

TEHNOLOGII BIOENERGETICE PENTRU EPURAREA APELOR REZIDUALE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor

la

Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul Inginerie Civilă și Instalații
de către

Biol. Boboescu Iulian Zoltan

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Ion Mirel
prof.univ.dr. Mihai Dima
prof.univ.dr.ing. Diana Robescu
conf.univ.dr.ing. Laura Momeu

Ziua susținerii tezei: 07.03.2014

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 9. Inginerie Mecanică |
| 2. Chimie | 10. Știința Calculatoarelor |
| 3. Energetică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 4. Ingineria Chimică | 12. Ingineria sistemelor |
| 5. Inginerie Civilă | 13. Inginerie energetică |
| 6. Inginerie Electrică | 14. Calculatoare și tehnologia informației |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 15. Ingineria materialelor |
| 8. Inginerie Industrială | 16. Inginerie și Management |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2014

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității mele în cadrul Departamentului de Hidrotehnică al Universității „Politehnica” din Timișoara, în cadrul fondului strategic "POSDRU" 107/1.5/S/77265, parte a POSDRU România 2007-2013, cofinanțat de Fondul Social European - Investind în Oameni.

Mulțumiri deosebite se cuvin conducătorului de doctorat prof.univ.dr.ing. Ion MIREL pentru sprijinul și competența îndrumare acordată pe întreaga perioadă a elaborării tezei.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei, prof.univ.dr.ing. Daniel GRECEA, doamna prof.univ.dr.ing. Diana ROBESCU, Univ. Politehnica din București, doamna conf.univ.dr.biol. Laura MOMEU, Univ. Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca și domnul prof.univ.dr.ing. Mihai DIMA, Univ. Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei, pentru observațiile făcute și pentru timpul acordat lucrării.

Doresc să mulțumesc doamnei ș.l.dr.ing. Elena Mariana SĂVESCU pentru bunăvoința de a-mi pune la dispoziție datele și măsurătorile necesare de la stația de epurare a localității Timișoara. Deasemenea, mulțumesc domnului ing. Ioan UZUN pentru facilitarea prelevării probelor de apă reziduală generate de Fabrica de Bere Timișoreana, Ursus Breweries.

Doresc să mulțumesc domnului ș.l.dr.ing. Vasile Daniel GHERMAN pentru sprijinul și îndrumarea acordată pe durata cercetării doctorale. Deasemenea, doresc să mulțumesc doamnei dr.biol. Éva KONDOROSI pentru acceptarea desfășurării unor experimente în laboratorul de Biologie moleculară și Biotehnologii din cadrul Institutului de Cercetări Biologice al Academiei Maghiare de Științe, Szeged, Ungaria și domnului dr.biol. Gergely Maróti pentru coordonarea și supravegherea acestor activități de cercetare.

Nu în ultimul rând doresc să mulțumesc colectivului din cadrul Departamentului de Hidrotehnică, a prietenilor și a familiei pentru sprijinul profesional și personal acordat.

Timișoara, Februarie, 2014

Iulian Zoltan BOBOESCU

Boboescu, Iulian Zoltan

Epurarea apelor uzate cu producerea si valorificarea simultana a biohidrogenului

Teze de doctorat ale UPT, Seria X, Nr. YY, Editura Politehnica, 2013, 168 pagini, 39 figuri, 27 tabele.

Cuvinte cheie: procese anaerobe fermentative, ape reziduale, biohidrogen, tehnologii bioenergetice avansate.

Rezumat

În prezent omenirea se confruntă cu o criză energetică accentuată cauzată de cerințele energetice tot mai ridicate, în condițiile în care sursele principale de energie utilizate sunt reprezentate de combustibili fosili epuizabili. În același timp, utilizarea acestor surse de energie are repercursiuni negative asupra integrității biosferei prin degajarea diferiților compuși toxici și a gazelor cu efect de seră. În plus, o altă problemă ce necesită o atenție deosebită se referă la, managementul deșeurilor organice, în special a apelor uzate menajere și industriale, datorită efectului negativ a acestora asupra mediului și implicit asupra sănătății umane.

Cercetarea doctorală de față, are ca scop dezvoltarea și optimizarea unei biotehnologii prin intermediul căreia se realizează valorificare energetică a apelor uzate, prin realizarea unei tranziții de la tehnologia clasică de epurare a apelor uzate, la o tehnologie nouă de producere a biohidrogenului în urma procesului de degradare anaerobă a apelor reziduale în cadrul stațiilor de epurare a apelor uzate comunale și industriale. Hidrogenul reprezintă un transportor energetic versatil ce poate fi utilizat direct într-o gamă largă de procese tehnologice. Mai mult, în urma utilizării acestuia, sunt eliberați ca produși secundari doar vapori de apă. Avantajul acestei abordări de producere a hidrogenului în comparație cu tehnologiile existente, este și acela de a realiza o pretratare, sau chiar în unele cazuri o tratare biologică completă, a acestor ape reziduale, în paralel cu generarea unei surse regenerabile de energie, cu un impact redus asupra mediului.

CUPRINS

LISTĂ DE TABELE.....	7
LISTĂ DE FIGURI	9
GLOSAR DE TERMENI SI CUVINTE CHEIE	14
1. INTRODUCERE	17
1.1. Contextul științific.....	17
1.2. Starea actuală la nivel național și internațional.....	19
1.3. Obiectivele științifice și tehnice ale cercetării doctorale	23
2. CARACTERISTICILE APELOR REZIDUALE.....	27
2.1. Apele reziduale menajere.....	27
2.2. Apele reziduale generate de industria alimentară.....	28
2.3. Potențialul energetic al maselor organice din apele reziduale	30
3. TEHNOLOGII BIOENERGETICE PENTRU EPURAREA APELOR REZIDUALE	32
3.1. Evoluția tehnologiilor de epurare a apelor reziduale	32
3.2. Scheme bioenergetice avansate pentru epurarea apelor reziduale	37
4. PROCESE BIOLOGICE IMPLICATE IN EPURAREA APELOR REZIDUALE	44
4.1. Procesele fermentării anaerobe a nămolurilor din apele reziduale.....	44
4.2. Procesele biochimice ale nitrificării și denitrificării din cadrul epurării avansate a apelor uzate menajere.....	46
4.3. Procesele biochimice din digestoarele anaerobe de contact cu producere de biohidrogen	47
4.4. Noțiuni de proiectare experimentală	49
4.4.1. Metode factoriale simple.....	50
4.4.2. Metode multifactoriale.....	50
4.4.2.1. Metode multifactoriale complete.....	50
4.4.2.2. Metode multifactoriale fracționale.....	51
4.4.2.2.1. Metoda Taguchi	51
4.4.2.2.2. Metoda Plackett-Burman	51
4.4.2.2.3. Metoda pantei ascendente	52
4.4.2.2.4. Metodele compus centrale și Box-Behnken.....	52
4.4.2.2.5. Metoda suprafeței de răspuns	52
4.4.3. Metoda rețelelor neuronale și algoritmul genetic.....	53
4.4.4. Optimizarea răspunsurilor multiple.....	53
4.5. Modelarea matematică și simularea proceselor biologice generatoare de biohidrogen	54
4.5.1. Modelarea progresului producției de biohidrogen	55
4.5.2. Modelarea creșterii microbiene în paralel cu degradarea substratului... ..	56
4.5.3. Modelarea formării produșilor metabolici secundari și a inhibiției procesului.....	58
5. ETAPE ȘI METODE EXPERIMENTALE ABORDATE	61
5.1. Baza materială	61
5.2. Obținerea inoculilor	63
5.2.1. Prelevarea inoculilor.....	63
5.2.2. Identificarea metodelor optime de pretratament a inoculilor.....	64
5.3. Determinarea compoziției comunităților microbiene	65
5.3.1. Cultivarea microorganismelor	65
5.3.2. Extragerea și izolarea ADN-ului total	65

5.3.3. Determinarea compoziției comunităților microbiene prin metoda 16S rRNA	66
5.3.4. Caracterizarea metagenomică a comunităților microbiene	67
5.4. Proiectarea și operarea bioreactoarelor	68
5.5. Optimizarea procesului	70
5.5.1. Proiectarea experimentală	70
5.5.2. Modelarea matematică și simularea fermentației anaerobe în absența luminii cu producere de biohidrogen utilizând programele Eureka™ Pro Desktop și BioWin	75
5.6. Metode analitice	75
6. STUDII ȘI CERCETĂRI EXPERIMENTALE	77
6.1. Identificarea grupelor principale de microorganisme implicate în procesul de producere al biohidrogenului	77
6.1.1. Efectul diferitelor metode de îmbogățire a microorganismelor producătoare de hidrogen asupra metabolismului acestora	77
6.1.2. Fermentarea apei uzate sintetice utilizând diferiți inoculi microbieni	80
6.1.3. Investigarea compoziției comunităților microbiene	83
6.1.4. Discuții	84
6.2. Căile metabolice adoptate de microorganismele producătoare de biohidrogen	87
6.2.1. Fermentarea și degradarea apei uzate sintetice	87
6.2.2. Strategiile metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesele de degradare a apelor uzate cu producție simultană de biohidrogen	88
6.2.3. Discuții	90
6.3. Optimizarea procesului de producție a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale	92
6.3.1. Identificarea factorilor cheie ce influențează procesul de fermentație utilizând metoda Plackett-Burman și Taguchi	92
6.3.2. Optimizarea procesului de producție al biohidrogenului utilizând ca substrat fermentescibil apă uzată rezultată în urma proceselor industriale de producere a berii, prin metoda suprafeței de răspuns	102
6.4. Modelarea matematică și simularea proceselor de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate	109
7. CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ȘI ELEMENTE DE ORIGINALITATE	116
7.1. Conținutul lucrării	116
7.2. Concluzii generale	117
7.3. Contribuții și elemente de originalitate	119
7.4. Propuneri și recomandări	124
Anexe	126
Bibliografie	131

LISTĂ DE TABELE

Tabelul 1.1 Caracteristici ale diferitelor tipuri de ape uzate.....	17
Tabelul 1.2. Limitele de evacuare a apelor uzate conform NTPA 001/2005	18
Tabelul 1.3. Obiectivele cercetării doctorale.....	22
Tabelul 2.1. Caracteristicile fizice, chimice și biologice ale apelor uzate menajere din centrele populate.....	25
Tabelul 2.2. Caracteristicile apelor uzate din centrele populate.....	25
Tabelul 2.3. Conținutul chimic al nămolurilor din apele uzate menajere.....	26
Tabelul 2.4. Caracteristici tipice efluenților din industria berii [86].....	27
Tabelul 2.5. Caracteristicile apelor uzate generate de fabricile de bere [86].....	28
Tabelul 2.6. Concentrațiile indicatorilor de calitate a apelor reziduale.....	29
Tabelul 5.1. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în prima etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.....	71
Tabelul 5.2. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în a doua etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.....	71
Tabelul 5.3. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în a treia etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.....	72
Tabelul 5.4. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în etapa experimentală factorială completă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.....	72
Tabelul 5.5. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în etapa experimentală multifactorială Placet-Burnman și central-compusă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.....	72
Tabelul 6.1. Compoziția microorganismelor provenite din I1 în diferite etape experimentale.....	82

Tabelul 6.2. Matricea experimentală ortogonală Taguchi aplicată în prima etapă a proiectării statistice factoriale.....	91
Tabelul 6.3. Predicție a condițiilor optime de operare a bioreactoarelor pentru maximizarea FO, rezultată în urma analizei primei matrici experimentale.....	95
Tabelul 6.4. Cele două matrici experimentale Taguchi aplicate în etapa a doua a proiectării statistice factoriale.....	95
Tabelul 6.5. Matricea experimentală aplicată în etapa a treia a proiectării statistice factoriale fracționale.....	98
Tabelul 6.6. Matricea experimentală factorială completă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.....	101
Tabelul 6.7. Matricea experimentală multifactorială Placket-Burman și central-compusă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.....	102
Tabelul 6.8. Detaliile și rezultatele aplicării matricii experimentale multifactoriale Placket-Burman și central-compuse.....	102
Tabelul 6.9. Analiza ANOVA a modelului polinomial de ordin doi.....	103

LISTĂ DE FIGURI

Figura 3.1. Schema tehnologică de epurare mecanică cu producere de biogaz	32
Figura 3.2. Treapta de epurare biologică cu producere de biogaz	33
Figura 3.3. Schema tehnologică de epurare a apelor uzate colectate în sistem separativ de canalizare	33
Figura 3.4. Schema tehnologică bioenergetică de epurare a apelor uzate colectate în sistem separativ de canalizare.....	34
Figura 3.5. Stadiile bioconversiei anaerobe a substanțelor organice; este de remarcat faptul că hidrogenul rezultat în urma acetogenezei este consumat în timpul metanogenezei.....	35
Figura 3.6. Schemă de epurare bioenergetică cu digestoare în serie, cu nitrificare în bazine de nămol activat și denitrificare.....	36
Figura 3.7. Schemă de epurare bioenergetică cu bazine de nămol activat, cu nitrificare.....	37
Figura 3.8. Schemă de epurare bioenergetică cu digestoare în paralel, cu nitrificare în bazine de nămol activat și denitrificare.....	37
Figura 3.9. Schema biotehnologică de epurare cu nămol activat și filtrare pe mase granulare.....	37
Figura 3.10. Schema biotehnologică de epurare cu nămol activat și biofiltre cu cărbune activ.....	38
Figura 3.11. Schema de epurare a apelor uzate din industria alimentară.....	39
Figura 3.12. Schema de epurare cu nitrificare și adăos de reactivi chimici în bazine cu nămol activat (BNA) pentru precipitarea fosforului și denitrificare, folosind metanol.....	39
Figura 3.13. Schema tehnologică alternativă a unei stații de epurare a apelor reziduale comunale.....	40
Figura 3.14. Etapele proceselor de fermentare anaerobă.....	41

- Figura 4.1.** Căile metabolice adoptate de microorganismele strict anaerobe în timpul producerii biohidrogenului în urma degradării substratului organic (glucoza).....46
- Figura 4.2.** Reprezentare grafică a unui concept de modelare matematică a procesului de producere al biohidrogenului în urma fermentării anaerobe.....52
- Figura 5.1.** Schema tehnică a instalației experimentale Armfield.....59
- Figura 5.2.** Instalația experimentală Armfield, alcătuită din două digestoare anaerobe de contact cu suport (fix sau mobil) sau fără suport, ce pot funcționa atât în paralel cât și în serie, în regim continuu sau staționar; instalația este prevăzută cu sistem de control și monitorizare al temperaturii din digestoare, pompe pentru circularea fluidelor și recipiente prevăzute cu lichid, utilizate în captarea și contorizarea în paralel a biogazului produs.....60
- Figura 5.3.** Punctele de prelevare a microorganismelor ce urmează a fi utilizate ca inoculi în procesele fermentative de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate; **A** - fabrica de bere Timișoreana, **B** - braț închis al râului Bârzava, **C** - treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara, **D** - bioreactor al platformei de cercetare USAMVBT utilizat pentru producerea metanului în urma degradării dejecțiilor animaliere.....61
- Figura 5.4.** Realizarea diferitelor strategii de pretratament a conșorțiilor inițiale de microorganisme; **A** - pretratamentul cu căldură în baie de apă, **B** - pretratamentul cu acid utilizând HCl 1N, **C** - pretratamentul prin ultrasonicare utilizând ultrasonicatorul, **D** - inocularea conșorțiilor microbiene după aplicarea pretratamentelor.....62
- Figura 5.5.** Cultivarea pe medii solide a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.....63
- Figura 5.6.** Extragerea și izolarea ADN-ului total al microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.....64
- Figura 5.7.** Analiza genetică prin metoda 16S rRNA a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.....65
- Figura 5.8.** Caracterizarea metagenomică a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.....65
- Figura 5.9.** Inocularea în mediu lichid de îmbogățire DMI a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate, utilizând hota microbiologică anaerobă.....66
- Figura 5.10.** Inocularea apei uzate sintetice folosind microorganismele pretratate și îmbogățite în prealabil în mediu lichid de îmbogățire DMI, utilizând hota microbiologică anaerobă (**A**) și fermentarea acestora în condiții controlate de temperatură și agitare (**B**).....67

- Figura 5.11. A** - pregătirea diferitelor condiții experimentale conform matricilor propuse; **B** - răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate sintetice în cadrul matricilor experimentale dezvoltate.....68
- Figura 5.12. A** - pregătirea diferitelor condiții experimentale conform matricilor propuse; **B** - răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate rezultate în urma proceselor tehnologice de producere a berii, în cadrul matricilor experimentale propuse.....69
- Figura 5.13.** Răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate rezultate în urma proceselor tehnologice de producere a berii, în cadrul matricilor experimentale propuse, la nivelul bioreactoarelor de dimensiuni mici (**A**), medii (**B**) și respectiv mari (**C**).....70
- Figura 5.14.** Diferitele aparate utilizate pentru monitorizarea proceselor fermentative; **A** - pH metru, **B** - spectrofotometru, **C** - HPLC, **D** - gaz-cromatograf.....74
- Figura 6.1.** Conținutul de hidrogen din biogazul analizat la sfârșitul etapei de îmbogățire a microorganismelor; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....76
- Figura 6.2.** Concentrația produșilor metabolici analizați, la sfârșitul etapei de îmbogățire a consorțiilor microbiene; **Panoul A**- I1, **Panoul B**- I2, **Panoul C**- I3 și **Panoul D**- I4; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....77
- Figura 6.3.** Conținutul de hidrogen din biogazul analizat la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....79
- Figura 6.4.** Concentrația produșilor metabolici analizați, la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....80
- Figura 6.5.** Evoluția fermentației anaerobe a apei uzate sintetice în cazul inoculului martor, nesupus pretratamentelor, provenit din I1; **Panoul A**- evoluția pH-ului, **Panoul B**- rata producției de H₂ și **Panoul C**- concentrația produșilor metabolici.....80
- Figura 6.6.** Restructurarea taxonomică a microorganismelor provenite din I1 și supuse pretratamentului cu căldură, pe parcursul etapelor experimentale; **Panoul A**- structura inițială a consorțiului microbial; **Panoul B**- structura consorțiului microbial la sfârșitul etapei de îmbogățire; **Panoul C**- structura consorțiului microbial la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice.....83
- Figura 6.7.** Evoluția biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice (**Panoul A**) și procentul acestuia din totalitatea biogazului produs la finalul perioadei

de fermentație anaerobă a apei uzate sintetice (**Panoul B**); **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....86

Figura 6.8. Concentrațiile glucozei și a produșilor metabolici rezultați în urma degradării anaerobe a apei uzate artificiale. **Panoul A**- 11; **Panoul B**- 12; **Panoul C**- 13 și **Panoul D**- 14. **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....87

Figura 6.9. Valorile pH-ului înregistrate la sfârșitul experimentelor de producere a biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice; **C**- control, **A**- pretratament cu acid, **H**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **HAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.....88

Figura 6.10. Rata de producție a biohidrogenului în paralel cu degradarea glucozei și acumularea etanolului și a acidului butiric, în timpul degradării apei uzate de către microorganismele provenite din 14, supuse pretratamentului cu acid (**Planșa A**) și pretratamentului prin ultrasonicare (**Planșa B**).....89

Figura 6.11. Reprezentarea cibernetică de tipul "cutiei negre" cu structură "intrări-ieșiri" a procesului de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apei uzate.....91

Figura 6.12. Media Evoluției biohidrogenului pe perioada celor 120 de ore de fermentare a apei uzate sintetice, pentru toate cele 18 linii experimentale.....92

Figura 6.13. Dinamica efectelor FI asupra FO (producția biohidrogenului) de-a lungul celor 120 de ore de fermentare (**Coloana A**), cât și asupra deviației standard experimentale (**Coloana B**).....94

Figura 6.14. Evoluția celor două matrici experimentale Taguchi aplicate în etapa a doua a proiectării statistice factoriale; **A și B** - rata de producție a biohidrogenului de-a lungul celor 120 ore de degradare a apei uzate sintetice; **C și D** - efectul FI asupra FO la 120 ore de fermentare anaerobă a apei uzate sintetice.96

Figura 6.15. Identificarea și ierarhizarea efectului interacțiunilor dintre FI asupra FO.....97

Figura 6.16. Clasificarea importanței relative și identificarea direcțiilor de influență a FI și a interacțiunilor dintre aceștia, asupra FO; **A** - analiza efectelor principale; **B** - reprezentare Pareto.....99

Figura 6.17. Reprezentarea efectelor interacțiunilor FI asupra FO; **A** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și pretratamentele la care acesta a fost supus; **B** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și concentrația glucozei; **C** - efectele interacțiunilor dintre prezența sau absența suportului de aderare a biofilmului microbial și concentrația glucozei; **D** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și raportul dintre N/P.....99

- Figura 6.18.** Evoluția în timp a influenței efectelor și interacțiunilor FI asupra FO.....100
- Figura 6.19.** Evoluția în timp a producției biohidrogenului în urma aplicării matricii experimentale multifactoriale; **A** - matricea experimentală de tip Placket-Burman; **B** - matricea experimentală de tip central-compus.....103
- Figura 6.20.** Clasificarea importanței relative și identificarea direcțiilor de influență a FI și a interacțiunilor dintre aceștia, asupra FO; **A** - histograma Pareto; **B** - analiza efectului interacțiunilor dintre temperatura de fermentare și valoarea pH-ului inițial asupra FO.....104
- Figura 6.21.** Evoluția în timp a efectelor principale asupra FO.....104
- Figura 6.22.** Valorile observate împreună cu valorile prezise a producției biohidrogenului în urma analizei experimentale.....105
- Figura 6.23.** Analiza suprafeței de răspuns (**A**) și a conturului de răspuns (**B**, **C** și **D**) pentru producția biohidrogenului ca o funcție a temperaturii și a pH-ului106
- Figura 6.24.** Proiectarea configurației tehnologice a treptei mecanice, parte a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....108
- Figura 6.25.** Proiectarea configurației tehnologice a treptei biologice, parte a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....109
- Figura 6.26.** Proiectarea configurației tehnologice a liniei nămolului, parte a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....109
- Figura 6.27.** Calibrarea modelului matematic ce descrie procesul tehnologic desfășurat în cadrul stației de epurare al orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....110
- Figura 6.28.** Proiectarea configurației tehnologice de producere a biohidrogenului prin înlocuirea treptei anaerobe a epurării biologice, ca parte integrată în procesul de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....111
- Figura 6.29.** Rata de producere a biogazului împreună cu rata de producere a biohidrogenului de-a lungul unui an pentru unul dintre cele patru bioreactoare proiectate prin înlocuirea treptei anaerobe a epurării biologice, ca parte integrată în procesul de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.....112
- Figura 6.30.** Compoziția biogazului (**A**) și caracteristicile efluentului (**B**) de-a lungul unui an, simulate în urma implementării schemei bioenergetice ca parte integrată în procesul de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.113

GLOSAR DE TERMENI SI CUVINTE CHEIE

Biogaz - în general se referă la gazul produs de către un grup divers de microorganisme, în urma degradării anaerobe a substanțelor organice. Compoziția acestuia este dominată de prezența metanului (65-70%), urmată de prezența dioxidului de carbon (25-30%) și mici cantități de hidrogen sulfurat, vapori de apă și siloxani.

Biohidrogen - biohidrogenul este produs de către un grup divers de microorganisme anaerobe sau facultativ anaerobe, în urma degradării substanțelor organice. Acesta poate fi însă produs și de anumite microorganisme în prezența luminii, fie prin degradarea substanțelor organice simple, fie prin scindarea moleculei de apă. În general, biohidrogenul produs în urma degradării anaerobe a substanțelor organice, se află în amestec cu azot și cantități foarte mici de dioxid de carbon și metan.

Bazin de activare cu procese aerobe și anaerobe - reprezintă o componentă a epurării biologice a apelor reziduale. Prezintă în general o treaptă aerobă în care se realizează procesele microbiologice de nitrificare prin adăugarea de oxigen, urmată de o treaptă anaerobă de denitrificare, prin care se asigură eliminarea nitraților în urma activității microorganismelor facultativ sau strict anaerobe.

Bioreactor anaerob (digestor) - bazin etanș, de diferite forme și mărimi, în interiorul căruia au loc procese fermentative de degradare a substanțelor organice, conduse de către un grup divers de microorganisme anaerobe, în urma cărora rezultă biogaz sau biohidrogen. Aceste bioreactoare sunt proiectate pentru a funcționa fie în regim static, cu încărcarea influentului și fermentarea integrală a acestuia, fie în regim dinamic, cu alimentare continuă sau intermitentă a influentului.

Căi metabolice - strategii metabolice adoptate de microorganismele investigate, sub influența diferiților factori ecologici externi.

Energie alternativă neconvențională - reprezintă o formă de energie diferită de cele utilizate în prezent, bazate pe arderea combustibililor fosili. În general, energiile alternative neconvenționale au caracter regenerabil și utilizarea acestora este neutră sau chiar negativă din punct de vedere al generării dioxidului de carbon.

Inocul - o populație de microorganisme formată fie dintr-o singură specie fie din mai multe specii atent selecționate, utilizată pentru a declanșa și menține un proces biotehnologic în urma căruia se urmărește obținerea anumitor funcții obiectiv (produsii metabolici, biogaz, biohidrogen, etc.).

Material organic combustibil - conține resturile vegetale (solid, semilichid și lichid) utilizate în producția de energie, provenite fie în urma prelucrării materialului lemnos (rumeguș, resturi lemnoase, etc.), fie din culturi vegetale modificate genetic

și suplimentate cu nutrienți proveniți din nămol bogat în metale grele și poluanți, ce nu sunt destinate consumului uman (soia cu modificări genetice, sfeclă de zahăr cu modificări genetice, etc.).

Material organic comestibil - conține resturile vegetale provenite din industria alimentară, alterate.

Metagenomica (metagenomics) - reprezintă o tehnică a biologiei moleculare ce face posibilă caracterizarea sistemelor genetice complexe și a căilor metabolice urmate de organismele parțial sau deloc cultivabile.

Microorganismele autotrofe - sunt acele microorganisme capabile de a produce compuși organici complecși din diferite substanțe simple, utilizând energie provenită fie direct de la soare (fotosinteză), fie provenită în urma reacțiilor chimice (chimiosinteză).

Microorganismele heterotrofe - sunt acele microorganisme ce nu au abilitatea de a fixa carbonul anorganic, utilizând astfel carbonul organic provenit din degradarea substanțelor organice.

Microorganismele anaerobe - stau la baza proceselor microbiologice anoxice. Aceste microorganisme nu au nevoie de oxigen pentru a se dezvolta, acesta fiind toxic pentru ele.

Microorganismele facultativ anaerobe - reprezintă microorganisme capabile de respirație aerobă în prezența oxigenului însă în același timp pot realiza tranziția metabolică spre fermentație anaerobă în absența oxigenului.

Microorganismele aerobe - stau la baza proceselor microbiologice oxice. Aceste microorganisme au nevoie de oxigen pentru a se dezvolta în condiții normale.

Microorganismele microaerofile - aceste microorganisme au nevoie de concentrații mici ale oxigenului (2-10%) pentru a se dezvolta în condiții normale.

Microorganismele patogene - reprezintă în general agenți infecțioși capabili de a provoca o serie de afecțiuni mai mult sau mai puțin grave în organismele gazdă infectate (animale, plante, fungi sau chiar alte microorganisme).

Microorganismele nepatogene - nu influențează negativ organismele cu care intră în contact. Sunt admise în anumite limite în evaluarea calității apelor, produse alimentare, etc.

Nămol activat - reprezintă un amestec grosier de apă uzată și o comunitate puternic dezvoltată de microorganisme capabile de a degrada substanțele organice din aceste ape reziduale.

Pile de combustie - reprezintă un sistem proiectat pentru convertirea unui gaz în electricitate prin intermediul unei reacții chimice cu oxigenul. Cel mai folosit gaz este hidrogenul însă mai pot fi folosite și gaze naturale sau metanol. Avantajul principal al utilizării hidrogenului în aceste sisteme este acela că în urma interacției chimice

cu oxigenul rezulta electricitate și vapori de apă, fiind astfel o alternativă cu impact redus asupra mediului.

Procese microbiologice criofile - se desfășoară la temperaturi scăzute (în unele cazuri chiar și spre 0°C) și sunt guvernate de microorganisme capabile de a își susține metabolismul la aceste temperaturi extreme. Datorită temperaturilor scăzute la care au loc aceste procese microbiologice, timpii de reacție sunt în general foarte lungi.

Procese microbiologice mezofile - se desfășoară la temperaturi medii, cuprinse în general între 20-35°C.

Procese microbiologice termofile - se desfășoară la temperaturi ridicate (în unele cazuri atingând chiar și 75°C) și sunt guvernate de microorganisme capabile de a își susține metabolismul la aceste temperaturi extreme. Datorită temperaturilor foarte ridicate la care au loc aceste procese microbiologice, timpii de reacție sunt în general foarte scurți.

Prođuși metabolici - reprezintă diferitele substanțe rezultate în urma metabolismului microorganismului, în funcție de căile metabolice adoptate de către acestea.

Substrat fermentescibil - este în general reprezentat de diferite substanțe organice simple și complexe, sub forma apelor reziduale, deșeuri animale și vegetale, etc., utilizate în procese de fermentare anaerobă în vederea obținerii anumitor răspunsuri (prođuși metabolici, biogaz, biohidrogen, etc.).

Tehnologii bioenergetice ecologice (prietenose cu mediul) - reprezintă acele tehnologii bioenergetice în urma cărora rezultă combustibili sau vectori energetici a căror utilizare nu eliberează compuși chimici dăunători mediului înconjurător sau sănătății umane.

Fermentația hidrolitică - prima etapă a degradării anaerobe a substanțelor organice, hidroliza reprezintă reacția în urma căreia moleculele organice complexe sunt convertite în monomeri simpli în urma activității bacteriilor hidrolitice.

Fermentație acidogenă - a doua etapă a degradării anaerobe a substanțelor organice, acidogeneza reprezintă reacția în urma căreia monomerii simpli sunt convertiți în acizi grași volatili în urma activității bacteriilor acidogene.

