

Soproni Egyetem

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Anaerob fermentációs folyamatok optimalítása a
mikroalga alkalmazhatóság továbbá a mikroelem
adagolás tekintetében**

Szabó Piroska Gabriella

Sopron
2017.

Soproni Egyetem
Erdőmérnöki Kar
Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola
Biokörnyezettudomány Program

Témavezető:
Dr. Rétfalvi Tamás

BEVEZETÉS

A világ fokozódó energiaigénye, a fosszilis energiátartalmak kimerülésének veszélye, valamint használtuk környezetkárosító hatása révén szén-alapú társadalmunk felismerte a megújuló energiaforrásokban rejlő lehetőségeket. A sokoldalúan alkalmazható biomassza, ezen belül pedig a biogáz előállítás fontos szerepet játszhat a nap-, szél-, vízenergia hasznosítás mellett. A legfrissebb tanulmányok azonban azt vetítik előre, hogy a jelenleg nagy tömegben fermentált alapanyagok jelenléte a jövőben csökkenni fog, új módszerek fognak előtérbe kerülni. Ilyen alternatívát jelenthet a mikroalgák anaerob fermentációja, az értekezés egyik fő célja a jelenlegi technológiákhoz történő illeszthetőségük vizsgálata volt.

A lebontás optimális működését a mikroelem adagolás jelentősen befolyásolja, így további célok között szerepelt a cukorrépa préselt szelet monofermentációja során alkalmazott mikroelem adagolás metánkihozatalra gyakorolt hatásainak elemzése.

Az anaerob fermentáció széleskörű, flexibilis használata mellett a komplex hasznosítás szintén előremutató kérdés az ágazatban, a fermentációs maradék magas szervesanyag tartalma miatt a talajerő javítás eszközeként szolgálhat. A gyakorlatban történő alkalmazhatóság céljából növényi tesztorganizmokon vizsgáltam az ökotoxikológiai aspektusokat, a fémek akkumulációját elemanalitikai analízissel követtem nyomon.

Célkitűzések

1. *Chlorella vulgaris* és *Scenedesmus sp.* mikroalga fajok jelenlegi anaerob fermentációs technológiákhoz történő illeszthetőségének vizsgálata. Monofermentációs vizsgálatok révén a kedvezőbb mikroalga faj kiválasztása további kofermentációs kísérletek végrehajtásához.
2. A lebontás során esetlegesen fellépő inhibíciós hatások elemzése analitikai módszerekkel. A klasszikus titrimetriás meghatározások mellett nagyműszeres kromatográfiás eszközök, HPLC-UV, GC-MS alkalmazása a metabolitok analíziséhez.
3. Kofermentációs vizsgálatok elvégzése mikroalga és különböző mezőgazdasági eredetű ipari melléktermékekre vonatkozóan, az optimális működés és maximális terhelhetőség meghatározása céljából.
4. Különböző szárazanyag tartalmú mikroalga biomassza metántermelési potenciáljának vizsgálata, a feltételezett hígulás mikrobiális összetételre gyakorolt hatásának elemzése.
5. Az anaerob fermentáció során alkalmazott mikroelem adagolás hatásának vizsgálata a metán kihozatalra cukorrépa préselt szelet monofermentációja esetében. A feltételezett pozitív hatás igazolása és számszerűsített értékének meghatározása.
6. A mezőgazdasági, erdészeti területeken történő alkalmazási lehetőségek meghatározása céljából

különböző mikroelem kezelésű kiejedt fermentiszapok ökotoxikológiai értékelése növényi tesztorganizmokon, valamint az egyes fémek akkumulációjának nyomon követése az alkalmazott iszapokban, talajokban és a biomasszában.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti elrendezés

1. Monofermentáció

- 3% és 10% N-tartalmú tápoldatban tenyésztett *Chlorella vulgaris* mikroalga anaerob fermentációja
- 3% és 10% N-tartalmú tápoldatban tenyésztett *Scenedesmus sp.* mikroalga anaerob fermentációja

