

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ «СТЕФАН АНГЕЛОВ»

Венелин Нейчев Хубенов

**АНАЕРОБНО РАЗГРАЖДАНЕ НА ОРГАНИЧНИ ОТПАДЪЦИ В
МЕЗОФИЛЕН И ТЕРМОФИЛЕН РЕЖИМ НА КУЛТИВИРАНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен «доктор»
в професионално направление: 4.3 „Биологически науки”
по специалност 01.06.12. „Микробиология”

Научни ръководители: доц. д-р Иван Симеонов Симеонов
доц. д-р Денчо Димитров Денчев

Научно жури: проф. Стоян Грудев дбн
проф. Венко Бешков дтн
доц. д-р Данка Гълъбова
доц. д-р Адриана Гущерова
доц. д-р Денчо Денчев

София, 2015 г.



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ «СТЕФАН АНГЕЛОВ»

Венелин Нейчев Хубенов

**АНАЕРОБНО РАЗГРАЖДАНЕ НА ОРГАНИЧНИ ОТПАДЪЦИ В
МЕЗОФИЛЕН И ТЕРМОФИЛЕН РЕЖИМ НА КУЛТИВИРАНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен «доктор»

в професионално направление: 4.3 „Биологически науки”

по специалност 01.06.12. „Микробиология”

Научни ръководители: доц. д-р Иван Симеонов Симеонов
 доц. д-р Денчо Димитров Денчев

Научно жури: проф. Стоян Грудев дбн
 проф. Венко Бешков дтн
 доц. д-р Данка Гълъбова
 доц. д-р Адриана Гущерова
 доц. д-р Денчо Денчев

София, 2015 г.

Дисертационният труд обхваща 134 страници, съдържа 38 фигури и 19 таблици. Библиографската справка включва 175 литературни източника. В автореферата е използвано номериране на фигурите и таблиците, съответстващо на номерирането в дисертационния труд.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на заседание на научния семинар по Приложна микробиология и микробни биотехнологии на 24.03.2015 г. в Институт по микробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в ИГ „Математическо моделиране и компютърни методи”, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН. Част от изследванията са извършени в Катедра „Биотехнология”, Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – гр. Бургас.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София

Защитата на дисертационния труд ще се състои на открито заседание пред научно жури на г. от часа в заседателната зала на Институт по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 26, гр. София.

1. УВОД

Нарасналият интерес към възобновяемите източници на енергия (ВЕИ) се обуславя както от икономически причини, така и от екологичната значимост на проблема. Икономическите причини са свързани главно с увеличаващото се потребление на енергия и с търсенето на възможности за осигуряване на разнообразни нейни източници. Екологичното значение на проблема се състои в това, да се използват различни органични отпадъци от селското стопанство, хранително-вкусовата и целулозната промишленост и по този начин да се намали нерегламентираното им изхвърляне или депонирането им в сметища и да се редуцира свободното отделяне на парникови газове в атмосферата.

Различните органични отпадъци се характеризират със специфичен строеж и физикохимични свойства. Това от своя страна влияе на микрофлората, осъществяваща ферментацията. За ефективен технологичен процес, е необходимо да се направи предварителна оценка на суровините и да се изяснят технологичните фактори, влияещи върху процеса на разграждането им.

Анаеробната биодеградация (АБД) на органични отпадъци с получаването на енергоносител – метан, е микробиологичен процес, в който се разграждат органичните вещества при минимален прираст на микробните клетки. Анаеробните процеси са перспективни и поради липсата на аериране, което намалява разходите при пречистване на отпадъците в сравнение с аеробните. В същото време един от крайните продукти е биогаз – горивна газова смес, в която преобладава метанът. Не е за пренебрегване и факта, че след метановата ферментация се натрупва остатък, който може да има качества на естествен тор.

Поради комплексния състав на използваните субстрати и сложните взаимоотношения в микробното съобщество, процесът на АБД е труден за управление. Силно въздействие оказват и смущаващите въздействия на околната среда, които не са достатъчно добре проучени. Ето защо детайлното проучване както на биохимичните процеси, протичащи в системата, така и на функционирането на микробната популация при различни субстрати и условия, е от съществено значение за направляване на процеса в желаната посока.

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е да се изследва влиянието на някои технологични фактори върху АБД на тор от едри преживни животни (ЕПЖ) при различни температурни условия, както и възможностите за получаване на биогаз от органични отпадъци с преобладаващо съдържание на целулоза, като се проследи функционирането на различните групи микроорганизми, съставлящи бактериалното съобщество.

За успешното осъществяване на тази цел бяха поставени за решаване следните задачи:

1. Анализ на промените в химичния състав на субстратите, метаболитите и крайните продукти при анаеробно разграждане на тор от ЕПЖ, филтърна хартия и слама при различни температурни условия.

2. Изследване влиянието на съотношението въглерод/азот (C/N) върху продуктивността и ензимната активност на микробното съобщество в мезофилен и термофилен анаеробен процес.

3. Установяване влиянието на тежките метали върху процеса на АБД и функционирането на микробното съобщество в мезофилен и термофилен анаеробен процес.

4. Изследване динамиката на растеж на целулозоразграждащи, протеолитични и липолитични микроорганизми, съставлящи микробното съобщество, и анализиране на характеризиращите ги специфични ензимни активности.

5. Провеждане на експерименти по подбор на подходяща хранителна среда за биодеградация на чиста целулоза, изследване производителността на процеса и функционирането на микробното съобщество.

6. Провеждане на експерименти за АБД на смеси от различни субстрати в мезофилни и термофилни условия.

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

4.1 Материали и методи

4.1.1. Изходни суровини

При провеждане на експериментите в качеството си на изходни суровини са използвани:

1. Тор от ЕПЖ;

2. Филтърна хартия “Whatman 1” като източник на чиста целулоза;
3. Пшенична слама (ПС) с размер на частиците 3-5 mm, третирана термохимично, с 0,2% NaOH, при 100°C.
4. Смес от отпадни плодове и зеленчуци (ОПЗ), съставена от 40% картофи, 20% домати, 20% краставици и 20% ябълки.

4.1.2. Хранителни среди

При изследване на процесите на АБД на чисти целулозни субстрати са използвани следните хранителни среди:

Среда № 1 – среда на Имшенецкий, Тя има следния състав (в g/L): МПБ – 750 mL; CaCO_3 – 3; Филтърна хартия – 35; H_2O (водопроводна) – 250mL;

Среда №2 – среда на Омелянский, която е изцяло синтетична и не съдържа растежни стимулатори, със състав (в g/L): $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ – 1,5; K_2HPO_4 – 1,5; MgSO_4 – 0,75; CaCO_3 – 30; NaCl – следи; филтърна хартия 35; H_2O (водопроводна) – до 1 литър.

Среда №3 – средаСМ-3,. Химичният и състав е следният (в g/L): KH_2PO_4 – 1,5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,9; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1,3; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; CaCl_2 – 0,02; дрождев екстракт – 5,0; 5,0% разтвор на FeSO_4 – 25 μl ; 0,2 % разтвор на резазурин – 1 mL; цистеинхидрохлорид – 0,5; филтърна хартия 35; H_2O (водопроводна)– до 1 литър.

4.1.3. Постановка на опитите

Опитите са проведени в различни типове биореактори (БР) в зависимост от целите на експеримента :

- стъклен цилиндър с работен обем ($V_{\text{раб}}$) 1,5 L;
- лабораторни ферментори с работен обем 1, 2, 3 и 8 L, снабдени с бъркалка и нагревател;
- пилотен биореактор с $V_{\text{раб}}=80$ L, снабден със система за мониторинг и автоматично управление.

Преди инокулирането във всички апарати са създадени анаеробни условия чрез продухване на азот. По време на процеса се поддържа абсолютна херметичност на апаратите, което запазва анаеробните условия. Технологичният режим на култивиране включва температура 34°C или 55°C

Инициацията на процеса в опитните апарати е осъществена чрез прибавянето на определено количество културална среда от работещ на тор от ЕПЖ биореактор, която достига до 5% от работния обем на апарата.

Култивирането е проведено в периодичен режим, като на определен интервал от време са вземани проби при спазване на всички изисквания за анаеробност.

Използван е и режим на култивиране, близък до непрекъснатия, т.е. всеки ден (в един и същи час) към входа на БР се подава определено количество субстрат и се отнема същото количество от изхода му.

Влиянието на йоните на тежките метали мед, кадмий и цинк върху растежа на микробните популации и продукцията на биогаз е изследвано като още в началото на процеса към културалната среда (тор от ЕПЖ) се добавя разтвор на $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 или CdSO_4 , осигуряващ допълнително над фоново количество Cu^{2+} в апарата 20, 40, 75, 100 mg/L, Cd^{2+} – 5, 20, 35, 60 mg/L, или Zn^{2+} – 5, 10, 50, 100 mg/L.

4.1.4. Аналитични методи

За изследване на промените със субстрата, числеността на микробните популации и образуваните междинни и крайни продукти пробите са проведени следните анализи:

Концентрация на сухото (СВ) и органично вещество (ОСВ) – тегловно след изсушаване.

Елементния състав на субстрата – съдържание на С, Н и N – чрез автоматичен анализатор.

Концентрацията на общ белтък, спектрофотометрично, след алкална хидролиза по метода на Lowry.

Концентрацията на редуциращи захари, спектрофотометрично с динитросалицилова киселина по метода на Miller.

Целулоза чрез спектрофотометричен метод на Updegraff.

Липиди след екстракция на пробите в апарат на Сокслет със смес от хлороформ-метанол.

Концентрацията на летливите мастни киселини:

- адаптиран титрационен метод на Ripley;
- титриметрично, след отдестилиране с водна пара на подкислена с H_3PO_4 проба;
- чрез газов хроматограф Thermo Scientific, модел Focus GC, оборудван със Split/Splitless инжектор, FID детектор и колона TG-WAXMSA.

Обемът на отделения биогаз чрез калибриран газхолдер, а съставът му – с помощта на апарат X-am 7000, снабден с инфрачервени детектори за CH_4 и CO_2 и химически детектори за H_2S и O_2 .

4.1.5. *Определяне на ензимни активности:*

Целулазна - спектрофотометрично по Moharrery & Tirta.

Протеолитична -спектрофотометрично по Greene.

Амилолитична–спектрофотометрично по Moharrery & Tirta.

Липолитична–титриметрично по Moharrery & Tirta.

Определяне количеството на анаеробни микроорганизми. целулозоразлагащи, протеолитични и липолитични – чрез общоприетите в микробиологичната практика методи. Изолирането на отделни видове се извършваше в петриевы панички с твърда хранителна среда.. Култивирането се провеждаше в специални апарати – анаеростати, снабдени с химични приспособления за създаване на анаеробни условия.

Всички опити са повторени 4-5 пъти. На таблиците и графиките са нанесени средноаритметичните данни.

4.2. Резултати и дискусия

4.2.1. Анаеробна биодегradация на тор от ЕПЖ

4.2.1.1. Промени в химичния състав на субстрата

Химичният състав на екскрементите е много разнообразен и зависи главно от фуража, добавките към него и от вида на животните. На таблица 7 са представени промените в химичния състав на изследвания субстрат при 14-дневна анаеробна биодегradация с получаване на биогаз при различни температурни условия. При температура 35°C СВ в апарата за култивиране в края на процеса намалява два пъти. В същата степен намаляват и въглехидратите, докато наличните белтъчини са разградени до около 40%. В най-голяма степен се разграждат липидите – 63%. При температура на култивиране 55°C, СВ в апарата намалява почти шест пъти. В подобна степен се променят въглехидратите и липидите. Сравнени с данните от мезофилния процес, тези резултати показват 25-30% увеличение. За разлика от въглехидратите и липидите биодегradацията на белтъците е само 20%.

