

**Софийски университет „Св. Климент Охридски“**

**Биологически факултет  
Катедра „Обща и приложна хидробиология“**

**Нора Кирилова Динова**

**СТРАТЕГИИ ЗА ФУНКЦИОНАЛЕН КОНТРОЛ НА МЕТАНОГЕНЕЗАТА В  
КЛЮЧОВИ ТЕХНОЛОГИИ ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА БИОГАЗ**

**Автореферат**

На дисертация за присъждане на образователна и научна степен „доктор“  
Професионално направление  
4.3 Биологически науки  
(Хидробиология – Биологично водопречистване)

**Научни ръководители:  
проф. дбн Яна Топалова  
доц. д-р Ирина Шнайдер**

**София  
2019**

*Използвани съкращения:*

аеДХА – аеробна дехидрогеназна активност

аиДХА – анаеробна дехидрогеназна активност

БДС - български държавен стандарт

БР - биореактор

ИБТ – инсталация за биологично третиране

ИИХ-БАН – Институт по инженерна химия, Българска академия на науките

ИМ-БАН – Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН

ККТ – критични контролни точки

МТ – метантанк

ОП „СПТО“ – Общинско предприятие „Столично предприятие за третиране на отпадъци“

ОСВ – органично сухо вещество

ПСОВ – пречиствателна станция за отпадъчни води

СВ – сухо вещество

СЖП – странични животински продукти

СПСОВ – софийска пречиствателна станция за отпадъчни води

ТЕЦ – тополоелектро централа

ФА – индекс на фосфатазна активност

ХПК – химично потребление на кислород

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол

FISH - флуоресцентен *in situ* хибридизационен анализ

FOS/TAC - летливи мастни киселини/алкалност

INT - 2-(*p*-йодофенил)-3-(*p*-нитрофенил)-5-фенил тетразолиев хлорид

ISO - международна стандартизираща организация

PEST - анализ на политическите, икономическите, социалните и технически фактори

*p*NPP - *p*-нитрофенил фосфат

Рг. - белтък

SWOT - анализ на силните и слаби страни, възможностите и опасностите

TTC - 2,3,5-трифенил-тетразолиев хлорид

## **I. Увод**

В настоящите години на машабни производства и консумация, все повече назрява необходимостта за бърз преход от линейна към кръгова икономика, възстановяване на ресурси и производство на енергия от възобновяеми източници.

Градските пречиствателни станции за отпадъчни води играят ключова роля и имат потенциал за осъществяване на горепосочените цели. Включените в тях метантанкове, третиращи утайки, образувани в процеса на пречистване на отпадъчните води, са специални съоръжения, които при функционирането си обвързват цикъла на водата с този на отпадъците и генерирането на енергия.

Недостатъчното количество образувани утайки в пречиствателните станции за отпадъчни води на малките населени места прави преработването им в метантанкове неэффективно и води до прилагането на неблагоприятни методи като аеробно стабилизиране или изгаряне. Търсенето на решения за включване на допълнителни потоци органични отпадъци за съвместното им третиране с утайки в технологии за производство на биогаз би допринесло за постигане на енергийна ефективност.

Многостъпалността на процеса на анаеробна биодеградация, осъществяван в метантанковете, комплексността на микробното съобщество и акумулиращите се в утайките замърсители затрудняват контрола и управлението на този тип биотехнологии.

Търсенето на синергитични решения изисква обвързване на чистите технологии. Поради тази причина в настоящия дисертационен труд излязохме от рамката на водопречиствателните процеси и третирането на утайки, като изследванията бяха разширени и към други ключови реални технологии за производство на биогаз, преработващи различни типове органични отпадъци.

Специален иновационен елемент в изследването бе включването на ензимологични показатели (аеробна и анаеробна дехидрогеназна активност, индекс на фосфатазната активност) и флуоресцентни методи (анализ автофлуоресценцията на ко-фактор F<sub>420</sub> и флуоресцентен *in situ* хибридационен анализ) за контрол на технологиите за производство на биогаз. Изследването на метантанковете, третиращи утайки, бе задълбочено чрез определяне на ключови групи метаногени, представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс и натрупването на полифосфати.

На база на получените резултати, бяха предложени стратегии за функционален контрол на технологиите за производство на биогаз и за технологични решения от енергиен характер за малки населени места. Разработените стратегии ще се предложат на фирмите-потребители за ефективен контрол и управление на метаногенезата в реалните съоръжения и технологии.

## **II. Литературен обзор**

В литературния обзор вниманието е насочено към процеса на анаеробна биодеградация на органични отпадъци, като фокусът е върху метаногенезата. Разгледани са възможните суровини, използвани в технологиите за производство на биогаз, биомехимичните и микробиологични характеристики на анаеробната биодеградация, както и факторите, от които зависи ефективното осъществяване на процеса. Разисквани са разнообразните варианти на тези технологии, както и използваните към момента и потенциалните индикатори за техния контрол. Направен е кратък обзор на предишните изследвания по проблема в България.

### III. Цел и задачи

Целта на настоящия дисертационен труд е на фона на отдиференцирани **критични проблеми в технологиите за производство на биогаз** и анализ на технологични, химични, микробиологични, ензимологични и флуоресцентни показатели в ключови лабораторни, пилотни и индустриални технологии да се разработят **стратегии за функционален контрол на метаногенезата**.

Задача 1: Да се направи SWOT и PEST анализ на технологиите за производство на биогаз и да се отдиференцират критичните проблеми в тяхното функциониране.

Задача 2: Да се изследват технологични, химични, микробиологични, ензимологични и флуоресцентни показатели в метантанковете на СПСОВ „Кубратово“ през четирите годишни сезона.

Задача 3: Да се изследват технологични, химични, микробиологични, ензимологични и флуоресцентни показатели в технологии за производство на биогаз, използващи различни типове суровини.

Задача 4: Да се изследват ключови групи метаногенни микроорганизми, представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс (р. *Pseudomonas* и р. *Acinetobacter*) и натрупването на полифосфати в критични контролни точки по време и място в СПСОВ „Кубратово“.

Задача 5: Да се предложат стратегии за функционален контрол и повишаване ефективността и ефикасността на технологиите за производство на биогаз.

### IV. Материали и методи

#### 4.1. Работна хипотеза

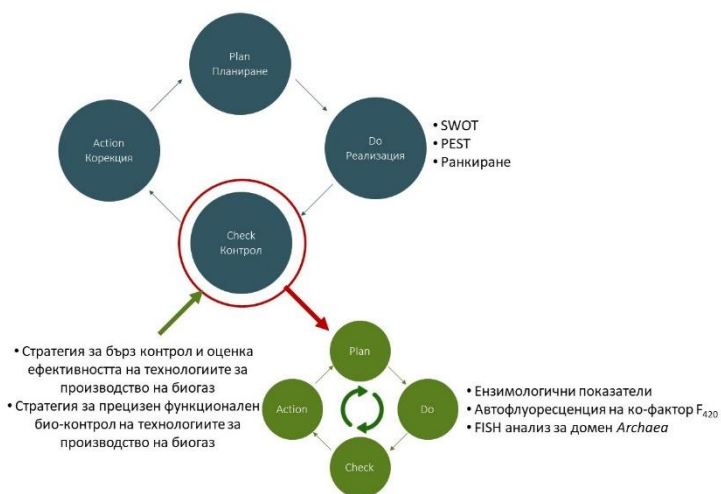
##### А. Биомениджърски фокус

При формиране на работната хипотеза имахме предвид два основни фокуса - биомениджърския поглед, базиран на основния закон на мениджмънта, който определя правилата за формиране на работещи стратегии и приложението на тези стратегии за подобряване на функционирането на изследваните технологии.

Основният закон на мениджмънта е цикълът на Деминг, който включва четири основни стъпки – планиране, реализация, проверка и корекция. Чрез приложението на подходи като SWOT, PEST анализ и ранкиране на проблеми на общия фон на технологиите за производство на биогаз бе направен анализ на външната и вътрешна среда и бяха открити **ключовите, критичните и приоритетни проблеми** в тяхното функциониране. Върху тези критични проблеми се концентрират усилията за разработване на алгоритми и стратегии за тяхното решаване.

Контролът е една от основните съставни части на управлението и е важен елемент от всяка биотехнология. Самият контрол на технологиите за производство на биогаз бе подложен също на цикъла на Деминг, като фокусът беше върху вътрешния контрол и бяха търсени най-преките неразшифровани и некомерсиализирани индикатори за функционирането на микробното съобщество. Търсени бяха параметри, даващи възможност да се навлезе по-дълбоко във функционалния контрол и да се направи обвързване между структурата и функцията на някои малко изследвани елементи. Такива са структурата на съобществата на домен *Archaea* и обвързването ѝ с крайния резултат на метаногенезата. Под тази структура се разбират две неща – количество (%-ен дял) и локализация в микробното съобщество, което дава информация за взаимоотношенията на археите. Тук едновременно се преплитат няколко неразделни компонента на функционирането: количество,

разположение, взаимоотношения на ключови групи микроорганизми в съобществата. Биомасата в метантанкове се идентифицира на три равнища: обща биомаса (субстрат и микроорганизми); процентно съотношение на микробната биомаса от общата биомаса; отдиференциране от общата микробна биомаса на ключови групи микроорганизми. Чрез принципите на биомениджмънта в комбинация с елементи на микробиологията, молекулярната биология и екологичната биотехнология, се търсеха работещи механизми за функционален контрол на технологиите за производство на биогаз, които да бъдат обобщени, верифицирани и предложени под формата на биостратегии. Стратегиите за контрол включват специфичните индикатори и индикаторни връзки, критични контролни точки по време, място и показател. Тук се отнася и обратният контрол, който дава възможност технологията да се коригира, в зависимост от крайния резултат и ефективност (Фиг.4.1).



Фиг. 4.1 Работна хипотеза /А/

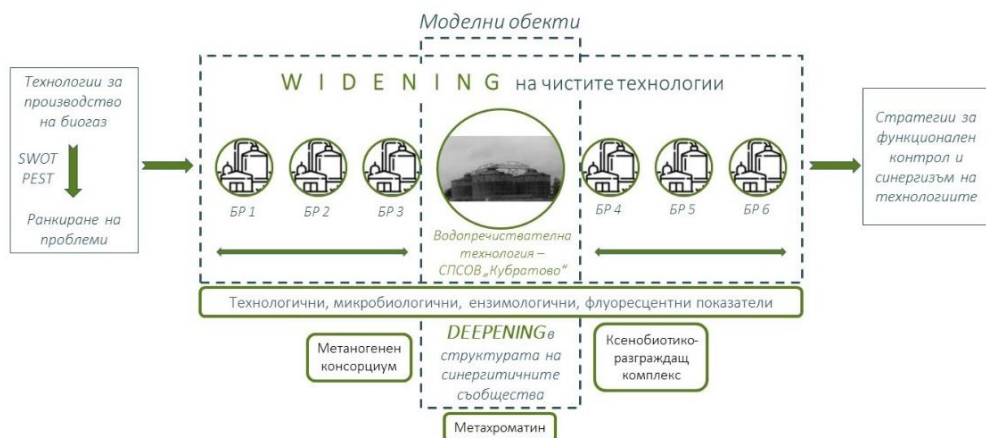
## Б/ Биотехнологичен фокус с акцент функционален контрол на производството на биогаз

Анаеробната биодеградация, като процес, на който се базират много от технологиите за стабилизирани на отпадъците /излишни активни утайки, селскостопански отпадъци, хранителни отпадъци и др./, води не само до намаляване на масата и обема им, но и до производство на ценни продукти като биогаз и почвен подобрител. Ключов момент при пречистването на отпадъчните води е оползотворяването на утайките, което е както екологичен, така и икономически проблем, тъй като представлява един от основните разходи във всяка пречиствателна станция за отпадъчни води.

Често срещани проблеми в съществуващите технологии за производство на биогаз са **неефективно осъществяване на метаногенезата и/или производство на биогаз с ниско качество**. Работната хипотеза на настоящия дисертационен труд се базира на схващането, че за повишаване ефективността и ефикасността на технологиите е необходимо въвеждане на системи за контрол, фокусирани върху **структурата и функционирането на метаногенните съобщества** (Фиг. 4.2). Поради тази причина дисертацията е насочена към разработване на **стратегии за функционален контрол на метаногенезата**. Основен

моделен обект за анализ на метаногенезата е **реално съществуващата технология за производство на биогаз** чрез стабилизиране на излишните утайки към СПСОВ „Кубратово“, част от „Софийска вода“ АД, изследвана през четирите годишни сезона. Кръговата икономика изисква **обвързване на чистите технологии** и с **цел разширяване на кръгозора в хоризонтала (Widening)** с оглед на друг тип технологии за производство на биогаз и търсене на **синергизъм между тези технологии**, бяха изследвани още шест варианта на реално съществуващи технологии, използващи различни суровини. Първоначалното конструиране на стратегиите се осъществи в технологията към СПСОВ „Кубратово“, а верифицирането им - в останалите шест технологии. Стратегиите за контрол включват подбор на критични контролни точки по място, време и показател в метантанковете. В тях са изследвани ключови за метаногенезата индикатори по стандартизирани и/или вътрешно-лабораторни методи, съгласно принципите на тоталното управление на качеството. Анализите включват използвани до момента **технологични показатели**. **Специален иновационен елемент са ензимологичните показатели**, съчетани с **флуоресцентни методи**. Изследвани са възможностите за синергизъм на технологиите и третирането на комбинация от суровини с цел създаване на хибридни технологии и производство на повече биогаз с по-добро качество.

За опознаване структурата на съобществата в метантанковете и **нивата на синергизъм на микроорганизмите** бе необходимо **задълбочаване на изследванията във вертикала (Deepening)**, за която цел като моделен обект бе използвана технологията към СПСОВ „Кубратово“. Чрез флуоресцентен *in situ* хибридизационен анализ са изследвани **представители на основните трофични групи метаногенни микроорганизми** (*Methanosaeta sp.*, *Methanosarcina sp.*, *Methanobacteriaceae*), **ключови представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс** (*Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*), **количеството натрупан метахроматин** в метантанковете с използването на епифлуоресцентен микроскоп и на микроорганизмите от домен *Archaea* в дълбочина чрез използването на конфокален лазерен сканиращ микроскоп.



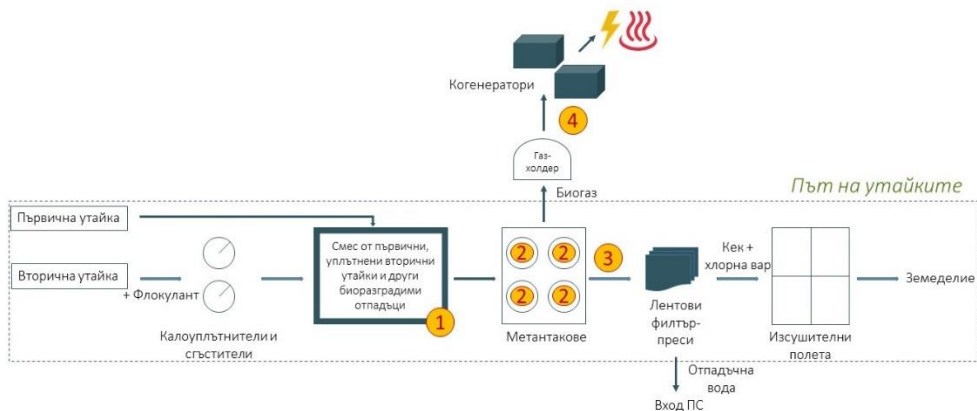
Фиг. 4.2 Работна хипотеза /Б/

#### 4.2. Моделни, изследвани технологии за производство на биогаз и контролни точки по време, място и показател

В настоящия дисертационен труд като модели бяха включени реални индустриални (*full-scale*), пилотни (*pilot-scale*) и лабораторни (*lab-scale*) технологии за производство на биогаз. Тук е мястото да посочим, че в нашата разработка не сме си поставили за цел да разработваме или да моделираме технология. Концентрирането на усилията ни беше на фона на вече съществуващи технологии да разработим и адаптираме стратегии за функционален контрол, което в дългосрочен план да се отрази на повишаването на ефективността и ефикасността на съществуващите технологии.

- **Технология за производство на биогаз в СПСОВ „Кубратово“** - СПСОВ „Кубратово“ оперира четири метантанка (MT1, MT2, MT3, MT4), всеки с обем от 7000 m<sup>3</sup>, които работят в мезофилен режим и използват за основна суровина първичните и вторични утайки, образувани в процеса на пречистване на отпадъчните води на гр. София.

Изследвани са проби на вход на MT, в самите MT (където се очаква процесът на метаногенеза да е в най-активна фаза), на изход от MT, както и продукцията и качеството на биогаза (Фиг. 4.3). Контролните точки по време за СПСОВ „Кубратово“ бяха подбрани в средата на всеки от годишните сезони (юли 2017 г., октомври 2017 г., януари 2018 г., април 2018 г.), така че микробните консорциуми да бъдат адаптирани към условията на околната среда и стационарното състояние да бъде установено.



