



XXXII. Országos Tudományos Diákköri Konferencia

2014



Biohidrogéntermelés anaerob mikrobakonzorciummal: kon- vencionális előkezelési módszerek és a környezeti paraméte- rek szerepe a folyamat hatékonyságában

Készítette:

Orlovits Katalin, Vegyészmérnöki M.Sc. hallgató (I. évfolyam)

Borza Beáta, Biomérnöki B.Sc. hallgató (IV. évfolyam)

Témavezető:

Dr. Bakonyi Péter

tudományos munkatárs

Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet

Mérnöki Kar

Pannon Egyetem

2013

Tartalom

1. Irodalmi rész	1
1.1 Bevezetés	1
1.1.1 A biomassa	4
1.1.2 A (bio) hidrogén térhódítása	6
1.2 A biohidrogén termelés megvalósítása	8
1.2.1 Biológiai úton történő előállítás biomasszából	9
1.2.2 Az előkezelés konvencionális módszerei	14
1.2.3 Fermentációs paraméterek szerepe a biohidrogén termelés során	16
2. Kísérleti rész	19
2.1 Felhasznált anyagok és módszerek	19
2.1.1 Az inokulum	19
2.1.2 A biogáziszap „öregítése”	20
2.1.3 A biogáziszap előkezelése	21
2.1.4 Hidrogén fermentáció	23
2.1.5 A gáz-folyadék arány és a pH hatásának vizsgálata	25
2.1.6 Gázmintavétel és analízis	26
2.1.7 H_2 parciális nyomásának számítása	29
3. Eredmények és értékelésük	33
3.1 A mezofil anaerob biogáziszap „öregítésének” hatása a H_2 termelő aktivitásra	33
3.2 Az előkezelési módszerek H_2 termelésre gyakorolt hatása	36
3.3 A kezdeti pH és gáz-folyadék arány hatása a H_2 termelékenységre és a H_2 parciális nyomására	38
4. Összefoglalás	44
Irodalomjegyzék	45
Köszönetnyilvánítás	50

1. Irodalmi rész

1.1 Bevezetés

Az ipar, ha még életre nem is kelt, már az első települések megjelenésével kialakult. Ez tulajdonképpen az emberek összegzett igényeire adott megoldás, ami a közösség szintjén alapszik. Az általa termelt egyik legfontosabb létszükségleti cikknek az energia tulajdonítható, melyet az emberek számos, a legkülönbözőbb művelet elvégzésére alkalmaznak.

Kezdetben az energia leginkább a munkavégzés jelentésköre alá volt sorolható, ám idővel a feladata jelentősen ártértékelődött (a jólét kielégítését szolgálta). Ez a jólét értelmezhető a tehetősebb és szegényebb rétegekbe tartozó emberek szükségleti igényeinek különbségeként, illetve alkalmas lehet az energiaszükségletek változásainak jellemzésére is.

Napjainkban az energiaszükségletet az ipar csaknem teljes egészében fosszilis, azaz nem megújuló erőforrások felhasználásával állítja elő. A technológia folyamatos fejlődése és a Föld népességének egyre nagyobb ütemben történő növekedése révén az emberiség oly jelentős mértékben használja ki ezeket a fosszilis energiahordozókat (földgáz, kőolaj, kőszén stb.), hogy optimális becslések szerint is előbb-utóbb kimerülhetnek a szénhidrogénforrások. E tevékenységnek köszönhetően környezetünk is folyamatosan egyre nagyobb károkat szenved el. Az évmilliók alatt felhalmozódott fosszilis energiahordozók felhasználása olyan mértékű káros anyag (pl. CO₂, NO_x, por, illékony szerves vegyület) kibocsátását eredményezi, amely a Föld hőmérsékletének eddig még soha nem tapasztalt emelkedését okozza és akár könnyedén ökológiai katasztrófa-hoz vezethet.

A kőolaj-finomítók napjainkban minden 1 millió tonna feldolgozott kőolajra vonatkoztatva 60-700 tonna nitrogén-oxidot, 10-3,000 tonna port, 20,000-820,000 tonna szén-dioxidot, 50-6,000 tonna illékony szerves vegyületet és 30-6,000 tonna kén-dioxidot (VOC) bocsátanak ki (Kovács, 2010).

Meteorológiai vizsgálatokból tudjuk, hogy a légkör CO₂ koncentrációja a 21. század elején 383 ppmv (térfogat-milliomod) volt. A geológusok kimutatása szerint ez több mint eddig bármikor a Föld történetében.

Az ember által okozott szén-dioxid emisszió eléri a 20 milliárd köbmétert, melynek legnagyobb része szintén a fosszilis tüzelőanyagok (kőolaj, földgáz, fekete-és barna kőszén, lignit) elégetéséből keletkezik. A szén-dioxid a természetes módon történő, illetve az emberi tevékenység miatt keletkező összes üvegházgáz-kibocsátásának mintegy 80%-át adja (Vida, 2009).

A nitrogén-oxidok üvegházgáz hatásukon kívül az emberi szervezetre szintén számottevő terhelést jelentenek, többek között asztmát, hörghurutot is okozhatnak. A belélegzett szilárdanyag (üledő és szálló por) egyes elemei rák és más egyéb súlyos életveszéllyel járó egészségkárosodás kialakulásáért lehetnek felelősek.

A légkörbe került illékony szerves vegyületek erős napsugárzás hatására reakcióba lépnek a kipufogógázok nitrogén-dioxidjával, nitrogén-oxiddá alakulnak, ennek során ózon szabadul fel, ami a környezetre és az emberi szervezetre is egyaránt káros hatással van (Laczó, 2008).

Mint ahogy az előbb leírt tények is alátámasztják, földünk kizsákmányolása, illetve folyamatos szennyezése vissza nem fordítható következményekkel járhat. Ezen tényezők visszaszorítása érdekében nagy szükség van a fosszilis készletek kihasználásának csökkentésére és más, azokat részben vagy egészben helyettesíteni tudó megújuló energiaforrások felhasználásának elősegítésére.

Az 1960-as évektől, de legfőképp az 1973-ban bekövetkezett energiaválság következtében, egyre nagyobb hangsúly helyeződött a fosszilis energiahordozókat kiváltani képes alternatív energiaforrások kutatására. A válság kitörésével, nyilvánvalóvá vált, a megoldást több területen kell egyszerre keresni. Egyfelől a megújítható forrásokból kell minél nagyobb mértékben fedezni az igényeket, másrészt a felhasznált energia leg-hatékonyabb alkalmazására kell törekedni. Az emberiség ráébredt arra, eljött az idő, az energiával kapcsolatos addigi szűk látókörének kiszélesítésére, a cél pedig, hogy magunkat minél inkább függetleníteni tudjuk a nem megújuló forrásoktól és nyissunk a megújuló, egyben lényegesen környezetbarátabb források felé.

E tudattól „fűtve” még abban az évben megalakult egy olyan kutató intézet (Clean Energy Research Institute (CERI) – Miami Egyetem (USA), melynek célja a megújuló energiahordozók kutatása volt (Bakonyi, 2012).

Megújuló energiaforrások közé sorolandók azok az energiafajták, amelyek természeti folyamatok során kvázi folyamatosan rendelkezésre állnak (akár naponta többször ismétlődően), vagy jelentősebb emberi beavatkozás nélkül legfeljebb néhány éven belül újratermelődnek (nap, szél, geotermikus-, vízenergia, biomassa). Használatukkal járó előnyök közé tartozik az energiafüggőség csökkentése (energiaforrások decentralizálása), klímavédelem (éghajlatváltozás lassítása, hatásainak mérséklése), fenntartható fejlődés elősegítése, illetve a különféle egyezményekben, direktívákban foglaltak teljesítésének elősegítése (mind globális, mind pedig regionális szinten). A „zöld”, azaz megújuló energiaforrások használata továbbra is lehetőséget biztosít a folyamatos emberi fejlődésre, azonban nem szennyezi, nem károsítja a környezetet.

EU klímapolitika értelmében - mely egyaránt Magyarországot is érinti - 2020-ig különféle vállalásokat kell teljesíteni (természetesen a tagállamok vállalásai országonként eltérők, s nagyban függnék a tagállamok méretétől, gazdasági, fejlettségi szintjétől). Ezen vállalások közé tartozik többek között (Böhringer, 2009):

- 20%-os energiafelhasználás csökkentés (energiahatékonyság növelése)
- 20%-os ÜHG (üvegház gáz) kibocsátás csökkentés (1990-es bázisévhez képest)
- EU szinten 20%-ra emelendő a megújuló energia részaránya (hazánk 13%-ot vállalt)
- 10% bioüzemanyag felhasználást kell elérni

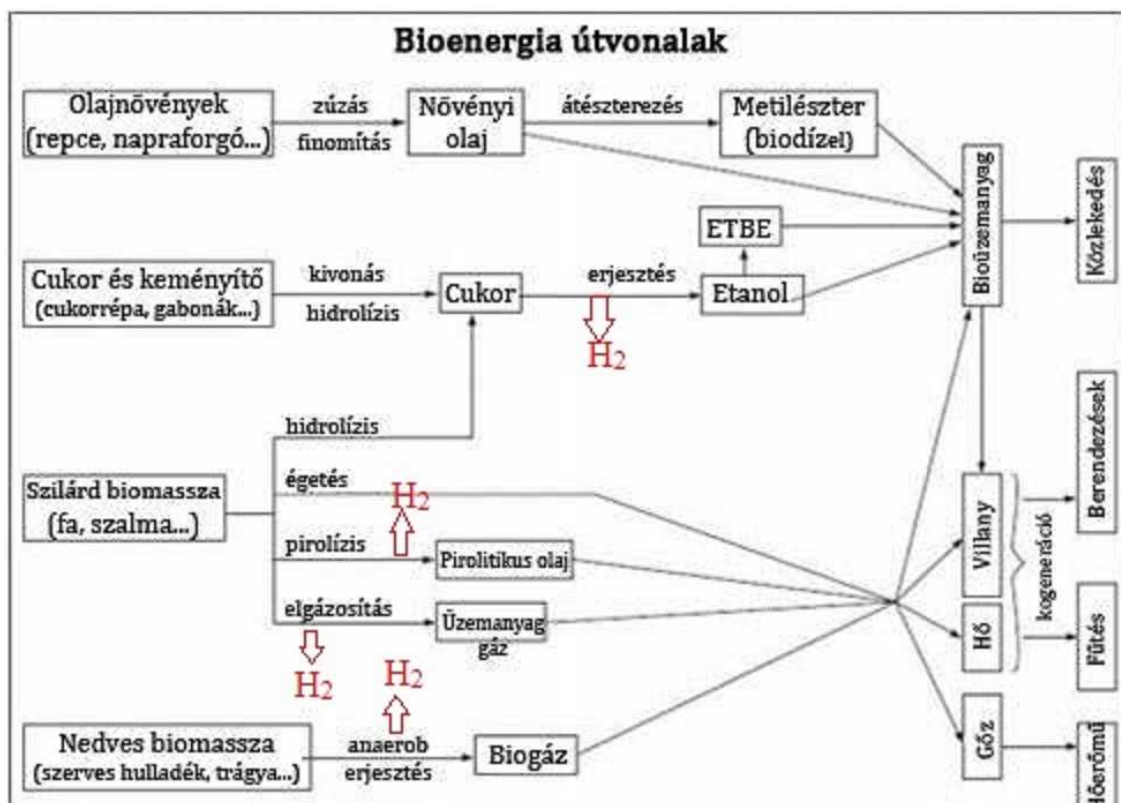
1.1.1 A biomassa

A biomassa, melynek felhasználása igen sokrétű, az egyik legjelentősebbnek számít a megújuló energiaforrások között. Az Európai Unió 2009/28/CE direktívája alapján a biomassa *„a mezőgazdaságból (a növényi és állati eredetű anyagokat is beleértve), erdőgazdálkodásból és a kapcsolódó iparágakból – többek között a halászatból és az akvakultúrából – származó, biológiai eredetű termékek, hulladékok és maradékanyagok biológiailag lebontható része, valamint az ipari és települési hulladék biológiailag lebontható része”*.

Előnyei közé tartozik többek között, hogy felhasználása során nincs többlet CO₂ kibocsátás, készletei nincsenek lelőhelyhez kötve, továbbá kifogyhatatlan bázist jelent. Mint energiaforrás, különbözik a széntől független forrásoktól (pl. napenergiától, szélenergiától), mert a kibocsátott gázok és a belőle nyert energia jellege alapvetően hasonló a nem megújuló energiahordozók alkalmazásánál szokásoshoz.

A fenntarthatóság elveit szem előtt tartva, megfelelő arányban kell figyelembe venni az energetikai célú hasznosítását, hiszen a biomassa felhasználása ipari nyersanyagként, élelemforrásként, vagy éppen takarmány alapanyagként szintén lényeges szempont.

A bioenergia előállítására alkalmas biomassa túlnyomó többsége növényi vagy állati eredetű. Származhat erdőgazdaságból, mezőgazdaságból, iparból, településekről, illetve osztályozható az alapján is, hogy az adott massa hulladékból, energianövényből vagy maradékanyagból származik-e. A biomassa fő alapanyagának számítanak a fehérjék, zsírok, szénhidrátok, továbbá az állattartás termékei és hulladékai. Növényi eredetű biomassa csoportjába tartoznak a mezőgazdasági termékek, erdőgazdasági és fafeldolgozási hulladékok, energetikai célra termesztett növények. A különböző forrásokból származó biomassa átalakításának lehetőségeit az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra Biomassza technológiai rendszerek (EC, 2007)

A fentiekből következik, hogy az adott biomassza származása és felhasználása igen sokrétű, megfelelő feldolgozás hatására egyenértékűvé alakítható a fosszilis energiahordozókkal. Kémiai átalakítás után (pl. elgázosítás) alkalmazható folyékony üzemanyagként (biodízelként növényi olajok észterezésével, alkohollá erjesztéssel), közvetlenül tüzelőanyagként, vagy pedig anaerob rothasztást követően (éghető) biogázként. A biogáz felhasználható villamos-, illetve hőenergia termelésére. Megfelelő előkezelést és tisztítást követően alkalmazható, gépjárművek üzemanyagaként, vagy pedig betáplálható a földgáz hálózatba.

