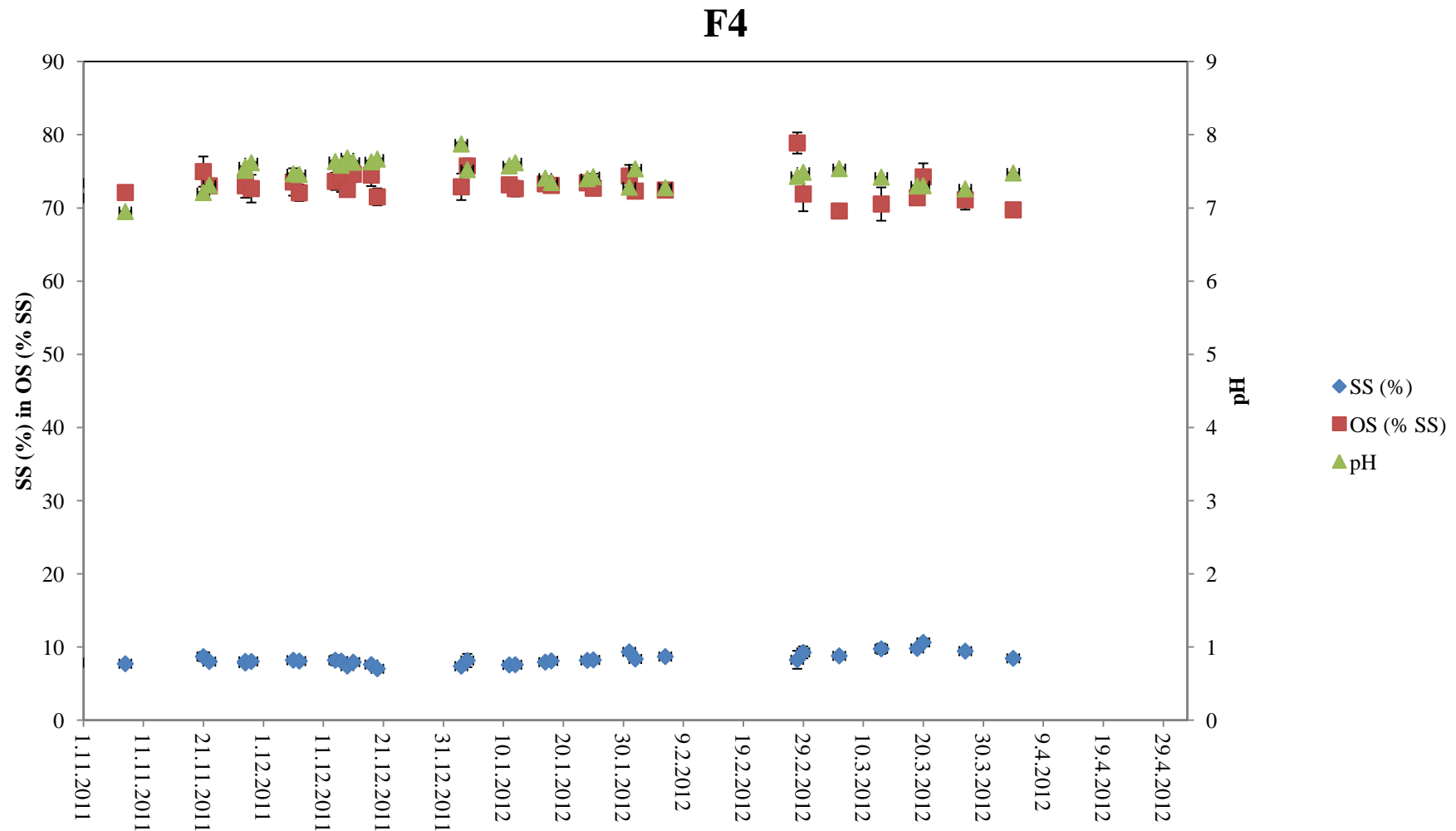
Grafikon 90: Spreminjanje deleža SS, OS in pH v anaerobnem reaktorju F1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.

Graph 90: Daily changes in TS, VS and pH in anaerobic digester F1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.

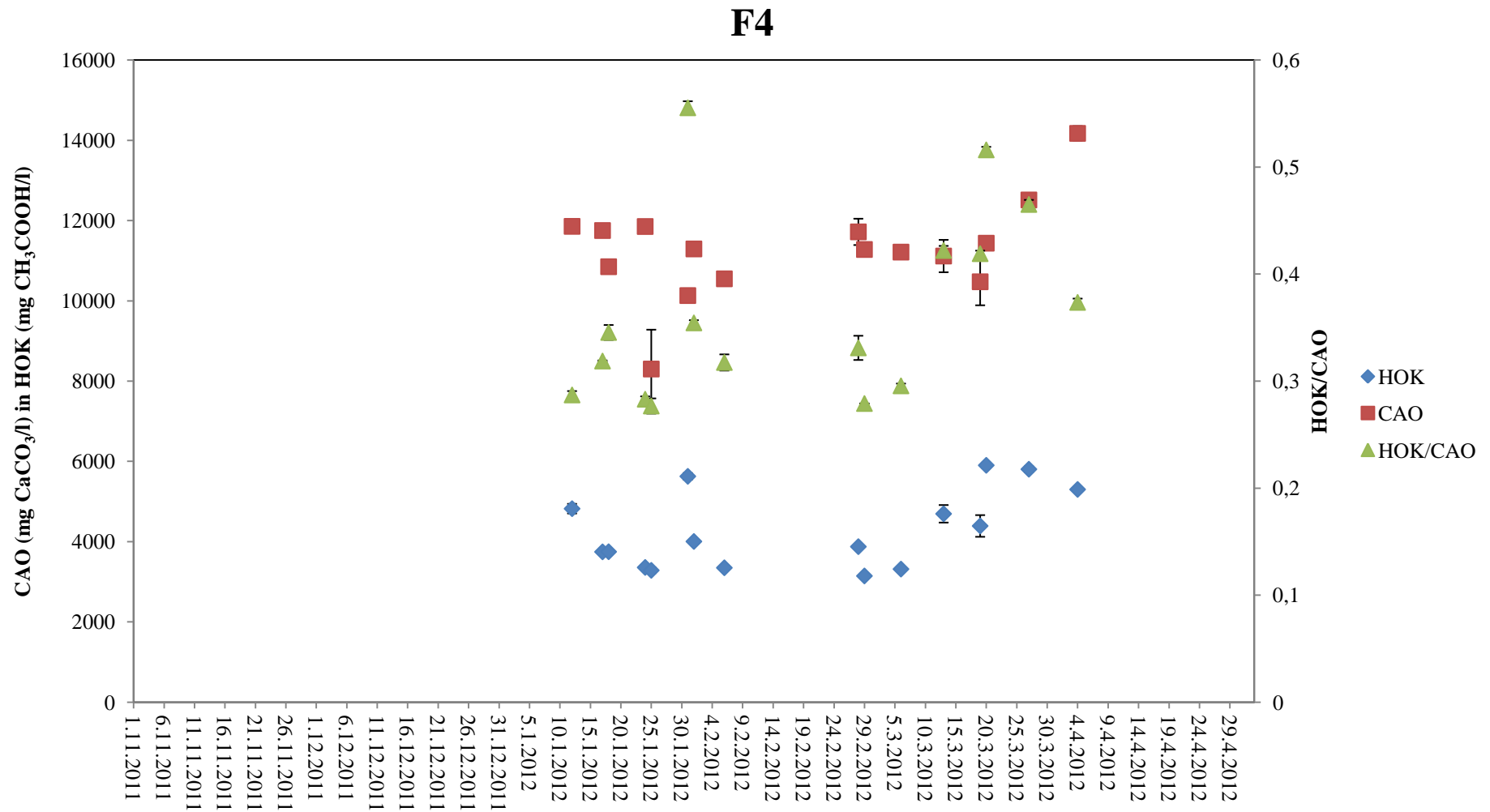


Grafikon 91: Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO anaerobnega reaktorja F1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.

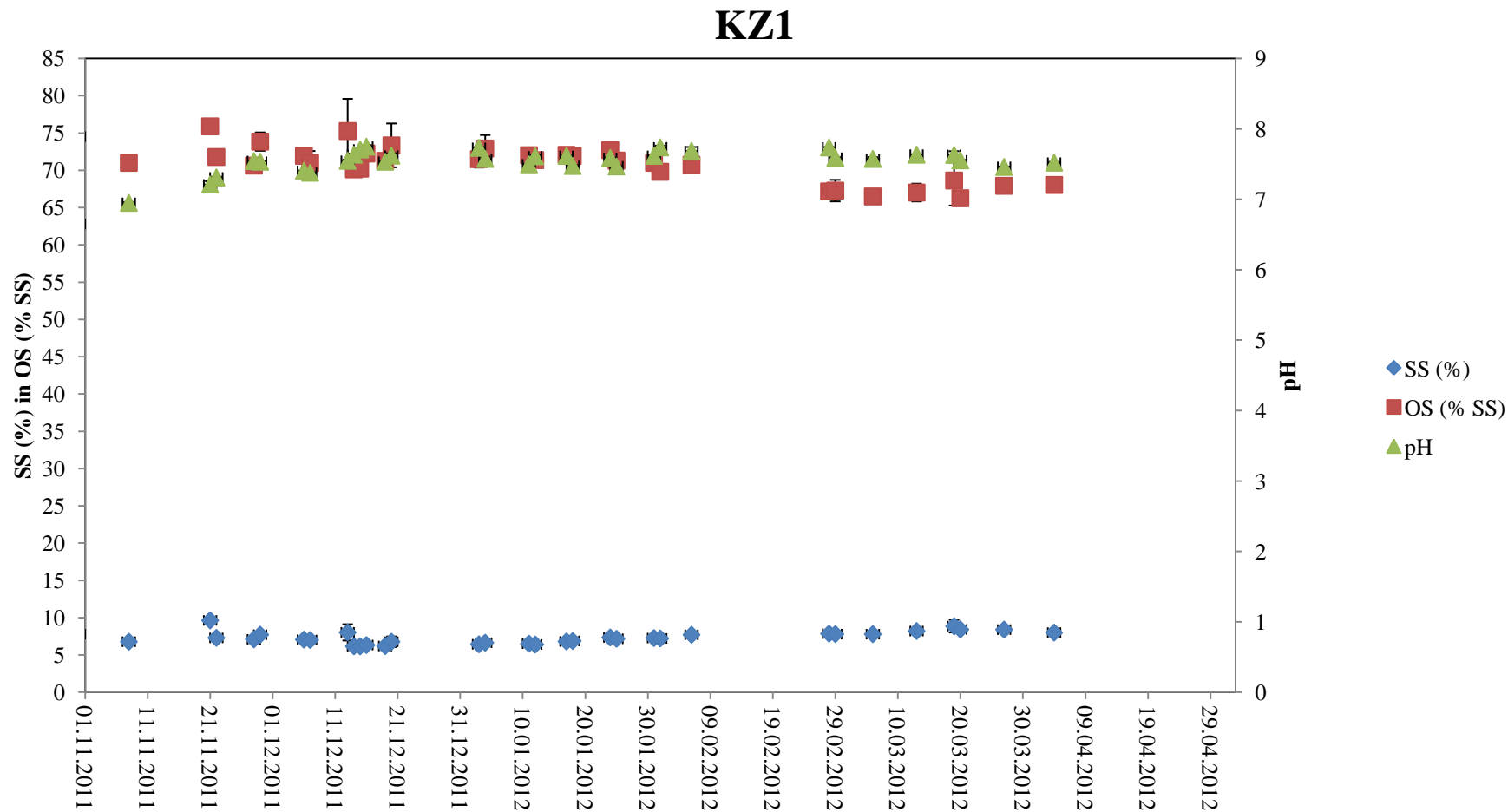
Graph 91: Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in anaerobic digester F1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.



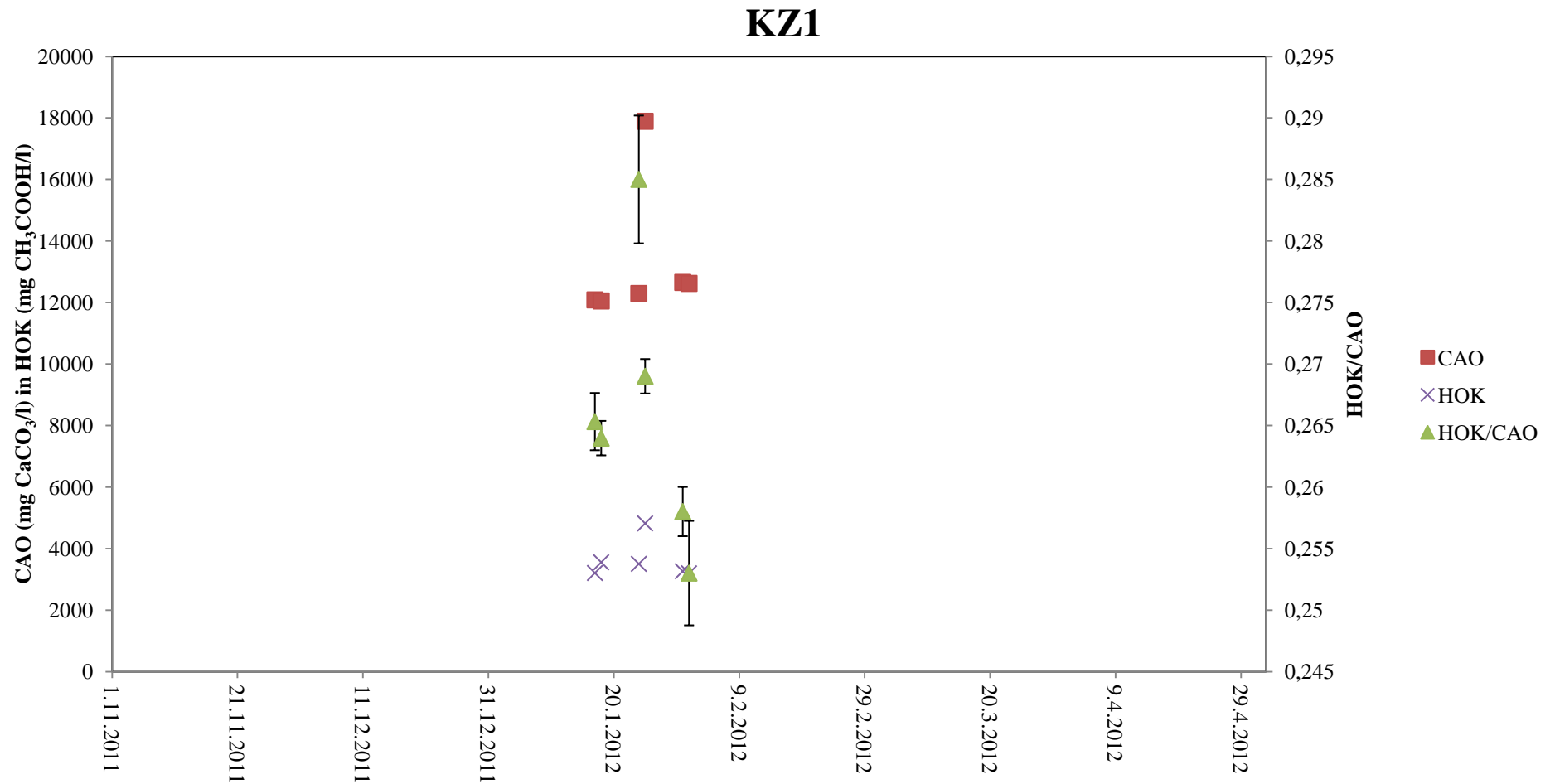
Grafikon 92: Spreminjanje deleža SS, OS in pH v anaerobnem reaktorja F4 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.
Graph 92: Daily changes of TS, VS and pH in anaerobic digester F4 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.



Grafikon 93: Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO anaerobnega reaktorja F4 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standardne deviacije meritev.
 Graph 93: Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in anaerobic digester F4 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.

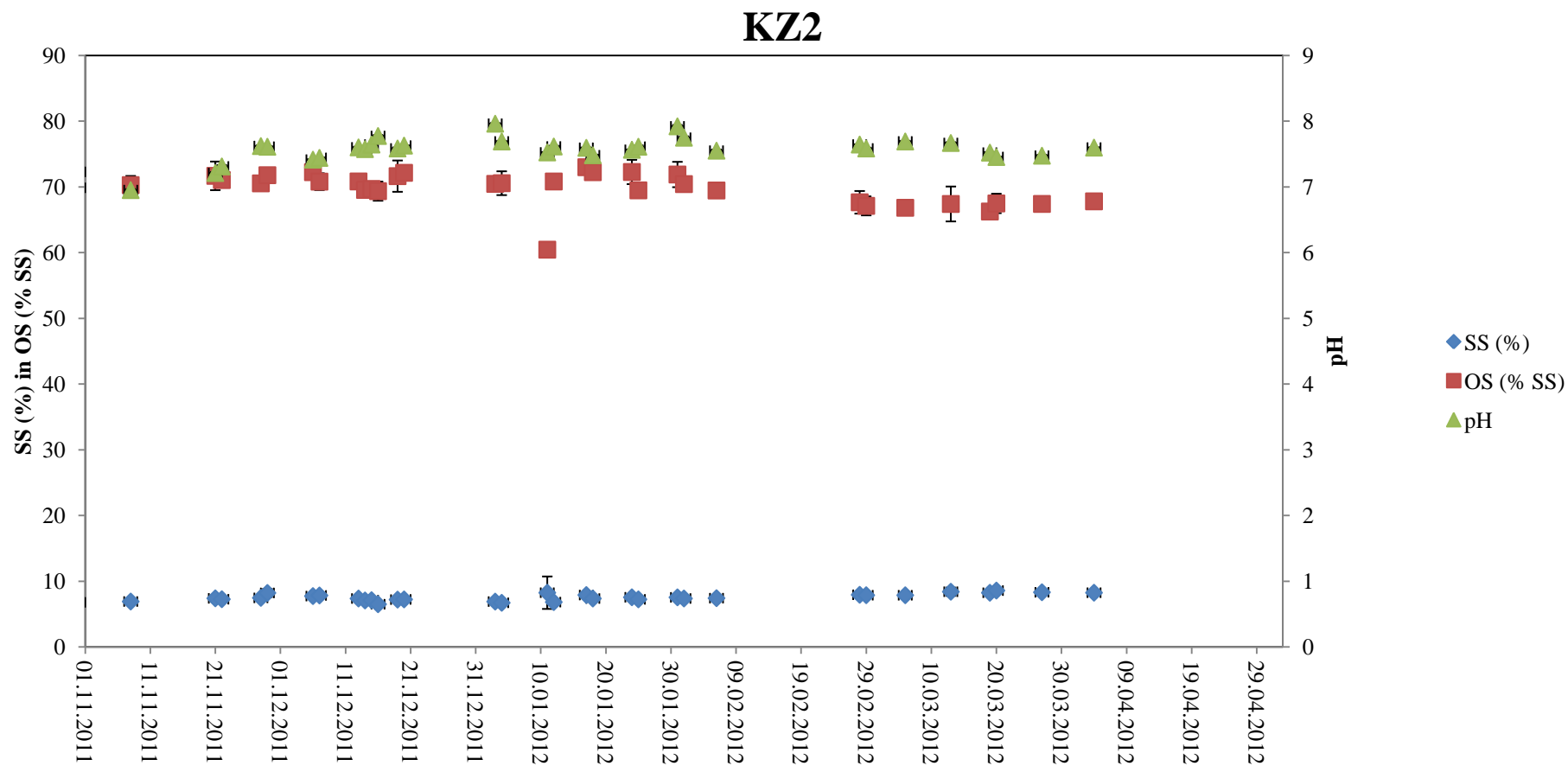


Grafikon 94: Spreminjanje deleža SS, OS in pH v končnem zalogovniku KZ1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.
 Graph 94: Daily changes of TS, VS and pH in post digester KZ1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.