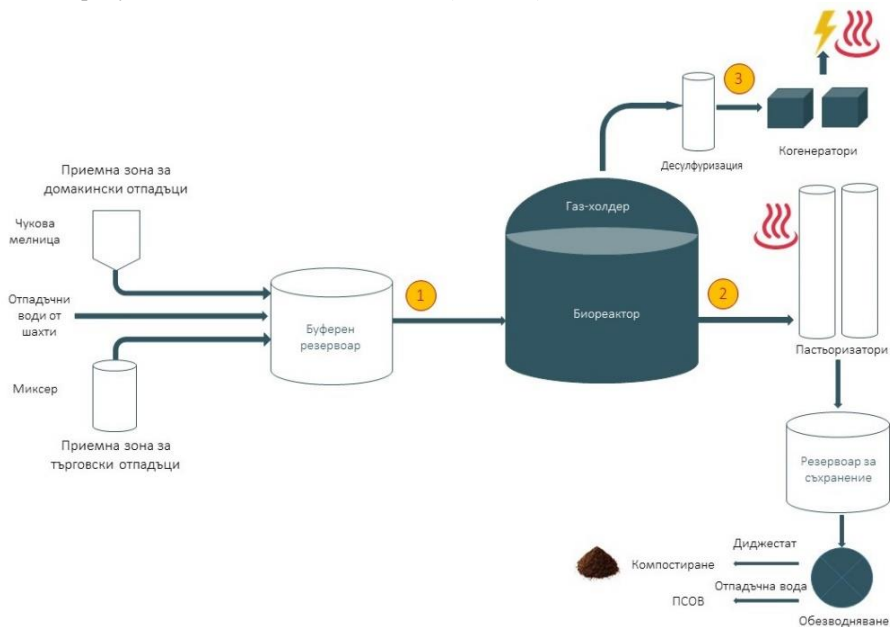
Фиг. 4.3 Контролни точки по място в СПСОВ „Кубратово“

- **Технологична линия за преработка на хранителни биоотпадъци с производство на биогаз и компост - ИБТ „Хан Богров“**, част от ОП „СПТО“

В тази технологична линия се третираят разделно събраните хранителни отпадъци на гр. София. Предварително третираните отпадъци преминават към зона за анаеробно разграждане, която е с непрекъснат режим на работа. Три различни потока влизат в буферния резервоар: 1/ суспензия от домакински хранителни биоотпадъци; 2/ суспензия от търговски хранителни биоотпадъци; 3/ вода от шахтите в приемна зона. Буферният резервоар играе ролята на осреднител, в който протичат и първите две фази на анаеробна биодegradация. Разграждането след това продължава в биореактор (БР1), в който се

осъществява същинската метаногенеза. В него се поддържа рН=6-8, анаеробни условия и температура около 37<sup>0</sup>С. Биореакторът има газ-холдер с двойна мембрана.

Изследвана е проба от изхода на буферния резервоар, явяващ се осреднител на входящия отпадък и в който протичат процесите на ферментация, от изхода на метантанка, както и продукцията и качеството на биогаз (Фиг. 4.4).



Фиг. 4.4 Контролни точки по място в ИБТ „Хан Богров“

- **Лабораторен биореактор - ИМ-БАН със субстрат пшенична слама (БР2)**

Лабораторният биореактор работи в мезофилен режим при температура 34<sup>0</sup>С±1-2<sup>0</sup>С и е с 3 l работен и 5 l полезен обем. Субстратът пшенична слама е преминал през химично предтретиране с амонячна вода и полиетилен гликол с цел повишаване разградимостта на лигнинна.

- **Лабораторен биореактор със субстрат царевичак - ИМ-БАН (БР3)**

Лабораторният биореактор работи в мезофилен режим при температура 34<sup>0</sup>С±1-2<sup>0</sup>С и е с 3 l работен и 5 l полезен обем. Субстратът царевичак е предварително изсушен и преминал през механично предтретиране чрез смилане, след което е разтворен в дестилирана вода с концентрация на разтвора 10 g/l царевичак.

- **Пилотен биореактор със субстрат царевичак – ИМ-БАН (БР4)**

Пилотният биореактор работи в термофилен режим при температура 55<sup>0</sup>С±1<sup>0</sup>С и е с 14 l работен и 20 l полезен обем. Субстратът царевичак е предварително изсушен и преминал през механично предтретиране чрез смилане, след което е разтворен в дестилирана вода с концентрация на разтвора 2.5 g/l царевичак.



- **Лабораторен биореактор със смесен субстрат от иглолистен материал, отпадъчно кафе и оборски тор - Институт по инженерна химия, БАН (ИИХ-БАН) (БР5)**

Лабораторният реактор е с обем 500 ml и работи в мезофилен режим при температура  $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , която се поддържа на водна баня. Субстратът се състои от 300 g оборски тор (предтретиран 1 час с електричен ток), 8 g иглолистен материал (предтретиран със 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  чрез киселинна хидролиза в автоклав за 20 min/ $121^{\circ}\text{C}$ ) и 4 g отпадъчно кафе. Към него не се добавя допълнително биомаса, а се разчита на естествено съдържащата се в оборския тор.

- **Лабораторен биореактор със смесен субстрат от иглолистен материал, оборски тор и глицерол –ИИХ-БАН (БР6)**

Лабораторният реактор е с обем 500 ml и работи в мезофилен режим при  $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , която се поддържа на водна баня. Субстратът се състои от 300 g оборски тор (предтретиран 1 час с електричен ток), 8 g иглолистен материал (предтретиран със 100 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  чрез киселинна хидролиза в автоклав за 20 min/ $121^{\circ}\text{C}$ ) и 4 g глицерол. Към него не се добавя допълнително биомаса, а се разчита на естествено съдържащата се в оборския тор.

Пробите за БР 2, 3 и 4 са взети от вътрешността на реакторите в края на процеса и е направен анализ на субстратите, с които са запазвани, както и на продукцията и качеството на биогаза. Пробовземането от БР 5 и 6 е от вътрешността им в края на процеса и е измерено количеството произведен биогаз. Пробовземането от ИБТ „Хан Богров“ е направено през октомври месец, когато количествата входящ хранителен отпадък са достигнали своя оптимум след снижаването им през летните месеци.

*Пробите, изследвани в настоящия дисертационен труд и информация за технологичните показатели на процесите, бяха любезно предоставени от следните партньори: за МТ на СПСОВ „Кубратово“ - от екипа на г-н Желяз Рангелов - Стариши мениджър на Софийска пречиствателна станция за отпадъчни води, „Софийска вода“ АД; за БР1 - от мениджърския екип на ОП „СПТО“ и Виктор Атанасов – заместник-ръководител ИБТ „Хан Богров“; за БР2, 3 и 4 - от екипа на доц. д-р Иван Симеонов, доц. д-р Денчо Денчев и гл.ас. д-р Венелин Хубенов от ИМ-БАН; за БР5 и 6 - от екипа на проф. д-н Венко Бешиков от ИИХ-БАН. Изказваме най-искрени благодарности на всички партньори за съдействието и че допринесоха този дисертационен труд да стане факт.*

#### **4.3. Изследвани показатели за контрол и методи за тяхното определяне**

При изследванията е приложен интердисциплинарен подход и са използвани хидрохимични, микробиологични, кинетични и ензимологични показатели. Методите, по които са определени съответните показатели са базирани на БДС, АРНА, ISO стандартите, както и на специфични методи (Табл. 4.1).

*Флуоресцентните методи бяха разработени в лабораторията по „Екологична биотехнология и биологично водопречистване“ с помощта на гл. ас. д-р Михаела Белухова. Олигонуклеотидните сонди бяха любезно предоставени от доц. д-р Стоян Чакъров. Флуоресцентните изображения бяха заснети със съдействието на доц. д-р Илиана Иванова и доц. д-р Милена Мурджева.*

#### **4.4. Обработка на резултатите**

Обработката на данните за всички изследвани показатели и изчисляването на коефициента на Пиърсън е направено чрез софтуерен продукт MS Office Excel 2013. Стандартните отклонения са определени най-малко от три независими повторения. Програмата за обработка на снимките *daime* също съдържа в себе си елементи за статистическа достоверност. За получаване резултатите от FISH анализа бяха обработени с

програмата *daime* общо 494 флуоресцентни снимки, а за анализа на ко-фактор F<sub>420</sub> – 232 флуоресцентни снимки.

Табл.4.1 Изследвани показатели и методи за тяхното определяне

Показател	Метод	
Температура, °C	Данните бяха любезно предоставени от операторите на съответните технологии за производство на биогаз	
Времетрае, дни		
Продукция на биогаз, m <sup>3</sup> /day		
CH <sub>4</sub> , %		
FOS/TAC		
Специфична продукция на биогаз, m <sup>3</sup> /kgDM/day	-	
ХПК, mgO <sub>2</sub> /l	Бихроматен метод по БДС 17.1.4.02-77	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , mg/l	Спектрофотометричен метод по БДС ISO 7150/1	
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , mg/l	Спектрофотометричен метод по БДС EN 1189	
СВ, g/g	Тегловен метод по БДС EN 15934	
ОСВ, %	Тегловен метод по БДС EN 15935	
ХПК:N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> :P- PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-	
ХПК:N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	
Белтък, g/g	Спектрофотометричен метод по Кочетов (1980)	
aeДХА, μMН <sup>+</sup> /min.gPr/gDM	Спектрофотометричен метод с 2,3,5-трифенил-тетразолиев хлорид по Gabbita & Huang (1984)	
anДХА, μMН <sup>+</sup> /min.gPr/gDM	Спектрофотометричен метод с 2-(p-йодофенил)-3-(p-нитрофенил)-5-фенил тетразолиев хлорид по Lenhard (1964)	
ФА, μMрNPP/min/.gPr/gDM	Спектрофотометричен метод с p-нитрофенил фосфат по Matavuly et al. (2001)	
Среден интензитет на флуоресценция	Микроскопски анализ на база автофлуоресценцията на ко-фактор F <sub>420</sub> и компютърна обработка през софтуер <i>daime</i>	
Площ на флуоресцентните обекти		
Среден размер/брой кълстери		
Количество и локализация на домен <i>Archaea</i>	FISH анализ по модификация на Nielsen (2009) и компютърна обработка през софтуер <i>daime</i> . Използвани са следните олигонуклеотидни сонди:	
Количество и локализация на р. <i>Methanosaeta</i>		- ARC915 – за домен <i>Archaea</i>
Количество и локализация на р. <i>Methanosarcina</i>		- MB1174 – за сем. <i>Methanobacteriaceae</i>
Количество и локализация на сем. <i>Methanobacteriaceae</i>		- MX825 – за р. <i>Methanosaeta</i>
Количество и локализация на р. <i>Acinetobacter</i>		- MS821 – за р. <i>Methanosarcina</i>
Количество и локализация на р. <i>Pseudomonas</i>		- ACA652 – за р. <i>Acinetobacter</i>
Количество и локализация на р. <i>Pseudomonas</i>		- Ps – за р. <i>Pseudomonas</i>
Натрупване на полифосфати	Микроскопски анализ след оцветяване с DAPI и компютърна обработка със софтуери Gimp и <i>daime</i>	

## V. Резултати и обсъждане

### 1. SWOT и PEST анализ на технологиите за производство на биогаз и отдиференциране на ключови проблеми

Подобряването на качеството и повишаването на ефективността на биотехнологиите изисква предварителен анализ на външната и вътрешната среда и набелязване на

приоритетите. На общия фон на технологиите за производство на биогаз бяха приложени биомениджърски подходи, каквито са SWOT и PEST анализа и ранкирането на проблеми.

**Обобщение на SWOT анализа:** Най-важната силна страна на този тип технологии е, че това е основа за устойчиво управление на органичните отпадъци и в същото време най-екологично благоприятната технология за производство на биоенергия. Слабите страни, свързани с ефективността и ефикасността на процеса, са липса на експресна система за контрол, липса на контрол на биологичната система, осъществяваща процеса и липса на индикатори, прогнозиращи бъдещ проблем в системата. Друг важен момент е необходимостта от търсене на решения за синергизъм на технологиите и съвместно третиране на различни суровини, особено в малки населени места. Има редица възможности, които могат да допринесат за понижаване на тези слаби страни и избягване на опасностите (Табл. 5.1).

**Обобщение на PEST анализа:** Разглеждайки икономическите и технически фактори, оказващи влияние върху технологиите за производство на биогаз, най-голямо значение има това, че съществуват големи количества ресурси (органични отпадъци) за тези технологии и че има добра основа за инвестиции и иновации в сектора за нови системи за контрол, методи за предтретиране и съвместно оползотворяване на различни типове биоотпадъци. Съществува солидна правна рамка върху този тип технологии и възможностите за използване на получените от нея ценни продукти.

Взимайки предвид резултатите от SWOT и PEST анализа, проблемите в технологиите за производство на биогаз могат да бъдат ранкирани, основавайки се на няколко типа индикатори: 1/ индикатори, засягащи самия процес; 2/ индикатори, засягащи степента на научно развитие; 3/ индикатори, засягащи регионалното развитие.

Фокусирайки се върху вътрешния контрол на технологиите за производство на биогаз, комплексността на метаногенния консорциум, продукцията на метан, прогреса в научните изследвания, достъпността до ресурси и стремежа към кръгова икономика, следните проблеми бяха отдиференцирани като най-критични: 1/ липса на точен и бърз контрол на биологичната система като широко приложима процедура; 2/ нерешена задача остава повишаването на метана в биогаза за разширяване на възможностите му за приложение; 3/ необходимост от синергизъм на технологиите и съвместно оползотворяване на различни типове биоотпадъци и постигане на енергийна независимост на малки населени места. Съществуващите системи за контрол на процеса на анаеробна биодеградация, в по-голямата си част, използват индиректни технологични индикатори. Този тип индикатори не дават точна информация за състоянието и функционирането на биологичната система, осъществяваща процеса на метаногенеза, а само за факторите на средата в метантанковете. Този подход не позволява ранна индикация за евентуален бъдещ проблем и не дава възможност за адаптация на микробния консорциум, с цел избягване на проблема или повишаване ефективността и ефикасността на процеса. Недостатъчното количество утайки, генерирани в ПСОВ на малки населени места, не позволява оползотворяването им в технологии за производство на биогаз, тъй като прави процеса неефективен и икономически неизгоден. От друга страна обаче, това е възможност за включване на различни типове отпадъци, генерирани в същия регион (хранителни биоотпадъци, селскостопански отпадъци и др.) и съвместното им оползотворяване. Обвързването на водния цикъл с цикъла на биоотпадъците и глобализацията на чистите технологии изисква синергични решения.

Табл. 5.1 SWOT анализ на технологията за производство на биогаз с изясняне на критичните проблеми

СИЛНИ СТРАНИ	СЛАБИ СТРАНИ
<p>Устойчиво управление на органични отпадъци</p> <p>Намалва масата и обема на отпадъка</p> <p><b>Производство на възобновяема енергия (биогаз) и по-човен подобрител</b></p> <p>Рециклиране на отпадъци</p> <p>Може да използва различни видове отпадъци (хранителни, селскостопански отпадъци, отпадъци води и утайки, странични животински продукти (ЖП))</p> <p>Добавя допълнителен приход</p> <p>Включва квалифицирани експерти – допринася за добавяната стойност на сектора</p> <p>Възвлича и некавалифициран персонал – подпомага социалното неравенство</p> <p><b>Ключов процес за развитие на кръговата икономика</b></p> <p>Генерират се големи количества отпадъци – субстрати за технологията за производство на биогаз</p> <p>Допринася за постигане на стратегията „Европа 2020“</p>	<p><b>Групи за управление</b></p> <p>Бавен анаеробен процес</p> <p>Различен добив на биогаз, в зависимост от субстрата</p> <p>Зависим от условията на околната среда</p> <p>Липсва надеждна брза система за контрол</p> <p><b>Липсва контрол върху биологичната система, осъществяваща процеса</b></p> <p>Проблеми с концентрацията на <math>H_2S</math> в биогаза</p> <p>Проблеми с микробиологичен произход – киселинни състояния и биологично пенеобразуване</p> <p>Липсва индикатор, предсказващ за евентуални бъдещи проблеми в системата</p> <p>Изпращане на проби в чужбина за специфични анализи</p> <p>Някои субстрати изискват предпретиране</p> <p>Ефективността на работа на МТ в ПСОВ е обвързана с целия водоприемствателен процес и с технологичния цикъл на водата в региона</p> <p><b>ПСОВ в малки населени места не произвеждат достатъчно утайка, за да бъде технологично икономически изгодна</b></p> <p>Необходимост от допълнително рециклиране на примеси от опаковки, когато се преработват хранителни отпадъци</p> <p>Транспортни разходи за доставяне на отпадъка от източника до инсталацията</p>
ВЪЗМОЖНОСТИ	ОПАСНОСТИ
<p>Потенциал да изпълни голям брой Европейски екологични, селскостопански и енергийни цели</p> <p><b>Повишаване количеството метан в биогаза</b></p> <p>Възможност за елиминиране на патогени при термофилен режим на работа или чрез пастъризация</p> <p>Едновременно разграждане на различни субстрати и синергизъм на технологиите</p> <p>Предпретиране на субстрата за повишаване скоростта на процеса</p> <p>Произвеждане на енергия за покриване на собствените нужди и за продажба на енергодружествата</p> <p>Намалва разходите за оползотворяване на излишната утайка в ПСОВ</p> <p>Енергийна независимост на малки населени места</p> <p>Разрастване на пазара на суровини от рециклируеми материали в ЕС и извън него</p> <p><b>Технологични възможности за повишаване ефективността на малки ПСОВ</b></p> <p><b>Увеличаване ефективността на продукция на биогаз и увеличаване на концентрацията на метан в него чрез приложението на функционален контрол на метаногенезата</b></p>	<p><b>Инхибиране на процеса поради наличието на токсични съединения в отпадъка или отпадъчните води или поради неблагоприятни условия на околната среда</b></p> <p>Патогенни микроорганизми в крайния продукт</p> <p>Високи концентрации <math>H_2S</math> могат да са причина за корозия на двигателите на когенераторите</p> <p>Инхибиране на процеса, поради големи количества СЖП</p> <p>Технически проблеми</p> <p>Необходимост от допълнителна енергия за подхранване на метанганка през зимните месеци</p> <p>Некавалифициран персонал и неработеще на възникващите проблеми</p> <p><b>Непривално смесване на суровини</b></p> <p>Доставяне на неравноразно събрани отпадъци в инсталацията</p> <p>Неконтролирано добавяне на аугментационни преферати</p>