Таблица 7. Динамика на промените в химичния състав на субстрата оборски тор при анаеробно разграждане при различни температури.

Измервани параметри	Температура	Култивиране, ден					
		0	2	5	7	10	14
Сухо вещество, %	35°C.	7,10	6,12	5,02	4,16	3,58	3,30
	55°C	7,00	5,82	4,31	2,15	1,6	1,20
Белтъци, g/L	35°C.	0,36	0,34	0,33	0,28	0,26	0,23
	55°C	0,35	0,33	0,30	0,29	0,28	0,28
Въглеhidрати, g/L	35°C.	7,47	6,28	5,96	4,63	4,25	3,75
	55°C	7,40	6,12	4,93	3,50	2,14	1,52
Липиди, g/L	35°C.	4,31	4,25	3,10	2,52	2,01	1,63
	55°C	1,25	1,21	0,92	0,82	0,47	0,33

Следователно можем да заключим, че при по-високата температура анаеробната биодegradация на въглеhidратите и липидите достига по-висока степен, докато по-слабото разграждане на белтъчините в сравнение с другите две основни групи вещества допълнително отслабва.

Интерес предизвикват резултатите от проследяване динамиката на елементния състав на субстрата (таблица 8). Съдържанието на въглерод за 14 денонощия намалява с 25%. В същото време делът на азота се увеличава с 29%. Това е малко изненадващо, като се има предвид, че всички азотсъдържащи продукти и организми остават до края на процеса в културалната среда. Възможната причина може да бъде наличието на микроорганизми, които свързват азота използван за продухване на средата.

Таблица 8. Изменение на елементния състав на средата при анаеробно разграждане на оборски тор.

Химичен елемент	Култивиране, денонощия					
	0	2	4	7	10	14
Въглерод, %	41,6	40,8	37,1	36,5	34,8	31,3
Азот, %	2,8	2,8	3,3	3,4	3,5	3,6
Водород, %	4,8	4,7	4,9	4,9	4,4	4,1
C/N	14,9	14,6	11,2	9,9	9,2	8,7

Съотношенията между елементите играе важна роля за синтеза на биогаз при АБД. В началото на култивирането при 35°C отношението C/N е равно на 15, а след 14 денонощия то спада до 8,7. Като се има предвид, че въглеhidратите в субстрата към този момент са се разградили само на 50%, може да се допусне, че процесът на

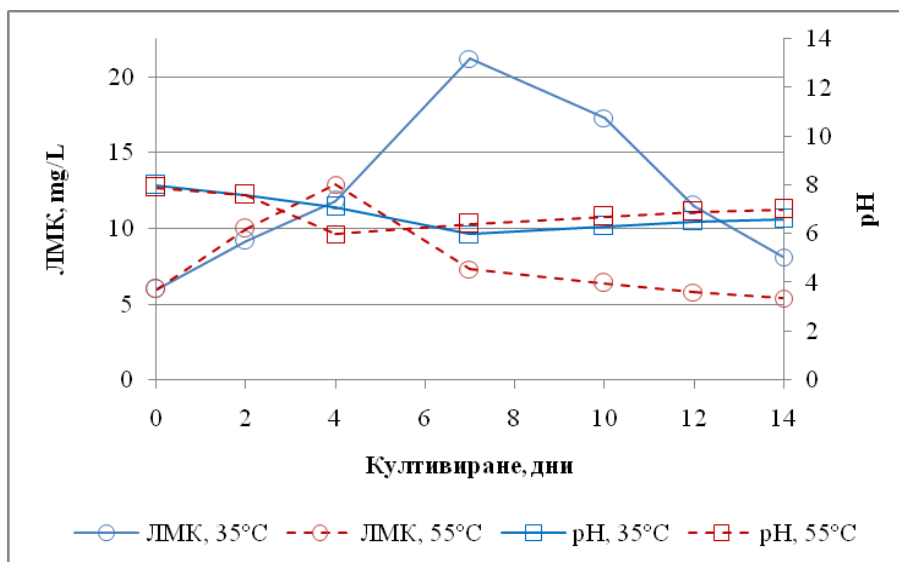
метанообразуване не е още завършен. Следователно това ниско и неоптимално съотношение оказва негативно влияние върху скоростта на газообразуване, за което съобщават редица автори [15, 84, 114]. Този факт още веднъж показва, че един от факторите за създаване на оптимални условия за процеса е именно съотношението C/N.

4.2.1.2. *Метаболитни и крайни продукти при анаеробната биодegradация на оборски тор при различни температурни условия*

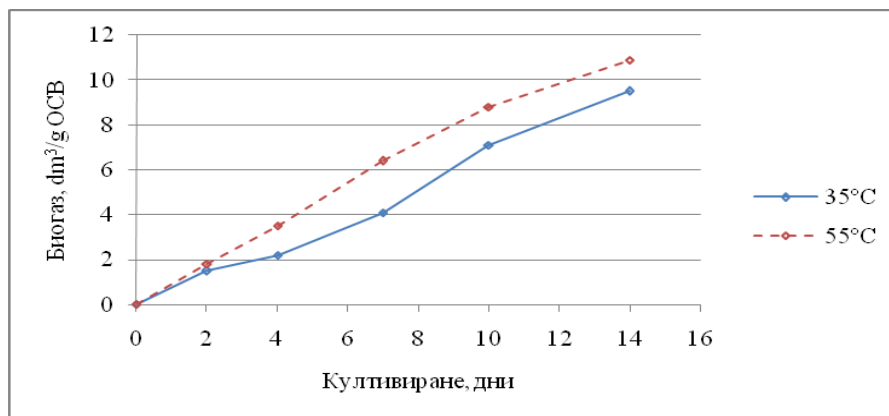
Графиките на фигура 6 показват, че образуването на ЛМК при температура 35°C започва още от началото на процеса. Скоростта на образуване се засилва след 4-то денонощие, като концентрацията на ЛМК достига максимума си на 7-то денонощие. По-нататък тяхното количество постепенно намалява. Динамиката на образуване на ЛМК при по-високата температура е подобна, с тази разлика че намаляването на концентрацията се проявява още на 7-я ден от култивирането. Това е свидетелство за активността на метаногените.

Показателят pH следва обратната зависимост – най-ниско е на 4-ия (при 55°C) и 7-ия (при 35°C) ден от култивирането, след което много слабо се покачва до около 6,5 - 7,0.

Следователно, процесите при по-високата температура протичат по-интензивно.

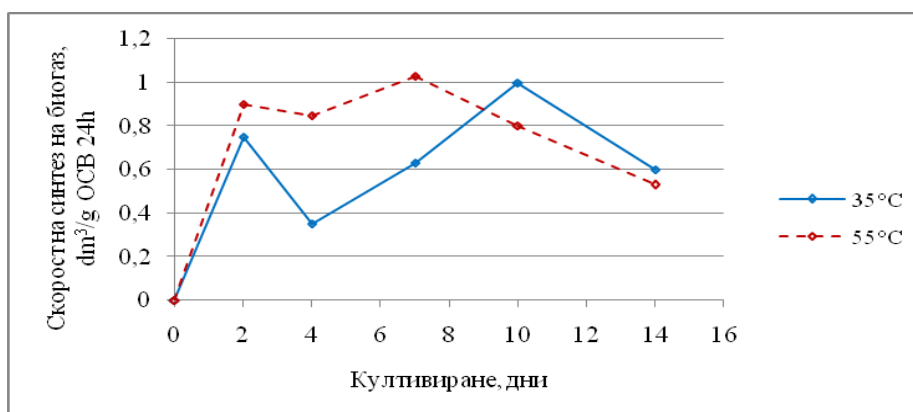


Фигура 6. Образуване на ЛМК и промяна на pH при анаеробно разграждане на оборски тор при 35°C и 55°C.



Фигура 7. Синтез на биогаз ($\text{dm}^3/\text{g OSCB}$) при анаеробно разграждане на тор от ЕПЖ при 35°C или 55°C.

Натрупването на биогаз при биодеградацията на тор от ЕПЖ при различни температури е представено на фигура 7. Вижда се, че крайното му количество при по-високата температура е с около 15% по-голямо в сравнение с това при 35°C. Динамиката в скоростта на синтез (фигура 8) показва, че има съществени разлики. Максимумът при ниската температура се проявява на 10-ия ден, докато при високата той е три дни по-рано – на 7-ия.



Фигура 8. Скорост на синтез на биогаз ($\text{dm}^3/\text{g OSCB} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$) при анаеробно разграждане на тор от ЕПЖ при 35°C и 55°C.

Освен това, почти през целия процес скоростта на образуване на биогаз при по-високата температура е по-голяма с изключение на последните дни от култивирането.

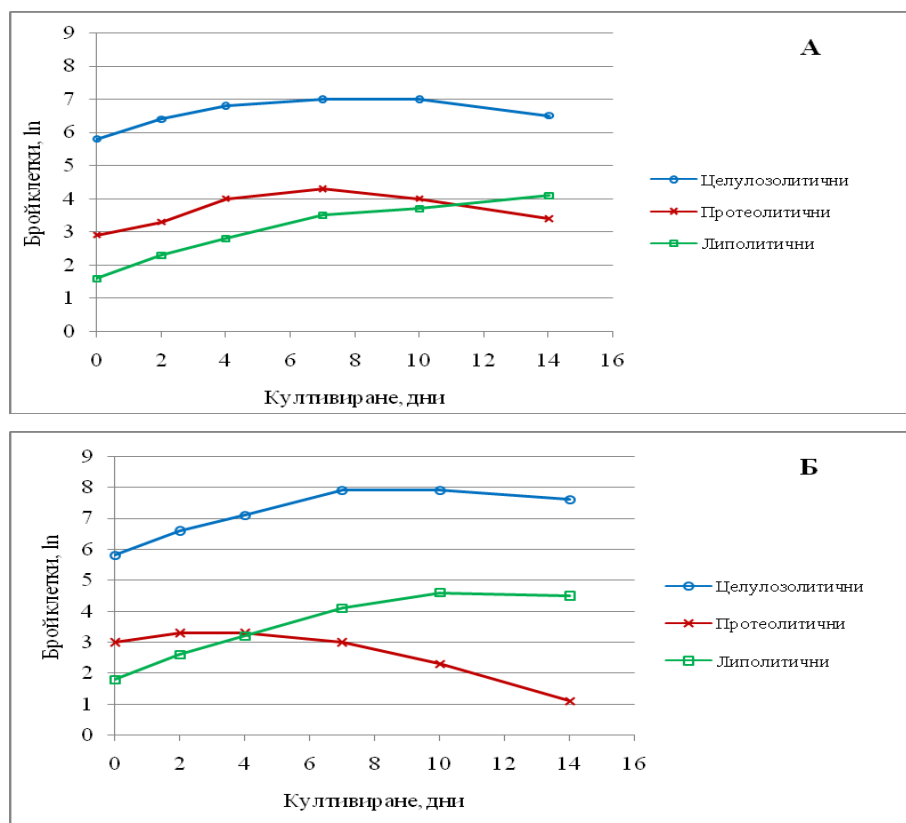
Съпоставяйки кривите от фигура 6 с тези за образуване на биогаз (фигура 7) става ясно, че причината за намаляване количеството на ЛМК е тяхното въвличане в синтеза на метан [19, 43]. Неговото интензивно натрупване съвпада с понижаването на ЛМК в системата. За това говори и скоростта на синтез на газа (фигура 8). При 35°C тя

нараства бавно и достига максимална стойност на 10-то денонощие, след което отново намалява.