Grafikon 95: Koncentracija CAO, HOK in razmerje HOK/CAO v končnem zalogovniku KZ1 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.

Graph 95: Daily changes in TIC, VOA and ratio VOA/TIC in post digester KZ1 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.



Grafikon 96: Spreminjanje deleža SS, OS in pH v končnem zalogovniku KZ2 BPE Vučja vas skozi čas. Podane so standarne deviacije meritev.

Graph 96: Daily changes of TS, VS and pH in post digester KZ2 of BGP Vučja vas as a function of time with standard deviations.

Ugotovitve

- Za obdobje od novembra 2011 do aprila 2012 je značilno, da je sestava vhodnih substratov zelo nihala, vendar kljub temu, je tvorba metana potekala nemoteno. Izjema je le prilagajanje na zamenjavo koruzne silaže s sirkom in obdobje od aprila naprej, ko ni bilo več doziranja ne sirka in ne koruzne silaže in se je količina substratov drastično zmanjšala.
- Zaradi zmanjšanja količine substratov in posledično manjše organske obremenitve reaktorjev, je bila tudi količina nastalega metana v mesecu aprilu 2012 v primerjavi s prejšnimi meseci občutno manjša.
- Kljub raznoliki sestavi vhodnih substratov, ni prišlo do večjih nihanj v procesu, kar nakazuje na funkcionalno kvaliteto inokuluma iz BPE Vučja vas. Zaradi učinkovite metabolne fleksibilnosti inokuluma je hidroliza novih, raznolikih substratov in njihovih kombinacij potekala brez problemov.
- Največji problem večjim BPE predstavlja zagotavljanje zadostne količine substrata.
- Na eni strani je uporaba energetskih rastlin za pridobivanje bioplina moralno sporna in tekmuje z oskrbo s hrano, na drugi strani pa v Sloveniji opazamo trend zaraščanja kmetijskih površin in opustitev kmetovanja.
- V Angliji veliko BPE kot kosubstrat ob koruni silaži in gnojevki uporablja tudi biološke odpadke iz gospodinjstev. V Sloveniji veliko težavo predstavlja birokratski sistem in trajanje pridobitve okoljskega dovoljenja za koriščenje biološko razgradljivih odpadkov.

4.6 Rezultati in diskusija analize mikrobne združbe

Bakterijske mikrobne združbe so ključne za razgradnjo polimernih rastlinskih ostankov pri pretvorbi organskih snovi do acetata, ogljikovega dioksida in vodika, ki pa so ključnega pomena za mikrobno združbo arhej, ki sodelujejo pri proizvodnji metana iz različnih substratov.

Z namenom, da bi ugotovili relativni vpliv dodajanja različnih hidrolitičnih encimov na strukturo mikrobnih združb, smo v vzorcih, ki so bili odvzeti iz kontinuiranega eksperimenta št. 13 (Možnost uporabe hidrolitskih encimov za povečanje produkcije bioplina iz odpadnega dehidriranega blata papirniške industrije v 5 l semi-kontinuiranem ampts II) ob dnevih 0, 15, 20, 30 in 45, analizirali polimorfizem gena za 16S rRNA kot filogenetskega markerja bakterij in arhej. S hitro tipizacijsko tehniko T-RFLP smo tako opisali strukturne odmike bakterijske in arhejske mikrobne združbe kot odziv na dve spremenljivki: dodajanje encimov in čas inkubacije v eksperimentu na realno velikih delcih biomase in substrata. Kot izhodiščni vzorec smo uporabili vzorce iz anaerobnih reaktorjev iz eksperimenta 13, v katere nismo dodajali encimov.

Iz rezultatov je razvidno, da je odziv bakterijskih mikrobnih združb bolj kompleksen od odziva arhejske mikrobne združbe v istih vzorcih. Spremembe v bakterijskih mikrobnih združbah tekom eksperimenta (smer gibanja označena z rumeno puščico na Grafikonu 97) so bile večje pri encimih Novozymes, Biofuture in kontroli s Palomo v primerjavi z encimi Novalin, Micropan Biogas in zeolitom IPUS M (Grafikon 97). Podobno velikih razlik med odzivi arhejskih združb pri različnih eksperimentalnih dodanih encimih nismo zaznali (Grafikon 98).

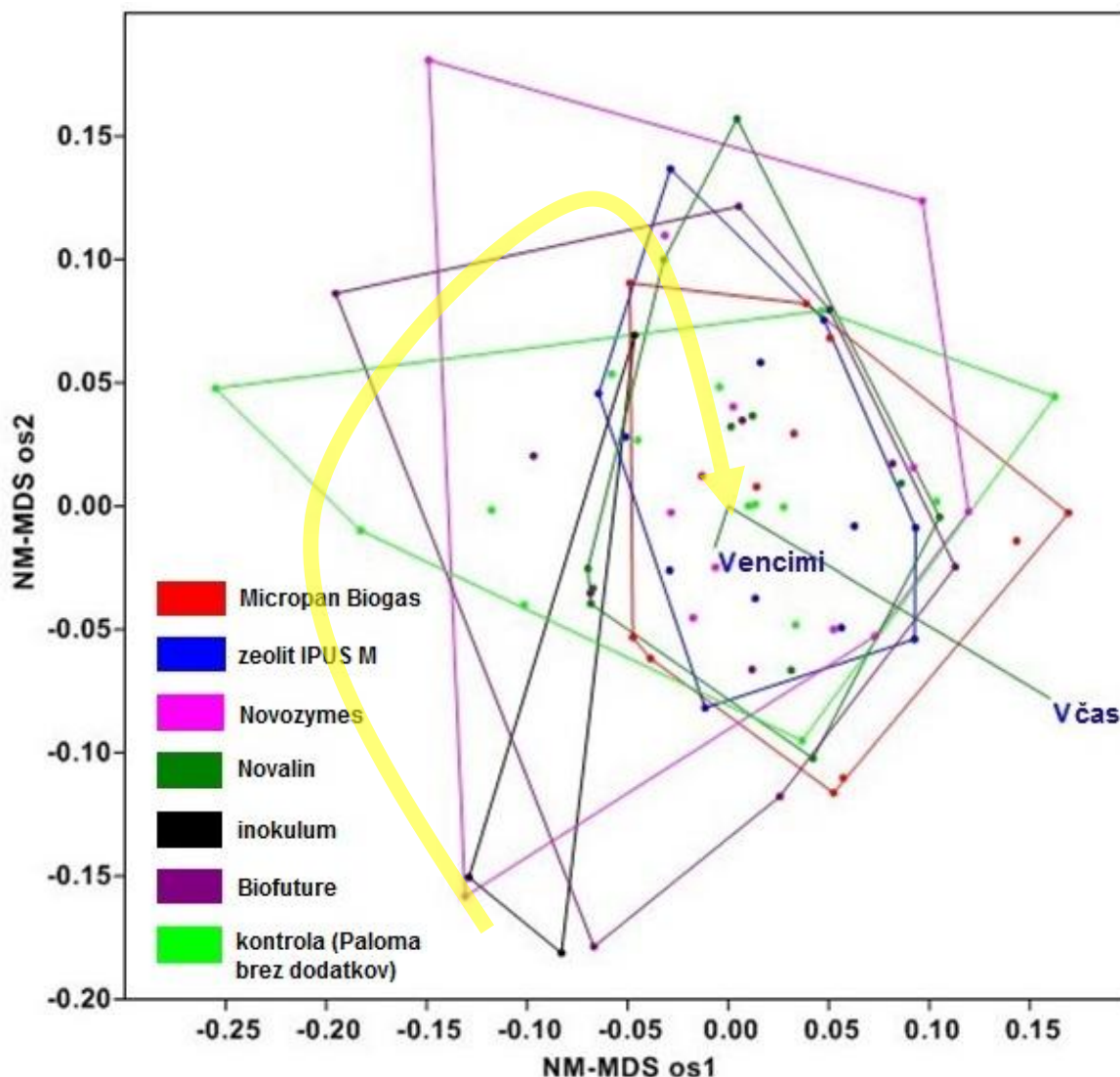
Vse mikrobne združbe eksperimentov, tako pri bakterijah kot pri arhejah, so se razlikovale od izvirnega stanja, odvzetega neposredno iz industrijskega reaktorja, ne glede na dodajanje encimov ali vrsto dodanih encimov. Analiza vpliva obeh dejavnikov je pokazala, da ima daleč večji vpliv na strukturo tako bakterijske kot arhejske mikrobne združbe sam čas inkubacije. Nasprotno pa je bil skupen vpliv dodajanja encimov ter vrsta dodanih encimov za več kot desetkrat manjši od samega vpliva inkubacije skozi čas.

Zato lahko sklepamo, da ima največji vpliv na strukturo bakterijske in arhejske mikrobne združbe čas inkubacije, tekom katerega tudi v naravnih sistemih na industrijskem modelnem merilu (Sundberg et al., 2013; Werner et al., 2011) potekajo različne adaptacije predstavnikov združb na nihanja ali spremembe v pogojih okolja, pri čemer je bil ugotovljen vpliv dodanih encimov v našem eksperimentu manjši za vsaj eno velikostno stopnjo in zato primerjalno relativno nepomemben.

Nizki vrednosti mere (stress) za odstopanja med odnosi v večdimenzionalnih podatkih mikrobnih združb in njihovi razvrstitvi na ordinaciji kažeta, da smo rekonstruirali stabilno in optimalno rešitev predstavitev odnosov med multi dimenzionalnimi podatki v samo dveh dimenzijah.

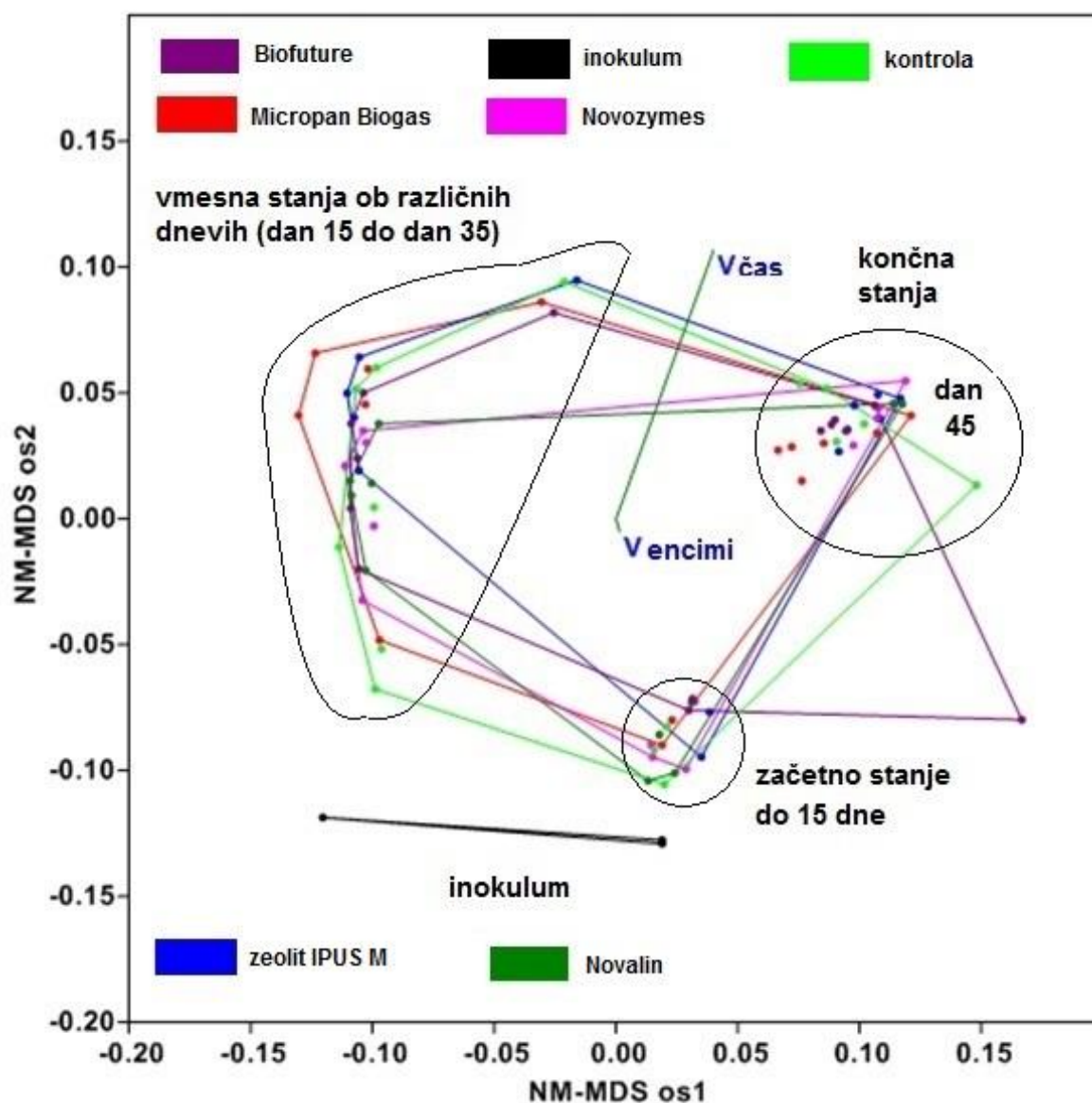
Ugotovitve iz eksperimenta analize mikrobne združbe

Z bolj kompleksnimi ter časovno in finančno zahtevnimi tehnikami globokega sekvenciranja (Sundberg et al., 2013), Micro Array (Novak et al., 2013) in metagenomiko bi z gotovostjo lahko pokazali, katere mikrobne skupine bakterij in arhej se razlikujejo med posameznimi vzorci vzeti ob različnih časih in iz različnih eksperimentalnih variant. S hitrimi tehnikami ugotavljanja mikrobnih združb pa smo pokazali, da do določenih sprememb v strukturi mikrobnih združb bakterij (razgrajevalcev rastlinskih polimerov) in arhej (proizvajalcev metana) prihaja, vendar pa so bile te spremembe tekom naših eksperimentov neodvisne od dodajanja in vrste encimov. Torej v splošnem ne moremo zavreči naše ničte hipoteze, da med vplivi različnih encimov tekom naši eksperimentov ni razlik.



Grafikon 97: Prikaz odnosov med mikrobnimi združbami bakterij skozi 45 dni kontinuirane razgradnje blata Paloma v 5 L AMPTS II z dodajanjem različnih encimov (nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS), indeks=Bray-Curtis, stress=0.16 in 0.09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ in 0.82). Središčni črti prikazujeta relativni vpliv dveh dejavnikov, dodajanja različnih encimov in časa inkubacije. Obodni konveksni obrisi predstavljajo geometrijske like, ki vsebujejo vse časovne točke variant z določenim encimom. (Legenda barv: **rdeča**: Paloma + Micropna Biogas; **modra**: Paloma + zeolit IPUS M; **roza**: Paloma + Novozymes; **zelena**: Paloma + Novalin; **črna barva**: Inokulum; **vijolična**: Paloma + Biofuture; **flourescentno zelena**: Paloma). Rumena puščica prikazuje smer gibanja strukture mikrobnih združb bakterij skozi čas.

Graph 97: The relationship between microbial communities of bacteria through 45 days of continuous decomposition of sludge Paloma in 5 L AMPTS II with the addition of various enzymes (nonmetrical multi dimensional scaling (MDS-NM), index = Bray-Curtis, stress = 00:16 and 00:09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ and 0.82). The center line shows the relative influence of two factors, the addition of various enzymes and incubation time. Circumferential convex contours represent geometric shapes containing all points in time variants of a particular enzyme. (Legend of colors: red color: Paloma + Micropna Biogas, blue color: Paloma + zeolite IPUS M; pink: Paloma + Novozymes; Green: Paloma + Novalin, black color: inoculum; purple color: Paloma + Biofuture; fluorescent green color : Paloma). Yellow arrow shows the movement of microbial communities of bacteria through time.



Grafikon 98: Prikaz odnosov med mikrobnimi združbami arhej skozi 45 dni kontinuirane razgradnje blata Paloma v 5 L AMPTS II z dodajanjem različnih encimov (nemetrično več dimenzionalno lestvičenje (NM-MDS), indeks=Bray-Curtis, stress=0.16 in 0.09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ in 0.82). Središčni črti prikazujeta relativni vpliv dveh dejavnikov, dodajanja različnih encimov in časa inkubacije. Obodni konveksni obrisi predstavljajo geometrijske like, ki vsebujejo vse časovne točke variant z določenim encimom. (Legenda barv: rdeča: Paloma + Micropna Biogas; modra: Paloma + zeolit IPUS M; roza: Paloma + Novozymes; zelena: Paloma + Novalin; črna: Inokulum; vijolična: Paloma + Biofuture; fluorescentno zelena: Paloma).

Graph 98: The relationship between microbial communities of archaea through 45 days of continuous decomposition of sludge Paloma in 5 L AMPTS II with the addition of various enzymes (nonmetrical multi dimensional scaling (MDS-NM), index = Bray-Curtis, stress = 00:16 and 00:09, Shepard plot $R^2 > 0.76$ and 0.82). The center line shows the relative influence of two factors, the addition of various enzymes and incubation time. Circumferential convex contours represent geometric shapes containing all points in time variants of a particular enzyme. (Legend of colors: red color: Paloma + Micropna Biogas, blue color: Paloma + zeolite IPUS M; pink: Paloma + Novozymes; Green: Paloma + Novalin, black color: inoculum; purple color: Paloma + Biofuture; fluorescent green colour : Paloma).