Fermentație acetogenă - a treia etapă a degradării anaerobe a substanțelor organice, acetogeneza reprezintă reacția în urma căreia acizi grași volatili sunt convertiți în acid acetic, dioxid de carbon și hidrogen în urma activității bacteriilor acetogene.

Fermentație metanogenă - ultima etapă a degradării anaerobe a substanțelor organice, metanogeneza reprezintă reacția în urma căreia acetatii sunt convertiți în metan și dioxid de carbon în timp ce hidrogenul este consumat, în urma activității bacteriilor metanogene.

1. INTRODUCERE

1.1. Contextul științific

Principalele probleme cu care se confruntă omenirea la nivel global în ultimele decenii sunt reprezentate de creșterea demografică accelerată [45]. Odată cu această creștere, apar o serie de probleme ce variază de la creșterea cantității de deșeuri organice rezultate în urma activității umane, cu repercursiuni grave asupra mediului, până la epuizarea resurselor energetice ale planetei [26]. În ceea ce privește deșeurile organice, apele reziduale reprezintă o sursă majoră de infecții. Astfel rezultă necesitatea dezvoltării unor tehnologii de epurare a acestor ape uzate menajere și industriale. Primele tehnologii de epurare a apelor reziduale erau compuse dintr-o treaptă mecanică de epurare și o treaptă de producere a biogazului. Aceste stații de epurare a apelor reziduale s-au dovedit a fi însă insuficiente pentru a asigura eliminarea unui efluent la standardele actuale de calitate. În continuare, aceste stații de epurare au fost completate cu o treaptă biologică secundară, în care erau dezvoltate procesele de nitrificare prin aerarea bazinelor biologice. În ultimii ani însă, aceste tehnologii de epurare a apelor reziduale au fost completate cu o treaptă biologică avansată, în cadrul căreia se dezvoltă procesele anaerobe de denitrificare. Astfel, compușii de azot (N) și fosfor (P) sunt complet eliminați din efluent, atingându-se condițiile actuale stricte de calitate. În plus, aceste stații de epurare a apelor reziduale sunt prevăzute cu o treaptă separată de tratare a nămolului provenit din decantoarele primare. Datorită creșterilor consumului specific, înregistrate în ultimii ani, s-a făcut simțită necesitatea îmbunătățirii liniei tehnologice a proceselor de epurare a apelor reziduale, astfel încât materialul organic prezent în aceste ape să fie suficient pentru dezvoltarea microorganismelor aerobe și anaerobe ce stau la baza proceselor de nitrificare și denitrificare. Astfel s-a realizat o scădere a timpilor de retenție a apei în decantorul primar de la 1,5 ore la 0,5 ore, sau chiar în unele cazuri o eliminare completă a acestora. În aceste condiții s-a încercat realizarea neutralizării nămolului prin intermediul bioreactoarelor (digestoare sau bazine de contact), dispuse în serie sau în paralel, în vederea eliminării materiilor organice și a compușilor pe bază de N și P. În acest context, teza de doctorat încearcă să aducă o contribuție în sensul de a răspunde cerințelor impuse de legislația de mediu referitoare la poluanții din efluent și nămolul reținut.

În contextul global al epuizării resurselor de petrol, sustenabilitatea resurselor de energie reprezintă o importantă problemă actuală. La nivel mondial, cererea de energie va crește constant în următorii ani, rezervele de combustibili fosili nefiind suficiente pentru alimentarea acestor nevoi crescânde [60]. Un bun management al deșeurilor, în special a celor sub forma apelor reziduale ar putea oferi o soluție la această problemă, diminuând energia necesară depozitării și epurării acestora. Cantitatea de ape reziduale produsă la ora actuală în urma activității societății umane este foarte mare, însă o cantitate considerabilă din aceste deșeuri înmagazinează cantități foarte mari de energie care ar putea fi recuperată odată cu degradarea acestora [4]. Un astfel de exemplu îl reprezintă deșeurile organice sub formă de ape uzate și nămoluri rezultate din Industria Alimentară:

fabrici de bere, lapte, mezeluri, dar și din stațiile de epurare municipale, ca de exemplu nămolul în exces rezultat în cantități foarte mari în urma proceselor de epurare biologică avansată a apelor uzate [70]. În prezent, aceste ape reziduale sunt puțin valorificate din punct de vedere al recuperării energiei prin degradarea lor. Tehnologiile existente și utilizate în prezent, recuperează o parte din această energie sub forma metanului, utilizat mai apoi fie direct prin combustie fie indirect pentru obținerea electricității [27]. Fermentarea anaerobă în metantancuri (digestoare) a nămolului cu un raport de apă/materii organice de 0,4 - 0,5, duce la producerea biogazului cu un conținut de metan de aproximativ 65-70%, în cazul apelor bogate în materii organice. Acest procedeu a fost observat și descris pentru prima dată de către contele Alessandro Volta, care asociază biogazul produs pe fundul anumitor lacuri cu cantitatea de materie organică degradată anaerob de către microorganismele metanogene. Aceste procese biologice sunt de o mare complexitate, fiind determinate de o serie de factori fizici, chimici și biologici. Astfel, biogazul obținut poate fi, din punct de vedere al conținutului de metan (CH_4), combustibil sau inert.

Există microorganisme prezente în natură, inclusiv cele aflate în deșeurile organice, capabile să genereze compuși cu conținut energetic deosebit de mare, ce pot fi folosiți ca și vectori alternativi de energie [136]. Biomasa poate fi convertită astfel în bioetanol, biogaz cu un mare conținut de metan sau în biohidrogen, prin intermediul diverselor procese biologice [73]. Biogazul bogat în CH_4 , prin caracteristica sa, se manifestă ca un element poluator pentru mediu. În plus, biogazul în exces nu se transportă datorită costurilor mari necesare pentru lichifierea acestuia. Datorită acestor neajunsuri, analizându-se procesul de producere al biogazului, s-a observat o etapă preliminară, etapa acidogenă, în cadrul căreia rezultă hidrogenul (H_2), numit și biohidrogen. Acest biohidrogen, prin natura sa, reprezintă un vector energetic valoros, cu caracteristici superioare biogazului bogat în CH_4 . Descompunerea hidrogenului nu generează poluanți spre deosebire de etanol sau metan, a cărui folosință duce la eliberarea unor cantități mari de gaze cu efect de seră [53]. În plus, hidrogenul deține cel mai mare conținut de energie pe unitate de masă dintre toți combustibilii cunoscuți (142 kJ/g sau 61,000 Btu/lb) și poate fi transportat în scopul consumului domestic sau industrial prin intermediul mijloacelor convenționale [64]. De asemenea, hidrogenul reprezintă o sursă regenerabilă de energie și o alternativă ideală la combustibilii fosili, necontribuind la efectul accelerat de seră [79]. Astfel, hidrogenul satisface toate condițiile unui combustibil alternativ regenerabil și cu impact redus asupra mediului. Folosirea lui în pilele de combustie este considerabil mai eficientă în comparație cu combustia necesară la ora actuală pentru conversia combustibililor clasici în energie mecanică [23]. Recent, subiectul abordat privind tehnologii bioenergetice din cadrul epurării apelor uzate menajere, face obiectul unei serii de publicații ce v-a fi elaborată în 12 volume, cu titlul "Compendiumul științelor energetice și a tehnologiilor". Acesta v-a include un volum dedicat cercetărilor din domeniul producerii hidrogenului, cu o serie de capitole ce fac referire la tehnologiile bioenergetice de obținere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale. Astfel, rezultatele obținute în cadrul cercetării doctorale, completează și pun în evidență condițiile de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apelor reziduale.

1.2. Starea actuală la nivel național și internațional

Dezvoltarea exponențială a industriei în ultimul secol a atras după sine o presiune sporită asupra echilibrului ecologic mondial. Resursele cele mai vulnerabile la aceste pericole sunt în special cele de apă. Acest lucru a dus la dezvoltarea atât a unor reglementări referitoare la calitatea apelor cât și a unor organisme de monitorizare a calității apelor, în special a celor dulci, potențial destinate consumului uman. Astfel s-au identificat diferite surse de poluare a acestor surse de apă, în funcție de caracteristicile proceselor tehnologice ce utilizează apele respective (tabelul 1.1).

Tabelul 1.1 Caracteristici ale diferitelor tipuri de ape uzate

Tip apă	Caracteristici
Ape menajere	CBO5: 200-600 mg/l
Reziduuri de la prelucrarea diferitelor țesuturi vegetale	CBO5: 200-5000 mg/l Solide în suspensie: 50-1800 mg/l
Reziduuri de la crescătoriile de porcine	CCOCr: 100 000 mg/l Solide totale: 70 000 mg/l
Efluenți de la crescătoriile de bovine	CBO5: 20 000 mg/l CCOCr: 100 000 mg/l Solide totale: 120 000 mg/l

România a fost declarată de Uniunea Europeană drept zonă de interes ecologic și vulnerabilă în același timp, motiv pentru care se impune asigurarea unui grad avansat de epurare a apelor reziduale, atât pentru cele menajere cât și pentru cele industriale. Strategia României de aderare la Uniunea Europeană implică necesitatea rezolvării problemelor de protejare a mediului prin modernizarea tehnologiilor existente, prin realizarea și punerea în funcțiune a unor instalații noi, performante și prin oferirea unor servicii adaptate exigențelor normelor de mediu. Astfel calitatea ecologică a surselor de apă constituie o problemă de interes național și internațional. Prin reglementările în domeniu se arată faptul că în receptorii naturali este interzisă deversarea oricăror tipuri de ape uzate fără o prealabilă epurare care să o facă compatibilă calitativ cu receptorul.

Pentru epurarea apelor uzate se urmărește parcurgerea unor etape pe două linii: linia apei, în care are loc reținerea substanțelor poluante din apele uzate; linia nămolului, în care are loc prelucrarea substanțelor reținute din ape uzate, sub formă de nămoluri.

Această epurare a apelor reziduale se realizează datorită necesității readucerii la starea inițială a acestora din punct de vedere a unor parametri fizici, chimici și biologici ca: încărcătura organică, concentrația anumitor nutrienți precum azotul și fosforul, valoarea pH-ului, încărcătura microbiană etc. În România, apa uzată deversată în emisari trebuie să respecte limitele reglementate prin NTPA 001/2005 (tabelul 1.2).

Tabelul 1.2. Limitele de evacuare a apelor uzate conform NTPA 001/2005

Nr.crt.	Indicatorul de calitate	U.M.	Valorile limită admise
1	Temperatura	°C	35
2	pH		
3	Materii în suspensie (MS)	mg/dm ³	35,0
4	CBO ₅	mgO ₂ /dm ³	25
5	CCO-Cr	mgO ₂ /dm ³	125
6	Azot amoniacal(NH ₄)	mg/dm ³	2,0 (3,0)
7	Azotiți(NO ₂ ⁻)	mg/dm ³	1,0 (2,0)
8	Azotați(NO ₃ ⁻)	mg/dm ³	25,0 (37,0)
9	Azot total	mg/dm ³	10,0 (15,0)
10	Sulfuri și hidrogen sulfurat	mg/dm ³	0,5
11	Sulfiți	mg/dm ³	1,0
12	Sulfați	mg/dm ³	600
13	Fenoli antrenabili cu vapori de apă	mg/dm ³	0,3
14	Substanțe extractibile cu solvenți	mg/dm ³	20,0
15	Produse petroliere	mg/dm ³	5,0
16	Fosfor total	mg/dm ³	1,0 (2,0)
17	Detergenți sintetici	mg/dm ³	0,5
18	Cianuri totale	mg/dm ³	0,1
19	Clor rezidual liber	mg/dm ³	0,2
20	Cloruri	mg/dm ³	500
21	Fluoruri	mg/dm ³	5,0
22	Reziduu filtrat la 105°C	mg/dm ³	2000
23	Calciu	mg/dm ³	300
24	Plumb	mg/dm ³	0,2
25	Cadmium Cd ²⁺	mg/dm ³	0,2
26	Crom total	mg/dm ³	1,0
27	Crom hexavalent	mg/dm ³	0,1
28	Fier total ionic	mg/dm ³	5,0
29	Cupru	mg/dm ³	0,1
30	Nichel	mg/dm ³	0,5
31	Zinc	mg/dm ³	0,5
32	Mercur Hg ²⁺	mg/dm ³	0,05
33	Argint	mg/dm ³	0,1
34	Aluminiu	mg/dm ³	5,0
35	Molibden	mg/dm ³	0,1
36	Seleniu	mg/dm ³	0,1
37	Mangan total	mg/dm ³	1,0
38	Magneziu	mg/dm ³	100
39	Cobalt	mg/dm ³	1,0

În multe cazuri, în special atunci când apele reziduale conțin concentrații ridicate de materii organice, procesele de epurare a acestora pot fi însoțite de tehnologii de obținere a energiei sub forma biogazului bogat în metan. Acest lucru reduce considerabil costurile de operare a stațiilor de epurare, în funcție de rata de producție a biogazului și a concentrației de metan din acesta [8384; 101]. În cadrul acestor procese, poluanții și deșeurile organice sunt convertite în biogaz cu un conținut mare de metan printr-o serie de reacții în lanț declanșate de un grup distinct de microorganisme [86; 9195; 98]. Complexele organice sunt mai întâi hidrolizate și fermentate în acizi grași, care mai apoi sunt convertiți la acetat și hidrogen și, în cele din urmă, la metan [137]. Prin comparație cu procesele de epurare aerobă a deșeurilor/apelor uzate, procesul metanogenic prezintă mai multe avantaje intrinseci: (a) economisirea energiei care altfel ar fi necesară pentru aerare (b) reducerea producerii de nămol și (c) producerea unui combustibil rapid utilizabil - metanul. Puterea calorică a biogazului ce prezintă un conținut mare de metan este de 5500-5900 Kcal/Nm³ și cea utilizabilă la arzătoare este de 4750 Kcal/Nm³. În compoziția biogazului predomină metanul (70%) și dioxidul de carbon (30%). 1m³ de biogaz este echivalent cu: 1 kg cox; 1,27 Nm³ gaz de iluminat, 5,1Kwh; 0,56 kg motorină și 0,47 Nm³ gaze naturale [110]. Până în prezent, la nivel mondial au fost instalate peste 2000 de sisteme metanogene la scară funcțională de epurare a apelor uzate [91].

În ultimii ani, accentul a început să fie pus pe dezvoltarea proceselor anaerobe noi pentru convertirea poluanților organici în biohidrogen, în locul metanului. Hidrogenul reprezintă un vector energetic superior metanului din două motive: în primul rând, hidrogenul are o arie de aplicație mult mai extinsă în comparație cu metanul, putând fi folosit pentru sintetizarea amoniacului, alcoolului și aldehydelor, cât și pentru hidrogenarea uleiurilor, a petrolului, carbonului și a uleiului sintetic, în timp ce metanul este folosit doar ca și combustibil [52]. În al doilea rând, hidrogenul este un combustibil ideal, producând doar apă și produs secundar în urma combustiei. Hidrogenul poate fi folosit în mod direct în motoarele cu combustie internă, sau în pilele de combustie, în scopul producerii de energie electrică [60]. Mulți specialiști în domeniul energetic sunt de părere că hidrogenul va înlocui combustibilii fosili, el reprezentând următoarea generație de sursă de energie. Unii dintre acești specialiști preconizează că o nouă economie, bazată pe utilizarea hidrogenului, va schimba fundamental natura pieței instituțiilor noastre sociale și politice, așa cum au făcut-o cărbunele în secolul XIX și petrolul în secolul XX [26]. Mai mult, metanul are un efect de seră de 21 de ori mai mare decât al dioxidului de carbon. Deși metanul constituie doar 0.00017% din atmosferă, posedă o forță de radiație de 0.47 W/m², ceea ce reprezintă 19% din forța globală actuală a efectului de seră [24].

Hidrogenul este produs în prezent la nivel comercial prin intermediul proceselor termo-chimice sau electrolitice, amândouă procese fiind însă intense din punct de vedere al producerii de energie [22]. Totuși, în natură, hidrogenul poate fi produs pe cale biologică atât de către organismele autotrofe cât și de cele heterotrofe. Organismele autotrofe, cum sunt de exemplu algele, folosesc dioxidul de carbon ca și sursă de carbon, în timp ce organismele heterotrofe folosesc materia organică ca și sursă de carbon [69]. Din punctul de vedere al specialiștilor în protecția mediului, utilizarea organismelor heterotrofe este recomandată datorită abilității acestora de a degrada poluanții organici [111].

În ultimii ani, pe măsură ce creșterea populație rămâne un proces exponențial, cantități mari de deșeuri organice sunt tot mai mult produse de industria alimentară și vatra centrelor populate. Aceste deșeuri organice au nevoie

de depozitare și tratare, în scopul prevenirii contaminării mediului și al riscurilor îmbolnăvirii populației. Acest lucru este din ce în ce mai dificil, datorită creșterii cantităților de deșeuri organice precum și costurile lor de tratare [27]. O soluție generală la aceste probleme este tratamentul și inactivarea acestor deșeuri organice odată cu producerea unei surse de energie regenerabile [53; 85]. În prezent, majoritatea proceselor de producere a energiei legate de epurarea deșeurilor organice sunt axate pe generarea metanului prin combustia căruia sunt produse gaze cu accentuat efect de seră [84]. Aceasta nu reprezintă o soluție viabilă pe termen lung având în vedere tendințele actuale la nivel mondial de a reduce utilizarea acestor gaze.

În ultimii ani cercetările în domeniu s-au axat pe dezvoltarea unor concepte și tehnologii noi de producere a biohidrogenului prin utilizarea deșeurilor organice ca și substrat fermentescibil [60]. Totuși, până în prezent niciunul dintre conceptele descrise nu a condus la realizarea unui sistem funcțional la scară industrială de producere a biohidrogenului pentru o perioadă îndelungată. Unul dintre impedimentele majore ale comercializării acestor tehnologii îl reprezintă rata scăzută de producție a acestora cât și încorporarea acestei tehnologii în cadrul strategiilor clasice de epurare a apelor reziduale [55]. Dezvoltarea cu succes a unei tehnologii de degradare a apelor uzate în paralel cu producerea biohidrogenului ar atrage după sine avantaje tehnologice și financiare enorme. Aceasta tehnologie are potențialul de a înlocui și astfel elimina anumite etape prezente în linia tehnologică de epurare a apelor reziduale, scăzând dramatic costurile de proiectare, construcție și operare a stațiilor de epurare a apelor uzate, în paralel cu obținerea unui vector energetic versatil, cu impact redus asupra mediului [15].

La nivel național, producerea biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale ca și substrat, cu excepția unor studii teoretice, reprezintă o temă neexplorată încă [15; 95]. În prezent, în România, se produce în unele stații de epurare și pre-epurare a apelor uzate, energie doar sub forma metanului. Astfel, importanța practică a cercetării doctorale va fi evidențiată prin identificarea și soluționarea unor serii de probleme tehnice și științifice care îngreunează producerea eficientă a biohidrogenului în urma utilizării diferitelor deșeuri organice ca și substrat de fermentație. În prezent, barierele științifice și tehnice ce trebuie depășite pentru a dezvolta o tehnologie fezabilă în acest sens se referă la următoarele aspecte:

- epurarea deșeurilor organice provenite din industria alimentară și vatra centrelor populate;
- diminuarea costurilor proceselor de tratare a diferitelor deșeuri organice prin cuplarea acestor procese cu producerea unei energii regenerabile și cu impact redus asupra mediului, sub forma biohidrogenului;
- îmbunătățirea producției biohidrogenului rezultat în urma degradării anaerobe a diferitelor deșeuri organice, prin optimizarea diferiților parametri care influențează acest proces;
- dezvoltarea unei noi tehnologii de producere a biohidrogenului capabilă de a înlocui tehnologia existentă de producere a metanului folosită în stațiile de epurare, prin conceperea unui sistem tehnologic rentabil din punct de vedere economic;
- proiectarea eficientă a unor pilelor de combustie capabile să utilizeze direct biohidrogenul generat direct în procesele de degradare anaerobă a apelor reziduale.

Depășirea acestor bariere tehnice și științifice ar duce la atingerea unei economii sustenabile, bazate pe hidrogen, cu impact considerabil redus asupra mediului.

1.3. Obiectivele științifice și tehnice ale cercetării doctorale

Obiectivele principale ale cercetării doctorale se încadrează în direcțiile generale Europene și internaționale de cercetare. Prin realizarea acestor obiective se va putea realiza un transfer tehnologic și de know-how către mediul economic global și național. De asemenea, se urmărește coordonarea direcțiilor de cercetare naționale cu tendințele cercetării științifice europene și internaționale, pentru un prestigiu și o mai bună vizibilitate la nivel internațional a rezultatelor cercetării științifice românești.

În urma cercetării doctorale se urmărește epurarea avansată a apelor de scurgere, concomitent cu neutralizarea nămolului, într-o tehnică unitară, coerentă, ce necesită investiții și cheltuieli de exploatare reduse. În acest context, scopul general al cercetării doctorale este acela de a propune un sistem tehnologic de producere a biohidrogenului, cu posibilă aplicație în stațiile de epurare precum și în industria alimentară, aducând astfel producerea hidrogenului prin intermediul proceselor fermentative mai aproape de comercializare. Prin eliminarea de pe linia tehnologică a apei a decantoarelor primare și înlocuirea lor cu digestoare (operate în serie sau în paralel), se pot obține reduceri importante asupra investițiilor în stațiile de epurare. În cazurile în care digestoarele incluse pe linia apei neutralizează și efectele nămolului, se obțin, prin eliminarea decantoarelor primare, reduceri importante asupra costurilor de investiție. În cadrul acestui concept, digestoarele introduse pe linia apei, au o dublă funcționalitate. În primul rând asigură, în urma proceselor de degradare anaerobă, producerea de biohidrogen. Deasemenea, acestea dezvoltă semnificativ treapta biologică de denitrificare (Tabel 1.3). În plus, nămolul rezultat în urma acestor procese biotehnologice, reprezintă un bun fertilizator pentru culturile agricole ecologice, sau pentru cele agricole cu modificări genetice (în cazul în care există prezente metale grele). Aceste aspecte motivează necesitatea implementării tehnologiilor bioenergetice pentru epurarea apelor de scurgere, în paralel cu valorificarea potențialului energetic din masele organice conținute în apele reziduale (menajere și industriale).

Astfel, obiectivele principale avute în vedere în cadrul tehnologiilor bioenergetice constau în:

- 1) reducerea sau chiar eliminarea completă a compușilor pe bază de N și P din apele de scurgere;
- 2) neutralizarea efectelor poluatoare a materiilor organice din apele reziduale;
- 3) utilizarea nămolului fermentat ca fertilizant pentru culturile agricole ecologice, în cazurile în care caracteristicile acestuia se încadrează în parametrii. Deasemenea, în condițiile în care aceste caracteristici nu sunt îndeplinite, nămolul poate fi utilizat ca îngrășământ pentru culturi energetice, cu modificări genetice. Acestea pot fi utilizate ca și sursă organică adițională pentru procesele microbiologice din cadrul digestoarelor anaerobe (corectarea raportului C/N).

Tabelul 1.3. Obiectivele cercetării doctorale

No	Obiectivele științifice
O.1	Stabilirea unor metode standardizate pentru crearea unor inoculi microbieni inițiali îmbogățiti selectiv, capabili de degradarea și epurarea substratelor organice complexe (ex. ape uzate comunale și industriale) simultan cu producerea biohidrogenului (prin intermediul proceselor fermentative);
O.2	Dezvoltarea unui proces de fermentare anaerobă a apelor uzate comunale și industriale în urma căruia să se realizeze trecerea de la tehnologia clasică de epurare a apelor uzate la o tehnologie nouă de producere a biohidrogenului prin eliminarea și înlocuirea anumitor elemente tehnologice, reducând linia nămolului;
O.3	Descifrarea căilor metabolice cheie implicate în procesele de producere a biohidrogenului în urma fermentării anaerobe a apelor uzate comunale și industriale, prin intermediul analizelor metagenomice și transcriptomice;
O.4	Identificarea atât a gradului de influență cât și a interacțiunilor prezente la nivelul diferiților factori fizici, chimici și biologici ce influențează procesul fermentativ de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate, aplicând unelte statistice de proiectare experimentală multifactorială și de interpretare a datelor;
O.5	Optimizarea proceselor de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apelor uzate comunale și industriale;
O.6	Modelarea matematică și simularea proceselor implicate în producția biohidrogenului prin degradarea anaerobă a apelor uzate comunale și industriale, în încercarea de a aprofunda atât înțelegerea acestora cât și de a dezvolta o strategie de optimizare caracteristică diferitelor tipuri de substrat utilizat (ape reziduale);
O.7	Diseminarea la scară largă a rezultatelor cercetării doctorale.

Culturile microbiene mixte tipic anaerobe nu pot produce cantități semnificative de H_2 , deoarece acesta reprezintă un intermediar pentru formarea CH_4 , astfel hidrogenul este rapid consumat de către bacteriile producătoare de CH_4 [142; 147; 159]. Una dintre cele mai eficiente metode de stimulare a producerii biohidrogenului prin intermediul culturilor anaerobe este restricționarea sau chiar înlăturarea completă a procesului metanogen, permițând astfel hidrogenului să devină un produs final al procesului metabolic [20]. Înțelegerea profundă a rolului acestor microorganisme precum și a căilor metabolice urmate de către acestea în timpul proceselor de fermentație v-a permite realizarea unui inocul inițial eficient, capabil de a derula procesele de fermentație în urma cărora rezultă biohidrogenul.

Abordarea metagenomică propusă în cercetarea noastră doctorală are rolul de a demonstra eficiența diferitelor metode de pretratament precum și evoluția în timp a populațiilor microbiene producătoare de hidrogen. Analizele metagenomice se concentrează pe acizii nucleici dintr-o mostră completă de mediu (sol, sistem digestiv, cavitatea orală umană, etc.). Acest tip de analize fac posibilă caracterizarea

sistemelor genetice complexe și a căilor metabolice urmate de organismele parțial sau deloc cultivabile [38; 139]. Aceasta este o disciplină nouă, dar care se dezvoltă rapid, iar cercetările tehnologice pot fi folosite și aplicate în cercetarea industrială, într-un mod cât mai rentabil din punct de vedere economic (capacități secvențiale, prețuri) [131]. Analizele metagenomice ne ajută să descriem, într-un mod mult mai complex, viața microscopică de pe Terra, datorită faptului că acestea nu se limitează la un număr mic de microorganisme cultivabile. Toate microorganismele trăiesc în comunități care au un rol bine definit în cadrul ecosistemului (inclusiv nămolul activ, fiind un sistem microbial complex). Cu ajutorul acestor analize, chiar și în cazul în care nu toți genomii pot fi separați, se pot determina microorganismele constituente ale acestui ecosistem, raportul exact al acestor specii, microorganismele dominante în cadrul ecosistemului, toate acestea prin procedeul de extragere a ADN-ului total din probele prelevate din diferite habitate [130]. Principalele domenii de exploatare în care sunt folosite aceste analize metagenomice de înaltă rezoluție sunt: industria alimentară, protecția mediului, cercetarea energiei obținută din biomasă, etc.; deasemenea aceste investigații sunt utilizate și în diagnosticarea diferitelor afecțiuni [51]. În plus, analiza metatranscriptomică ne oferă informații valoroase despre căile metabolice urmate de bacteriile producătoare de hidrogen, contribuind astfel la o mai bună înțelegere și un control mai bun al procesului de obținere a hidrogenului prin procese fermentative [158].

Producerea biohidrogenului prin intermediul proceselor de fermentație reprezintă un proces foarte complex, fiind influențat de mulți factori ca: inoculii microbiali inițiali, substratul fermentativ, tipul bioreactoarelor, raportul azot/fosfor, concentrația ionilor metalici, temperatura, pH-ul ș.a.m.d. [120; 151]. Efectul acestora asupra proceselor fermentative a fost îndelung discutat în cadrul studiilor întreprinse la nivel mondial în ultimii ani, existând în prezent anumite contradicții în ceea ce privește influența acestor factori asupra procesele fermentative de producere a hidrogenului, de aceea sunt recomandate mai multe studii în această privință [52; 64; 147]. În plus, majoritatea acestor studii au fost realizate în bioreactoare cu regim staționar utilizând glucoza și sucroza ca singură sursă de carbon, astfel, se recomandă în continuare realizarea studiilor referitoare la producerea biohidrogenului prin fermentare anaerobă în sisteme continue, utilizând deșeuri organice ca și substrat de fermentare [75; 157].

Metode și strategii variate au fost folosite în ultimele decenii în scopul îmbunătățirii ratelor de producție și cantitatea de biohidrogen produsă. Au fost realizate multe studii în ceea ce privește producerea biohidrogenului prin procese fermentative folosind culturi pure și mixte pe substrat sintetic sau diverse ape uzate [102; 127; 150]. Rezultatele au evidențiat rolul important pe care îl dețin un mare număr de factori fizici, chimici și biologici, influențând considerabil ratele de producție și cantitatea de hidrogen produsă [150]. În ciuda faptului că în general producerea biohidrogenului prin procese de fermentație a substraturilor de carbohidrați necesită condiții asemănătoare, există totuși variații semnificative în ceea ce privește influența și interacțiunile dintre parametri implicați în proces, în funcție de substratul organic supus fermentării [47]. Aceste variații apar chiar și atunci când este folosit același tip de substrat și aceleași tipuri de microorganisme. De aici derivă importanța optimizării parametrilor implicați în producerea biohidrogenului.

Pentru înțelegerea gradului de influență a acestor parametri se recomandă realizarea unei optimizări a procesului de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate, utilizând unelte statistice avansate de proiectare experimentală multifactorială (DOE) [106]. Această abordare reprezintă o metodă

structurată prin care anumiți factori sunt selectați și modificați intenționat într-un mod controlat în scopul obținerii unor anumite efecte ale acestora asupra procesului desfășurat. Această metodă este adesea urmată de analiza rezultatelor experimentale, din care reiese care sunt cei mai importanți parametri ai procesului, cât și interacțiunile dintre aceștia [48]. În funcție de numărul de factori care se pot investiga, proiectarea experimentală se poate clasifica în două categorii: proiectarea experimentală factorială și proiectarea experimentală multifactorială [61; 119].