4.2.1.3. Микробно разнообразие и ензимна активност

Тъй като в състава на субстрата присъстват основните химични съединения – въглехидрати, протеини, липиди, които се разграждат от микроорганизми със специфични трофични възможности, интерес представляват динамиката в размножаването на популациите на трите функционални групи микроорганизми – целулозоразлагащи, протеолитични и липолитични, както и характеризиращите ги специфични ензимни активности.

Динамиката на растеж на микробните популации е представена на фигура 9 А, Б. На тях липсват типичните фази на растеж. Това може да се дължи на сложния състав на средата, както и на началната численост на популациите. Въпреки това и при другите две групи без тази на протеолитичните бактерии се наблюдава нарастване на броя на клетките до 7-то денонощие от началото на култивиране. След това настъпва стационарна фаза, която продължава до 10-12 ден.



Фигура 9. Растеж на микробните популации в процес на периодично анаеробно разграждане на тор от ЕПЖ А - при 35°C; Б – при 55°C.

За разлика от тези две групи растежната крива на протеолитичните бактерии в първите 4-5 дни на култивиране се задържа на постоянно ниво. След това до края на процеса количеството им постоянно намалява, което вероятно е свързано с тяхното лизиране.

Описаните прояви могат да се обяснят с правилото на Одум за отрицателното влияние на числеността на популацията върху скоростта на размножителния процес [27] и се срещат и при други биотехнологични процеси [9]. Те са свързани с условията на съществуване и са валидни за популациите на всички живи същества.

Особено интересно е това, което се случва с размножаването на протеолитичните бактерии при по-високата температура. Техният брой в хода на процеса непрекъснато намалява (почти 20 пъти в края). Следователно те не издържат тази температура. Това обстоятелство е много важно за практическото използване на термофилните процеси, тъй като патогенните за човека и животните микроорганизми също не издържат високи температури на култивиране. Тогава те няма да се съхранят и в продукта, който остава след ферментацията.

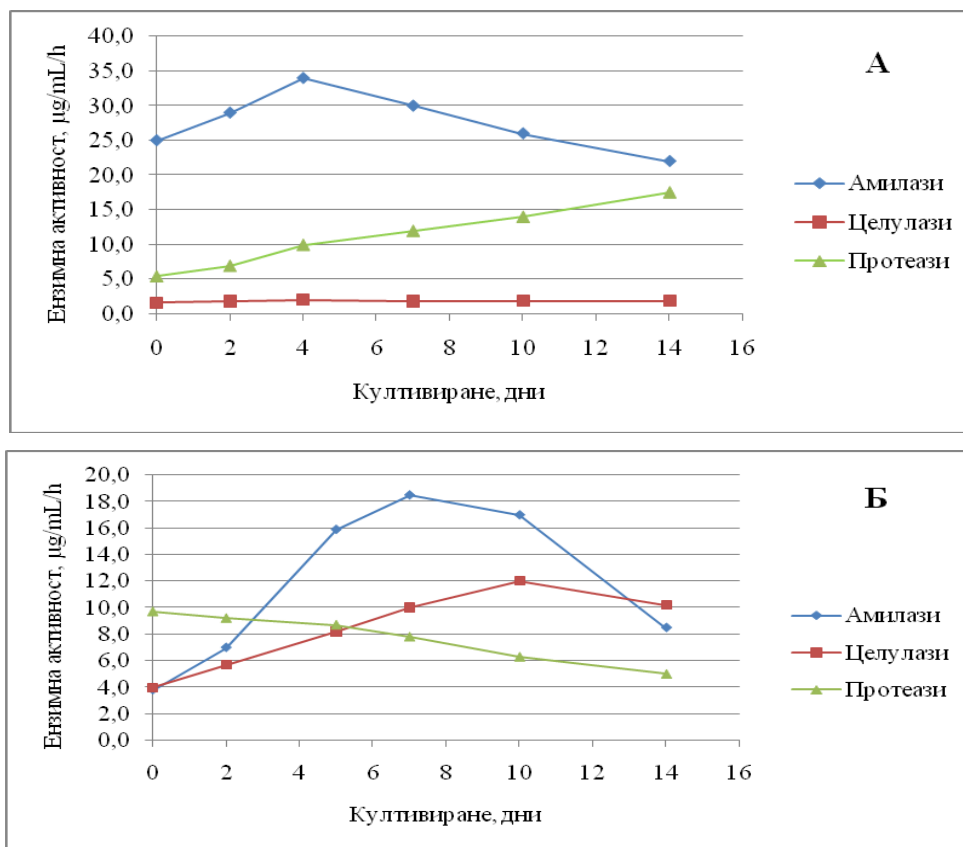
За потвърждение на достоверността на наблюдаваните промени в числеността на микробните популации са анализирани измененията в ензимните им активности (фигура 11 А, Б).

Вижда се, че при температура 35°C, активността на ензима целулаза не надвишава 2 µg разграден субстрат за 1 час от 1 mL, амилазата е с активност над 30 µg/h/mL проба. Максимумът и за двете активности се наблюдава на 4-то денонощие от култивирането, но целулазата остава активна до края на процеса, докато амилазните ензими намаляват активността си. Този резултат съвпада с кривите на растеж за целулозолитичните бактерии.

Съвсем друга е картината с протеазните ензими. Тяхната активност расте през цялото време на култивиране при 35°C. Тя е по-ниска в сравнение с амилазните, което корелира с количеството на протеините в говеждия тор.

Следователно можем да заключим, че при мезофилни условия протеините в субстрата също заслужават внимание като източник за образуване на биогаз.

На фигура 11 Б са представени промените в ензимните активности и при термофилни условия (55°C). Характерно е, че още на старта на процеса посевният материал е с по-висока активност на специфичните ензими в сравнение с мезофилния процес.



Фигура 11. Ензимна активност на функциониращите групи микроорганизми при анаеробно разграждане на тор от ЕПЖ при 35°C (А) и 55°C (Б).

В хода на култивирането тези активности нарастват с изключение на протеолитичните. Следователно потвърждава се описаното за числеността на микробните популации. Промените не са в еднаква степен. Най-силно нараства амилолитичната активност. Активността на целулазите също е висока и достига максимума си на 10-то денонощие.

Ензимите, свързани с разграждането на белтъчините, в първите 1-2 дни от култивирането, остават с непроменена активност. След това тяхната активност непрекъснато намалява чак до края на процеса.

4.2.2. Влияние на някои технологични фактори върху биодegradацията на субстратите

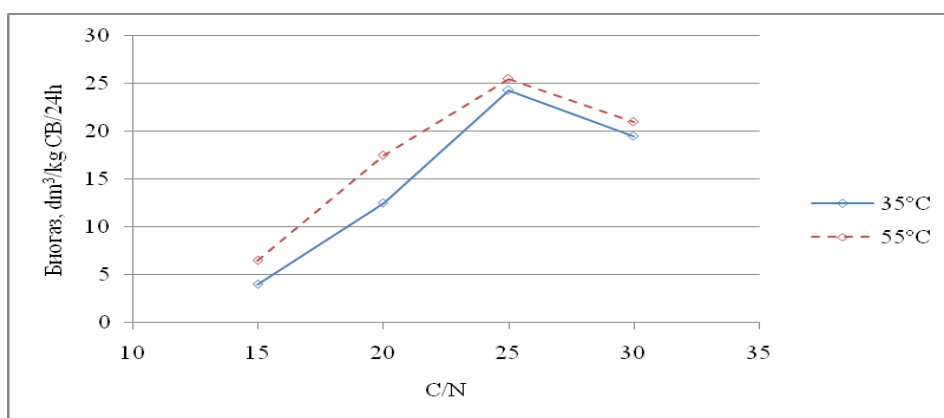
4.2.2.1. Влияние на съотношението C/N

Един от важните фактори, влияещ на анаеробното разграждане на органичната материя, е съотношението между въглеродните и азотни атоми в средата на култивиране.

Изхождайки от такива съображения са извършени опити с различно C/N в средата.. Изходната суровина съдържа 42% въглерод и 2,8% азот. Това дава съотношение C/N=15/1. Промяната му е постигната чрез допълнително внасяне в БР на съответно количество глюкоза до достигане на съотношение 20/1, 25/1 и 30/1.

Таблица 10. Синтез на биогаз ($\text{dm}^3/\text{kg CB}/24\text{h}$) при периодични процеси на АБД на тор от ЕПЖ с различно начално съотношение C/N.

Култивиране, дни	Мезофилен режим				Термофилен режим			
	Начално C / N				Начално C / N			
	15/1	20/1	25/1	30/1	15/1	20/1	25/1	30/1
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	0,5	1,1	2,5	1,9	0,8	2,6	4,2	2,5
5	1,5	2,8	6,2	6,0	1,9	4,5	10,7	6,8
8	3,0	5,1	13,0	9,6	4,3	8,7	20,3	15,0
10	4,2	12,3	23,9	18,7	6,7	12,7	25,6	21,1
14	6,0	9,5	19,0	14,9	7,0	10,3	22,1	17,6

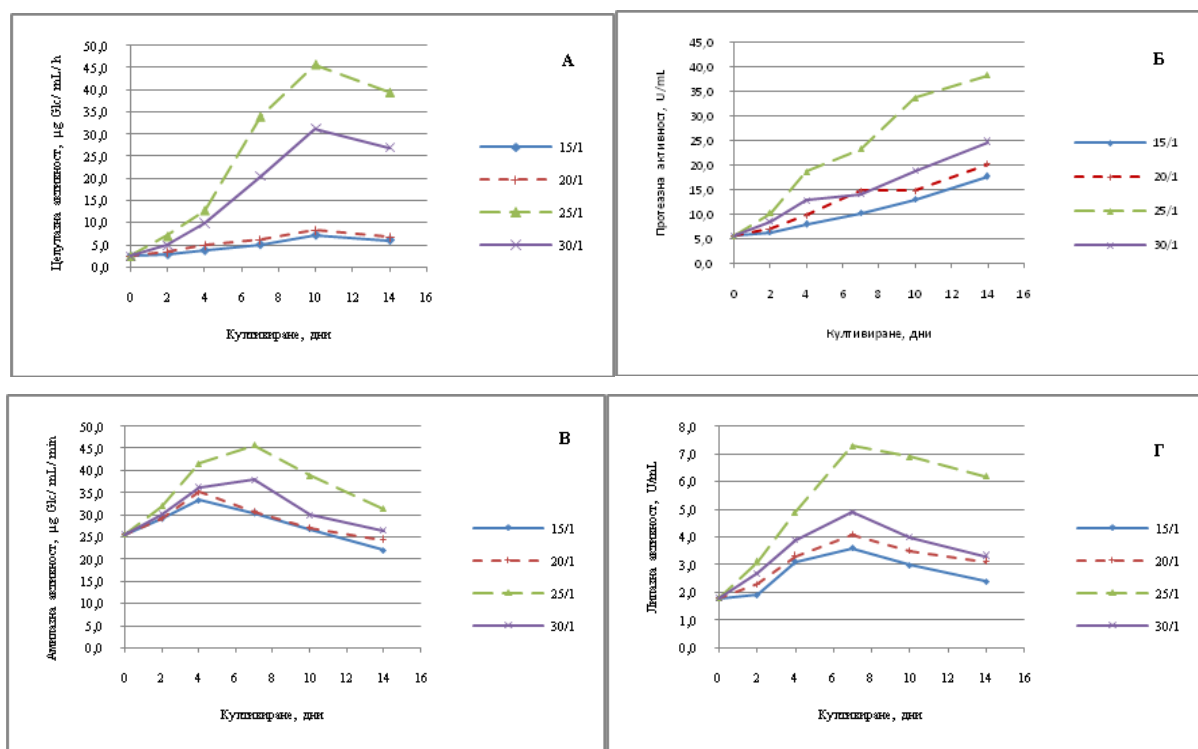


Фигура 12. Влияние на началното съотношение C/N върху продукцията на биогаз при периодични процеси на АБД на тор от ЕПЖ.