2. Kofermentáció

- Kettes kofermentáció: *Chlorella vulgaris* + használt sütőolaj/kukoricaszilázs/malomipari korpa alkalmazása
- Szárazanyag tartalom változásának vizsgálata: 3,8% és 7,2% szerves szárazanyag tartalmú szubsztrát mix (*Chlorella vulgaris*, használt sütőolaj)
- Hármes kofermentáció: SBPP/kukoricaszilázs (70%) + *Chlorella vulgaris* (20%), használt sütőolaj (10%) együttes alkalmazása.

3. Mikroelem adagolás

- Metántermelésre gyakorolt hatás vizsgálata SBPP monofermentáció esetében, három különböző kezelésű csoport felállítása:
 - a. kezeletlen: mikroelem adagolás nélkül,
 - b. kezelt (2 $\mu\text{L/L/nap}$ mikroelem),
 - c. kezelt+Fe (2 $\mu\text{L/L/nap}$ mikroelem+ 82 $\mu\text{L/L/nap}$ Fe(III)-klorid 40%-os oldata)

- Ökotoxikológia: SBPP, kukoricaszilázs monofermentációjából származó iszapokon végzett gyökérnövekedés gátlás fehér mustár (*Sinapis alba*), biomassza hozam vizsgálatok tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* L.) tesztszervezeteken.
- Mikroelem analízis: talaj, iszap, biomassza

*összetétele 1 kg oldatra vonatkoztatva: 1625 mg cink, 13 640 mg mangán, 93 mg bór, 20 000 mg nikkel, 600 mg réz, 50 000 mg kobalt, 228 mg molibdén és 113 mg szelén.

Anaerob fermentáció

Kísérleteimet fél folyamatos rendszerben laboratóriumi körülmények között a VDI 4630 német szabvány alapján végeztem. A vizsgálatok során alkalmazott aktív oltóiszapok a kaposvári biogáz üzemből származtak. Az oltóiszap terhelését 2500 mL névleges térfogatú sötétített fermentorüvegekben, (Merck & Co., Germany) 1000 mL térfogatú iszappal hajtottam végre. Az állandó mezofil tartományt (38 °C iszap maghőmérséklet) vízfürdők (Memmert WNB 14 Basic, Memmert GmbH. & Co.) segítségével biztosítottam. A fermentorok keverését manuálisan, naponta 3 alkalommal végeztem el. A termelődött biogázt Tedlar® teflonzacskókban gyűjtöttem, mennyiségét naponta mértem gáztömör Hamilton fecskendővel (Sigma Aldrich Co.). A biogáz metántartalmát heti rendszerességgel ellenőriztem Ecoprobe 5-IR talajlevegő-analizátor segítségével (RS Dynamics Ltd, Czech Republic). A kutatás során alkalmazott alapanyagok legfontosabb paramétereit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat Az anaerob fermentációs kísérletek során alkalmazott szubsztrátok paraméterei

| | TS% | VS% | C% | N% | S% | C/N |
|--------------------------|-----|-----|-------|------|-------|------|
| Cukorrépa préselt szelet | 20 | 91 | 47,04 | 3,38 | 0,30 | 14 |
| Kukoricaszilázs | 30 | 29 | 46,92 | 2,25 | 0,23 | 21 |
| Malomipari korpa | 88 | 81 | 44,28 | 2,66 | 0,25 | 17 |
| Használt sütőolaj | 100 | 99 | 82,57 | 0,08 | 0,001 | 1032 |

A monofermentációk során felhasznált mikroalga biomassa a Mosonmagyaróvári Alga Kultúra Gyűjteményből származott (MACC). A termesztés csöves fotobioreaktorokban történt (Agro-Bioferment Rt.). A betakarítás Alfa Laval Clara 80 szeparátor (Alfa Laval, Sweden) segítségével történt. A kofermentációs kísérletek során liofilizált *Chlorella vulgaris* mikroalga port alkalmaztam.