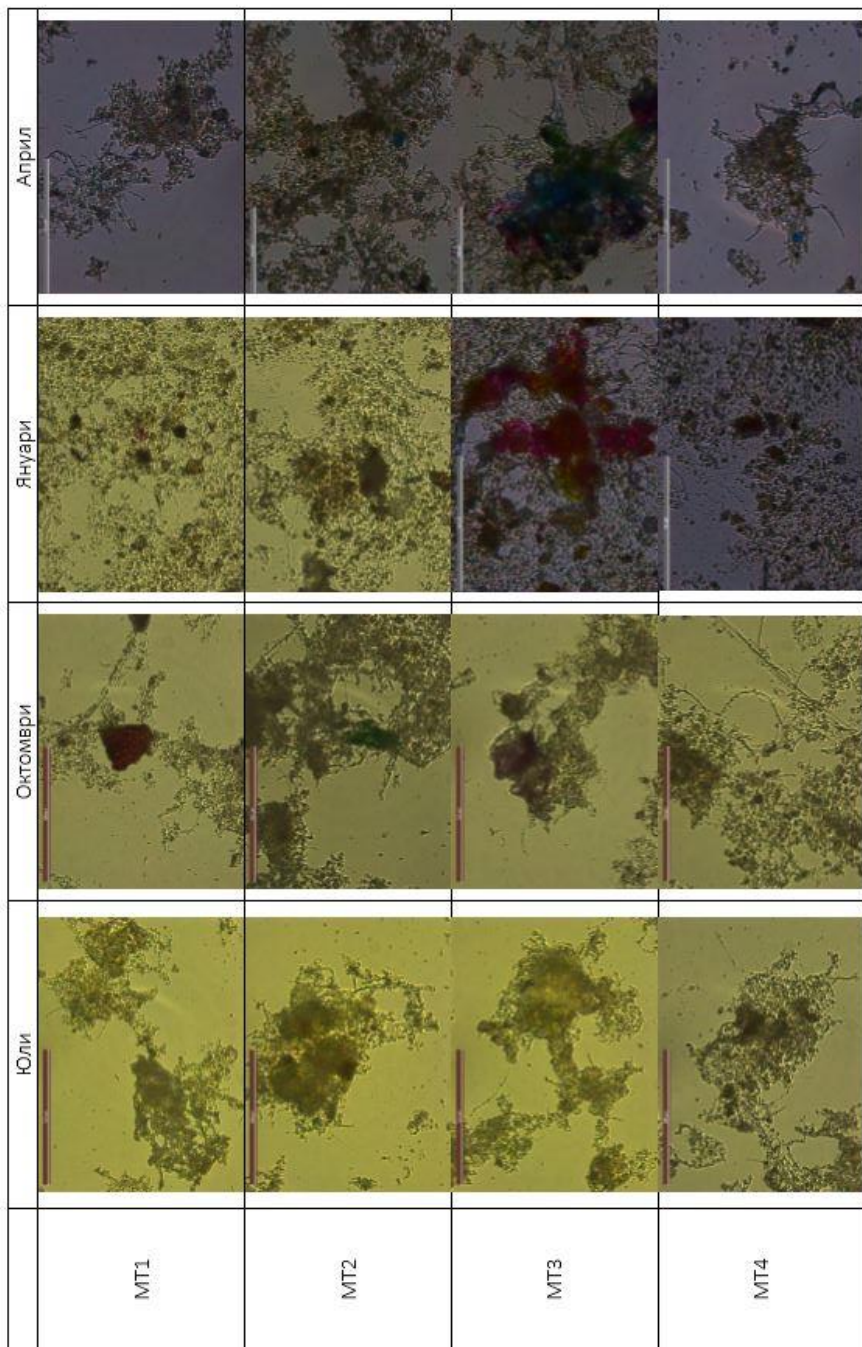
## **2. Технологични, химични, микробиологични, ензимологични и флуоресцентни показатели в метантанковете на СПСОВ „Кубратово“ през четирите годишни сезона.**

За търсенето на подходящите биологични индикатори за предизвестяване на възникващи проблеми в системата и връзката им с продукцията на биогаз и метан, бе подбрана една от най-ефективно функциониращите технологии за производство на биогаз в България – СПСОВ „Кубратово“.

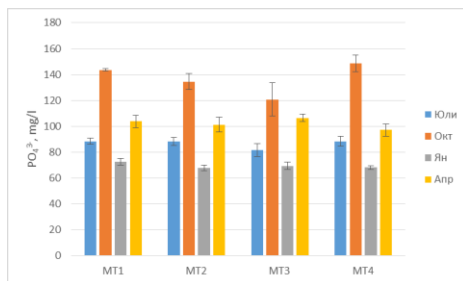
### **2.1. Технологични и химични показатели**

Не се отчита значителна разлика в параметрите времепрестой, рН, СВ и концентрация на метан в биогаза през различните сезони в четирите МТ. Процесът на анаеробна биодеградация в технологиите с непрекъснат режим на работа, каквито са МТ на СПСОВ „Кубратово“, е в стационарна фаза и се отличава с поддържане на едни и същи технологични показатели през по-голямата част от времето, тъй като в тези стационарни състояния продукцията на биогаз е най-висока. Те се характеризират със стабилно микробно съобщество, уникално за всеки МТ. Съдържанието на метан е стабилно във всички ККТ и е в границите 65-66%, което позволява оползотворяването на биогаза за производство на топло- и електроенергия. Стойностите на рН са в техния оптимум за процеса при всички изследвани ситуации. Снижение на температурата в четирите МТ е отчетена през зимния месец (с до 8<sup>0</sup>С по-ниска в МТ3 между есенния и зимния период), което се свързва с промяна на атмосферните условия и необходимостта от внасяне на допълнителна външна енергия, необходима за подгриване на реакторите. Най-ниската продукция на биогаз, измерена в m<sup>3</sup>/day, за всички МТ е отчетена за есенния сезон – през месец октомври. Лятото е благоприятно за метаногенните съобщества в МТ и съответно най-висока продукцията на биогаз е отчетена при юлското пробовземане за всички МТ, освен МТ1, чийто най-висок добив на биогаз е през зимата.

Факторите, оказващи влияние върху активността на метаногенния консорциум и продукцията на биогаз, могат да бъдат най-разнообразни. На направените светлинно-микроскопски снимки от всички МТ през четирите сезона (Фиг. 5.1) се установява навлизане на замърсител с антропогенен характер в МТ през октомври месец. Тъй като МТ в СПСОВ „Кубратово“ са с общ вход, от който се подава равномерно количество на еднакви интервали към четирите МТ, този замърсител оказва влияние върху системата във всеки един от тях. Неговото присъствие се регистрира и при следващите периоди на пробовземане, което означава, че или периодично се е съдържал и подавал с входящия материал към МТ, или че еднократно подаденото количество не е могло да се разгради напълно и се е акумулирало в образуваните от метаногенния консорциум клъстери. Най-ниската продукция на биогаз през месец октомври може да се свърже с неговото инхибиращо влияние върху биологичната система при своето навлизане и последващата ѝ адаптация към неговата концентрация. Възможно е също така неговото последващо капсулиране в определени клъстери да не оказва влияние върху останалата част от съобществото. Подобни рискови ситуации са се случвали и преди, когато предприятия в региона на ПСОВ инцидентно изпускат токсични замърсители в градската канализация. Такава ситуация е имало през 2014 година, когато в СПСОВ „Кубратово“ са навлезли 30 t мазут, поради инцидент в ТЕЦ „София-Изток“. Такъв тип “шоково“ натоварване на ПСОВ води до инхибиране на активната утайка, преминаване на токсичните замърсители през съерженията за пречистване на отпадъчните води и попадането им в МТ, където метаногенните микроорганизми са много по-чувствителни.



Фиг. 5.1 . Светлинно-микроскопски снимки от МТ през четирите сезона при увеличение 630X



Фиг. 5.2 Концентрация на фосфатни йони в изследваните МТ през четирите сезона

Резултатите от анализа за определяне концентрацията на фосфатни йони показват значителното им повишаване през есенния сезон (до 148.81 mg/l), последвано от това през пролетния месец (до 106.42 mg/l) (Фиг. 5.2). Причините за това могат да бъдат от различен характер. Първо, концентрацията на фосфатите и другите биогени е директно свързана с концентрацията им в инфлуента на вход ПСОВ и тяхната степен на биотрансформация в процеса на пречистване на отпадъчните води. Периодът август – октомври се характеризира с ниско водно ниво. Есента също така се свързва с края на вегетативния сезон и намаляване скоростта на биотрансформационните процеси. В съответствие с основните биодеградационни принципи и природните геохимични цикли на въглерода и фосфора, самопречиствателните процеси са свързани с повишаване концентрацията на фосфора. Освен това, през летните месеци се използват много фосфорни торове в селското стопанство. Високите водни нива, които причиняват разреждане на водите през пролетния сезон и биодисимилацията на фосфора във водните басейни през лятото водят до понижаване на неговата концентрация. Тези сезонни флукутации оказват влияние върху водопречиствателните процеси в ПСОВ и върху акумулацията на биогени в утайката. Всички тези фактори могат комплексно да окажат влияние върху повишаване концентрацията на фосфора. В СПСОВ „Кубратово“ се прилагат „зимен“ и „летен“ режим на работа по отношение отстраняването на фосфора при пречистването на отпадъчните води. През летните месеци се прилага биологично отстраняване на фосфора. Понижението на температурата на околната среда през есенните месеци в отворените биобасейни води до намаляване на скоростта на биологичните процеси като цяло. Това налага преминаване към „зимен“ режим на отстраняване на фосфор чрез добавяне на  $FeCl_3$  в биобасейните. „Зимният“ режим на работа в СПСОВ „Кубратово“ в периода на настоящето изследване е бил от декември 2017 г. до юни 2018 г., което обяснява високите концентрации фосфатни йони през месец октомври и снижаването им при януарското пробовземане.

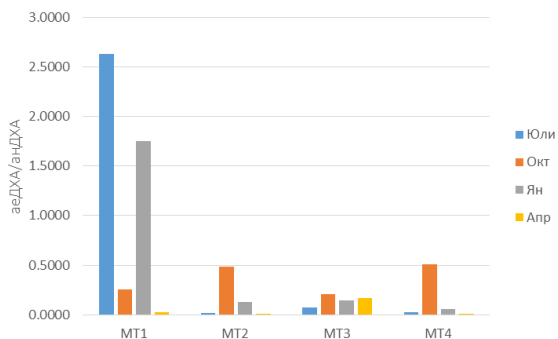
МТ в ПСОВ, третиращи утайка, са специални технологични системи, тъй като тяхната ефективност е свързана с целия воден цикъл в дадения регион и водопречиствателните процеси в ПСОВ. Есента е сезон, характеризиращ се с повишени количества валежи. Това води до по-голямо количество вода, преминаваща през съоръженията на ПСОВ. Навлизайки в ПСОВ, тези води носят със себе си много замърсители, събрани при измиването на пешеходните алеи и пътищата. Много от тези замърсители се акумулират в първичната утайка. Друга част от тях преминава през ПСОВ, но поради голямо количество води, няма достатъчно време, за да бъдат елиминирани и се акумулират във вторичната утайка. Много различни ксенобиотици са откривани в отпадъчни води – като о-нитрофеноли, пентахлорфенол и др. Такъв тип токсични замърсители могат и да не повлияят водопречиствателния процес (в концентрации 2-4 mg/l), поради резистентността на

ксенобиотико-разграждащия комплекс на активната утайка, но те се акумулират в нея и по този начин преминават в МТ, където метаногенното съобщество е много по-чувствително.

## 2.2. Ензимологични показатели

Беше изчислено съотношението аеДХА/анДХА (Фиг. 5.3). Установява се повишаване на аеДХА във всички МТ през есенния период. Изключение прави МТ1 през януари месец, когато аеДХА е най-висока. Тенденция към повишаване през есенния период се установява и при анДХА, но пикът при нея е през зимния месец, с изключение на МТ3, при който най-висока активност е отчетена през октомври. Тетразолиевите соли (ТТС и INT), използвани при определяне на дехидрогеназните активности, са включени в електрон-транспортните вериги, като мястото на INT предхожда това на ТТС. Това означава, че аеДХА е по-обща като индикатор и би трябвало да включва в себе си и анДХА. Резултатите, получени от настоящето изследване, показват, че стойностите за аеДХА са по-ниски от тези за анДХА. Това може да се дължи на инхибиране на пътя в електрон-транспортната верига след позицията на INT, поради стриктно анаеробните условия.

Съотношението между аеДХА и анДХА показва градиента на водородни катиони и редокс-потенциала (по-ниско съотношение се свързва с по-нисък редокс-потенциал и по-анаеробни условия, докато по-високо съотношение се свързва с по-висок редокс-потенциал и съответно по-аноксидни или аеробни условия). От друга страна, съотношението аеДХА/анДХА би трябвало да бъде и индикатор за функционирането на метаногенния консорциум. Установява се повишаване в стойностите му при есенното пробовземане за три от МТ (МТ2; МТ3; МТ4) (Фиг. 5.3), поради повишаването с един порядък в аеДХА за МТ3 и МТ4 и с два порядъка за МТ2. Обратно на това, съотношението е много по-високо през летния сезон за МТ1, поради по-ниската с един порядък анДХА през юли. Повишаването на показателя аеДХА/анДХА би могло да бъде индикатор и за това, че процесът не е в последна фаза на анаеробна биодegradация. Тъй като МТ в СПСОВ „Кубратово“ са от едностъпален тип, всички фази на производство на биогаз протичат в едно съоръжение и не са разделени. Получените по-високи стойности за съотношението аеДХА/анДХА могат да са следствие от факта, че в момента на пробовземане процесът е бил в по-ранна ферментационна фаза, при която анаеробните условия не са строго задължителни.

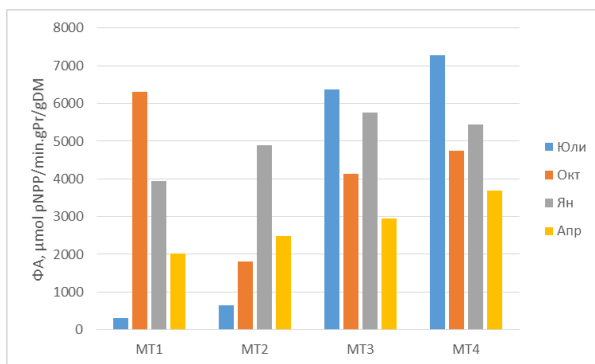


Фиг. 5.3 Съотношение аеДХА/анДХА в изследваните МТ през четирите сезона

ФА принадлежи към групата на хидролитичните ензими, отговорни за освобождаването на орто-фосфати от органично свързан фосфор. Освен това, ФА е индикатор за степента на хетеротрофна активност на микроорганизмите, индуцирана от наличието на органични



субстрати. Установява се понижаване в тази активност за всички изследвани МТ при пролетното пробовземане (Фиг. 5.4), което може да се свърже с лекия спад на ОСВ през зимното и пролетното пробовземане, в сравнение с лятото и есента (от 53-55% на 48-50%).



Фиг. 5.4 ФА в изследваните МТ през четирите сезона

### 2.3. Флуоресцентен анализ на ко-фактор F<sub>420</sub>

Подбраните флуоресцентни показатели бяха: 1/ брой на отчетени флуоресцентни обекти (кълстери); 2/ среден размер на кълстерите; 3/ интензитет на флуоресценция; 4/ площ, заета от флуоресцентните обекти (Фиг. 5.5). Съобществата в МТ проявяват синергитични и синтрофни взаимоотношения. Сформирането на зони от струпвания или кълстери се възприема като сформирани на зони с висока активност и силни синергитични и синтрофни връзки, наподобяващи флокулите в активната утайка. Изчислено бе съотношението среден размер на кълстерите/брой кълстери за всяка от анализираниите флуоресцентни снимки. Високите стойности на това съотношение индикират, че кълстерите са не толкова много на брой, колкото на големина. Това означава, че микробното съобщество изменя своята структура и сформира активни зони с концентрация на синергитични и синтрофни взаимоотношения, където метаногенната активност и продукцията на биогаз и метан е висока. Тези струпвания (кълстери) са формирани от различни групи микроорганизми, които съвместно разграждат органичната материя и се смята, че допринасят за увеличаване продукцията на биогаз и метан от метаногените. По-силният флуоресцентен сигнал (интензитет на флуоресценция) се свързва с по-високата метаногенна активност.

От резултатите, получени при анализа на МТ на СПСОВ „Кубратово“, най-високото съотношение среден размер кълстери/брой кълстери се установява през юлското пробовземане при всички МТ. Тези резултати кореспондират на най-високата продукция на биогаз през този сезон в три от четирите изследвани МТ. Установява се понижаване в стойностите на този показател и съответно разделяне на микробното съобщество на по-малки сформирания през следващите месеци с достигане на минимум през месец януари и повишаване на стойностите през месец април, отново при всички МТ (Табл. 5.3).