5 SKLEPI

Obratovalne težave, s katerimi se soočajo velike bioplinske elektrarne v Sloveniji, so predvsem pomanjkanje substratov zaradi sušnega obdobja zadnjih dveh let in posledično manjšega hektarskega donosa pridelka. Druga njihova slabost je, da večina BPE v celotni ne izkorišča odvečne proizvedene toplote energije, ki bi jo lahko nekemu uporabniku v bližini prodala po subvencionirani ceni, ta bi jo pa koristno uporabil. Čeprav se bioplin lahko proizvaja iz različnih biološko razgradljivih substratov, na BPE še vedno kot substrat prevladuje koruzna silaža, gnoj in gnojevka, kar pa dolgoročno ne predstavlja rešitve za povečanje neodvisnosti od fosilnih goriv, povečuje pa intenzivno pridelavo energetskih ratlin za pridobivanje bioplina in etanola, namesto za hrano za ljudi in živali. Vendar na drugi strani v Sloveniji opazamo trend opustitve kmetovanja in zaraščanja kmetijskih površin. Za potrebe bioplina so bile že razvite hibridne vrste energetskih rastlin, z namenom čim večjega prirastka metana. Energetske rastline za pridobivanje bioplina, ki tekmujejo z oskrbo s prehrano, bi postopoma lahko zamenjali z biološkimi komunalnimi odpadki, kar so raziskovali tudi Pognani et al. (2009). Na primer v Angliji je v zadnjih letih število bioplinskih elektrarn skokovito naraslo in do danes znaša že 136 elektrarn, ki zajemajo kmetijske bioplinske elektrarne, industrijske bioplinske elektrarne (papirniška industrija, čistilne naprave) in bioplinske elektrarne, ki za substrat uporabljajo biološke odpadke (<http://www.biogas-info.co.uk/maps/index2.htm>).

Transport kravjega gnoje do bioplinskih elektrarn je v Nemčiji ekonomsko sprejemljiv na razdalji manjši od 22 km, transport bioloških komunalnih odpadkov pa na razdalji manjši od 425 km (Lindorfer in Schwarz, 2013). Druga možnost je, da kombiniramo odvečno blato iz ČN z biološkimi odpadki, kar bi z nadaljnim razvojem lahko zaživel tudi v večji meri na realnem modelnem merilu, saj raziskave kažejo na izboljššan proces anaerobne presnove. Vendar na drugi strani procesa anaerobne presnove, kjer kot substrat uporabljamo biološke odpadke, ni enostavno voditi, saj je lahko struktura odpadkov, ki jih uporabimo, zelo raznolika, kar pa privede do nihanj v proizvodnji metana in kinetiki procesa. Na mikroorganizme lahko delujejo tudi različni kationi, kopičenje maščobnih kislin, amonijak, težke kovine, nečistoče in toksične snovi (aromati), ki jih najdemo v odpadkih, kot so plastični, kovinski, stekleni in ostali delci od različnih embalaž in jih je potrebno pred doziranjem v fermentor ločiti od organske frakcije (Iacovidou et al., 2012). Za anaerobno presnovo bioloških odpadkov je v Sloveniji potrebno pridobiti okoljsko dovoljenje, kot je to navedeno v Uredbi o predelavi biološko razgradljivih odpadkov in uporabi komposta ali digestata (UL RS št. 99/2013: 10787-10796), kar pa po izkušnjah različnih upravljavcev lahko traja tudi več let, veliko pa je nasprotovanje tudi lokalne skupnosti, ki si ne želi stabilizacije takšnih vrst odpadkov v svoji bližnji okolici, predvsem zaradi formaldehidov pri izgorevanju bioplina, povečanega lokalnega prometa in hrupa, smradu in strahu pred neznanim.

Sklepi iz eksperimentov:

1. Z nadgradnjo in validacijo AMPTS II na 5 l pilotno modelno merilo smo prešli iz modificiranih inokulumov, substratov in neenotne procedure sestavljanja eksperimentov na večjo laboratorijsko modelno merilo, kjer smo uporabili substrate, ki imajo velikost delcev kot na BPE pred doziranjem v anaerobne reaktorje, realni inokulum, realno organsko obremenitev, realno razmerje med substrati in inokulumom (Preglednica 46), ki se jih uporablja na bioplinskih elektrarnah.
2. Analize BMP različnih šarž substratov istega substratnega razreda na naših 5 l modificiranih modelnih merilih kažejo, da so razlike znotraj istega substratnega razreda lahke zelo velike, tudi do 50 %.

3. Ugotovili smo, da imajo encimske predobdelave lignoceluloznih substratov in blata iz čistilnih naprav pozitiven učinek na pridobivanje biometana. Študije, ki so jih opravili drugi avtorji, nakazujejo da mehanska predobdelava lignoceluloznih substratov sicer je smiselna, vendar do določene meje. Tako na primer Hermmann in drugi (2012a,b) odsvetujejo zmanjševanja velikosti delcev pod 8 mm, saj je energija, ki bi jo morali vložiti, večja od energije, ki bi jo pridobili z dodatno proizvedenim metanom.
4. S kombinacijo 4 različnih substratov v šaržnem sistemu smo predvideli optimalno kombinacijo, ki sta jo sestavljali koruzna silaža in biološki odpadki. Z večanjem količine papirniškega blata se je tvorba metana zmanjševala, v primeru blata Kraft pa bil proces inhibitoren.
5. Z enačbo tretje stopnje v programu *STATISTICA* smo dosegli najboljše prilaganje modela glede na izmerjene vrednosti in predvideli optimalne kombinacije različnih substratov v šaržnem načinu.
6. S kombinacijo ultrazvočne predobdelave in hidrolitske encimske predobdelave na primeru semikontinuiranega anaerobnega procesa z blatom iz ČN smo izboljšali učinkovitost anaerobne presnove in posledično povečali tvorbo metana za 24,4 %, z uporabo samo ultrazvočne predobdelave za 7,5 %, z uporabo samo encimov pa za 14,4 %, v primerjavi z izhodiščnim vzorcem.
7. Vpliv predobdelave blata iz ČN z ultrazvokom je bil manjši v primerjavi z encimsko predobdelavo blata. Vendar kot navajajo drugi avtorji (Perez Elvira et al., 2009), je učinkovitost laboratorijskih ultrazvočnih sond v primerjavi z industrijskimi majhna, kar je lahko tudi vzrok slabše učinkovitosti ultrazvočne predobdelave in posledično manjšemu povečanju produkcije metana v našem primeru v primerjavi z drugimi študijami na modelu realnega modelnega merila čistilne naprave.
8. Največji vpliv na učinkovitost predobdelave z ultrazvokom so imeli: specifična dovedena energija ultrazvočne predobdelave (SE), stopnja razgradnje blata z ultrazvokom (DD), starost blata, pH blata in vsebnost inhibitornih snovi. Starost blata, pH, povečana koncentracija amonijaka in povečana koncentracija hlapnih maščobnih kislin so bili vzrok, da je predobdelava z ultrazvokom imela manjši učinek na tvorbo metana.
9. Kljub zmanjšanju velikosti delcev blata z ultrazvokom, ni nujno, da je velikost delcev merilo, da se bo tvorba metana povečala, saj je proces anaerobne presnove odvisen tudi od biokemijskih procesov, vsebnosti inhibitornih snovi in lastnosti gorvodnega toka blata. Zhang in drugi (2013) navajajo, da bi za substrate, ki imajo večjo vsebnost vlaken, mehanska predobdelava lahko imela pozitiven vpliv na povečanje tvorbe metana.
10. Papirniško blato lahko predstavlja alternativni vir substratov za pridobivanje bioplina. Ker tako blato vsebuje manj dušika, je priporočljivo, da se pri procesu anaerobne presnove dodaja substrat, ki je bogat z dušikom. V našem primeru je to bila prašičja gnojevka.
11. S hitrimi tehnikami ugotavljanja mikrobnih združb smo pokazali, da do določenih sprememb v strukturi mikrobnih združb bakterij (razgrajevalcev rastlinskih polimerov) in arhej (proizvajalcev metana) prihaja, vendar pa so bile te spremembe tekom naših eksperimentov neodvisne od dodajanja in vrste encimov, zato v splošnem ne moremo zavreči naše ničte hipoteze, da med vplivi različnih encimov tekom naši eksperimentov ni razlik.

Iz tega lahko zaključimo, da izboljšanje procesa anaerobne presnove in povečanje prirastka metana na enostaven način lahko dosežemo z dodajanjem hidrolitskih encimov. Pri tem odpadejo vlaganja v dodatne enote in modifikacije substratov z različnimi mehanskimi ali kemijskimi predobdelavami.

Stroški, ki jih ima BPE, so stroški nakupa, transporta in skladiščenja encimov. Pomembno je, da se učinkovitost encimov preizkusi na pilotnem semi-kontinuiranem modelnem merilu z realnim inokulumom in realnimi substrati, brez prilagajanja inokuluma in substratov, kot je to običajno na laboratorijskem modelnem merilu (glej preglednico 46), saj je le na tak način možno oceniti, ali bodo hidrolitski encimi imeli pozitiven vpliv na pridobivanje metana.

Preglednica 46: Gradient v značilnostih za postavitev in izpeljavo testnih eksperimentov med objavljeno literaturo in tistih, uporabljenih v tem doktoratu, z namenom, da zagotovimo lažje odločanje na BPE.

Table 46: The gradient in test set-up characteristics between published literature and those used in this dissertation with the purpose to provide on-site decision making support.

	Literatura*	Doktorat	Doktorat	Doktorat
PARMETRI	ŠARŽNI	ŠARŽNI	SEMI-KONTINUIRANI	REALNA MODELNO MERILO BPE
dodatne modifikacije substratov za zmanjšanje velikosti delcev	da	ne/realistična velikost delcev kot na BPE	ne/realistična velikost delcev kot na BPE	ne
redčenje substrata	precej različno, samovoljno	ne/kot na BPE	ne/kot na BPE	ne/pogojno
organska obremenitev	precej različno, samovoljno	kot na BPE	kot na BPE	kot na BPE
šarža substratov	enojna	kot na BPE	kot na BPE/multipla	multipla
dodajanje pufra v inokulum	da	ne	ne	ne
filtracija inokuluma	da	ne	ne	ne
homogeniziranje inokuluma	da	ne	ne	ne
aklimatizacija inokuluma	da	ne	ne/ iz realnega časa	ne/ iz realnega časa
mešanje inokulumov iz različnih virov	da	ne	ne	ne
razplinjevanje inokuluma	da	ne	ne	ne
mešanje vsebine	precej različno	kot na BPE	kot na BPE	kot na PBE
meritve plina	konstanten volumn ali konstanten pretok	konstanten pretok kot na BPE	konstanten pretok kot na BPE	konstanten pretok
postavitev eksperimentov	precej različen med različnimi študijami	enaka kot pri semikontinuiranih eksperimentih	enaka kot pri šaržnih eksperimentih	realna modelno merilo
volumen	precej različen, manjši od 1 l	5 l	5 l	Tabela B1
razmerje substrat/inokulum	precej različno, samovoljno	kot na BPE	kot na BPE	kot na BPE

*v (Angelidaki et al., 2009; Carlsson et al., 2012; Raposo et al., 2011; Muller et al., 2004; VDI4630-2006)

Hipoteze, ki jih lahko potrdimo, so naslednje:

- 1) H1: Z dodajanjem encimov lignoceluloznim substratom izboljšamo učinkovitost anaerobne presnove.
- 2) H1: S kombinacijo ultrazvoka in dodajanja encimov blatu iz čistilnih naprav izboljšamo učinkovitost anaerobne presnove, v primerjavi z uporabo samo ene izmed metod predhodne obdelave.
- 3) Ho: Ne moremo zavreči ničte hipoteze, da encimske predobdelave lignoceluloznih substratov nimajo vpliva na mikrobne združbe bakterij.

V prihodnosti bi bilo smiselno preiti iz mezofilnega temperaturnega območja na termofilno, kjer je sicer proces bolj občutljiv na temperaturne spremembe, vendar zaradi hitrejše razgradnje organske snovi in hitrejše kinetike procesa zmanjšamo velikost anaerobni reaktorjev in posledično zmanjšamo investicijske stroške. Ostaja pa vprašanje, ali bi toplota, ki se bo proizvedla, lahko pokrila energetske potrebe po ogrevanju anaerobnih reaktorjev v zimskem času, ko se zunanje temperature spustijo pod ničlo. Ena izmed možnosti je, da se anaerobne reaktorje vgradi v zemljo, ki bi služila kot dober izolator, če to ne bi preveč podražilo investicije.

Prav tako bi bilo smiselno v semi-kontinuiranih eksperimentih testirati določene kombinacije substratov, ki smo jih naredili v šaržnem sistemu, da bi videli, kakšna je razlika med napovedjo metana v šaržnem sistemu in semi-kontinuiranim, kjer zaradi vsakodnevnega doziranja substratov inhibitorne učinke lahko zaznamo, medtem, ko jih v šaržnih sistemih zaznamo težje.

6 SUMMARY

Recent worldwide research initiatives have shown that the chemical, mechanical (physical) and biological pre-treatments of substrates and their combinations increase methane yields significantly (Kolbl et al., 2014; Lindmark et al., 2012; Menardo et al., 2012; Zhang and Banks, 2013). Although the positive impact of pre-treatment on the production of methane is obvious for some substrates, the ratio of the net increase in the production of biomethane and energy used for pre-treatment, is not obvious and depends on a number of decisions in the industry and the real parameters of substrates, such as the following: the nature and extent of pre-treatment, type of substrate, the annual fluctuations in the chemical properties of substrates, particle size distribution, the inhibitory effects of certain substrates, organic loading and mixing characteristics of the inoculum, the preadaptation or premixing of various inocula to accommodate novel substrates, the cost of installing equipment for mechanical grinding substrates, operating, maintenance and wear and tear costs of equipment and revenue of biogas plant (Kolbl et al., 2014; Lindmark et al., 2012; Menardo et al., 2012; Zhang and Banks, 2013; Herrmann et al., 2012; Herrmann et al., 2012b). Profitability of biogas plants (BGP) is limited to specific cases, which are difficult to generalize, even based on data from the published literature, since they cover differently modified substrates, which have reduced particle size or are chemically pretreated leading to changes in their properties and the energy increment (Kolbl et al. 2014; Lauwers et al., 2013; Palmowski and Muller, 2003; Raposo et al., 2011). Therefore, for decisions on biogas plants the data resulting from the inoculum of the biogas plants at hand and exact substrates in such a state and condition as they are used for dosing in anaerobic reactors in the real biogas plant are needed (Angelidaki et al., 2009; Kolbl et al., 2014). Systematic errors in BMP tests and the lack of uniformity, next to dependency on several factors are all limiting BMP application to real scale (Angelidaki et al., 2009; Izumi et al., 2010; Palmowski and Muller, 2000; Walker et al., 2009; Raposo et al., 2011; Kolbl et al., 2014). Further, because of the lack of uniformity in the preparation of the experiments for the determination of BMP, the differences in the BMP approaches and the resulting net residence times, methane yields in a continuous systems are generally lower than in batch systems (Modhoo, 2012). In the standard approach (Angelidaki et al., 2009, VDI 4630, 2006) during the preparation of anaerobic reactors biomass and substrates are pretreated by filtration or grinding, where the particle size is significantly reduced, biomass is also diluted and buffered (VDI 4630, 2006). The other topic is the disposal of bio-waste to landfill facing a number of environmental problems, such as formation of methane emissions of odors, minerals and nutrients, reproduction of various microorganisms, insects and many rodents and birds, which may pose a threat to human health, risk of explosion and toxicity to surroundings (Pognani et al., 2009). So far, composting represents the main way of treating biological wastes. On the other hand, biological wastes represent a potential source of energy that can be converted by biological processes into biomethane and usefully employed, thus increasing the share of energy from renewable sources. The EU encourages maximizing the production of electricity from renewable sources, including the use of bio-waste, hence rising the popularity and the use of biogas (Pognani et al., 2009; Gunaseelan, 2004). In Germany, 120 from a total of 7500 BGP use bio-waste as a substrate or co-substrate, in Slovenia there are 2 BGP (Lorenz et al., 2013). The term codigestion defines anaerobic digestion of two substrates, which are both dosed to the same anaerobic reactor in order to improve the efficiency of anaerobic metabolism and improve the production of energy. In the area of agriculture such devices are already a reality. Building of BGP where sewage sludge and food wastes are used as substrates in combination has been increasing, even though the anaerobic digestion of food waste is a difficult process, and the process is in many cases adjusted by addition of chemicals, substrate pre-treatment and/or by increase of the temperature in the anaerobic reactors (Iacovidou et al., 2012). Biodegradable substrates also include part of the waste from various types of industries such as pulp and paper industry and the pharmaceutical industry,

where a byproduct of papermaking is paper sludge that contains large fractions of cellulose and mycelium from reactor from production of medical drugs (pharmaceuticals). A paper sludge and the mycelium may also be used as co-substrates in the process of anaerobic digestion, complementing nutrient requirements of the inoculum.

Anaerobic digestion process of sludge from municipal wastewater treatment plants and lignocellulosic substrates for biogas were carried out systematically. The following hypotheses were put forward:

1. Ho: Mechanical and enzymatic pre-treatment of lignocellulosic substrates have no effect.
H1: We assume that with an appropriate combination of mechanical pretreatment and enzyme addition to lignocellulosic substrates the efficiency of anaerobic digestion, compared to using only one of the methods of pre-treatment, can be improved.
2. Ho: Mechanical and enzymatic pre-treatments of wastewater sludge have no effect.
H1: We assume that with a combination of ultrasound and enzyme addition to wastewater sludge, the efficiency of anaerobic digestion compared to using only one of the methods of pre-treatment, can be improved.
3. Ho: Mechanical and enzymatic pre-treatments of substrates and combination of the two pretreatment groups have no effect on the microbial communities of bacteria and archaea.
H1: We assume that the addition of enzymes affects the structure of the bacterial but not archaeal microbial communities in laboratory scale and time model experiments.