2. táblázat Az alkalmazott mikroalgák főbb paraméterei

| | lipid (%/TS) | fehérje (%/TS) | össz. szénhidrát (%/TS) |
|---|-----------------|-------------------|----------------------------|
| <i>Chlorella vulgaris</i> (MACC-452) monofermentáció | 34,4 | 15,9 | 43,5 |
| <i>Scenedesmus sp.</i> (MACC-401) monofermentáció | 23,7 | 24,3 | 24,7 |
| <i>Chlorella vulgaris</i> (liofilizált algapor) kofermentáció | 11,2 | 60,2 | 13,5 |

Analitikai vizsgálatok

Az iszap titrált savtartalmának meghatározását saját módszer alapján hajtottam végre (*Rétfalvi et al., 2013*).

Az iszap szerves sav összetételét HPLC-UV (Gynkotec M 480-as pumpa, TOSOH 6040 UV detektor, 20 ml-es feltöltő hurok, Rheodyne 8125 injektor, Aminex HPX-87H oszlop segítségével végeztem el.

Az iszap KOI tartalmának meghatározását az MSZ ISO 6060 szabvány, NH_4^+ tartalmat az MSZ ISO 7150-1 szabvány, az összes foszfor tartalmat az MSZ 488/18-77 szabvány alapján végeztem.

A mikroelem analízist ICP-OES (iCAP 6300 Duo ICP-OES, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA) műszer, a CNS tartalom meghatározását Elementar vario MAX CNS analizátor (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) és WLD detektor segítségével hajtottam végre.

Ökotoxikológiai vizsgálatok

A kiejedt fermentiszapok ökotoxikológiai értékelése céljából akut toxicitási tesztet alkalmaztam fehér mustár (*Sinapis alba*) tesztszervezeten. A gyökérnövekedés gátlási vizsgálatokat az STN 83 8303:1999 szabvány alapján hajtottam végre. A fölősiszapok mikroelemek akkumulációjának szántóföldi flórára gyakorolt hatását statikus akut toxicitási tesztel elemeztem. Tenyészedényes kísérleteim során a tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* L.) biomassza hozamát az STN EN 14735:2006-03 (83 8300) szabvány alapján vizsgáltam.

Metagenomikai vizsgálatok

A DNS szekvenálás Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) szekvenátorral valósult meg. A mintakönyvtárak előkészítése a Life Technologies IonXpress Plus Fragment Library Kit protokollja szerint történt, a DNS tisztítása PureLink PCR Purification Kit segítségével történt.

Statisztikai értékelés

Leíró statisztikai elemzések során a Microsoft Excel programot alkalmaztam. A variancia analízist STATISTICA 10 (Version 10, StatSoft, Tulsa, OK, USA) program, a sokváltozós adatelemzést (PCA-főkomponens elemzés) a „Chemometrics-Add-In” Microsoft Excel bővítmény segítségével végeztem el.

AZ EREDMÉNYEK TÉZISSZERŰ ISMERTETÉSE

1. tézis

A mikroalga termesztés során alkalmazott tápoldat nitrogéntartalma hatással van a szüretelt mikroalga anaerob fermentációjának fajlagos metánhozamaira. A hatás mértéke és iránya mikroalga faj specifikus. *Chlorella vulgaris* (MACC 452) esetén 3%-ról 10%-ra növelve a tápoldat nitrogéntartalmát az iszaptérfogatra számított fajlagos metánhozam 7,6%-kal, a szerves száraz anyagra vonatkoztatott metánhozam 59,8%-kal nőtt, ugyanakkor a *Scenedesmus* (MACC 401) esetén a tápoldat nitrogéntartalmának megegyező változása az iszaptérfogatra számított metánhozamot 54,2%-kal, a szerves száraz anyagra vonatkoztatott metánhozamot 9,6%-kal csökkentette.