При тези условия на опитите максимално количество биогаз и при двата режима на култивиране е синтезирано при съотношение C/N=25/1 (таблица 10). При по-високо съдържание на въглерода добивът на краен продукт намалява. С изключение на режимите с 15/1 и 20/1 C/N, термофилният режим слабо превишава добива на биогаз в сравнение с мезофилния. Това добре се демонстрира на фигура 12.

Поради това, по-нататъшните експерименти са продължени само при температури 35°C.

На фигура 15 са представени резултатите от серия опити по изследване промените в ензимната активност на микробните популации, растящи при различни съотношения C/N.

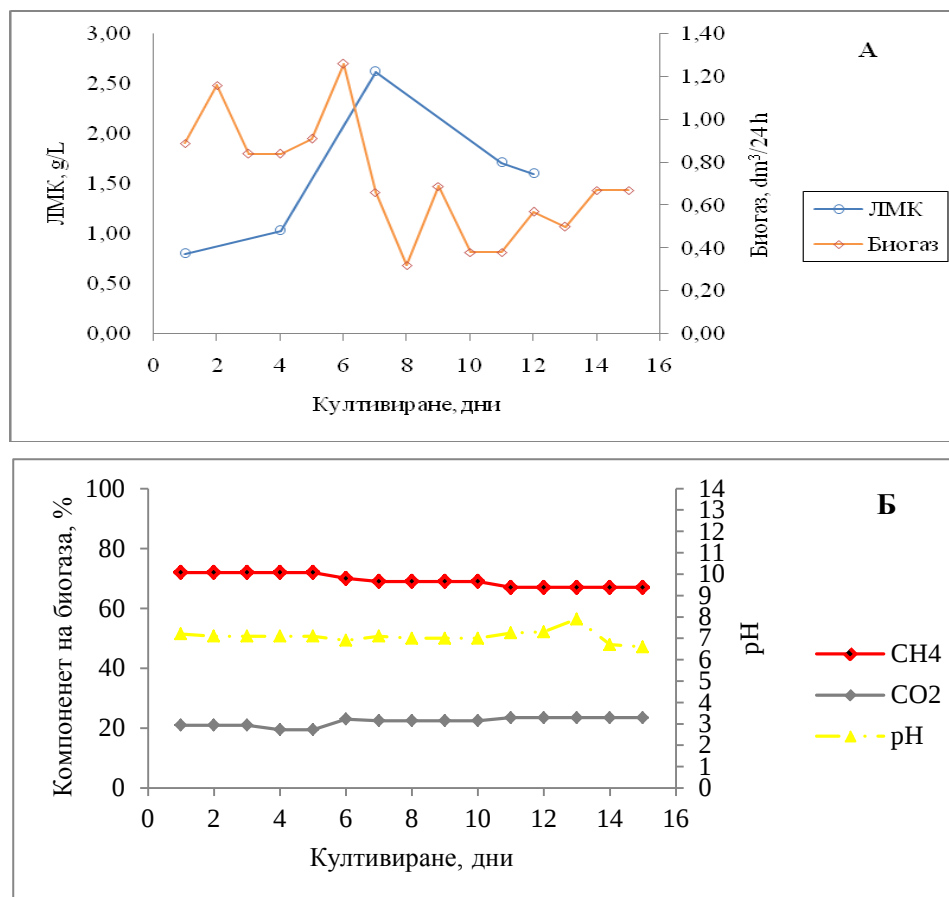


Фигура 15. Ензимна активност на микробната популация в периодичен процес на АБД на тор от ЕПЖ при различни начални съотношения C/N: А) целулазна активност; Б) протеазна активност; В) амилазна активност; Г) липазна активност.

Трябва да се подчертае, че най-ниска е активността на всички ензими при съотношение C/N=15/1, следвана от тази при съотношение C/N=20/1 и C/N=30/1. При тези експерименти най-добри условия за развитието на микробното съобщество, проявлението на специфичните ензимни активности и синтеза на биогаз дава съотношение C/N=25/1. Възможен подход за достигането на благоприятно C/N може да бъде смесването на различни отпадъци с предварително определено съдържание на въглерод и азот [159, 160].

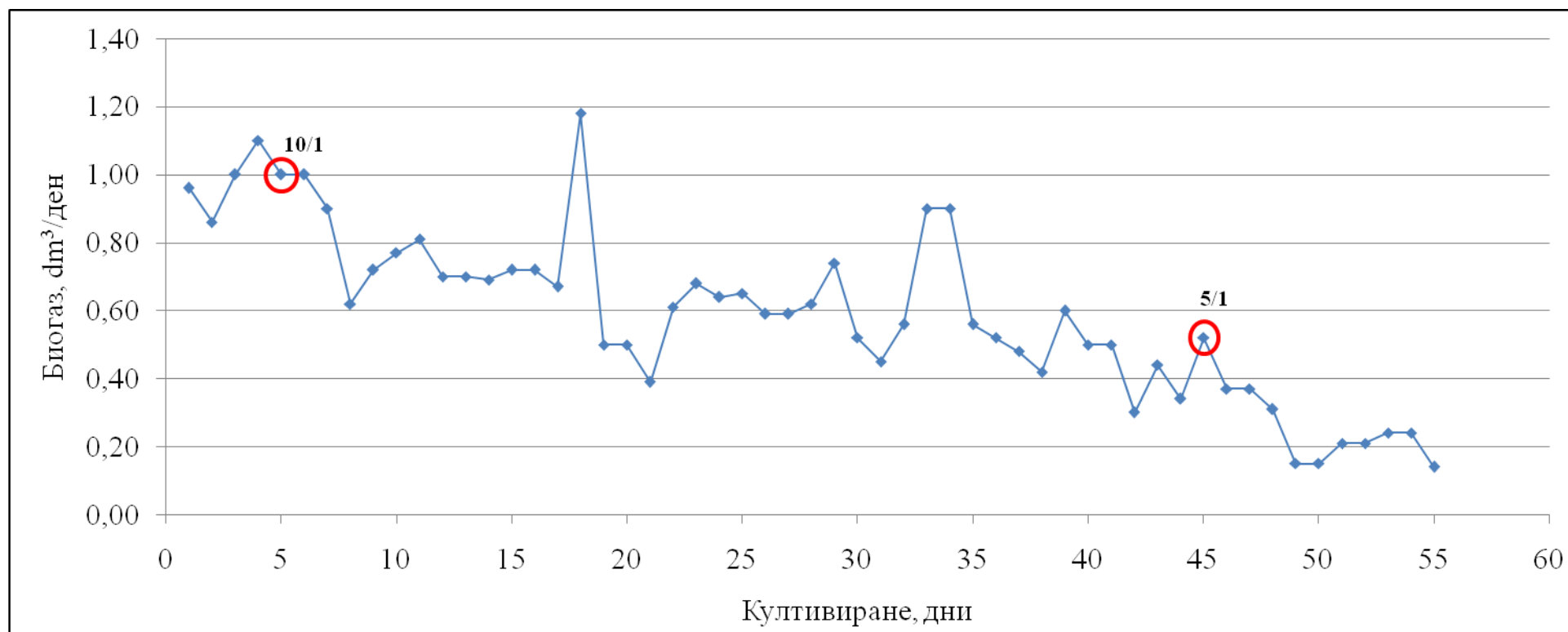
Проведени са допълнителни експеримента с цел проследяване добивите на процеси, близки до непрекъснатите, при съотношения 30/1, 10/1 и 5/1. Промяната на съотношението C/N е постигната с добавяне на подходящо, богато на въглеродни или азотни атоми вещество – ескулин (за съотношение 30/1) или амониев нитрат (за съотношение 10/1 и 5/1).

Добавянето на ескулин (фигура 16) веднага води до увеличение на концентрацията на ЛМК в БР (от 0,8 до 2,65 g/L), след което тяхната концентрация плавно намалява. Въпреки това рН на средата в БР се запазва постоянно, което се дължи на нейната буферност.



Фигура 16. Добив на биогаз и динамика на ЛМК (А); рН и процентно съдържание на CH₄ и CO₂ (Б) по време на непрекъснат процес при C/N=30/1, D=0,05 ден⁻¹.

Добивите на биогаз плавно намаляват до 11-ия ден, след което започват леко да се увеличават, но остават на по-ниско ниво от това в началото на процеса. Съдържанието на CH₄ в биогаза след 5-ия ден постепенно намалява като след 11-ия ден се установява на 68%. Съдържанието на CO₂ в биогаза след 5-ия ден постепенно се увеличава, като след 11-ия ден се установява на 24%.

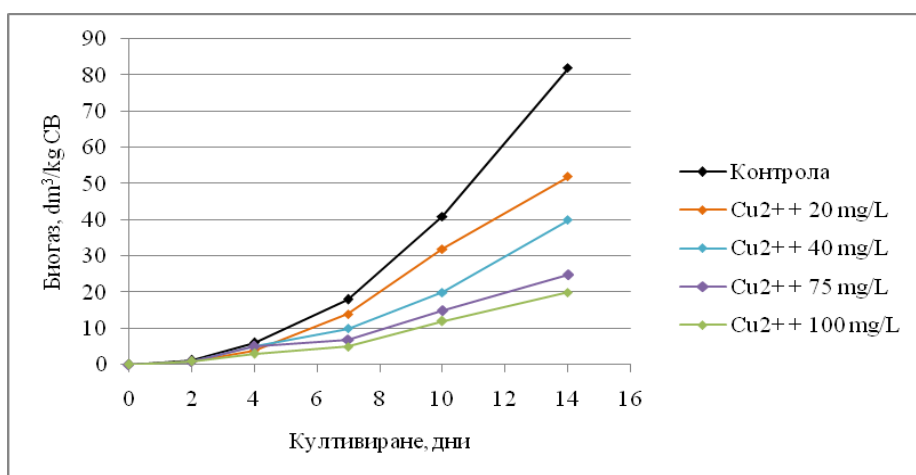


Фигура 17. Добив на биогаз в непрекъснат процес на АБД на тор от ЕПЖ при съотношение C/N=10/1 и 5/1.

Резултатите с добавянето на амониев нитрат, понижаващ съотношението C/N показват, че и при двата експеримента дневният добив на биогаз намалява още в първите дни (фигура 17). Получените ниски добиви на биогаз са очаквани и потвърждават резултатите на други автори [159, 160].

4.2.2.2. Влияние на тежките метали

В болшинството от публикуваните работи влиянието на тежките метали се изследва, като се използват чисти култури микроорганизми, култивирани върху синтетични хранителни среди. На фигури 18, 19 и 20 са представени резултатите от влиянието на трите вида йони върху синтеза на биогаз в динамика.

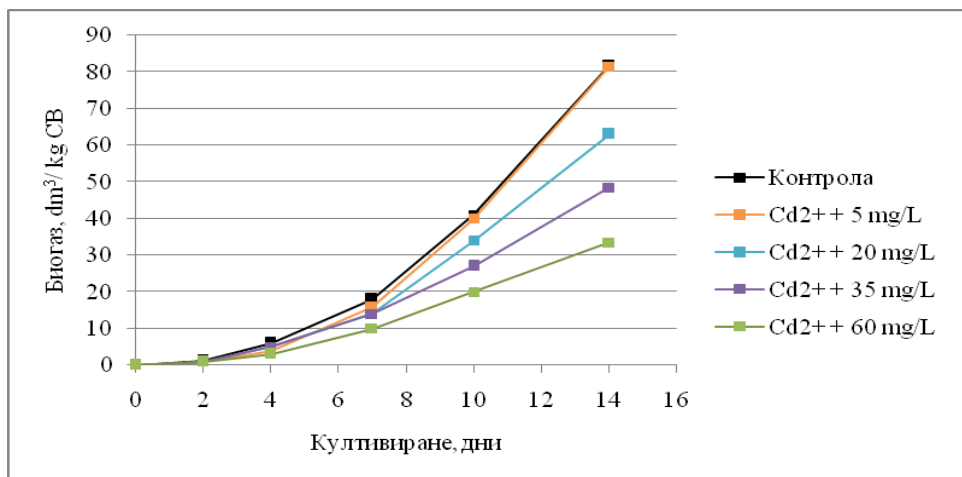


Фигура 18. Влияние на медни йони върху образуването на биогаз при периодичен процес на анаеробно разграждане на говежди тор.