Тези резултати кореспондират много точно със специфичната продукция на биогаз и метан в МТ2, 3 и 4. Установява се спад в продукцията от лятното към зимното пробовземане и нейното повишаване отново през пролетта. От това следва, че синергитичните и синтрофни отношения между микроорганизмите в МТ са в пряка зависимост с ефективното и ефикасно функциониране на технологиите за производство на биогаз. Разпадането на кълстерите на по-малки сформирания би могло да бъде следствие от факторите на средата в МТ, като

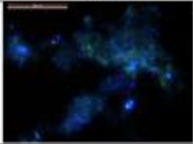
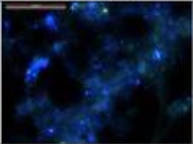
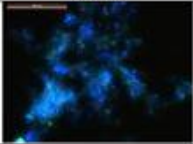
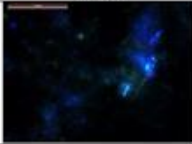
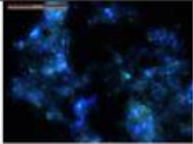
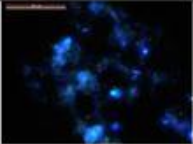
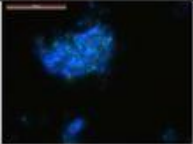
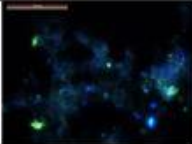
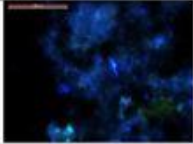
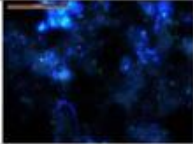
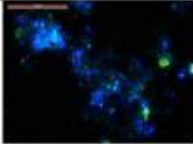
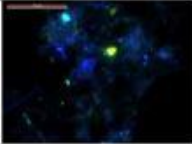
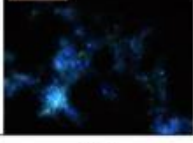
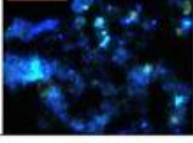
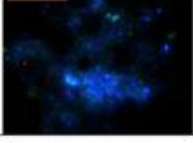
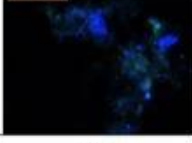
например установената най-ниска температура в тях през зимния сезон. По-скоро обаче причината се крие в навлизането на токсичен замърсител, установен през октомврийското пробвземане, т.к. намаляването на размера на клъстерите и снижението на продукцията на биогаз и метан започва още тогава. Метаногените са силно чувствителна бавнорастяща група микроорганизми. Това личи от факта, че три месеца след регистрирането на токсичния замърсител неговото наличие все още се установява в средата и метан-продуцентите продължават да снижават активността си. Ситуацията не стои по същия начин с МТ1. Макар и при него да се установява разделяне на клъстерите на по-малки сгрупвания, през зимното пробвземане се регистрират само следи от навлезлия през месец октомври замърсител. Микробното съобщество не само се справя по-бързо с неговата биодеградация, а и е увеличило активността си до толкова, че през този зимен сезон в него е отчетена най-висока продукция на биогаз.

Табл. 5.3 Съотношение среден размер/брой клъстери в СПСОВ „Кубратово“

	Среден размер/брой клъстери			
	Юли	Окт	Ян	Апр
МТ1	<b>35</b>	25	6	22
МТ2	<b>25</b>	18	2	10
МТ3	<b>37</b>	15	4	15
МТ4	<b>38</b>	33	9	11

Показателят площ на отчетените флуоресцентни обекти носи информация за количеството метаногени, докато интензитет на флуоресценция, макар и отново свързан с тяхното количество, дава информация по-скоро за тяхната активност. Във всички МТ, освен МТ2, се установява увеличаване в площта на флуоресцентните обекти през месец октомври, което индикира за повишаване количеството метаногени през този период. Този резултат, на пръв поглед, изглежда противоречив на данните за продукцията на биогаз. Количеството на микроорганизмите обаче не винаги е свързано с тяхната активност. Причина за това повишаване би могла да бъде „защитна“ реакция на метаногените към справянето с критична ситуация, а именно вероятно на навлезлия токсичен замърсител.

Така получените резултати за интензитета на флуоресценция не могат еднозначно да бъдат коментирани и съотнесени към продукцията на биогаз и метан. В МТ1 се установява относителна стабилност в този показател с лек спад през зимния месец. В МТ2 се регистрира спад в стойностите му от юли към април месец. При МТ3 се регистрира повишаване през месец октомври с последващ спад през януари и отново покачване на стойностите през април, а в МТ4 пик през есента и минимална стойност през пролетта. Обхватът, в който варира този показател при анализа на МТ от СПСОВ „Кубратово“, е 20-42. Това е изключително тесен интервал, имайки предвид, че софтуерът, чрез който са обработени снимките, засича интензитет в границите 0-255. Дали съществува връзка между интензитета на флуоресценция и ефективността и ефикасността на производство на биогаз и каква е тя ще бъде установено чрез софтуерно изчисляване на коефициент на корелация, представен по-напред в дисертационния труд.

	Юли	Октомври	Януари	Април
MT1				
Площ, %	47%	77%	49%	68%
Интензитет на флуоресценция	37	38	33	33
MT2				
Площ, %	60%	55%	23%	49%
Интензитет на флуоресценция	42	30	27	26
MT3				
Площ, %	57%	71%	37%	38%
Интензитет на флуоресценция	41	47	24	32
MT4				
Площ, %	32%	67%	52%	25%
Интензитет на флуоресценция	25	33	31	20

Фиг. 5.5 Автофлуоресценция на ко-фактор F420 през четирите изследвани ситуации при увеличение 400X

## 2.4. Микробиологични показатели

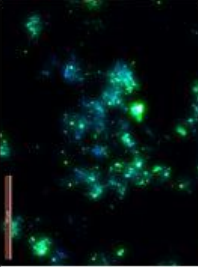
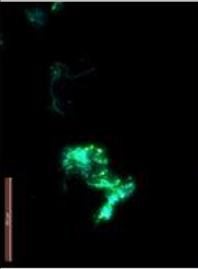
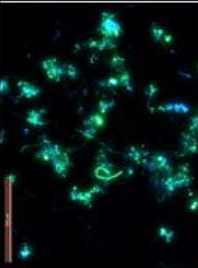
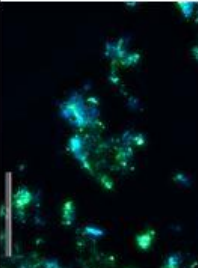
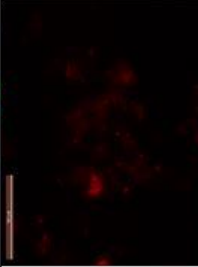

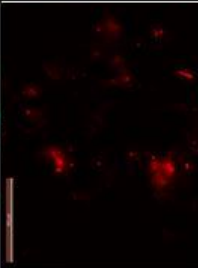
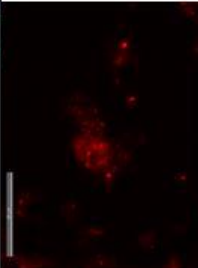
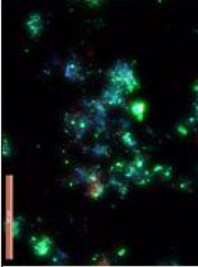
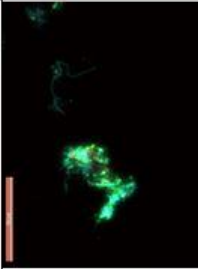
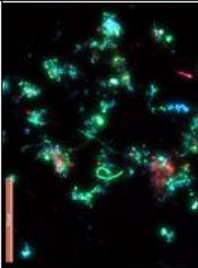
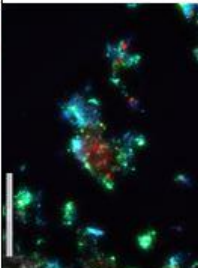
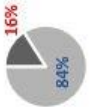

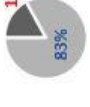


Структурата на микробния консорциум в изследваните МТ беше изследвана и чрез молекулярна флуоресцентна техника (FISH) с фокус върху *Archaea* - доменът, към който принадлежат микроорганизмите, отговорни за последния етап от продукцията на биогаз. Трябва да се вземе предвид, че макар изследваните МТ да имат едни и същи конструктивни характеристики, поради флукутации във факторите на средата във всеки един от тях и разликите в подавания субстрат, всеки един е сформирал специфично микробно съобщество. Всяко стационарно състояние е специфично за всеки от МТ и за всеки от изследваните сезони. Сравнявайки данните за технологичните и химични показатели за различните МТ в един сезон, не могат да се открият значителни разлики. Сравнявайки резултатите обаче МТ по МТ, се установява, че всеки МТ представлява изградена независима система. При последващия анализ съобществата в четирите МТ се разглеждат като независими микробни съобщества. На

Фиг. 5.6 са представени резултатите от FISH анализа за домен *Archaea* в МТ1. Всички микроорганизми в пробата са визуализирани чрез оцветяване с DAPI и микроорганизмите от домен *Archaea* флуоресцират в червено, поради свързване със специфичната олигонуклеотидна сонда ARC915, маркирана с багрилото Cy3. Насложени снимки, илюстриращи микроорганизмите от домен *Archaea* като част от общо засечените микроорганизми и представящи локализацията им в консорциума, са представени също на Фиг. 5.6. Количеството *Archaea* варира между 15% и 24% за всички изследвани ситуации. Тези резултати потвърждават основната теория, че домен *Bacteria* доминира над домен *Archaea* в анаеробни МТ (Ju F. et al., 2015). Също така потвърждава и изследванията на Ju F. et al. и Regueiro L. et al., в които процентът *Archaea* в МТ, третиращи утайка от пречистването на отпадъчни води, е отчетен със средна стойност 20%.

Определеният процент *Archaea* чрез FISH анализа е най-висок при есенното пробовземане за всички МТ, освен МТ4, при който най-висок процент е отчетен през януари месец. На снимките могат да бъдат регистрирани и зони, формиращи клъстери от *Archaea*. Тези зони се предполага, че са най-активните и микроорганизмите в тях имат силни синергитични и синтрофни взаимоотношения и този тип кооперация се приема като основен фактор, допринасящ за по-голям добив на биогаз и метан.

Есенният месец се характеризира и с най-ниска продукция на биогаз и метан за всички МТ. Тази ниска ефективност на процеса на анаеробна биодеградация може да е следствие от различни неблагоприятни за метаногенното съобщество условия. ПСОВ „Кубратово“ третира смесен поток битови, дъждовни и индустриални отпадъчни води. Тези индустриални води съдържат разнообразни видове токсични замърсители в различни концентрации, в зависимост от конкретното производствено предприятие. По-голямото количество води, навлизали в станцията през есента, прави пречиствателния процес по-труден и част от токсичните замърсители се акумулират в утайката и преминават в МТ. Различни условия като промени във факторите на средата, наличието на токсични вещества или инхибитори често водят до понижаване на микробната активност. В тези случаи защитната реакция на микроорганизмите е да увеличат техния брой. Ситуацията на каламитет е добре познат феномен в екологията, при който в критични ситуации организмите увеличават количеството си (Schneider I. et al., 2016; Topalova Y., 2009). В настоящето изследване е отчетено увеличаване на броя хомогенни клетки, но не и на клъстерите, които са зоните със синергитични взаимоотношения.

Остатъчната концентрация токсични вещества от биобасейните е сравнително ниска, което провокира една от най-простите адаптивни реакции в съобществата, когато те се адаптират неселективно към сравнително ниските концентрации на ксенобиотика, а именно намножаване на количеството хомогенни клетки, което чрез FISH метода се отчита като по-голяма площ. Въпреки това, броят на микроорганизмите не е свързан с тяхната активност и с тяхната способност да продуцират повече биогаз или биогаз с по-високо качество. В този ред на мисли трябва да се вземат предвид също така и клъстерите от археи, които са с висока метаногенна активност. Важно е да се отбележи, че оценявайки таксона *Archaea* като цяло и взимайки предвид хомогенно разположените и синтрофните му представители, то количеството на хомогенно разположените нараства. Повишаването на количеството на същите е свързано с по-ниска метаногенна активност през есенния сезон.

		МТ 1			
		Юли	Октомври	Януари	Април
Оцветяване с DAPI					
FISH-ARC 915					
Насложени снимки – Оцветяване с DAPI и FISH-ARC915					
					
					

Фиг. 5.6 Снимки от FISH за домен Arcobacter през изследваните сезони в МТ1 (увеличение 400X)

Индустриалните МТ са зависими от работата на цялата ПСОВ и характеристиките на първичната и вторичната утайка. По този начин продукцията на биогаз зависи от целия водопречиствателен процес в ПСОВ. Разглеждането на технологията за производство на биогаз, в зависимост от начина на пречистване на водите и сезона, е нов подход и би допринесъл за регулирането и управлението на структурите на микробното съобщество, както и за ефективността на добив на метан. В този аспект връзката между общото количество бактерии и количеството/локализацията на археите играе ролята на значим индикатор.

### **3. Технологични, химични, микробиологични, ензимологични и флуоресцентни показатели в технологии за производство на биогаз, използващи различни типове субстрати.**

Недостигът на достатъчно генерирани утайки за ефективна продукция на биогаз в малки ПСОВ налага обвързване на цикъла на водата с този на отпадъците. Обхватът на суровините, които могат да се преработват в технологии за производство на биогаз, е много широк. В това число влизат всички отпадъци с органичен произход, каквито са хранителните, селскостопанските и др.

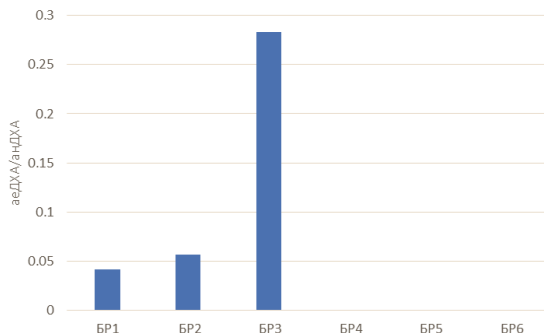
#### **3.1. Технологични и химични показатели**

Разглежданите технологии са с различен обем, с различен конструктивен характер и различен режим на работа. Анализирани са представители на всеки един от етапите при мащабиране на дадена биотехнология – *lab-scale* (БР2, 3, 5 и 6), *pilot-scale* (БР4) и *full-scale* (БР1). БР1 е с непрекъснат режим на работа, докато останалите пет реактора са в периодичен режим. Разликите между тях са свързани също и с характера на входящия субстрат, методите на неговото предтретиране, както и поддържания температурен режим в средата. Всички тези характеристики оказват влияние върху различните изследвани показатели в БР, формирането на стабилно микробно съобщество и ефективността на продукция на биогаз и метан. БР1 е с най-дълъг времепрестой и продуцира най-голямо количество биогаз (2043 m<sup>3</sup>/day). Това, разбира се, е следствие от непрекъснатия му режим на работа, от значително по-големите потоци входящ отпадък и обема на реактора (3000 m<sup>3</sup>), както и от методите на предтретиране. Достъпността за метаболизиране на субстрата от метаногените е изключително важна за тяхната ефективна и ефикасна продукция на биогаз, което си проличава и от най-високото отчетено съдържание на метан (75%), именно в този БР.

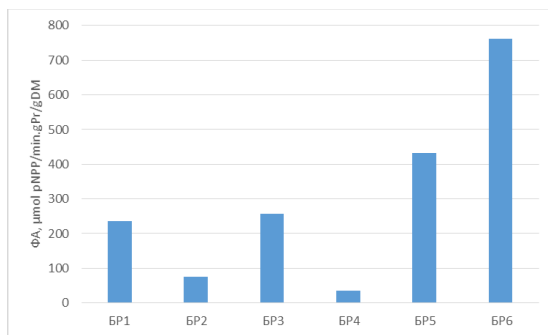
Сравнявайки технологичните параметри на лабораторните БР, се установява, че продукцията на биогаз е най-висока в термофилния БР4 (0.00024 m<sup>3</sup>/ден), при който времепрестоят е 27 дни. В този случай, от събраните данни, се регистрира и най-високото качество на биогаза (55% метан). По-високата температура може би оказва положително влияние върху скоростта на хидролиза и разтворимостта на веществата в средата, като ги прави по-достъпни за групата на метаногенните микроорганизми и по този начин се повишава ефективността на процеса. Най-ниската продукция на биогаз е измерена в БР5 и 6, което би могло да е следствие от най-малкия обем на тези реактори (0.5 l). Мезофилният БР3 се отличава с най-ниско съдържание на продуцирания метан (48%) и по-ниска производителност на биогаз, в сравнение с БР2, което най-вероятно се дължи на по-краткия и недостъгътен времепрестой в реактора (15 дни) и характеристиките на субстрата царевичак, чиято биодеградация протича по-благоприятно в термофилни условия.