A biogáz üzemek nagy előnye, hogy a legtöbb szerves hulladék, mint a mezőgazdasági, állati eredetű hulladék feldolgozására, átalakítására, kezelésére, illetve ártalmatlanítására alkalmasak. Ezen tevékenységük folyamán pedig energiát termelnek. A maradékanyagokból és hulladékból származó biomassza átalakítása nyomán nyert energia a kedvező környezeti hatásainak köszönhetően egyre nagyobb jelentőségre tesz szert.

1.1.2 A (bio) hidrogén térhódítása

Különféle elképzelések ismertek arra, hogy az állatokból és növényekből származó szerves anyagok (biomassza) milyen energiahordozóvá alakíthatók át. Ilyen lehet például a bioetanol, biobutanol, biodízel, biobrikett, biogáz, vagy pedig a biohidrogén, mely az összes közül kiemelten előnyös energiaforrásnak számít. Utóbbi kiemelt jelentőséggel rendelkezik a biológiai eredetű gázok közül, amelyre ma már szinte a világon úgy tekintenek, mint egy olyan energiahordozóra, ami ha nem is teljes mértékben, de képes lesz a jelenleg még erősen domináns fosszilis erőforrásokat helyettesíteni.

CERI-ben dolgozó kutatók elsőként vetették fel egy hidrogén alapú energiaellátó rendszer gondolatát. 1974-ben megalakult az IAHE (International Association for Hydrogen Energy), melynek vezetősége egy hivatalos folyóiratot hozott létre (International Journal of Hydrogen Energy - IJHE) a hidrogénnel kapcsolatos kutatások és azok eredményeinek nyilvánossá tételére (Bakonyi, 2012).

Az évek során egyre nagyobb népszerűsége tett szert a hidrogénnel kapcsolatos tudomány, ezzel párhuzamosan pedig egyre több fontos felfedezés eredménye vált nyilvánossá. Egy olyan „álom”-üzemanyagnak, illetve energiaforrásnak tekintik, mely védelmet biztosíthat egy esetlegesen bekövetkező globális energia válság esetén.

1974-től napjainkig terjedő időszakban a hidrogént, illetve a segítségével előállítható energiát az ipar szinte minden területéről (a petrokémiai ipart kivéve) egyre fokozódó érdeklődés kíséri. A klasszikus hidrogéngyártás azonban legtöbbször magas energiaigényű, költséges és nem éppen környezetbarát technológiának tulajdonítható. Ellenkezőleg a biológiai úton történő előállítással, melynek során a gyártást különböző mikroorganizmusok végzik általában környezetihez közeli hőmérsékleten és nyomáson, így ez a módszer kevésbé energiaigényes, illetve kevésbé környezetterhelő a klasszikus mechanizmusokhoz képest.

A biológiai úton történő előállítás nem csupán környezetbarát, de új utat is nyitott a megújuló energiaforrások felhasználásának lehetőségei között. Az alkalmazott mikroorganizmusok számos hulladék (mely kvázi kimeríthetetlen forrást jelent) lebontására, illetve átalakítására képesek, így fontos szerepet játszanak az újrahasznosítás szempontjából is egyaránt. Ezeken kívül a fermentatív H_2 termelési folyamatok melléktermékként

néhány hasznos zsírsav előállítására is alkalmasak, mint például: tejsav, ecetsav, vajsav, melyek megfelelő kinyerés után további célokra felhasználhatók (Das, 2004).

A 90-es évek elején az érdeklődés még nagyobb lett, hiszen teljes mértékben nyilvánvalóvá vált a fosszilis tüzelőanyagok globális szintű negatív hatása. Következésképp, a Shell Oil co. felhagyott az addigi hidrogén ellenes elgondolásával és saját Hidrogén Divíziót hozott létre, melyben az elektromos járművek és a hidrogén tüzelőanyag cellák jövőben játszott nagyon fontos szerepét fogalmazta meg (Baranowski, 2008). Az olajtársaság különböző autógyárak partnerségével bemutató H₂ töltőállomásokat nyitott világszerte (Kína, EU, USA, Ázsia). Kis idő elteltével a BP olajtársaság is követte ezt a példát, így tehát az olajipar is hozzákezdett a hidrogénnel, mint lehetséges alternatívával foglalkozni.

Pozitív példaként tekinthető továbbá a legnagyobb autógyárak „elkötelezettsége” a tüzelőanyag-cellás hibrid járművek gyártása iránt, illetve az a tény, hogy a biológiai hidrogéntermelés kormányzati támogatást kapott többek között Németországban, az USA-ban és Japánban is egyaránt (Das, 2009).

Az olaj árának folyamatos növekedése, illetve a globális felmelegedés hatásai miatti aggodalom következtében, megfelelően átalakított gazdasággal, piaccal, illetve az alternatív technológiák kellően erős támogatásával a H₂ aránya növelhető lehetne az energiapiacra. Ahhoz viszont, hogy a H₂ a gyakorlatban is megfelelően alkalmazható üzem- és fűtőanyag lehessen, még nagymértékben javítani szükséges az energiatranszportjának technológiáit, jelentős mértékben csökkentve ezzel a költségeket is egyben.

Azonban még számos további kutatás és fejlesztés szükséges a megújuló forrásokra alapozott energiatermelés-, átalakítás- és szállítás versenyképessé tételére (Balog, 2005).

1.2 A biohidrogén termelés megvalósítása

A hidrogén a legkönnyebb kémiai elem, a Földön vegyületeiben hatalmas mennyiségben fordul elő. A legfontosabb vegyületét nyilvánvalóan a víz jelenti. Akárcsak az elektromos áram, a hidrogén is olyan energiahordozó, amelyhez nem lehet a megszokott módon, például bányászat útján hozzájutni. Abban is hasonlítanak egymásra, hogy mindkettő komoly tárolási feladatot igényel. Erre a problémára különböző fejlettségi fokon már számos megoldás létezik.

Mesterséges úton előállított, szekunder energiahordozónak számít, amely környezetet kímélő módon használható fel. Mint energiahordozónak elsődlegesen a környezetvédelmi előnyei a meghatározók, hiszen égetése során teljes mértékben karbon-mentes termék, víz keletkezik (Das, 2011).

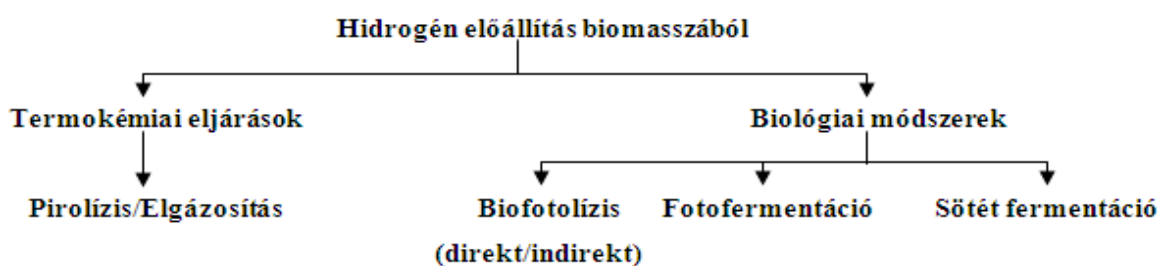
A hidrogén égési jellemzőit összehasonlítva más tüzelőanyagokkal (pl. benzinnel vagy földgázzal) (1. táblázat), levonható az a következtetés, hogy a H_2 egy nagy fűtőértékű és égéshőjű gáz.

1. táblázat Tüzelési és égési jellemzők összehasonlítása (Tóth, 2011)

	Hidrogén	Földgáz	Benzin
Alsó fűtőérték, MJ/kg	120	50	42
Felső fűtőérték (égéshő), MJ/kg	142	57	42

Mint ahogy azt a 2. ábra is mutatja, rendszerint két különböző fajta eljárást (termokémiai és biológiai) vizsgálnak és alkalmaznak biohidrogén előállítása céljából. A termokémiai eljárások során is egyaránt szabályozva van a hőmérséklet és a nyomás, hogy a biomasszában különféle kémiai változások játszódjanak le és növekedjen az előállított gázok hidrogén hozama. Ilyen eljárások esetén általában elgázosítást, illetve pirólízist alkalmaznak. A biológiai folyamatok előnyét a jelenlévő mikroorganizmusok (baktériumok) jelentik, melyek képesek a biomassza hatékony átalakítására.

A folyamatok tovább oszthatók fényfüggő, illetve fénytől független mechanizmusokra. Fényfüggő folyamatok közé sorolandó a fotobiolízis és a fotofermentáció, a fénytől függetlenek csoportjában pedig a sötét fermentáció a legtöbbet alkalmazott módszer (Manish, 2008).



**2. ábra A hidrogén biomasszából történő előállításának lehetőségei
(Bakonyi, 2012)**

A hidrogéngyártás fő alapanyagának még mindig a földgáz (metán) számít, viszont jelenleg a biológiai, fermentációs és az anaerob folyamatok vizsgálata a tudomány számos területén a legkutatottabb témák közé tartozik.

Hiszen ahhoz, hogy a hidrogén jövőnk energiaforrása lehessen, mindenképpen környezetbarát, biológiai úton célszerű előállítani.

1.2.1 Biológiai úton történő előállítás biomasszából

A mikroorganizmusok metabolizmusuknak és élettani tulajdonságuknak köszönhetően képesek különböző folyamatok révén hidrogént termelni. Ezen mikrobák mindegyikének egyaránt megvannak a maga előnyei illetve hátrányai.

A mikrobiális sejtek olcsó biokatalizátoroknak tekinthetők, reaktorokban való alkalmazásuk nagyságrenddel kisebb energia befektetést igényel, hiszen az általuk katalizált reakciók a környezetihez közeli nyomás és hőmérséklet tartományban játszódnak le, ennek következtében pedig energetikai szempontból nézve mindenképpen előnyösebbek a hagyományos hidrogéntermelő eljárásokhoz képest (Blaskó és Tamás, 2008).

A hidrogén biológiai módszerekkel történő előállításának közös jellemzői közé tartozik az, hogy ezek a folyamatok mind anaerob körülmények között játszódnak le és hidrogéntermelő enzimek vesznek részt bennük (Manish, 2008). A hidrogént előállítani képes enzimek közé sorolhatók a hidrogenázok és nitrogenázok, melyek működése igen érzékeny az O_2 jelenlétére.

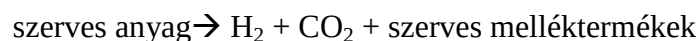
Az aktív centrumban található fémtartalmuk szerint a hidrogenázok három fő csoportja különböztethető meg: [NiFe]-hidrogenázok, [FeFe]-hidrogenázok és [Fe]-hidrogenázok (Kim, 2011).

A biológiailag történő hidrogén előállítás módszerei 3 fő csoportba sorolhatók (2. ábra): fotofermentáció, biofotolízis és a sötét fermentáció.

A $bioH_2$ előállításának különböző megközelítései között az úgynevezett sötét fermentációs út egy gazdasági és gyakorlati szempontból is fenntarthatóbb és széleskörűen alkalmazható módszernek tűnik (Krupp, 2009). A továbbiakban csak a sötét fermentáció kerül részletesebben bemutatásra, hiszen vizsgálataink során ezzel a módszerrel történő biohidrogén előállításával foglalkoztunk.

Sötét fermentáció

A folyamat során napenergia közvetlen felhasználása nélkül, oxigénmentes körülmények között, különféle változatos szerves anyagokból, mint például a keményítő, cellulóz vagy a glükóz, hidrogén, szén-dioxid, különféle szerves komponensek és melléktermékek keletkeznek. Különböző heterotróf, obligát (pl. *Clostridiaceae*) illetve fakultatív (pl. *Enterobacteriaceae*) anaerob baktériumok játszanak szerepet a reakciók lejátékozódása során (Levin, 2004).



A sötét fermentáció lejátékozódásakor tehát a reaktorban található fény-független mikroorganizmusok jelenléte nyomán különböző szerves vegyületekből hidrogén képződik.

Ezt a hidrogénképződést számos paraméter befolyásolja, beleértve a szén- és nitrogénforrásokat, a mikrobakonzorcium összetételét, a H_2 parciális nyomását, pH-t (Das és Khanna, 2012).

Ez idáig többnyire egyszerű, tiszta szubsztrátok kerültek alkalmazásra a kísérletek során, ezért jelentős érdeklődést mutat a komplexebb anyagok segítségével előállítható biohidrogén témája (Kumar, 2013 b).

Előnyök:

- nem szükséges fény jelenléte
- nem keletkezik O_2
- nincs nettó CO_2 kibocsátás, amennyiben a szubsztrát megújuló forrásból származik
- decentralizált energiatermelés valósítható meg a biomassza forrásánál, így csökkentve a kiadásokat és a szállítási költségeket
- egyszerűbb reaktortechnika, olcsóbb üzemeltetés, mint például a fotobioreaktorok esetében
- nagy gázképződési sebesség. A szakirodalomban fellelhető legnagyobb volumetrikus biohidrogén képződési gázáram értéke $15\text{ L } H_2\text{ L}^{-1}\text{h}^{-1}$, melyet *Clostridiaceae* által dominált, granulált iszappal, mezofil körülmények között voltak képesek elérni (Wu, 2006).