Медните йони в концентрации над 20 mg/L инхибират крайното образуване на биогаз (фигура 18). Този ефект се проявява още в началото на процеса на анаеробното разграждане. Следователно инхибирането обхваща всички фази на анаеробния процес. В зависимост от количеството добавени йони намаляването на биогаза в сравнение с контролата е 38, 51, 69 и 75% съответно.

Йоните на кадмия (фигура 19) в концентрации над 20 mg/L също инхибират образуването на биогаз. Степента на инхибиране е по-слаба от тази на медните йони и е разположена в диапазона 23-54%. Следователно ако в средата по някаква причина попаднат Cd^{2+} в количества до 10 mg/L, то процесът на метанообразуване би протичал нормално.

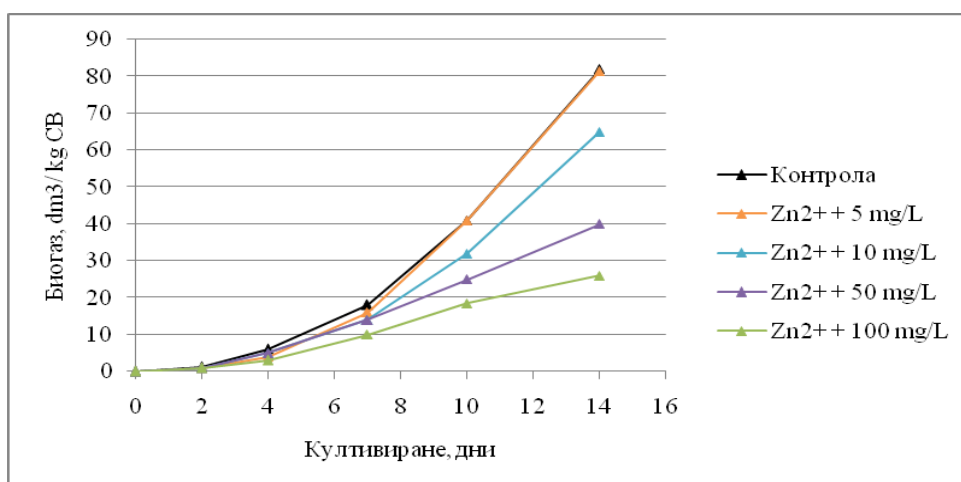
Подобно е действието и на цинковите йони (фигура 20).



Фигура 19. Влияние на кадмиеви йони върху образуването на биогаз при периодичен процес на анаеробно разграждане на говежди тор.

По силата на своето действие върху крайния продукт биогаз йоните на изследваните тежки метали се подреждат в следния ред: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$.

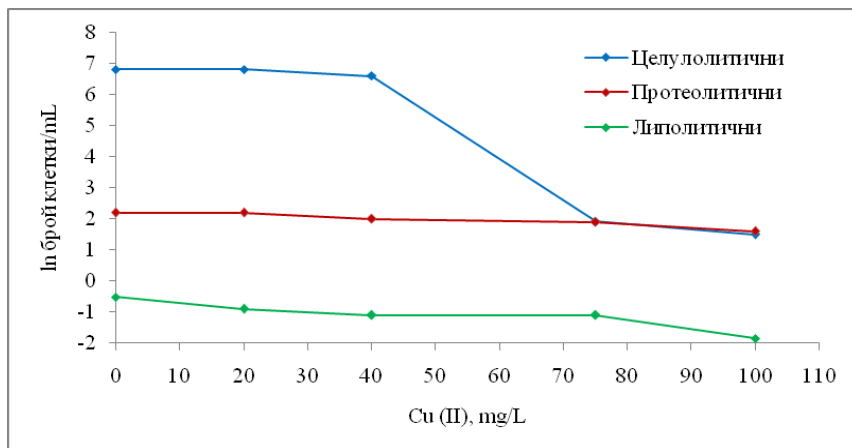
Тъй като активната част от анаеробната ферментация са микробните популации, бе проследено тяхното размножаване при завишени концентрации на метални йони в средата.



Фигура 20. Влияние на цинкови йони върху образуването на биогаз при периодичен процес на анаеробно разграждане на говежди тор.

Графиките на фигура 24 показват, че числеността на целулозните бактерии в среда съдържаща до 40 mg/L Cu^{2+} остава непроменена в сравнение с контролата. Над тази концентрация растежът на микробните клетки се инхибира и тяхното количество намалява. Популацията на протеолитиците в много по-малка степен се влияе от наличието на тези йони. Концентрации на Cu^{2+} над фоновите (3 mg/L) оказват инхибиращо влияние на липолитичните микроорганизми. От тези резултати може да се

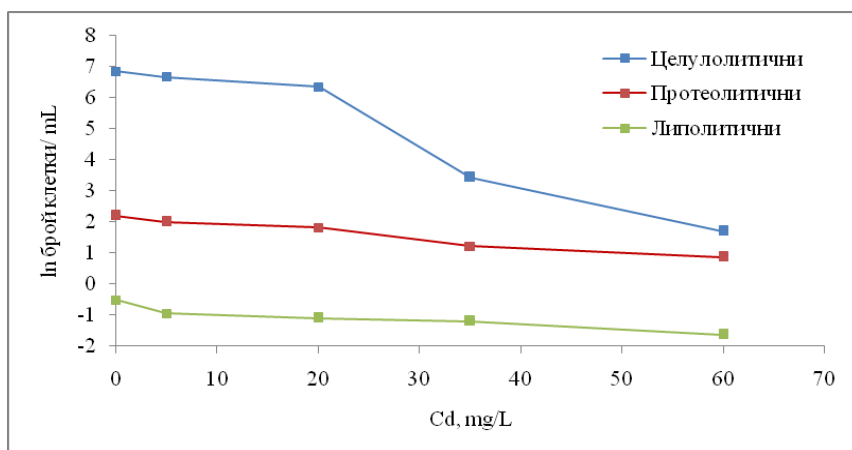
направи извода, че микробните видове усвояващи въглехидрати и липиди са най-чувствителни към наличието на медни йони. Като се има предвид, че при метаболизирането на тези съединения като междинни продукти се получават карбокси- и мастни киселини, става ясно защо съдържанието на ЛМК също намалява.



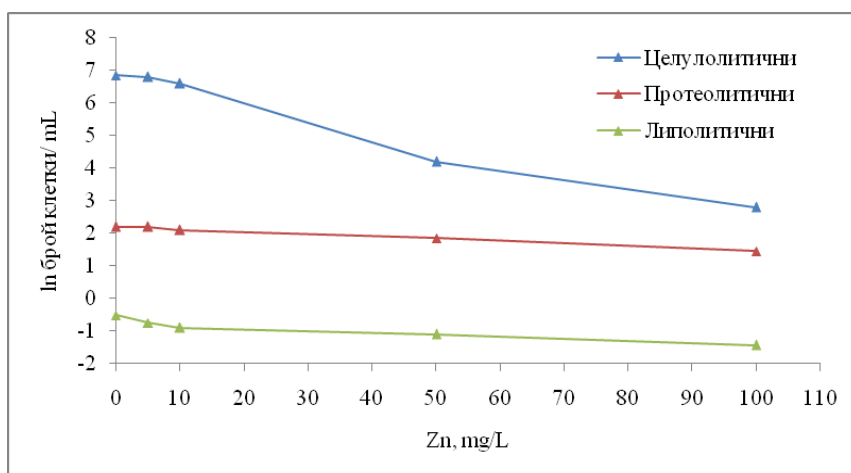
Фигура 24. Влияние на медни йони върху числеността на микροорганизмите.

Поведението на целулолитичните микробни популации в среда с Cd^{2+} (фигура 25) е подобно на това за Cu^{2+} . Микροорганизмите разграждащи липиди, също силно се влияят от наличието на Cd^{2+} . Последните още в концентрации над фоновата инхибират растежа. Този процес непрекъснато се усилва с нарастване на концентрацията на Cd^{2+} в средата.

Малко по-слаб е инхибиращият ефект на Zn^{2+} и върху трите групи изследвани микροорганизми (фигура 26). Въпреки това целулолитичните бактерии се повлияват също най-силно. Останалите две групи почти в еднаква степен изпитват инхибиращото влияние на тези метални йони.



Фигура 25. Влияние на кадмиеви йони върху числеността на микροорганизмите.



Фигура 26. Влияние на цинкови йони върху числеността на микроорганизмите.

Таблица 12. Влияние на инхибиращи концентрации на тежки метали върху фазата на метаногенеза при периодичен процес на АБД на тор от ЕПЖ..

Култивиране, дни	Контрола		Cu ²⁺ 75 mg/L		Cd ²⁺ 35 mg/L		Zn ²⁺ 100 mg/L	
	ЛМК, mg/L	Биогаз, dm ³ /kg СВ	ЛМК, mg/L	Биогаз, dm ³ /kg СВ	ЛМК, mg/L	Биогаз, dm ³ /kg СВ	ЛМК, mg/L	Биогаз, dm ³ /kg СВ
7	21,0	17,5	21,0	17,5	21,0	17,5	21,0	17,5
10	10,2	41,5	17,5	35,3	15,1	29,8	14,3	38,2
14	6,7	83,0	12,0	44,0	10,9	43,0	9,1	55,7

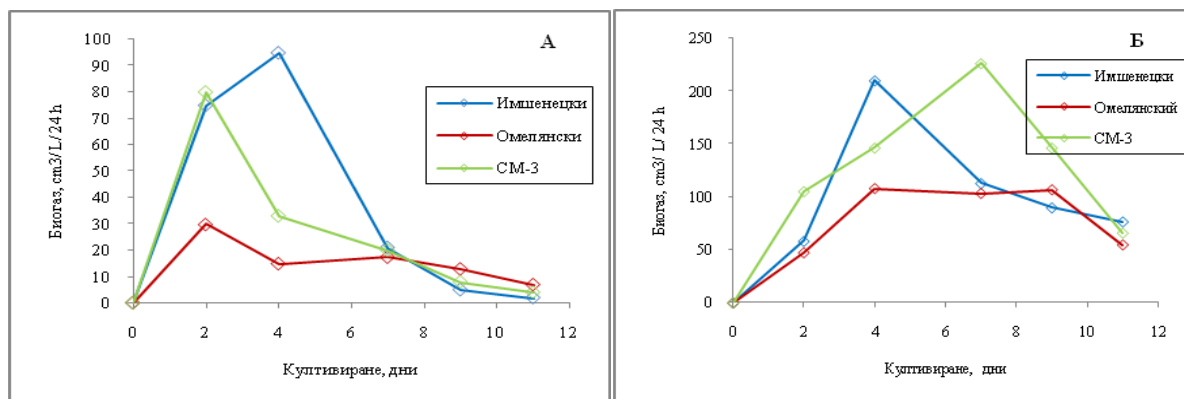
Посочените микробни групи са характерни главно за фазите на хидролиза и ацетогенеза. На таблица 12 са представени резултатите за влиянието на тежките метали върху фазата на метаногенезата. От нея става ясно, че Cu²⁺ и Cd²⁺ в по-голяма степен инхибират метаногенните бактерии отколкото Zn²⁺. Доказателство за това е образуваният биогаз. Количеството му е най-ниско при наличие на Cu²⁺ и Cd²⁺.