Deasemenea, pentru o mai bună înțelegere și descriere a acestor procese, se recomandă utilizarea diferitelor modele matematice dezvoltate pentru a descrie mecanismele fizice, chimice și biologice ce stau la baza influenței factorilor implicați [103; 106; 126]. Aceste modele oferă informații valoroase referitoare la analiza și performanța sistemelor de producere a biohidrogenului prin fermentația anaerobă a apelor uzate. Ecuțiile matematice care descriu diferite procese chimice, fizice și biologice, sunt cruciale pentru înțelegerea completă a mecanismelor de fermentație implicate. Este astfel importantă înțelegerea operațiilor atunci când apar interacțiuni complexe [8; 116; 152]. Pentru eficiența proiectării și scalării sistemelor de producere a biohidrogenului, este necesar un model matematic potrivit al procesului. Modelarea unui astfel de proces complex necesită descrierea matematică a mai multor procese distincte cum sunt: creșterea microbiană (formarea biomasei) corelată cu degradarea substratului, precum și a produșilor rezultați (hidrogen, acizi grași volatili, solvenți, etc.) care au efecte de inhibare a întregului proces [43]. În plus, sunt dezvoltate unele modele pentru a descrie efectele mai multor parametri fizico-chimici cum sunt: temperatura, pH-ul, rata de diluție etc., asupra producerii de biohidrogen, metode realizate în pat staționar [141] sau prin fermentare anaerobă în sistem continuu [16; 71; 104; 109; 129; 154].

2. CARACTERISTICILE APELOR REZIDUALE

2.1. Apele reziduale menajere

Caracteristicile fizice, chimice și biologice ale apelor uzate menajere din centrele populate, cât și limitele de calitate admise prin normele românești pentru deversare în emisarii naturali, sunt redată în tabelul 2.1 [114115; 117; 122].

Tabelul 2.1. Caracteristicile fizice, chimice și biologice ale apelor uzate menajere din centrele populate.

Nr. Crt.	Indicatori de calitate	Concentrații la intrarea în stațiile de epurare [mg/dm ³]	NTPA 001/05
1.	MTS	110-350	35
2.	CBO5	120-300	20-25
3.	CCO-Cr	150-500	70-125
4.	NH4-N	5-10	2
5.	NO2-N	0,05-2	1
6.	NO3-N	11-40	1
7.	N	25-35	10
8.	PO4-P	6-12	4
9.	P	2-3	1
10.	pH	6,2-10	6,5-8,5
11.	T	25-35	35

Caracteristicile apelor uzate din centrele populate, în funcție de mărimea debitelor de scurgere, sunt redată în tabelul 2.2 [66; 121; 124].

Tabelul 2.2. Caracteristicile apelor uzate din centrele populate.

Nr. Crt.	Q [l/s]	MTS [mg/dm ³]	CBO5 [mg/dm ³]	SV [mg/dm ³]
1.	1800-2000	50-550	20-200	10-210
2.	250-300	35-235	20-65	12-50
3.	80-100	60-200	30-415	20-195
4.	30-50	10-500	25-627	5-185
5.	10-15	8-780	60-2740	15-375

Concentrația indicatorilor de calitate, este determinată de proveniența apelor reziduale, dar și de mărimea debitelor de scurgere [114]. Procesele biochimice de fermentare anaerobă necesare pentru producerea biogazului și pentru eliminarea nutrienților din apele de scurgere, sunt determinate, în principal, de masa organică din apele de scurgere, exprimată prin conținutul de CBO₅, de

substanțele volatile, cât și de temperaturile la care se produc procesele biochimice aerobe și anaerobe. Conținutul chimic al nămolurilor din apele uzate menajere, este redat procentual din totalul masei solide în stare uscată, în tabelul 2.3 [115].

Tabelul 2.3. Conținutul chimic al nămolurilor din apele uzate menajere.

Substanțele conținute în nămoluri	Nămol	
	proaspăt %	fermentat %
Substanțe organice (volatile)	60-80	45-60
Substanțe minerale totale	20-40	40-55
Cenușă insolubilă	17-35	35-40
Azot (N ₂)	(2,4-3,5)	(3-3,5)
Nitrat de sodiu	1-3,5	1,4
Fosfor (P ₂ O ₅)	1-3,5	0,5-3,7
Potasiu (K ₂ O)	0,2-0,5	0,4
Siliciu (SiO ₂)	...	15-16
Fier (Fe ₂ O ₃)	(3-2)	5,4
Celuloză și alte substanțe	10-13	10-13
Grăsimi și alte uleiuri	7-35	3-17
Proteine	22-28	16-21
Lignină	(5,8-8,5)	(5,2-5,6)

Caracteristicile apelor uzate determină tehnologia bioenergetică ce se poate utiliza pentru asigurarea unei producții de biogaz cât mai mari și o eficiență de operare cât mai ridicată, la toți indicatorii de calitate ceruți prin NTPA 001/2005 [57; 91; 114].

2.2. Apele reziduale generate de industria alimentară

Apele reziduale din industria alimentară constau din ape de transport și spălare a materiei prime, ape tehnologice, ape de condens sau de răcire, ape de la spălarea și dezinfectia sălilor de fabricație, a utilajelor și ambalajelor, ape de la instalațiile sanitare [96]. Acestea conțin cantități importante de reziduuri solide compuse din resturi de materie primă, produse finite rebutate, materiale neutilizabile în proces [65]. De asemenea, datorită varietății provenienței și compoziției acestora, apele reziduale se caracterizează printr-o mare fluctuație a proprietăților fizico-chimice și microbiologice [95].

Caracteristicile apelor uzate industriale variază în funcție de ramurile industriale și chiar și în cadrul aceleiași industrii, în funcție de fazele procesului de producție. Compoziția apelor uzate stabilește într-o mare măsură tipul de tehnologie de epurare adoptată, tipul și dimensiunea construcțiilor și instalațiilor care o formează. Acestea sunt determinate pe baza unor analize de laborator care pun în evidență caracteristicile fizice, chimice și biologice ale apelor. Acestea au ca scop:

- furnizarea de informații despre gradul de poluare a apei;
- stabilirea eficienței necesare pentru stațiile de epurare;

- determinarea tehnologiei de epurare necesare.

Principala caracteristică a apelor din industria alimentară o constituie încărcarea organică, concentrațiile mari a diferitelor elemente și temperaturile ridicate rezultate din procesele tehnologice de fabricație. Astfel, datorită concentrațiilor mari a acestor poluanți este necesară de cele mai multe ori o preepurare sau chiar o epurare completă a acestor ape reziduale, inclusiv în condițiile în care acestea sunt deversate în canalizarea centrelor populate.

Una dintre industriile alimentare ce utilizează cele mai mari cantități de ape reziduale este industria berii. Cea mai importantă caracteristică a apelor reziduale provenite de la fabricile de bere este varietatea mare de concentrații a substanțelor reziduale precum și volumul de ape reziduale (Tabelul 2.4). Această fluctuație este cauzată de alternarea fazelor de producție în cadrul procesului de fabricare precum și de necesarul de apă folosit la faza respectivă, unele având nevoie de cantități importante de apă, iar altele mai puțin: de exemplu, prelucrarea materiilor prime, prepararea mustului de fermentație, filtrarea, îmbutelierea etc. Efluenții de la fabricile de bere au de obicei un conținut organic ușor biodegradabil fiind constituiți în cea mai mare parte din zahăr, amidon solubil, etanol, acizi grași volatili. Pe lângă aceste reziduuri ușor biodegradabile, apa reziduală conține și reziduuri solide precum resturi de semințe de la cerealele folosite în proces, kiselgur, tescovină, drojdie neutilizată, bucăți rupte de ambalaj (sticlă sau aluminiu), bucăți de carton [87].

Tabelul 2.4. Caracteristici tipice efluenților din industria berii [86]

Parametru	Unitate de măsură	Compoziția efluentului	Repere tipice ale fabricilor de bere
Flux	-	-	2-8 hl efluent/ hl bere
CCOCr	mg/l	2000-6000	0,5-3 kg CCOCr/hl bere
CBO5	mg/l	1200-3600	0,2-2 kg CBO5/hl bere
MTS	mg/l	200-1000	0,1-0,5 kg MTS/hl bere
T	°C	18-40	
pH	-	4,5-12	
Nt	mg/l	25-80	-
Pt	mg/l	10-50	

Volumele de ape reziduale produse la fabricarea berii oscilează între 3-5 și 40-60 ori producția de bere exprimată în hectolitri; în această categorie intră și fabricile complexe bere-malt, ca și cele care nu au fabrici de malt. În funcție de gradul de recuperare a reziduurilor din apele uzate precum și de tehnologia de fabricație, indicatorii specifici de impurificare pe unitatea de produs variază, între limitele: CBO5 = 0,3 - 1,1 kg/hl bere produs; MTS = 0,1 - 1,1 s.u./hl bere produs (Tabelul 2.5). Datorită conținutului mare de substanțe organice degradabile și a germenilor de fermentare antrenați, apele uzate concentrate în special, dar și cele de spălare și clătire suferă o descompunere rapidă însoțită de acidulare și degajare de mirosuri [121].

Tabelul 2.5. Caracteristicile apelor uzate generate de fabricile de bere [86]

Felul apei uzate	Cantitatea de apă reziduală evacuată/hl bere	CBO5 mediu, mg/l	Proporția față de poluarea totală
Lichid la presarea boabelor	1,8-3,0	15000	3,5
Lichid de la presarea resturilor de hamei	1,2	7340	1,1
Apă de spălare a filtrului de plămadă	8,0	4930	4,6
Apă de spălare a drojdiei	1,5	7400	1,3
Filtrat de la separarea drojdiei	1,5	69000	13,3
Apă de spălare a instalațiilor, pierderi de bere, ape de răcire, ape menajere	-	-	-
Efluent total	1500	660	100

2.3. Potențialul energetic al maselor organice din apele reziduale

În general, atât apele reziduale menajere cât și cele provenite în urma proceselor tehnologice realizate în industria alimentară, prezintă un potențial energetic sub forma maselor organice [58]. Acest potențial poate fi exploatat sub diferite forme, în special sub forma biogazului cu conținut mare de metan sau hidrogen. Procesele microbiologice în urma cărora sunt generați acești vectori energetici sunt direct influențate de concentrația maselor organice disponibile. Astfel, pentru desfășurarea optimă a acestor procese, este necesară menținerea debitelor apelor reziduale la nivele optime. Pentru un debit mediu situat în jurul unei valori de 150 l/om·zi rezultă o proporție de aproximativ 58% materii organice și 42% materii anorganice [imhoff]. Astfel, un consum excesiv al resurselor de apă (peste 200 l/om·zi) atrage după sine atât risipa acestora cât și diluarea apelor reziduale, acest lucru ducând la reducerea maselor organice și implicit a potențialului energetic stocat în acestea. Pe de altă parte, un consum specific redus al surselor de apă (50-60 l/om·zi) poate duce la sedimentarea materiilor organice și anorganice prezente în apele reziduale, colmatând astfel rețeaua de canalizare a centrelor populate. În același timp, acest consum redus de apă denotă lipsa igienei elementare necesară menținerii în limite normale a sănătății populației.

Deasemenea, atât din punctul de vedere al potențialului energetic al maselor organice din apele reziduale cât și al sistemelor și tehnologiilor de epurare avansată a acestora, sistemul de colectare unitar este considerat perimat, deoarece apa meteorică diluează apele reziduale colectate, reducând astfel parametrii de calitate ai acesteia (Tabelul 2.6) [40]. Acest sistem unitar a fost promovat în primul rând din considerente tehnice și economice și mai puțin ecologice. Cu toate acestea, apele reziduale se supun reglementărilor specificate în NTPA 002 înainte de a fi deversate în emisari.

Tabelul 2.6. Concentrațiile indicatorilor de calitate a apelor reziduale

Indicatori de calitate	Ape uzate menajere (g/om·zi)	Ape uzate industriale (g/om·zi)
C_{MTS}	70	130
C_{CBO5}	60	200
C_{CCO}	120	280
C_N	11	60
C_P	2	5

3. TEHNOLOGII BIOENERGETICE PENTRU EPURAREA APELOR REZIDUALE

3.1. Evoluția tehnologiilor de epurare a apelor reziduale

Procesele de epurare a apelor reziduale menajere și industriale, având o aplicabilitate de peste 100 ani, au apărut ca o necesitate privind protecția emisarilor și a așezărilor urbane împotriva poluării. Tocmai de aceea, evacuarea apelor reziduale în emisari trebuie astfel făcută încât să nu afecteze folosirea ulterioară a acestora. Calitatea apelor evacuate depinde de tehnologiile de epurare adoptate, iar stabilirea acestora se face în funcție de caracteristicile fizice, chimice, biologice și bacteriologice ale apelor reziduale și ținând cont de categoriile de calitate ale emisarilor. Categoriile de calitate ale apelor de suprafață, în România, sunt reglementate de Ordinul 1146 din 10 decembrie 2002, (Anexa 1) .

Dezvoltarea accelerată a tehnologiilor casnice, diversificarea industriilor în ultimii ani a dus la accentuarea poluării chimice, biologice, bacteriologice, ceea ce a determinat adoptarea unor tehnici și tehnologii de epurare cât mai eficiente. În urma activităților umane apele se impurifică, iar deversarea acestora în emisari fără o prealabilă epurare duce la schimbarea compoziției și reduce capacitatea lor de folosință.

Epurarea apelor reziduale constituie ansamblul de măsuri și procedee prin care impuritățile de natură minerală, organică, bacteriologică conținute în apele reziduale sunt reduse sub limitele admise, astfel încât să nu afecteze calitatea mediului înconjurător.

Procesele de epurare pot fi de natură fizică, chimică, biologică sau combinate. Gradele de epurare impuse de normele de protecție a mediului se pot obține doar dacă aceste metode sunt combinate [121].

Metodele clasice sau convenționale utilizate în epurarea apelor reziduale se pot grupa în trei categorii principale:

- mecano - chimice, au ca scop reținerea materiilor în suspensie;
- mecano - biologice, ce au ca scop reducerea impurităților organice;
- avansate.

De asemenea, nămolul generat trebuie prelucrat prin procedee fizice și biologice, neglijarea acestuia conducând la anularea efectului realizat asupra mediului înconjurător de procedeele de epurare a apei [87].

Tehnologiile de epurare se bazează pe reținerea materiilor în suspensie și reducerea compușilor pe bază de carbon, azot, fosfor utilizând metode mecanice, mecano-chimice și biologice; aceste procese se combină în cazul unui anumit procedeu sau în diferite procedee, ceea ce permite obținerea unor eficiențe ridicate de epurare, precum și posibilitatea eșalonării investițiilor necesare execuției stației de epurare.

Procesele chimice intervin în cazul dezinfectării apelor reziduale în compoziția cărora predomină bacterii patogene sau la eliminarea substanțelor în suspensie, coloidale și dizolvate cu ajutorul substanțelor chimice.

Pentru eliminarea din apele reziduale a substanțelor organice în stare de soluție, acționează procesele chimice în paralel cu cele biologice, constituind așa numitele procese de natură biochimică. Procesele biologice care intervin la epurarea apelor reziduale sunt procese aerobe, condiționate fiind de existența microorganismelor aerobe a căror activitate de oxidare și mineralizare a substanțelor organice depinde de realizarea unui mediu aerob definit de existența oxigenului furnizat de atmosferă sau de apă. Cele mai importante produse ale oxidării substanțelor organice sunt bioxidul de carbon (CO_2), oxizi de azot și oxizi de sulf, iar CO_2 se degajă parțial în atmosferă.

Procesele biologice utilizate la stabilizarea depunerilor organice (nămoluri) rezultate din epurarea apelor reziduale sunt procese biologice anaerobe care folosesc, în activitatea microorganismelor oxigenul legat chimic de azot din nitriții și nitrații existenți în nămoluri. Aceste procese se realizează în bazine de fermentare a nămolurilor (metantancuri, decantoare cu etaj etc.).

Există o succesiune în timp a schemelor tehnologice de epurare a apelor reziduale, aplicate în raport cu cerințele și reglementările diferitelor etape de dezvoltare a societăților umane de-a lungul timpului. Primele scheme tehnologice au fost concepute numai cu treapta mecanica/primara cu fermentarea nămolurilor pentru producerea de biogaz în metantancuri, sau fara producere de biogaz, cu fermentarea nămolurilor în decantoare cu etaj (Fig. 3.1) [89]. Biogazul astfel obținut, era utilizat atât pentru încălzirea spațiilor componente stației de epurare cât și metantancurilor. Apa epurată mecanic era deversată direct în emisar, soluție improprie în prezent datorită nerespectării limitelor admise a indicilor de calitate actuali. Această schemă tehnologică a fost proiectată și utilizată pentru epurarea apelor reziduale ale orașului Timișoara în 1912. Mai apoi, aceste scheme tehnologice au fost completate cu o treapta biologică/ secundară, constituita din bazine de aerare cu namol activat, cu scopul de a se îmbunătăți condițiile calitative ale apelor epurate (Fig. 3.2) [89]. Epurarea biologică se poate asigura în construcții pentru epurare în condiții apropiate de cele naturale (campuri de irigare, campuri de infiltrare) sau artificiale (filtre biologice de mica și mare încărcare, filtre biologice turn, bazine de aerare, iazuri biologice, santuri de oxidare, puturi absorbante, fose septice etc.). Chiar și așa însă, apele epurate aveau încărcări ce depășeau limitele admise pentru nitriți și nitrați. Această soluție tehnologică a fost adoptată și în cadrul stației de epurare a apelor uzate provenite din orașul Timișoara, pentru a completa tehnologia existentă, Funcționând până în 2012, când s-a dat în funcțiune stația de epurare cu tehnologia modernizată.

Tehnologiile de epurare, dezvoltate în ultimii 20-25 ani s-au axat pe eliminarea compusilor de azot și de fosfor prin introducerea, în fluxul tehnologic a unei trepte biologice de epurare avansat/tertiara (Fig.3.3) [89]. Epurarea avansată se poate aplica după epurarea mecanica/primara, ca o completare a epurării biologice/secundara sau după epurarea secundara, ca treapta terțiara [87]. Epurarea avansată/terțiara se poate realiza prin: metode fizice (filtrare prin mase granulare și microrfiltrare); metode fizico-chimice (coagulare chimică, adsorbție, spumare, electroliza, osmoza inversă, distilare, înghețare, schimb ionic, oxidare chimică și electrochimică etc.); metode biologice (bazine de activare/nitrificare-denitrificare, bazine de defosforizare, bazine cu namol activat, filtre biologice, biofiltre, irigare cu ape uzate iazuri de stabilizare etc).

Tehnologiile de epurare avansată au fost prevăzute cu linii de producere și utilizare de biogaz, sistem aplicat pentru re tehnologizarea și a modernizarea stațiilor de epurare existente. În cazul stațiilor noi proiectate, tehnologiile de epurare avansată, prevăd o tratare separată a nămolurilor rezultate, cu sau fara producere

de biogaz [89; 134]. În cazurile în care apele reziduale prezintă o încărcare organică redusă, aspect provocat de existența sistemelor unitare de colectare a apelor uzate menajere și meteorice, s-a renunțat la linia tehnologică de producere a biogazului. Masa organică din aceste ape de scurgere este utilizată în totalitate în timpul proceselor microbiologice de pe linia apei (bazine de activare cu procese oxice și anoxice).

Tehnologiile de epurare aplicate cu precădere în zonele rurale și în localitățile cu colectare separativă a apelor de scurgere, au determinat găsirea unor soluții pentru realizarea epurării poluanților din apele reziduale și nămol. Pornind de la această cerință fundamentală, s-a conturat o tehnologie nouă, cunoscută sub numele de tehnologii bioingineresti, prin care sunt asigurate procesele biotehnologice pentru reținerea compușilor de N și P în paralel cu captarea energiei sub forma biohidrogenului, în urma degradării anaerobe a masei organice conținute în apele reziduale. Această tehnologie de epurare a apelor reziduale, cu producerea simultană a biohidrogenului, este redată în figura 3.4. Tehnologia propusă se caracterizează prin faptul că sunt înlocuite decantoarele primare cu digestoare anaerobe dispuse în serie sau în paralel, prin intermediul cărora se asigură captarea biohidrogenului din masele organice a apelor de scurgere. Această tehnologie elimină bioreactoarele utilizate pentru fermentarea nămolurilor. Biogazul produs poate fi utilizat pentru a genera energia utilizată în cadrul stației de epurare a apelor reziduale. Acest biogaz poate fi biogaz bogat în metan sau în hidrogen. Obținerea unei forme sau a alteia de gaz se realizează în urma unui studiu tehnic, economic, ecologic și social. Forma nouă de energie sub forma biohidrogenului, se încadrează în viziunea modernă și în cerințele impuse de UE privind valorificarea energiei alternative și a protecției mediului înconjurător.

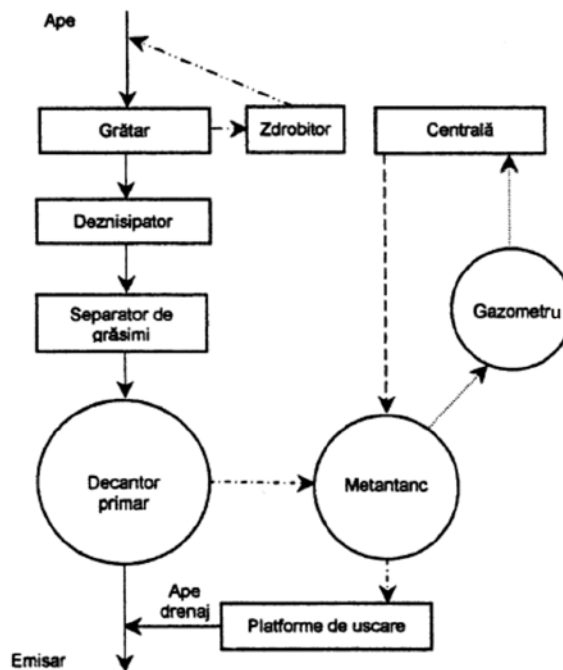


Figura 3.1. Schema tehnologică de epurare mecanică cu producere de biogaz

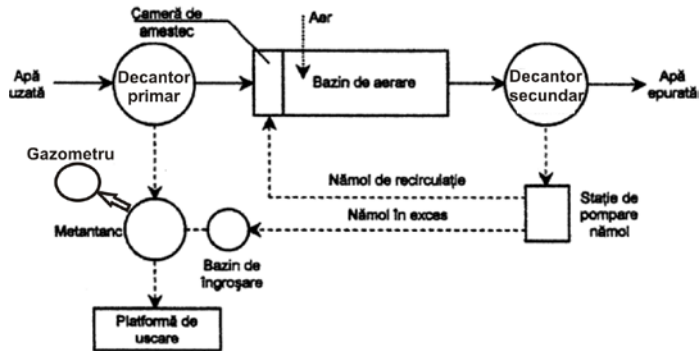


Figura 3.2. Treapta de epurare biologică cu producere de biogaz

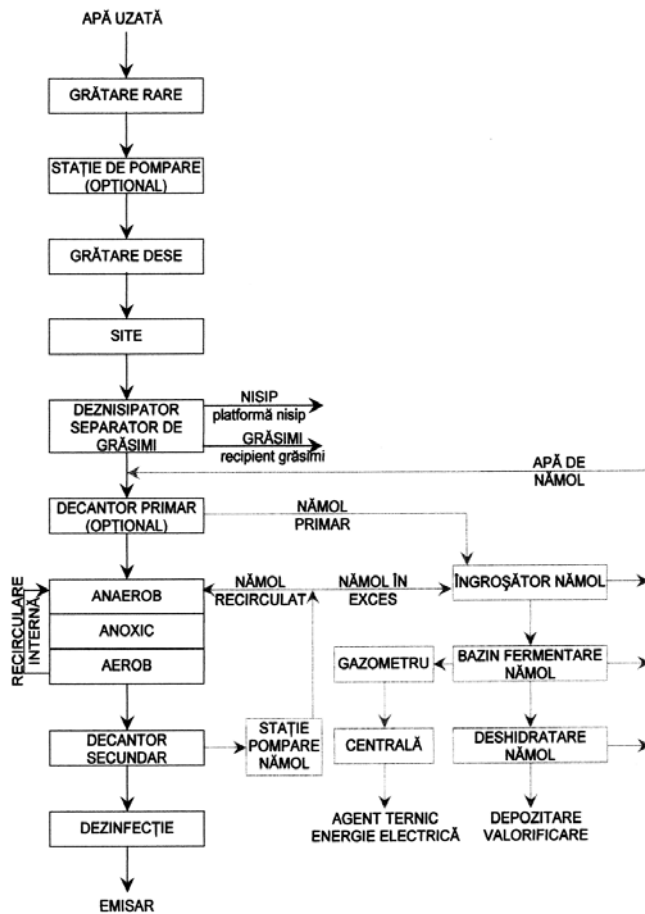


Figura 3.3. Schema tehnologică de epurare a apelor uzate colectate în sistem separativ de canalizare

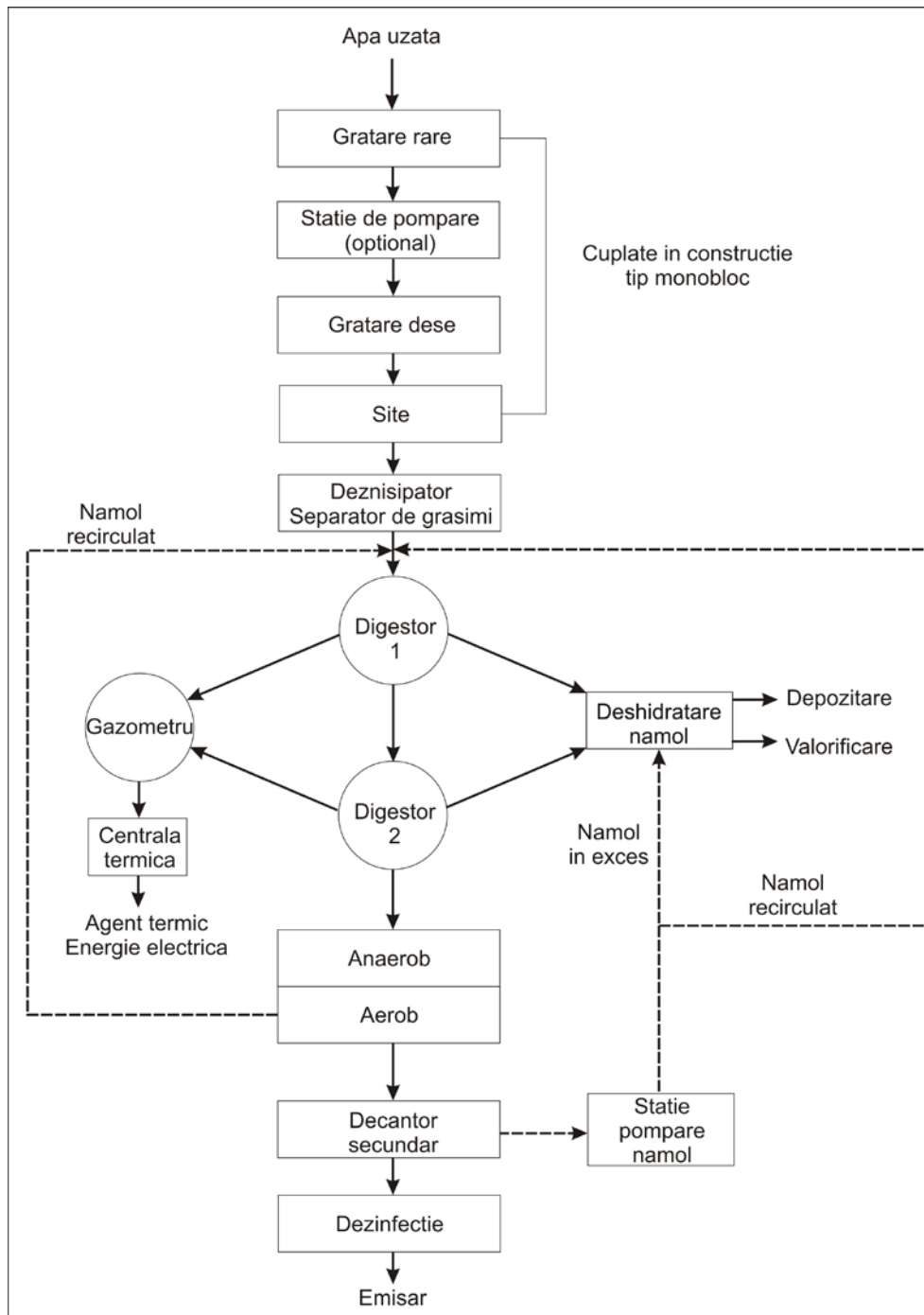


Figura 3.4. Schema tehnologică bioenergetică de epurare a apelor uzate colectate în sistem separativ de canalizare

3.2. Scheme bioenergetice avansate pentru epurarea apelor reziduale

Tehnologiile utilizate pentru epurarea apelor uzate menajere provenite de pe vatra centrelor populate, au cunoscut, în ultimii 20-25 de ani, evoluții considerabile, determinate fiind de cerințele impuse de legislația pentru protecția mediului înconjurător, dar și de Directiva Parlamentului European privind promovarea utilizării energiei din surse regenerabile. În contextul acestor cerințe, se evidențiază tehnologiile bioenergetice specifice, pentru epurarea avansată a apelor uzate menajere provenite de pe vatra centrelor populate, în paralel cu producerea de biogaz prin fermentare anaerobă a maselor organice din conținutul acestor ape (Fig. 3.5).