Hátrányok:

- energiadús melléktermékek képződése (pl. etanol, butanol, szukcinát, acetát, laktát)
- relatív alacsony hidrogén hozam (a keletkező szerves melléktermékek miatt)

Az eddigi, sötét fermentációs hidrogéntermeléshez kapcsolódó kutatások javarészt főként *Enterobacteriaceae* (pl. *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*) és *Clostridiaceae* (pl. *C. irregulares*, *C. acetobutylum*, *C. butylicum*, *C. canis*, *C. glykolicum*) baktériumcsaládok képviselőit vizsgálták (Zhanga, 2006).

Enterobacteriaceae törzsbe tartozó baktériumok jellemzően alacsony, illetve közepes (1-2 mol H₂/mol) glükóz hozam elérésére alkalmasak és viszonylag gyorsan képesek szaporodni (Wang, 2009). Legnagyobb előnyük, hogy ezek a mikroorganizmusok kevésbé érzékenyek az oxigén okozta inhibícióra, mivel képesek annak hatékony és gyors kivonására a rendszerből, s ezt követően pedig vissza tudnak térni a hidrogéntermelő életmódhoz (Yokio, 2011).

A *Clostridiumok* előnye, hogy hidrogéntermelő képességük meghaladja az *Enterobakteriumokét*. Endospórákat képezve rendkívül hatékonyan képesek átvészelni a kedvezőtlen környezeti körülményeket, mint például a kiszáradást, hőt, sugárzást, illetve különböző kémiai ágensek negatív hatását.

A spórák életképességüket akár igen hosszú ideig is megőrizhetik, majd kedvező környezetbe kerülve ismét aktiválódnak, kicsíráznak, s újra növekedésbe fognak. Nagy hátrányuk, hogy alkalmazásuk során tökéletesen anaerob környezetet kell biztosítani - ami azonban ipari méretekben nehezen megvalósítható -, hiszen extrém módon érzékenyek még az oxigénnyomokra is. Továbbá a fermentorban akkumulálódó hidrogén parciális nyomása jelentősen negatívan befolyásolja a hidrogéntermelő aktivitásukat (Nath, 2004).

Az előbb említett baktériumokkal szakaszos kísérletekben végzett vizsgálatokban legtöbbször egyszerű szubsztrátokat (mint glükóz, keményítő, xilóz) alkalmaztak.

Monokultúrák felhasználása esetén az egész kísérlet időtartama alatt steril körülményeket kell biztosítani. Ennek következtében alkalmazásuk során nem közelíthetők meg az ipari körülmények, hiszen ilyen méretekben a teljes sterilitás nehezen megoldható, illetve ennek megvalósítása rendkívül magas költségeket von maga után, továbbá az anaerob közeg biztosításához (a teljes üzemelés során) valamilyen redukáló ágens alkalmazása szükséges a redoxpotenciál értékének kellően alacsonyan (≤ 300 mV) tartásához (Bakonyi, 2012). Következésképpen a tiszta mikrobakultúrák ipari méretekben való használata a jelen állás szerint a magas költségek miatt még kérdéses.

Az eddig említettek alapján, célszerű lehet az előbb tárgyalt mikrobákat kevert tenyészetekben (mikrobakonzorciumokban) alkalmazni, ahol a *Clostridiumok* hatékony H₂ termelését eredményesen kiegészítheti az *Enterobakteriumok* oxigénlimitáló és hid-

rogéntermelő képessége. Ezek a mikrobakonzorciumok egyesítik az őket felépítő mikroorganizmusokra jellemző előnyös tulajdonságok összességét.

Több szempontból is előnyös a kevert kultúrák hidrogéntermelésre való felhasználása, mivel így például a felhasználható alapanyagok köre jóval szélesebb lehet, illetve könnyebben megoldható az ilyen rendszerek üzemeltetése (Fang és Li, 2007).

A mikrobakonzorciumok alkalmazása esetén hátrány adódhat abból, hogy egy meghatározott idejű folyamatos működtetés után mikrobák fajösszetétele módosulhat (*population shift*), amely a folyamat hozamát és a produktivitást akár kedvezőtlenül is befolyásolhatja (Hawkes, 2002).

Az esetleges redukáló komponensek igénybevételének kiküszöbölése céljából olyan mikrobiológiai törzsek használhatók, melyek obligát- és fakultatív anaerob törzseket is hasonlóképpen tartalmaznak. Egy ilyen rendszer előnye, hogy míg az obligát anaerobok képesek biztosítani a magas hidrogénhozamok elérését, addig a fakultatív anaerobok alkalmasak az oxigénnyomok rendszerből való kivonására, ugyanakkor ők is egyaránt képesek elősegíteni a hidrogén, mint termék képződését (Ogino, 2005).

A természetben szép számban fellelhetők a hidrogén előállításra képes mikrobák, javarészt a talajban, szennyvíziszapban, biogáziszapban (Wang és Wan, 2008). Az ilyen forrásokból eredő, megfelelő előkezelésen átesett mikrobakonzorcium a H₂ biológiai úton történő „termeléséhez” potenciális inokulumként szolgálhat.

Az előkezelés célja, hogy a nem kívánatos „hidrogénfogyasztó” (pl. metanogén) baktériumokat elpusztítsa, szaporodásukat meggátolja, így módon lehetséges a hasznos (savképző) mikroorganizmusok szelektálásának megvalósítása.

A folyamat melléktermékeként képződő „hasznos” savak közé sorolhatjuk az ecetsavat és a vajsavat, ellenben a propionsavval, melynek képződése hidrogénfogyasztással jár együtt (Hassan, 2009).

1.2.2 Az előkezelés konvencionális módszerei

Ahhoz, hogy a H_2 termelés megfelelő hatásfokkal működhessen, a legtöbb esetben szükség van az alapanyag valamilyen előkezelési módszerrel történő kezelésére. Értelmszerűen az lenne a legjobb, ha olyan mikrobákat sikerülne identifikálni vagy „előállítani”, melyek az alapanyag és iszap előkezelése nélkül, a saját maguk által előállított egyedi enzimekkel közvetlenül képesek az összes alapanyag eredményes lebontására és hasznosítására a bioreaktorban (Nath, 2004).

Jelenleg viszont szükség van a biogáziszap előkezelésre, hogy a hidrogénfogyasztó baktériumokat képesek legyünk elnyomni a hidrogéntermelőkkel szemben, míg ez alatt az utóbbiak feldúsulnak az iszapban.

A használatos módszerek közé tartozó mechanizmusok a következők: termikus eljárások, mint a hő-sokk, fagyasztás és felolvasztás, a pH megváltoztatása savas- vagy bázikus kezeléssel, a redoxpotenciál megváltoztatása levegőztetéssel, továbbá kémiai inhibítor(ok) alkalmazása (például: kloroform, jódpropán, 2-brometánszulfonsav) (Wang és Wan, 2008). Cheong és Hansen 5 előkezelési módszert határozott meg (nátrium 2-brometánszulfonát, savas előkezelés, nedves- és száraz hőkezelés, fagyasztás és felolvasztás) a hidrogéntermelő baktériumok szelektálására, majd arra a következtetésre jutott, hogy a savas előkezelés a legjobb az említett öt közül (Cheong, 2006). Hu és Chen három előkezelési eljárást említett (savas, hő-sokk, kloroform) a metanogén baktériumok elnyomására, ezen eljárások közül pedig a kloroformmal történő kezelést jelezte meg, mint leghatékonyabb módszert (Hu, 2007). Mohan és munkatársai szintén három eljárást neveztek meg (hő-sokk, savas- és bázikus kezelés) a cél elérése érdekében, és arra a következtetésre jutottak, hogy a hővel való előkezelés a legjobb az említettek közül (Mohan, 2008).

Ezen ellentmondások tisztázására Wang és Wan tanulmányt készített a legjobb előkezelési módszer azonosítása és a hidrogénhozam növelése céljából. Ebben a tanulmányban 5 különböző kezelési módszert (savas, bázikus, hő-sokk, levegőztetés, kloroform) hasonlítottak össze szakaszos eljárásnál 35 °C-on, 7-es kezdeti pH érték mellett glükóz szubsztrát alkalmazásával.

A hővel történő kezelés során 100 °C-on 15 percig forralták az iszapot, a savas kezelésnél az iszap kezdeti pH-ját HCl hozzáadásával 3-ra állították, míg NaOH alkalmazásánál az iszap pH-ját 10-re emelték fel. A kezelés mindkét esetben 24 órán keresztül tartott. Kloroformos előkezelésnél kloroformot adtak az iszaphoz 2%-os végkoncentrációban (a kezelés 24 órán keresztül folyt), a levegőztetés során pedig az iszapot szintén 24 órán keresztül levegőztették.

A módszerek összehasonlításának eredményét a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat Az előkezelési módszerek eredményeinek összehasonlítása (Wang és Wan, 2008)

Előkezelési módszer	Kumulatív H₂ termelés (mL)	H₂ produktivitási ráta (mL/h)
Sav	96,8	86
Bázis	125,9	94,8
Hő-sokk	215,4	120,4
Levegőztetés	80,2	45,7
Kloroform	53	3,2

Az eredmények alapján elmondható, hogy az elvégzett összes vizsgálat alatt a hő-sokkal kezelt iszapban rendelkeztek a mikroorganizmusok a legmagasabb H₂ produktivitási rátával, illetve a kumulatív hidrogén termelés értéke szintén a hőkezelés esetén volt a legmagasabb. Ennek oka elsősorban az, hogy a hő-sokk képes volt hatékonyan elpusztítani a metanogén baktériumok nagy részét (Wang és Wan, 2008).

A hő-sokk kedvező hatása az oldható metabolitok szempontjából sem elhanyagolható. Az összes elvégzett vizsgálatban a hővel kezelt iszapban az oldható anyagok közül az ecetsav koncentrációja minden esetben alacsonyabb volt, mint a kontrol kísérletekben tapasztalható, emellett viszont a kumulatív H₂ termelés és a produktivitási ráta szintén ebben az esetben bizonyult a legmagasabbnak. Továbbá nem volt detektálható a

keletkező propionsav mennyisége, mely jelentősen képes csökkenteni az elérhető hidrogén hozamot (Wang és Wan, 2008).

Mohan és munkatársai hasonló eredményre jutottak, hiszen az általuk elvégzett kísérletsorozatban a hővel előkezelt iszap esetén tapasztalták a legmagasabb kumulatív hidrogéntermelés értékeket (Mohan, 2008).

Az előbbieken tárgyaltak alapján az a következtetés vonható le, hogy az alkalmazott különféle előkezelési módszerek közül a hővel történő kezelés (hő-sokk) egy széles körben alkalmazható, megbízható, továbbá jó hatékonyságot biztosító eljárás.

1.2.3 Fermentációs paraméterek szerepe a biohidrogén termelés során

A fermentatív H_2 termelés egy összetett folyamat, ennek következtében számos tényező befolyásolja, amelyek nagymértékben képesek megszabni az adott mikroba, mikrobakonzorcium anyagcseréjét, ezáltal a lejátszódó hidrogénképződés hozamát is. Ezen kulcsparaméterek közé tartozik, például a pH, a hőmérséklet, a H_2 parciális nyomása, a tápoldat összetétele, stb. (Wang, 2009).

Mint minden biotechnológiai eljárásnál, a biohidrogén előállításánál is nélkülözhetetlen azoknak a paraméterek a meghatározása, melyeket megfelelő módon szabályozva és optimális értékre állítva az adott rendszer minél nagyobb teljesítőképességgel működtethető.

Az optimális működési beállítások megtalálása gyakran igen költséges eljárás, továbbá igen nagyszámú kísérlet elvégzését indokolja. E probléma megoldására kísérlettervezésen alapuló optimalizálási módszerek használatosak. Az idő- és gazdasági tényezők jelentős korlátozottsága miatt az ilyen optimalizálási módszereknél célszerű arra törekedni, hogy egy adott probléma megoldása a lehető gazdaságosabban és a lehető legrövidebb idő alatt végrehajtható legyen. Tehát az optimális működés feltételeit lehetőleg minél kisebb számú beállítás mellett célszerű vizsgálni. Így a rendszerről kapható bemeneti-kimeneti kapcsolatokhoz jutunk hozzá, az ezekből nyert információk alapján pedig következtetni lehet a rendszer kívánt optimális beállításaira (Márkus, 2012).

Egy adott kísérlet során egy vagy több faktor szándékos megváltoztatását követően vizsgáljuk a megváltoztatás hatását, mely a kívánt célt jellemző válasz változón fi-

gyelhető meg. Az optimálisan megtervezett beállítások mellett minimális költség- és időráfordítással maximalizálni lehet a rendszerről nyerhető információk mennyiségét és ennek segítségével objektív konklúziókhoz lehet jutni (Bakonyi, 2012).

pH

A pH olyan tényező, melynek megfelelő beállítása rendkívül fontos a reaktor üzemeltetése szempontjából, hiszen nemcsak a hidrogenáz enzimek aktivitását befolyásolja, hanem egyben a sejtekben lejátszódó metabolikus folyamatokat is (Wang, 2009). A különböző mikroorganizmusokban végbemenő anyagcsere folyamatok megváltozását eredményezheti (*metabolic shift*¹), ha a kémhatás nem optimális, továbbá a pH-ban és hőfokban végbemenő egyidejű változás következtében az egész mikrobaflóra összetétele egyaránt jelentős mértékben megváltozhat. Ennek eredményeként a flórát alkotó törzsek egymáshoz viszonyított aránya módosul: míg egyes törzsek visszaszorulnak, mások ezzel szemben dominálni kezdenek (*population shift*²) (Bakonyi, 2012).

A szakirodalomban fellelhető adatok alapján az alkalmazott mikrobák sajátosságaitól függően, a pH optimuma a 4-7 közötti intervallumban mozog (Nath, 2004).