For the optimization of anaerobic digestion, we first defined the biomass from different biogas plants (BGP) and municipal wastewater treatment plants (municipal WWTP) and various substrates, we have chosen depending on the potential of possible substrates from paper industry and biological waste that could be used in the future on BGP if environmental permits are obtained for. This would significantly reduce the usage of energy crops for biogas production, reduce the negative impact on self-sufficiency in food and biogas plants dependence on weather conditions and the crop production. Properties of biogas plants, from which we obtained the inocula and substrates, their size, range and WWTP digester Šaleška valley, are given in Annex B.

To optimize the performance of anaerobic processes, we have made several experiments that are given in Table 15 and vary depending on system (batch or semi-continuous), type of pretreatment, size of reactors and substrates used, with the aim of facilitating decision-making in real scale biogas plants. In doing so, we have (see Figure 38):

- 1) Upgraded the AMPTS II to 5 l scale to enable subsequent use of real substrates, real organic loading, real inoculum and made correlations between 0.5 liters and 5 liters methane yields.
- 2) Biomethane yields of 24 substrates in solid and liquid form were estimated on 5 l pilot scale AMPTS II and compared them with existing published data.
- 3) Impacts of various additives in the form of enzymes and micro-organisms were assessed on the production of methane and profitability.
- 4) Methane production was optimized with combination of different substrates in batch systems.
- 5) The special cubic model was used to predict optimal combinations to maximize the BMP for a combination of different substrates.
- 6) In a semi-continuous processes we tested enzymes on dehydrated paper mill sludge Paloma and the effects of ultrasound pretreatment on wastewater sludge with a combination of hydrolytic enzymes to increase the production of methane sludge from WWTP Šaleška valley, where in both cases we used the real substrates and real inoculum.

- 7) In a semi-continuous process with dehydrated paper mill sludge from Paloma, the effect of enzymes on microbial population was evaluated using PCR and T-RFLP.
- 8) Monitoring of full scale BGP Vučja vas was conducted.

Conclusions from the experiments:

- 1) With the upgrading and validation of AMPTS II to 5 l pilot scale, we proceeded from modified inocula, substrates and non-uniformed procedures of assembling experiments to larger laboratory scales, where substrates with real particle size (such as on BPE prior to dosing in anaerobic reactors), real inoculum, real organic loading and real ration between substrates and inoculum as on BGP (Table 46) were used.
- 2) Analysis of BMP from different batches of the same substrates class using 5 l modified scale indicated that the differences within the same substrate class can vary significantly up to 50 %.
- 3) Enzymatic pre-treatment of lignocellulosic substrates and wastewater sludge had positive effect on the production of biomethane. Studies carried out by other authors suggest that mechanical pretreatment of lignocellulosic substrates is practicable but to a certain limit. For example Hermmann et al. (2012a,b) disadvice the reduction of the particle size to less than 8 mm, since the energy that would be used for pretreatment is greater than the energy that would be produced by additional methane.
- 4) With the combination of 4 different substrates in a batch system, we anticipated the optimal combination, which consisted of corn silage and biological wastes. With the increase in amount of paper mill sludge the formation of methane has reduced, in the case of Kraft sludge the process was inhibitory.
- 5) With the equation of the third degree using the software Statistica we achieve the best fit to the model according to the measured values and predicted optimal combinations of different substrates in batch mode.
- 6) The combination of ultrasound pre-treatment and hydrolytic enzyme pre-treatment in the case of semi-continuous anaerobic process with sludge from WWTP we improved the efficiency of anaerobic digestion and consequently increased the formation of methane by 24,4 %. When using only ultrasound pre-treatment the increase in methane formation was 7,5 %. Using only enzymes 14,4 % the increase in methane formation was achieved. All comparisons were made to the control sample.
- 7) The effect of ultrasound pre-treatment of wastewater sludge was lower in comparison with enzymatic pre-treatment of sludge. However as reported by other authors (Elvira Perez et al., 2009) the laboratory ultrasonic probes are less efficient compared to the industry scale probes. This is one of reasons for lower efficiency of ultrasound pre-treatment and consequently a lesser increase in the production of methane in our experiment in comparison with other studies on real scale.
- 8) The greatest impact on the effectiveness of pre-treatment with ultrasound had: specific energy input of ultrasound pre-treatment (SE), degree of degradation of sludge with ultrasound (DD), sludge age, the sludge pH and the content of inhibitory substances. Sludge age, pH, increased concentration of ammonia and increased concentration of volatile fatty acids were the cause for a lesser effect on the formation of methane when sludge was pre-treated with ultrasound.
- 9) Despite the reduction in the particle size of the wastewater sludge by ultrasound pre-treatment, it is not directly evident that the particle size is related to the increased formation of methane because the process of anaerobic digestion is also dependent on the bio-chemical processes, the content of the inhibitory substances and the characteristics of the upstream flow

- of sludge. Zhang et al. (2013) suggested that substrates that have a higher content of fiber, mechanical pre-treatment can have a positive impact on increasing the production of methane.
- 10) Paper mill sludge may represent an alternative source of substrates for production of biogas. Since paper mill sludge contains less nitrogen, it is recommended that in the process of anaerobic digestion substrates which are rich in nitrogen are added. The source of nitrogen in our case was pig slurry.
 - 11) With rapid techniques for the detection of microbial communities, we have shown that certain changes in the structure of microbial communities of bacteria (disintegrators of plant polymers) and Archaea (producers of methane) are obvious, but these changes over the course of our experiments were independent from the addition of enzymes and therefore in general, we can not discard our zero hypothesis that the effects of various enzymes during our experiments have no differences.

From this we can conclude that improvement of anaerobic digestion processes and increase in production of methane in a simple manner can be achieved by the sole addition of hydrolytic enzymes. No investment costs for additional units and modification of substrates with various mechanical or chemical pretreatment are needed. Costs of enzymatic pretreatment of BGP consist of: the costs of purchasing, transporting and storing enzymes. It is important that the effectiveness of the enzymes is tested in a semi-continuous pilot scale reactor with a real inoculum and realistic substrates without any adjustment of the inoculum and substrates as has been done on the laboratory scale so far (see Table 46), because only in this way it can be estimated whether hydrolytic enzymes have a positive impact on the production of methane.

Based on the information obtained from conducted experiments, the following hypotheses were accepted or could not be discarded in the latter case:

- 1) H1: The sole addition of hydrolytic enzymes to lignocellulosic substrates improved significantly the efficiency of anaerobic digestion.
- 2) H1: Combination of ultrasound and enzymatic pre-treatment of wastewater sludge improved the efficiency of anaerobic digestion compared to using only one of the methods of pre-treatment.
- 3) Ho: We cannot discard the Ho hypothesis that enzymatic pre-treatment of lignocellulosic substrates have no effect on the microbial community of bacteria. No effects of enzymes on microbial communities were identified.

In the future it would make sense to switch from mesophilic to thermophilic temperature range despite greater sensitivity of process to temperature changes. The advantages of thermophilic temperature range are: faster degradation of organic material and rapid kinetics of the process, reduced size of the anaerobic reactors and consequently reduced investment costs. The question remains whether the generated heat can cover the energy need for heating of anaerobic reactors in the winter when outdoor temperatures fall deeply below zero or whether heat loss due to wind dissipation can be alleviated. One possibility is that the anaerobic reactors are installed below ground, which would serve as a good insulator provided that the investment costs are not significantly increased. In a semi-continuous experiments it would be of high interest to test further combinations of substrates that have been conducted in a batch system to elucidate the difference between the production of methane in a batch and semi-continuous system, in which inhibitory effects of daily dosage of substrates can be detected, while in batch systems this detection is far less obvious.

LITERATURA IN VIRI

- Agbor, V.B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D.B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*, 29(6): 675-685.
- Ahring, B. 2003. Perspectives for Anaerobic Digestion. in: *Biomethanation I*, (Eds.) B. Ahring, I. Angelidaki, E.C. Macario, H.N. Gavala, J. Hofman-Bang, A.J.L. Macario, S.J.W.H.O. Elferink, L. Raskin, A.J.M. Stams, P. Westermann, D. Zheng, Vol. 81, Springer Berlin Heidelberg, str. 1-30.
- Angelidaki, I., Alves, M., Bolzonella, D., Borzacconi, L., Campos, J.L., Guwy, A.J., Kalyuzhnyi, S., Jenicek, P., van Lier, J.B. 2009. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: a proposed protocol for batch assays. *Water Science and Technology*, 59(5): 927-934.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J.M. 2011. BIOMETHANATION AND ITS POTENTIAL. in: *Methods in Enzymology: Methods in Methane Metabolism, Pt A*, (Eds.) A.C. Rosenzweig, S.W. Ragsdale, Vol. 494, Elsevier Academic Press Inc. San Diego, str. 327-351.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st ed. Washington, USA, American Public Health Association
- Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(6): 755-781.
- Apul, O.G., Sanin, F.D. 2010. Ultrasonic pretreatment and subsequent anaerobic digestion under different operational conditions. *Bioresource Technology*, 101(23): 8984-8992.
- Ashekuzzaman, S.M., Poulsen, T.G. 2011. Optimizing feed composition for improved methane yield during anaerobic digestion of cow manure based waste mixtures. *Bioresource Technology*, 102(3): 2213-2218.
- Banks, C.J., Chesshire, M., Heaven, S., Arnold, R. 2011. Anaerobic digestion of source-segregated domestic food waste: Performance assessment by mass and energy balance. *Bioresource Technology*, 102(2): 612-620.
- Barber, W.P. 2005. THE EFFECTS OF ULTRASOUND ON SLUDGE DIGESTION. *Water and Environment Journal*, 19(1): 2-7.
- Batstone, D.J., Jensen, P.D. 2011. 4.17 - Anaerobic Processes. in: *Treatise on Water Science*, (Ed.) W. Editor-in-Chief: Peter, Elsevier. Oxford, str. 615-639.
- Bayer, E., Shoham, Y., Lamed, R. 2006. Cellulose-decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. in: *The Prokaryotes*, (Eds.) M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt, New York, Springer, str. 578-617.
- Bayr, S., Rintala, J. 2012. Thermophilic anaerobic digestion of pulp and paper mill primary sludge and co-digestion of primary and secondary sludge. *Water Research*, 46(15): 4713-4720.
- Bioprocess Control, 2011. AMPTS II – Automatic Methane Potential System. Operation and Maintenance Manual.
- Bombač, A., Lenarčič, J. 2009. Presoja izvedbe mešanja v nevtralizacijskem reaktorju z vodilno cevjo. *Ventil*, 15: 432 – 439.
- Bougrier, C., Carrere, H., Delgenes, J.P. 2005. Solubilisation of waste-activated sludge by ultrasonic treatment. *Chemical Engineering Journal*, 106(2): 163-169.
- Boyer, R. 2005. Temelji biokemije. Študentska založba, Ljubljana. 634 str.
- Braguglia, C.M., Gianico, A., Mininni, G. 2011. Laboratory-scale ultrasound pre-treated digestion of sludge: Heat and energy balance. *Bioresource Technology*, 102(16): 7567-7573.

- Braguglia, C.M., Mininni, G., Gianico, A. 2008. Is sonication effective to improve biogas production and solids reduction in excess sludge digestion? *Water Sci Technol*, 57(4): 479-83.
- Browne, J.D., Murphy, J.D. 2013. Assessment of the resource associated with biomethane from food waste. *Applied Energy*, 104(0): 170-177.
- Bruni, E., Jensen, A.P., Pedersen, E.S., Angelidaki, I. 2010. Anaerobic digestion of maize focusing on variety, harvest time and pretreatment. *Applied Energy*, 87(7), 2212-2217.
- Buslov, D.K., Kaputski, F.N., Sushko, N.I., Torgashev, V.I., Solov'eva, L.V., Tsarenkov, V.M., Zubets, O.V., Larchenko, L.V. 2009. Infrared spectroscopic analysis of the structure of xylans. *Journal of Applied Spectroscopy*, 76(6): 801-805.
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-Sagastume, F. 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*, 32(9): 1634-1650.
- Carrère, H., Dumas, C., Battimelli, A., Batstone, D.J., Delgenès, J.P., Steyer, J.P., Ferrer, I. 2010. Pretreatment methods to improve sludge anaerobic degradability: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3): 1-15.
- Cecchi, F., Bolzonella, D., Pavan, P., Macé, S., Mata-Alvarez, J. 2011. 6.36 - Anaerobic Digestion of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste for Methane Production: Research and Industrial Application. in: *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, (Ed.) M.-Y. Editor-in-Chief: Murray, Academic Press. Burlington, str. 463-472.
- Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, 99(10): 4044-4064.
- Chernicharo, C.A.d.L. 2007. *Anaerobic Reactors*. IWA Publishing, London.
- Chynoweth, D.P., Turick, C.E., Owens, J.M., Jerger, D.E., Peck, M.W. 1993. Biochemical methane potential of biomass and waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 5(1): 95-111.
- Deublein, D., Steinhauser, A. 2010. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Dewil, R., Baeyens, J., Goutvrind, R. 2006. Ultrasonic treatment of waste activated sludge. *Environmental Progress*, 25(2): 121-128.
- Elliott, A., Mahmood, T. 2007. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Research*, 41(19): 4273-4286.
- Erden, G., Filibeli, A. 2010. Ultrasonic pre-treatment of biological sludge: consequences for disintegration, anaerobic biodegradability, and filterability. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(1): 145-150.
- Fantozzi, F., Buratti, C. 2011. Anaerobic digestion of mechanically treated OFMSW: Experimental data on biogas/methane production and residues characterization. *Bioresource Technology*, 102(19): 8885-8892.
- Frigon, J.-C., Mehta, P., Guiot, S.R. 2012. Impact of mechanical, chemical and enzymatic pre-treatments on the methane yield from the anaerobic digestion of switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, 36(0): 1-11.
- Gerardi, M.H. 2003a. Bacteria. in: *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, John Wiley & Sons, Inc., str. 11-16.
- Gerardi, M.H. 2003b. Substrates and Products. in: *The Microbiology of Anaerobic Digesters*, John Wiley & Sons, Inc., str. 59-72.
- Gomez-Tovar, F., Cells, L.B., Razo-Flores, E., Alatraste-Mondragon, F. 2012. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresource Technology*, 116: 372-378.
- Govoreanu, R., 2004. Activated sludge flocculation dynamisc: On-line measurement methodology and modelling. Doktorska naloga. Univerza v Gentu, Fakulteta kmetijskih in aplikativnih bioloških znanosti.: 276 str.

- Gunaseelan, V.N. 2004. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 26(4): 389-399.
- Hach Lange. Targeted control of biogas plants with the help of FOS/TAC. http://www.hach-lange.ma/countrysites/action_q/download%3Bdocument/DOK_ID/14785938/type/pdf/lkz/MA/spkz/fr/TOKEN/mKV7MMONzPtTv-bAYO-9pBUgqHs/M/8bROJw_1.10.2013
- Hagelqvist, A. 2013. Batchwise mesophilic anaerobic co-digestion of secondary sludge from pulp and paper industry and municipal sewage sludge. *Waste Management*, 33(4): 820-824.
- Heiermann, M.; Plöchl, M.; Suárez Quiñones, T.; Budde, J.; Schaff, J.; Hilse, A. 2011. Prozessoptimierung durch den Einsatz von Enzymen in Biogasanlagen: Einsatz von Hilfsmitteln zur Steigerung der Effizienz und Stabilität des Biogasprozesses, 29 september, 2011. Gülzow, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., str. 83-94.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1): 10-18.
- Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C., Prochnow, A. 2012a. Particle Size Reduction during Harvesting of Crop Feedstock for Biogas Production I: Effects on Ensiling Process and Methane Yields. *BioEnergy Research*, 5(4): 926-936.
- Herrmann, C., Prochnow, A., Heiermann, M., Idler, C. 2012b. Particle Size Reduction During Harvesting of Crop Feedstock for Biogas Production II: Effects on Energy Balance, Greenhouse Gas Emissions and Profitability. *BioEnergy Research*, 5(4): 937-948.
- Hogan, F., Mormede, S., Clark, P., Crane, M. 2004. Ultrasonic sludge treatment for enhanced anaerobic digestion. *Water Science & Technology*, 50(9): 25-32.
- Iacovidou, E., Ohandja, D.-G., Voulvoulis, N. 2012. Food waste co-digestion with sewage sludge – Realising its potential in the UK. *Journal of Environmental Management*, 112(0), 267-274.
- ILIĆ, D., PANJAN, J. 2008. Ocena vpliva fosforja iz kmetijstva na evtrofikacijo površinskih voda v krajinskem parku Goričko = Estimation of impact of agricultural phosphorus on eutrophication of surface water in Goričko nature park. *Gradbeni vestnik*, letn. 57, št. 11, str. 310-316
- Izumi, K., Okishio, Y.K., Nagao, N., Niwa, C., Yamamoto, S., Toda, T. 2010. Effects of particle size on anaerobic digestion of food waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(7): 601-608.
- Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J.C., Bottero, J.Y., Villemin, G., Urbain, V., Manem, J. 1995. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*, 29(7): 1639-1647.
- Kač, M., 2008. Tematski leksikoni. KEMIJA. Učila International, Tržič, 442 str.
- Karlsson, A., Truong, X.B., Gustavsson, J., Svensson, B.H., Nilsson, F., Ejlertsson, J. 2011. Anaerobic treatment of activated sludge from Swedish pulp and paper mills - biogas production potential and limitations. *Environmental Technology*, 32(14): 1559-1571.
- Khanal, S.K., Grewell, D., Sung, S., van Leeuwen, J. 2007. Ultrasound Applications in Wastewater Sludge Pretreatment: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(4): 277-313.
- Kolbl, S., Palocz, A., Panjan, J., Stres, B. 2014. Addressing case specific biogas plant tasks: Industry oriented methane yields derived from 5 L Automatic Methane Potential Test Systems in batch or semi-continuous tests using realistic inocula, substrate particle sizes and organic loading. *Bioresource Technology*, 153(0): 180-188.
- Lauwers, J., Appels, L., Thompson, I.P., Degreève, J., Van Impe, J.F., Dewil, R. 2013. Mathematical modelling of anaerobic digestion of biomass and waste: Power and limitations. *Progress in Energy and Combustion Science*, 39(4): 383-402.