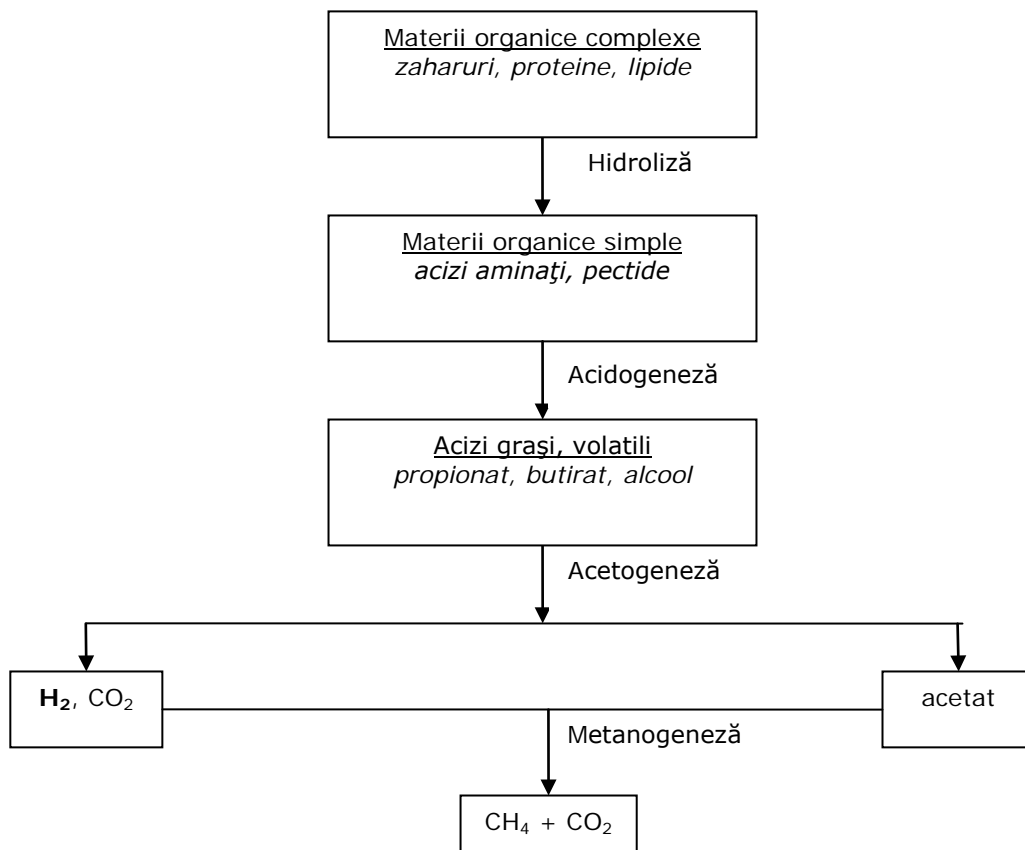


Figura 3.5. Stadiile bioconversiei anaerobe a substanțelor organice; este de remarcat faptul ca hidrogenul rezultat în urma acetogenezei este consumat în timpul metanogenezei.

Tehnologiile propuse, dezvoltă treapta de epurare mecanică (TM) a influentului (I), pentru reținerea suspensiilor grosiere, a nisipurilor și a grăsimilor, înlocuiesc decantoarele primare, cu bazine de fermentare anaerobă/digestoare (DG)

pentru producerea și captarea biogazului (GZ), urmând ca pe filiera apei, să se asigure eliminarea compușilor de azot și de fosfor, printr-o succesiune de obiecte și procese tehnologice [29; 138]. Epurarea avansată a apelor de scurgere, se poate asigura prin: bazine de activare; bazine de aerare; decantoare secundare (DS); biofiltre; membrane filtrante; filtre rapide ascendente sau descendente, echipate cu diferite tipuri de mase granulare; sisteme pentru dezinfecția apelor epurate [37].

Producția de biogaz și eficiența epurării, evidențiată prin mărirea concentrațiilor de azot și de fosfor în efluentul epurat, este determinată de caracteristicile apelor de scurgere (fizice, chimice și biologice), de succesiunea proceselor și a obiectelor componente, dar și de modul în care sunt exploatate și întreținute obiectele procesului tehnologic [9; 25]. Procesele microbiologice necesare atât pentru producerea de biogaz, cât și pentru eliminarea nutrienților pe bază de azot și fosfor, sunt posibile datorită încărcării organice și a temperaturii apelor uzate de scurgere (20-25°C) [77; 82]. Biogazul produs în digestoarele anaerobe, poate fi utilizat pentru încălzitul biomasei din reactoare (30-37°C) și a spațiilor tehnologice, dar și pentru producerea de energie electrică, prin cogenerare [81; 91; 99; 135]. Nămolul rezultat din fermentarea anaerobă mezofilă, se poate utiliza ca îngrășământ pentru terenurile cu culturi ecologice [90; 97; 100].

Tehnologiile biotehnologice pentru epurarea avansată a apelor uzate menajere provenite de pe vatra centrelor populate, se stabilesc în raport cu mărirea debitelor și de caracteristicile apelor [28].

Tehnologiile redată în figurile 3.6-3.11, dezvoltă treapta de epurare mecanică pentru reținerea corpurilor groșiere și a nisipurilor, după care sunt pompate în digestoarele anaerobe, producătoare de biogaz, urmând ca prin filiera de epurare a efluentului, să se asigure, prin diferite tipuri de construcții și instalații, eliminarea compușilor de azot și de fosfor [8788; 95; 125].

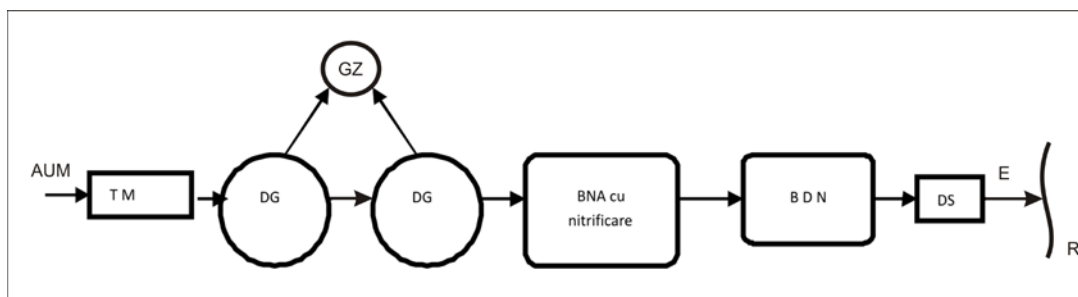


Figura 3.6. Schemă de epurare bioenergetică cu digestoare în serie, cu nitrificare în bazine de nămol activat și denitrificare.

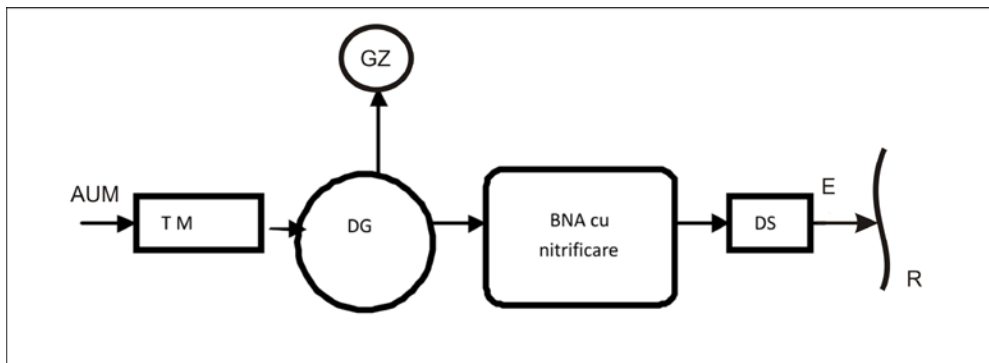


Figura 3.7. Schemă de epurare bioenergetică cu bazine de nămol activat, cu nitrificare.

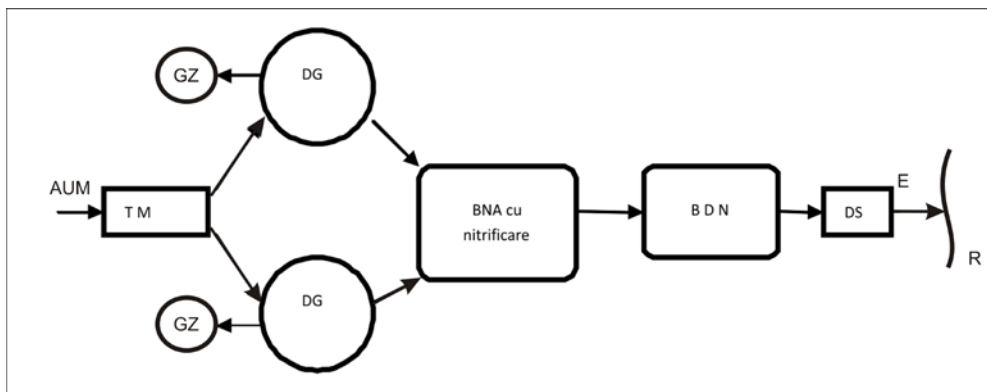


Figura 3.8. Schemă de epurare bioenergetică cu digestoare în paralel, cu nitrificare în bazine de nămol activat și denitrificare.

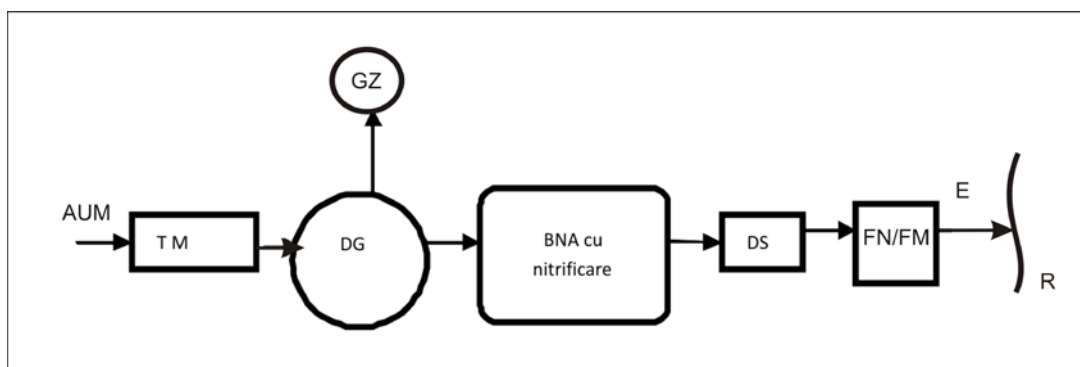


Figura 3.9. Schema biotehnologică de epurare cu nămol activat și filtrare pe mase granulare.

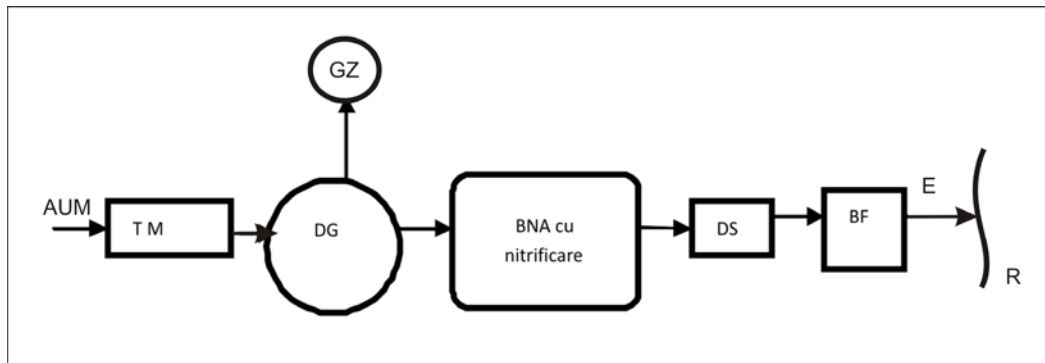


Figura 3.10. Schema biotehnologică de epurare cu nămol activat și biofiltre cu cărbune activ.

În cadrul schemelor propuse, decantoarele primare au fost eliminate, rolul lor fiind ocupat de digestoarele anaerobe, fiind inserate pe linia apei. Acestea pot funcționa în regim caloric diferit. Astfel, bioreactoarele dispuse în serie pot funcționa atât în regim termofil (la temperaturi situate în jurul a 50-55°C) cât și în regim mezofil (30-35°C). Această configurație prezintă avantajul de a necesita încălzirea doar a primului reactor pentru a asigura regimul termofil de degradare. Deasemenea, un avantaj semnificativ reprezintă faptul că în treapta termofilă există posibilitatea degradării unui procent semnificativ din masa organică disponibilă (30%), iar în treapta următoare, mezofilă, un procent similar v-a fi degradat, dublând astfel eficiența sistemului [95]. Digestoarele anaerobe utilizate pentru producerea de biogaz, dispuse în serie sau în paralel, pot fi prevăzute cu material de suport. Materialul de suport al reactoarelor anaerobe este constituit din nisip, bile de sticlă sau PVC, pentru fixarea microorganismelor și menținerea lor în stare activă, datorită faptului că apa circulă în digestoare [95]. Acest suport are însă și avantajul de a măări suprafața de contact a microorganismelor implicate în procesele de degradare a apelor reziduale cu producere simultană de biohidrogen, eficientizând considerabil producția acestuia.

Digestoarele anaerobe, fără material de suport, sunt echipate cu dispozitive de amestec continuu, cu scopul de a se menține dezvoltarea microorganismelor producătoare de biogaz [121]. Efluentul rezultat în urma fermentației anaerobe din digestoare, este trecut prin diferite tipuri de construcții și instalații, necesare pentru eliminarea compușilor pe bază de azot și de fosfor.

Treapta biologică pentru eliminarea compușilor de azot și fosfor, se poate constitui din: bazine cu nămol activat (**BNA**) pentru nitrificare; reactoare aere cu nămol activat; bazine pentru denitrificare (**BDN**) și decantoare secundare (**DS**); bazine de activare (**BA**) în care se pot dezvolta simultan sau separat procesele de nitrificare-denitrificare; biofiltre (**BF**); filtre nisip (**FN**); membrane filtrante (**FM**) filtre rapide echipate cu nisip (**FR**), cărbune activ sau alte tipuri de materiale cu proprietăți absorbante; aparate și dispozitive pentru dezinfecția efluentului epurat (**E**) [121].

Aceste tehnologii bioingineresti sunt recomandate în special pentru sistemele de colectare separate. Sistemele unitare prezintă o serie de neajunsuri semnificative pentru procesele de epurare a apelor reziduale datorită diluției masei organice, acest lucru ducând la reducerea proceselor microbiologice prezente în

treapta biologică de epurare a apelor reziduale. Astfel, aceste sisteme de colectare necesită o extinsă campanie de reabilitare în scopul prevenirii infiltrațiilor provenite din hiporeic. Deasemenea, performanțele tehnologice bioenergetice sunt determinate de gradul de încărcare cu masă organică a apelor reziduale și de calitatea rețelelor de canalizare, pentru a nu permite diluarea acestor ape.

Schemele propuse au fost inspirate din tehnologiile practicate la epurarea apelor uzate din industria alimentară (fig. 3.9 și 3.10) [87].

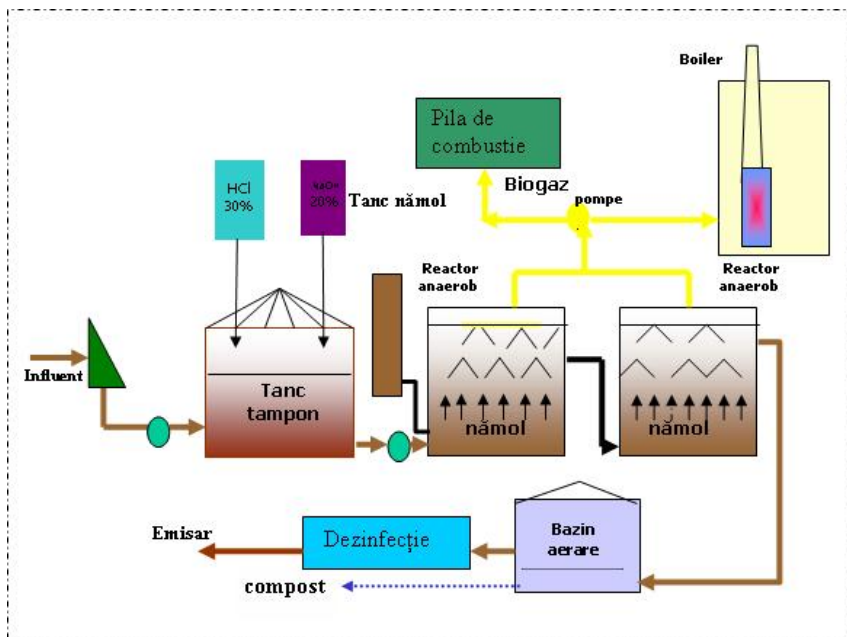


Figura 3.11. Schema de epurare a apelor uzate din industria alimentară

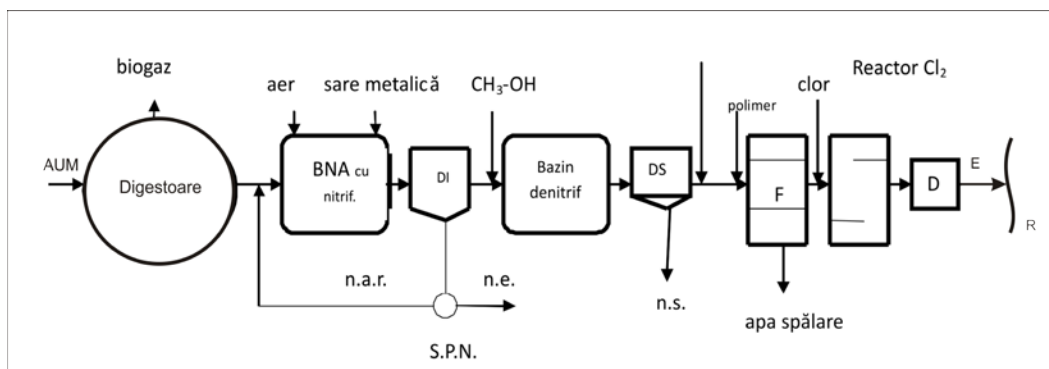


Figura 3.12. Schema de epurare cu nitrificare și adaos de reactivi chimici în bazine cu nămol activat (BNA) pentru precipitarea fosforului și denitrificare, folosind metanol.

Astfel, pentru a produce biohidrogen în urma degradării anaerobe a apelor reziduale, este necesară dezvoltarea proceselor microbiologice ale acetogenezei în detrimentul celor de metanogeneză, când acest hidrogen este transformat în metan. Acest lucru presupune modificări în cadrul tehnologiilor de epurare a apelor reziduale în urma cărora treapta biologică este dezvoltată prin adăugarea unor bioreactoare (digestoare) în interiorul cărora apa reziduală este degradată în absența oxigenului. Aceste modificări ar atrage după sine o serie de avantaje ca: **a)** înlocuirea decantoarelor primare; **b)** obținerea unei surse alternative de energie sub forma biohidrogenului; **c)** dezvoltarea procesului microbiologic de denitrificare; **d)** înlocuirea etapei anaerobe din cadrul bazinelor de activare. De aceea, producerea biohidrogenului în locul metanului, prin degradarea anaerobă a apelor reziduale, simultan cu tratamentul acestor deșeuri, câștigă tot mai multă importanță la nivel internațional reprezentând un mod eficient de a obține energie verde dintr-o sursă regenerabilă printr-o abordare durabilă. Avantajele majore ale energiei produse din apa uzată precum și din alte deșeuri organice se referă în principal la reducerea impactului asupra mediului împreună cu recuperarea energiei, simultan cu tratarea și epurarea acestora. Rentabilitatea economică, facilitatea și fezabilitatea tehnică, nevoile sociale și prioritățile politice reprezintă factorii cheie în alegerea bioproceselor care vor fi folosite pentru utilizarea apei uzate în următorii ani [118]. Astfel, principalul scop al cercetării doctorale de față este acela de a stabili și optimiza un proces tehnologic în scopul obținerii unei surse de energie regenerabilă cu impact minim asupra mediului sub forma biohidrogenului, simultan cu tratamentul deșeurilor biologice provenite din industria alimentară și vatra centrelor populate. Acest proces tehnologic ar putea înlocui atât decantoarele primare cât și treapta anaerobă a bazinelor de activare din cadrul stațiilor de epurare a apelor uzate, cu o serie de bioreactoare (dispuse în serie sau în paralel, în funcție de caracteristicile apelor reziduale) în care se vor desfășura procese de degradare anaerobă a apei uzate brute, în urma cărora v-a rezulta biohidrogen (Fig. 3.12 și 3.13). Deasemenea aceste modificări duc la dezvoltarea etapei de denitrificare a etapei biologice de epurare a apelor reziduale, ducând la creșterea calității generale a efluentului rezultat. Aceste modificări aduse fluxului tehnologic au potențialul de a scădea dramatic costurile de construcție și operare a stațiilor de epurare a apelor reziduale, pe de o parte prin simplificarea elementelor tehnologice componente și pe de o altă parte prin generarea unei forme de energie regenerabile, cu impact redus asupra mediului, sub forma biohidrogenului (Fig. 3.14).

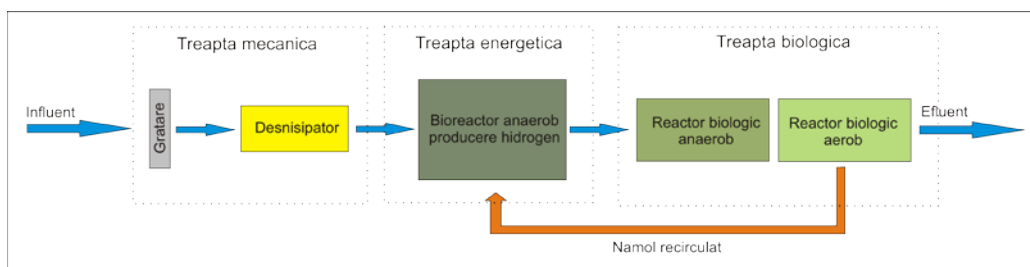


Figura 3.13. Schema tehnologică alternativă a unei stații de epurare a apelor reziduale comunale

Diminuarea costurilor implicate în managementul deșeurilor organice împreună cu epurarea acestora cât și obținerea unor vectori energetici regenerabili, cu impact redus asupra mediului, în urma degradării anaerobe a acestora, a căpătat

o importanță din ce în ce mai mare în ultimii ani, în contextul epuizării surselor clasice de energie și a protecției mediului [4950; 56]. O metodă de a controla acumularea constantă a acestor deșeuri organice diverse cât și de a diminua costurile de tratament a acestora este generarea de bioenergie sub forma biohidrogenului în urma fermentației anaerobe a acestora. Astfel, procesul conferă beneficiile utilizării și tratării acestor deșeuri organice cu generarea concomitentă a unei energii regenerabile, cu impact scăzut asupra mediului. Apa uzată generată de către diferite procese industriale, este considerată a fi substratul ideal pentru aceste procese bio-tehnologice, datorită conținutului mare de material organic degradabil [70].

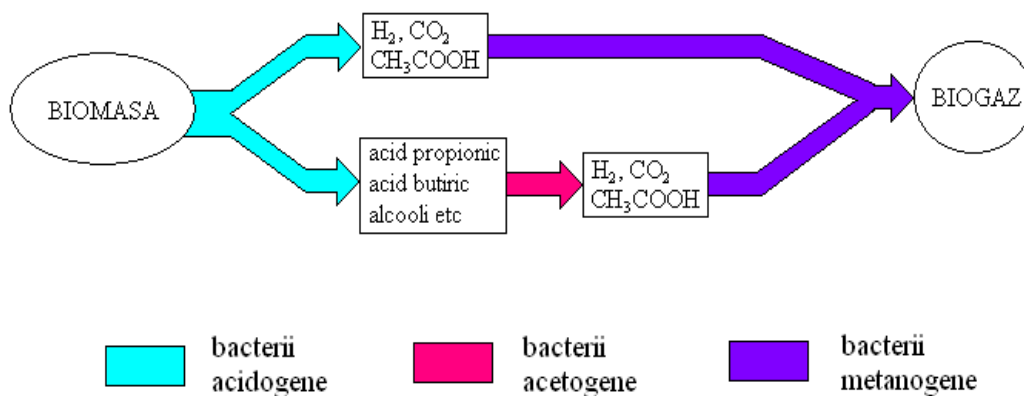


Figura 3.14. Etapele proceselor de fermentare anaerobă

4. PROCESE BIOLOGICE IMPLICATE IN EPURAREA APELOR REZIDUALE

4.1. Procesele fermentării anaerobe a nămolurilor din apele reziduale

Producerea microorganismelor producătoare de biogaz din apele uzate menajere, este rezultatul metabiozei dintre trei comunități de microorganisme: nemetanogene, dar lichefiante și acidogene; nemetanogene, dar acetogene și a celor metanogene [78]. Astfel, procesele fermentării anaerobe cuprinde trei etape: lichefierea acidogenă; acetogeneza cu formarea acizilor; metanogeneza cu formarea metanului [77]. Reacțiile biochimice ce au loc pentru producerea de biogaz, sunt descrise în cele ce urmează. În partea a doua a primei etape, microorganismele transformă compușii organici micromoleculari, rezultați în urma procesului de lichefiere, în acizi organici. Acest stadiu de acidogeneză, este numit stadiul conținutului biochimic de oxigen, constant, care se continuă cu o descompunere realizată de către bacteriile metanogene, formându-se acizi organici reduși (acidul formic și acidul acetic), dioxid de carbon, hidrogen și apă. Bacteriile metanogene pot reduce dioxidul de carbon și oxida hidrogenul molecular, producând metan și apă. În acest caz, dioxidul de carbon servește drept acceptor de electroni, iar hidrogenul molecular drept donator de electroni conform reacției:



Energia rezultată este utilizată pentru asimilarea carbonului din CO_2 , contribuind astfel la formarea substanțelor celulare [63].



Unele tulpini de bacterii metanogene pot produce metan și din CO și H_2 , însă viteza lor de dezvoltare este mult mai lentă.

Sub acțiunea bacteriilor metanogene, acidul acetic se poate descompune direct în metan și dioxid de carbon conform relației:



Într-un sistem, în care anumite comunități de bacterii s-au adaptat la condițiile de mediu, celuloza este descompusă direct în metan și în dioxid de carbon conform relației:



Dacă substanțele organice folosite se notează prin H_2A , atunci reacția de formare a metanului poate fi redată sumar sub forma:



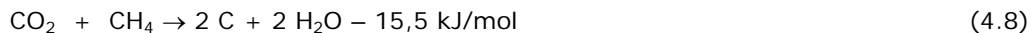
Energia rezultată se folosește pentru asimilarea carbonului din dioxid de carbon sau acetat. Bacteriile metanogene pot asimila din acetat, până la 60% din carbonul total al substanțelor celulare, iar restul de 40% provenind din dioxidul de carbon [67]. Procesele nutritive și cele biologice au loc sub acțiunea bacteriilor metanogene dar numai în absența oxigenului.

Pentru conversia biogazului obținut prin prelucrarea apelor uzate, este nevoie de un sistem format din două părți, A și B. Partea A reprezintă procesul de livrare a metanului și dioxidului de carbon, fiind procesul în care biogazul este generat prin digestie anaerobă, iar partea B este procesul catalitic, care permite conversia biogazului în carbon solid și apă sau permite valorificarea lui în pile de combustie [121].

Conversia metanului și a dioxidului de carbon în carbon și apă se realizează conform următoarelor reacții:



Reacția globală:



În aceste reacții hidrogenul funcționează ca donor, hidrogenul produs reduce dioxidul de carbon și moleculele de metan sunt convertite în carbon. Estimând, aceste reacții produc aproximativ 4 tone carbon solid și 6 tone apă pentru 10 tone de amestec gaz metan și dioxid de carbon.

Producția de biogaz este în strânsă legătură cu compoziția nămolului proaspăt din apele uzate și cu durata de fermentare (vârsta nămolului), aceasta fiind estimată cu ajutorul relației [117]:

$$G_{\text{max}} = 138 \sqrt{\Theta \times G_0} \quad (4.9)$$

unde,

$$\Theta_f = 175 \times 10^{-0,0087T} \quad (4.10)$$

În care: G este cantitatea de biogaz, în Nm³/zi; Θ reprezintă temperatura de fermentare, în °C; G₀ - cantitatea de materii organice solide din nămolul proaspăt, în t/zi.

Puterea calorică a biogazului produs, este de 5500-5900 Kcal/Nm³ și cea utilizabilă la arzătoare este de 4750 Kcal/Nm³. În compoziția biogazului predomină metanul (70%) și dioxidul de carbon (30%). 1m³ de biogaz este echivalent cu: 1 kg cox; 1,27 Nm³ gaz de iluminat, 5,1Kwh; 0,56 kg motorină și 0,47 Nm³ gaze naturale [110].

4.2. Procesele biochimice ale nitrificării și denitrificării din cadrul epurării avansate a apelor uzate menajere

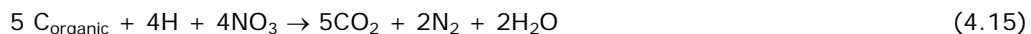
Nitrificarea este procesul de oxidare a ionului de amoniu în nitrit și apoi în nitrat, cu ajutorul bacteriilor autotrofe și heterotrofe, proces ce se desfășoară în două faze, conform reacțiilor [29]:



În procesul de denitrificare, nitratul existent în apă este descompus pe cale biologică, în azot liber, dioxid de carbon și apă, concomitent cu un consum de carbon. Reacțiile chimice ale denitrificării se bazează pe faptul că în locul asimilării de oxigen:

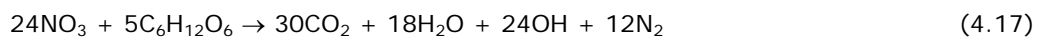
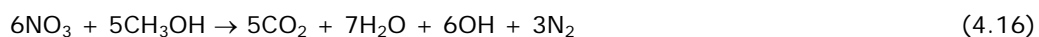


Se produce consum de nitrat:



Sursele de carbon sunt constituite din metanol (CH_3OH), glucoză ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), etanol, etc., substanțe organice ușor asimilabile de către bacteriile denitrificatoare [30].

Reacțiile de denitrificare pentru metanol în glucoză, ca sursă de carbon sunt următoarele:



Aceste procese se dezvoltă în funcție de tehnologia bioenergetică de epurare avansată propusă [155]. Succesiunea acestora poate fi influențată de prezența proceselor anaerobe ce au loc în digestoarele aflate în amonte de bazinele de activare, masa organică fiind transformată decătore microorganismele anaerobe, rezultând o serie de acizi și alți compuși organici.