A gyakorlat azt mutatja, hogy a lebontó folyamatok során felhalmozódó köztitermékek (savak) hatására a pH értéke kisebb-nagyobb mértékben savas irányba tolódik el (Valdez, 2009).

Szubsztrátok

Az eredményes hidrogéntermelés megvalósításához nélkülözhetetlen valamilyen szénhidrátban gazdag alapanyag használata, hiszen az olyan hulladékok, amelyek csupán zsírokban és fehérjékben dúsak, nem alakíthatók át megfelelő hatékonysággal hidrogénné. Fermentatív H₂ termelésre a szubsztrátok már igen széles körét felhasználták, melyek közül a legelterjedtebbnek a glükóz, szacharóz és a keményítő bizonyult (Wang,

¹ metabolic shift: egy adott mikroorganizmus metabolikus folyamatai eltolódnak pl. a célkomponens(ek) termelése helyett nem kívánatos melléktermékek (jelen esetben pl. etanol, butanol, aceton, stb.) fermentációja felé.

² population shift: ha pl. a hidrogén termelő mikrobák helyét átveszik hidrogén fogyasztó társaik, vagyis változás következik be az egyes törzsek dominanciájában (Hawkes, 2002).

2009). Az elmúlt években azonban számos tanulmányban foglalkoztak a szerves hulladékok (mint a növényi biomassza, mezőgazdasági és ipari eredetű hulladékok) e célra történő szubsztrátként való felhasználásával (Kapdan, 2006).

Nitrogén

A nitrogén azon elemek egyike közé tartozik, amelyek a sejtek anyagában nagy mennyiségben fellelhetők, hiszen a sejt szaporodása szempontjából esszenciális vegyületnek számít (enzimek, nukleinsavak, fehérjék szintézise).

Megállapítható az a tény, hogy az ideális nitrogénforrások jelenléte nélkülözhetetlen a mikroorganizmusok megfelelő szaporodóképességének biztosításában, ez pedig hatással van a hidrogéntermelésre, mivel az előállított hidrogén ún. primer anyagcsere termék, vagyis keletkezése a sejtszaporodással, sejtnövekedéssel van egyensúlyban. Olyan esetben, amikor az adott alapanyag nitrogéntartalma nem kielégítő, szükség van kiegészítő “mesterséges” nitrogénforrás alkalmazására (pl. élesztőkivonat, ammónia, pepton, tripton stb) (Bakonyi, 2012).

Nyomelemek

Az eddig említett tényezőkön kívül egyéb nyomelemek, illetve fémionok (pl. Fe, Ni, Zn, Cu, Ca, B stb.) jelenléte is számottevő mértékben képes hatással lenni a mikroorganizmusok élettani folyamataira, ezen keresztül pedig képes befolyásolni azok H_2 termelő aktivitását. Hatásuk kétféle lehet: egyrészt abban az esetben, ha koncentrációjuk túl magas, toxikus hatást fejthetnek ki a baktériumokra, másrészt pedig „nyomnyi” mennyiségben való jelenlétük elengedhetetlenül szükséges a sejtek elfogadható katalitikus aktivitásának biztosításában (Bakonyi, 2012).

Az előbb említett nyomelemek közül leggyakrabban általában a Fe, Ni, S hatását vizsgálták, valószínűsíthetően azért, mert ezek azok a nélkülözhetetlen vegyületek, melyek kulcsfontosságú szerepet játszanak a hidrogenáz enzimek felépítésében (Liu, 2004).

2. Kísérleti rész

2.1 Felhasznált anyagok és módszerek

2.1.1 Az inokulum

Munkánk során inokulumként a Pálhalmi Agrospeciál Kft. biogáz üzemének anaerob rothasztójából származó mezofil biogáziszapot használtuk fel. A 2007-ben megnyílt üzemben, a cégnél keletkezett biomassza jellegű mezőgazdasági hulladék, állattartási hulladék, valamint jelentős mennyiségű regionálisan gyűjtött hulladék (konyhai, mezőgazdasági, élelmiszer-ipari) - környezetvédelmi szempontból megfelelő - feldolgozásával, biogázzá alakításával foglalkoznak. A biogáz termelése két 3500 m³-es fermentorban mezofil környezetben zajlik. A munkánkhoz felhasznált biogáziszap a 2-es fermentorból származott, mely működése során a másikkal szemben cellulóz alapú szubsztrátot is kap.

A mikrobakonzorciumok használatának egyik nagy előnye - a tiszta kultúrával szemben -, hogy nem szükséges a steril körülmények biztosítása, így a biohidrogén előállítás jóval gazdaságosabb. Mint az esetek nagy részében, a biogáz fermentorból származó iszapban a hidrogéntermelő baktériumokon kívül a metanogén törzsek is jelen vannak, melyek hidrogénfogyasztó tulajdonságuknak köszönhetően nemkívánatosnak minősülnek a rendszerben. Ebből kifolyólag, a metanogén törzseket valamilyen erre alkalmas módon eliminálni szükséges a reaktorból. Ezen mikroorganizmusok rendkívül érzékenyek a környezeti változásokra, többek között a hőmérséklet megváltozására, pH változásra stb. (Hallenbeck, 2009).

Szaporodásuk gátlásához és a lejátszódó biológiai folyamatok hatékonyságának növeléséhez az említett H₂ termelő törzsek megfelelő szelekciója volt szükséges kísérleteink során. A vizsgálatok alatt a hosszú távon szobahőmérsékleten „öregített” biogáziszapot különböző előkezelési módszereknek (hő-sokk, bázikus-, kémiai kezelés, levegőztetés) vetettük alá abból a célból, hogy kideríthessük, melyik eljárás bizonyul hatékonyabbnak H₂ előállítás szempontjából.

A metanogénnekkel szemben számos H_2 termelő mikroorganizmus rendelkezik azzal az előnnyel, hogy képes a számára kedvezőtlen körülmények között spórákat képezve sikeresen túlélni, majd e spórákból az ismét megfelelő körülmények beállása után, újra szaporodásnak indulni, s újra aktív anyagcserét folytatni.

2.1.2 A biogáziszap „öregítése”

A Pálhalmáról frissen begyűjtött anaerob iszapot zavartalan körülmények között szobahőmérsékleten néhány hétig állni hagytuk azzal a céllal, hogy felfedjük, az iszap „öregedése” képes-e javítani a H_2 termelékenységét.

Minden eltelt hét végén a biogáziszapot termikusan előkezelve biohidrogén fermentációt végeztünk 100 mL-es headspace palackokban, azonos kísérleti körülmények között: szubsztrátként keményítőt alkalmaztunk 5 g/L-es koncentrációban, a szükséges nyomelemeket élesztőkivonat hozzáadásával biztosítottuk, melyet 2 g/L-es koncentrációban használtunk. Előkezelésként az iszapot hő-sokkal kezeltük 75 °C-on, 30 percig. Az alkalmazott gáz-folyadék arány 1:1 volt, tehát 50 mL előkezelt iszapot mértünk be, továbbá a pH értékét minden esetben 6,5-re állítottuk, majd a palackokat gumiszeptummal történő lezárásuk előtt a gáz- és folyadék fázis anaerobbá tétele érdekében 2.5-ös tisztaságú (99,5 %) nitrogén gázzal buborékoltattuk át.

Az öregítési stratégia célja és a kísérletek során kapott eredmények az Eredmények címszó alatt kerül bővebben tárgyalásra.

2.1.3 A biogáziszap előkezelése

Az előző fejezetben tárgyalt módon előkondicionált („öregített”) iszapot vetettük alá különféle előkezelési technikákkal való vizsgálatoknak. Négy különböző előkezelési módszert: a hő-sokkot, bázikus-, kémiai előkezelést és levegőztetést alkalmaztunk a hidrogéntermelés szempontjából nem kedvező mikroorganizmusok kiszorítása és a biohidrogén hozam javítása érdekében. Az alkalmazott eljárások paraméterei a 3. táblázat-ban kerültek összefoglalásra.

3. táblázat Alkalmazott módszerek az iszap előkezelésére

	Hő-sokk	Bázikus	Levegőztetés	Kémiai
jellemző kondíció	75 °C	pH=11	levegő térfogat-árama: 10 L/h	2 g/L KNO ₃
időtartam	30 min	24 h	3 h	24 h

Bázikus előkezelés során a pH-t 24 órára NaOH hozzáadásával extrém lúgos tartományba (pH=11) toltuk el. Mivel a metanogén baktériumok kifejezetten érzékenyek a kémhatás megváltozására, így a hosszú ideig tartó szélsőséges pH könnyedén a pusztulásukat eredményezheti, míg a hidrogéntermelők az előzőekben említett spóráképzés révén képesek az előállt kedvezőtlen körülményeket túlélni.

A levegőztetési módszernél 3 órán keresztül 10 L/h térfogatáramú levegőt alkalmaztunk az iszap előkezeléseként. Mivel a metanogén baktériumok az obligát anaerobok csoportjába tartoznak, ezért már az oxigén nyomnyi mennyiségben fennálló jelenléte is toxikus számukra, ez alapján a levegőztetés egy hatékony előkezelési módszernek vélhető, mely könnyedén előidézheti a biogáziszapban való elhalásukat.

Kémiai előkezelés alkalmával olyan vegyület, vagy vegyületek alkalmazása volt szükséges, mely hatékonyan képes meggátolni a metanogének szaporodását. Előkísérletek alapján elmondható, hogy a KNO₃ 2 g/L-es koncentrációja már elégséges dózis ahhoz, hogy megfelelően kifejtsen hatását. Ennek fényében kísérleteink során 24 órán keresztül 2 g/L-es KNO₃ koncentrációt alkalmaztunk.

Korábbi kísérletek adataiból kiindulva megállapítható volt, hogy minimum 15-20 perces, 65 °C feletti (70-75 °C) hővel történő kezelés szükséges a metanogén mikroorganizmusok életkörülményeinek negatív irányba történő megváltoztatásához (Lankó, 2012). Az általunk végzett hőkezelés során 75 °C-ot alkalmaztunk 30 percen keresztül (3. ábra). Az előkezelési idő akkor vette kezdetét, mikor az inokulum felvette a megfelelő hőmérsékletet (előkezelt térfogattól függően 5-10 perc).

A 30 percen keresztül tartó kezelés alatt, a megfelelő hőmérsékleti homogenitás (hőeloszlatás) biztosítása érdekében 5 percenként szükséges volt az iszap megkeverése. A fél óra eltelte után az előkezelést „befagyasztottuk” az iszap folyó csapvíz alatt szoba hőmérsékletre való gyors visszahűtésével.

A hűtés azért volt szükséges, mert az iszap önmagában végbemenő lassú, kontrollálatlan módon történő visszahűlése további előkezelésnek minősült volna, bizonytalanságot okozva ezzel a mérési eredményekben.



3. ábra A hőkezelés során alkalmazott vízfürdős termosztát

Miután az előkezelési vizsgálatok ideje letelt, következett az egyes minták összeállítása, a pH beállítása, majd a fermentáció lebonyolítása.

A fermentáció megkezdése előtt a pH értékét 6,5-re állítottuk, a mintákat nagy tisztaságú, 99,5%-os nitrogén gázzal buborékoltattuk át, majd a headspace bioreaktorokat gumiszeptummal lezártuk.

Minden elvégzett 3. táblázat-ban található kísérleti kondícióit korábbi vizsgálatok, illetve szakirodalmi adatok alapján határoztunk meg (Lankó, 2012, Wang és Wan 2008).

2.1.4 Hidrogén fermentáció

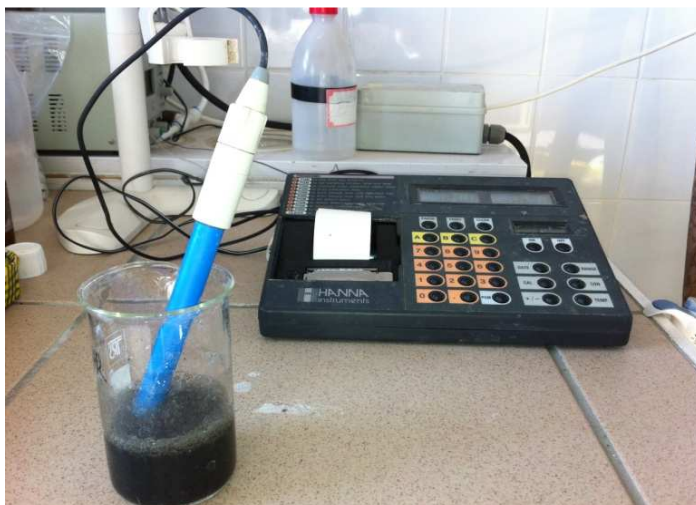
Vizsgálataink során minden esetben szakaszos fermentációt végeztünk 100 mL össtérfogatú úgynevezett headspace üvegekben, melyek gumiszeptum segítségével teljes mértékben légmentesen lezárhatók. Mielőtt az előkezelt iszapot az adott vizsgálat számára meghatározott térfogatban bemértük volna, a megfelelő szubsztrátok kimérése volt a feladat.

Szénforrásként (burgonya) keményítőt használtunk fel 5 g/L-es koncentrációban, kiegészítő nitrogén- és nyomelem forrásként pedig élesztőkivonatot alkalmaztunk 2 g/L-es koncentrációban az összes általunk végzett kísérlet lebonyolításánál. A használt koncentrációk előzőekben végzett kísérletek alapján állapítottuk meg (Lankó, 2012).

A minták összeállításánál a reaktoredényben megfelelő szintre állítottuk a folyadék térfogatot (előre meghatározott mennyiségű előkezelt biogáziszapot mértünk be).