Подобни резултати са получени и от други автори [52, 118]. Особено показателни в това отношение са резултатите на Bhattacharya et al. [52], които показват, че кадмиеви йони в концентрация 0,1 mg/L лимитират превръщането на ацетата в метан при хемостатно култивиране. Нашите експериментални данни потвърждават тези резултати, но се различават от тези на Demirel et al. [73].

4.2.3. Анаеробна биодегradация на моделен целулозен субстрат филтърна хартия

И при трите хранителни среди като източник на въглерод се използва едно и също количество филтърна хартия. В качеството на критерий за подбор на средата се

използва количеството отделен в хода на процеса биогаз и образуването на метаболитни продукти – ЛМК.



Фигура 27. Отделен биогаз при анаеробно разграждане на филтърна хартия на три различни хранителни среди в периодичен процес при температура 35°C (А) и 55°C (Б).

На фигура 27 А и Б са представени резултатите за динамиката на отделяне на биогаз при различни температурни условия в периодичен процес на трите среди.

И на трите среди при температура 35°C процесът се характеризира с наличие на максимум в газоотделянето. За среда Имшенецкий той се наблюдава на 4-ия ден от култивирането. За другите две среди настъпва малко по-рано – след втория ден. Максималното количество биогаз се отделя на среда 1, а най-слабо – на среда 2. Средно е положението със среда СМ-3. След посочените максимуми количеството му рязко намалява до края на процеса.

При високата температура на полусинтетичната среда Имшенецкий още на 4-ия ден се наблюдава един максимум в газоотделянето. На синтетичната среда Омелянский, след първоначалното нарастване на отделения биогаз (на 4-ия ден) се наблюдава задържане на постоянно ниво, продължаващо до края на култивирането. Процесът на среда СМ-3 протича по съвсем друг начин. Вижда се постепенното плавно отделяне на биогаз, което продължава до 6-7-ия ден. Крайното му количество достига по-високи стойности в сравнение със среда 1 и 2.

Анализите на образуваните и метаболизираните в хода на процеса ЛМК, показват съвпадение с добивите на биогаз

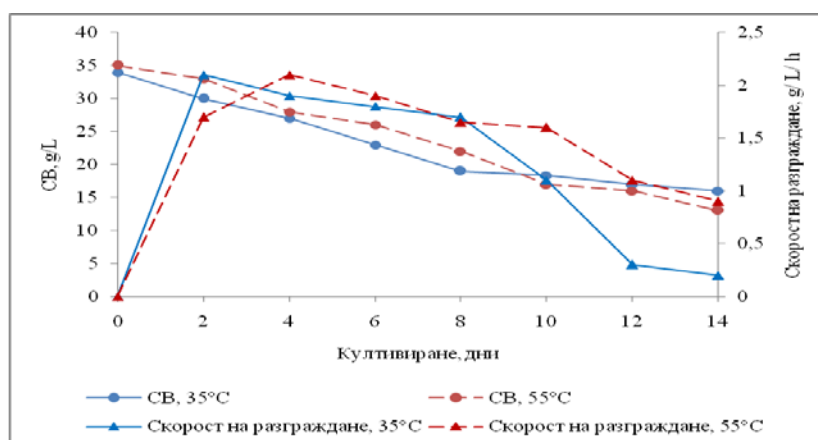
От направената сравнителна оценка на трите вида среди използвани при анаеробната биодеградация на чиста целулоза в различни температурни условия, можем да заключим следното:

За растеж на микробното съобщество използващо целулозен материал и синтезирането на биогаз са подходящи средата на Имшенецкий и среда СМ-3. Среда, в която липсва растежен стимулатор не е подходяща за анаеробно разграждане на целулозен материал.

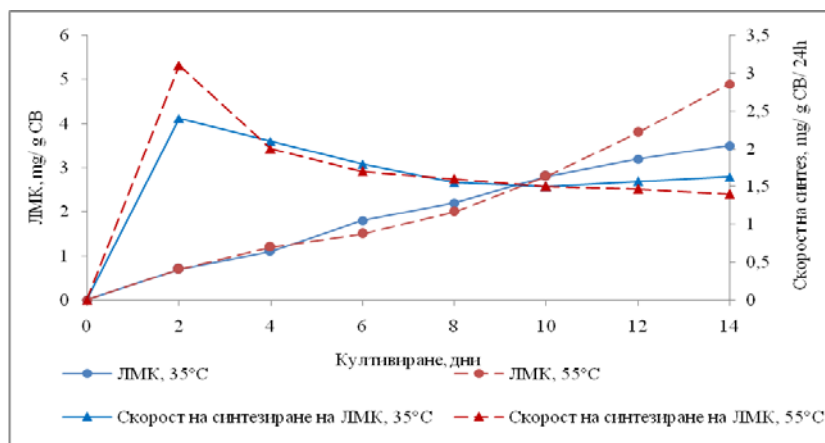
Изхождайки от тези резултати за по-нататъшните изследвания на процеса с използване на чиста целулоза като субстрат избрахме среда СМ-3, която удовлетворява и двете температури.

На фигура 29 е представена динамиката в количеството на сухото вещество при анаеробно разграждане при различни температурни условия.

Графиките показват, че внесеният целулозен материал – филтърна хартия – от 34-35 g/L достига до 16,4-13,4 g/L. Това означава, че при по-ниската температура той е разграден на 51%, докато при по-високата – на 62%. При термофилния режим на култивиране скоростта е много по-висока, което се отразява и на количеството разграден материал. Следователно, двата режима на култивиране слабо се отличават по степента на биодеградация на материала, като термофилния протича с по-висока скорост.



Фигура 29. Динамика на сухото вещество и скоростта на разграждането му при температура 34°C и 55°C.

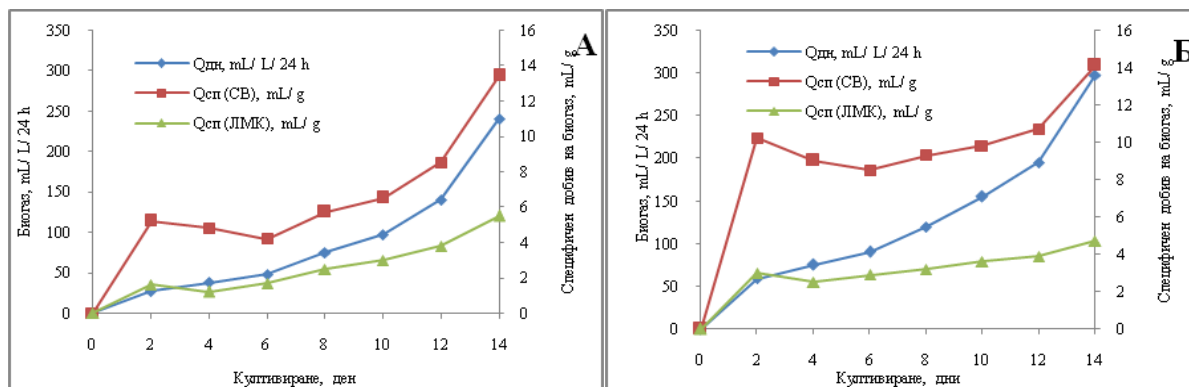


Фигура 30. Образуване на летливи мастни киселини и скоростта на синтезирането им от разграденото сухо вещество при температура 34°C и 55°C.

Основните метаболитни продукти през първата фаза на анаеробното разграждане на органичната материя са разтворими олигомери и ЛМК. Графиката на фигура 30 показва, че образуването на ЛМК започва още в началото на процесите независимо от температурата, при която се провеждат. Тяхната концентрация в културалната течност нараства до края на култивирането. Скоростта на синтезирането им е най-висока в първите дни на процеса, особено при термофилния. В хода на биодegradацията тя постепенно намалява в еднаква степен и за двете температури.

Динамиката на размножаване на три функционални групи, участващи при биодegradацията на филтърна хартия показва (фигура 32 А, Б), че при стартирането на процеса най-голям е броят на общата група хетеротрофни микроорганизми. Това не е учудващо в предвид качеството на използвания посевен материал, който е взет от процес със затихваща скорост. Другите две групи са представени от по-малък брой клетки. Протеолитичните бактерии също увеличават бавно числеността си до края на култивирането.

Тази метаболитна картина при анаеробната биодegradация на целулоза в различни температурни условия създава и условията за синтез на крайния продукт – биогаз (фигура 31 А, Б).

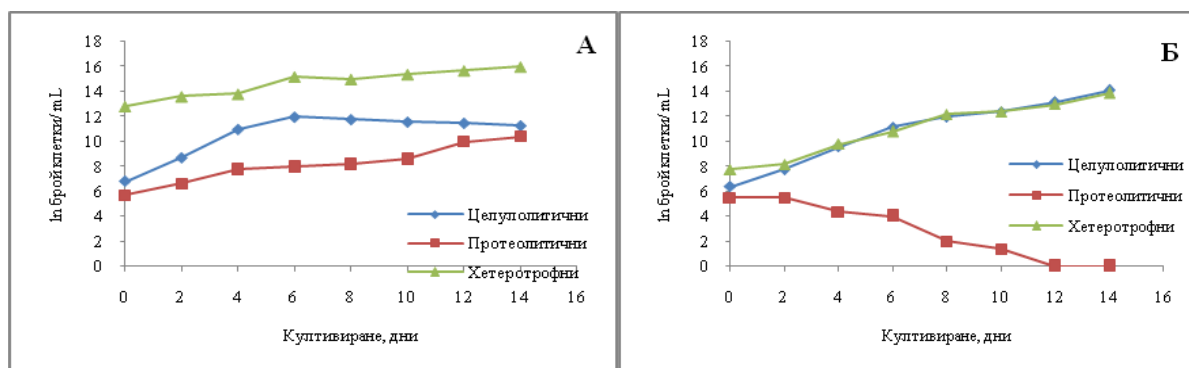


Фигура 31. Динамика на дневния и специфичния добив (за g СВ или ЛМК) на биогаз при анаеробно разграждане на целулозен материал при температура 34°C (А) и 55°C (Б).

Известно е, че анаеробното разграждане на органичното вещество се осъществява от сложна асоциация микроорганизми.

Динамиката на размножаване на три функционални групи, участващи при биодegradацията на филтърна хартия, показва (фигура 32 А, Б), че при стартирането на процеса най-голям е броят на общата група хетеротрофни микроорганизми. Това не е учудващо предвид качеството на използвания посевен материал, който е взет от процес със затихваща скорост. Другите две групи са представени от по-малък брой клетки. Протеолитичните бактерии също увеличават бавно числеността си до края на култивирането.

В хода на анаеробното разграждане в мезофилни условия (фигура 32 А) числеността и на трите групи се увеличава. Най-бързо това става с целулозоразлагащите микроорганизми. Максимумът в техния брой се достига на 6-то денонощие, след което количеството на клетките остава постоянно. Тези резултати добре корелират със степента на разграждане на субстрата в такива условия.



Фигура 32. Динамика на размножение на микробните популации при анаеробно разграждане на чиста целулоза при температура 34°C (А) и 55°C (Б).

Съвсем друга е картината при високата температура (фигура 33 Б). Групите на целулозолитичните и хетеротрофните микроорганизми през целия процес увеличават числеността си. При това количеството им е еднакво, което показва, че целулозолитичните бактерии са доминиращата група за процеса и хетеротрофите са представени главно от тях.