- Lehne, G., Muller, A., Schwedes, J. 2001. Mechanical disintegration of sewage sludge. *Water Sci Technol*, 43(1): 19-26.
- Lesteur, M., Bellon-Maurel, V., Gonzalez, C., Latrille, E., Roger, J.M., Junqua, G., Steyer, J.P. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry*, 45(4): 431-440.
- Lin, Y., Wang, D., Wu, S., Wang, C. 2009. Alkali pretreatment enhances biogas production in the anaerobic digestion of pulp and paper sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1): 366-373.
- Lindmark, J., Leksell, N., Schnürer, A., Thorin, E. 2012. Effects of mechanical pre-treatment on the biogas yield from ley crop silage. *Applied Energy*, 97(0): 498-502.
- Lindorfer, J., Schwarz, M.M. 2013. Site-specific economic and ecological analysis of enhanced production, upgrade and feed-in of biomethane from organic wastes. *Water Science and Technology*, 67(3): 682-688.
- Lorenz, H., Fischer, P., Schumacher, B., Adler, P. 2013. Current EU-27 technical potential of organic waste streams for biogas and energy production. *Waste Management*, 33(11): 2434-2448.
- Mao, T., Show, K.-Y. 2007. Influence of Ultrasonication on Anaerobic Bioconversion of Sludge. *Water Environment Research*, 79(4): 436-441.
- McPherson, M.J., Moller, S.G. 2006. PCR Second Edition. Taylor & Francis, New York. 305 str.
- Menardo, S., Airoidi, G., Balsari, P. 2012. The effect of particle size and thermal pre-treatment on the methane yield of four agricultural by-products. *Bioresource Technology*, 104(0): 708-714.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K. 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, 26(5): 485-495.
- Montalvo, S., Díaz, F., Guerrero, L., Sánchez, E., Borja, R. 2005. Effect of particle size and doses of zeolite addition on anaerobic digestion processes of synthetic and piggery wastes. *Process Biochemistry*, 40(3-4): 1475-1481.
- Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., Angeles de la la Rubia, M. 2012. Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review. *Applied Clay Science*, 58(0): 125-133.
- Muller, J. 2000. Disintegration as a key-step in sewage sludge treatment. *Water Science and Technology*, 41(8): 123-130.
- Muller, J.A., Winter, A., Strunkmann, G. 2004. Investigation and assessment of sludge pre-treatment processes. *Water Sci Technol*, 49(10): 97-104.
- Møller, H.B., Sommer, S.G., Ahring, B.K. 2004. Methane productivity of manure, straw and solid fractions of manure. *Biomass and Bioenergy*, 26(5): 485-495.
- Müller, J., Lehne, G., Schwedes, J., Battenberg, S., Näveke, R., Kopp, J., Dichtl, N., Scheminski, A., Krull, R., Hempel, D.C. 1998. Disintegration of sewage sludges and influence on anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 38(8-9): 425-433.
- Neis, U., Nickel, K., Tiehm, A. 2000. Enhancement of anaerobic sludge digestion by ultrasonic disintegration. *Water Science and Technology*, 42(9): 73-80.
- Nielsen, P.H., Frølund, B., Keiding, K. 1996. Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44(6): 823-830.
- Novak, D., Franke-Whittle, I.H., Pirc, E.T., Jerman, V., Insam, H., Logar, R.M., Stres, B. 2013. Biotic and abiotic processes contribute to successful anaerobic degradation of cyanide by UASB reactor biomass treating brewery waste water. *Water Research*, 47(11): 3644-3653.
- Palmowski, L.M., Muller, J.A. 2003. Anaerobic degradation of organic materials--significance of the substrate surface area. *Water Sci Technol*, 47(12): 231-8.

- Palmowski, L.M., Muller, J.A. 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 41(3): 155-162.
- Panjan, J. 2006. Die Messung von Partikelgrößen und ihre Anwendung bei Flockungs- und Absetzprozessen. *KA. Wasserwirtschaft, Abwasser, Abfall*, 53 (3): 260-264
- Parawira, W. 2012. Enzyme research and applications in biotechnological intensification of biogas production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2): 172-186.
- Pavlostathis, S.G. 2011. 6.31 - Kinetics and Modeling of Anaerobic Treatment and Biotransformation Processes. in: *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, (Ed.) M.-Y. Editor-in-Chief: Murray, Academic Press. Burlington, str. 385-397.
- Perez-Elvira, S., Fdz-Polanco, M., Plaza, F.I., Garralon, G., Fdz-Polanco, F. 2009. Ultrasound pretreatment for anaerobic digestion improvement. *Water Science and Technology*, 60(6): 1525-1532.
- Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R.J., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y. 2011. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1): 1-18.
- Pognani, M., D'Imporzano, G., Scaglia, B., Adani, F. 2009. Substituting energy crops with organic fraction of municipal solid waste for biogas production at farm level: A full-scale plant study. *Process Biochemistry*, 44(8): 817-821.
- 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(1): 439-447.
- Quarmby, J., Scott, J.R., Mason, A.K., Davies, G., Parsons, S.A. 1999. The Application of Ultrasound as a Pre-Treatment for Anaerobic Digestion. *Environmental Technology*, 20(11): 1155-1161.
- Quiñones, T.S., Plöchl, M., Pätzold, K., Budde, J., Kausmann, R., Nettmann, E., Heiermann, M. 2012. Hydrolytic Enzymes Enhancing Anaerobic Digestion. in: *Biogas Production*, John Wiley & Sons, Inc., str. 157-198.
- Rajagopal, R., Massé, D.I., Singh, G. 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, 143(0): 632-641.
- Rao, M.S., Singh, S.P., Singh, A.K., Sodha, M.S. 2000. Bioenergy conversion studies of the organic fraction of MSW: assessment of ultimate bioenergy production potential of municipal garbage. *Applied Energy*, 66(1): 75-87.
- Raposo, F., Fernandez-Cegri, V., De la Rubia, M.A., Borja, R., Beline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernandez, B., Fernandez-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Kaparaju, P., Koubova, J., Mendez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V. 2011. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(8): 1088-1098.
- Robič, N. 2012. Analiza bakterijske združbe in sedimentov štirih nepovezanih jamskih sistemov. Diplomaska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 80 str.
- Romano, R.T., Zhang, R., Teter, S., McGarvey, J.A. 2009. The effect of enzyme addition on anaerobic digestion of Jose Tall Wheat Grass. *Bioresource Technology*, 100(20): 4564-4571.
- Sambusiti, C., Monlau, F., Ficara, E., Carrère, H., Malpei, F. 2013. A comparison of different pre-treatments to increase methane production from two agricultural substrates. *Applied Energy*, 104(0): 62-70.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2): 185-194.
- Scano, E.A., Asquer, C., Pistis, A., Ortu, L., Demontis, V., Cocco, D. 2014. Biogas from anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes: Experimental results on pilot-scale and preliminary

- performance evaluation of a full-scale power plant. *Energy Conversion and Management*, 77(0): 22-30.
- Sundberg, C., Al-Soud, W.A., Larsson, M., Alm, E., Yekta, S.S., Svensson, B.H., Sørensen, S.J., Karlsson, A. 2013. 454 pyrosequencing analyses of bacterial and archaeal richness in 21 full-scale biogas digesters. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3): 612-626.
- Thorin, E., Lindmark, J., Nordlander, E., Odlare, M., Dahlquist, E., Kastensson, J., Leksell, N., Pettersson, C.-M. 2012. Performance optimization of the Växtkraft biogas production plant. *Applied Energy*, 97(0): 503-508.
- Tian, X.-f., Fang, Z., Guo, F. 2012. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3): 335-350.
- Tiehm, A., Nickel, K., Zellhorn, M., Neis, U. 2001. Ultrasonic waste activated sludge disintegration for improving anaerobic stabilization. *Water Research*, 35(8): 2003-2009.
- Tomei, M.C., Braguglia, C.M., Cento, G., Mininni, G. 2009. Modeling of Anaerobic Digestion of Sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(12): 1003-1051.
- Uredba o podporah električni energiji, proizvedeni iz obnovljivih virov energije. UL RS št. 37/2009:1780
- Uredba o spremembi Uredbe o podporah električni energiji, proizvedeni iz obnovljivih virov energij UL RS št. 43/2011: 2096
- Uredbi o predelavi biološko razgradljivih odpadkov in uporabi komposta ali digestata. UL RS št. 99/2013: 10787-10796.
- Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*, 30(6): 1458-1480.
- VDI-4630. 2006. Fermentation of organic materials, Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests. in: *VDI Handbuch Energietechnik*, Beuth Verlag. Berlin, Germany, 92 str.
- Vesilind, P. A, Rooke, R. L., 2003. *Wastewater treatment plant design*. Water environment Federation, IWA Publishing, Velika Britanija.
- Walker, M., Zhang, Y., Heaven, S., Banks, C. 2009. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. *Bioresource Technology*, 100(24): 6339-6346.
- Wang, F., Wang, Y., Ji, M. 2005. Mechanisms and kinetics models for ultrasonic waste activated sludge disintegration. *Journal of Hazardous Materials*, 123(1-3): 145-150.
- Wang, Q., Kuninobu, M., Kakimoto, K., I-Ogawa, H., Kato, Y. 1999. Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment. *Bioresource Technology*, 68(3): 309-313.
- Wang, X., Yang, G., Li, F., Feng, Y., Ren, G., Han, X. 2013. Evaluation of two statistical methods for optimizing the feeding composition in anaerobic co-digestion: Mixture design and central composite design. *Bioresource Technology*, 131(0): 172-178.
- Weiß, S., Tauber, M., Somitsch, W., Meincke, R., Müller, H., Berg, G., Guebitz, G.M. 2010. Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite. *Water Research*, 44(6): 1970-1980.
- Werner, J.J., Knights, D., Garcia, M.L., Scalfone, N.B., Smith, S., Yarasheski, K., Cummings, T.A., Beers, A.R., Knight, R., Angenent, L.T. 2011. Bacterial community structures are unique and resilient in full-scale bioenergy systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10): 4158-4163.

- Wett, B., Phothilangka, P., Eladawy, A. 2010. Systematic comparison of mechanical and thermal sludge disintegration technologies. *Waste Management*, 30(6): 1057-1062.
- Wood, N., Tran, H., Master, E. 2009. Pretreatment of pulp mill secondary sludge for high-rate anaerobic conversion to biogas. *Bioresource Technology*, 100(23): 5729-5735.
- Xing, Y., Ghani, Y.A., Ooi, K.-e., Xie, R., Ng, S.-w. 2007. Full-scale demonstration of an ultrasonic disintegration technology in enhancing anaerobic digestion of mixed primary and thickened secondary sewage sludge. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 6(5): 533-541.
- Xu, H., He, P., Yu, G., Shao, L. 2011. Effect of ultrasonic pretreatment on anaerobic digestion and its sludge dewaterability. *Journal of Environmental Sciences*, 23(9): 1472-1478.
- Yan, L., Gao, Y., Wang, Y., Liu, Q., Sun, Z., Fu, B., Wen, X., Cui, Z., Wang, W. 2012. Diversity of a mesophilic lignocellulolytic microbial consortium which is useful for enhancement of biogas production. *Bioresource Technology*, 111(0): 49-54.
- Yeow, S.K., Peng, W.L. 2012. Application of Ultrasound Pretreatment for Sludge Digestion. in: *Biogas Production*, John Wiley & Sons, Inc., str. 91-136.
- Zhang, Y., Banks, C.J. 2013. Impact of different particle size distributions on anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste. *Waste Management*, 33(2): 297-307.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*(0).
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Sun, S., Qiao, W., Xiao, M. 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*, 102(24): 11177-11182.
- Zhu, L., O'Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzaple, M.T. 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 99(9): 3817-3828.
- Zielewicz, E., Sorys, P. 2008. The comparison of ultrasonic disintegration in laboratory and technical scale disintegrators. *The European Physical Journal Special Topics*, 154(1): 289-294.
- Ziemiński, K., Romanowska, I., Kowalska, M. 2012. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic wastes to improve biogas production. *Waste Management*, 32(6): 1131-1137.
- Zlokarnik, M. 2002. Scale up in chemical engineering. Wiley-VCH Verlag, Weinheim: 224 str.
- Genetika, <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg> (7.10.2013)
- Viskoznost, <http://sl.wikipedia.org/wiki/Viskoznost> (23.3.2014)
- Višine podpor električni energiji, http://www.borzen.si/si/cp/Shared%20Documents/Podpore_slo.pdf (22.3.2014)
- Komunalno podjetje Velenje, http://www.kp-velenje.si/index.php?option=com_content&view=article&id=126&Itemid=201 (9.4.2014)

PRILOGE

SEZNAM PRILOG

PRILOGA A: Vhodni podatki za delo s programom STATISTICA	ii
PRILOGA B: Karakteristike bioplinskih elektrarn	iv
PRILOGA C: Seznam uporabljenih encimov v eksperimentih	v
PRILOGA D: Biometanski potenciali različnih organskih substratov iz literature	vi
PRILOGA E: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin v anaerobnih reaktorjih iz eksperimenta 12.	ix
PRILOGA F: Vsebnost organskih snovi in razgradnja organskih snovi iz eksperimenta 13.	xiii
PRILOGA G: Spreminjanje viskoznosti biomase iz eksperimenta 13	xv
PRILOGA H: Klasifikacije biomase, ki se lahko uporablja za proizvodnjo električne energije	xviii
PRILOGA I: Obrazložitve okrajšav in parametrov	xix

PRILOGA A: Vhodni podatki za delo s programom STATISTICA

Preglednica A1: Vhodna tabela za program STATISTICA za kombinacijo treh substratov.

Table A1: Input table used in STATISTICA software for combinations of three substrates.

Neodvisne variable, x_{ij}				Odvisna variabla, Y
blato Kraft	Paloma	Koruzna silaža	biološki odpadki	BMP (ml CH ₄ /g OS)
1	0	0	0	-141,0
1	0	0	0	-140,4
1	0	0	0	-139,8
0	1	0	0	56,3
0	1	0	0	73,5
0	1	0	0	90,7
0	0	1	0	252,0
0	0	1	0	256,1
0	0	1	0	261,3
0	0	0	1	360,6
0	0	0	1	370,6
0	0	0	1	381,9
0,5	0	0	0,5	-147,0
0,5	0	0	0,5	-132,7
0,5	0	0	0,5	-118,3
0,5	0,5	0	0	-125,0
0,5	0,5	0	0	-79,6
0,5	0,5	0	0	-34,2
0,5	0	0,5	0	-107,9
0,5	0	0,5	0	-105,2
0,5	0	0,5	0	-102,5
0	0,5	0,5	0	162,3
0	0,5	0,5	0	187,2
0	0,5	0,5	0	212,1
0	0,5	0	0,5	179,8
0	0,5	0	0,5	224,1
0	0,5	0	0,5	268,4
0	0	0,5	0,5	297,6
0	0	0,5	0,5	367,3
0	0	0,5	0,5	437,5
0,3333	0	0,3333	0,3333	65,5
0,3333	0	0,3333	0,3333	90,4
0,3333	0	0,3333	0,3333	115,3
0	0,3333	0,3333	0,3333	208,7
0	0,3333	0,3333	0,3333	212,0
0	0,3333	0,3333	0,3333	215,3
0,25	0,25	0,25	0,25	123,8
0,25	0,25	0,25	0,25	146,1
0,25	0,25	0,25	0,25	168,8

Preglednica A2: Vhodna tabela za program STATISTICA za kombinacijo blata iz ČN in bioloških odpadkov.

Table A2: Input table used in STATISTICA software for combination of wastewater sludge and OFMSW.

Neodvisne variable, x_{ij}		Odvisna variabla, Y
biološki odpadki	blato iz ČN	BMP (ml CH ₄ /g OS)
1	0	292,0
1	0	308,9
1	0	355,1
0	1	239,6
0	1	248,2
0	1	256,7
0,5	0,5	229,7
0,5	0,5	244,7
0,5	0,5	259,7

Preglednica A3: Vhodna tabela za program STATISTICA za kombinacijo blata iz ČN in zelenega odreza.

Table A3: Input table used in STATISTICA software for combinations of wastewater sludge and green cuttings.

Neodvisne variable, x_{ij}		Odvisna variabla, Y
blato iz ČN	zeleni odrez	BMP (ml CH ₄ /g OS)
1	0	453
1	0	470
1	0	487
0	1	136
0	1	154
0	1	172
0,5	0,5	282
0,5	0,5	299
0,5	0,5	316
0,75	0,25	237
0,75	0,25	280
0,75	0,25	323
0,85	0,15	247
0,85	0,15	275
0,85	0,15	303
0,9	0,1	297
0,9	0,1	321
0,9	0,1	345
0,95	0,05	480
0,95	0,05	507
0,95	0,05	528

PRILOGA B: Karakteristike bioplinskih elektrarn

Preglednica B1: Karakteristike bioplinskih elektrarn, iz katerih smo uporabljali biomaso.

Table B1: Characteristics of biogas plants used in doctoral dissertation.

Bioplinarna	Lastnik	Leto začetka obratovanja	pH	T(°C)	Volumen reaktorjev	Nazivna moč	Priprava substratov	HRT (dan)	OLR (t OS/dan)	Vrsta substrata	S/I razmerje (kg OS m ⁻³)
BPE Vucja vas	Keter Organica d.o.o.	2011	7,96 ± 0	38 ± 2	6 x 3.931 m ³ reaktorjev in 2 post-reaktorja volumna 5.350 m ³	4 MW	mešanje substratov v mešalni jami in dodajanje vode iz vodnih rezervoarjev ter ogrevanje na 30°C	100	60 - 70	kravji gnoj in gnojevka, koruzna silaža, micelij, olivne tropine, sirek, suho in mokro mleto koruzno zrnje, vinjasa	3,5 - 10
BPE Šijanec	Robert Šijanec	2011	7,47 ± 0,03	38 ± 2	3 x 3843 m ³ reaktorji	1 MW	mešanje substratov v mešalni jami in dodajanje vode iz vodnih rezervoarjev ter ogrevanje na 30°C	60	25 - 30	koruzna silaža, kravji in prašičji gnoj ter gnojevka, travna silaža, vinjasa	3,5 - 10
BPE Kolar	Marjan Kolar	2007	7,68 ± 0,06	38 ± 2	4 x 2077 m ³ reaktorji	1 MW	mešanje substratov v mešalni jami in dodajanje vode iz vodnih rezervoarjev ter ogrevanje na 30°C	80	20 - 25	koruzna silaža, kravji in prašičji gnoj ter gnojevka, travna silaža	3,5 - 10
CCN Šaleške doline	Komunalno podjetje Velenje d.o.o.	1990, od leta 2007 ogrevanje sekundarnega anaerobnega reaktorja	7,59 ± 0,02	35 - 37	2 x 960 m ³	150 kW	zgoščevanje blata na zgoščevalniku do 4 - 6 % SS pred doziranjem v anaerobni reaktor	28	2 - 2,5	primarno in sekundarno blato v razmerju 5:3	2,4 - 7

PRILOGA C: Seznam uporabljenih encimov v eksperimentih

Preglednica C1: Encimi, ki smo jih uporabili v eksperimentih.