4.3. Procesele biochimice din digestoarele anaerobe de contact cu producere de biohidrogen

Dintre procesele variate de producere a hidrogenului, calea biologică este cunoscută ca fiind cea ce necesită cel mai mic consum energetic [10; 31; 46; 68]. În plus, în cadrul procesului de fermentație în urma căruia rezultă biohidrogen se pot folosi diverse deșeuri organice ca și substrat de fermentație. Astfel, prin combinarea producerii biohidrogenului cu tratamentul biologic al deșeurilor organice se obține un mare avantaj economic față de metodele tradiționale de producere a hidrogenului [21; 36; 42; 47]. În plus, apele uzate generate în urma proceselor industriale, constituie un substrat ideal datorită conținutului mare de material organic ușor degradabil [70]. În cadrul proceselor clasice, deșeurile organice, în principal apele uzate, sunt convertite în metan; studiile recente însă, s-au concentrat pe dezvoltarea unor procese anaerobe în urma cărora se poate obține conversia deșeurilor organice în biohidrogen [5; 68].

Dezvoltarea cu succes a unei tehnologii de degradare a apelor uzate în paralel cu producerea biohidrogenului prin dezvoltarea etapei acetogene, ar atrage după sine avantaje tehnologice și financiare enorme. În unele cazuri, ar fi posibilă eliminarea atât a decantoarelor primare din treapta mecanică de epurare cât și a etapei anaerobe din treapta biologică de epurare, acestea fiind înlocuite cu o serie de bioreactoare anaerobe legate în serie sau în paralel, în funcție de specificitatea apei uzate, în care apa uzată brută ar trece printr-un proces de degradare anaerobă în urma căruia rezultă biohidrogen în paralel cu realizarea treptei de denitrificare a acesteia [87; 95]. Acest proces este guvernat de un inocul microbial îmbogățit selectiv, capabil de a degrada aceste substraturi organice complexe, în paralel cu producerea biohidrogenului. Eliminarea acestor decantoare primare și instalarea bioreactoarelor pentru producerea biohidrogenului ar putea reduce considerabil linia nămolului în cadrul acestor stații de epurare. Nămolul rezultat în urma treptei biologice de epurare a apelor reziduale este supus unor pretratamente și recirculat în aceste bioreactoare pentru producerea biohidrogenului (Fig.3.11). Astfel, aceasta tehnologie are potențialul de a înlocui și astfel elimina anumite etape prezente în linia tehnologică de epurare a apelor reziduale, scăzând dramatic costurile de proiectare, construcție și operare a stațiilor de epurare a apelor uzate, în paralel cu obținerea unui vector energetic versatil, cu impact redus asupra mediului [15].

Procesul de producere a biohidrogenului prin intermediul degradării fermentative este des întâlnit în condiții anoxice. În timpul procesului de fermentație, substratul organic este inițial convertit la piruvat, pe căi glicolitice. Acesta este apoi oxidat la acetil Co-A, care poate fi convertit la acetil fosfat generând astfel ATP și acetat [78]. Astfel procesele de fermentație anaerobe permit producția în masă a hidrogenului prin procese relativ simple, dintr-un spectru larg de deșeuri organice, incluzând ape uzate comunale sau provenite din industria alimentară. Când bacteriile degradează substraturile organice, sunt generați electroni care trebuie eliberați în scopul menținerii neutralității electrice a sistemului. În medii anoxice, protonii se pot comporta ca și acceptori de electroni pentru a produce hidrogen molecular [44]. Astfel, hidrogenul poate fi produs de către bacteriile producătoare de hidrogen aflate în diferite substraturi reziduale organice (Fig. 4.1) [44].

Majoritatea microorganismelor capabile de a genera hidrogen ca și produs metabolic secundar, fac parte din procariotele aparținând domeniilor de viață

Bacteria și Arhaea [145]. Enzima implicată în acest proces (hidrogenaza) a fost deasemenea identificată în organitele subcelulare ale unor eucariote [144]. Procesul de degradare fermentativă a substratului în H_2 este comun unor grupe variate de microorganisme, având loc printr-o serie de reacții biochimice complexe, similare bioconversiei anaerobe [33]. Acest proces reprezintă o etapă de tranziție în cadrul acestor ecosisteme complexe, fiind de cele mai multe ori un precursor al metanului (CH_4) [54]. Degradarea anaerobă a deșeurilor organice complexe în metan (producția de biogaz), necesită patru etape importante și cinci grupe de microorganisme distincte din punct de vedere fiziologic [136]. Acest fenomen implică o serie de procese biologice declanșate de reacțiile diferitelor specii de microorganisme în care hidrocarburile sunt convertite de la molecule complexe la molecule simple și, în cele din urmă, la dioxidul de carbon (CO_2) și metan (CH_4), printr-o serie de reacții fermentative mediate de către un grup variat de microorganisme [80]. Este de așteptat ca elementele preliminare ale rețelei de degradare metanogenă să joace un rol în producerea biohidrogenului. Multe sisteme termofilice folosesc oxidarea sintrofică a acetatului la CO_2 și H_2 de către bacteriile acetogene și homoacetogene, cuplată cu consumul de H_2 de către microorganismele metanogene hidrogenotrofe [140]. Bacteriile acetogene producătoare de H_2 cresc în asociații sintrofe cu metanogene hidrogenotrofe, care păstrează presiunea parțială a H_2 suficient de scăzută pentru a permite acetogenezei să devină favorabilă termodinamic, printr-un transfer interspecific [41]. Astfel, interacțiunile metabolice dintre diversele grupe de microorganisme sunt esențiale, funcționarea sistemului dinamic de producere a H_2 necesitând o profundă înțelegere a factorilor implicați. Optimizarea parametrilor procesului fermentativ pentru îmbunătățirea performanței sistemului este un procedeu important atât pentru producția biohidrogenului cât și pentru ritmul de degradare a substratului organic.

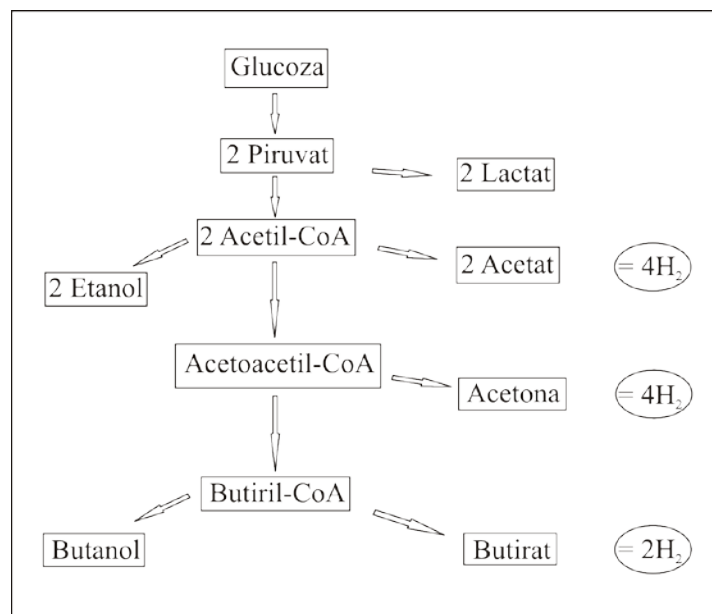


Fig. 4.1. Căile metabolice adoptate de microorganismele strict anaerobe în timpul producerii biohidrogenului în urma degradării substratului organic (glucoza).

Bacteriile facultativ anaerobe degajă 2 moli de hidrogen pentru fiecare mol de glucoză degradată, în timp ce bacteriile strict anaerobe produc 4 moli de hidrogen pentru 1 mol de glucoză [60]. Organismele facultativ anaerobe sunt mai puțin sensibile la oxigen și sunt capabile în general de a își relua activitatea de producere a hidrogenului în cazul contaminării cu oxigen a sistemului. În consecință, în ciuda ratei mai mici de generare a biohidrogenului, organismele facultativ anaerobe sunt de preferat pentru funcționarea pe termen lung a acestor sisteme [2]. Procesul de producere a biohidrogenului prin procese fermentative poate fi realizat atât prin folosirea unor culturi microbiale pure, cât și a comunităților microbiale mixte. Dacă se folosesc comunități microbiale mixte însă, biohidrogenul produs de bacteriile producătoare de hidrogen poate fi consumat rapid de bacteriile consumatoare de hidrogen [143]. Așadar, pentru a evita acest lucru, este nevoie de crearea unui consorțiu microbial specific, capabil să degradeze deșeurile organice și să producă hidrogen fără ca acesta să fie apoi consumat de către speciile microbiale metanogene, prin limitarea dezvoltării acestor din urmă [76].

Astfel, unele microorganisme posedă caracteristici care oferă o potențială exploatare a acestora în producția biohidrogenului. Aceste caracteristici trebuie controlate adecvat și chiar ajustate în unele cazuri pentru atingerea scopurilor propuse [1]. Caracteristicile și funcțiile acestor microorganismelor sunt guvernate de multiple enzime și căi metabolice precum sistemul fotosintetic, complexul respirator, enzimele hidrogenaza și nitrogenaza etc. [46].

4.4. Noțiuni de proiectare experimentală

În vederea dezvoltării unor astfel de tehnologii de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale în cadrul stațiilor de epurare și preepurare a apelor uzate provenite din vatra centrelor populate și industria alimentară, este necesară depășirea unui impediment major al acestui proces, și anume rata foarte scăzută de producere a biohidrogenului. Această rată este guvernată de o serie de parametri fizici, chimici și biologici ca: dezvoltarea bacteriilor producătoare și consumatoare de hidrogen, substratul utilizat, nutrienții inorganici, condițiile de operare a bioreactoarelor, etc. [127]. Astfel, optimizarea parametrilor de funcționare a acestor factori, în special a celor nutritivi și ambientali, reprezintă un aspect deciziv pentru buna funcționare a procesului. Cea mai des utilizată strategie de optimizare este reprezentată de metoda statistică de proiectare experimentală, prin care sunt variați o serie de factori considerați importanți pentru proces. Această abordare este adesea însoțită de o analiză amănunțită a rezultatelor experimentale, putând astfel realiza predicții referitoare atât la influența acestor factori cât și la interacțiunile prezente între ei [150]. Astfel, datorită naturii dinamice și complexe a acestor sisteme, utilizarea acestor abordări statistice de proiectare experimentală reprezintă o necesitate în optimizarea proceselor de producție a biohidrogenului. Luând în considerare aceste aspecte, se recomandă utilizarea metodelor de proiectare experimentală pentru a studia efectele diferiților factori implicați în procesele analizate, oferind astfel o mai bună înțelegere a acestor fenomene și îmbunătățind în același timp performanțele tehnologiei [102].

O astfel de abordare experimentală necesită un număr de trei pași principali: i) un pas de ierarhizare a factorilor analizați, în funcție de importanța acestora pentru ieșirile sistemului ce urmează a fi optimizate, utilizând metode factoriale simple sau multifactoriale, în funcție de numărul factorilor ce urmează a fi

investigați; ii) un pas de apropiere de optimul vizat prin variații a factorilor investigați utilizând metoda Box-Behnken sau metoda pantei cele mai abrupte; iii) identificarea zonei de optim, unde nivelurile optime ale factorilor investigați sunt determinate utilizând metoda suprafeței de răspuns sau alte metode statistice [13].

Analiza componentelor principale și a algoritmilor genetici bazați pe rețele neuronale au fost deasemenea utilizate în vederea optimizării parametrilor de proces a sistemelor de producere a biohidrogenului. În funcție de numărul factorilor ce sunt supuși investigării, proiectarea experimentală poate fi clasificată în două categorii principale: proiectarea experimentală factorială simplă și proiectarea experimentală multifactorială [150].

4.4.1. Metode factoriale simple

Metoda factorială simplă reprezintă o abordare directă ce are în vedere investigarea influenței a câte unui singur factor asupra procesului supus optimizării, în timp ce restul factorilor considerați importanți în proces, sunt menținuți constanți. Astfel se poate analiza treptat răspunsul tuturot acestor factori asupra procesului investigat. Datorită ușurinței cu care această metodă poate fi aplicată, metoda factorială simplă a fost utilizat adesea în studii direcționate spre elucidarea efectelor anumitor factori fizici, chimici și biologici asupra procesului de producție al biohidrogenului [39; 48]. Cu toate acestea, această abordare prezintă dezavantajul de a nu releva posibilele interacțiuni ce apar între factorii vizați. Astfel, este posibil ca zona de optim identificată, să nu fie cea reală. În plus, aplicarea acestei metode presupune realizarea unui număr foarte mare de experimente, în special atunci când sunt implicați un număr ridicat de factori, făcând procesul de optimizare costisitor și laborios.

4.4.2. Metode multifactoriale

Spre deosebire de metoda factorială simplă, proiectarea experimentală multifactorială este capabilă de a evalua influența mai multor factori simultan pe mai multe nivele, permițând astfel observarea interacțiunilor ce au loc între aceștia. Analiza statistică a acestei abordări de optimizare se poate realiza fie pe baza valorilor reale fie pe baza valorilor codificate a factorilor analizați. În cazul din urmă, se poate realiza o comparație directă a acestor factori, aceștia fiind comparabili în mod direct indiferent de natura lor, realizându-se o determinare eficientă a mărimii acestora asupra răspunsului vizat. [39]. Proiectarea experimentală multifactorială poate fi clasificată în două categorii principale: metoda multifactorială completă și metoda multifactorială fracțională.

4.4.2.1. Metode multifactoriale complete

În cazul utilizării unei metode multifactoriale complete, sunt testate toate combinațiile a fiecărui factor luat în considerare, pe toate nivelurile. Pe baza rezultatelor obținute, se poate realiza un model polinomial pentru a descrie efectul factorilor studiați asupra unui răspuns, urmând optimizarea acestuia [61]. Datorită capacității acestei metode de proiectare experimentală de a acoperii influența

factorilor studiați utilizând toate combinațiile posibile, aceasta a fost utilizată extensiv în studii ce au vizat optimizarea procesului de producție al biohidrogenului prin fermentare anaerobă [32; 59]. Principalul dezavantaj al utilizării acestei metode se referă la faptul că numărul experimentelor crește exponențial odată cu numărul factorilor investigați și a nivelurilor acestora. Această abordare statistică de proiectare experimentală necesită perioade experimentale extinse și costisitoare, nefezabile din punct de vedere practic și economic.

4.4.2.2. Metode multifactoriale fracționale

Metodele multifactoriale fracționale de proiectare experimentală oferă o alternativă atunci când numărul factorilor investigați este prea mare pentru a fi cercetat utilizând o metodă multifactorială completă. Acest lucru este posibil datorită capacității acestei abordări statistice de a extrage informațiile necesare utilizând doar o fracție din numărul de experimente necesare în cazul metodelor multifactoriale complete [119]. Astfel, utilizând aceste abordări multifactoriale fracționale, se pot obține efectele anumitor factori implicați în procesul de producere al biohidrogenului cât și interacțiunile dintre aceștia în condiții viabile din punct de vedere economic și practic. Din păcate însă nu poate fi garantată obținerea unor predicții optime datorită capacității reduse de modelare a modelului polinomial de ordinul doi. Dintre cele mai des utilizate metode multifactoriale fracționale de proiectare experimentală în optimizarea proceselor biologice amintim: metoda Plackett–Burman, Taguchi, central-compus și Box–Behnken, adesea cuplate cu metoda suprafeței de răspuns.

4.4.2.2.1. Metoda Taguchi

Metoda multifactorială fracțională de proiectare experimentală Taguchi permite investigarea efectului asupra unui răspuns dat a unui număr ridicat de factori cu două sau mai multe nivele într-un număr relativ scăzut de experimente. Acest lucru face din metoda de proiectare experimentală Taguchi o unealtă foarte eficientă în analiza combinației optime a factorilor avuți în vedere pentru a atinge optimul dorit al răspunsului investigat [3]. În urma aplicării acestei metode, utilizând o serie de unelte statistice se pot identifica factorii cheie ce au efect semnificativ asupra răspunsului avut în studiu. Cu toate acestea, uneori metoda Taguchi nu este foarte exactă deoarece optimul răspunsului investigat poate fi departe de nivelurile predeterminate ale factorilor investigați [125].

4.4.2.2.2. Metoda Plackett-Burman

Primul pas spre optimizarea proceselor de producere al biohidrogenului îl reprezintă identificarea importanței factorilor investigați asupra procesului. Metoda multifactorială fracțională de proiectare experimentală Plackett–Burman poate fi folosită cu succes în ierarhizarea importanței factorilor investigați asupra răspunsului [61]. Deoarece principalele efecte pot fi determinate nu doar de factorii studiați ci și de posibilele interacțiuni dintre aceștia, metoda de proiectare experimentală Plackett–Burman se pretează situațiilor în care aceste interacțiuni sunt considerate neglijabile. De cele mai multe ori se utilizează un model polinomial de ordinul 1 (Eq. (4.18)) pentru a descrie efectele factorilor analizați.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i \quad (4.18)$$

unde y este răspunsul, β_0 este constanta, β_i este coeficientul linear și X_i reprezintă nivelul factorilor codificați. În urma unei analize ANOVA a modelului estimat se pot ierarhiza factorii analizați în funcție de importanța acestora asupra răspunsului [7].

4.4.2.2.3. Metoda pantei ascendente

Estimarea inițială a condițiilor optime ale unui bioproces este de cele mai multe ori departe de optimul real. Astfel este necesar un al doilea pas de optimizare, bazat pe identificarea factorilor cheie a procesului respectiv și identificarea condițiilor optime a acestora. Metoda multifactorială fracțională de proiectare experimentală a pantei ascendente este una dintre cele mai eficiente metode dezvoltate în acest sens. Pentru a obține această pantă ascendentă pentru factorii investigați în prealabil utilizând abordarea Plackett-Burman sau Taguchi, adesea se utilizează un model polinomial de ordinul 1 (Eq. (4.1)). Panta ascendentă astfel rezultată pleacă de la centrul proiectării experimentale, terminându-se în zona în care nu mai pot fi aduse îmbunătățiri sistemului, astfel indicând zona de optim pentru răspunsul investigat [74].

4.4.2.2.4. Metodele compus centrale și Box-Behnken

După identificarea regiunii răspunsului optim pentru un proces urmărit, este necesară o caracterizare amănunțită a răspunsului în acea zonă de optim. Metodele multifactoriale fracționale de proiectare experimentală central-compus și Box-Behnken pot fi utilizate pentru estimarea unui model polinomial de ordinul doi al răspunsului în zona de optim generând o suprafață de răspuns.

Modelul central-compus reprezintă o metodă multifactorială fracțională pe cinci niveluri dezvoltată de Box și Wilson. Modelul este alcătuit în general din un model factorial complet de tip 2^n , un model axial de tip 2^n și un model central de tip m [17]. Această abordare necesită un număr relativ ridicat de nivele ale factorilor investigați, conținând extreme la ambele capete ale acestor factori.

Modelul Box-Behnken este o metodă multifactorială fracțională pe trei nivele, dezvoltată de Box și Behnken. Acest model poate fi considerat o combinație a unei proiectări factoriale pe două nivele și o proiectare incompletă de tip "block". În fiecare structură de tip "block", un anumit număr de factori implicați în procesul investigat sunt analizați în toate combinațiile, în timp ce restul factorilor sunt menținuți la valori centrale [11]. Proiectare experimentală Box-Behnken reprezintă o alternativă economică modelului central-compus datorită numărului redus de nivele la care sunt investigați factorii implicați în proces și considerați relevanți. De asemenea, nivelele considerate pentru acești factori nu necesită extreme superioare și inferioare.

4.4.2.2.5. Metoda suprafeței de răspuns

Pentru aplicarea metodei suprafeței de răspuns, în general se utilizează un model polinomial (Eq. (4.19)) capabil de a descrie efectul factorilor analizați în prealabil prin metodele central-compus sau Box-Behnken, asupra unui răspuns.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.19)$$

unde y reprezintă răspunsul, β_0 reprezintă constanta, β_i reprezintă coeficientul linear, β_{ii} reprezintă pătratul coeficientului, β_{ij} reprezintă coeficientul interactiv și X_i reprezintă nivelurile factorilor codificați. Modelul polinomial de ordinul doi poate fi reprezentat grafic ca o suprafață de răspuns și a unui contur de răspuns. Aceste reprezentări grafice pot identifica importanța factorilor studiați asupra răspunsului cât și interacțiunile ce apar între acești factori. Utilizând analiza ANOVA, pot fi identificați factorii și interacțiunile ce exercită cea mai mare influență asupra răspunsului. În plus, utilizând modelul de regresie este posibilă estimarea răspunsului optim al factorilor cheie împreună cu interacțiunile acestora, pentru procesul de producție al biohidrogenului utilizând ape uzate ca substrat fermentescibil [105106; 156].

4.4.3. Metoda rețelelor neuronale și algoritmul genetic

În ultimii ani a fost dezvoltată reprezentarea matematică a funcțiilor neuronale. Acest model este capabil de a descrie efectele ce interacționează la nivelul diferiților factori ai unui proces non-linear. Există studii ce concluzionează faptul că un astfel de model neuronal este mult mai potrivit pentru modelarea cât mai exactă a unui proces biologic ca producerea biohidrogenului în comparație cu un model polinomial de ordinul doi [128]. Însă utilizarea acestui model necesită abordarea unor tehnici de optimizare diferite cât și a unui număr sporit de experimente. Algoritmul genetic bazat pe principiul evoluției prin selecție naturală, reprezintă o astfel de abordare a optimizării unor astfel de procese biologice non-lineare și complexe de producere a biohidrogenului utilizând modelul funcțiilor neuronale

4.4.4. Optimizarea răspunsurilor multiple

Având în vedere faptul că procesul de producere al biohidrogenului utilizând ape uzate reziduale poate fi legat de procesul de preepurare sau chiar epurare a acestora, poate apărea necesitatea de a optimiza două sau mai multe răspunsuri simultan. Adesea optimizarea unui răspuns intervine în optimizarea altui răspuns în cazurile în care se dorește optimizarea simultană a două sau mai multe răspunsuri. Pentru evitarea acestor situații, este necesară o strategie de optimizare simultană a răspunsurilor vizate. Acest pas necesită dezvoltarea câte unui model caracteristic fiecărui răspuns în parte și menținerea simultană a acestora în zona de optim. Acest pas este urmat de identificarea unui răspuns general, astfel optimizarea mai multor răspunsuri poate fi redusă la optimizarea acestui singur răspuns general utilizând strategiile de proiectare experimentală descrise anterior [123].

4.5. Modelarea matematică și simularea proceselor biologice generatoare de biohidrogen

O serie de modele matematice și simulări au fost dezvoltate în ultimii ani pentru o mai bună înțelegere a proceselor implicate în producerea biohidrogenului și astfel pentru o abordare eficientă a optimizării acestora. Aceste modele matematice și simulări pot fi utilizate în determinarea valorilor optime a parametrilor relevanți în procesul de producție al biohidrogenului. În ultimii ani au fost dezvoltate o serie de modele matematice capabile de a descrie o gamă largă de procese biotehnologice [132133; 152]. Unele dintre aceste modele pot fi utilizate pentru descrierea fenomenelor biotehnologice implicate în procesul de producție al biohidrogenului [47; 132]. Astfel au fost dezvoltate modele matematice capabile de a descrie degradarea substratului organic de către microorganismele producătoare de hidrogen, creșterea acestor microorganismele, generarea hidrogenului ca și produs metabolic final, producerea diferiților produși metabolici, etc. [107; 152]. Datele obținute în urma dezvoltării și utilizării acestor modele matematice, pot oferi o imagine completă a proceselor implicate în degradarea anaerobă a rezidurilor organice cu producere simultană de biohidrogen.

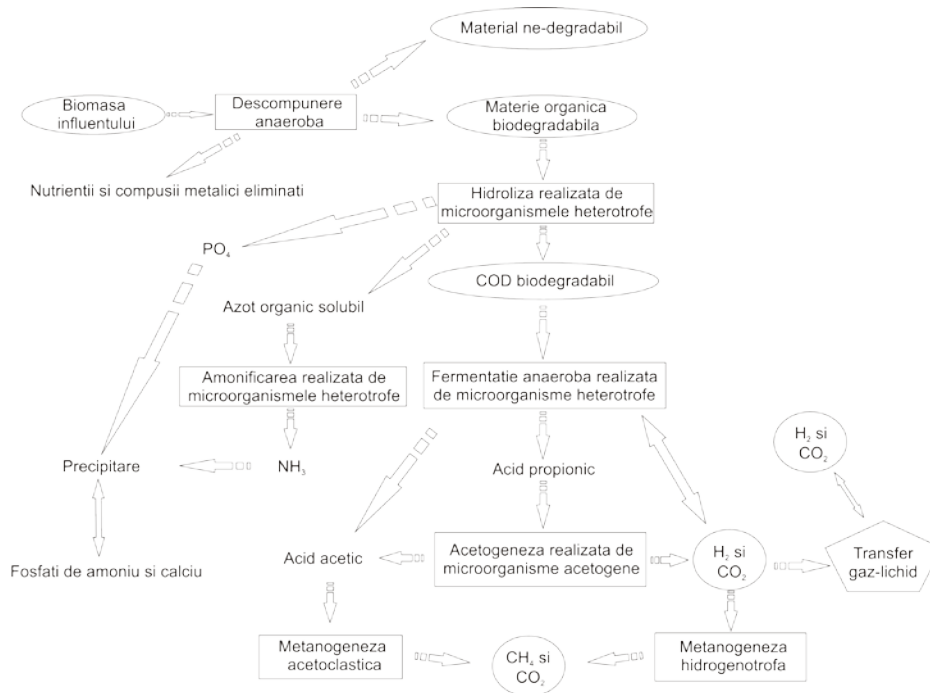


Figura 4.2. Reprezentare grafică a unui concept de modelare matematică a procesului de producere al biohidrogenului în urma fermentării anaerobe.

Pentru a obține predicții reale este necesară însă utilizarea unui sistem complex de modele matematice în care fiecare model este dezvoltat pentru a descrie diferite etape ale procesului de producere al biohidrogenului (Fig. 4.2) [43].

Această necesitate este dată de complexitatea sistemului ce necesită o descriere matematică a unui număr considerabil de etape și factori diferiți implicați în procesul fermentativ. Acești factori se referă la creșterea și înmulțirea microorganismelor producătoare de hidrogen, compoziția microbială inițială, degradarea substratului, generarea produșilor metabolici finali (hidrogen, acizi grași volatili, solvenți, etc) și gradul de inhibiție a acestora asupra sistemului. Deasemenea este necesară descrierea amănunțită a efectului unor parametri fizico-chimici ca temperatura, pH-ul, rata de diluție a substratului, etc., cât și interacțiunile dintre aceștia, asupra procesului de producere al biohidrogenului [107; 109].

4.5.1. Modelarea progresului producției de biohidrogen

Producerea biohidrogenului în urma fermentării anaerobe reprezintă un proces complex și dinamic. Cu toate acestea, în ultimii ani au fost dezvoltate o serie de modele matematice capabile de a descrie în detaliu fenomenele implicate în acest proces. Printre primele modele matematice utilizate pentru descrierea progresului producției biohidrogenului, este modelul modificat Gompertz (Eq. (4.20)). Dezvoltat de M.H. ZWIETERING & al. [160], modelul a fost utilizat atât pentru descrierea degradării substratului de către bacteriile producătoare de hidrogen și înmulțirea acestora cât și generarea hidrogenului și a altor produși metabolici secundari în fermentații anaerobe în regim staționar [18; 72].

În ultimii ani, având la bază modelul Logistic (Eq. (4.21)), folosit de cele mai multe ori pentru a descrie progresul creșterii microbiale în experimentele de producere al biohidrogenului în pat staționar, a fost dezvoltat modelul Logistic modificat (Eq. (4.22)). Acesta a fost dezvoltat în special pentru descrierea progresului producerii biohidrogenului utilizând sisteme model [103]. Deasemenea, acest model a fost utilizat și pentru descrierea creșterii bacterilor producătoare de biohidrogen, reușind să descrie mai exact acest fenomen în comparație cu modelul Logistic clasic [104; 148]. O serie de studii au comparat abilitatea modelelor modificate Gompertz, Logistic și Richards (Eq. (4.23)) de a descrie progresul creșterii microbiale în pat staționar, concluzionând că modelul Gompertz modificat este cel mai în măsură de a modela acest factor [104].

$$X = \frac{X_0 \exp(k_c t)}{1 - (X_0/X_{max})(1 - \exp(k_c t))} \quad (4.20)$$

$$H = H_{max} \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max} \varphi}{H_{max}} (Y - t) + 1 \right] \right\} \quad (4.21)$$

$$H = \frac{H_{max}}{1 + \exp[4R_{max}(Y - t)/H_{max} + 2]} \quad (4.22)$$

$$S = S_0 \left\{ 1 - \left[1 + (m - 1) e^m \times \exp \left[\frac{\mu_m}{S_0} m / (m - 1) (Y - t) \right] \right]^{1/(1-m)} \right\} \quad (4.23)$$

unde H și H_{max} reprezintă valoarea cumulată a substratului degradat cât și valoarea maximă a substratului degradat (atunci când ecuația este utilizată pentru descrierea degradării substratului), sau înmulțirea cumulată a microorganismelor producătoare

de hidrogen cât și înmulțirea maximă a acestora (atunci când ecuația este utilizată pentru a descrie înmulțirea microorganismelor producătoare de hidrogen).

Deasemenea, o serie de grupuri de cercetare au modificat și utilizat modelul matematic Nr. 1 al digestiei anaerobe (ADM1), dezvoltat de Asociația Internațională a Apei (IWA), pentru a descrie progresul degradării glucozei, creșterii microbiene și producerea metaboliților secundari, inclusiv hidrogenul, în condiții de pat staționar [35; 113]. Unul dintre principalele dezavantaje ale utilizării acestui model provine din gradul înalt de dificultate al aplicării.

Atât modelul matematic Luedeking–Piret (Eq. (4.24)) cât și forma modificată a acestuia (Eq. (4.25)) sunt adesea utilizate pentru a descrie relația dintre rata de creștere a microorganismelor producătoare de hidrogen și rata de formare a metaboliților secundari [107]. Deasemenea, Eq. (4.26) și (4.27) au fost utilizate pentru a descrie relațiile dintre degradarea substratului organic, producerea metaboliților secundari, inclusiv a hidrogenului, cât și rata de creștere a microorganismelor implicate în procesul fermentativ [104].