Протеолитичните бактерии при тази температура не срещат благоприятни условия за развитие и техният брой непрекъснато намалява, достигайки на 11-12-ти ден нула. Тези данни съвпадат с резултатите, получени в опитите с тор от ЕПЖ (фигура 10). Това е важен момент за този тип култивиране. Той би могъл да се използва в практиката за обеззаразяване на остатъчния биошлам от протеолитични патогенни бактерии, при деградацията на целулозен материал, които не растат при високи температури [18, 138].

Анализът на експерименталните данни свързани с промени в субстрата използван като въглероден източник, доказва, че чистата целулоза се разгражда успешно в анаеробен мезофилен и термофилен процес. Образуването на метан в изходящия газ започва след известна адаптация на микробната асоциация използвана за инокулум. При анаеробното разграждане на целулозен субстрат участват няколко функционални групи микроорганизми. Едни от тях усвояват основния субстрат целулоза, други растат използвайки аминокиселините в средата, а трети функционират главно за сметка на олигозахаридите, които са резултат от процеса на биodeградация. При термофилни условия се развиват специфични целулолитични микроорганизми, които са доминираща група. Те са отговорни за осъществяване на процеса на биodeградация на целулозата. Термофилният процес е по-благоприятен с по-високите си показатели по отношение на крайните продукти и неспособността да се развиват протеолитични микроорганизми. Последният факт може да се окаже твърде полезен за използване на отпадния биошлам като органичен тор в растениевъдството.

4.2.4. Анаеробна биodeградация на природни целулозосъдържащи материали и смеси от тях.

4.2.4.1. АБД на смеси от животновъдството с отпадни плодове и зеленчуци

Въпросът за разширяване на суровинната база за биотехнологичните производства е бил винаги актуален при изследване на процесите осъществявани с микроорганизми. Това важи и за анаеробните процеси целящи получаването на биогаз. На отпадъците от плодове и зеленчуци се е обръщало по-малко внимание, поради

структурата на тъканите и особеностите на химичния им състав. Тези отпадъци представляват сериозен екологичен проблем [119, 141]. От друга страна, проведените от нас изследвания показват, че оптимално, за растежа на микробното съобщество и продуктивността на системата съотношение между въглерода и азота в средата е между 25/1 и 30/1. Един от подходите за достигане на това съотношение е използването на различни отпадъци [26, 35], които се смесват по такъв начин, че съдържанието на въглерод и азот в сместта да дава съотношение близко до оптималното между 25/1 и 30/1.

В изследването използвахме смес от картофи, домати, краставици и ябълки в съотношение 4:2:2:2. Химичният състав на тази смес показва, че в нея се съдържа много малко азот и сравнително голямо количество въглерод във вид на захари, органични киселини и др. Това дава неблагоприятно за микробното съобщество съотношение C/N. Поради това, смесването на такава смес с други субстрати ще подобри условията на култивиране.

Преди да осъществим това обаче бе изследвана биодеграцията на чистата смес от ОПЗ, чиито резултати да послужат за сравнение.

На фигура 33 са показани дневните добиви на биогаз, а на таблица 15 –средните стойности на крайния продукт в мезофилен и в термофилен процеси, проведени с лабораторни биореактори при СВ на входа 70 g/L и различна скорост на разреждане (D , ден⁻¹). Вижда се, че при мезофилния процес, с увеличаване на D до достигане на стойност равна на 0,06 ден⁻¹, количеството на отделения биогаз нараства 3,4 пъти. При температура 55°С и същите технологични условия добивът на биогаз до $D=0,04$ ден⁻¹ не се отличава съществено от предишния режим.

Таблица 15. Средни стойности на отделения биогаз при биодеграцията на смес от ОПЗ при температура 35°С и 55°С.

D , ден ⁻¹	Мезофилен режим		Термофилен режим	
	Брой дни за изчисляване на средна стойност	Биогаз Q _{сп.} , dm ³ / L/ 24 h	Брой дни за изчисляване на средна стойност	Биогаз Q _{сп.} , dm ³ / L/ 24 h
0,01	33	0,64	13	0,51
0,02	49	0,84	78	0,71
0,04	65	1,45	55	1,32
0,06	47	2,15	-	-

Информация за биодеграцията на целулозата при двете температури на култивиране е дадена в таблица 17. Прави впечатление, че в термофилен режим разграждането на целулозата е по-голямо в сравнение с мезофилното култивиране.

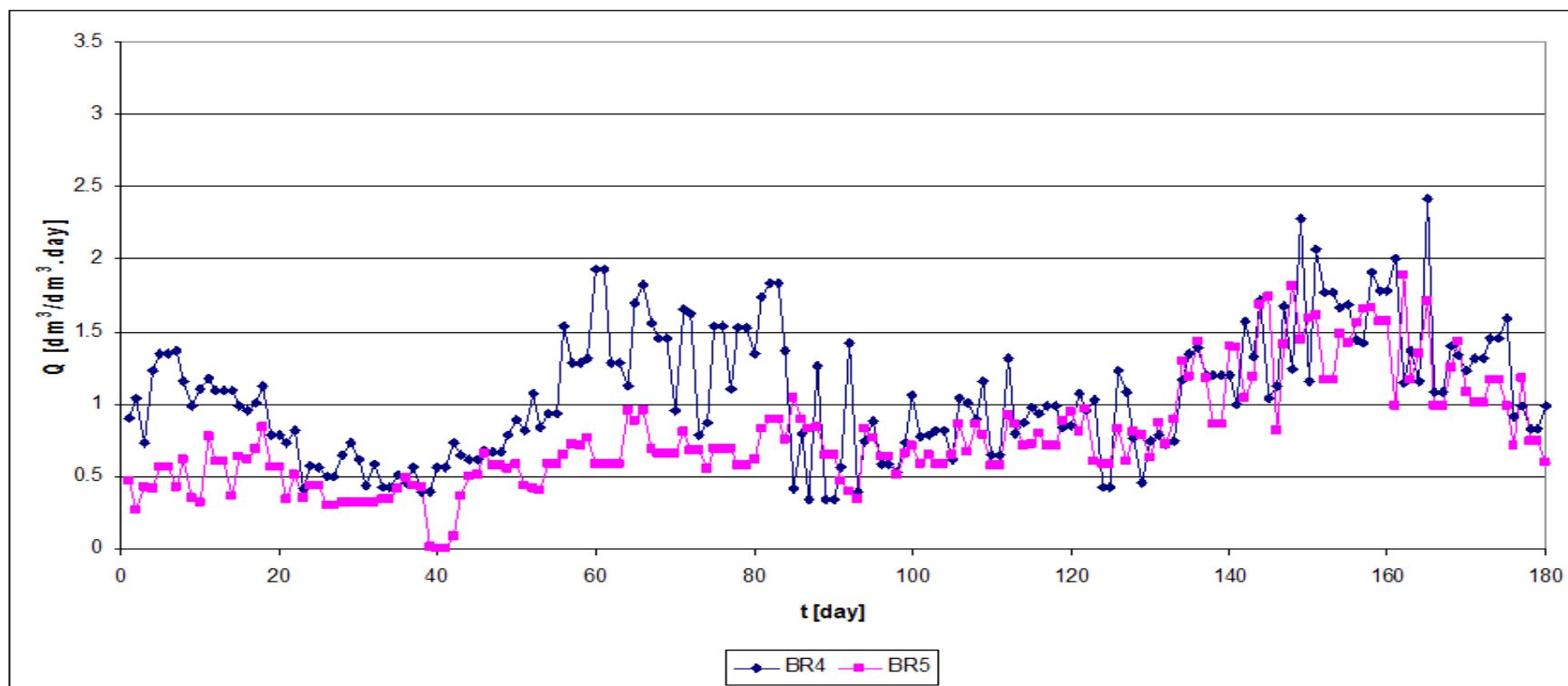
Това съвпада с данните за по-активно размножаване на целулозолитични микроорганизми при култивиране при висока температура на среда с чиста целулоза (фигура 33). Активността на целулозолитичните ензими също корелира с биодegradацията на целулозата. Следователно, и при използването на субстрат ОПЗ, преимуществено се развиват бактерии усвояващи полизахарида целулоза.

Таблица 17. Разграждане на целулоза в мезофилен и термофилен режим за 24h престой в БР при $D = 0,05 \text{ ден}^{-1}$

Температура	Целулоза, mg/mL		Целулазна активност, $\mu\text{g Glc/ h / mL}$
	вход	изход	
34°C	1,641	0,185	0,100
55°C	1,641	0,105	0,120

След осъществяване на експериментите за биодegradация на чиста смес от ОПЗ, бе съставена нова смес, която съдържа ОПЗ и различно количество свинска тор (СТ). Тя беше предпочетена тъй като има още по-ниско съотношение на C/N.

В таблица 18 са представени в синтезиран вид резултатите от експериментите при различни съотношения на участващите в състава компоненти.



Фиг. 33. Дневни добиви на биогаз при температура 35°C и 55°C при биодegradация на смес от ОПЗ.

Таблица 18. Биодegradация и метаногенеза на смес от свински тор (СТ) и отпадни плодове и зеленчуци (ОПЗ).

Субстрат СТ + ОПЗ, %	Добив на биогаз, m ³ /kg	Съдържание на CH ₄ , %	Добив на CH ₄ , m ³ /kg	Степен на разграждане, %
100+0	0,67	62	0,42	72,3
90 + 10	0,73	61	0,44	50,3
70 + 30	1,09	60	0,65	60,3
50 + 50	0,54	59	0,32	70,6
25 + 75	0,58	58	0,34	83,1
0 +100	0,91	57	0,52	78,9

В тези варианти на опита, добивът на биогаз варира от 0,58 до 1,09 m³/kg СВ. Съдържанието на CH₄ в газа е в диапазона 58-62%, а като добив – 0,32-0,65 m³/kg. Степента на разграждане достига най-висока стойност при варианта със 75% ОПЗ. Най-добри резултати по отношение на наблюдаваните стойности на крайните продукти са получени при съотношение на компонентите в сместта захранваща БР със СТ 70% и ОПЗ 30%.

4.2.4.2. Анаеробна биодegradация на смес от ОПЗ и пшенична слама

Предварително смляната и алкално третирана ПС беше използвана за приготвяне на опитните смеси с ОПЗ в следните отношения (ОПЗ/ПС) – 8/2; 7,5/2,5; 7/3; 6,5/3,5 и 5/5.

Резултатите от експериментите по отношение на добива на биогаз, на метан и степента на разграждане на изходните продукти при различни комбинации на участващите компоненти са представени в синтезиран вид в таблица 19.

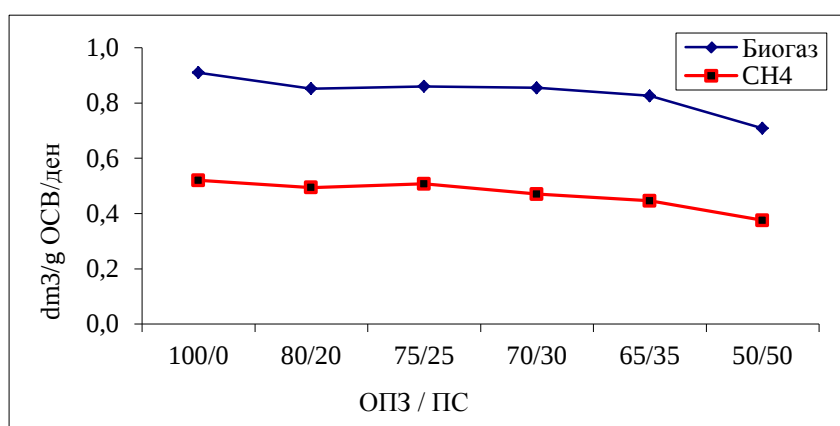
Таблица 19. Биодegradация и метаногенеза на смес от отпадни плодове и зеленчуци (ОПЗ) и пшенична слама (ПС).