2. tézis

Cukorrépa préselt szeletre alapozott félfolyamatos anaerob kofermentációs kísérleteim alapján liofilizált *Chlorella vulgaris* és használt sütőolaj hozzáadásával eredményes kofermentáció valósítható meg. A szerves szárazanyag alapján 20% (liofilizált *Chlorella vulgaris*) és 10%-os (használt sütőolaj) részarány mellett a szerves szárazanyagra vonatkoztatott metán kihozatal 18,4%-kal, az iszaptérfogatra vonatkoztatott metánhozam 26,2%-kal emelkedett a cukorrépa préselt szelet monofermentációjához képest. A megtermelt biogáz metántartalmában 10,8%-os növekmény érhető el.

3. tézis

A liofilizált *Chlorella vulgaris* és kukorica szilázs 50-50% szerves szárazanyag részarány mellett végzett kofermentációja használt sütőolaj alkalmazásával 70% kukorica szilázs, 20% liofilizált *Chlorella vulgaris* és 10% használt sütőolaj szerves szárazanyag részarány mellett a szerves szárazanyagra vonatkoztatott metánhozam tekintetében 38,9%-os intenzifikálás érhető el.

4. tézis

Félfolyamatos laboratóriumi körülmények között végzett cukorrépa préselt szelet monofermentációja során a szerves komplex formában lévő mikroelem pótlás hatására a szerves szárazanyagra vonatkoztatott metánhozam 11,0%-kal nőtt. A mikroelem adagolás további kedvező hatása, hogy szerves anyag túlterhelést követően az iszap titrált savtartalmi értéke gyorsabban csökken, az iszap rövidebb idő alatt visszaterhelhető.

5. tézis

A mikroelem adagolás hatással van az anaerob iszapok ökotoxikológiai aspektusaira. A *Sinapis alba*-n (fehér mustár) végzett szabványosított gyökérnövekedés gátlási tesztek alapján a cukorrépa préselt szelet és kukorica szilázs anaerob fermentációjából származó, mikroelemmel kiegészített iszapjaira stimulációs hatást fejt ki, ugyanakkor az iszapok hígítási arányának növekedésével csökken a stimuláló hatás.

A *Hordeum vulgare* L. (tavaszi árpa) biomassza termelésére a kukorica szilázs mikroelemmel kezelt iszapja gátló hatást (23,8 IC%) gyakorol, a mikroelemmel és vassal kezelt iszap esetében azonban stimuláció (-89,4 IC%) figyelhető meg.

Az értekezés témakörében megjelent publikációk

Nemzetközi lektorált folyóiratban megjelent publikáció

- **Szabó, P.**, Hybská, H., Bolodár-Varga, B., Rétfalvi, T., (2017). Evaluation of trace element supplementation for methane production and ecotoxicological aspects of sugar beet pressed pulp. *Applied Ecology and Environmental Research* (megjelenés alatt)

- Rétfalvi, T., **Szabó, P.**, Tukacs-Hájos, A., Albert, L., Kovács, A., Milics, G., Neményi, M., Lakatos, E., Ördög, V., (2015). Effect of co-substrate feeding on methane yield of anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Applied Phycology*. 28. 2741-2752.
DOI 10.1007/s10811-016-0796-5

- Tukacs-Hájos, A., Szendefy, J., Maróti, G., Pap, B., **Szabó, P.**, Rétfalvi, T., (2014). Monitoring of thermophilic adaptation of mesophilic anaerobe fermentation of sugar beet pressed pulp. *Bioresource Technology*, 166. 288-294.
DOI 10.1016/j.biortech.2014.05.059

- Rétfalvi, T., Tukacs-Hájos, A., **Szabó, P.**, (2013). Effects of artificial overdosing of p-cresol and phenylacetic acid on the anaerobic fermentation of sugar beet pulp. *International Biodeterioration & Biodegradation* 83. 112-118.
DOI 10.1016/j.ibiod.2013.05.011