A biogáziszapok pH-járól általánosságban elmondható, hogy az enyhén lúgos, 8-8,5 közötti értékeken belül változik (Bakonyi, 2012). Az általunk használt iszap kémhatása átlagosan 8,3-8,4 volt.

Szakirodalmi adatok alapján viszont, a hidrogéntermelő mikroflóra szaporodásának túlnyomórészt a savas környezet kedvez (Wang, 2009). Emiatt a minták pH-ját kiindulásnál H_2SO_4 cseppek segítségével 6,5-ös kezdeti értékre állítottuk (4. ábra).



4. ábra A pH beállítására szolgáló készülék és elektród

Egy további kísérletsorozatban a kémhatást is változtattuk pH hatásának tanulmányozása érdekében (2.1.5 fejezet).

Mivel a mikrobák által végrehajtott sötét fermentáció anaerob körülmények között zajlik, így szükség volt a folyadékfázisban, illetve gázfázisban jelen lévő oxigén eliminálására. Emiatt a kémhatás beállítása után, de még a fermentáció megkezdése előtt a bioreaktorok folyadék és gáz halmazállapotú fázisait egyaránt 5 percig 2.5-ös tisztaságú nitrogén gázzal öblítettük át (5. ábra), majd ennek végeztével gumiszeptummal lezártuk őket. Az előkezelés után a bioreaktorokat 24 órára 37 °C-on 150 rpm rázatási intenzitással rázó gépbe helyeztük (6. ábra).



5. ábra A minták N₂ gázzal történő anaerobbá tétele

2.1.5 A gáz-folyadék arány és a pH hatásának vizsgálata

A különböző gáz-folyadék arányok (g/f), illetve különböző pH értékek a biohidrogén előállítására gyakorolt hatásának vizsgálatához kísérlettervezésen alapuló módszert alkalmaztunk, melynek során e két befolyásoló tényező (faktor) egyszerre került változtatásra. A kísérletek alatt három pH értéket, valamint három g/f arányt vettünk alá vizsgálatnak, mindebből következik, hogy háromszintű, két faktoros, tehát 3^2 -típusú kísérleti tervet készítettünk, illetve valósítottunk meg. Az alkalmazott kilenc (3^2) különböző kísérleti beállítást és az ebből kapott eredmények tartalmazó 5. táblázat az Eredmények című fejezetben kerül részletezésre.

pH hatásának vizsgálata

A kezdeti pH hatásának vizsgálata érdekében három különböző tartományba eső kémhatás érték mellett vizsgáltuk meg a biogáziszapban jelenlévő mikroorganizmusok biohidrogén termelékenységét (mL H_2 /mL fermentlé).

Az elvégzett kísérletek során szintén a már említett (burgonya) keményítőt használtuk szénforrásként (5 g/L), nitrogénforrásként és nyomelemként pedig élesztőkivonatot alkalmaztunk (2 g/L). A biogáziszapon 75 °C-on, 30 percig végrehajtott hővel történő előkezelést követően összeállítottuk a mintákat a bioreaktorban, azt követően a minták kezdeti pH-ját 4,5-ös, 6,5-ös, illetve 8,5-ös értékre állítottuk.

Ezek után a reaktorokat nitrogénnel átbuborékolattuk (5 percig), szeptummal lezártuk, majd pedig rázógépbbe helyeztük őket 150 rpm-es intenzitással, a fermentáció végeztéig (24 órára).



6. ábra A minták rázatására és megfelelő hőmérsékleten tartására szolgáló készülék

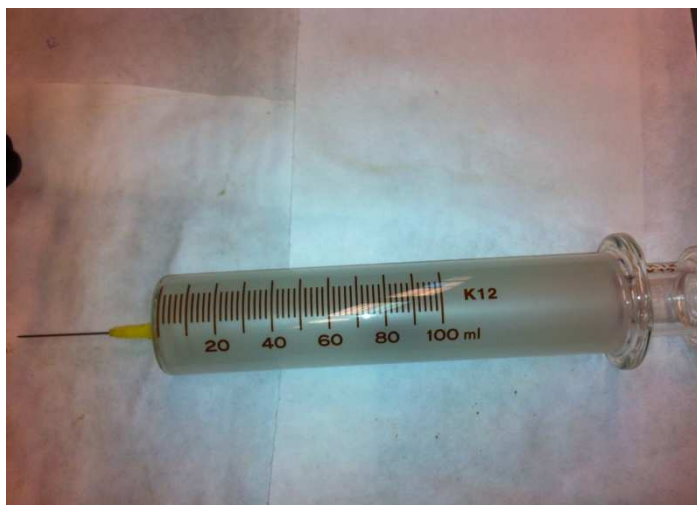
Gáz-folyadék arány hatásának vizsgálata

A g/f arány hatásának vizsgálata a kezdeti pH vizsgálatához hasonlóan három különböző érték mellett történt. Ez azt jelenti, hogy a pH vizsgálata során alkalmazott egy-egy különböző kémhatás értékhez egy-egy különböző g/f arány tartozott.

Tehát minden egyes pH értéknél egy 1:1-es (50 mL gáz és 50 mL folyadék), egy 1,85:1-es (65 mL gáz és 35 mL folyadék) és egy 3:1-es (75 mL gáz és 25 mL folyadék) gáz-folyadék arányt állítottunk be. Ezt követte a nitrogénes átbuborékoltatás, szeptummal történő lezárás, majd a minták rázó gépbe helyezésével a fermentáció (37 °C, 150 rpm, 24 óra).

2.1.6 Gázmintavétel és analízis

A minták rázó gépbe helyezése után, gyakorlatilag a fermentáció befejeztével csi-szolatos üvegfecskendő (7. ábra) segítségével megmértük a bioreaktorokban fejlődött biológiai eredetű gázok (CO₂ és H₂) térfogatát.



7. ábra A fermentáció során keletkezett biológiai eredetű gázok térfogatának meghatározásához használt üvegfecskendő

A gázelegy összetételét, vagyis CO_2 , H_2 és esetleges CH_4 tartalmát egy HP 5890 típusú gázkromatográf (10. ábra) segítségével határoztuk meg.

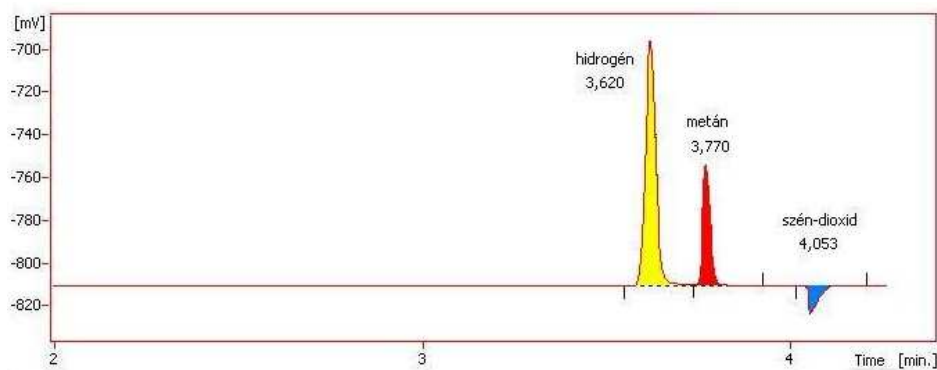
Az analízishez CarboPLOT kolonnát, nitrogén vivőgázt, illetve hővezetőképességi detektort (TCD) alkalmaztunk. Az általunk használt kolonna hossza 60 m, a belső átmérője 0,32 mm, a filmvastagság pedig 1,5 μm volt. A berendezés oszlopterének hőmérséklete 90 °C-ra, az injektor hőmérséklete 130 °C-ra, míg a detektor hőmérséklete 115 °C-ra volt állítva.



8. ábra A gázanalízishez alkalmazott Hamilton gázfecskendő

Mint ahogy az a gázanalízis eredményeként kapott kromatogrammon (9. ábra) is látható, a fermentáció során termelődött biohidrogén retenciós ideje 3,620 perc volt, a metán retenciós ideje 3,77 perc volt, míg a képződött szén-dioxid gáz retenciós ideje

4,053 perc volt. A CH₄ gáz az esetlegesen nem megfelelő előkezelés indikátoraként szerepel az ábrán.



9. ábra A gázanalízis eredményeként kapott kromatogram

A gázanalízis során kapott eredményekből kiszámoltuk a képződött H₂ kumulatív térfogatát (T=37 °C, p=1 atm állapotra vonatkozóan) a keletkezett biológiai eredetű gázok mennyiségének és hidrogén tartalmának figyelembe vételével, majd meghatároztuk a fajlagos hidrogén kihozatalt, melyet úgy kaptunk meg, hogy az összes termelődött hidrogéngáz mennyiségét 1 mL fermentlére vonatkoztattuk (mL H₂/mL fermentlé).

A számítás menetét a következő fejezetben részletezzük.

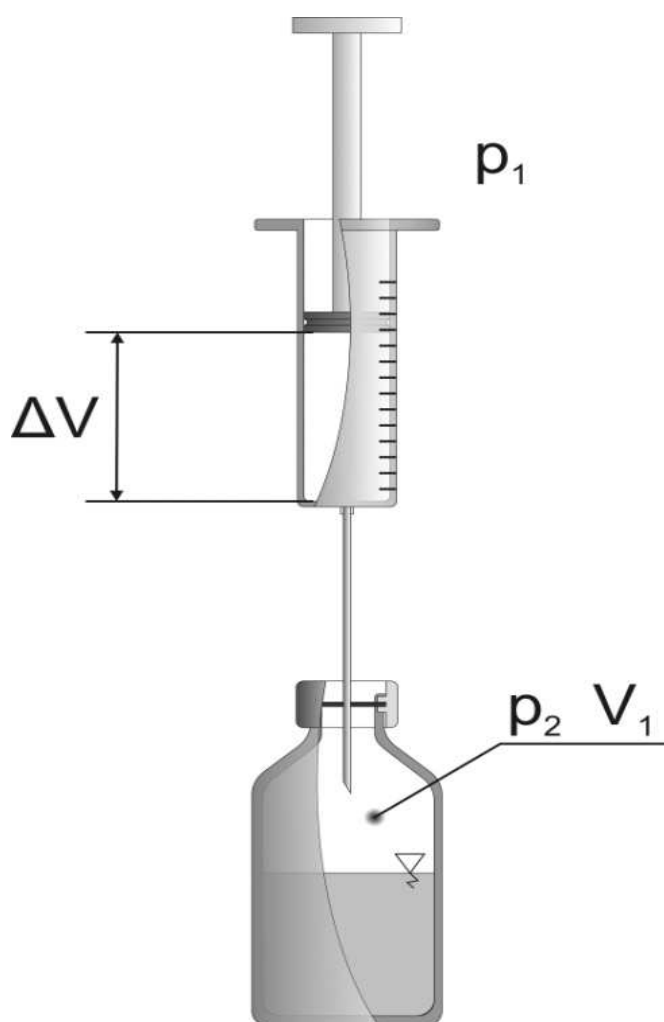


10. ábra A gázminták analíziséhez alkalmazott HP8590 típusú gázkromatográf

2.1.7 H_2 parciális nyomásának számítása

A számítások során feltételeztük, hogy a gáztérben a fermentációt követően a hidrogén, szén-dioxid és az anaerobizáláshoz alkalmazott nitrogén gáz van jelen számottevő mennyiségben (nyomgázok pl. H_2S jelenlétét elhanyagoltuk).

Első lépésként kiszámítottuk a zárt rendszerben mintavétel előtt uralkodó összes nyomást, tehát a rendszer végső nyomását (p_2), továbbá a zárt rendszerben jelen levő nitrogén parciális nyomását (p_{N_2}), melyek segítségével meghatároztuk a keletkezett biogáz (H_2+CO_2) parciális nyomását (p_g).



11. ábra A vizsgálatok során a képződött biológiai eredetű gázok mennyiségének meghatározásához alkalmazott technika

Mint ahogy említésre került, illetve az ábrán is látható:

- p_2 : a zárt rendszer teljes nyomása a mintavétel előtt (gázelegy összes nyomása)
- p_1 : az atmoszférikus nyomás (101 325 Pa-nak tekintve), illetve a zárt palack kezdeti nyomása is egyben a N_2 -vel történő átbuborékoltság után (szobahőmérsékleten)
- V_1 : a szabad gáz térfogat a reaktorban (gázfázis térfogata)
- ΔV : a fermentáció során keletkezett gáz térfogata (melyet 2.1.6. fejezetben említett s 7. ábrán látható üvegfecskendővel mértünk)

A felsorolt paraméterek közül ismertük a zárt palack kezdeti nyomását (p_1), a szabad gáz térfogatát a bioreaktorban (V_1), továbbá a fermentáció során keletkezett gáz térfogatát (ΔV). Kiszámítandó volt a zárt rendszer mintavétel előtti teljes nyomása (p_2), a zárt gáztérben jelen levő nitrogén parciális nyomása (p_{N_2}), a keletkezett biogáz (jelen esetben CO_2 és H_2) parciális nyomása (p_g), illetve a keletkezett biohidrogén parciális nyomása (p_{H_2}). A számítások elvégzéséhez az ideális gázok állapotegyenletére, valamint az abból levezethető Boyle-Mariotte (1. egyenlet), illetve Gay-Lussac törvényekre (3. egyenlet) volt szükségünk.

A Boyle-Mariotte törvény kimondja, hogy izoterm állapotban (jelent esetben 37 °C fermentációs hőmérsékleten) a gázok nyomásának és térfogatának szorzata állandó ($p_1 \cdot V_1 = p_2 \cdot V_2$). Ez alapján meghatározható a mintavétel előtt a gáztérben uralkodó összes nyomás (p_2), ha ismerjük p_1 , illetve V_1 értékét, továbbá a fermentáció végeztével megmérjük a keletkezett biogáz térfogatát (ΔV).

$$p_2 V_1 = p_1 (V_1 + \Delta V) \quad 1. \text{ egyenlet}$$

$$p_2 = p_1 \frac{(V_1 + \Delta V)}{V_1} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Miután megkaptuk a végső teljes nyomás értékét (p_2), a Gay-Lussac törvény segítségével kiszámítottuk a zárt gáztérben jelen levő N_2 parciális nyomását (p_{N_2}).