Съотношение ОПЗ / ПС	Степен на разграждане, %	Добив на биогаз, m ³ /kg СВ	Добив на метан, m ³ /kg СВ
100 / 0	78,9	0,910	0,52
80 / 20	76,5	0,852	0,49
75 / 25	78,7	0,860	0,51
70 / 30	82,1	0,855	0,47
65 / 35	79,5	0,826	0,45
50 / 50	58,5	0,708	0,38

Резултатите от експериментите по отношение на добива на биогаз, на метан и степента на разграждане на участващите компоненти (ОПЗ и слама) в различни комбинации са представени в синтезиран вид в таблица 19.

От таблица 19 е видно, че оптималното съотношение ОПЗ/ПС с оглед максимален добив на метан е 75/25, а оптималното съотношение по отношение на степента на разграждане е 70/30. Изводът от представените експериментални данни е, че добавянето на ПС в количество от 20 до 30% в комбинация със 70 до 80% ОПЗ е най-благоприятен за практически цели.

Характеристиката на метаногенезата по отношение на целевия продукт при използването на тези смеси е показана на фигура 34.



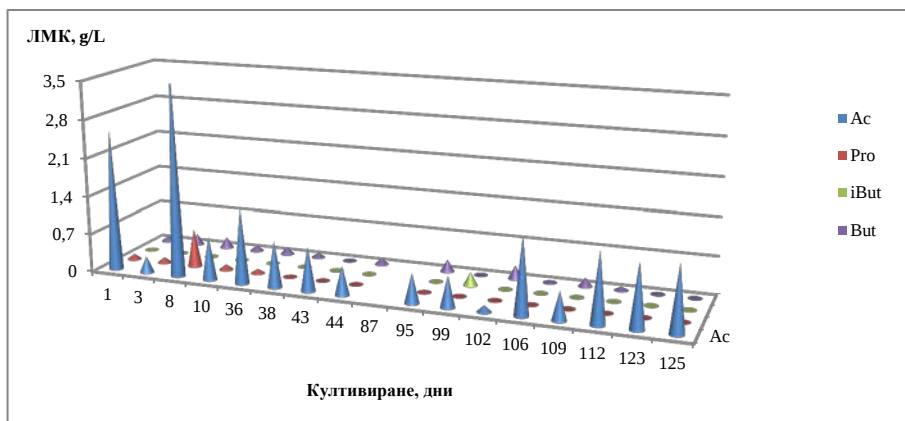
Фигура 34. Специфични добиви на биогаз и метан при анаеробна биодеградация на смеси от ОПЗ и претретирана пшенична слама.

Това предположение убедително се доказва от газхроматографския анализ на смесите преди процеса (фигура 36) и след него (фигура 37).

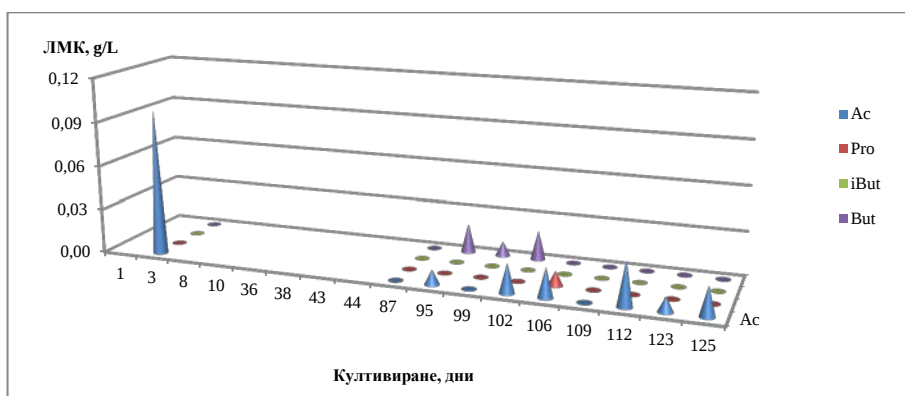
Вижда се, че в един продължителен период, през който всекидневно се подава свежа среда в БР, количеството на ЛМК е много високо. Сред тях преобладава ацетата. В по-малка степен са застъпени пропионат и бутират, а практически в неусвоима концентрация е изо-бутират, а валериат, изо-валериат и капроат не се откриват.

Още на 24-я час след подхранването, количеството на ЛМК рязко намалява, достигайки стойности, които са неусвоими от микроорганизмите (фигура 37).

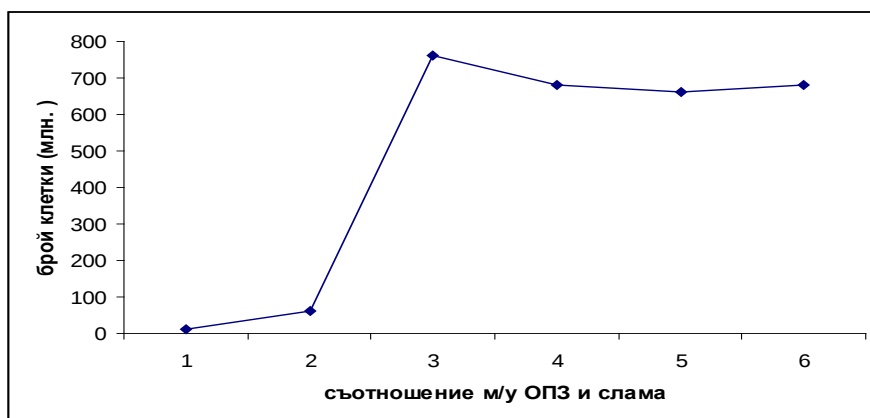
Ако ЛМК в плодовете и зеленчуците се метаболизират директно от ацетогенната и метаногенни функционални групи, участващи в процеса наличието на целулоза (общо около 70% от СВ) би следвало да индуцира развитието на целулозолитичните микроорганизми. Резултатите от микробиологичните изследвания в тази насока са представени на фигура 38.



Фигура 36. Концентрация на ЛМК във входящата смес.



Фигура 37. Концентрация на ЛМК в биореактора.



Фигура 38. Растеж на целулозолитични микроорганизми при усвояването на смеси от ОПЗ и пшенична слама в различни съотношения. 1-100% ОПЗ; 2- 80/20; 3- 70/30; 4- 65/35; 5- 55/45; 6- 50/50.

С нарастване на количеството на добавената слама в сместа броят на микробните клетки, усвояващи целулоза, също се увеличава. Максималното количество образуван биогаз при съотношение 70/30 съвпада с развитието на тази микробна група (таблица 20). Следователно тя участва активно в процеса на биодеградация и продуктите от дейността и се включват в биосинтезата.

Експериментите с различни смеси на ОПЗ със свински тор и с пшенична слама дадоха много добри резултати за практиката. Те бяха защитени със свидетелство за регистрация на полезен модел № 1814, издадено на 22.01.2014 година.

5. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

Изводи

1. Термофилните условия на култивиране ускоряват процесите на биодegradация на тор от ЕПЖ и смес от ОПЗ и слама, като стимулират разграждането на въглехидратите и липидите и инхибират метаболитизирането на протеините.

2. В микробното съобщество, разграждащо тор от ЕПЖ, независимо от температурата преобладават целулозолитичните бактерии. При повишаване на температурата тази група се развива най-силно, а популацията на протеолитичните бактерии се инхибира.

3. Оптималното съотношение C/N, благоприятстващо развитието и функционирането на микробното съобщество и получаването на максимално количество биогаз е в интервала 25-28. С подбор на суровини, съдържащи ниско или високо количество азот, и включването им в средата на култивиране може да се повиши продукцията на биогаз.

4. Йоните на тежките метали мед, кадмий и цинк играят модулираща роля върху процеса на метанообразуване чрез инхибиране на микробните популации, отговорни за метаболизма на въглехидратите и липидите от субстрата. По силата на своето въздействие върху добива на биогаз йоните се подреждат в реда: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. Медните и кадмиевите йони в по-голяма степен инхибират метаногенните популации на микробното съобщество в сравнение с цинковите.

5. Добивите на биогаз при мезофилен и термофилен анаеробен биодegradационен процес на смес от ОПЗ при еднакви условия са съизмерими, както и по отношение на концентрацията на метан в биогаза. Характерно за термофилния процес е по-пълното разграждане на органичния материал в сравнение с мезофилния, в т.ч. и на целулозата.

6. Добавянето на предварително третирана пшенична слама към ОПЗ не влошава процеса на метанообразуване. По отношение на добива на метан може да се препоръча

използването на смес от ОПЗ и претретирана пшенична слама в диапазона 75/25 – 70/30.

Приноси

1. Доказано е, че процесът на АБД на тор от ЕПЖ, на смес само от ОПЗ или на смес от ОПЗ със слама при температура 55°C е неблагоприятен за развитието на протеолитични микроорганизми, което благоприятства прилагането на биошлама като потенциален биотор.

2. Доказано е, че разграждането на тор от ЕПЖ, ОПЗ и техни смеси със слама е най-добро при съотношение C/N в границите на 25-28 в процесите на АБД с получаване на метан.

3. Осъществена е за първи път успешна АБД на смеси от свински тор и ОПЗ и на ОПЗ със слама, като е намерено оптимално съотношение между двата субстрата за максимален добив на метан, което е 70:30. Процесът е осъществен в пилотен биореактор и е защитен със **Свидетелство за регистрация на полезен модел № 1814, издадено на 22.01.2014 година.**

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Hubenov V. N., S. N. Mihaylova, I. S. Simeonov. Anaerobic co-digestion of wasted fruits and vegetables and swine manure in pilot-scale bioreactor. // *Bulgarian Chemical Communications*, 2014 (In press). IF=0,349/2013

2. Simeonov I., V. Hubenov, S. Mihaylova. Comparative studies of the anaerobic digestion of fruits and vegetables waste at mesophilic and thermophilic temperatures. // *Comptesrendus de l'Academiebulgare des Sciences. Tome 67, No 5, 2014*. IF=0,198/2013

3. Хубенов В., В. Денчева, П. Павлов, Х. Георгиева, Д. Денчев. Анаеробна микробна биодegradация на целулозен материал при две различни температури. // *Екологично инженерство и опазване на околната среда*, № 2, 2010, с. 33-39;

4. Simeonov I., B. Kalchev, S. Mihaylova, V. Hubenov, A. Aleksandrov, R. Georgiev, N. Christov. Pilot-scale Biogas Plant for the Research and Development of New Technologies. // *Int. J. Bioautomation*, 16, 3, 2012, 187-202, SJR=0,134/2013

Полезен модел:

Симеонов И., Д. Денчев, С. Михайлова, В. Хубенов, Е. Чорукова. Полезен модел № 1814/22.01.2014. Патентно ведомство на Република България, 2014

Участия в научни конференции

- Lazarova P., D. Denchev, V. Hubenov. Heavy metals as methane fermentation process modulators. 6th Balkan Congress of Microbiology, MicrobiologiaBalkanica' 2009, October, 2009, Ohrid, Macedonia

- Hubenov V., D. Denchev, I. Simeonov, Anaerobic digestion of cattle manure in various carbon/nitrogen ratios, Central European symposium on industrial microbiology and microbial ecology, Power of microbes in industry and environment 2010, Malinska, Croatia, 22nd – 25th September, 2010;

- Hubenov V., I. Simeonov, D. Denchev, S. Mihajlova. Anaerobic co-digestion of swine manure, wasted fruits and vegetables and wheat straw. 8th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica' 2013, October 2nd-5th, 2013, Veliko Tarnovo, Bulgaria