### 3.2. Ензимологични показатели

Съотношението аеДХА/анДХА дава информация за степента на анаеробност на средата и като цяло за функционирането на съобществото в БР (Фиг. 5.7). Най-високи стойности са отчетени при БР3 (0.28). Този резултат би могъл да означава и че пробите не са взети в крайните фази на процеса. Технологиите за производство на биогаз в БР2, 3, 4, 5 и 6 са едностъпални и всички етапи на анаеробна биодegradация протичат на едно и също място. В БР4 съотношението е равно на нула, поради факта, че при анализа не е установена никаква аеДХА. Съотношението не е изчислено за БР5 и 6, т.к. при тях не е отчетена анДХА. Най-ниска стойност за аеДХА/анДХА е отчетена при БР1 (0.04), което означава, че макар и регистрираната висока аеДХА в този БР, тя се компенсира от още по-високата анДХА.



Фиг. 5.7 Съотношение между аеДХА и анДХА в изследваните БР



Фиг. 5.8 ФА в изследваните БР

Индексът на фосфатазна активност се свързва с хетеротрофната активност на микроорганизмите при наличие на висока концентрация органика. Този подготвителен етап на субстрата е изключително важен от гледна точка осигуряване на неговата достъпност за усвояване от метаногените. Най-високи стойности на ФА са отчетени в БР5 и 6 ( $434.44$  и  $761.59 \mu\text{mol pNPP/min.gPr/gDM}$ ), а най-ниски при БР4 ( $34.86 \mu\text{mol pNPP/min.gPr/gDM}$ ) (Фиг. 5.8). Високите стойности на аеДХА, на съотношението аеДХА/анДХА и на ФА в БР5 и 6 са индикатор за това, че микробното съобщество в тези реактори е с висока метаболитна активност. Тази активност по всяка вероятност обаче е насочена към биодegradация на органиката, а не към продукция на биогаз. Не са установени концентрации, извън

допустимите, за амониевите и фосфатни йони, както и за органичното съдържание. Причините за неефективното осъществяване на процеса в БР5 и 6 биха могли да се крият в малкия обем на реактора, липсата на анаеробност на средата, най-ниската сред изследваните реактори поддържана температура на средата - 32<sup>0</sup>С или недостатъчния времепрестой за достигане до крайните етапи на анаеробна биодеграция.

	БР1	БР2	БР3
	100x		
Брой кълстери	135	242	169
Среден размер на кълстерите, $\mu\text{m}^2$	1560	828	1262
Среден размер/Брой	12	3	7
	400x		
Площ, %	30%	23%	26%
Интензитет на флуоресценция	25	18	22
	БР4	БР5	БР6
	100x		
Брой кълстери	224	109	94
Среден размер на кълстерите, $\mu\text{m}^2$	572	1156	996
Среден размер/Брой	3	11	11
	400x		
Площ, %	33%	11%	11%
Интензитет на флуоресценция	16	12	14

Фиг. 5.9 Автофлуоресценция на ко-фактор F<sub>420</sub> в БР 1-6

### 3.3. Флуоресцентен анализ на ко-фактор F<sub>420</sub>

Най-висока стойност на съотношението среден размер/брой кълстери бе установено в БР1 (12), индикиращо за най-висока степен на поддържане на синтрофни и синергитични взаимоотношения между метаногенните представители сред изследваните в тази глава от дисертационния труд реактори (Фиг. 5.9). Микробното съобщество в него е адаптирано към



един и същ тип входящ субстрат и към технологичните параметри на процеса и е успяло да изгради стабилна микробоценоза. Една от най-високите стойности на интензитета на флуоресценция и площ на флуоресцентните обекти са установени отново в БР1, като причините за това са свързани с ефективно функциониращата биологична система в този реактор.

Следващите микробни съобщества с най-силно изразени кооперативни взаимоотношения са установени в БР5 и 6 със съотношение среден размер/брой кълъстери, равно на 11 и за двата реактора. Важно е да се отбележи, че в тези БР се разчита на естествено срещаща се в оборската тор микрофлора. Най-ниски стойности са установени в БР3, 4 и 5 (съответно 3, 7 и 3). Най-голяма площ, установена сред лабораторните реактори, е тази в БР4, а най-ниска – в БР5 и 6, което може да бъде обвързано с продукцията на биогаз. Необходимо е да се отчете недостатъкът на този метод при приложението му в лабораторните реактори, третиращи отпадъци с растителен произход. Поради недостатъчното надребняване на субстрата преди входяването му в реактора, в него попадат частици отпадък с голям размер. Тези частици имат силна автофлуоресценция, което може да затрудни обработката на флуоресцентните изображения. Освен това, тези по-големи частици най-вероятно затрудняват биодеградацията на субстрата и са недостъпни за усвояване от микроорганизмите.

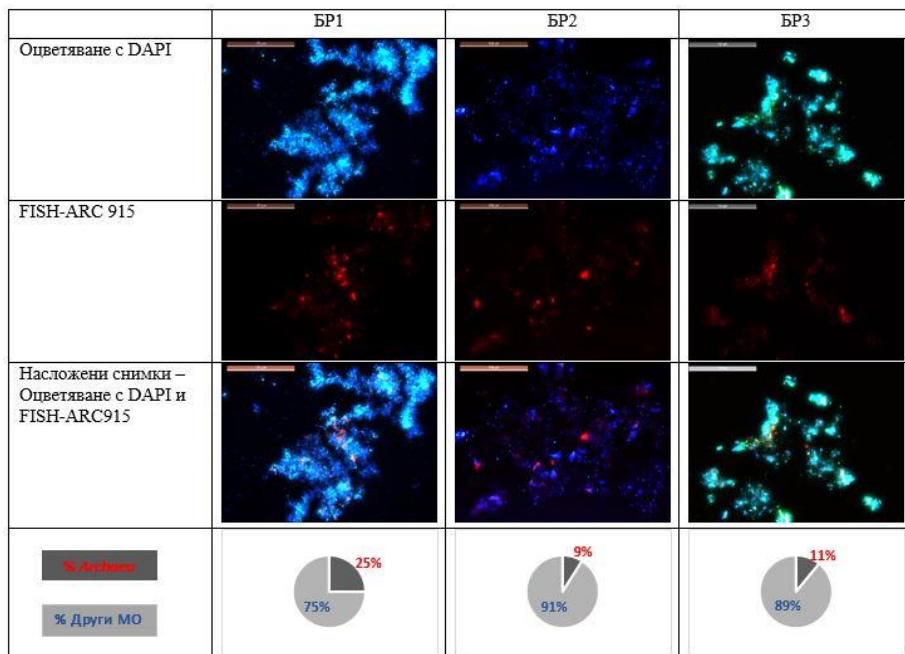
#### **3.4. Микробиологични показатели**

В БР1 се извършват процесите на ацетогенеза и същинската метаногенеза и технологичните параметри, които се поддържат в него, са оптимални за по-чувствителната група, а именно тази на метаногените. Продуцираният от него биогаз е с високо качество и съдържание на метан от 75%. Представителите на археите, определени чрез FISH метода чрез свързване на флуоресцентно маркираната специфична олигонуклеотидна сонда ARC915, наброяват 25% от общото количество микроорганизми (Фиг. 5.10). В БР1 се е сформирало стабилно активно метаногенно съобщество.

БР 2-6 функционират в периодичен режим на работа и третират различен тип селскостопански отпадъци. В тях в началото на процеса постъпва точно определено количество и с ясни характеристики отпадък. Ключов момент при тях за постигане на висока ефективност е бързото стартиране на процеса. Поради краткия времепрестой не се достига до стабилна стационарна фаза, както при индустриалните реактори, а се разчита на максимално активна логаритмична фаза. Микроорганизмите от домен *Archaea*, определени чрез FISH метода, в тях са 9%, 11%, 8%, 21%, 16%, съответно за БР 2, 3, 4, 5 и 6. На Фиг. 5.10 са представени подобрени снимки от FISH анализа за БР 1-3. По-високият процент археи в БР5 и 6 се свързва и с характеристиките на входящия субстрат в тези реактори. Метаногените се срещат естествено в стомасите на преживните животни и вследствие нормалната ферментация на храната, която поемат, като продукт се отделя метан. Затова и те естествено попадат в реакторите с постъпващата в тях оборска тор. В БР5 и 6 не се добавя допълнителен инокулационен материал за осъществяване на процеса на анаеробна биодеградация и производство на биогаз, а се разчита на естествено съдържаща се в оборската тор микрофлора.

Важен момент при реакторите в периодичен режим на работа е бързото стартиране на процеса, свързано с бърза хидролиза на субстрата и осигуряване на достъпност на веществата за усвояване от метаногенните микроорганизми. Предвид характеристиките на входящия отпадък във всички изследвани БР и високото съдържание на целулоза в него,

етапът на хидролиза е от голямо значение, т. к. той често бива инхибиран при третиране на отпадъци с растителен произход. За ефективна анаеробна биодеградация в тези случаи е необходимо наличието на активни представители на хидролизиращите групи микроорганизми и в частност на целулозоразграждащите такива. Характеристиките на субстрата, трудната му биодеградация и краткият времепрестой най-вероятно мобилизира микроорганизмите от домен *Archaea* да навлязат в активна логаритмична фаза, увеличавайки своето количество. Осигуряването на достатъчно лесно усвоим субстрат за метаногените ги прави по-активни в производството на биогаз и метан, като тази активност не е свързана с техния брой. Увеличаването в количеството на метаногените се включва като компенсаторен механизъм при неоптимални условия на околната среда.



Фиг. 5.10 FISH за домен *Archaea* в БР1, 2 и 3 (увеличение 400X)

#### 4. Ключови групи метаногенни микроорганизми, представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс и натрупването на полифосфати в критични контролни точки по време и място в СПСОВ „Кубратово“

За по-задълбочен анализ на структурата на микробното съобщество в МТ бе подбрана технологията за производство на биогаз в СПСОВ „Кубратово. Като най-характерни бяха подбрани два от МТ – МТ1 и МТ3, съответно с най-висока и най-ниска обща производителност на биогаз. За целите на сравнителния анализ бяха подбрани две от времевите ККТ за тези МТ – лятното пробовземане, при което бе установено най-висока ефективност на продукцията на биогаз за станцията, и есенното пробовземане, при което ефективността бе най-ниска.

#### 4.1. FISH за метаногенни представители

Сред представителите на метаногените за анализ бяха подбрани групите на *Methanobacteriaceae sp.*, *Methanosaeta sp.* и *Methanosarcina sp.*, съответно като най-често срещаните се водородотрофи, ацетотрофи и метаногени, едновременно преработващи водород и ацетат, в метантанкове (Demirel B. & Schere P., 2008). Изследваните водородотрофни представители (сем. *Methanobacteriaceae*) запазват сравнително стабилно количество в анализирани ККТ, вариращи в границите 3-4% от общото количество микроорганизми в пробите. Наличието и активността на водородотрофни микроорганизми е важно за стабилността и ефективността на анаеробната биодеградация. При представителите на р. *Methanosarcina* се установява увеличаване на количеството им от 3 на 6% в МТ3 и спад в него от летния към есенния сезон при МТ1 (от 6 на 3%). Тенденцията при ацетотрофните метаногени от р. *Methanosaeta* е една и съща и при двата МТ, като числеността им нараства от летния към есенния сезон, съответно от 3 на 9% за МТ1 и от 5 на 10% за МТ3 (Фиг. 5.11). Трите изследвани групи метаногени са сравнително равномерно разпределени през летния сезон (между 3 и 6%), докато доминиращата група през есента е тази на ацетотрофите (р. *Methanosaeta* – 9-10%). Представителите на това семейство не са били установявани като доминираща група при МТ, третиращи животинска тор.

Представителите на изследваните групи метаногени съставляват 81% от общото количество археи през лятото за МТ1 и 62% през есента и съответно 69% от археите за МТ3 през лятото и 91% през зимата. Тези данни потвърждават, че подбраните групи метаногени са доминиращите представители на археите в МТ, преработващи утайка от пречистването на отпадъчните води. Като ключова и повлияваща се от условията на средата се очертава групата на ацетотрофните представители, удвояваща числеността си през есенния сезон три пъти за МТ1 и два пъти за МТ3.

#### 4.2. Изследване в дълбочина на клъстери от археи

Използването на епифлуоресцентен микроскоп за наблюдение на резултатите от FISH анализ ни предоставя 2D изображения. Интересно, от гледна точка синергитични и синтрофни взаимоотношения в образуваните клъстери и локализацията на представителите на домен *Archaea* в тях, бе наблюдението им в дълбочина чрез използването на конфокален сканиращ лазерен микроскоп. Бяха подбрани и сканирани в дълбочина през 0.5  $\mu\text{m}$  по три обекта, специфично образувани клъстери, за всяка от подбраните за допълнителен анализ ККТ.

Регистрира се, че основната част от археите се локализируют в центъра на образуваните клъстери във всички изследвани ситуации. Това най-вероятно се дължи на факта, че те са най-чувствителната група от всички микроорганизми, срещани се в МТ (Torres L. & Bandala E., 2014). По този начин те са защитени от една „обвивка“ от други различни видове бактерии, които по-лесно биха понесли и се справили с флукуациите на факторите на средата и при евентуалното навлизане на токсичен замърсител.

	MT 1		MT3	
	Юли	Октомври	Юли	Октомври
Отвеляване с ДАРГ				
FISH-MX825				
Насложени снимки – Отвеляване с ДАРГ и FISH-MX825				

Фиг. 5.11 FISH за *Methanosaeta spp.* в изследваните ККТ (увелчение 630X)

### 4.3. FISH за представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс

Определено бе количеството на микроорганизмите от р. *Acinetobacter* и р. *Pseudomonas* в избраните ККТ на СПСОВ „Кубратово“. Тези два рода бактерии изпълняват ключова роля във водопречиствателните процеси, като представляват основна част от ксенобиотико-разграждащия комплекс на АУ, най-вече поради способността им да използват алтернативни източници на енергия. Заедно с излишната вторична утайка, те неминуемо попадат и в МТ.

Установено бе, че числеността на представителите на р. *Acinetobacter* варира между 17 и 24% в изследваните ККТ (Фиг. 5.12). Това представлява една стабилна популация, конкурираща се по количество с представителите на домен *Archaea*, отговорни за производството на биогаз в МТ. Също, както при получените за археите резултати, представителите на р. *Acinetobacter* увеличават своя брой при есенното пробовземане, което се отличава с по-неблагоприятни условия на средата, навлизане на токсичен замърсител в МТ и по-ниска продукция на биогаз. Тази група микроорганизми няма отношение към продукцията на биогаз, но тяхната роля е свързана с разграждането на органиката и биодegradацията на ксенобиотици. Увеличаването на техния брой през есента може да бъде свързано с навлизането на токсичния замърсител, установен при анализа на светлинно-микроскопските снимки, и тяхната реакция към неговото отстраняване. Наличието на микроорганизми от р. *Acinetobacter* в МТ, преработващи излишна утайка от пречистването на отпадъчни води в ПСОВ, би могло да представлява една допълнителна защита за силно чувствителните към промени в средата и постъпването на токсични вещества метаногени. Реакцията към биодegradация на постъпващи ксенобиотици от тази група микроорганизми предпазва метаногените от инхибиране и поддържа ефективното протичане на анаеробна биодegradация и производство на биогаз в този специфичен тип МТ.

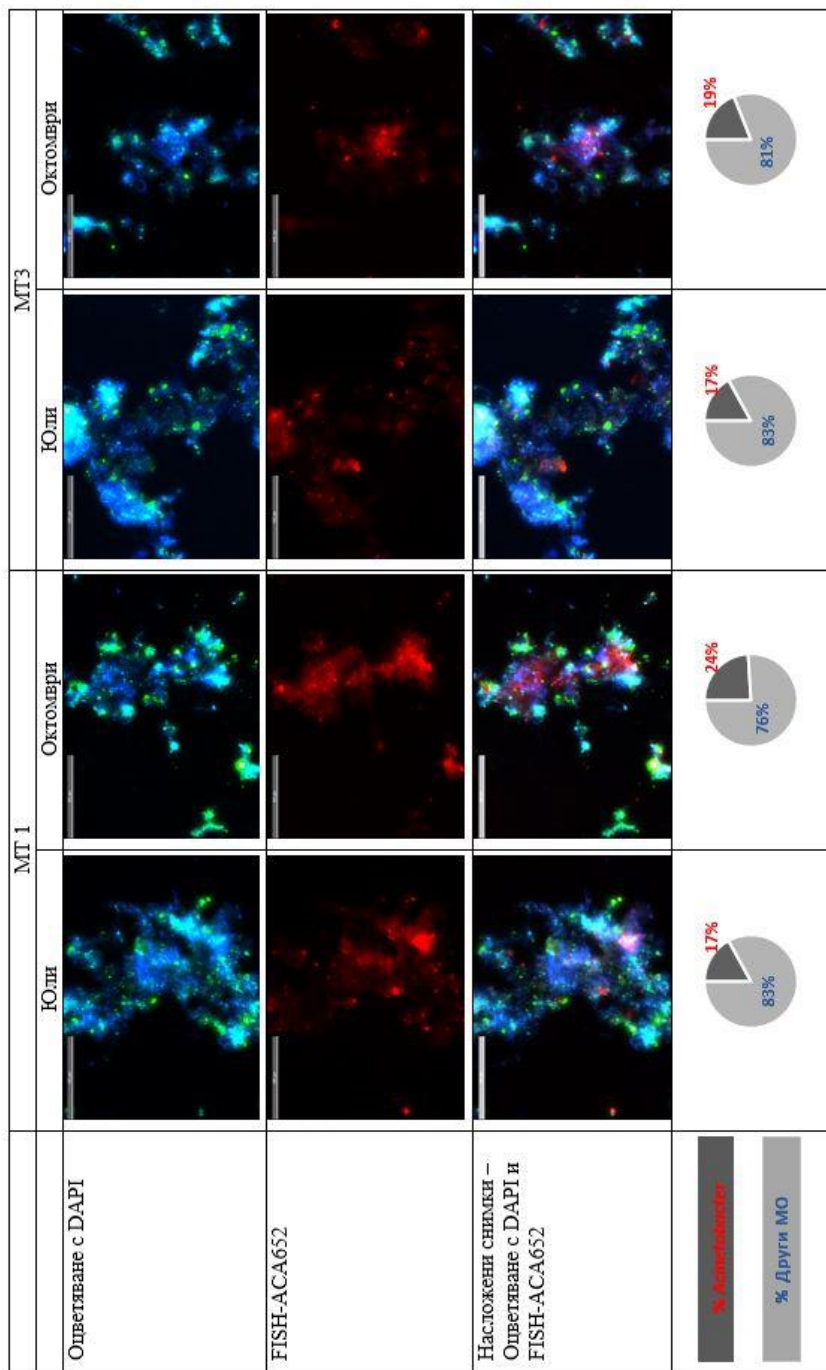
Представителите на р. *Pseudomonas* варират в тесни граници в изследваните ККТ между 5 и 6% (Фиг. 5.14). Заемат нисък, но стабилен процент във формираното микробно съобщество в МТ. Тази постоянност в популацията им води до извода, че са изградили стабилно съобщество, което трудно се повлиява от промени в средата. Ролята на микроорганизмите от р. *Pseudomonas* като представители на ксенобиотико-разграждащия комплекс е сходна с тази на р. *Acinetobacter*. Тяхната стабилност е важна от гледна точка устойчивото и ефективно осъществяване на процеса на анаеробна биодegradация в МТ. Индикаторната роля на р. *Acinetobacter* обаче е по-значителна, тъй като тяхната численост може да бъде обвързана с продукцията на биогаз и ефективността на процесите в МТ, третиращи утайка.