Table C1: Enzymes used in experiments.

Proizvajalec	Testni vzorec	Encimi	Uporaba	pH območje	Temperaturno območje	Priporočeno doziranje
Novozymes	NS81217	Amilaze	Razgradnja škroba	5-9	30-80 °C	0,1 do 1 % glede na suho snov substrata
	NS81220	Proteaze	Razgradnja beljakovin	7-10	40-80 °C	
	NS81233	Hemicelulaze	Razgradnja hemiceluloze	6,5-9,5	35-65 °C	
	NS81022	Lipaze	Razgradnja maščob	5-10	30-50 °C	
	NS81210	Celulaze kompleks	Razgradnja celuloze	4,5-7,5	35-65 °C	
Eurovix	Micropan Biogas	Encimske sestavine, mešanica fakultativnih anaerobnih bakterij	Hidroliza polisaharidov, beljakovin in maščob	6-7	Ni podatka	50 mg/1 l vzorca
NovaBiotec	Novalin	Celulaze, hidrolitski encimi	Razgradnja lignina in celuloze	7-8	35-55 °C	200 do 400 g/t OS suhega vzorca
Biofuture	BFL 4400AN	Posebno izbrani mikroorganizmi	Pretvorba organskih snovi v enostavne organske kisline,	Ni podatka	Ni podatka	0,07 g/g dozirane organske snovi

PRILOGA D: Biometanski potenciali različnih organskih substratov iz literature

Preglednica D1: Biometanski potenciali različnih organskih substratov.

Table D1: Biomethane potential of various organic substrates.

Številka	Substrat	BMP (ml CH ₄ / g OS)	Vir
1	papirniško blato	53,26	(Hagelqvist, 2013)
2	papirniško blato	118	(Karlsson et al., 2011)
3	papirniško blato	87	(Karlsson et al., 2011)
4	papirniško blato	103	(Karlsson et al., 2011)
5	papirniško blato	69	(Karlsson et al., 2011)
6	papirniško blato	110	(Karlsson et al., 2011)
7	papirniško blato	117	(Karlsson et al., 2011)
8	papirniško blato	43	(Karlsson et al., 2011)
9	papirniško blato	98	(Karlsson et al., 2011)
10	papirniško blato	95	(Karlsson et al., 2011)
11	papirniško blato	155	(Karlsson et al., 2011)
12	papirniško blato	51	(Karlsson et al., 2011)
13	papirniško blato	132	(Karlsson et al., 2011)
14	koruzna silaža	311	(Herrmann et al., 2012)
15	koruzna silaža	304	(Herrmann et al., 2012)
16	koruzna silaža	328	(Herrmann et al., 2012)
17	koruzna silaža	325	(Herrmann et al., 2012)
18	koruzna silaža	354	(Herrmann et al., 2012)
19	koruzna silaža	346	(Herrmann et al., 2012)
20	koruzna silaža	335	(Herrmann et al., 2012)
21	koruzna silaža	331	(Herrmann et al., 2012)
22	koruzna silaža	313	(Herrmann et al., 2012)
23	koruzna silaža	364	(Raposo et al., 2012)
24	koruzna silaža	315	(Raposo et al., 2012)
25	koruzna silaža	251	(Raposo et al., 2012)
26	koruzna silaža	349	(Raposo et al., 2012)
27	koruzna silaža	378	(Raposo et al., 2012)
28	koruzna silaža	328	(Raposo et al., 2012)
29	koruzna silaža	418	(Raposo et al., 2012)
30	koruzna silaža	196	(Raposo et al., 2012)
31	koruzna silaža	233	(Raposo et al., 2012)
32	koruzna silaža	250	(Raposo et al., 2012)
33	koruzna silaža	340	(Raposo et al., 2012)
34	koruzna silaža	334	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
35	koruzna silaža	283	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
36	koruzna silaža	280	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
37	koruzna silaža	366	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
38	koruzna silaža	302	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)

se nadaljuje...

...nadaljevanje Preglednice D1

39	koruzna silaža	322	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
40	koruzna silaža	313	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
41	koruzna silaža	326	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
42	koruzna silaža	287	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
43	tritikal	351	(Herrmann et al., 2012)
44	tritikal	335	(Herrmann et al., 2012)
45	tritikal	327	(Herrmann et al., 2012)
46	tritikal	318	(Herrmann et al., 2012)
47	tritikal	211	(Raposo et al., 2012)
48	tritikal	286	(Raposo et al., 2012)
49	tritikal	290	(Raposo et al., 2012)
50	tritikal	252	*
51	tritikal	255	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
52	tritikal	265	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
53	tritikal	232	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
54	tritikal	212	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
55	tritikal	213	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
56	tritikal	264	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
57	tritikal	236	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
58	tritikal	241	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
59	tritikal	223	(Amon et al., 2007a; Amon et al., 2007b)
60	tritikal	319	(Esposito et al., 2012)
61	tritikal	335	(Esposito et al., 2012)
62	wheat bran	500	(Deublein & Steinhauser, 2010)
63	wheat bran	600	(Deublein & Steinhauser, 2010)
64	klavniški odpadki	351	(Raposo et al., 2012)
65	klavniški odpadki	381	(Raposo et al., 2012)
66	klavniški odpadki	482	(Raposo et al., 2012)
67	klavniški odpadki	390	(Raposo et al., 2012)
68	klavniški odpadki	230	(Raposo et al., 2012)
69	biološki odpadki	900	(Hansen et al., 2004)
70	biološki odpadki	850	(Hansen et al., 2004)
71	biološki odpadki	790	(Hansen et al., 2004)
72	biološki odpadki	930	(Hansen et al., 2004)
73	biološki odpadki	920	(Hansen et al., 2004)
74	biološki odpadki	760	(Hansen et al., 2004)
75	biološki odpadki	240	(Hansen et al., 2004)
76	biološki odpadki	155	(Hansen et al., 2004)
77	biološki odpadki	110	(Hansen et al., 2004)
78	biološki odpadki	255	(Hansen et al., 2004)
79	biološki odpadki	270	(Hansen et al., 2004)

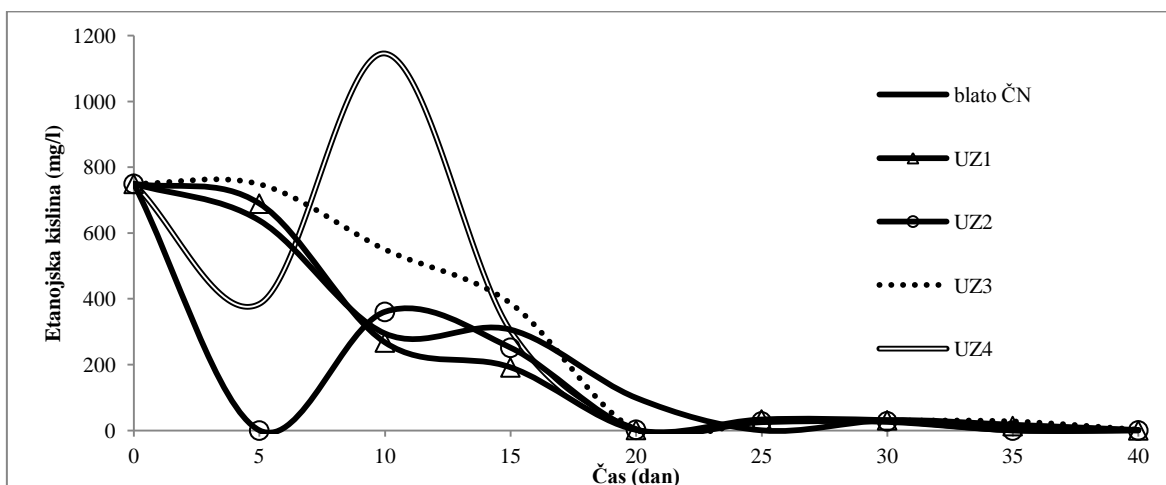
se nadaljuje...

...nadaljevanje Preglednice D1

80	biološki odpadki	280	(Hansen et al., 2004)
81	biološki odpadki	420	(Hansen et al., 2004)
82	biološki odpadki	410	(Hansen et al., 2004)
83	biološki odpadki	360	(Hansen et al., 2004)
84	biološki odpadki	298	(Raposo et al., 2012)
85	biološki odpadki	573	(Raposo et al., 2012)
86	biološki odpadki	200	(Raposo et al., 2012)
87	biološki odpadki	220	(Raposo et al., 2012)
88	biološki odpadki	160	(Raposo et al., 2012)
89	biološki odpadki	250	(Raposo et al., 2012)
90	biološki odpadki	495	(Raposo et al., 2012)
91	biološki odpadki	353	(Raposo et al., 2012)
92	biološki odpadki	230	(Raposo et al., 2012)
93	biološki odpadki	550	(Raposo et al., 2012)
94	biološki odpadki	92	(Raposo et al., 2012)
95	biološki odpadki	60	(Raposo et al., 2012)
96	biološki odpadki	530	(Raposo et al., 2012)
97	biološki odpadki	187	(Raposo et al., 2012)
98	biološki odpadki	450	(Raposo et al., 2012)
99	biološki odpadki	50	(Raposo et al., 2012)
100	biološki odpadki	200	(Raposo et al., 2012)
101	biološki odpadki	186	(Raposo et al., 2012)
102	biološki odpadki	222	(Raposo et al., 2012)
103	biološki odpadki	360	(Raposo et al., 2012)
104	glukoza	380	(Hansen et al., 2004)
105	glukoza	360	(Hansen et al., 2004)
106	glukoza	335	(Hansen et al., 2004)
107	glukoza	351	(Raposo et al., 2012)
108	glukoza	335	(Raposo et al., 2012)
109	blato s ČN	320	(Luostarinen et al., 2009)
110	blato s ČN	318	(Luostarinen et al., 2009)
111	blato s ČN	278	(Luostarinen et al., 2009)
112	blato s ČN	210	(Carrère et al., 2010)
113	blato s ČN	275	(Apul & Sanin, 2010)
114	blato s ČN	294	(Apul & Sanin, 2010)
115	blato s ČN	239	(Apul & Sanin, 2010)
116	blato s ČN	295	(Perez-Elvira et al., 2009)

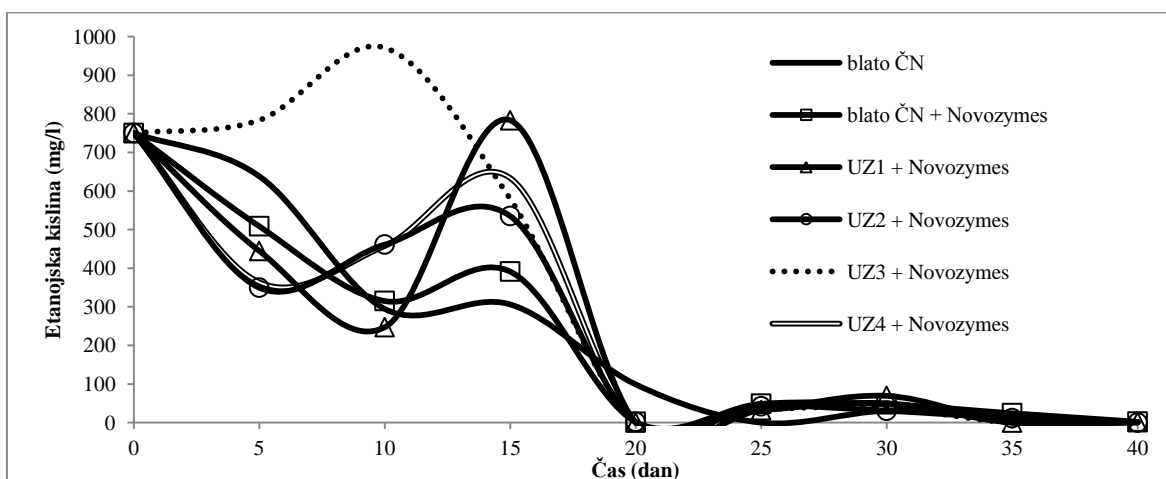
*[http://www.biomass-asia-](http://www.biomass-asia-workshop.jp/biomassws/08workshop/files/4Biogas%20Production%20from%20Residues%20of%20tr)[workshop.jp/biomassws/08workshop/files/4Biogas%20Production%20from%20Residues%20of%20tr](http://www.biomass-asia-workshop.jp/biomassws/08workshop/files/4Biogas%20Production%20from%20Residues%20of%20tr)
[itikal.pdf](http://www.biomass-asia-workshop.jp/biomassws/08workshop/files/4Biogas%20Production%20from%20Residues%20of%20tr)

PRILOGA E: Vsebnost hlapnih maščobnih kislin v anaerobnih reaktorjih iz eksperimenta 12.



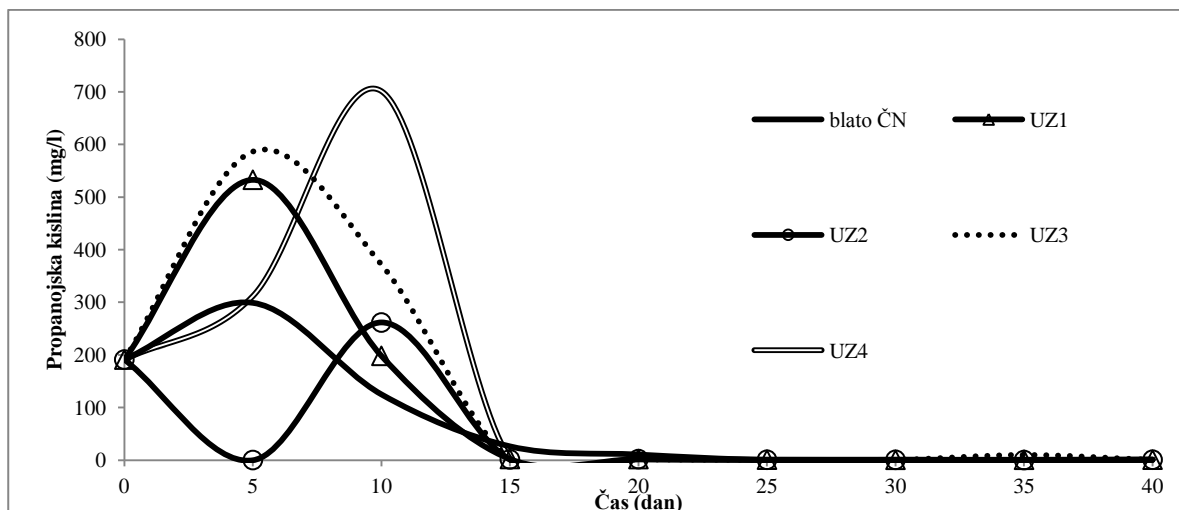
Grafikon E1: Koncentracija etanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E1: Concentration of ethanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound in 40 day semi-continuous process.



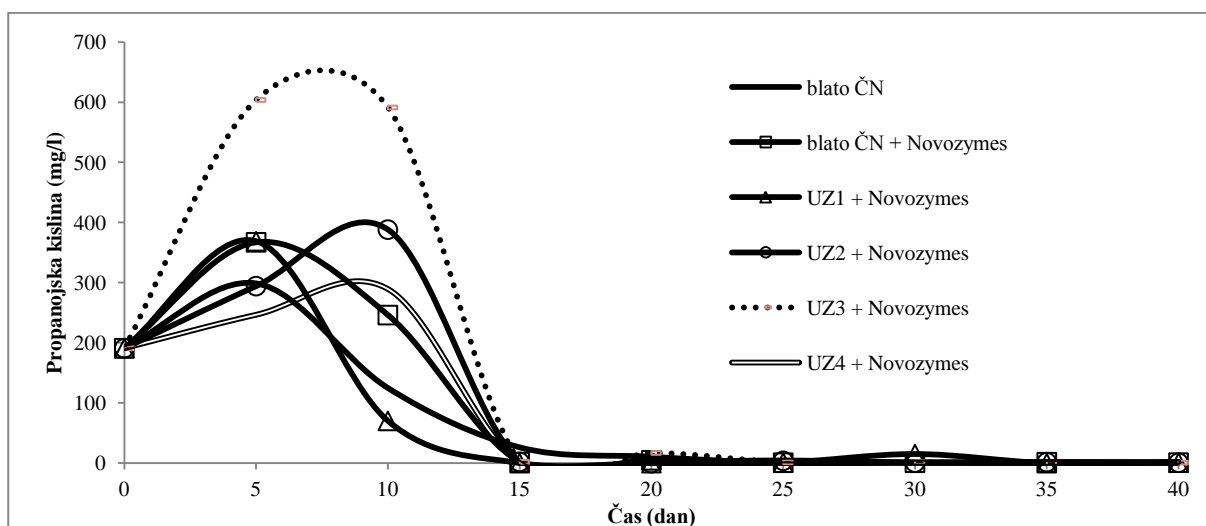
Grafikon E2: Koncentracija etanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E8: Concentration of ethanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound and enzymes in 40 day semi-continuous process.



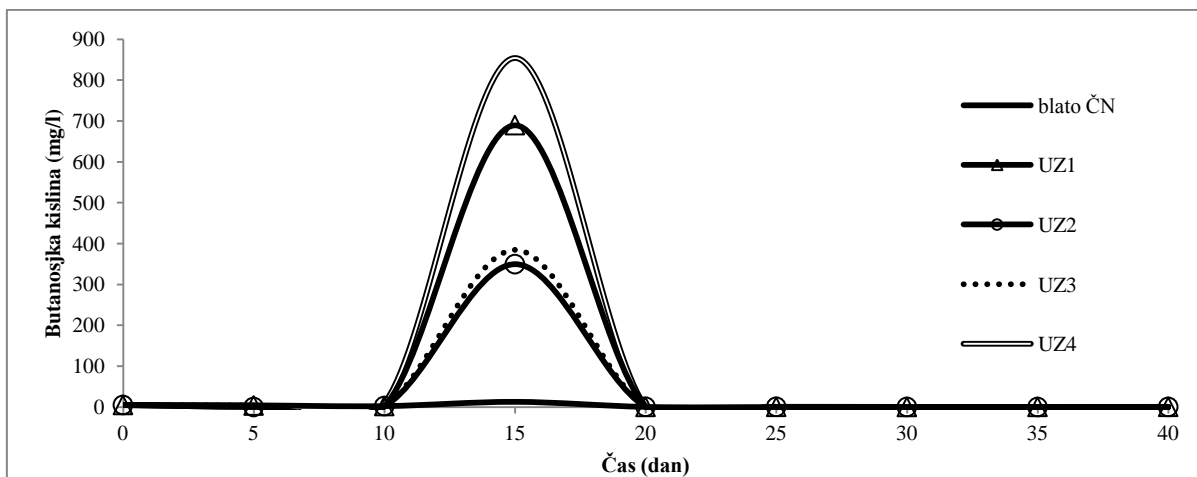
Grafikon E3: Koncentracija propanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E3: Concentration of propanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound in 40 day semi-continuous process.