A Gay-Lussac törvény kimondja, hogy izochor feltételek között (állandó gáztérfogat esetén) a gázok nyomásának és hőmérsékletének hányadosa állandó ($\frac{p_1}{T_1} = \frac{p_2}{T_2}$).

A minták légmentes lezárása után a gáztérben csak a folyadék és gáz fázis anaerobba tétele érdekében bevezetett nitrogén volt jelen, amelynek nyomása megegyezett a légköri nyomással, hőmérséklete szobahőmérsékletű volt $T_1=20\text{ °C}$ (293 K). A fermentáció megkezdését követően viszont a hőmérséklet a termosztálás hatására $T_2=37\text{ °C}$ -ra (310 K) emelkedett, melynek következtében a nitrogén gáz nyomása p_{N_2} -re növekedett. Ez a nyomásnövekedés a termikus egyensúlyi állapot eléréséig folytatódott, amikor is a N_2 hőmérséklete elérte a fermentáció hőmérsékletét.

$$\frac{p_1}{T_1} = \frac{p_{N_2}}{T_2} \quad 3. \text{ egyenlet}$$

$$p_{N_2} = \frac{p_1}{T_1} T_2 \quad 4. \text{ egyenlet}$$

A gázelegy összes nyomásából (p_2) és a nitrogén parciális nyomásából (p_{N_2}) kiszámítható a keletkezett biogáz parciális nyomása (p_g) (5. egyenlet).

$$p_g = p_2 - p_{N_2} \quad 5. \text{ egyenlet}$$

Mivel a hidrogén és a szén-dioxid a sötét fermentáció során képződő fő gázanyagcsereterméknek számítanak, az egyéb gázok (pl. H_2S) a keletkezett biogáz parciális nyomásához (p_g) való hozzájárulása elhanyagolható, ezáltal p_g nyomása magában foglalja mind a hidrogén, mind pedig a szén-dioxid nyomását is egyaránt. Hogy a keletkezett biogáz parciális nyomásából (p_g) megkapjuk a hidrogén parciális nyomását (p_{H_2}), a 2.1.6. fejezetben taglalt GC segítségével végrehajtott gáztér analízis eredményét kell figyelembe venni. Következésképp, a keletkezett biohidrogén parciális nyomása (p_{H_2}) kiszámítható a biogáz parciális nyomás értékének, illetve a H_2 gázfázisbeli végső koncentrációjának (y_{H_2}) szorzataként (6. egyenlet).

$$p_{H_2} = p_g * y_{H_2} \quad 6. \text{ egyenlet}$$

Az előzőekben részletezett számításai módszer alkalmazását egy általunk végzett mérési pont alapján mutatjuk be (4. táblázat). Az említett kísérlet során a pH értéke 4,5 volt, az alkalmazott gáz-folyadék arány pedig 1:1. A következő táblázat a számítás eredményeként kapott értékeket szemlélteti.

4. táblázat A számítási módszer egy példán való levezetésének paraméterei és eredményei

V_1 (m ³)	ΔV (m ³)	p_2 (Pa)	p_{N_2} (Pa)	p_g (Pa)	y_{H_2} (%)	p_{H_2} (Pa)
$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	202 650	107 204	95 445	58,3	55 645

3. Eredmények és értékelésük

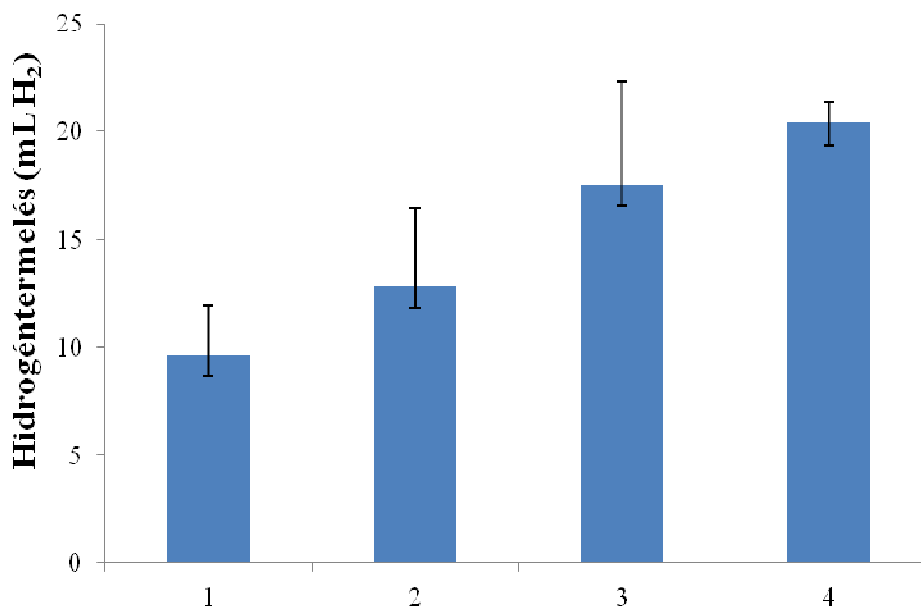
3.1 A mezofil anaerob biogáziszap „öregítésének” hatása a H₂ termelő aktivitásra

A biogáziszapot begyűjtését követően az esetek többségében rutinszerűen 4 °C-on tárolják az esetlegesen bekövetkező biológiai változások lassítása, illetve viszszaeszkálása érdekében.

Az általunk elvégzett kísérletek során azonban ez a lépés nem került megvalósításra, hiszen többek között azt is szeretnénk volna megvizsgálni, hogyan változik az idő múlásával az iszap hidrogéntermelő aktivitása. Ezért a kíváncsiságtól hajtva, a Pálhalmai Agrospeciál Kft. biogáz üzemének anaerob rothasztójából származó mezofil biogáziszapot szobahőmérsékleten tároltuk, hogy megvizsgáljuk ezen fajta „öregítés”, mint előkondicionáló módszer, milyen irányba tolja el a fermentáció eredményét, tehát hasznos, vagy kevésbé hasznos stratégiai alternatívának bizonyul-e a H₂ termelést illetően. Az így kapott eredményeket a 12. ábra szemlélteti.

Az ábrán látható eredmények összehasonlítása az átlagok és a szórások figyelembe vételével történt. Minden feltüntetett oszlop 5 párhuzamos mérés eredményét reprezentálja és a kapott eredmények matematikai átlagát szemlélteti 4 különböző vizsgált időpontnál.

Mivel az átlagok összehasonlításából való következtetés levonása nem mondható megbízható módszernek, ezért mérések szórását is tekintetbe kell venni. Ezeket az egyes oszlopokon feltüntettük, s az eredményeket ezen hibahatárok (95%-os konfidencia intervallum) figyelembevételével értékeltük ki.



12. ábra Az iszap előkondicionálásának eredményei a hidrogéntermelés szempontjából (1: kezdetben, 2: egy hét után, 3: két hét után, 4: három hét után)

A kiértékelés eredményeként elmondható, hogy szignifikáns különbség van az 1. és 3. illetve 2. és 4. oszlopban feltüntetett kísérletek eredményi között (ahol konfidencia intervallumok nem fednek át). Mindebből azt a következtést lehet levonni, hogy az anaerob iszap biohidrogén termelő aktivitása kéthetente spontán módon növekedett. Ezen megfigyelés több hipotézissel is magyarázható.

Egyrészt lehetséges, hogy az idő múlásával a biogáziszapban kezdetben jelen levő összetett tápanyagok hidrolízise, szolubilizációja nyomán több felhasználható szubsztrát állt a mikrobák rendelkezésére a hidrogén fermentációk során.

A megfigyelt viselkedés feltételezett magyarázata lehet továbbá az is, hogy ezen eltelt idő alatt megváltozott az iszapban található mikrobakonzorcium összetétele. Az anaerob kevert kultúrákban a lokális mikrokörnyezetekben lejátszódó időbeli pl. tápanyag koncentrációváltozások következtében a kultúra öregedése képes lehet megváltoztatni a különféle mikroba populációk dominanciáját.

Ismeretes, hogy bizonyos mikroorganizmusok (pl. metanogének) sokkal érzékenyebbek a környezeti változásokra, mint más mikrobák. A hidrogéntermelő törzsek viszonylag erőteljesebbek, robusztusabbak, ezen tulajdonságuk pedig az idő múlásával

dominánssá válásukat is eredményezheti a közegben, míg mások ezzel szemben nem képesek magukat hatékonyan fenntartani, így számuk csökkenésnek indulhat. Feltételezhető, hogy a szobahőmérsékleten való állás során a (hőkezelést tűrő) hidrogéntermelők feldúsultak (egyre dominánsabbá váltak) a közegben és így egyre nagyobb hidrogéntermelés vált elérhetővé.

Ahogy az a 12. ábra alapján kiderül, a biogáziszap kezdeti biohidrogén termelő aktivitása három hétig tartó kondicionálás után mintegy megduplázódott.

Ez azt jelenti, hogy egy ilyen „öregítési” stratégia egyfajta kezelési technikaként szolgálhat, hogy még hatékonyabb bakteriális konzorciumot lehessen nyerni a biológiai úton történő hidrogén előállításához.

A hipotézisek bizonyításához vizsgálni kellett volna az iszap diverzitásának változását melynek során hétről-hétre vizsgálunk kellett volna a mikrobakonzorciumban bekövetkezett változásokat is, e feladat elvégzésére azonban nem állt rendelkezésre a megfelelő technikai apparátus. Másrészt, a szerves anyagok hidrolízisének vizsgálata valószínűleg nyomon követhető lenne az oldott szerves anyag tartalom időbeni változásának mérésével, pl. oldott kémiai oxigén igény (KOI) tartalom méréseken keresztül, de a munkánk során ilyen vizsgálatokat idő hiányában egyenlőre nem folytattunk le.

Azt is szükséges megjegyezni, hogy az „öregítés” az eltérő forrásokból származó kevert kultúra viselkedésére, s így a hidrogéntermelési potenciálra vonatkozóan változatos képet is mutathat azok eltérő mikrobiológiai háttere miatt. Ezért, különböző eredetű kultúrákon végzett kísérletek feltárhatják, hogy az általunk megfigyelt trend kiindulási kultúra függő-e, ezt a jövőben érdemes lehet megvizsgálni.

Továbbá - bár a kísérletek három hét után történő leállítása miatt erre vonatkozó releváns információkat nem állt módunkban kinyerni - azt feltételeztük, hogy egy bizonyos, hosszabb idő eltelte után a kultúra „öregedése” már olyan mértékben következne be, hogy az a hidrogéntermelő baktériumok számára is kedvezőtlen lehet, populációjuk nagysága lecsökkenhet, hátrányosan befolyásolva ezzel az elérhető hidrogén hozamokat.

Következésképp elmondható, hogy egy ilyen stratégia esetleges alkalmazása során körültekintően kell eljárni, hogy segítsük a hasznos, hidrogéntermelő mikrobák minél hatékonyabb túlélését.

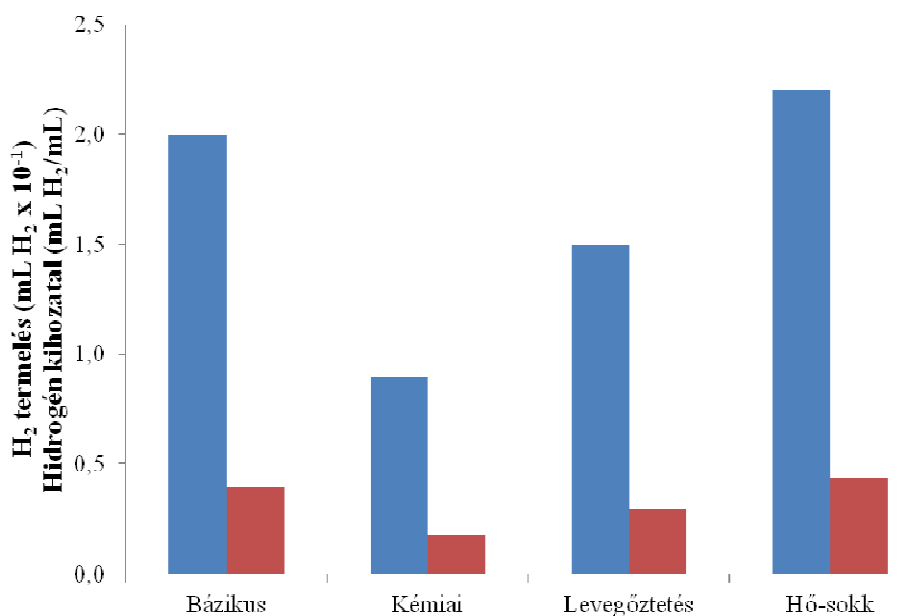
3.2 Az előkezelési módszerek H₂ termelésre gyakorolt hatása

A „öregített” iszapot különböző előkezelési módszereknek vetettük alá annak érdekében, hogy biohidrogén termelő képességét tovább fokozzuk.

Ahogy azt a 2.1.3 fejezetben jeleztük, az általunk végzett kísérletek során a prekondicionált biogáziszapon hő-sokkot (75 °C, 30 perc) alkalmaztunk előkezelésként. Mindazonáltal a cél az volt, hogy más technikákat is teszteljünk és azok segítségével felfedjük a legjobb módszert a konzorcium H₂ termelő teljesítményének maximalizálására.