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4.24)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (4.25)$$

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (4.26)$$

$$\frac{dX}{dt} = -Y_{X/S} \frac{dS}{dt} \quad (4.27)$$

În concluzie, se poate afirma ca modelul matematic Gompertz modificat permite descrierea unei palete largi de factori care influențează producerea biohidrogenului. Deasemenea, utilizând modelul matematic Logistic modificat se pot obține predicții similare. În ceea ce privește modelul modificat ADM1, se poate afirma ca utilizarea acestuia este considerabil limitată de dificultatea aplicării acestuia [13]. Se recomandă realizarea unor studii adiționale referitoare la modelul matematic Luedeking–Piret și forma modificată a acestuia în sisteme continue. Pentru o mai bună înțelegere a acestor sisteme se recomandă deasemenea utilizarea Eq. (26) pentru a descrie relația dintre degradarea substratului organic și producerea metaboliților secundari, cât și utilizarea Eq. (4.26) și (4.27) pentru a descrie comparativ această relație utilizând culturi microbiene pure cât și culturi microbiene mixte [13]. Studiile comparative ce vizează abilitatea acestor modele matematice de a descrie progresul procesului fermentativ de producere al biohidrogenului sunt limitate, astfel se recomandă o aprofundare a acestui subiect.

4.5.2. Modelarea creșterii microbiene în paralel cu degradarea substratului

Substratul organic utilizat în fermentarea anaerobă cu producere de hidrogen conține o concentrație ridicată de carbohidrați, o sursă importantă de energie și carbon pentru bacteriile producătoare de hidrogen, influențând astfel în

mod direct rata de producere a biohidrogenului a acestor organisme. Există o serie de modele matematice utilizate pentru a descrie mecanismele implicate în degradarea substratului, producerea biohidrogenului și creșterea microorganismelor implicate în aceste procese [107].

Printre primele modele matematice utilizate pentru a descrie relația dintre creșterea microorganismelor și degradarea substratului, se numără modelul matematic clasic Monod (Eq. (4.28)) [62]. În ultimii ani însă au fost dezvoltate o serie de modele matematice capabile de a descrie mai exact aceste fenomene. Studii ce au comparat abilitatea modelului clasic Monod de a descrie relația dintre progresul degradării glucozei și creșterea microorganismelor producătoare de hidrogen, cu modelul matematic Andrew (Eq. (4.29)) și forma modificată a acestuia (Eq. (4.30)) au concluzionat că cele din urmă descriu mai exact aceste fenomene [108]. Acest lucru este pus pe seama faptului că spre deosebire de modelul clasic Monod, modelul Andrew și forma sa modificată țin cont și de inhibiția substratului, aducând modelul mai aproape de sistemul real.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{R_{max}S}{K_S + S} X \quad (4.28)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{R_{max}S}{K_S + S + S^2/K_1} X \quad (4.29)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{R_{max}S}{K_S + S - S^2/K_1} X \quad (4.30)$$

unde $X = X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)$ și R_{max} reprezintă rata de creștere specifică a microorganismelor.

Modelul matematic Monod cu modificări (Eq. (4.31)) poate fi utilizat pentru a descrie efectele concentrației substratului asupra ratei de producere al biohidrogenului și a creșterii microorganismelor implicate în proces, în condițiile în care substratul organic utilizat pentru fermentație inhibă creșterea acestor microorganisme și implicit rata de producție a hidrogenului. În plus, au fost dezvoltate două modele matematice (Eqs. (4.32) și (4.33)) având la bază modelul Monod modificat, încorporând inhibițiile ce apar în procesul biotehnologic de producere al biohidrogenului provocate de valori foarte acide ale pH-ului și degradarea substratului, pentru a descrie progresul degradării glucozei și al creșterii microbiene în fermentații anaerobe realizate în pat staționar [71; 112]. Aceste modele matematice pot deasemenea descrie progresul producției biohidrogenului împreună cu generarea anumitor produși metabolici secundari.

$$I_{pH} = \exp \left[-3 \left(\frac{pH - pH_{UL}}{pH_{UL} - pH_{LL}} \right)^2 \right] \quad (4.31)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{X/S}} \frac{R_{max}S}{K_S + S} X I_{pH} \quad (4.32)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{R_{max}S}{K_S + S} X I_{pH} - k_d X \quad (4.33)$$

unde R_{\max} reprezintă rata de creștere specifică a microorganismelor producătoare de hidrogen.

În ultimii ani au fost dezvoltate două variante extinse ale modelului Monod, și anume modelul Han–Levenspiel (Eq. (4.34)) împreună cu o variantă modificată a acestuia (Eq. (4.35)). Aceste modele matematice au fost utilizate pentru a descrie efectele concentrației glucozei și a sucrozei asupra ratei de producție a biohidrogenului concluzionând că aceste modele descriu mai exact aceste procese în comparație cu modelul clasic Monod [16].

$$R = \frac{R_{\max}S \left(1 - \frac{S}{S_{\text{crit}}}\right)^m}{S + K_S \left(1 - \frac{S}{S_{\text{crit}}}\right)^n} \quad (4.34)$$

$$R = \frac{R_{\max}S \left(1 - \frac{S}{S_{\text{crit}}}\right)^m}{S + K_S} \quad (4.35)$$

În general, modelul matematic Monod, încorporând termeni adiționali ce descriu diverse inhibiții ale procesului sau rata de degradare a biomasei, poate fi utilizat cu succes pentru a descrie efectele concentrației substratului asupra ratei de degradare a acestuia, creșterea microorganismelor și producerea biohidrogenului în sisteme de fermentare anaerobă [13]. Se recomandă studii adiționale de comparare a acestor modele matematice dezvoltate din modelul Monod pentru identificarea celui mai potrivit model pentru descrierea cazurilor particulare de fermentare anaerobă cu producere de biohidrogen cât și pentru a descrie efectele concentrației substratului sau a anumitor produși metabolici asupra procesului fermentativ.

4.5.3. Modelarea formării produșilor metabolici secundari și a inhibiției procesului

În ultimii ani, o serie de studii au confirmat faptul ca acumularea anumitor produși metabolici, săruri sau chiar a hidrogenului, poate influența necesitățile energetice ale microorganismelor producătoare de hidrogen și chiar inhiba o serie de enzime specifice implicate în generarea hidrogenului. Astfel, totalitatea acestor factori pot inhiba creșterea microorganismelor implicate în producerea hidrogenului prin fermentarea anaerobă a substratului organic și implicit producerea acestuia.

Până în prezent au fost dezvoltate o serie de modele matematice capabile de a descrie efectele inhibitorii ale unor săruri cât și a concentrației în sistem a hidrogenului, asupra proceselor fermentative de producere a biohidrogenului. Dintre acestea, foarte des utilizat este modelul matematic Han–Levenspiel modificat (Eq. (4.35)). Pe lângă acesta, o serie de alte modele matematice (Eq. (4.36), (4.37) și (4.38)) au fost propuse pentru a descrie efectele inhibitorii ale concentrațiilor sucrozei, acetatului de sodiu și a acidului butiric asupra ratei de degradare a substratului organic și a producției biohidrogenului cât și asupra creșterii microorganismelor implicate în procesele de degradare anaerobă a substratului organic cu producere simultană de biohidrogen [154].

$$R = \frac{R_{\max}}{1 + (C/K_C)^m} \quad (4.36)$$

$$R = \frac{R_{max}K_C}{K_C + C} \quad (4.37)$$

$$R = R_{max} \frac{S}{K_S + S} \left(1 - \frac{S}{S_{crit}}\right)^m \left(1 - \frac{C}{C_{crit}}\right)^n \quad (4.38)$$

Temperatura este considerată ca fiind unul dintre cei mai importanți factori ce influențează producția de hidrogen prin procese de fermentație anaerobă datorită efectului direct atât asupra activității microorganismelor implicate în proces cât și asupra enzimelor esențiale, ca de exemplu hidrogenaza. Unul dintre primele modele matematice utilizate pentru a descrie efectele temperaturii asupra ratei de producție a hidrogenului și a creșterii microorganismelor implicate în acest proces, este modelul Arrhenius (Eq. (4.39)). În plus, acest model a fost utilizat cu succes pentru a descrie efectele temperaturii asupra ratei de degradare a substratului organic și a producției anumitor metaboliți finali în timpul proceselor fermentative de producere a biohidrogenului [16].

$$R = A \exp\left(-\frac{E_a}{R_g T}\right) \quad (4.39)$$

O limitare importantă însă a acestui model o reprezintă imposibilitatea de a modela scăderea răspunsului odată cu creșterea temperaturii peste valorile optime. Tocmai pentru a răspunde acestei necesități a fost dezvoltat modelul matematic Ratkowsky (Eq. (4.40)). Acest model reușește cu succes să descrie efectul temperaturii asupra proceselor fermentative de producere a biohidrogenului de-a lungul întregii game de valori a temperaturii. Astfel, modelul matematic Ratkowsky redă curba trasată de valorile temperaturii de la T_{min} la T_{max} , având valori optime la T_{opt} [149].

$$R = [A(T - T_{min})]^2 \{1 - \exp[B(T - T_{max})]\}^2 \quad (4.40)$$

pH-ul este deasemenea considerat un factor cheie în procesele fermentative de producere a biohidrogenului, influențând în primul rând activitatea hidrogenazelor și creșterea microorganismelor implicate în proces. Modelul matematic Andrew (Eq. (4.29 și 4.41)) a fost utilizat pentru a descrie efectul concentrației H⁺ asupra ratei specifice de producție a biohidrogenului în sisteme fermentative. În plus, acest model poate fi utilizat pentru a descrie efectul concentrației H⁺ asupra factorilor ca rata degradării substratului organic, creșterea microorganismelor implicate în aceste procese cât și producerea anumitor produși metabolici secundari [34]. Deasemenea este posibilă modelarea efectului pH-ului asupra sistemelor fermentative de producere a biohidrogenului utilizând acest model. Modelul matematic Ratkowsky (Eq. (4.42)) reprezintă deasemenea un candidat potrivit pentru descrierea efectului pH-ului asupra diferiților parametri ai procesului de producere al biohidrogenului degradând substanțe organice complexe [153].

$$R = \frac{R_{max}[H^+]}{K_a + [H^+] + [H^+]^2/K_b} \quad (4.41)$$

$$R = [A(pH - pH_{min})]^2 \{1 - \exp[B(pH - pH_{max})]\}^2 \quad (4.42)$$

Rata de diluție a substratului organic reprezintă deasemenea un factor decisiv în procesul fermentativ de producere a biohidrogenului, influențând abilitatea microorganismelor de a degrada substanțele organice din sistem. O serie de studii au utilizat atât modelele matematice "substrat unic" cu și fără elemente ce descriu degradarea biomasei cât și modelul "substrat dublu" cu elemente încorporate de degradare a biomasei (bazate pe Eqs. (4.43-4.46)) pentru a descrie efectele ratei de diluție atât asupra generării biohidrogenului în sisteme fermentative anaerobe cât și asupra concentrației glucozei, peptonei, sucrozei, biomasei și o serie de produși metabolici ca acid formic, acid acetic, acid butiric, acid propionic și etanol. Aceste studii au concluzionat faptul că modelul matematic "substrat dublu" cu elemente încorporate de degradare a biomasei este cel mai în măsură de a descrie corect efectele acestor factori asupra ratei de producție a biohidrogenului [153]. Alți autori au utilizat Eq. (4.47) pentru a descrie efectele ratei de diluție asupra degradării sucrozei într-un proces fermentativ de producere a biohidrogenului [19].

$$S = \frac{DK_S}{R_{max} - D} \quad (4.43)$$

$$S = \frac{(D + k_d)K_S}{R_{max} - D - k_d} \quad (4.44)$$

$$X = Y_{X/S}(S_0 - S) \quad (4.45)$$

$$P = Y_{P/X}X \quad (4.46)$$

where R_{max} is the specific microbial growth rate.

$$R = \frac{D + k_d}{Y_{X/S}} \quad (4.47)$$

Având în vedere faptul că majoritatea studiilor referitoare la modelarea matematică a producerii diferiților produși metabolici împreună cu efectul inhibitor al acestora asupra proceselor fermentative de producere al biohidrogenului au fost realizate în sistem staționar, se recomandă investigarea acestor modele și în sisteme semi-staționare și continue. Dintre toate modelele matematice prezentate, doar modelul Han–Levenspiel cu modificări ulterioare a fost utilizat pentru a descrie efectele inhibitorii ale concentrației sărurilor și a hidrogenului asupra ratei de producere a biohidrogenului în procese de fermentare anaerobă [13]. Acest model ar putea fi utilizat pentru a descrie efectul acestor factori și asupra degradării substratului, a creșterii microorganismelor producătoare de hidrogen și asupra ratei de producere a anumitor produși metabolici secundari. Se consideră necesară investigarea mai amănunțită a capacității acestor modele matematice de a descrie efectul diferiților produși metabolici asupra proceselor fermentative de producere a biohidrogenului în sisteme continue și semi-continue.

5. ETAPE ȘI METODE EXPERIMENTALE ABORDATE

5.1. Baza materială

Cercetările doctorale au fost realizate atât în laboratoarele de "Alimentări cu apă și canalizări", "Producere a Biogazului" și "Microbiologia și Chimia Apei" din cadrul Departamentului de Hidrotehnică al Universității "Politehnica" din Timișoara, cât și în laboratoarele de Biologie moleculară și Biotehnologii din cadrul Institutului de Cercetări Biologice al Academiei Maghiare, Szeged, Ungaria.

Într-o fază incipientă, au fost realizate studii preliminare pe stații pilot referitoare metodologia de obținere a biogazului din masa organică (Figurile 5.1 și 5.2). Aceste cercetări preliminare s-au realizat utilizând o soluție pe bază de glucoză fermentată termofil (digestorul 1) și mezofil (digestorul 2). Această tehnologie bioenergetică prezintă două digestoare de contact, echipate cu suport mobil din piese de PVC, cu scopul de a stimula procesele de dezvoltare a microorganismelor anaerobe. Aceste digestoare pot funcționa fie în regim mezofil (28-39°C), fie în regim fie în regim termofil. Temperaturile de fermentare pot fi programate individual pentru fiecare digester astfel acestea pot fi operate fie la aceeași temperatură fie la temperaturi diferite (ex. primul digester este operat în regim termofil iar cel de-al doilea digester este operat în regim mezofil).

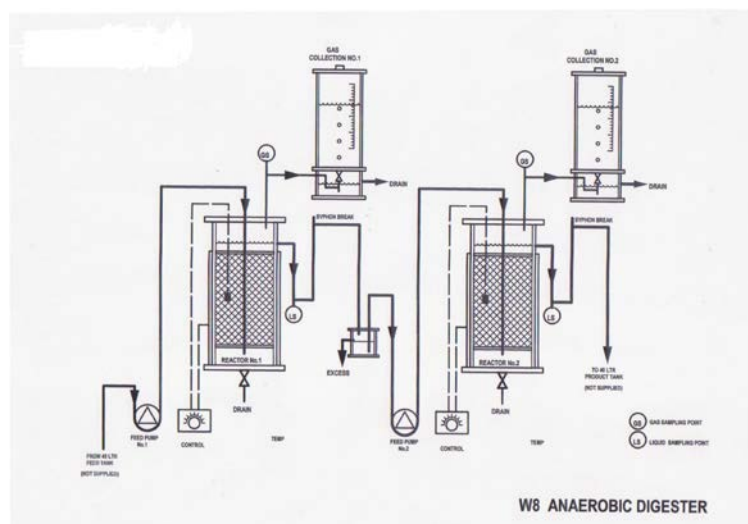


Figura 5.1. Schema tehnică a instalației experimentale Armfield.

Disponerea în serie a digestoarelor anaerobe determină un plus de energie obținută, de circa 30% în prima etapă și 28% în cea de-a doua etapă. Volumele de reacție pot fi egale sau diferite, în funcție de temperaturile de fermentare specifice fiecărui bioreactor. Astfel, în cazul unui regim de funcționare mixt, digesterul termofil trebuie prevăzut cu o capacitate de 50-75% mai mare în comparație cu digesterul anterior termofil [6]. Aceste concluzii sunt utile pentru derularea în continuare a cercetărilor pe instalații pilot de tip industrial.



Figura 5.2. Instalația experimentală Armfield, alcătuită din două digestoare anaerobe de contact cu suport (fix sau mobil) sau fără suport, ce pot funcționa atât în paralel cât și în serie, în regim continuu sau staționar; instalația este prevăzută cu sistem de control și monitorizare al temperaturii din digestoare, pompe pentru circulația fluidelor și recipiente prevăzute cu lichid, utilizate în captarea și contorizarea în paralel a biogazului produs.



Figura 5.3. Instalația experimentală pilot cu capacitate de 300L.

5.2. Obținerea inoculilor

5.2.1. Prelevarea inoculilor

În scopul obținerii unui inocul complex de microorganisme capabile de degradarea apelor uzate provenite din vatra centrelor populate și industria alimentară cu obținerea în paralel a biohidrogenului, au fost prelevate probe din o serie de habitate bogate în materie organică (Figura 5.2). Astfel microorganismele selectate pentru utilizarea ca inocul primar în experimentele întreprinse în cadrul cercetării doctorale provin din: ape uzate din industria berii, nămol activ prelevat de la un bioreactor de mari dimensiuni ce utilizează dejecții menajere pentru a produce metan în regim continuu, treapta de denitrificare a stației de epurare a apelor uzate a orașului Timișoara, nămol prelevat din un braț închis al râului Bârzava. Aceste ecosisteme prezintă o biodiversitate ridicată de microorganisme capabile de degradarea diversilor compuși organici.



Figura 5.3. Punctele de prelevare a microorganismelor ce urmează a fi utilizate ca inoculi în procesele fermentative de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate; **A** - fabrica de bere Timișoreana, **B** - braț închis al râului Bârzava, **C** - treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara, **D** - bioreactor al platformei de cercetare USAMVBT utilizat pentru producerea metanului în urma degradării dejecțiilor animaliere.

5.2.2. Identificarea metodelor optime de pretratament a inoculilor

Datorită faptului că în experimentele de fermentare anaerobă a apelor uzate au fost utilizați inoculi formați din populații mixte de microorganisme, este necesară realizarea unei selecții a populațiilor microbiene producătoare de hidrogen în detrimentul celor consumatoare de hidrogen. În scopul îmbogățirii acestor microorganisme generatoare de hidrogen capabile de a forma spori de rezistență și de a limita dezvoltarea microorganismelor metanogene incapabile de a forma acești spori, s-au utilizat o serie de strategii de pretratament a acestor inoculi (Fig. 5.4). Pretratamentele adoptate au constat în: încălzirea inoculului inițial la o temperatură de 70°C timp de o oră; scăderea valorii pH-ului inoculului inițial până la o valoare de 3, pentru o perioadă de 24 de ore la temperatura camerei utilizând HCl 1N; ultrasonicarea inoculului pentru o perioadă de 30 de minute la descărcări discontinue de 24 KHz (0.5 secunde descărcare urmată de o pauză de 0.5 secunde); o combinație a tuturor acestor pretratamente. Deasemenea, pentru fiecare tip de inocul utilizat, au existat experimente martor în care inoculii microbieni nu au fost supuși pretratamentelor. Toate experimentele în care au fost utilizați atât inoculii supuși pretratamentelor cât și cei fără aceste pretratamente, au fost realizate în trei paralele simultane pentru identificarea eventualelor erori experimentale standard.



Figura 5.4. Realizarea diferitelor strategii de pretratament a consorțiilor inițiale de microorganisme; **A** - pretratamentul cu căldură în baie de apă, **B** - pretratamentul cu acid utilizând HCl 1N, **C** - pretratamentul prin ultrasonicare utilizând ultrasonicatorul, **D** - inocularea consorțiilor microbiene după aplicarea pretratamentelor.

5.3. Determinarea compoziției comunităților microbiene

5.3.1. Cultivarea microorganismelor

Pe toată durata experimentelor de fermentare a apelor uzate s-au realizat proceduri de cultivare a microorganismelor utilizate ca inoculi inițiali (Fig. 5.5). Acestea au fost cultivate atât înainte cât și după realizarea pretratamentelor, utilizând mediul de cultură TGM (30 g/L tryptone, 1 g/L yeast extract, 10 g/L glucose) și mediul de cultură clasic DMI, ambele solidificate cu 1.5% agar. Microorganismele au fost supuse diluțiilor în serie și apoi cultivate în trei serii paralele la o temperatură de 30°C atât în condiții aerobe cât și în condiții anaerobe.



Figura 5.5. Cultivarea pe medii solide a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.

5.3.2. Extragerea și izolarea ADN-ului total

Deasemenea, în paralel cu metodele de cultivare a microorganismelor, s-au realizat procedee de extracție și izolare a ADN-ului total conform metodelor standard, cu modificări [23]. Probele (0.5 g) au fost mai întâi tratate cu 1.3 ml soluție tampon de extracție (Fig. 5.6). După agitarea și amestecarea acestora a fost

adăugată 7 μ l de proteinază K (20.2 mg/ml). În pasul următor s-au adăugat 160 μ l de 20% SDS urmat de agitarea prin inversie și incubarea probelor la 60°C pentru o oră agitând probele la intervale de 15 minute. Apoi probele au fost centrifugate la 13000 RPM timp de 5 minute, transferând supernatantul în tuburi eppendorf noi. Depunerea solidă astfel rezultată, a fost tratată în trei repetiții cu 400 μ l soluție tampon de extracție și 60 μ l soluție SDS (20%) urmând ca probele să fie incubate la 60°C pentru 15 minute cu agitare intermitentă la intervale de 5 minute. Supernatantul colectat a fost amestecat cu cloroform și alcool isoamilic (25:24:1). Stratul apos a fost separat și precipitat cu 0.7 volum izopropanol. După o centrifugare la 13000 RPM pentru 15 min, precipitatul brun a fost spălat cu 70% etanol, uscat la temperatura camerei și dizolvat în soluție TE (10 mM Tris Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0).



Figura 5.6. Extragerea și izolarea ADN-ului total al microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.

5.3.3. Determinarea compoziției comunităților microbiene prin metoda 16S rRNA

Comunitățile microbiene au fost supuse deasemenea analizelor genetice prin metoda 16S rRNA (Fig. 5.6). Pentru o identificare completă a compoziției acestor comunități s-au utilizat primeri specifici atât pentru bacterii cât și pentru arhei (63F 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' 1542R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' și respectiv UA571F 5'-GCYTAAAGSRICCGTAGC-3' UA1204R 5'-TTMGGGGCATRICKACCT-3') Aceste analize au fost efectuate atât la nivelul coloniilor izolate din probele analizate cât și la nivelul ADN-ului total extras din aceste probe. Metoda moleculară 16S rRNA a fost utilizată extensiv în cadrul cercetărilor de profil taxonomic în ultimii ani. Secvențierea capilară a fost utilizată pentru a determina secvențele fragmentelor 16S rRNA amplificate. Identificarea comunităților microbiene a fost realizată prin asocieri homologue utilizând baza de date online BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).



Figura 5.7. Analiza genetică prin metoda 16S rRNA a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.

5.3.4. Caracterizarea metagenomică a comunităților microbiene

În ultimii ani a fost dezvoltată o metodă de secvențiere și analiză a ADN-ului microbial total de înaltă rezoluție (Fig. 5.8). Această metodă ne permite analiza detaliată a tuturor taxonilor componenți din cadrul unui consorțiu microbial complex. Probele au fost astfel pregătite pentru analiza metagenomică și analizate pe platforma Ion Torrent PGM (Life Technologies). Pentru fiecare probă analizată au fost generate în medie aproximativ 291.322 de fragmente secvențiale cu o lungime medie de 161 de nucleotide. Analize extinse de bioinformatică (generarea profilelor taxonomice, evaluarea potențialului metabolic, etc.) au fost efectuate utilizând pachetul software online MG-RAST, o versiune modificată a pachetului RAST (Rapid Annotations based on Subsystem Technology) [24].

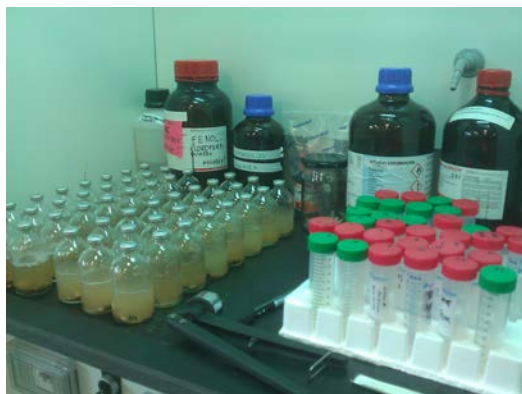


Figura 5.8. Caracterizarea metagenomică a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.

5.4. Proiectarea și operarea bioreactoarelor

Bioreactoare de diferite volume au fost utilizate în condiții diferite pe parcursul cercetărilor experimentale. Diferite substraturi organice au fost utilizate în experimentele de fermentare anaerobă în paralel cu generarea biohidrogenului, variând de la apă uzată sintetică până la apă uzată provenită din industria alimentară. Adesea aceste experimente au fost precedate de o îmbogățire în prealabil a inoculilor microbieni în mediu lichid complet DMI (Fig. 5.9). Motivul pentru care uneori s-a realizat această îmbogățire este legat atât de creșterea numărului microorganismelor ce au supraviețuit pretratamentelor realizate în prealabil cât și pentru aclimatiza aceste microorganisme la condițiile specifice ale proceselor de fermentare anaerobă a apelor uzate și producția simultană a biohidrogenului. Toate experimentele de fermentare au fost realizate în câte trei paralele pentru a identifica deviația standard a rezultatelor înregistrate.



Figura 5.9. Inocularea în mediu lichid de îmbogățire DMI a microorganismelor utilizate în experimentele de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate, utilizând hota microbiologică anaerobă.

Un litru de mediu de îmbogățire lichid DMI conține 3.54 g de NH_4Cl , 6.72 g de NaHCO_3 , 0.125 g de K_2HPO_4 , 0.21 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.017 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{xH}_2\text{O}$, 0.61 g de $\text{Na}_2\text{SxH}_2\text{O}$, 0.018 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g de resazurină și 17.8 g de glucoză în 1 L apă distilată. Mediul DMI a fost apoi sterilizat la 160°C pentru o perioadă de 30 de minute. Îmbogățirea inoculului microbial a fost realizată în bioreactoare de mici dimensiuni (sticlute serologice de 100 ml) conținând 50 ml mediu DMI și 10 ml probă microbială supusă în prealabil pretratamentelor. Sticlutele au fost apoi capsate cu dop de cauciuc și inel de aluminiu în condiții anaerobe în interiorul unei hote microbiene anaerobe COY (Toepffer Lab Systems). Incubarea culturilor microbiene s-a realizat la 30°C pentru o perioadă de șapte zile.

În primele etape experimentale s-a utilizat ca substrat fermentativ apă uzată sintetică. Această abordare are ca scop utilizarea unui sistem model, constant, de fermentare. Un litru de apă uzată sintetică conține: 15 g glucoză, 0.5 g de NH_4Cl , 0.25 g de KH_2PO_4 , 0.25 g de K_2HPO_4 , 0.3 g de $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.039 g de $\text{FeCl}_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0.025 g de CoCl_2 , 0.0115 g de ZnCl_2 , 0.0133 g de $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.006 g de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ și 0.015 g de MnCl_2 . pH-ul inițial a fost ajustat la 5.5 utilizând 1N HCl. Consorțiile de microorganisme pretratate și îmbogățite în prealabil au fost utilizate pentru a inocula bioreactoarele de mici dimensiuni (sticlucțe serologice de 100 ml) utilizând ca substrat de fermentare apă uzată sintetică (Fig. 5.9). Astfel, după etapa de îmbogățire, s-au utilizat 10 ml (20%) din consoțiile microbiene respective pentru a inocula 50 ml de apă uzată sintetică în bioreactoarele de mici dimensiuni. Sticlucțele au fost apoi capsate cu dop de cauciuc și inel de aluminiu în condiții anaerobe în interiorul unei hote microbiene anaerobe COY (Toepffer Lab Systems). Incubarea culturilor microbiene s-a realizat la 30°C pentru o perioadă de șapte zile la o agitație de 130 RPM.



Figura 5.10. Inocularea apei uzate sintetice folosind microorganismele pretratate și îmbogățite în prealabil în mediul lichid de îmbogățire DMI, utilizând hota microbiologică anaerobă (A) și fermentarea acestora în condiții controlate de temperatură și agitare (B).

5.5. Optimizarea procesului

5.5.1. Proiectarea experimentală

Experimentele de proiectare experimentală au fost realizate în etape succesive, utilizând ca strat fermentescibil atât apă uzată sintetică cât și apă uzată provenită în urma proceselor tehnologice de producție a berii. În prima etapa experimentală a fost utilizată apa uzată sintetică în diferite combinații experimentale (Tabelele 5.1-5.3). Această primă etapă experimentală a fost realizată în trei pași consecutivi, desfășurarea fiecărui pas fiind decisă de rezultatele obținute în pasul experimental anterior.

Derularea acestei prime etape experimentale a început cu efectuarea unui număr de 18 linii experimentale, fiecare dintre acestea fiind realizate în trei paralele experimentale, în care au fost analizate efectele diferiților parametri ce guvernează procesul de fermentare anaerobă a proceselor fermentative cu producere paralelă a biohidrogenului, asupra răspunsului vizat (rata de producție a biohidrogenului) (Tabelul 5.1 și Fig. 5.11). În paralel cu analiza acestor parametri, au fost identificați și produșii metabolici rezultați în urma acestor fermentații.

În funcție de rezultatele obținute în acest prim pas experimental, au fost realizate următoarele două matrici experimentale pentru a identifica atât influența factorilor analizați asupra acestor procese cât și eventualele interacțiuni dintre aceștia (Tabelele 5.2 și 5.3).