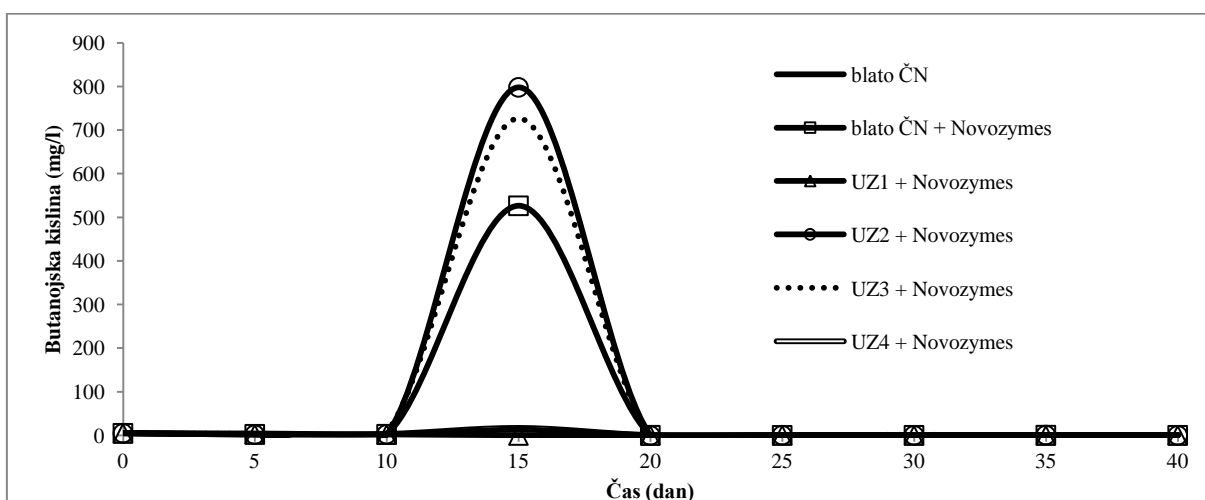
Grafikon E4: Koncentracija propanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E8: Concentration of propanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound and enzymes in 40 day semi-continuous process.



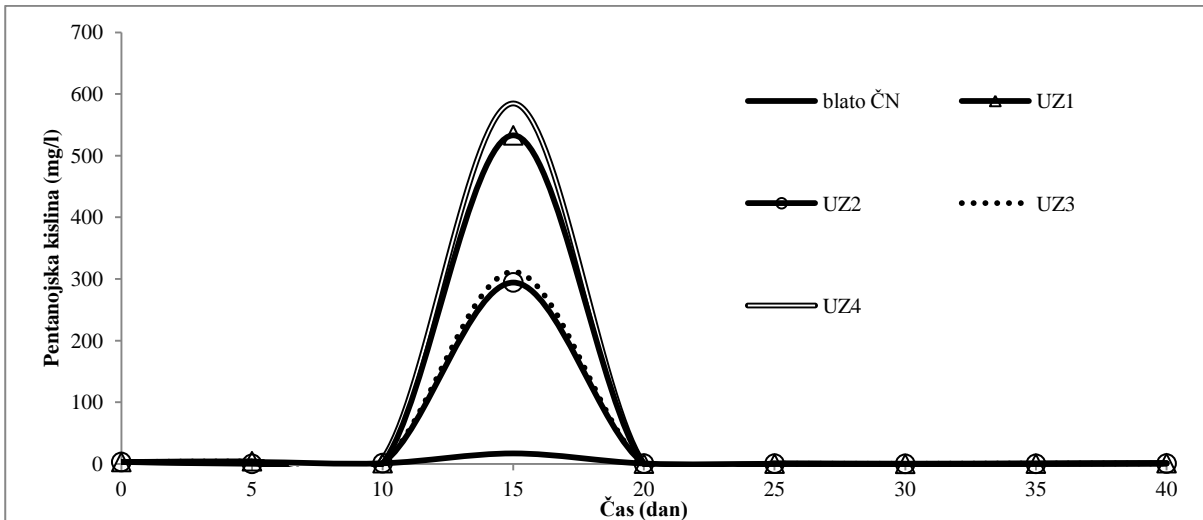
Grafikon E5: Koncentracija butanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E5: Concentration of butyric acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound in 40 day semi-continuous process.



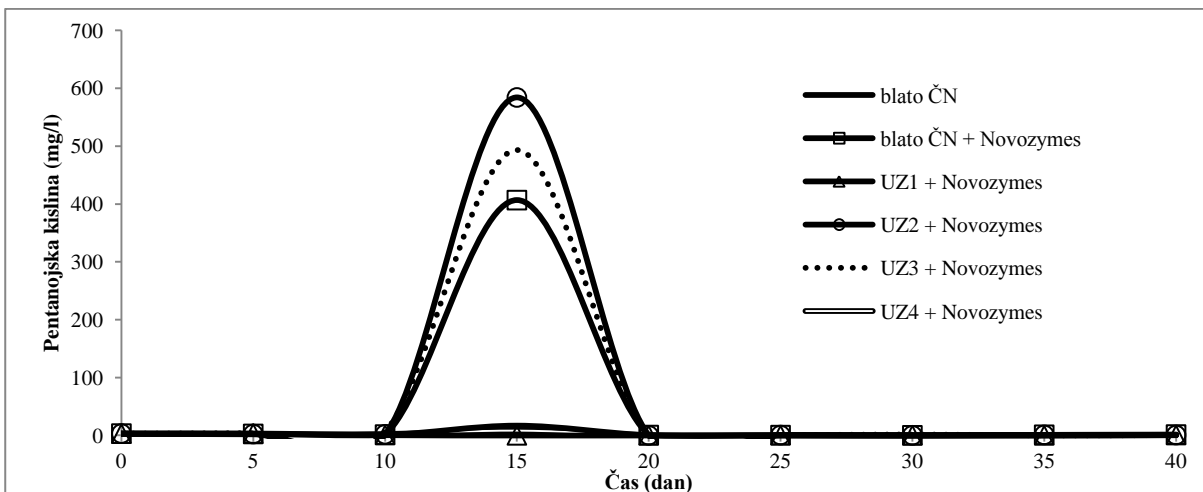
Grafikon E6: Koncentracija butanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevem semi-kontinuiranem procesu.

Graph E7: Concentration of butyric acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound and enzymes in 40 day semi-continuous process.



Grafikon E7: Koncentracija pentanojske kisline v kontrolnem reaktorju in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom v 40 dnevnem semi-kontinuiranem procesu.

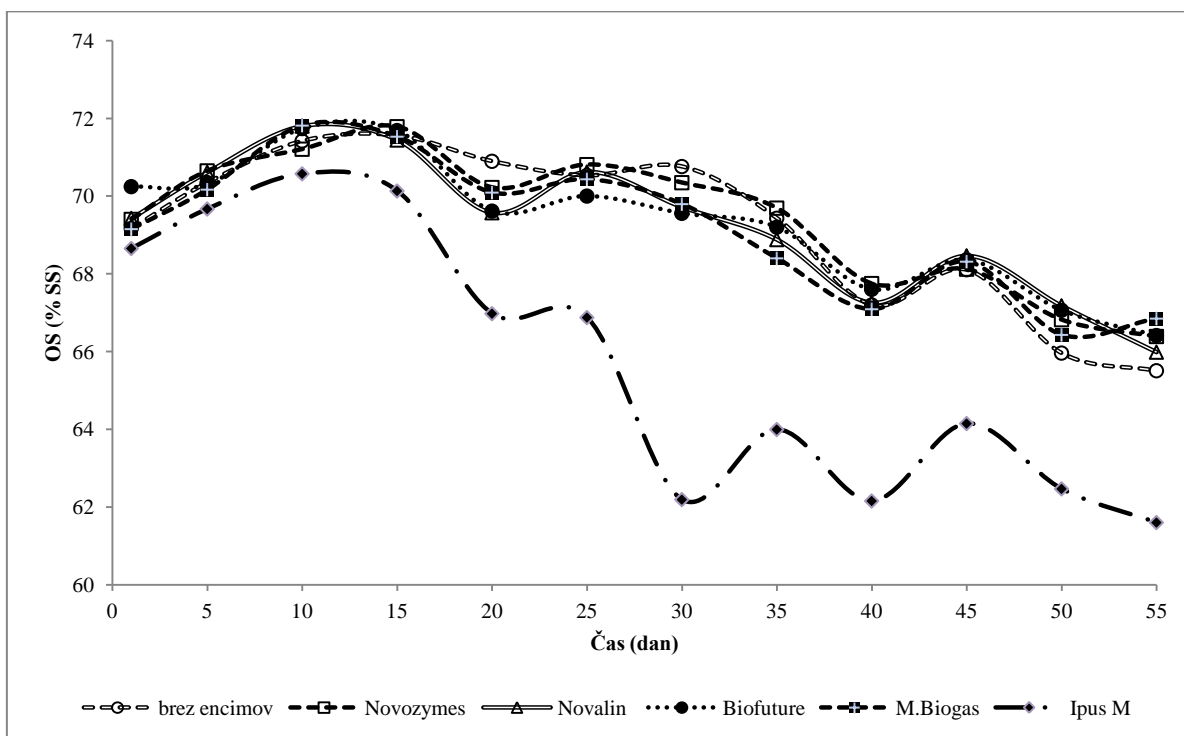
Graph E7: Concentration of pentanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound in 40 day semi-continuous process.



Grafikon E8: Koncentracija pentanojske kisline v izhodiščnem vzorcu in reaktorjih obdelanih z ultrazvokom in encimi v 40 dnevnem semi-kontinuiranem procesu.

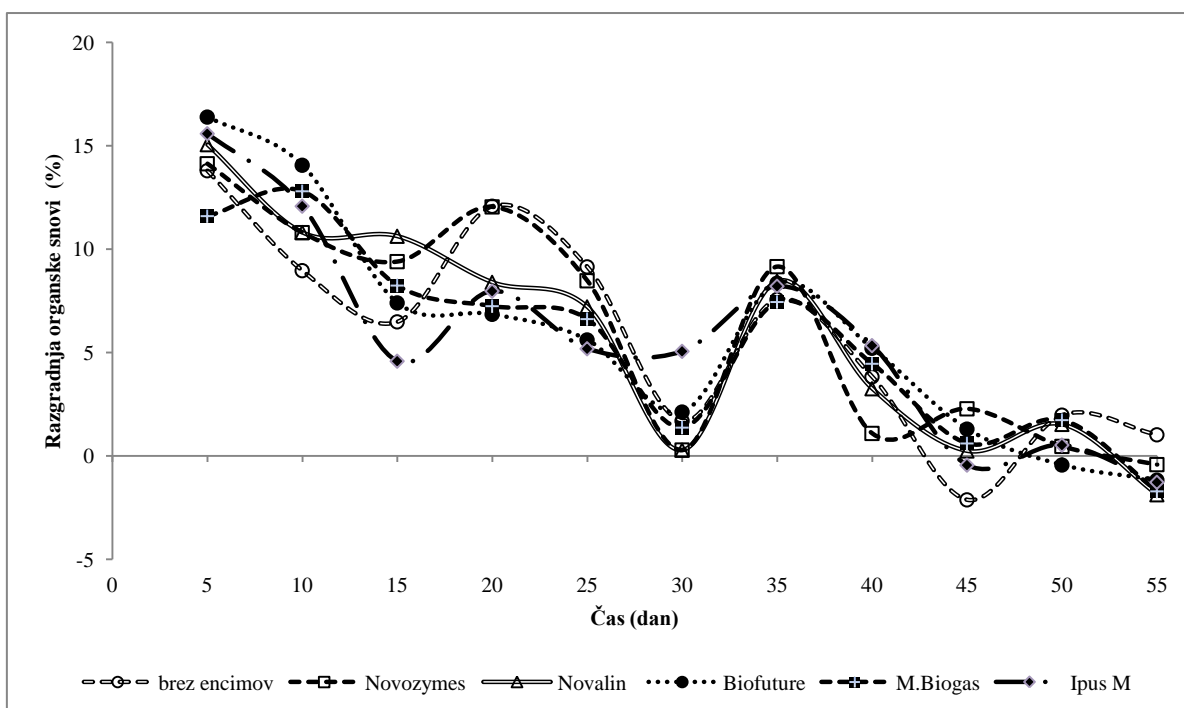
Graph E8: Concentration of pentanoic acid in control reactor and pretreated reactors with ultrasound and enzymes in 40 day semi-continuous process.

PRILOGA F: Vsebnost organskih snovi in razgradnja organskih snovi iz eksperimenta 13



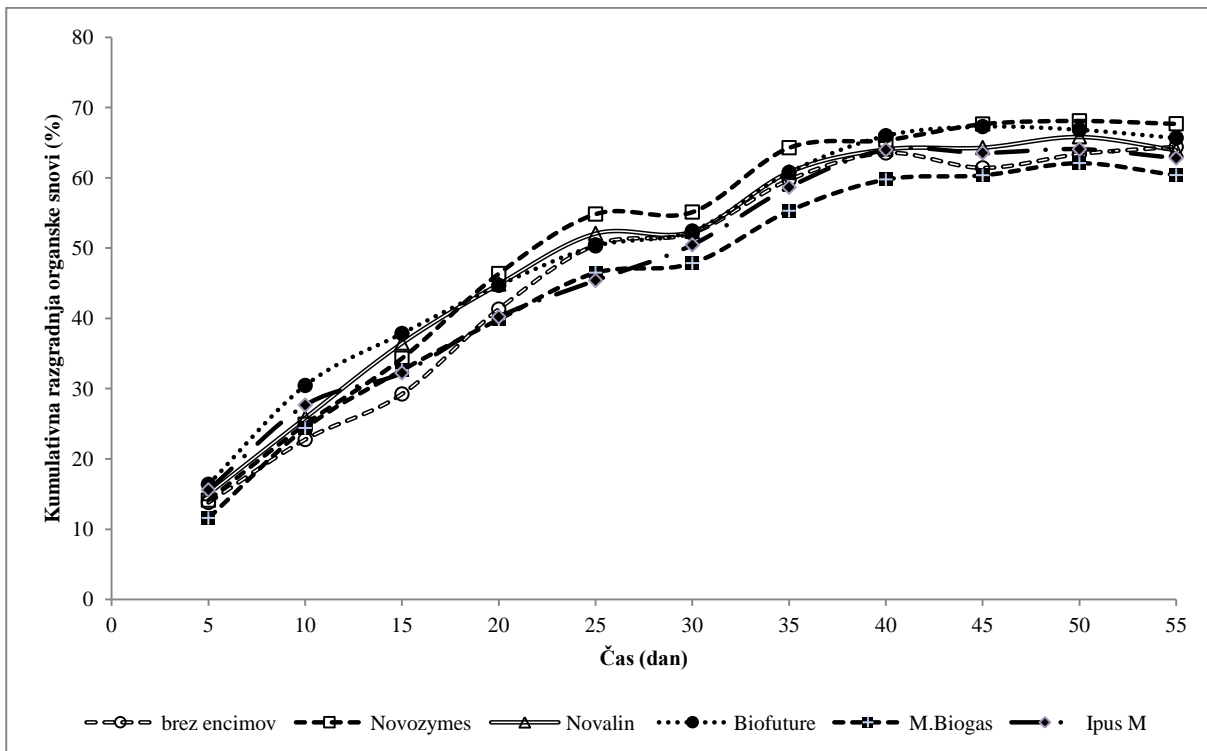
Grafikon F1: Gibanje OS (% SS) v eksperimentu 13.

Graph F1: Variation of VS (% TS) in experiment 13.



Grafikon F2: Razgradnja organske snovi v eksperimentu 13.

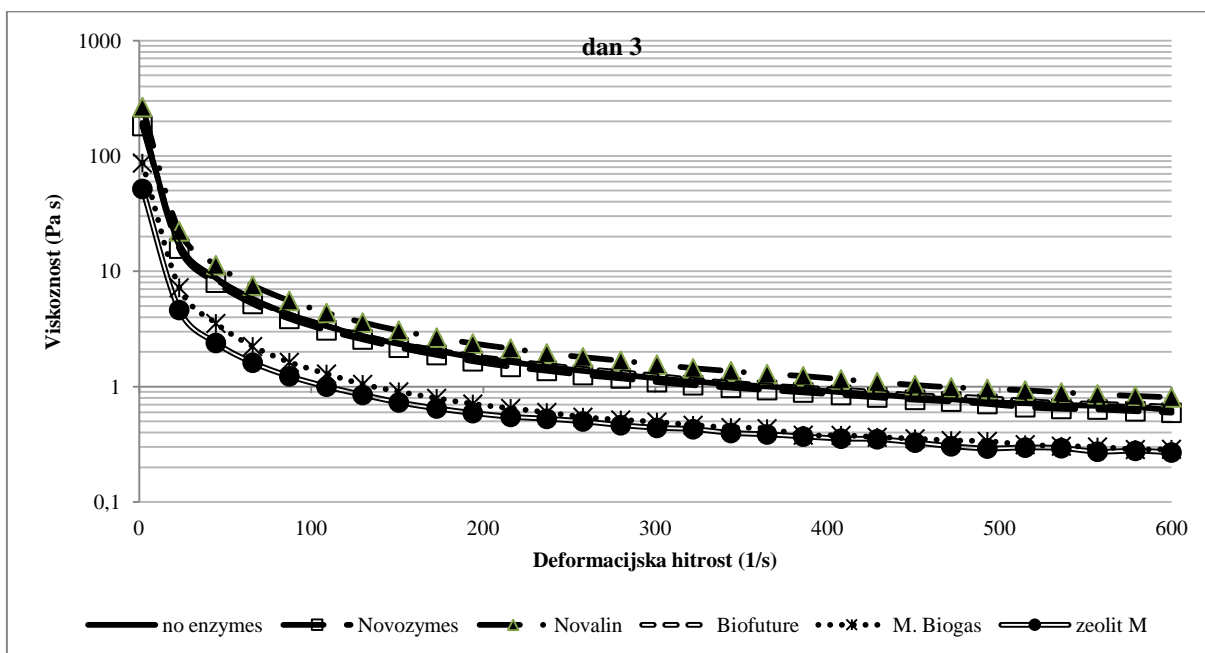
Graph F2: Volatile solids reduction in experiment 13.