Mivel a szakirodalom nem egyértelmű a hidrogéntermelők optimális dúsítási technikáját illetően, szükség volt egy eset-specifikus optimalizálásra, így tehát a különböző előkezelési módszerek kibővített skáláját próbáltuk ki a cél elérése érdekében. Ennek során, ahogy említésre került hő-sokkot, bázikus, kémiai illetve levegőztetéssel történő előkezelést alkalmaztunk a 3. táblázat-ban foglaltak szerint.

A 13. ábra a vizsgálatok során kapott kumulatív hidrogéntermelések értékeit ilusztrálja. Ezen ábrán az látható, hogy az összes hidrogéntermelés (kék oszlop), valamint a hidrogén kihozatal (piros oszlop) a különböző iszap előkezelési eljárásoknál a következő sorrendben változott: kémiai előkezelés < levegőztetés < bázikus előkezelés < hő-sokk.



13. ábra A különböző előkezelési módszerek hidrogénfejlődésre gyakorolt hatása (kék oszlop: H₂ termelés; piros oszlop: H₂ kihozatal)

Wang és Wan az általuk végzett tanulmányban hasonló következtetéseket vontak le, melyek szerint a különböző előkezelések közül a hő-sokk eredményezte a legmagasabb H₂ képződést, míg a legalacsonyabbat a kémiaileg előkezelt iszap produkálta (Wang és Wan, 2008). Egy másik munkában az ismételt levegőztetést találták a leghatékonyabb módszernek, majd ezt követte a hő-sokk és a bázikus kezelés (Ren, 2008). Ez a megállapítás ellentmondásban van az általunk kapott eredményekkel, hiszen a mi esetünkben mind a hővel történő kezelés, mind pedig a lúgos előkezelés képes volt jelentősen jobban „teljesíteni”, mint a levegőztetési módszer.

Feltételezésünk szerint az eltérés okának tulajdonítható többek között a kiindulási iszapforrások különbözősége, az előkezelési körülmények különbözősége (pl. időtartam, hőmérséklet stb.), illetve a fermentáció során használt szubsztrát minősége közötti különbség.

Ren és munkatársai például az alkalmazott hőkezelést 120 °C-on, 20 percig végezték, mi viszont csak 75 °C-ot alkalmaztunk 30 percen keresztül. Egy ilyen különbség jelentős eltéréshez vezethet hidrogéntermelés szempontjából, hiszen ahogy ez már meg-

fogalmazásra került Baghchehsaraee és munkatársai által: az alkalmazott hőmérséklet kulcsszerepet játszik az adott kultúra hatékonyságában (Baghchehsaraee, 2008).

Továbbá, mivel a biogáziszap forrásától függ az abban élő mikrobakonzorcium összetétele így különböző eredetű iszapok alkalmazásánál más és más tulajdonságú baktérium együttessel kell, hogy számoljunk, melyek előkezeléssel szembeni érzékenysége változatos képet mutathat.

Fontos figyelembe venni, hogy függetlenül a minták előkezelésére alkalmazott módszerektől, metánt egyik esetben sem sikerült kimutatnunk, ami azt bizonyítja, hogy mind a kémiai és bázikus kezelésnél, mind pedig a levegőztetéssel és hővel történő előkezelésnél egyaránt eredményes volt a hidrogéntermelő baktériumok szelekciója a metanogénekkal szemben.

3.3 A kezdeti pH és gáz-folyadék arány hatása a H₂ termelékenységre és a H₂ parciális nyomására

A sötét fermentációval történő hidrogéntermelésben a pH és a g/f arány meghatározó paramétereknek számítanak (Hassan, 2009).

Az általunk végzett vizsgálatban az előbb említésre került két faktor (kezdeti pH és g/f arány) hatását kerestük háromszintes kísérleti terv megközelítéssel. E módszer lehetővé teszi, hogy a vizsgálataink során kapott eredményeket matematikai statisztikai alapon értékelhessük ki, ezáltal segít abban, hogy megbízhatóbb következtetéseket tudjunk levonni a kapott kísérleti adatokból.

A vizsgálat során kezdetben különböző gáz-folyadék arányokat (g/f) és pH értékeket állítottunk be (5. táblázat), majd hatásuk feltárására a H₂ kihozatalt és a H₂ parciális nyomását, mint függő változókat választottuk.

Ez alatt a mérésorozatot a hővel történő előkezelést (75 °C, 30 perc) alkalmaztuk, hiszen ahogy azt a 12. ábra is mutatja, vizsgálataink során összességében ezt találtuk leghatékonyabb módszernek a négy közül.

A kísérleti mátrixot és a kapott eredményeket az 5. táblázat-ban foglaltuk össze.

5. táblázat A 3² kísérleti tervezési mátrix és a válaszváltozók

pH	Gáz mennyisége (ml)	Folyadék mennyisége (ml)	g/f	H ₂ termelékenység (ml H ₂ /ml)	p _{H2} (Pa)
4,5	50	50	1	0.58	55645
4,5	65	35	1.85	0.66	32620
4,5	75	25	3	0.97	29041
6,5	50	50	1	0.26	24878
6,5	65	35	1.85	0.23	11652
6,5	75	25	3	0.40	12231
8,5	50	50	1	0.11	10456
8,5	65	35	1.85	0.05	2024
8,5	75	25	3	0.28	8108

g/f: gáz-folyadék arány; p_{H2}: H₂ parciális nyomása

A statisztikai analízist és a kapott eredményekre, a megfelelő válaszfelületek illesztését a Statistica 8-nevű szoftverrel végeztük. A szoftver segítségével 2 faktoros, 3 szintes kísérleti tervet (3² kísérleti tervezési mátrixot) készítettünk, tehát 9 darab kísérleti beállítás mellett folytattuk le vizsgálatainkat.

A faktorok száma arról ad felvilágosítást, hány paraméter (bemeneti változó) hatását kívánjuk egyszerre vizsgálni, ami esetünkben a pH-t és a gáz-folyadék arányát jelentette.

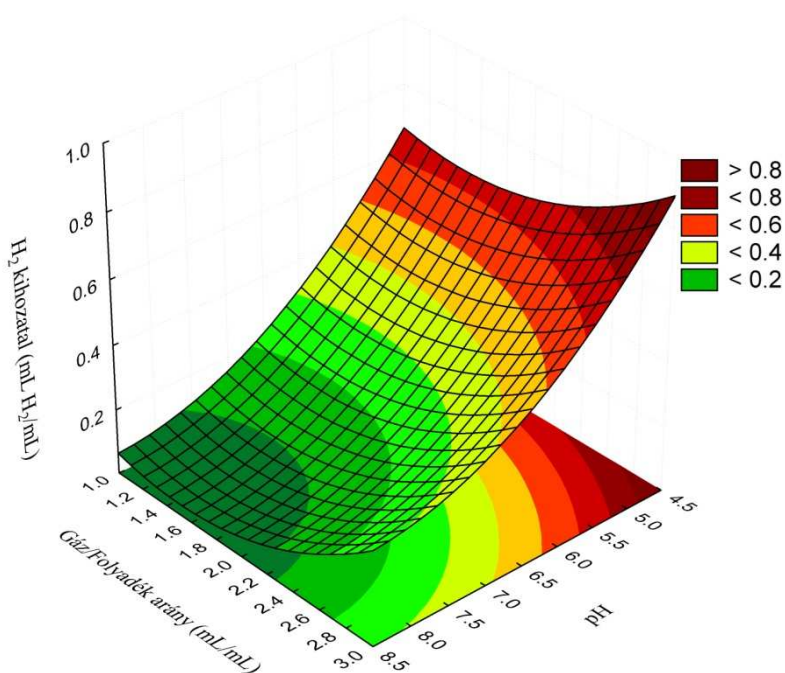
A kísérleti terv szintjeinek száma azt adja meg, hogy az egyes faktorokat hány különböző érték mellett áll szándékunkban megvizsgálni, esetünkben tehát ez három különböző pH-érték és három különböző gáz-folyadék arány beállítása mellett történt meg.

A Statistica 8 nevű programmal elvégzett statisztikai kiértékelés (ANOVA) eredményeit mindkét válaszváltozó esetében a 6. táblázat tartalmazza, míg az eredményekre illesztett válaszfelületek a 14. ábra és a 15. ábra által kerültek feltüntetésre.

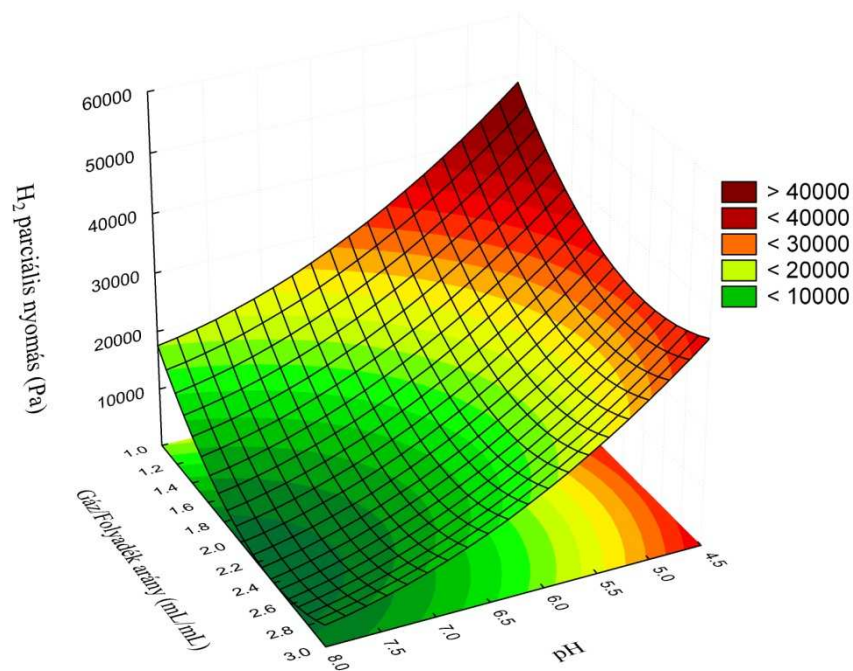
6. táblázat A három szintes kísérlettervezés statisztikai értékelése

Független változók	Függő változók	
	H ₂ kihozatal	H ₂ parciális nyomás
	szignifikancia érték (<i>p</i>)	
pH (L)	<0.001	0.003
pH(N)	0.053	0.197
g/f (L)	0.017	0.05
g/f (N)	0.09	0.108

L: lineáris hatás; N: négyzetes hatás



14. ábra Az illesztett válaszfelület, mely bemutatja a pH és g/f arány H₂ előállításra gyakorolt hatását



15. ábra Az illesztett válaszfelület, mely bemutatja a pH és g/f arány a fejlődő H_2 parciális nyomására gyakorolt hatását

A szignifikancia érték (p) megadja, hogy egy adott faktornak szignifikáns-e a hatása az adott válaszváltozóra nézve. Ha értéke kisebb vagy egyenlő, mint 0,05, szignifikáns a faktor(ok) hatása (tehát az nem a „véletlenből” adódik).

Ezek alapján tehát a 6. táblázat azt jelzi, hogy mind a pH, mind pedig a gáz-folyadék arány képes befolyásolni a H_2 kihozatait és a H_2 parciális nyomását is statisztikailag szignifikáns módon ($p \leq 0,05$).

Mint az a 14. ábra alapján elmondható, a hővel előkezelt mezofil biogáziszap hidrogéntermelő-képessége a kezdeti pH fokozatos csökkentésével javult, másrészt a gáz-folyadék arányának növekedése szintén magasabb $bioH_2$ kihozatait eredményezett. Ebből levonható az a következtetés, hogy minél nagyobb volt az alkalmazott gáztér a minta fölött (tehát minél nagyobb volt a keletkezett gáz számára rendelkezésre álló gáztér nagysága), annál hatékonyabb hidrogéntermelést figyelhettünk meg.

Továbbá a 15. ábra azt mutatja, hogy nagyobb hidrogén parciális nyomás alakult ki alacsonyabb kezdeti pH-értéknél és alacsonyabb gáz-folyadék arányok mellett.

Összegezve a két (14.-15.) ábra tartalmát megállapítható, hogy közvetlen kapcsolat van a hidrogén kihozatal és a hidrogén parciális nyomása között, mivel alacsonyabb H_2 parciális nyomás értékek mellett fokozott hidrogéntermelés volt megfigyelhető, ami arra enged következtetni, hogy a hidrogén parciális nyomásának növekedése a bioreaktorban gátolja az iszapban lévő mikroorganizmusok hidrogéntermelő képességét. Tehát minél nagyobb az általunk alkalmazott gáz-folyadék arány, a folyamat során képződő gáz annál nagyobb térfogatban lesz képes eloszlni, így a parciális nyomás értéke csökken, ennek következtében pedig az elérhető H_2 kihozatal magasabb lesz.

Ez a fajta viselkedés a Henry törvénnyel (7. egyenlet) való kapcsolat figyelembevételével magyarázható, amely szerint egy adott gáz parciális nyomása (az oldhatóságával együtt) képes meghatározni a folyadék fázisban oldott gáz mennyiségét:

$$p^G_i S_i = c^L_i \quad 7. \text{ egyenlet}$$

Ahol a p^G_i az i-edik gázkomponens parciális nyomását jelöli gázfázisban, S_i az i-edik gázkomponens oldhatósága folyadék fázisban, c^L_i pedig az i-edik gázkomponens koncentrációját adja meg szintén a folyadék fázisban.

A 7. egyenlet, azaz a Henry törvény alapján elmondható, hogy egy adott gáz parciális nyomásának növekedése növeli ugyanezen gáz folyadék fázisban oldott mennyiségét.