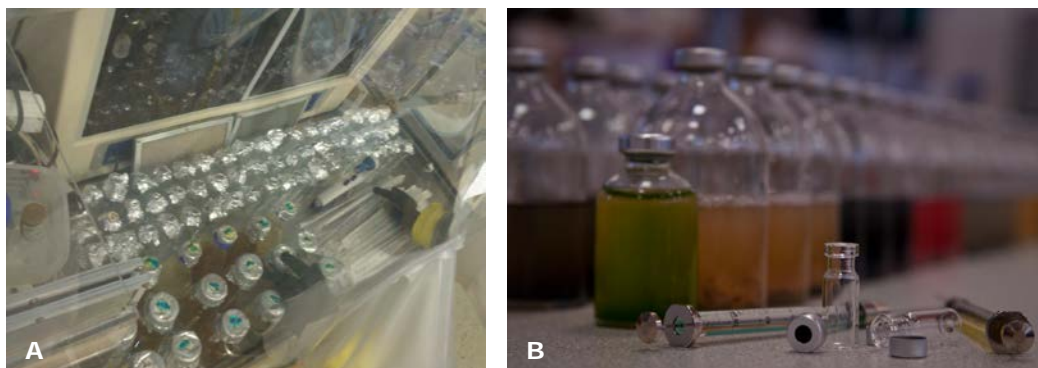


Figura 5.11. A - pregătirea diferitelor condiții experimentale conform matricilor propuse; B - răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate sintetice în cadrul matricilor experimentale dezvoltate.

Următoarea etapă experimentală majoră a fost concepută în vederea obținerii unei strategii de optimizare a procesului de producție al biohidrogenului utilizând apă uzată provenită în urma proceselor tehnologice de fermentare a berii, având la bază informațiile acumulate în etapele experimentale anterioare (Fig. 5.12). Caracteristicile acestei ape uzate provenite din cadrul proceselor tehnologice realizate la fabrica de bere Timișoreana, localitatea Timișoara, România, sunt: CCO total-6558 mg/l, CCO solubil-5066 mg/l, Ntotal-75,8 mg/l și Ptotal-58,4 mg/l.

Această etapă experimentală a fost împărțită deasemenea în mai mulți pași

consecutivi. În primul pas s-a dezvoltat o abordare experimentală factorială completă în vederea discriminării influenței anumitor factori (suport de atașare a biofilmului microbial, temperatura de fermentație, valoarea pH-ului inițial și concentrația substratului organic) asupra procesului de producere al biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din procesele tehnologice de producere a berii. Această abordare experimentală completă oferă avantajul de a obține o rezoluție suficient de mare pentru a nu exista suprapuneri ale efectelor sau interacțiunilor dintre diferiții factori de influență analizați. Factorii de influență analizați au fost aleși pe baza rezultatelor obținute în etapele experimentale anterioare, fiind testați la nivele joase și înalte, codate cu (-1) și respectiv (+1) (Tabel 5.4). Au fost propuse două matrici experimentale, fiecare conținând 8 linii experimentale diferite. Prima matrice experimentală a fost dezvoltată în jurul nivelului (-1) pentru prezența substratului de aderență a biofilmului în timp ce cea de-a doua matrice experimentală a fost dezvoltată pentru nivelul (+1) al aceluiași factor de influență. Motivul acestei abordări este faptul că prezența sau absența substratului de aderență pentru biofilmul bacterian este un factor de influență calitativ, spre deosebire de restul factorilor luați în considerare, aceștia fiind de tip cantitativ.

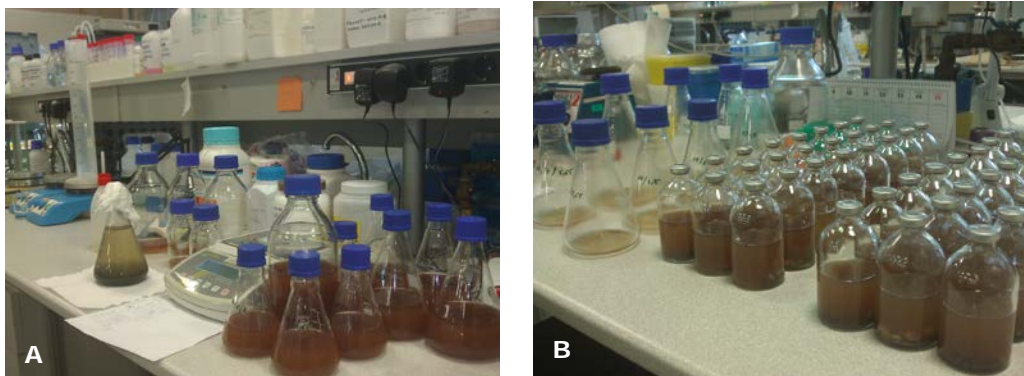


Figura 5.12. **A** - pregătirea diferitelor condiții experimentale conform matricilor propuse; **B** - răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate rezultate în urma proceselor tehnologice de producere a berii, în cadrul matricilor experimentale propuse.

În cel de-al doilea pas experimental, considerând rezultatele obținute în urma etapei de discriminare a influenței factorilor analizați și a interacțiunilor dintre aceștia asupra producției de biohidrogen în urma degradării apei uzate provenite din industria berii, s-a dezvoltat un model nou experimental, menținând pe tot parcursul acestui model prezența substratului de aderență a biofilmului bacterian la (+1). Astfel, utilizând trei variabile independente (temperatura, valorile pH-ului inițial și concentrația inițială a glucozei), s-a dezvoltat o strategie experimentală central-compusă pentru optimizarea producției de biohidrogen utilizând ca substrat fermentescibil apă uzată provenită în urma proceselor de producție a berii (Tabelul 5.5). Modelul experimental este compus dintr-o matrice experimentală de tip Placket-Burman cu 8 încercări experimentale (2^3 factori), urmat de o a doua matrice experimentală de tip central-compus cu 6 puncte axiale, localizate la o distanță de $\alpha = 1,287$ de centrul modelului experimental, valoare ce îi asigură caracterul de

ortogonalitate. Modelul experimental prezintă deasemenea două puncte în centru (Fig. 5.13).

Toate aceste modele de proiectare experimentală au fost analizate utilizând pachetul software Statistica 8 (StatSoft) iar graficele au fost editate utilizând pachetul software GraphPad Prism 5.01.



Figura 5.13. Răspunsurile diferite obținute în urma degradării apei uzate rezultate în urma proceselor tehnologice de producere a berii, în cadrul matricilor experimentale propuse, la nivelul bioreactoarelor de dimensiuni mici (A), medii (B) și respectiv mari (C).

Tabelul 5.1. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în prima etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.

Codul	Factorii de influență	Nivelul inferior (-1)	Nivelul mediu (0)	Nivelul superior (+1)
X ₁	Viteza de agitare	75 RPM	-	150 RPM
X ₂	Originea inoculului ^a	I1	I2	I3
X ₃	Pretratamentul adoptat ^b	M	C	A
X ₄	Temperatura de operare	25°C	30°C	37°C
X ₅	Concentrația inițială a glucozei	15 g/l	20 g/l	25 g/l
X ₆	Valoarea inițială a pH-ului	5	6	7
X ₇	Suportul de aderență pentru biofilmul bacterian	Absent	Încapsulare în gel alginat	Sfere rugoase
X ₈	Raportul N/P	3	7	11

a I1- Bazinul de staționare din treapta biologică de epurare a apei uzate din cadrul fabricii de bere Timișoreana; I2- Bioreactorul utilizat în producerea metanului; I3- Treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara.

b M- martor, nesupus pretratamentelor; C- pretratament prin căldură; A- pretratament utilizând HCl.

Tabelul 5.2. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în a doua etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.

Codul	Factorii de influență	Nivelul inferior (-1)	Nivelul mediu (0)	Nivelul superior (+1)	Nivelul adițional (+2)
X ₁	Originea inoculului ^a	I1	I2	I3	-
X ₂	Pretratamentul adoptat ^b	C	A	U	CAU
X ₃	Temperatura de operare	25°C	30°C	37°C	-
X ₄	Concentrația inițială a glucozei	15 g/l	20 g/l	25 g/l	-
X ₅	Valoarea inițială a pH-ului	5	6	7	-
X ₆	Suportul de aderență pentru biofilmul bacterian	Absent	-	Sfere rugoase	-
X ₇	Raportul N/P	3	-	11	-

a I1- Bazinul de staționare din treapta biologică de epurare a apei uzate din cadrul fabricii de bere Timișoreana; I2- Bioreactorul utilizat în producerea metanului; I3- Treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara.

b C- pretratament prin căldură; A- pretratament utilizând HCl; U- pretratament prin ultrasonicare; CAU- utilizarea concomitentă a celor trei pretratamente.

Tabelul 5.3. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în a treia etapă experimentală a proiectării statistice factoriale.

Codul	Factorii de influență	Nivelul inferior (-1)	Nivelul superior (+1)
X ₁	Originea inoculului ^a	I2	I3
X ₂	Pretratamentul adoptat ^b	A	CAU
X ₃	Concentrația inițială a glucozei	15 g/l	25 g/l
X ₄	Suportul de aderență pentru biofilmul bacterian	Absent	Sfere rugoase
X ₅	Raportul N/P	3	11

a I2- Bioreactorul utilizat în producerea metanului; I3- Treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara.

b A- pretratament utilizând HCl; CAU- utilizarea concomitentă a celor trei pretratamente.

Tabelul 5.4. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în etapa experimentală factorială completă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.

Codul	Factorii de influență	Nivelul inferior (-1)	Nivelul superior (+1)
X ₁	Suportul de aderență pentru biofilmul bacterian	Absent	Sfere rugoase
X ₂	Temperatura de operare	25°C	37°C
X ₃	Valoarea inițială a pH-ului	4.8	6.5
X ₄	Concentrația inițială a glucozei	5 g/l	15 g/l

Tabelul 5.5. Factorii de influență împreună cu nivelele codate ale acestora, analizați în etapa experimentală multifactorială Placet-Burnman și central-compusă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.

Codul	Factorii de influență	Nivelul inferior (-1)	Nivelul mediu (0)	Nivelul superior (+1)
X ₁	Temperatura de operare	25°C	31°C	37°C
X ₂	Valoarea inițială a pH-ului	4.8	5.6	6.5
X ₃	Concentrația inițială a glucozei	5 g/l	10 g/l	15 g/l

5.5.2. Modelarea matematică și simularea fermentației anaerobe în absența luminii cu producere de biohidrogen utilizând programele Eureka™ Pro Desktop și BioWin

În paralel cu desfășurarea experimentelor de fermentare și producere a biohidrogenului utilizând ape uzate sintetice și industriale ca substrat fermentescibil și diverși inoculi microbieni, s-au realizat activități de modelare și simulare matematică a acestor procese. Această abordare are scopul înțelegerii mai aprofundate a fenomenelor fizice, chimice și biologice implicate în aceste procese, în scopul realizării unei optimizări complete, precum și validarea implementării tehnologiei noi dezvoltate de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale, în cadrul procesului tehnologic de epurare a apelor uzate.

Pentru studiul procesului de fermentare anaerobă a apelor uzate utilizate ca substrat, a fost utilizat programul BioWin, pachet software dedicat modelării și simulării proceselor din stațiile de epurare a apelor uzate. Acesta este un program complex de modelare și simulare a funcționării stațiilor de epurare a apelor uzate comunale și industriale. Acest pachet software poate fi utilizat pentru calcularea și simularea a până la 50 de variabile și 60 de procese unitare aerobe și anaerobe. La baza programului se află modelul biologic de degradare a materiei organice, suplimentat cu o serie de alte modele matematice (modelul chimiei apei utilizat pentru calcularea valorii pH-ului de-a lungul proceselor biologice; modelul de transfer al masei, utilizat pentru modelarea valorilor oxigenului dizolvat și alte interacțiuni gaz-lichid; etc.).

Pentru modificarea și optimizarea modelelor matematice utilizate în modulele componente ale programului BioWin, s-a utilizat pachetul de unelte software Eureka. Acesta permite analizarea datelor experimentale și detectarea atât a ecuațiilor guvernante cât și a relațiilor existente între acestea.

5.6. Metode analitice

De-a lungul etapelor experimentale, atât în timpul îmbogățirii microorganismelor cât și în timpul experimentelor propriuzise, s-au realizat o serie de măsurători de control atât a diversilor parametri implicați în desfășurarea proceselor fermentative cât și a răspunsurilor acestor procese (Fig. 5.14). Concentrația celulelor microorganismelor din probele analizate a fost identificată prin metoda absorbției optice la 600 nm (OD_{600}) utilizând spectrofotometru Jenway 6320D. Măsurătorile pH-ului s-au realizat în general la intervale de 48 de ore utilizând un pH-metru Thermo Scientific Orion 3-star. Nivelul oxigenului dizolvat din cadrul bioreactoarelor a fost monitorizat în timp real utilizând un AD 132 DO-metru (ADWA Instruments).

Cantitatea și compoziția biogazului produs în timpul experimentelor de fermentare a apelor uzate, au fost evaluate prin gascromatografie (GC) utilizând un sistem GC Agilent Technologies 7890A echipat cu detector de conductivitate termică, utilizând argon ca și gaz transportor. Temperaturile injectorului, a detectorului și a coloanei au fost menținute la valori de 30° C, 200° C și respectiv 230° C. Coloana utilizată a fost de tip HP PLOTQ (15 m x 530 mm x 40 mm). Înainte de injectarea biogazului în GC (0.5 ml), acesta a fost în prealabil agitat utilizând

seringi etanșe pentru gaz, pentru a evita acumulările hidrogenului în partea superioară a bioreactoarelor.

Produșii metabolici rezultați în timpul proceselor fermentative și zaharurile rămase nedegradate, au fost analizate prin intermediul cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) utilizând un Hitachi LaChrom Elite HPLC echipat cu un detector de index de refracție L-2490 (temperatura fiind fixată la 41°C) și un termostat de coloană L-2350. Pentru injectarea probelor (40 μl) a fost utilizat un prelevator automat L-2200. Pentru separarea diferiților compuși organici s-a utilizat o coloană de analiză a acizilor organici model Transgenomic ICsep COREGEL-64H (7.8 x 300mm). Temperatura acesteia a fost fixată la 50°C. Eluția probelor a fost realizată utilizând o soluție de H₂SO₄ 0.01M cu o curgere constantă de 0.8 ml min⁻¹.

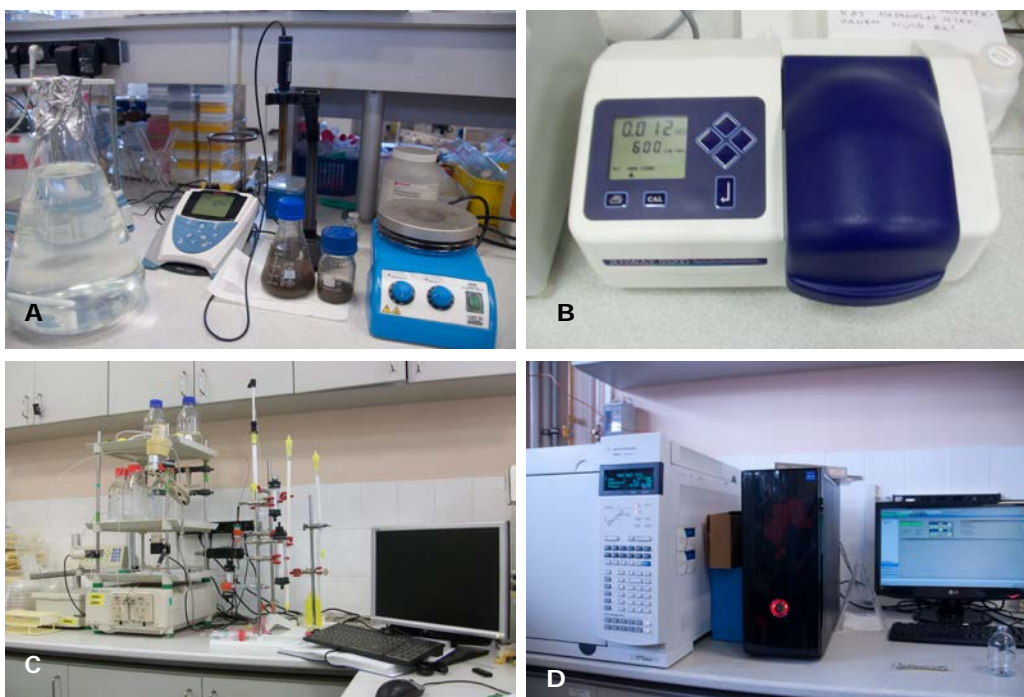


Figura 5.14. Diferitele aparate utilizate pentru monitorizarea proceselor fermentative; **A** - pH metru, **B** - spectrofotometru, **C** - HPLC, **D** - gaz-cromatograf.

6. STUDII ȘI CERCETĂRI EXPERIMENTALE

6.1. Identificarea grupelor principale de microorganisme implicate în procesul de producere al biohidrogenului

Pentru a obține și controla un inocul microbial capabil de a degrada atât ape uzate comunale cât și ape uzate provenite din industria alimentară, au fost prelevate probe din diferite ecosisteme bogate în substanțe organice [14]. Din aceste probe au fost mai apoi izolate și îmbogățite populații microbiene utilizate ca inocul în bioreactoarele de mici dimensiuni, pentru producerea biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice. Mediile de prelevare a acestor consorții microbiene sunt: nămol activ rezultat din treapta de preepurare a apelor uzate provenite din industria berii, Fabrica de Bere Timișoreana (**Inocul 1**); nămol prelevat din un canal închis al râului Bârzava, supus unei accentuate poluări organice provenite din supraplinul foselor septice a unui cartier al orașului Bocșa (**Inocul 2**); nămol activ provenit dintr-un bioreactor utilizat în producția metanului în urma digestii anaerobe a dejecțiilor animaliere (**Inocul 3**); nămol activ provenit din treapta de denitrificare a apelor uzate din cadrul stației de epurare a orașului Timișoara (**Inocul 4**). Aceste ecosisteme prezintă o biodiversitate ridicată de microorganisme capabile de degradarea diversilor compuși organici. Înainte de inocularea bioreactoarelor de mici dimensiuni în vederea fermentării apei uzate sintetice, aceste consorții microbiene au fost supuse proceselor de pretratament și cultivare pe mediu lichid de îmbogățire DMI. Aceste pretratamente au constat în supunerea inoculilor la căldură ridicată (**C**), acid (**A**), ultrasonicare (**U**) și o combinație a tuturor acestor pretratamente (**CAU**). Deasemenea, pentru fiecare tip de inocul utilizat, au existat experimente martor în care inoculii microbieni nu au fost supuși pretratamentelor (**M**).

6.1.1. Efectul diferitelor metode de îmbogățire a microorganismelor producătoare de hidrogen asupra metabolismului acestora

În timpul îmbogățirii diferitelor consorț microbiene în medii de cultură lichid DMI, s-au realizat o serie de analize atât în ceea ce privește compoziția biogazului rezultat și a compușilor metabolici, cât și a dinamicii populaționale microbiene. Astfel s-a realizat o monitorizare completă a metabolismului și dinamicii microorganismelor implicate în procesele fermentative de producere al biohidrogenului atât în timpul îmbogățirii acestora cât și în timpul experimentelor propriuzise de degradare a apelor uzate sintetice în vederea generării biohidrogenului. Încă din timpul dezvoltării acestor microorganisme în mediu de îmbogățire DMI, se observă diferențe majore între abilitatea acestora de a produce biohidrogen, atât din punct

de vedere a provenienței lor cât și a pretratamentelor la care acestea au fost supuse. Microorganismele provenite din Inoculul 1 (I1) și cele provenite din Inoculul 4 (I4) au manifestat o producție generală mai ridicată de biohidrogen. Astfel conținutul de H₂ din totalul biogazului generat în cele 7 zile de îmbogățire a atins un maxim de 38% în cazul I1 supus ultrasonicării (U) și 42% în cazul I4 supus deasemenea ultrasonicării (U). În același timp, microorganismele provenite din Inoculul 2 (I2) au atins o concentrație a H₂ de maxim 17% din totalul de biogaz generat în cazul supunerii acestora la pretratamentul prin căldură (C), în timp ce microorganismele provenite din Inoculul 3 (I3) au produs o concentrație de maxim 14% H₂ în compoziția totalului de biogaz produs când acestea au fost supuse ultrasonicării (U) (Fig.6.1).

Diferitele pretratamente utilizate asupra inoculilor microbiene au generat răspunsuri diferite în cadrul populațiilor de microorganisme asupra căilor metabolice și implicit a ratei de producere a biohidrogenului. În general, în timpul îmbogățirii populațiilor microbiene, inoculii supuși pretratamentelor au produs cantități mai mari de hidrogen indiferent de originea acestora. Pretratamentul ce a generat cantitatea cea mai mare de biohidrogen, este ultrasonicarea (U), în urma căreia I4 a produs un total maxim de 50.94 ml, în timp ce microorganismele supuse pretratamentului cu acid (A) au generat cele mai mici cantități de biohidrogen (un maxim de 10.93 ml în cazul I3).

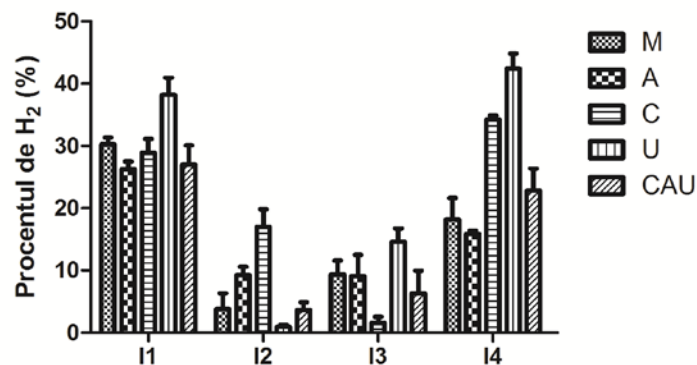


Figura 6.1. Conținutul de hidrogen din biogazul analizat la sfârșitul etapei de îmbogățire a microorganismelor; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.

La finalul perioadei de îmbogățire a comunităților microbiene în mediu lichid DMI s-au analizat produșii metabolici primari (concentrațiile glucozei, etanolului, acidului butiric, etc.) prin metoda cromatografiei lichide de înaltă performanță (HPLC) (Fig. 6.2). Concentrația inițială a glucozei (sursa principală de carbon pentru procesele biologice) a fost stabilită la 17.8 g/l. Cea mai accentuată rată de degradare a glucozei a fost înregistrată la nivelul microorganismelor provenite din I1 și I4 supuse ultrasonicării (U) (cu o concentrație finală de 0.62 g/l glucoză pentru I1 și 0.95 g/l glucoză pentru I4 respectiv). În comparație, microorganismele provenite din I2 și I3 au prezentat o rată mai scăzută a degradării glucozei (o concentrație finală de 11 g/l glucoză în cazul I2 pretratat cu acid și 12.57 g/l în cazul I3 fără pretratament). În ceea ce privește producția de etanol nu există diferențe majore între diferiții inoculi utilizați și diferitele pretratamente aplicate (Fig. 6.2).

Concentrația finală a etanolului a variat între 2 și 2.5 g/l, diferențe notabile fiind înregistrate doar în cazul pretratamentului cu acid al I1 și I4 supus tuturor pretratamentelor (CAU) unde au fost înregistrate valori ușor mai mici (Fig. 6.2). Există diferențe notabile între diferiții inoculi utilizați, la nivelul concentrației finale a acidului butiric. Aceste valori variază considerabil de asemenea și între diferitele tipuri de pretratament aplicate acestor inoculi (Fig. 6.2). În general se observă o tendință mai mare de acumulare a acidului butiric în urma activității metabolice a microorganismelor provenite din I1 și I4 în comparație cu cele provenite din I2 și I3. Cele mai mari concentrații finale de acid butiric au fost de 2.87 g/l (I1) și 3.21 g/l (I4). În ambele cazuri probele respective au fost supuse ultrasonicării (U). Cele mai mari concentrații de acid butiric înregistrate în cazul microorganismelor provenite din I2 și I3 au fost de 0.64 g/l (pretratament prin căldură) și respectiv 0.55 g/l (pretratament prin ultrasonicare). Concentrațiile acizilor lactici, acetici și propionici au variat de asemenea considerabil în funcție de natura inoculilor și pretratamentele la care aceștia au fost supuși (Fig. 6.2). Cele mai mari concentrații ale acidului acetic au fost identificate în urma activității metabolice a microorganismelor supuse ultrasonicării provenite din I1 și I4, atingând valorile de 1.73 g/l și respectiv 1.03 g/l. Concentrația cea mai mare a acidului lactic a fost măsurată în cazul microorganismelor netratate (M) provenite din I4, atingând o valoare finală de 3.55 g/l. Concentrațiile finale ale acidului propionic au fost nesemnificative în majoritatea cazurilor, excepție făcând microorganismele pretratate cu acid provenite din I2, atingând o valoare finală de 0.88 g/l.

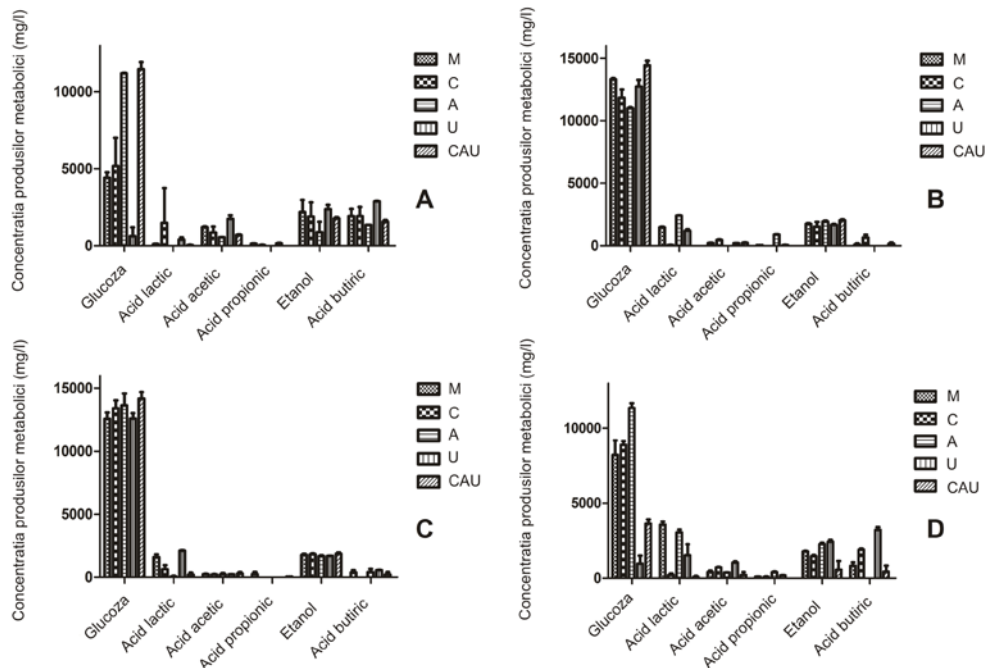


Figura 6.2. Concentrația produșilor metabolici analizați, la sfârșitul etapei de îmbogățire a consorțiilor microbiene; **Panoul A-** I1, **Panoul B-** I2, **Panoul C-** I3 și **Panoul D-** I4; **M-** martor, **A-** pretratament cu acid, **C-** pretratament cu căldură, **U-** pretratament prin ultrasonicare și **CAU-** utilizarea tuturor pretratamentelor.

Valorile pH-ului au fost înregistrate pe întreg parcursul experimentelor de îmbogățire și degradare a apelor uzate sintetice. Valoarea inițială a acestuia a fost de 8.5, înregistrându-se o scădere continuă de-a lungul fazei de îmbogățire în mediu lichid DMI, indiferent de tipurile de pretratament utilizate sau de originea inoculilor. Cu toate acestea, au fost identificate mici diferențe în evoluția pH-ului în cadrul probelor diferite. În cazul microorganismelor provenite din I1 nu au fost detectate diferențe semnificative ale valorilor pH-ului în cadrul diferitelor pretratamente utilizate, înregistrându-se o valoare finală a acestuia de 4.0. La nivelul microorganismelor provenite din S2, cea mai bazică valoare finală a pH-ului s-a înregistrat în cazul utilizării tuturor pretratamentelor (5.4), restul pretratamentelor împreună cu martorul înregistrând valori cuprinse între 4.2 și 4.5. Cea mai mare variație a valorilor finale ale pH-ului între diferitele pretratamente aplicate au fost în cazul microorganismelor provenite din I3 (între 4.5 și 6.1). În mod similar situației întâlnite în cazul microorganismelor provenite din I1, și cele provenite din I4 au înregistrat diferențe minore între valorile finale ale pH-ului, variând între 3.7 și 4.0.

6.1.2. Fermentarea apei uzate sintetice utilizând diferiți inoculi microbieni

După etapa de îmbogățire a culturilor microbiene prelevate din diferitele medii (I1, I2, I3 și I4) și supuse în prealabil pretratamentelor, acestea au fost utilizate pentru a inocula bioreactoare de mici dimensiuni conținând apă uzată sintetică. Sa optat pentru utilizarea apei uzate sintetice în această etapă experimentală pentru a avea un sistem model și constant ce permite compararea diferiților inoculi în condiții de laborator controlabile. În timpul acestei etape experimentale s-au înregistrat diferențe semnificative în producția biohidrogenului în funcție de proveniența inoculilor și tipul de pretratament la care aceștia au fost supuși. Astfel, valori notabile ale cantității de hidrogen produse în urma degradării apei uzate sintetice au fost înregistrate doar la nivelul microorganismelor provenite din I1 și I3 (Fig. 6.3). Microorganismele provenite din I2 și I4 nu au produs cantități semnificative de biohidrogen în urma degradării apei uzate sintetice, indiferent de strategiile de pretratament utilizate.

În această etapă experimentală, microorganismele provenite din I1 și supuse pretratamentului prin ultrasonicare, au generat doar o cantitate totală de 9% H₂ din totalul de biogaz produs, deși în etapa de îmbogățire în mediu lichid DMI, acestea au produs o cantitate totală de 38% H₂ din totalul de biogaz generat (Fig. 6.1). În urma degradării apei uzate sintetice, cea mai mare cantitate de biohidrogen produsă de microorganismele provenite din I1 a rezultat în urma utilizării inoculului martor, netratat (M), atingând o concentrație de 27% H₂ în volumul total de biogaz produs. În mod interesant, în cadrul consorțiului microbial martor (M) provenit din I3 nu a fost înregistrat biohidrogen în această etapă experimentală. Doar populațiile microbiene provenite din acest inocul supuse pretratamentelor au produs cantități considerabile de biohidrogen (între 5 și 13% din volumul total de biogaz produs) (Fig. 6.3).