Tudományos közlemény - konferencia kötetben

- **Szabó P.**, Hybská H., Bolodár-Varga B., Rétfalvi T., (2017). A mikroelem adagolás ökotoxikológiai hatásainak vizsgálata silókukorica fermentiszapon. MKE XIII. Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Program és előadás összefoglalók, p. 63. ISBN 978-963-9970-77-9

- **Szabó P.**, Ördög V., Rétfalvi T., (2016). Effect of C/N ratio on anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* microalgae Biogas Science 2016, Book of abstracts, pp. 66-67. ISBN 978-3-900932-21-3

- **Szabó P.**, Rétfalvi T., Tukacs-Hájos A., Albert L., Ördög V., Kovács A., Milics G., Neményi M., Lakatos E., (2015). Effect of C/N ratio of anaerobic fermentation of *Chlorella* microalgae. 7th Symposium of Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems, Book of Abstracts, p. 46.

- Pozsonyiné-Oravec B., Rétfalvi T., **Szabó P.**, Albert L., Ördög V., Kovács A., Milics G., Neményi M., Lakatos E., (2015). Anaerobic fermentation of *Scenedesmus* microalgae. 7th Symposium of Microalgae and Seaweed Products in Plant/Soil-Systems, Book of Abstracts, p. 62.

- **Szabó P.**, (2013). Fermentiszapok kromatográfiás vizsgálata. In: Albert L., Szabó P. (szerkesztők) Kémia, Környezettudomány, Fenntarthatóság. Kémiai Intézet Tudományos Ülése, pp. 81-86.
ISBN 978-963-334-147-6

Konferencia előadások, poszterek

- **Szabó P.**, Rétfalvi T., (2016). Application of chromatographic methods in monitoring of anaerobic sludges. Zem v pasci? 2016 Aplikácie analytických metód v environmentálnom a požiarnom inžinierstve Hodruša-Hámre, Szlovákia (poszter)

- **Szabó P.**, Pozsonyiné Oravecz B., Ördög V., Molnár Z., Rétfalvi T., (2015). A C/N arány hatása a *Chlorella* mikroalga anaerob fermentációban történő hasznosítására. Tavaszi Szél Konferencia, Eger (szóbeli előadás)

További közlemények

Tudományos közlemény - konferencia kötetben

- Rétfalvi T., **Szabó P.**, Nebehaj E., Hofmann T., (2015). Magyarországi nemestölgy hordó-faanyagok kémiai összetételének összehasonlító vizsgálata. Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar Kari Tudományos Konferencia. Konferencia kötet, p. 40.

- Rétfalvi T., Pozsonyiné Oravecz B., **Szabó P.**, Tukacs-Hájos A., (2011). A krezol okozta inhibíció vizsgálata az anaerob fermentációs folyamatokban. Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar, Kari Tudományos Konferencia. Konferencia kötet, p. 81.

- Rétfalvi T., Tukacs-Hájos A., Oravecz B., **Szabó P.**, Albert L., (2011). Analitikai kémia szerepe az anaerob fermentációs folyamatok ellenőrzésében. MKE 1. Nemzeti Konferencia, Program és előadás összefoglalók, p. 72.

- Oravecz B., Tukacs-Hájos A., **Szabó P.**, Rétfalvi T., (2011). Kémiai jelzőmolekulák vizsgálata az anaerob fermentáció során. Nyugat-magyarországi Egyetem, Tudományos Doktorandusz Konferencia, Konferencia kiadvány, pp. 46-49.

Konferencia előadások, poszterek

- Tukacs-Hájos A., Rétfalvi T., **Szabó P.**, (2012). Biogáz üzemek monitorozási rendszereinek kialakítása és előnye. Környezeti problémák a Kárpát-medencében II. Konferencia, Pécs (szóbeli előadás)

- **Szabó P.**, Pécsi J., Markó G., (2012). Moisture content fluctuation in forest road subgrades. International conference, Catchment processes in regional hydrology: from experiment to modelling in Carpathian drainage basins, Sopron, Hungary (poszter)