Az enzimatis reakciók széles körénél gyakori megfigyelés, hogy a különböző folyamatok során keletkező termék felhalmozódása egy bizonyos koncentráció elérése után képes korlátozni további produktum keletkezését.

A biohidrogén fermentáció esetében az (egyik) termék értelemszerűen a hidrogén, amely a folyadék fázisban termelődik. Ebben a folyadék fázisú biogáziszapban található hidrogéntermelő mikroorganizmusok tulajdonképpen úgy viselkednek, mint egész sejtes heterogén biokatalizátorok és fejtik ki metabolikus aktivitásukat. Minél több keletkező hidrogén halmozódik fel a folyadék fázisban, a fellépő inhibíció annál inkább visszafolytja a hidrogenáz enzimek aktivitását.

A H_2 relatív magas Henry állandójának (alacsony oldhatóságának) köszönhetően a keletkező hidrogén elsődlegesen a gázfázisba való lépést „preferálja”, ami nagyban függ az anyagátadási sebességtől és viszonyoktól a gáz és folyadék fázisok között.

Ezt a jelenséget alátámasztva, került megfigyelésre az úgynevezett „hidrogén túltelítettség” (*supersaturation*) jelensége, ami elsősorban a megfelelő gáz-folyadék fázis között lejátszódó anyagtranszfer fontosságát emeli ki. Ekkor a keletkező hidrogén gáz- és folyadék fázisok közötti eloszlása, vagyis a H_2 folyadék fázisbeli koncentrációja nem egyszerűen a Henry-törvény által meghatározott, mivel az anyagátadás a gáz- és folyadék fázis között nem megfelelő, s az oldott hidrogén koncentráció az elméleti érték többszöröse is lehet (Kraemer, 2006).

Továbbá úgy találták, hogy a mikroorganizmusok egy csoportja, nevezetesen a *Clostridiumok* nagyobb hatékonysággal képesek hidrogént termelni elegendően alacsony H_2 parciális nyomáson, amennyiben a termelés NADH oxidációjához csatoltan játszódik le bennük, melynek során a keletkező protonok molekuláris hidrogénné redukálása történik meg (Hallenbeck, Wang és Wan, 2009).

A H_2 parciális nyomás hatásaiból levont következtetések alapján feltételezhető, hogy az állandósult, folyamatos üzemű bioreaktorokban minél nagyobb g/f arány alkalmazása lehet szükséges a hidrogéntermelés hatékonyságának növelésében. A méret-növelés kérdését figyelembe véve azonban elmondható, hogy magasabb gáz-folyadék arányok megvalósítása nagyobb bioreaktor volument igényelne, tehát ez gazdasági megfontolásokból nem feltétlen célszerű.

A g/f arány csökkentése, illetve a keletkező hidrogén rendszerben való felhalmozódásának (parciális nyomás növekedésének) megakadályozása érdekében célravezető lehet félfolyamatos vagy folyamatos gázelvétellel működtetni a bioreaktorokat. Ez esetben a keletkező $bioH_2$ várhatóan jelentősen kisebb termékinhibíciót okozhat, hiszen folyamatosan eltávolításra kerül, így pedig nagyobb hidrogéntermelési teljesítmény elérése válik lehetővé (Bélafi-Bakó, 2006, Logan, 2002). A fermentációs folyamatok során keletkezett biológiai eredetű hidrogén folyamatos elválasztásának (extrakciójának) egyik lehetséges eszköze lehet a gáz szeparációs membránok alkalmazása (Bakonyi, 2013a,b).

4. Összefoglalás

Munkánk során a Pálhalmai Agrospeciál Kft. anaerob rothasztójából származó mezofil biogáziszap felhasználásával sötét fermentációs biohidrogén előállítását vizsgáltunk. „Nagyító alá” került az iszap „öregedésének”, továbbá a különböző előkezelési módszereknek a biohidrogén előállításának hatékonyságában játszott szerepe.

Kimutattuk, hogy az anaerob iszap előkondicionálása („öregítése”) eredményesen képes javítani az előkezelt beoltóiszap hidrogéntermelő hatékonyságát.

Megállapítást nyert továbbá, hogy a kísérleteink alatt tesztelt különböző iszap előkezelési módszerek közül a hő-sokk a leginkább megfelelő eljárás - egy kis előnnyel a bázikus kezelés előtt - a H_2 termelékenységi fokozása szempontjából.

A pH és a gáz-folyadék arányának hatását is megvizsgáltuk mint kritikus fermentációs paramétereket, majd arra a következtetésre jutottunk, hogy mindkét említett paraméter jelentős hatással bír a biohidrogén kihozatalra.

Végezetül igazoltuk, hogy a folyamatok során alkalmazott pH, illetve a gáz-folyadék arány jelentősen képes befolyásolni a fermentorban a keletkező hidrogén parciális nyomását, amely közvetlen kapcsolatot mutatott a hidrogén termelékenységgel, miszerint alacsonyabb pH, valamint magasabb gáz-folyadék arány (kisebb H_2 parciális nyomás) mellett a H_2 produktivitás jelentős mértékben növelhető.

Irodalomjegyzék

Arvelakis S, Koukios EG. Physicochemical upgrading of agroresidues as feedstocks for energy production via thermochemical conversion methods. *Biomass and Bioenergy* 2002,22:331-48.

Baghchehsaraee, Nakhla G, Karamanev D, Margaritis A, Reid G. The effect of heat pretreatment temperature on fermentative hydrogen production using mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008, 33:4064-73.

Bakonyi P. A biohidrogén *Escherichia coli*-val megvalósított előállításának és membrános szeparálásának vizsgálata. *Doktori (Ph.D.) értekezés*, Pannon Egyetem, 2012.

Bakonyi P, Kumar G, Nemestóthy N, Lin CY, Bélafi-Bakó K. Biohydrogen purification using a commercial polyimide membrane module: studying the effects of some process variables. *International Journal of Hydrogen Energy* 2013a,38:15092-99.

Bakonyi P, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K. Biohydrogen purification by membranes: An overview on the operational conditions affecting the performance of non-porous, polymeric and ionic liquid based gas separation membranes. *International Journal of Hydrogen Energy* 2013b,38:9673-87.

Bakonyi P, Simon V, Orlovits K, Borza B, Kumar G, Periyasamy S, Lin CY, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K. Biohydrogen production by aged anaerobic microflora under different operational circumstances and bacterial community response to various treatments. *Current Biochemical Engineering* (under review).

Balog K. Megújuló forrású energiával előállított hidrogén – az új gazdaság alapja. *Energiaellátás, energiatakarékosság világszerte (BME OMMIK)* 2005, 44:22-35.

Baranowski B, Zaginichenko S, Schur D, Shorokhod V. Carbon nanomaterials in clean energy hydrogen system. The Netherlands: Springer 2008.

Bélafi-Bakó K, Búcsú D, Pientka Z, Bálint B, Herbel Z, Kovács KL, Wessling M. Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 2006,31:1490-95.

Bíró-Hornok-Kevei-Kucsera-Maráz-Pesti-Szűcs-Vágvölgyi. *Általános mikrobiológia*. Budapest-Pécs: Dialóg Campus Kiadó 2001.

Böhringer, Löschelb A, Moslenerc U, Rutherfordd TF. EU climate policy up to 2020: An economic impact assessment. *Energy Economics* 2009,31:S295-S305.

Cheong, Hansen C. Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006,72:635-43.

Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrigen Energy* 2001,26:13-28.

Das D, Khanna N. Biohydrogen production by dark fermentation. *WIREs Energy and Environment* 2012.

Das D, Nath K. Biohydrogen production as a potencial energy resource - Present state of art. *Journal of Scientific & Industrial Research* 2004,63:729-38.

Demirbas A. Hydrogen-rich gases from biomass via pyrolysis and air-steam gasification. *Energy Sources Part A* 2009;31:1728-36.

Lee DH, Lee DJ. Hydrogen economy in Taiwan and biohidrogen. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008,33:1607-18.

Eroglu E, Melis A. Photobiological hydrogen production: Recent. *Bioresource Technology* 2011,102: 8403-13.

Hallenbeck PC. Fermentative hydrogen production: Principles, progress, and prognosis. *International Product of Hydrogen Energy* 2009,34:7379-89.

Hallenbeck PC, Ghosh D, Skonieczny MT, Yargeau V. Microbiological and engineering aspects of biohydrogen production. *Indian Journal of Microbiology* 2009,49:48-59.

Hassan M, Chong ML, Sabaratnam V, Shiraic Y. Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 2009,34:3277-87.

Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy. Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation. *International Journal of Hydrogen Energy* 2002,27:1339-47.

Hu B, Chen S. Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy* 2007,32:3266-73.

Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and Microbial Technology* 2006,38:569-82.

Kim DH, Han SK, Kim SH, Shin HS. Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technology* 2011,102:8423-31.

Kovács L. Az „élő” tömítés (LL) hatása az illékony szerves vegyületek emissziójára a Dunai Finomítóban. *Magyar Kémikusok Lapja* LXV. évf. 2010 november; 355-60.

Kraemer JT, Bagley DM. Supersaturation of dissolved H₂ and CO₂ during fermentative hydrogen production with N₂ sparging. *Biotechnology Letters* 2006,28:1485-91.

Krupp M, Widmann R. Biohydrogen production by dark fermentation: Experiences of continuous operation in large lab scale. *International Journal of Hydrogen Energy* 2009,34:4509-16.

Kumar G, Lin CY. Bio conversion of biodiesel solid residues to hydrogen and methane: influence of substrate concentration, temperature and pH. *Institute Journal Of Hydrogen Energy* 2013a,38:63-72.

Kumar G, Sen B, Lin CY. Pretreatment and hydrolysis methods for recovery of fermentable sugars from de-oiled Jatropha waste. *Bioresource Technolgy* 2013b,145:275-79.

Laczó F. A megújuló energiaforrások kézikönyve. Környezettudományi Központ 2008.

Laczó F. Bioüzemanyagok előállításának lehetőségei Magyarországon. Környezettudományi Központ 2008.

Lankó J. Termikusan előkezelt anaerob mikrobakonzorcium alkalmazása a biohidrogén előállítására. *Szakdolgozat*, Pannon Egyetem, 2012.

Levin DB, Pitt L, Love M. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *International Journal of Hydrogen Energy* 2004,2:173-85.

Li C, Fang H. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2007,37:1-39.

Lin CY, Lay CH. Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora. *International Journal of Hydrogen Energy* 2004,29:41-5.

Liszi J. Fizikai Kémia. Veszprém: Pannon Egyetemi Kiadó 1993.

Liu G, Shen J. Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004,98:41-5.

Logan BE, SE Oh, Kim IS, Ginkel SV. Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers. *Environmental Science & Technology* 2002,36:2530-35.

Manish S, Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008,33:279-86.

Márkus L. Kísérlettervezés – Az ipari kísérlettervezés statisztikai módszerei. www.math.elte.hu/probability/markus/DOE_Lecture_Actual1.ppt (2012. 02. 10.)

Mathews J, Wang G. Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production. *Int Journal of Hydrogen Energy* 2009,34:7404-16.

Mohan SV, Babu VL, Sarma PN. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology* 2008,99:59–67.

Nath K, Das D. Improvement of fermentative hydrogen production: various Approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004,65:520-29.

Ni M, Leung DY, Leung MKH, Sumathy K. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Processing Technology* 2006,87:461-72.

Ogino H, Miura T, Ishimi K, Seki M, Yoshida Y. Hydrogen production from glucose by anaerobes. *Biotechnology Progress* 2005,21:1786-88.

Ren NQ, Guo WQ, Wang XJ, Xiang WS, Liu BF, Wang XZ, Ding J, Chen ZB. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008,33:4318-24.

Simon V, Orlovits K, Borza B, Bakonyi P, Nemestóthy N. Biohidrogén fermentációs kísérletek mérési módszereinek összehasonlítása. *Membrántechnika és ipari biotechnológia* 2013,18-31.

Storm R. Hot House, Global Climate Change and the Human Condition. USA: Praxis Publishing 2007.

Szabó I. Hulladékelhelyezés. Miskolci Egyetemi Kiadó 1999.

Tamás J, Blaskó L. A biogáztermelés mikrobiológiája. In *Environmental management*. Debrecen: Debreceni Egyetem a TÁMOP 4.1.2 pályázat keretein belül 2008.

Tóth J. Biomassák hasznosítási lehetőségei. Gödöllő: Biomassza Termékpálya Szövetség 2012.

Tóth P, Bulla M, Nagy G. Energetika 2011.

Valdez IV, Poggi HM. Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2009,13:1000-13.

Vida G. Ökológiai folyamatok: fosszilis energia fogyasztása és az éghajlatváltozás. Magyar Tudományos Akadémia 2009. 11. 15.

Wang J, Wan W. Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy* 2008,33:2934-41.

Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* 2009,43:799-11.

Wu SY, Hung CH, Lin CN, Chen HW, Lee AS, Chang JS. Fermentative hydrogen production and bacterial community structure in high-rate anaerobic bioreactors containing silicone-immobilized and self-flocculated sludge. *Biotechnology and Bioengineering* 2006,93:934-46.

Yokoi H, Saitu A, Uchida H, Hirose J, Hayashi S, Takasaki Y. Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2011,91:58-63.

Zhang H, Bruns MA, Logan BE. Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research* 2006,40:728-34.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnénk köszönetet mondani témavezetőknek, Dr. Bakonyi Péternek, hogy figyelemmel kísérte munkánkat, és sok hasznos szakmai tanáccsal látott el annak elvégzése során, valamint hogy segítette jelen TDK dolgozat elkészítését.

Szeretnénk még köszönetet mondani Simon Veronikának gyakorlati segítségéért.

Köszönettel tartozok továbbá a Biomérnöki, Membrántechnológiai és Energetikai Kutató Intézet dolgozóinak, akik mindvégig segítették munkámat.