### 4.4. Натрупване на полифосфатни гранули

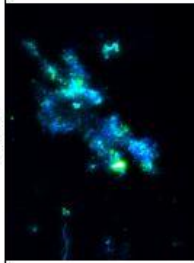
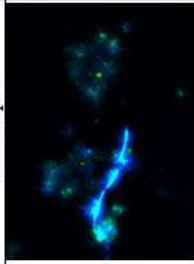
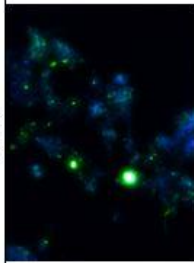
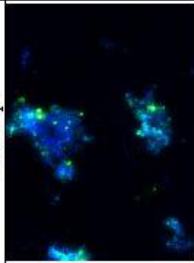
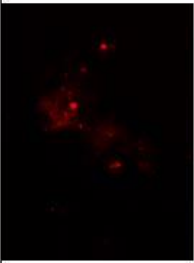
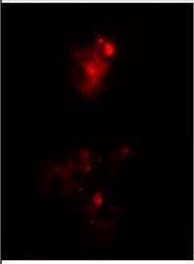
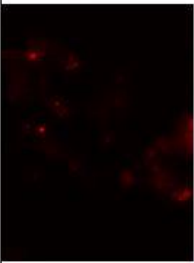
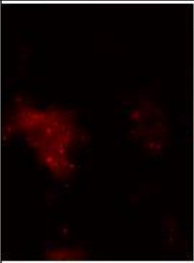
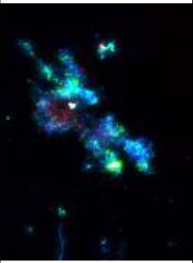
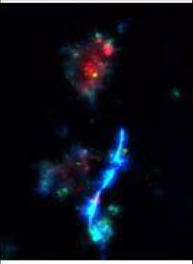
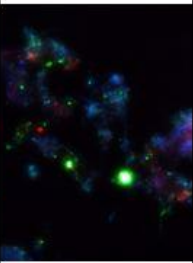
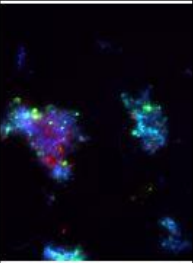

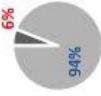


И при двата допълнително изследвани МТ се отчита повишаване в съдържанието на полифосфати от летния към по-неблагоприятния за процеса есенен сезон (за МТ1 – от 10 на 15%; за МТ3 – от 11 на 14%) (Фиг. 5.14). Тези резултати позволяват допускането, че неблагоприятните условия на средата карат микроорганизмите да натрупват по-големи количества алтернативни източници на енергия като защитен адаптивен механизъм. Това е и едно от обясненията за най-високата обща и специфична производителност на биогаз в СПСОВ „Кубратово“, чиято микробна система притежава пълен пакет от функции и възможности за адаптация към рискови ситуации. Използването на алтернативни

източници на енергия от микроорганизмите може да играе индикаторна роля за адаптация към биодegradация на ксенобиотиците. Точно в есенния сезон бе установено навлизане на потенциален трудно разградим замърсител, вероятно от багрилната промишленост, установено при светлинно-микроскопския контрол (Табл. 5.1). Микроорганизмите, в ситуация на токсична „преса“, са по-зависими от наличието на алтернативни източници на енергия. Натрупването на по-голямо количество полифосфати в клетките е индикатор за използването от тях допълнителни енергийни източници, каквито са полихидроксиацетатът и полихидроксibuтиратът.

По-голямото количество натрупани полифосфати в МТ през месец октомври се свързва и с по-голямото количество отчетени микроорганизми от р. *Acinetobacter* през същия месец (Фиг. 5.12), което показва и тяхната ключова роля. Представителите на тази група бактерии са важен фактор за ефективното осъществяване на процесите в МТ на СПСОВ „Кубратово“ и, може би, би била ключова за всички МТ в ПСОВ. Метаногените, отговорни за продукцията на биогаз и метан, са изключително чувствителни към малки промени в средата и навлизането на токсични вещества в МТ би могло да доведе до тяхното инхибиране и излизане на съоръженията от експлоатация за неопределен период от време до възстановяването на микробното съобщество. Микроорганизмите от р. *Acinetobacter* в този тип МТ играят роля на „защитници“ на метаногените, използвайки алтернативни енергийни източници и адаптирайки се към биодegradация на постъпилите ксенобиотици. Несъмнено, роля в биодegradацията на ксенобиотиците и в натрупването на полифосфати имат и представителите на р. *Pseudomonas*.



Фиг. 5.12 FISH за *Aspergillus* sp. в изследваните ККТ (увелчение 400X)

		MT 1		MT 3	
		Юли	Октомври	Юли	Октомври
Оцветяване с DAPI					
FISH-Ps					
Насложени снимки – Оцветяване с DAPI и FISH-Ps					
	   				
	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="background-color: #444; color: red; padding: 5px; text-align: center;">% <i>Pseudomonas</i></div> <div style="background-color: #444; color: white; padding: 5px; text-align: center;">% Други МО</div> </div>				

Фиг. 5.13 FISH за *Pseudomonas* sp. в изследваните ККТ (увеличение 400X)



		MT 1		MT 3	
		Юли	Октомври	Юли	Октомври
<p>Оцветяване с DAPI - Полифосфати</p>					
	<p><b>% Полифосфати</b></p> <p><b>% Останала част</b></p>				

Фиг. 5.14 Полифосфати в изследваните ККТ (увеличение 400X)

## **5. Стратегии за функционален контрол и повишаване ефективността и ефикасността на технологиите за производство на биогаз**

Подборът на правилните индикатори е важен за набавяне на необходимата информация за характеристиките на навлизания субстрат, средата в МТ и състоянието на микробното съобщество, осъществяващо процеса на анаеробна биодеградация. Единствено събирането на точната информация би позволило поддържане на ефективна продукция на биогаз и оптимизиране на процесите в тези технологии. Обвързването и синергизмът между чистите технологии е ключово за реализиране целите на кръговата икономика и постигане на устойчиво развитие.

### **5.1. Стратегия за технологично решение на критични проблеми от енергиен характер на малки селища**

Включването в изградените инсталации за производство на биогаз към малки ПСОВ на различни типове локално образувани органични отпадъци би било едно ефективно решение. Анаеробната биодеградация на различни субстрати увеличава не само производството на биогаз, а и неговото качество. Съвместната биодеградация на различни субстрати се предпочита пред преработването на един тип отпадък, поради следните причини: разреждане на токсични съединения, налични в някои от суровините; подобряване съотношението между въглерода и азота на входящия отпадък; продуцира се ферментационен продукт с по-високо качество; позволява регулиране на рН на входящия материал; позволява регулиране на влажността на входящия материал. Важно обаче е правилното комбиниране на тези суровини и на подбора от методи за тяхното предтретиране. Всеки тип органичен отпадък има различни характеристики: утайките, образувани в процеса на пречистване на отпадъчни води, са с ниско органично натоварване; животинската тор има ниско органично натоварване, но високо азотно съдържание, което може да инхибира метаногените; растителните селскостопански отпадъци са с високо съдържание на въглерод; органичната фракция от общинските твърди отпадъци съдържа примеси, както и относително високо съдържание на тежки метали; СЖП са с високо азотно съдържание и/или висока концентрация на дълговерижни мастни киселини, като и двете са потенциални инхибитори на метаногенната активност. Повечето от тези проблеми могат да бъдат решени чрез добавянето на различни субстрати.

Целта на етапа на предтретиране е да се модифицира структурата на комплексните материали, да се намали степента им на полимеризация и да се увеличи повърхността на частиците. От ключово значение е подборът на метод за предтретиране на лигноцелулозните отпадъци, които са най-трудни за биодеградация и в същото време - богат на енергия субстрат. Приложението на ултразвук води до физични и химични реакции, които могат значително да модифицират структурата на материала. Когато ултразвуковата вълна преминава през субстрата, се генерират газови балончета, които последователно се компресират и разширяват от минаването на звуковата вълна до достигане на критична точка, в която се спукват, образувайки микрозони с екстремни условия на температура (~5000°C) и налягане (~50 МРа). Микрозоналните високи температури и налягане от „шокиращите вълни“ могат сериозно да повлияят структурата на органичните молекули, освобождавайки вътреклетъчен материал, който може по-лесно да бъде усвоен от микроорганизмите и по този начин се увеличава контактът между средата и субстрата. Преработката с ултразвук води и до дезинтегриране на микроорганизмите и отделяне на

екзоензими в средата. Предтретирането с ултразвук ускорява етапа на хидролиза, води до намаляване времепрестоя в биореактора, до по-добро разграждане на субстрата и оттам до увеличаване добива на биогаз.

Подготовката на субстрата се разглежда от гледна точка на една различна иновация, а не само третиране на суровината с ултразвук, който метод е отдавна известен. Тук стоят параметрите на ултразвуковото обработване. Прекалено високата честота води до феномен, наречен кавитация, който предизвиква механични увреждания на съоръженията в инсталациите за производство на биогаз и поради тази причина все още не е широко приложим метод. Екипът на лабораторията по „Екологична биотехнология и биологично водопречистване“ е участвал в трансферирането в България на иновация за обработка с ултразвук, чиято технология успява да угаси вълните причинени от ултразвука и да предотврати кавитацията в съоръженията. Направените от тях изследвания показват, че предтретирането с ултразвукова дезинтеграция на хранителни отпадъци, на селскостопански отпадъци и на утайки при внасяне на енергия между  $2 \text{ kWh/m}^3$  и  $4 \text{ kWh/m}^3$  повишава количеството на продуцирания биогаз и метан между 11% до 21%. С колко ще се повиши ефективността на производство на биогаз чрез предтретиране с ултразвук зависи от използваната сила (W), честота (kHz) и време на третиране (min), като оптималните стойности на тези параметри не са еднакви за различните видове суровини и за отделните инсталации, и е необходимо да бъдат предварително тествани в допълнителни изследвания. В по-нататъчни изследвания се планира да се установи връзката между параметрите на ултразвукова обработка и ефективността на метаногенеза чрез използване на споменатото ултразвуково устройство и мултиреакторна система за тестване на различни комбинации от субстрати. Тук се посочват само възможностите за приложение на тези две иновации – антикавитация и мултиреакторна система.

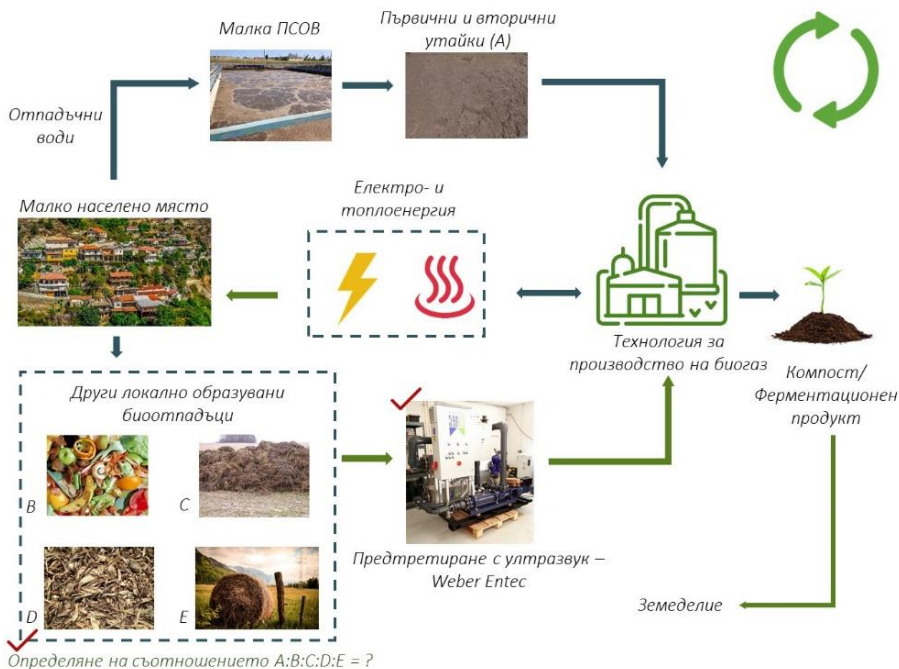
На Фиг. 5.15 е представена схема за подобряване на ефективността на МТ в ПСОВ на малките населени места. Включването на допълнителни потоци отпадъци за съвместно третиране би допринесло за достигане на енергийна независимост на тези места. Ключови моменти, които изискват допълнителни изследвания, са правилното комбиниране на специфичните за региона органични отпадъци и определяне на точните параметри на ултразвуковото предтретиране.

## **5.2. Корелационен анализ на изследваните показатели за контрол с продукцията на биогаз и метан**

За установяване на най-подходящите индикатори за контрол на технологиите за производство на биогаз бе изчислена корелацията между изследваните в настоящия дисертационен труд показатели за контрол и продукцията на биогаз и метан. Данните от получените резултати за коефициента на Пийърсън са представени в Табл. 5.4. Бе изчислена корелацията между изследваните показатели и общата и специфична продукция на биогаз и метан.

От изследваните технологични показатели висока корелация се установява единствено с показателя ОСВ ( $r = -0.93$ ). Високото съдържание на органика е важно условие за процесите на анаеробна биодеграция. Анаеробните процеси изискват по-голямо съдържание на органика от аеробните. Установеният корелационен коефициент обаче е

отрицателен и би могъл да се свърже с факта, че по-високата продукция на биогаз е следствие от разграждането на органиката и съответно понижаване на ОСВ.



Фиг. 5.15 Повишаване ефективността на продукцията на биогаз в малки населени места

От изследваните ензимологични показатели висока положителна корелация е установена с ФА ( $r = 0.65$ ). ФА не е от ензимите, участващи във финалните етапи на анаеробна биодеграция. Високите ѝ стойности може би са фактор за по-бързото разграждане на органиката и доставяне на субстрат, достъпен за усвояване от метаногенните микроорганизми и по този начин допринася за по-високата продукция на биогаз и метан. ФА обаче е подходящ бърз индикатор за контрол на технологиите на производство на биогаз, давайки информация за първите етапи на анаеробна биодеграцията и хетеротрофната активност на съобществото при наличието на органика.

Интерес предизвиква високата корелация между трите изследвани показателя, базирани на автофлуоресценцията на ко-фактор  $F_{420}$ . Връзката и с трите индикатора е положителна, което отразява факта, че продукцията на биогаз и метан е правопропорционална към тяхната стойност. Един от установените ключови проблеми на технологиите за производство на биогаз е повишаване количеството на метан в него. Най-висока корелация на показателят среден размер/брой кълъстери е установена именно със специфичната продукция на метан. Ключово за високата продукция на метан се оказва сформирването на активни зони (кълъстери), в които протичат синергитични и синтрофни взаимоотношения между метаногенните микроорганизми.



Високият интензитет на флуоресценция, свързан с активността на метаногенното съобщество, също се установява, че е в положителна връзка с продукцията на биогаз и метан ( $r = 0.74$ ). Този резултат е показателен за факта, че флуоресценцията на ко-фактор  $F_{420}$  кореспондира на състоянието на микробното съобщество, осъществяващо процеса на метаногенеза. Показателят площ на флуоресцентните обекти има висока корелация с продукцията на биогаз ( $r = 0.70$ ) и средна, но със стойности, близки до високата връзка, с производството на метан ( $r = 0.59$ ).