Grafikon F3: Kumulativna razgradnja organske snovi v eksperimentu 13.

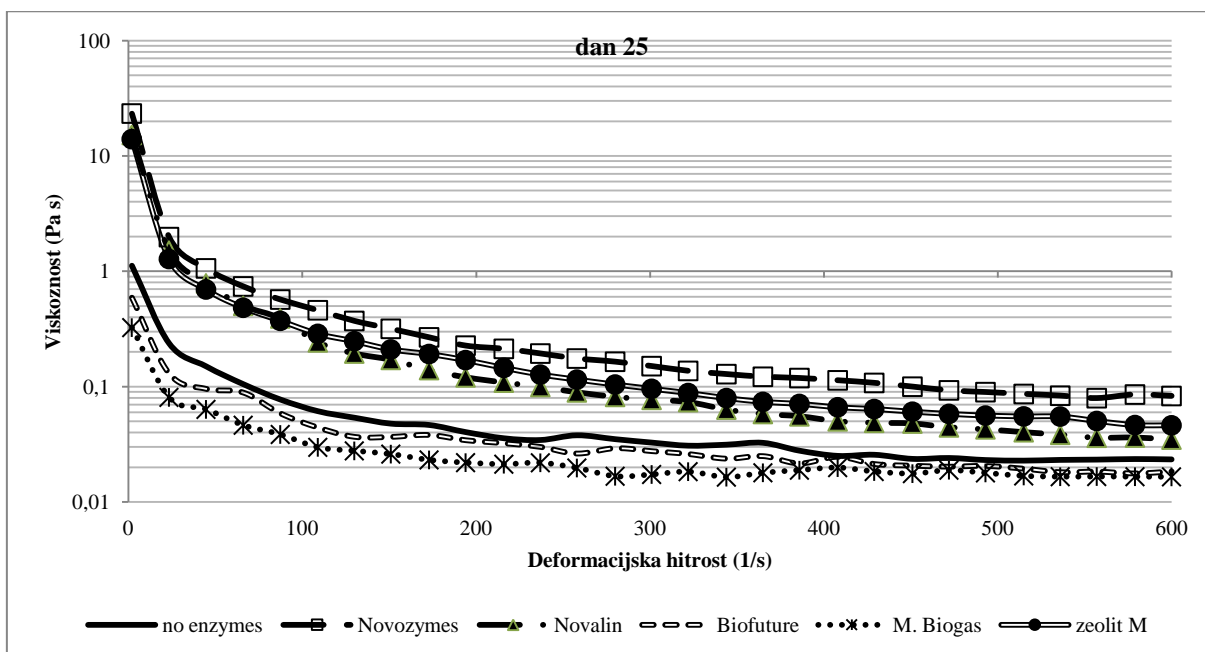
Graph F3: Cumulative volatile solids reduction in experiment 13.

PRILOGA G: Spreminjanje viskoznosti biomase iz eksperimenta 13



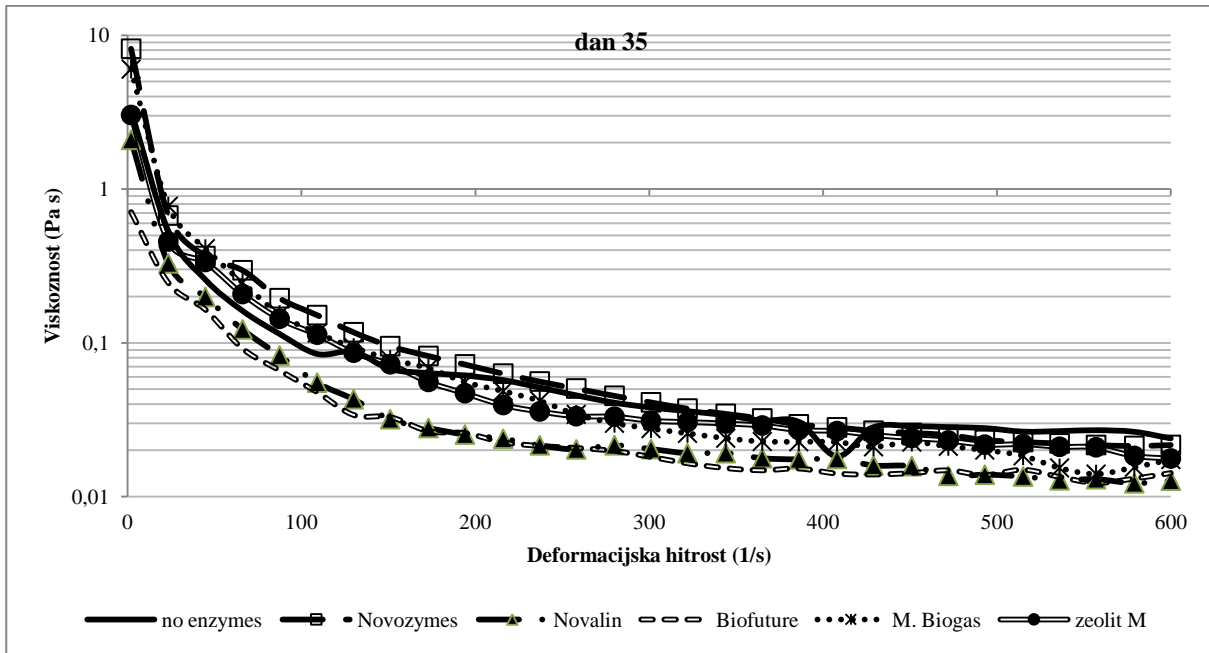
Grafikon G1: Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov tretji dan po zagonu eksperimenta 13.

Graph G1: Viscosity as a function of shear rate for anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes at day 3 in experiment 13.



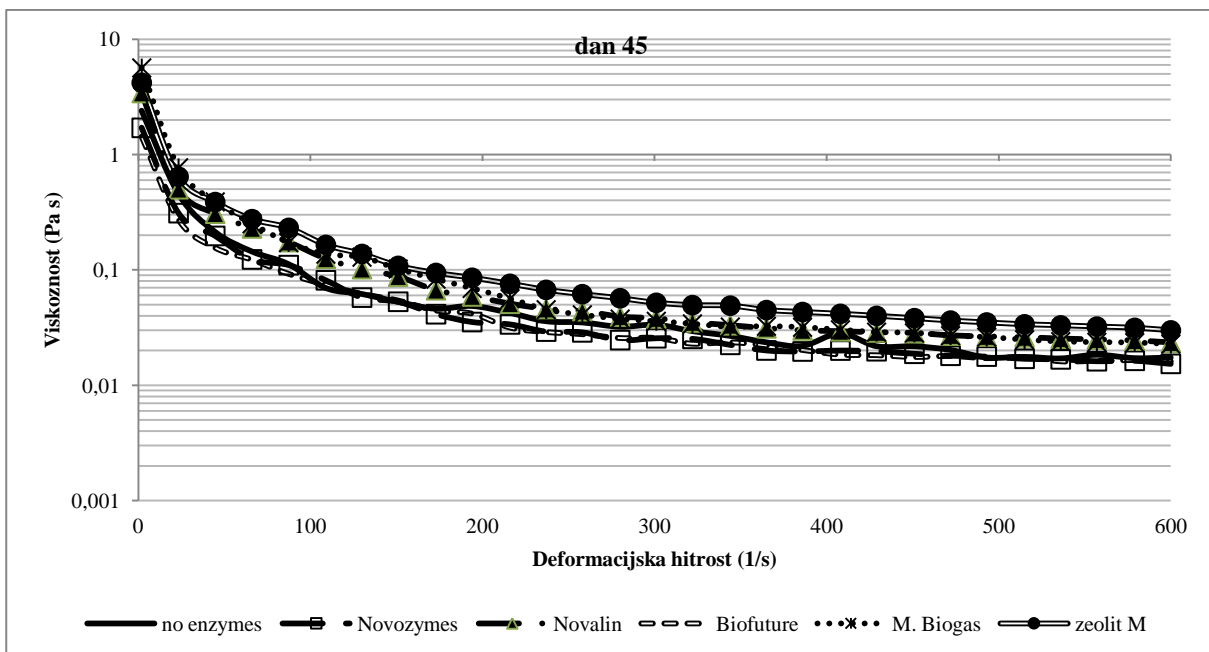
Grafikon G2: Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 25 dan po zagonu eksperimenta 13.

Graph G2: Viscosity as a function of shear rate for anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes at day 25 in experiment 13.



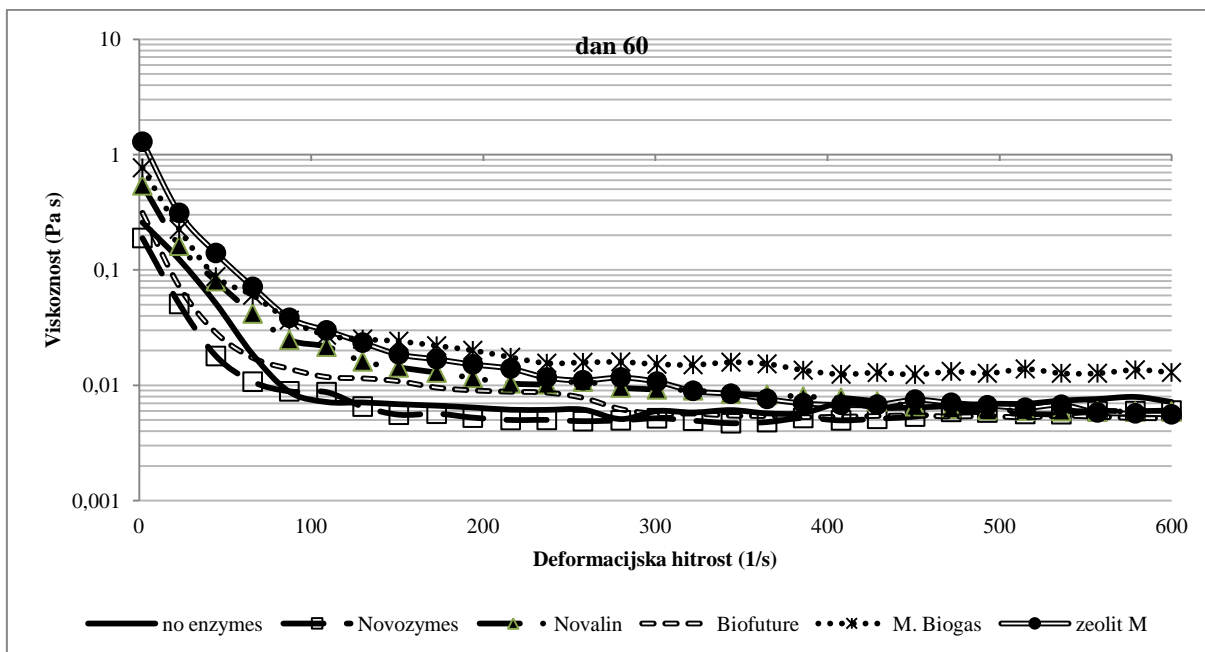
Grafikon G3: Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 35 dan po zagonu eksperimenta 13.

Graph G3: Viscosity as a function of shear rate for anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes at day 35 in experiment 13.



Grafikon G4: Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 45 dan po zagonu eksperimenta 13.

Graph G4: Viscosity as a function of shear rate for anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes at day 45 in experiment 13.



Grafikon G4: Viskoznost kot funkcija deformacijske hitrosti za anaerobne reaktorje brez in z dodajanjem hidrolitskih encimov 60 dan po zagonu eksperimenta 13.

Graph G4: Viscosity as a function of shear rate for anaerobic reactors with and without addition of hydrolytic enzymes at day 60 in experiment 13.

PRILOGA H: Klasifikacije biomase, ki se lahko uporablja za proizvodnjo električne energije

Preglednica H1: Biomasa, ki se lahko uporablja za proizvodnjo električne energije, ki prejema podpore, razdeljena po virih (UL RS št. 37/2009:1780).

Table H1: Biomass that can be used for production of electrical energy and receives support.

Vir biomase – 1. stopnja	Vir biomase – 2. stopnja
A – lesna biomasa	A1 – les iz gozdov in nasadov
	A2 - stranski proizvodi in ostanki iz lesnopredelovalne industrije
	A3 – odslužen les
B – biomasa iz kmetijstva	B1 – energetske rastline
	B2 – biorazgradljive frakcije izdelkov, ostankov in odpadkov
C – biološko razgradljivi odpadki	C1 – biološko razgradljivi komunalni odpadki
	C2 – biološko razgradljivi industrijski odpadki
	C3 – blato iz čistilnih naprav odpadnih vod
	C4 – pregnito blato iz anaerobne obdelave biološko razgradljivih odpadkov

Energetske rastline so lesni ali nelesni pridelek, gojen posebej v energetske namene. Biorazgradljive frakcije izdelkov, ostankov in odpadkov zajemajo biorazgradljive frakcije izdelkov, ostankov in odpadkov iz kmetijstva, vključno s snovmi rastlinskega in živalskega izvora. Biološko razgradljivi komunalni in industrijski odpadki so biološko razgradljiva frakcija industrijskih in komunalnih odpadkov, katerih energetska uporaba dovoljujejo predpisi o ravnanju z odpadki. V kategorijo blata iz čistilnih naprav odpadnih voda je uvrščeno odpadno blato komunalnih in industrijskih čistilnih naprav (UL RS št. 37/2009:1780).

PRILOGA I: Obrazložitev okrajšav in parametrov

Preglednica I1: Obrazložitev parametrov pri meritvah eksperimentov.

Table I1: Explanation of parameters that were used in experiments.

<i>SLO</i>	<i>ANG</i>	<i>enota</i>	<i>Obrazložitev</i>
16S rRNA	16S rRNA	-	sekvenca gena 16S rRNA
A	A (area)	[cm ²]	površina ultrazvočne sonde
AMPTS	AMPTS	-	Automatic Methane Potential Test System
BMP	BMP (biomethane potential)	[ml CH ₄ /(g OS)]	biometanski potencial
BPE	BGP (biogas plant)	-	bioplinska elektrarna
CAO	TIC (total inorganic carbon)	[mg CaCO ₃ /l]	celotni anorganski ogljik – alkalnost
CČN	MWWTP (municipal wastewater treatment plant)	-	centralna čistilna naprava
DD	DD (degree of disintegration)	[%]	stopnja razgradnje
EPS	EPS (extracellular polymeric substances)	-	zunajcelične polimerne substance
F1	F1	-	fermentor 1
F2	F2	-	fermentor 2
H ₂ S	H ₂ S	-	vodikov sulfid
HMK	VFA (volatile fatty acids)	[mg/l]	hlapne maščobne kisline
HOK	VOA (volatile organic acids)	[mg CH ₃ COOH/l]	hlapne organske kisline
HOK/CAO	VOA/TIC	[-]	razmerje med hlapnimi organskimi snovmi in celotnim anorganskim ogljikom
HRT	HRT (hydraulic retention time)	[dan]	hidravlični zadrževalni čas
KDL	ADL (acid detergent lignin)	[%]	kisli detergentski lignin (lignin)
KDV	ADF (acid detergent fibers)	[%]	kisla detergentska vlakna (celuloza in lignin)
k _H	k _H (hydrolysis coefficient)	[d ⁻¹]	koeficient hidrolize
KPK	COD (chemical oxygen demand)	[mg/l]	kemijska potreba po kisiku
KZ1	KZ1	-	končni zalogovnik 1
KZ2	KZ2	-	končni zalogovnik 2
MJ	MJ	-	mešalna jama
modelno merilo	scale	-	modelno merilo
N _{celotni}	N _{total}	[mg/l]	koncentracija celotnega dušika

se nadaljuje...

...nadaljevanje

NDF	NDV (neutral detergent fibers)	[%]	nevtralna detergentska vlakna (lignin, celuloza, hemiceluloza)
NH ₃	NH ₃ (ammonia)	[mg/l]	prosti amonijak
NH ₄ ⁺ -N	TAN (total dissolved ammonium as nitrogen)	[mg/l]	koncentracija amonijskega dušika
NO ₃ -N	NO ₃ -N (nitrate as nitrogen)	[mg/l]	nitratni dušik
OLR	OLR (organic loading rate)	[g OS/(l d)]	organska obremenitev v semi-kontinuiranih reaktorjih
OLR	OLR (organic loading rate)	[g OS/l]	organska obremenitev v šaržnih reaktorjih
OS (% SM)	VS (% FM)	[%]	vsebnost organske snovi v svežem vzorcu
OS (% SS)	VS (% SS)	[%]	vsebnost organske snovi v suhem vzorcu
OSMKK	OSMKK	-	ostanki sveže mletih klavničnih kosti
OVE	RE (renewable energy)	-	obnovljivi viri energije
P	P (phosphorus)	[mg/l]	fosfor
P	P (power)	[W]	moč
PCR	PCR (polymerase chain reaction)	-	verižna reakcija s polimerazo (ključen encim pri podvojevanju DNK)
pH	pH	[-]	merilo za kislo, nevtralno in bazično območje
S/I razmerje	S/I ratio	[kg OS/m ³]	razmerje med substratom in inokulumom
SE	SE (specific energy)	[kJ/kg SS]	specifična energija
SM	FM (fresh mass)	[g]; [kg]; [t]	sveža masa
SRT	SRT (solids retention time)	[dan]	zadrževalni čas blata
SS	TS (total solids)	[%]	suha snov vzorca
t	t (time)	[s]; [dan]	čas
TKN	TKN (total Kjeldahl nitrogen)	[mg/l]	dušik po Kjeldahlu
T-RFLP	T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism)	-	restriksijski polimorfizem dolžine končnih fragmentov
UASB	UASB (upflow anaerobic sludge blanket)	-	upflow anaerobic sludge blanket
UD	UD (ultrasound density)	[W/l]	gostota ultrazvoka, dovedena moč na liter vzorca

se nadaljuje...

...nadaljevanje

UD ₀	UD ₀ (ultrasound dosage)	[Ws/l]	ultrazvočna doza – dovedena energija na liter blata iz ČN
UI	UI (ultrasound intensity)	[W/cm ²]	intenziteta ultrazvoka
UZ	US (ultrasound)	-	ultrazvok
V	V (volume)	[l]; [m ³]	volumen
ZO	ZO (green cuttings)	-	zeleni odrez