Основната част от метаногенните микроорганизми са некултивируеми и определянето им чрез стандартни култивационни техники не би дало точни резултати. Поради тази причина в настоящия дисертационен труд бе приложен FISH за домен *Archaea*, чрез който се получава информация за числеността на култивируемите и некултивируемите микроорганизми и за тяхната локализация и кооперация. За да се оцени потенциалът на тази флуоресцентна техника в контрола на технологиите за производство на биогаз, бе анализирана взаимовръзката между резултатите, получени от FISH и продукцията на биогаз и метан в изследваните технологии. Бяха изследвани два отделни параметъра - % *Archaea* и съотношението Други микроорганизми/*Archaea*. Поради различията в процесите при непрекъснат и периодичен режим на работа, водещи до различни етапи на развитие на микробното съобщество при двата типа, корелациите бяха търсени поотделно за индустриалните и лабораторните реактори. И в двата случая бе установена висока отрицателна корелация между продукцията на биогаз и метан и % *Archaea* и висока положителна връзка със съотношението Други микроорганизми/*Archaea*. Колкото по-ниска е продукцията на биогаз и метан, толкова по-висок е процентът на представителите от домен *Archaea*. Предпоставките за този резултат бяха обсъдени в Раздел 2 и 3 от настоящия труд. Водещ е фактът, че количеството микроорганизми не е пряко свързано с тяхната активност. Защитна реакция и срещано явление в природата е увеличаването броя на организмите в критични ситуации. Локализацията на микроорганизмите от домен *Archaea* чрез FISH метода също така ни дава информация за степента на синергизъм и синтрофност между тях. При всички случаи връзката между общото количество микроорганизми и количеството/локализацията на археите играе роля на значим индикатор.

Впечатление прави, че установените високи корелационни коефициенти с продукцията на биогаз и метан са с изследваните биологични показатели на процеса. Изключение прави единствено съдържанието на ОСВ. За осъществяването на функционален контрол на технологиите за производство на биогаз и отразяване на състоянието на микробното съобщество е необходимо контролът да бъде фокусиран върху него, а не само върху факторите на средата. Този поглед би дал възможности за поддържане на ефективното функциониране на тези технологии и тяхното оптимизиране с оглед разрешаване на установените ключови проблеми.

### **5.3. Стратегии за функционален контрол на технологиите за производство на биогаз, на базата на различни механизми и индикатори**

Предложените стратегии за функционален контрол се базират на две системи, в чиято същност стоят два флуоресцентни метода – анализ на автофлуоресценцията на ко-фактор  $F_{420}$  и FISH за домен *Archaea*, отразяващи състоянието на метаногенното съобщество.

### 5.3.1. Стратегия за бърз контрол и оценка ефективността на технологиите на производство на биогаз

С оглед получените резултати от корелационния анализ и необходимостта от бързи биологични индикатори, отразяващи състоянието на метаногения консорциум в МТ, бе разработена система за контрол, базирана на автофлуоресценцията на ко-фактор  $F_{420}$ . И трите изследвани флуоресцентни показателя показваха взаимосвързаност с продукцията на биогаз и метан в изследваните технологии за производство на биогаз. Методите за тяхното определяне са бързи, т.к. не изискват предварителна обработка на пробата. Необходимо е използването на флуоресцентен микроскоп с филтри с определена дължина на вълната и софтуер, обработващ информацията от получените снимки. Комбинацията от параметрите на флуоресцентния снимков анализ могат да дадат бърза и обективна представа за ефективността на функциониране на МТ.

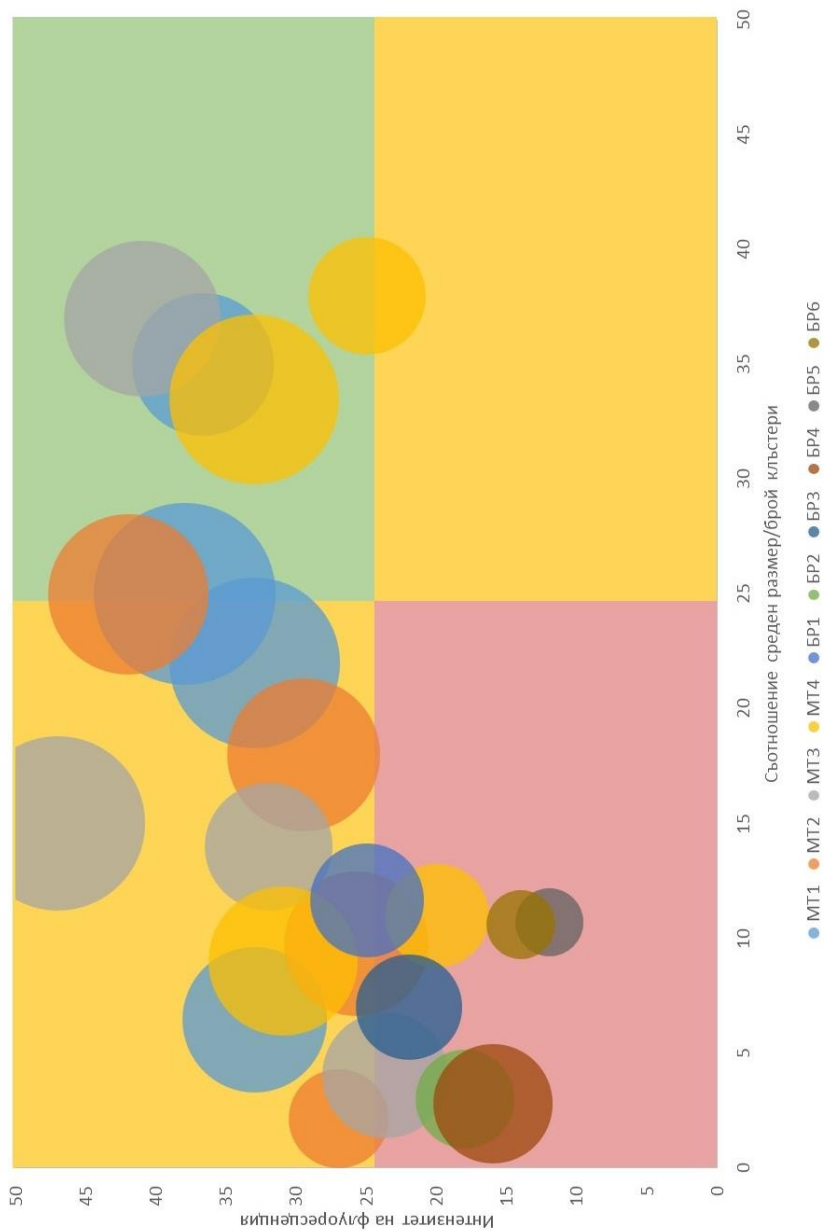
Бе създадена био-индикаторна система за оценка на технологиите на производство на биогаз (Фиг. 5.17), базирана на комбинация от трите флуоресцентни показателя. Тя е визуализирана чрез координатна система, по абцисата на която се разполагат стойностите на съотношението среден размер/брой кълстери, по ординатата – интензитетът на флуоресценция, а площта на флуоресцентните обекти е отразена под формата на окръжности. На база получените при флуоресцентния снимков анализ резултати, стойностите на координатите  $x$  и  $y$  са в границите 0-50.

На Фиг. 5.16 е представена легендата към био-индикаторната система за контрол. Зоните, според които се разделят МТ, са три – с висока ефективност; със задоволителна ефективност, но с необходимост от строг мониторинг; с ниска ефективност.

Ниво на ефективност		$x$	$y$
Висока ефективност		$\leq 25$	$\geq 25$
Задоволителна ефективност, но с необходимост от строг мониторинг		$1/ \leq 25$ $2/ > 25$	$1/ < 25$ $2/ \geq 25$
Ниска ефективност		$> 25$	$< 25$

Фиг. 5.16 Легенда за оценка на ефективността според био-индикаторната система за контрол

Основен елемент в представената био-индикаторна система за оценка и контрол на МТ е използването на ко-фактор  $F_{420}$ . Доколкото ни е известно, подобна система за контрол и управление на метаногенните процеси се прилага за първи път в реални технологии за производство на биогаз.



Фиг. 5.17 Р-Бю-индикаторна система за оценка ефективността на технологиите на производство на биогаз



### 5.3.2. Стратегия за прецизен функционален био-контрол на технологиите за производство на биогаз

Контролът на технологиите за производство на биогаз в повечето индустриални инсталации се базира на технологични показатели (рН, температура, СВ, ОСВ, FOS/TAC и др.). Проследяването на тези показатели е важно, т.к. факторите на средата оказват влияние върху функционирането и активността на микробното съобщество в МТ. Прецизната система за контрол, която се предлага в този дисертационен труд, не изключва тези показатели, а напротив – препоръчва ежедневното им проследяване в три ККТ – вход, в МТ и изход на МТ в непрекъснат режим на работа. Допълнителният анализ на химични показатели в същите ККТ по място (вход, вътрешност и изход), като ХПК, амониеви йони и фосфати и изчисляването на съотношенията между биогенните елементи би дало представа за състава на входящия субстрат и средата в МТ. Тази информация е важна, от гледна точка настройването на технологичните параметри на тези технологии и би могла да предскаже реакцията на микробното съобщество спрямо съответните характеристики на навлизания отпадък. Препоръчва се изследването на химичните показатели да се прави при навлизането на нов тип отпадък или веднъж седмично. Целта на изследването на тези показатели на вход и изход на МТ е, освен информация за характеристиките на входящия субстрат, и оценка ефективността на биодegradация и трансформация на отпадъците и последващите възможности за оползотворяване на ферментационния продукт.

Едновременно лесен за приложение анализ, но и важен от гледна точка информацията, която носи, е светлинно-микроскопският контрол. Чрез него можем веднага да придобием представа за изменения в общата структура на микробното съобщество в МТ или за попадането на някои типове замърсители, като такива от багрилната промишленост, нефтени въглеводороди и др.

Естеството на функционалния контрол е фокусирането му върху биологичната система в МТ. Едни от най-често използваните функционални показатели са активностите на ензимите, които катализират основните, алтернативните и допълнителните метаболитни пътища. В настоящето изследване бе установена корелация между продукцията на биогаз и метан и ФА. Този резултат прави ФА потенциален индикатор за вътрешен контрол на процеса. ФА е извънклетъчен ензим, участващ в първия етап на анаеробна биодegradация – хидролизата, което я прави важен показател, тъй като именно този етап често се оказва лимитиращ за осъществяването на метаногенезата. Макар и да не е регистрирана връзка между аеДХА, анДХА и съотношението аеДХА/анДХА с продукцията на биогаз и метан, тези ензимни активности са ценен индикатор за определяне метаболитното състояние на микробното съобщество, скоростта на биодegradация на тривиалната органика и стелента на анаеробност на средата. Те биха могли да се използват като допълнителни индикатори при задълбочен мониторинг на технологиите или възникване на критични проблеми с разграждане на входящия отпадък. Търсенето и включването във функционалния контрол на ензимни активности, участващи във финалния етап на анаеробна биодegradация – метаногенезата, несъмнено би допринесло за повишаване ефективността на технологиите за производство на биогаз. Понижаването в стойностите на ензимните активности е индикатор за инхибиране на микроорганизмите,

осъществяващи съответния етап от процеса и трябва да бъдат взети мерки за отстраняване на проблема.

Приложението на FISH анализа и количественото определяне на микроорганизмите от домен *Archaea* показва високия му потенциал за включване във функционалния контрол на технологиите за производство на биогаз. Взаимовръзката между числеността на археите и продукцията на биогаз и метан бе оценена високо при изчислението на коефициента на Пиърсън. Определянето на тяхното количество и локализацията им дава представа за актуалното състояние на метаногенното съобщество и ги прави ключов индикатор в контрола на тези технологии. Този анализ е необходимо да се осъществява на проби, взети от вътрешността на МТ и на интервали, по-малки или равни на времепрестоя в съоръжението.

Информацията от FISH анализа за домен *Archaea* на пръв поглед наподобява тази, получена чрез флуоресцентния снимков анализ, базиран на F<sub>420</sub>. FISH анализът обаче е много по-прецизен и точен и при него силната автофлуоресценция на някои от съдържащите се отпадъци в реактора не оказва влияние и съответно отклонението в резултата е по-малко. FISH методът позволява, както разширяване на анализа към други групи микроорганизми, така и задълбочаването към конкретни представители на метаногените. Неговото приложение обаче изисква по-дълго време, квалифициран персонал и използването на по-скъпи реактиви. Приложението на FISH метода за домен *Archaea* не изключва използването на био-индикаторната система, базирана на F<sub>420</sub>. Двете флуоресцентни техники могат да бъдат взаимно съчетани, в съответствие с техните предимства и недостатъци. Като по-често средство за контрол може да бъде използван по-бързият и по-достъпен за изпълнение метод, базиран на F<sub>420</sub>, а на по-широки интервали от време по-прецизната техника за флуоресцентна *in situ* хибридизация за домен *Archaea*, но и за други групи микроорганизми, в зависимост от характеристиките на конкретната технология. Допълнително предимство в съчетаването на тези два метода е факта, че за осъществяването им се използва една и съща техника (флуоресцентен микроскоп) и един и същ софтуер за обработка на флуоресцентните изображения.

Био-контролът трябва да бъде съобразен и насочен към конкретната технология за производство на биогаз и субстрата, който се преработва в нея. Споменатите до момента показатели за контрол имат отношение към процесите във всякакъв тип МТ. Функционалният био-контрол трябва да бъде детайлизиран спрямо конкретните характеристики на технологията.

При реакторите, преработващи селскостопански и хранителни отпадъци, е изключително важно включването във вътрешния контрол на определяне количеството на различните групи хидролизиращи микроорганизми и хидролитични ензими, т.к. при тях лимитиращият етап най-често е този на хидролизата, поради по-трудното разграждане на лигноцелулозните отпадъци (Лазарова П. и др., 2009; Хубенов В., 2015).

Както бе установено при задълбочения анализ на МТ от СПСОВ „Кубратово“, ключова роля в процеса на анаеробна биодegradация при тях играят представителите на ксенобиотико-разграждащия комплекс – *p. Acinetobacter* и *p. Pseudomonas*. Локализацията и количественото им определяне, както и натрупването на полифосфати, са потенциални индикатори за функционален контрол на технологиите за производство на биогаз, преработващи утайки.

Като продължение на разгледания в този дисертационен труд Case study, свързан с МТ на СПСОВ „Кубратово“ и изследване на функционирането им през четирите годишни сезона, бе предложена и представена във Фиг. 5.19 прецизна система за функционален био-контрол с ККТ по време, място и показател, именно за тази технология.

Знак	Честота на изследване
V	Ежедневно
V	Два пъти седмично
V	Ежеседмично
V	На 12 дни
V	При възникване на проблем в системата

Фиг. 5.18 Легенда към прецизната система за контрол на МТ на СПСОВ „Кубратово“








\*\*\*

### **Предложение за стратегии за функционален контрол, адаптирани към изследваните технологии:**

И така както стана ясно, в дисертацията бяха очертани два фокуса: 1/ приложение на биомениджърски правила за изграждане на стратегии и биостратегии за подобрене на ключови биотехнологии за производство на биогаз и 2/ поставяне на акцента върху контрола като най-динамичната и иноваторска част от управлението. В нашия случай контролът беше насочен към микробното съобщество, осъществяващо процесите на анаеробна биодеградация в технологии за производство на биогаз.

Контролът беше развит на равнище функциониране на анаеробния микробен консорциум /флуоресценция на F<sub>420</sub> и ензимни активности/ и молекулен анализ на консорциума, разгледан на равнище структуриране /формиране на клъстери от домен *Archaea* с определена големина, дифузност, плътност и интензивност на флуоресценция/ и на равнище биоразнообразие на некултивируемия микробен консорциум от домен *Archaea*.

Молекулните и функционални характеристики на анаеробната биологична система в динамика бяха обвързвани с технологичните показатели при производството на биогаз - обща и специфична продукция на биогаз и специфична продукция на метан. Корелациите бяха верифицирани в разнообразни, налични в България, технологии с цел утвърждаване на предложените механизми за биоконтрол и управление на технологиите за производство на биогаз. Тези разширени биологични изследвания бяха насочени към включването им в стратегии за контрол на технологиите.

Показатели за контрол		Общ вход 	Общ изход 
<b>Технологични и химични показатели</b>			
T <sup>o</sup> C		V	V
pH		V	V
СВ, g/g		V	V
ОСВ, %		V	V
ХПК, mgO <sub>2</sub> /l		V	V
FOS/ТАС		V	V
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , mg/l		V	V
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , mg/l		V	V
ХПК:N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> :P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		V	V
ХПК:N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> *		V	V
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> :N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> *		V	V
Светлинно-микроскопски контрол		V	V
<b>Ензимологични показатели</b>			
ФА, μMrNPP/min, gPr/gDM		X	V
aeДХА, μMНТ*/min, gPr/gDM		X	V
андХА, μMНТ*/min, gPr/gDM		X	V
aeДХА:андХА		X	V
<b>Флуоресцентни показатели, базирани на F<sub>450</sub></b>			
Среден размер/брой кълъстери		X	V
Интензитет на флуоресценция		X	V
Площ, %		X	V
<b>FISH</b>			
Archeae, %		X	VV
p <i>Methanoseta</i> , %		X	VV
p. <i>Acinetobacter</i> , %		X	VV
p. <i>Pseudomonas</i> , %		X	VV
Натрупване на полифосфати, %		X	VV

Фиг. 5.19 Прецизна система за контрол на МТ в СПСОВ „Курбатово“

Така в нашата разработка предлагаме следните елементи на стратегиите за функционален контрол:

**А/ конкретни функционални индикатори** - специфични за първата фаза на анаеробната биодegradация - фосфатазната активност и за втората същинска фаза на метаногенезата - директен флуоресцентен контрол по ко-фактора F<sub>420</sub> и FISH техники и индикатори за оценка на метаногенезата.

**Б/ Паралелно с индикаторите, са предложени методите, комбинацията от методи за тяхното определяне, система от критични контролни точки по време, място и показател, корелации за обратен контрол, т.е. предложени са всички елементи, необходими за формиране на стратегии за контрол, адаптирани към конкретна технология за производство на биогаз.**

Тук е мястото отново да подчертаем, че **в нашата разработка ние не предлагаме технологии, нито тяхното моделиране и оптимизиране.** Фокусирайки се върху най-динамичната част от управлението /контрола/, проследихме и предлагаме **стратегии за вътрешен функционален контрол**, адаптирани по ефективност и ефикасност за съответните изследвани технологии:

**1/ Технологии за производство на биогаз в метантанкове на големи градски пречиствателни съоръжения, работещи при непрекъснат режим**

**Стратегия 1:** за бърз контрол - флуоресцентна индикация с F<sub>420</sub>, за прецизен контрол се прилага и паралелен анализ с флуоресцентни хибридационни техники.

**2/ Технологии за производство на биогаз при периодичен режим и суровини слама и царевичак**

**Стратегия 2:** начален контрол с фосфатазна активност, последващ бърз контрол - флуоресцентна индикация с F<sub>420</sub>, за прецизен контрол се прилага и паралелен анализ с флуоресцентни хибридационни техники.

**3/ Хибридни технологии за производство на биогаз в малки пречиствателни станции при комбинирани суровини - активни утайки и растителни отпадъци**

**Стратегия 3:** начален контрол с фосфатазна активност, последващ бърз контрол - флуоресцентна индикация с F<sub>420</sub>, за прецизен контрол се прилага и паралелен анализ с флуоресцентни хибридационни техники. В този случай успешността и ефективността на първата фаза зависят от мацерацията /предварителната обработка/ на суровините, което може да стане след обработка с ултразвук.

**4/ Технологии за производство на биогаз със суровини хранителни отпадъци**

**Стратегия 4:** за бърз контрол - флуоресцентна индикация с F<sub>420</sub>, за прецизен контрол се прилага и паралелен анализ с флуоресцентни хибридационни техники.

## **VI. Изводи**

**Относно критичните проблеми в изследваните технологии за производство на биогаз:**

1. Критични проблеми в биотехнологиите за производство на биогаз са: 1/ липсата на адекватни биоиндикатори за функционален контрол и управление на метаногенезата; 2/ ниска концентрация на метан и разширяване на възможностите за приложение на биогаза като биогориво; 3/ необходимост от съвместно оползотворяване на различни типове биоотпадъци и създаване на хибридни технологии.

2. Стратегиите за функционален контрол са конструирани на два етапа - 1/ създаване в хода на технология за непрекъснато култивиране /метантанковете на СПСОВ „Кубратово” и 2/ последваща верификация и адаптация при технологии с периодично действие за доказване на универсалност на биоиндикаторната система.

**Относно създаването на стратегиите за флуоресцентен контрол на метаногенезата в МТ на СПСОВ „Кубратово”:**

3. При флуоресцентния анализ, базиран на ко-фактор F<sub>420</sub>, най-високо съотношение среден размер кълстери/брой кълстери се установява през юлското пробовземане при всички МТ. Това корелира с най-високата продукция на биогаз през този сезон в три от четирите изследвани МТ.

4. Най-високо количество микроорганизми от домен *Archaea*, определени чрез FISH метода, е установено при есенното пробовземане за повечето МТ. Анализът регистрира ясно формирани кълстери от *Archaea*. Предполага се, че тези зони са местообитанията на най-активните метаногени със силно изразени синтрофни и синергитични взаимоотношения, допринасящи за големия добив биогаз и метан.

5. Изследваните ключови метаногени (*Methanosaeta sp.*, *Methanosarcina sp.*, сем. *Methanobacteriaceae*) съставят 75% от микробното съобщество на домен *Archaea*.

6. Чрез целеви FISH анализ в МТ се установяват стабилни съобщества от ксенобиотико-разграждащи микроорганизми от *p. Acinetobacter* и *p. Pseudomonas*, което показва, че с вторичните утайки в МТ постъпват токсични вещества, а тяхната биодegradация продължава и в хода на метаногенезата. Това се потвърждава и от натрупването на полифосфати, които са индикатор за изчерпването на резервните енергетични източници - полихидроксibuтират и полихидроксиацетат.

**Относно верификацията на стратегията за функционален контрол в разнообразни технологии за производство на биогаз:**

7. Съотношението аeДХА/анДХА в БР5 и 6 са индикатор за това, че микробното съобщество е с висока метаболитна активност. Тази активност е насочена към биодegradация на органиката, а не към продукция на биогаз, което се доказва от ниските корелации с общата и специфичната продукция на биогаз.

8. Индексът на фосфатазната активност е значим индикатор за първите фази на анаеробна биодegradация като корелациите с общата, специфичната продукция на биогаз и корелацията със специфичната продукция на метан са между 62-65%.

9. Най-висока стойност на съотношението среден размер/брой кълстери е установено в БР1, утвърждаващо най-висока степен на поддържане на синтрофни и синергитични взаимоотношения между метаногенните представители сред реактори БР 1-6. Установява се висока корелация между интензитета на флуоресценция на ко-фактор F<sub>420</sub> и общата и специфична продукция на биогаз и специфичната продукция на метан между 66-74%.

10. Представителите на археите, определени чрез FISH метода, достигат 25% от общото количество микроорганизми в БР1. В него се установява сформирани на стабилно активно метаногенно съобщество.

**Относно стратегиите за функционален контрол и предложенията за повишаване на ефективността и ефикасността на хибридни технологии за производство на биогаз в малки населени места:**

11. Хибридни технологии за съвместно третиране на суровини от различни източници утайки от пречиствателни станции, разнообразни растителни суровини, са потенциална възможност за решаване на енергийните проблеми на малки населени места под 10000 жители. В тези случаи са необходими иновации, свързани с първоначална обработка на суровините, за тяхното подходящо модифициране и ефективно включване в метаногенезата.

12. Показателите от флуоресцентния анализ, базиран на ко-фактор  $F_{420}$ , и количественото определяне на микроорганизмите от домен *Archaea* чрез FISH метода имат висок потенциал за адекватен функционален контрол и управление на технологиите за производство на биогаз.

13. Създадените системи за флуоресцентен и ензимологичен контрол на процесите на анаеробна биодеградация и на метаногенезата са подходящи за приложение в стратегии за функционален контрол и управление на технологиите за производство на биогаз.

## **VII. Приноси**

### **1. Приноси с оригинален характер**

1.1. Въведени са нови индикатори за биологичен контрол на технологиите за производство на биогаз – среден размер/брой клъстери, интензитет на флуоресценция, площ на флуоресцентните обекти, други МО/*Archaea*.

1.2. Създадена е био-индикаторна система за оценка и контрол на МТ, базирана на автофлуоресценцията на ко-фактор  $F_{420}$ . Подобна система за контрол и управление на метаногенните процеси се прилага за първи път в реални технологии за производство на биогаз.

1.3. За първи път е направено обвързване на функционирането на МТ, третиращи утайка, с количеството микроорганизми от *p. Acinetobacter* и *p. Pseudomonas*, и с натрупването на полифосфати.

1.4. Установени са корелациите между продукцията на биогаз и метан и различни показатели с потенциал за включването им във функционалния контрол на технологиите за производство на биогаз за целева и бърза индикация.

### **2. Приноси с потвърдителен характер**

2.1. Потвърдена е основната теория, че домен *Bacteria* доминира над домен *Archaea* в анаеробни МТ.

2.2. Потвърдени са изследванията и на други автори, в които процентът на домен *Archaea* в МТ, третиращи утайка от пречистването на отпадъчни води, е със средна стойност 20%.

2.3. Потвърдено е, че метаногените от *p. Methanosaeta*, *p. Methanosarcina* и сем. *Methanobacteriaceae* са доминиращите представители на археите в МТ, преработващи утайка от пречистването на отпадъчни води.

2.4. Потвърдено е определящото значение на междуорганизмовите взаимоотношения за биодеградация и ефективно осъществяване на анаеробните процеси в МТ.

## **IX. Участия в научни проекти**

### **Статии в реферирани списания и с импакт фактор:**

1. Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Rangelov J., Topalova Y. (2018), Control of biogas production process by enzymatic and fluorescent image analysis, *Biotechnology and biotechnological equipment*, <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1425637> (IF2017=1.227)
2. Dinova N., Peneva K., Belouhova M., Rangelov J., Schneider I., Topalova Y., (2018), FISH analysis of microbial communities in a full-scale technology for biogas production, *Engineering in life sciences*, (DOI) - 10.1002/elsc.201800041 (IF2017=2.385)

### **Статии в български списания:**

1. Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2016) Functional control of the technologies for biogas production, *Ecological Engineering and Environment Protection*, No 1, 2016, p. 52-64
2. Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y. (2017), Development of a bio-indicative control system of the technologies for biogas production, *Ecological Engineering and Environment Protection*, IX, Supplement 1, 2017, p. 87-95

### **Участия в конференции:**

Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2017), Increase of the effectiveness and the efficiency of the technologies for biogas production through a system for functional control, 70 years the Stephan Angeloff Institute of Microbiology – BAS, International scientific conference – Microbiology for a better health and industry, March 14-15th 2017

Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2017), Bio-indicative control system of the technologies for biogas production from food bio-waste, FOOD-3 International Conference “The challenges for quality and safety along the food chain” NBU, Sofia, Bulgaria, March 23-25th 2017

Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2017), The role of the dehydrogenase and phosphatase activities in the functional control of the technologies for biogas production, Fifth international conference “Ecological engineering and environment protection” 2017 (EEEP’2017), Plovdiv, Bulgaria, June 5-7th 2017

Dinova N., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2017), Study of the functioning and the activity of the biological system in the technology for biogas production of WWTP “Kubratovo”, Youth scientific conference "Kliment's days", Sofia, Bulgaria, November 16-17th 2017

Dinova N., Belouhova M., Rangelov J., Schneider I., Topalova Y., (2018), Study of the methanogenic consortium in the digesters of WWTP “Kubratovo”, XII National scientific-technical conference with an international participation “Ecology and Health 2018”, Plovdiv, Bulgaria, June 7th 2018

Динова Н., Белухова М., Шнайдер И., Топалова Я., (2018), Биогаз - от класически технологии към иновативни бизнес решения, Да печелим от отпадъци, София, България, 14ти Юни 2018г.

Dinova N., (2018), Innovative and business aspects of the processes of biogas production, School for young scientists: Innovation and business processes, part of John Atansoff celebration days – 115th anniversary, International conference “Automation and informatics’2018”, Sofia, Bulgaria, October 3rd 2018



Dinova N., Tagarev G., Belouhova M., Schneider I., Topalova Y., (2018), Polyphosphates and representatives of the xenobiotic-degrading complex in anaerobic digesters treating sludge, International scientific conference "Kliment's days", Sofia, Bulgaria, November 8-9th 2018

#### **X. Участия в научни проекти**

1. Създаване на зона за компостиране в Биологически факултет с технология за обработка на растителни отпадъци, Ръководител – доц. д-р Ирина Шнайдер, ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“, Договор № 72/12.04.2016 г.

2. Функционален контрол на метаногенезата в технологии за производство на биогаз, Ръководител – доц. д-р Ирина Шнайдер, ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“, Договор № 8010-1/12.04.2017 г.

3. Съвместен проект със „Софийска вода“ АД – „Жива вода – река, язовир, биоразнообразие, живот“, Ръководител – проф. дбн Яна Топалова

4. Приложение на флуоресцентен *in situ* хибридационен анализ във функционалния контрол на технологиите за производство на биогаз, Ръководител – доц. д-р Ирина Шнайдер, ФНИ на СУ „Св. Климент Охридски“, Договор № 80-10-17/17.04.2018 г.

5. Проект BG16RFOP002-1.002-0404 „Създаване на активни биокомпоненти и нанотранспортни фактори за решаване на критични проблеми на кожата“, финансиран от Оперативна програма „Иновации и конкурентноспособност“ 2014-2020, Ръководител – проф. дбн Яна Топалова

6. Участие в създаване и развитие на Център по компетентност «Чисти технологии за устойчива околна среда – води, енергия, отпадъци за кръгова икономика» с координатор проф. дбн Яна Топалова.

#### **XI. Литература, използвана в автореферат**

1. Кочетов Г. А., 1980, Практическо ръководство по ензимологии, Изд. “Высшая школа”, Москва

2. Лазарова П., Хубенов В., Денчев Д., 2009, Микробиологичен статус на мезофилен процес за анаеробно разграждане на оборски тор, Екологично инженерство и опазване на околната среда, 2, стр. 55-60

3. Топалова Я., 2009, Биологичен контрол и управление на водопречистването, PublishSciSet-Eco, София

4. Хубенов В., 2015, Анаеробно разграждане на органични отпадъци в мезофилен и термофилен режим на култивиране, Дисертация, БАН – Институт по микробиология „Стефан Ангелов“

5. Daims H, Lückner S, Wagner M., 2006, daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. Environmental microbiology, 8, pp. 200-213.

6. Demirel B., Schere P., 2008, The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review, Reviews in environmental sciences and biotechnology, 7 (2), pp. 173-190

7. Ju F., Fang H., Zang T., 2015, Application of metagenomics in environmental anaerobic technology, in: Fang H., Zang T., (Eds.), Anaerobic biotechnology: Environmental protection and resource recovery, Imperial college press, London, pp. 73-108

8. Lenhard G., Nourse L.D., Schwarz H.M., 1965, The measurement of dehydrogenase activity of activated sludges. *Advances in Water Pollution Research*. In: Jaag O., Baars J.K., Pearson E.A. (Eds.). *Proceedings of the 2nd International Conference*; Tokyo, Japan; Aug 1964. Oxford: Pergamon Press; pp. 105–119.

9. Matavuly M., Bokorov M., Gayin S., Gantar M., Stoyilkovicy S., Flint K.P., 1990, Phosphatase activity of water as a monitoring parameter. *Water science and technology*, 22 (5), pp. 63-68.

10. Nielsen P., Daims H., Lemmer H., 2009, *FISH Handbook for biological wastewater treatment – Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH*, IWA Publishing

11. Regueiro L., Veiga P., Figueroa M., Alfonso-Gutierrez J., Stams A.J., Lema J.M., Carballa M., 2012, Relationship between microbial activity and microbial community structure in six full-scale anaerobic digesters, *Microbiological research*, 167, pp. 581-589

12. Schneider I., Ducheve M., Yotinov I., Todorova Y., Daskalova E., Topalova Y., Stefanova V., 2016, Effect of mazut on structural and functional indicators of activated sludge in Sofia wastewater treatment plant “Kubratovo”, *Ecological engineering and environment protection*, 2, pp. 27-35

13. Torres L., Bandala E., 2014, *Energy and environment nowadays*, Nova Science Publishers, Inc.

## БЛАГОДАРНОСТИ

\*\*\*

Изказвам най-искрената си благодарност към научните ми ръководители проф. д-бн Яна Топалова и доц. д-р Ирина Шнайдер за споделените идеи, насоките, съдействието и подкрепата при изработването на този дисертационен труд и в изграждането ми като специалист. Благодаря Ви от все сърце за топлото отношение, добрите примери и уроци, както в професионален, така и в житейски план!

Благодаря на гл. ас. д-р Михаела Белухова, която бе мой задухисен ръководител в усвояването на флуоресцентните техники, а в чисто човешки план - опора и приятел във всяка ситуация!

Благодаря на всички преподаватели от Катедра „Обща и приложна хидробиология“ за споделените знания и опит! Специални благодарности изказвам на доц. д-р Йована Годорова, гл. ас. д-р Ивайло Йотинов и Елмира Даскалова за това, че винаги ми оказваха безрезервна подкрепа и съдействие през тези години.

Благодаря на проф. Райчо Димков и всички останали колеги, които с препоръките си спомогнаха дисертационният труд да бъде издигнат на едно по-високо ниво!

Благодаря на всички партньори, които ни предоставиха проби и споделиха информацията за функционирането на технологиите за производство на биогаз, които управляват и без които този дисертационен труд нямаше да бъде факт! Благодаря на Виктор Атанасов и екипа на ОП „СПТО“, които освен това ми помогнаха да натрупам опит в управлението на инсталация за производство на биогаз на практика; на инж. Желяз Рангелов и Васил Николов от СПСОВ „Кубратово“, „Софийска вода“ АД; на доц. д-р Иван Симеонов, доц. д-р Денчо Денчев и гл. ас. Венелин Хубенов от Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН; на проф. д-н Венко Бешков и д-р Иван Ангелов от Институт по инженерна химия, БАН.

Благодаря на доц. д-р Стоян Чакъров, който предостави олигонуклеотидните сонди за флуоресцентните *in situ* хибридизационни анализи, на доц. д-р Илиана Иванова и доц. д-р Милена Мурджева за съдействието при заснемане на флуоресцентните изображения.

Благодаря на всички студенти-магистри, които участваха в експерименталната работа по настоящата дисертация!

Благодаря от цялото си сърце на семейството ми и мъжа до мен за помощта, подкрепата, разбирането, търпението и куража, които ми даваха през цялото време!

Благодаря Ви!