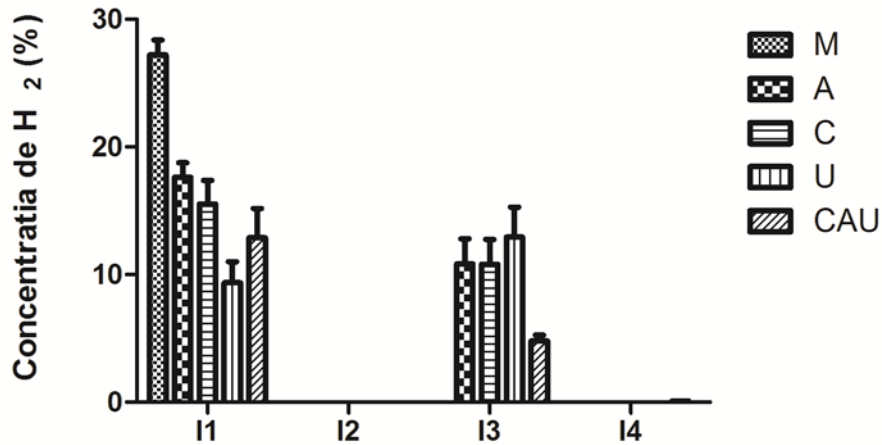


Figura 6.3. Conținutul de hidrogen din biogazul analizat la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.

Deoarece cantitățile cele mai mari de biohidrogen produse în această etapă experimentală au fost generate de microorganismele provenite din I1, în urma degradării apei uzate sintetice, în continuare sunt prezentate rutele metabolice adoptate doar de aceste microorganisme. Există diferențe considerabile în ceea ce privește producerea diferiților produși metabolici în cadrul pretratamentelor utilizate asupra microorganismelor provenite din I1 (Fig. 6.4). Concentrația inițială a glucozei din apa uzată sintetică a fost de 3.7 g/l. Rata cea mai mare de consum a glucozei a fost întâlnită în cazul inoculului martor, ce nu a fost supus pretratamentelor (M), ducând la consumul total al acesteia până la finalul experimentelor de degradare a apei uzate sintetice (Fig. 6.5). La capătul opus se află cazul în care au fost utilizate toate pretratamentele asupra inoculului (CAU), condiții în care la sfârșitul fermentației apei uzate sintetice a fost detectată o concentrație a glucozei de 2.31 g/l. Concentrația etanolului măsurată în cazul fermentațiilor realizate de microorganismele provenite din I1 diferă în funcție de strategiile diferite de pretratament utilizate (Fig. 6.4). Cea mai mare concentrație a etanolului a fost întâlnită în cazul inoculului martor, ce nu a fost supus pretratamentelor (M), atingând o valoare de 2.68 g/l până la finalul experimentelor de degradare a apei uzate sintetice (ziua 12 de fermentație) (Fig. 6.5). Deasemenea, concentrația cea mai mică a etanolului a fost detectată în cazul în care au fost utilizate toate pretratamentele asupra inoculului (CAU), cu o concentrație maximă de 1.91 g/l (ziua 5 de fermentație). Și concentrațiile acidului butiric au variat considerabil între diferitele metode de pretratament utilizate asupra microorganismelor provenite din I1 (Fig. 6.4). Consorțiul martor (M) a generat concentrația cea mai mare de acid butiric (1.3 g/l la finalul etapei experimentale). În contrast, cea mai mică concentrație a acidului butiric a fost detectată în cazul utilizării pretratamentului cu acid a inoculului microbial provenit din I1, generând o concentrație maximă de 0.24 g/l spre finalul experimentelor de degradare anaerobă a apei uzate sintetice (Fig. 6.4).

Concentrațiile acizilor lactic acetic și propionic deasemenea variază dramatic între diferitele pretratamente ale comunităților microbiene provenite din I1 (Fig. 6.4). Concentrațiile acidului lactic au fost relativ ridicate în cazul tuturor pretratamentelor utilizate, atingând valoarea maximă de 1.83 g/l în cazul inoculului pretratată cu căldură. În mod interesant, consorțiul martor (M), nesupus pretratamentelor, a înregistrat o producție de doar maxim 0.08 g/l. În general au fost detectate concentrații scăzute ale acidului acetic în cazul pretratamentelor utilizate (între 0.18 și 0.26 g/l). O concentrație mai mare a fost înregistrată în cazul consorțiului martor (M), nesupus pretratamentelor, atingând un maxim de 0.48 g/l (Fig. 6.4). Acidul propionic a fost detectat în concentrații foarte mici în cazul atât a inoculilor microbieni supuși diferitelor strategii de pretratament cât și în cazul inoculului martor.

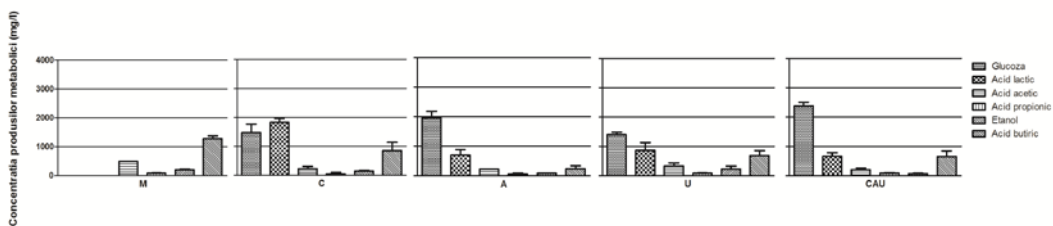


Figura 6.4. Concentrația produșilor metabolici analizați, la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice; **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.

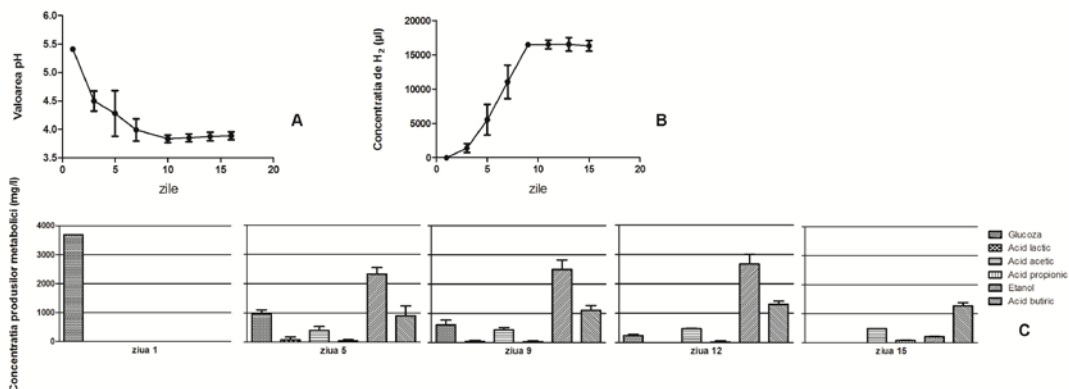


Figura 6.5. Evoluția fermentației anaerobe a apei uzate sintetice în cazul inoculului martor, nesupus pretratamentelor, provenit din I1; **Panoul A**- evoluția pH-ului, **Panoul B**- rata producției de H₂ și **Panoul C**- concentrația produșilor metabolici.

În ceea ce privește variațiile pH-ului între diferiții inoculi proveniți de la I1, nu au fost detectate diferențe majore, înregistrându-se o tendință generală de scădere constantă a pH-ului de-a lungul fazei experimentale de degradare a apei uzate sintetice, de la o valoare inițială de 5.5, la valori finale cuprinse între 3.5 și 3.8 înregistrate spre sfârșitul fazei experimentale.

6.1.3. Investigarea compoziției comunităților microbiene

Rata de supraviețuire a microorganismelor utilizate ca inocul, supuse pretratamentelor, a fost determinată de-a lungul celor două etape experimentale, îmbogățire în mediul lichid DMI respectiv degradarea apei uzate sintetice. În acest scop s-au aplicat metode de cultivare în condiții aerobe și anaerobe a microorganismelor prelevate din aceste consorții, urmate de metode moleculare de identificare a acestor comunități microbiene. Numărul coloniilor microbiene formate în urma cultivării acestor microorganisme pe perioada etapelor experimentale, sugerează faptul că efectul cel mai mare asupra biodiversității inoculilor l-au avut atât utilizarea combinației tuturor celor trei pretratamente (CAU) cât și utilizarea ultrasonice (U). În comparație cu aceste metode de pretratament, utilizarea acidului (A) și a căldurii (C) asupra consorțiilor microbiene a generat o scădere moderată a biodiversității acestora. După cum este de așteptat, populațiile microbiene martor, nesupuse pretratamentelor (M) au menținut un grad ridicat de biodiversitate de-a lungul etapelor experimentale. Cu toate acestea însă, metodele de cultivare a microorganismelor pot oferi doar o estimare orientativă a efectului acestor pretratamente asupra populațiilor microbiene datorită faptului că majoritatea microorganismelor nu pot fi cultivate în condiții de laborator. Astfel, pentru a obține o imagine de ansamblu, completă, asupra biodiversității acestor populații și dinamica acestora în urma aplicării strategiilor de pretratament și a inoculării apei uzate sintetice, s-au utilizat metode moleculare și genomice utilizându-se ADN-ul total purificat din aceste probe. Astfel s-au utilizat analize 16S rRNA specifice bacteriilor, arheelor și a eucariotelor pentru a determina raportul dintre aceste grupe principale de organisme. Ca și o metodă independentă, s-a utilizat secvențierea metagenomică de înaltă rezoluție pentru a obține o imagine și mai detaliată asupra profilului taxonomic a inoculilor investigați. În continuare, datorită faptului că producția cea mai mare de biohidrogen în urma degradării apei uzate sintetice a fost obținută în cazurile în care s-au utilizat ca inocul microorganisme provenite din I1, prezentăm compoziția și evoluția taxonomică doar a acestor consorții microbiene.

În general, se observă o accentuată modificare în compoziția inoculilor utilizați, în comparație cu structura inițială a acestora, în funcție de strategiile de pretratament utilizate. Modificarea cea mai evidentă apare în raportul dintre bacterii și arhei (Tabelul 6.1). Se observă o tendință generală de scădere a membrilor aparținând arheelor în detrimentul bacteriilor, în urma utilizării pretratamentelor. O privire mai îndetaliată relevă faptul că deși numărul arheelor scade în comparație cu bacteriile de-a lungul desfășurării etapelor experimentale, compoziția acestora rămâne relativ constantă spre deosebire de membrii bacteriilor, unde au loc modificări majore a compoziției și structurii populaționale (Fig. 6.6).

Analizele metagenomice efectuate asupra microorganismelor provenite din I1 arată o modificare pregnantă a compoziției populaționale bacteriene, de la o comunitate inițială cu o biodiversitate relativ ridicată, la un sistem taxonomic mult mai puțin complex. Inoculul inițial provenit din I1 este dominat de Proteobacteria (55.24% din totalul speciilor bacteriene), urmat de Firmicutes (19.12% din totalul speciilor bacteriene), Bacteroidetes (14.98% din totalul speciilor bacteriene) și alți taxoni (10.66% din totalul speciilor bacteriene). Această compoziție taxonomică se restructurează complet ca și răspuns la diferitele strategii de pretratament utilizate urmate de îmbogățirea acestora în mediu de cultură lichid DMI; de ex. compoziția finală a bacteriilor din cadrul inoculului supus pretratamentului prin căldură (H), este dominată la finalul fermentării apei uzate sintetice de Firmicutes (84.29% din totalul

speciilor bacteriene), prezentând un număr considerabil redus de Proteobacteria (12.31% din totalul speciilor bacteriene) și alți taxoni (3.4% din totalul speciilor bacteriene) (Fig. 6.6). Astfel de rearanjamente drastice în cadrul comunităților microbiene au fost observate în cazul tuturor pretratamentelor.

Tabelul 6.1. Compoziția microorganismelor provenite din I1 în diferite etape experimentale.

Inoculul	Domeniile de viață (%)		
	Archaea	Bacteria	Eukaryota
Populația microbiană inițială a I1	6	92	2
Comunitatea microbiană martor, nesupusă pretratamentelor, la sfârșitul fazei de îmbogățire în mediu lichid DMI	18.3	79	2.7
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin căldură, la sfârșitul fazei de îmbogățire în mediu lichid DMI	10	87	2
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin acid, la sfârșitul fazei de îmbogățire în mediu lichid DMI	6.2	92.2	1.6
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin ultrasonicare, la sfârșitul fazei de îmbogățire în mediu lichid DMI	2.4	95.7	1.9
Comunitatea microbiană martor, nesupusă pretratamentelor, la sfârșitul fazei de degradare a apei uzate sintetice	2.8	95.2	2
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin căldură, la sfârșitul fazei de degradare a apei uzate sintetice	2	96	2
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin acid, la sfârșitul fazei de degradare a apei uzate sintetice	1.5	97	1.5
Comunitatea microbiană supusă pretratamentului prin ultrasonicare, la sfârșitul fazei de degradare a apei uzate sintetice	0.9	97.1	2

6.1.4. Discuții

Studiile referitoare la determinarea condițiilor optime de pretratere a consorțiilor microbiene complexe pentru maximizarea eficienței capacității acestora de a degrada substraturile organice complexe cu generarea concomitentă al biohidrogenului, sunt sporadice și incomplete. Deasemenea există aspecte încă contradictorii referitoare la strategiile optime de pretratere a acestor microorganisme. Acest lucru poate fi pus pe seama diferențelor existente între originea acestor microorganisme, a condițiilor de efectuare a acestor pretratamente și a substratului utilizat în procesele fermentative de producere a biohidrogenului.

În cazul abordării noastre experimentale descriem o metodă de obținere a unor populații microbiene îmbogățite selectiv, capabile de producerea biohidrogenului în urma degradării apei uzate. În prima etapă experimentală s-a realizat o îmbogățire a consorțiului microbian supus în prealabil unor metode de pretratament, în vederea eliminării microorganismelor consumatoare de hidrogen

(metanogene) în paralel cu îmbogățirea microorganismelor producătoare de biohidrogen. În timpul acestei etape, s-au analizat o serie de caracteristici ale acestui sistem, precum rata de producție a biohidrogenului, concentrația produșilor metabolici și valorile pH-ului, în funcție de strategiile de îmbogățire aplicate. Aceste comunități microbiene astfel selectate și îmbogățite au fost utilizate în pasul experimental următor, pentru a inocula bioreactoarele de mici dimensiuni în vederea degradării apei uzate sintetice și a producției simultane de biohidrogen. și în această etapă experimentală au fost analizate rata de producție a biohidrogenului, concentrația produșilor metabolici și valorile pH-ului.

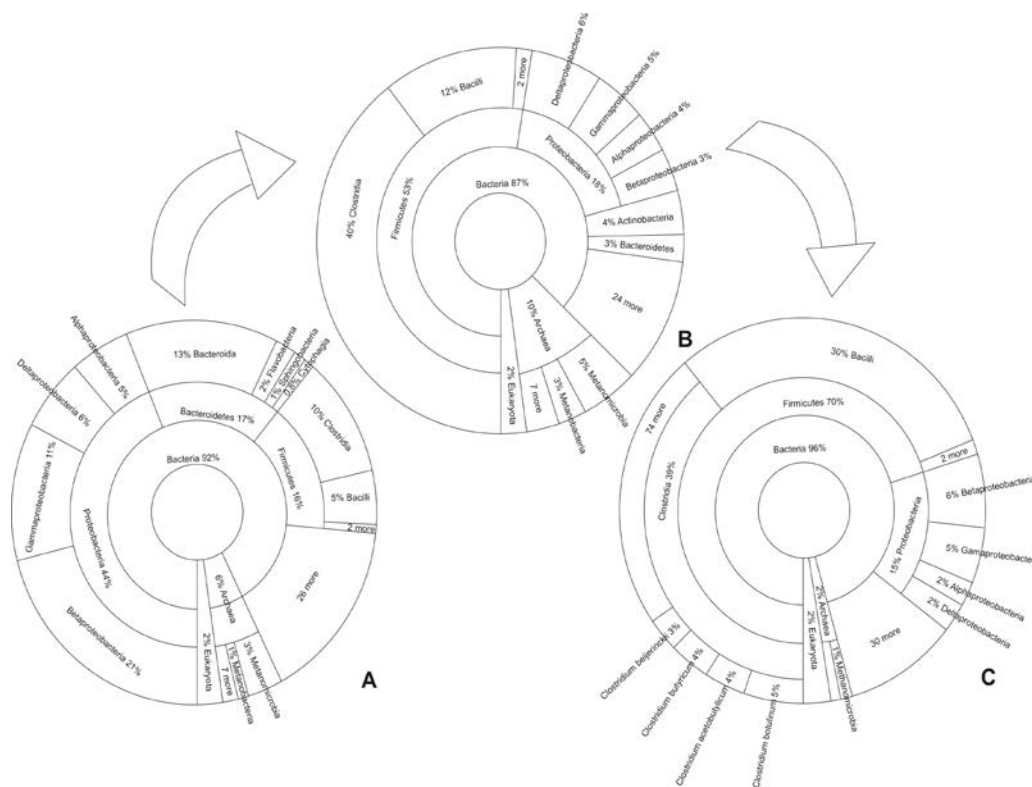


Figura 6.6. Restructurarea taxonomică a microorganismelor provenite din I1 și supuse pretratamentului cu căldură, pe parcursul etapelor experimentale; **Panoul A-** structura inițială a consorțiului microbial; **Panoul B-** structura consorțiului microbial la sfârșitul etapei de îmbogățire; **Panoul C-** structura consorțiului microbial la sfârșitul etapei de degradare a apei uzate sintetice.

Au fost înregistrate diferențe majore între diferiții inoculi utilizați, în ceea ce privește rata de producție a biohidrogenului, între faza experimentală de îmbogățire a microorganismelor în mediu lichid DMI și cea de degradare a apei uzate sintetice. Astfel, cu toate că în timpul etapei de îmbogățire a microorganismelor toate pretratamentele utilizate asupra celor 4 inoculi au generat cantități semnificative de biohidrogen, în timpul degradării apei uzate sintetice doar microorganismele provenite din I1 și I3 au generat biohidrogen. De asemenea, au existat diferențe majore între comunitățile microbiene provenite din același inocul inițial, supuse aceluiași pretratament. Astfel, deși inoculul provenit din I1 supus ultrasonificării a

generat cantitățile cele mai mari de biohidrogen în timpul perioadei de îmbogățire în mediu lichid DMI, același inocul a generat cantități foarte mici de biohidrogen în urma degradării apei uzate sintetice. În mod interesant, deși consorțiul martor provenit din I1, nesupus pretratamentelor (M), a generat cantități mici de biohidrogen în timpul etapei de îmbogățire în mediu lichid DMI, acesta a generat cantitățile cele mai mari de biohidrogen în urma degradării apei uzate sintetice. Cea mai mare producție de biohidrogen în timpul etapei de îmbogățire a fost înregistrată de microorganismele provenite din I4, supuse ultrasonicării (U). În mod interesant însă, acest inocul nu a înregistrat o producție considerabilă de biohidrogen în timpul degradării apei uzate sintetice. În ceea ce privește metabolismul microorganismelor implicate în procesele de degradare a substanțelor organice și producerea concomitentă a biohidrogenului, s-a observat o strânsă corelație între producerea biohidrogenului și degradarea glucozei, atât în etapa de îmbogățire pe mediu DMI cât și în cea de degradare a apei uzate sintetice. Deasemenea concentrația acizilor butiric și acetic s-a corelat cu rata de producere a biohidrogenului în ambele etape experimentale. Concentrația cea mai mare a acestor acizi a fost detectată în probele ce au produs cantitățile cele mai mari de biohidrogen, indicând faptul că fermentația acetică și cea butirică joacă un rol important în procesul de producere al biohidrogenului. După cum era de așteptat, o rată mică de producere a biohidrogenului a fost asociată cu concentrații mari de acid propionic, lactic și etanol, căi metabolice consumatoare de hidrogen.

De-a lungul celor două etape experimentale, au fost identificate prin secvențieri 16S rRNA și metagenomice, schimbări majore în compoziția comunităților microbiene. O concluzie generală este aceea că toate strategiile de pretratament aplicate asupra inoculilor microbieni au condus la scăderea dramatică a biodiversității acestora (Fig. 6.6). A fost posibilă identificarea schimbării drastice a raportului dintre bacterii și arhei în funcție de pretratamentul utilizat (efectul cel mai puternic a fost obținut în cazul utilizării ultrasonicării). O creștere a numărului bacteriilor în detrimentul arheelor a fost corelată cu creșterea ratei de producere a biohidrogenului. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că un număr mare de arhei sunt organisme consumatoare de hidrogen, neformatoare de spori de rezistență, în timp ce o mare parte din bacteriile ce au rezistat pretratamentelor sunt specii producătoare de hidrogen. Pe baza analizelor metagenomice se poate observa o rearanjare majoră a populațiilor de bacterii în cadrul inoculilor proveniți din I1 supuși pretratamentelor, observându-se că la sfârșitul perioadei de fermentare a apei uzate sintetice, grupul Firmicutes devine dominant, în comparație cu inoculul inițial unde Proteobacteria a fost grupul cel mai abundent.

Aceste variații în producția de hidrogen pot fi explicate prin mai multe observații. Deoarece pretratamentul celor patru inoculi prin ultrasonicare a generat în majoritatea situațiilor o producție ridicată de hidrogen în timpul îmbogățirii consorțiilor microbiene, sugerează faptul că această metodă de pretratament favorizează dezvoltarea microorganismelor anaerobe capabile de a descompune cantități mari de glucoză și de a produce în același timp biohidrogen, în detrimentul celor metanogene, consumatoare de hidrogen. În același timp însă, se pare că această metodă de pretratament reduce considerabil biodiversitatea microorganismelor utilizate ca inocul. Populațiile microbiene supraviețuitoare au fost dominate de bacterii, raportul bacterii/arhei fiind considerabil mai mare în favoarea bacteriilor comparativ cu cazurile în care s-au utilizat alte metode de pretratament. Deasemenea, această ipoteză este susținută și de faptul că utilizarea ultrasonicării a generat numărul cel mai redus de colonii cultivabile. Această teorie poate explica de

ce în etapa experimentală de degradare a apei uzate sintetice, microorganismele supuse ultrasonicerii au produs cantitățile cele mai mici de biohidrogen. Apa uzată sintetică reprezintă un substrat organic complex, dificil de degradat, în care un consorțiu microbial cu o biodiversitate scăzută nu reușește să degradeze eficient sursa de carbon disponibilă, astfel nereușind să producă cantități considerabile de biohidrogen. În același timp consorțiul microbial martor, nesupus pretratamentelor (M), păstrând o biodiversitate ridicată, reușește să degradeze eficient apa uzată sintetică și astfel să genereze cele mai mari cantități de biohidrogen.

Astfel, concluziile principale ce pot fi trase se referă la faptul că o strategie de obținere, îmbogățire și control al unui consorțiu microbial capabil de degradarea apei uzate în paralel cu producția biohidrogenului, trebuie să țină cont atât de mediul inițial de proveniență al acestor microorganisme cât și de particularitățile apelor uzate utilizate ca substrat de fermentație.

6.2. Căile metabolice adoptate de microorganismele producătoare de biohidrogen

Pentru evidentiarea detaliată a căilor metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesele de degradare anaerobă a apelor uzate cu producție concomitentă de H_2 , a fost dezvoltată o strategie experimentală elaborată pe bioreactoare de mici dimensiuni utilizând apă uzată sintetică, inoculate cu populații microbiene provenite din diferite habitate bogate în substanțe organice [12]. Atât desfășurarea experimentelor cât și mediile de proveniență, îmbogățire și pretratament a microorganismelor implicate în procesele fermentative, sunt asemănătoare condițiilor prezentate în capitolul "6.1. Identificarea grupelor principale de microorganisme implicate în procesul de producere al biohidrogenului". Singura diferență notabilă se referă la faptul că prelevarea microorganismelor a avut loc în o perioadă diferită față de etapele experimentale anterioare, acest lucru ducând la diferențe considerabile în compoziția inoculilor utilizați și deci asupra procesului de producție a biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice utilizate ca substrat fermentativ [146].

6.2.1. Fermentarea și degradarea apei uzate sintetice

Ca și în cazul etapelor experimentale descrise anterior, populațiile microbiene supuse în prealabil unor strategii de pretratamente și îmbogățite în mediu de cultură lichid DMI, au fost utilizate pentru a inocula bioreactoare de mici dimensiuni conținând apă uzată sintetică. Și în acest caz au fost înregistrate diferențe mari a ratei de producere al biohidrogenului între diferiții inoculi utilizați în procesele de degradare a apelor uzate artificiale (Fig. 6.7a). Comunitățile microbiene provenite din I4 au produs în general cantități mai mari de biohidrogen în urma degradării apei uzate sintetice în comparație cu populațiile microbiene provenite din I1, I2 și I3. Cea mai mare cantitate de biohidrogen a fost produsă de microorganismele provenite din I4 și supuse pretratamentului cu acid, atingând o concentrație a hidrogenului de 29% din totalul de biogaz produs (Fig. 6.7b). În ceea ce privește producția biohidrogenului înregistrată în cazul microorganismelor provenite din I3, se observă o rată generală mai scăzută, cu un maxim de 22% hidrogen detectat în totalul de biogaz, produs de populațiile supuse ultrasonicerii.

Consoțiile microbiene provenite din I1 și I2 au produs cantități relativ mici de hidrogen în urma degradării apei uzate sintetice. O excepție o reprezintă microorganismele provenite din I1 și supuse tuturor pretratamentelor (CAU), caz în care s-a atins o producție maximă de 23% hidrogen din totalul de biogaz produs.

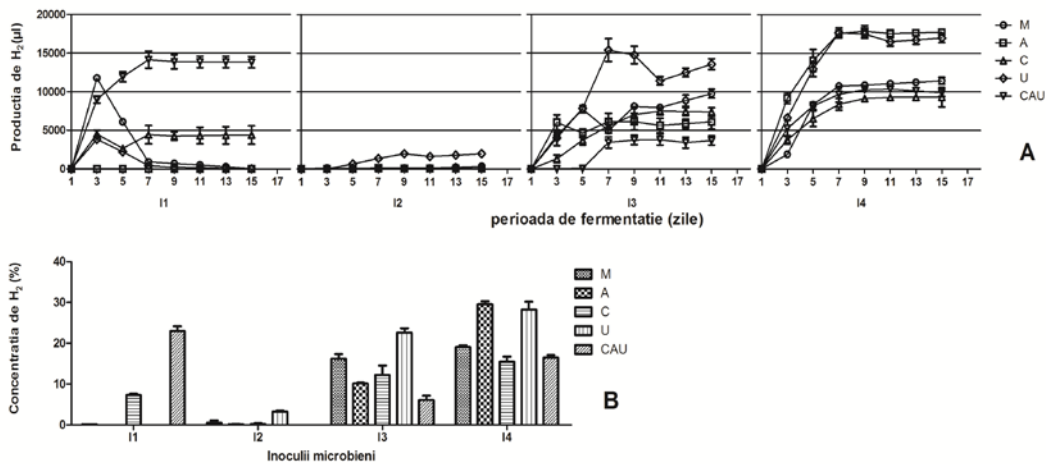


Figura 6.7. Evoluția biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice (**Panoul A**) și procentul acestuia din totalitatea biogazului produs la finalul perioadei de fermentație anaerobă a apei uzate sintetice (**Panoul B**); **M**- martor, **A**- pretratament cu acid, **C**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **CAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.

6.2.2. Strategiile metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesele de degradare a apelor uzate cu producție simultană de biohidrogen

Pe tot parcursul fermentației anaerobe a apei uzate sintetice, au fost înregistrate concentrațiile glucozei și a diferiților produși metabolici (acizii succinic, lactic, formic, acetic, propionic, butyric și etanol) utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță HPLC (Fig. 6.8). Sistemele fermentative au înregistrat diferențe semnificative atât între diferiții inoculi utilizați cât și între diferitele strategii de pretratament aplicate. Concentrația inițială a glucozei în apa uzată sintetică a fost 3 g/l. Aceasta a reprezentat principala sursă de energie pentru microorganismele implicate în procesul de producere al biohidrogenului, astfel monitorizând îndeaproape consumul acestuia putem identifica activitatea microbiană din aceste sisteme fermentative. Astfel, o rată mare de consum al glucozei a fost asociată cu o producție ridicată de biohidrogen. Situațiile în care s-au înregistrat producțiile cele mai mari de hidrogen (pretratamentul cu acid și cel prin ultrasonicare a microorganismelor provenite din I4) au înregistrat de asemenea și un consum total al glucozei prezente în apa uzată sintetică (fig 6.8d).

În ceea ce privește concentrațiile etanolului, nu au fost înregistrate diferențe majore între inoculii proveniți din I1, I3 și I4, cu o medie a acestuia de 4 g/l (Fig.

6.8a, 6.8c și 6.8d). Populațiile microbiene derivate din inoculul I2 au produs cantități considerabil mai mici de etanol, variând de la 0.27g/l în cazul celor supuse pretratamentului cu căldură până la 2.89 g/l în cazul inoculului martor, nesupus pretratamentelor (Fig. 6.8b).

Și în cazul concentrației acidului butiric au existat diferențe minore între inoculii proveniți din I1, I3 și I4, înregistrând valori generale mai mari în comparație cu microorganismele provenite din I2. S-au înregistrat cu toate acestea diferențe, în special între diferitele strategii de pretratament a acestor inoculi. Astfel, o concentrație maximă de 1g/l a fost detectată în cazul ultrasonicării inoculului provenit din I4 în timp ce o concentrație maximă de doar 0.54 g/l acid butiric a fost înregistrată în cazul microorganismelor supuse ultrasonicării provenite din I2 (Fig. 6.8).

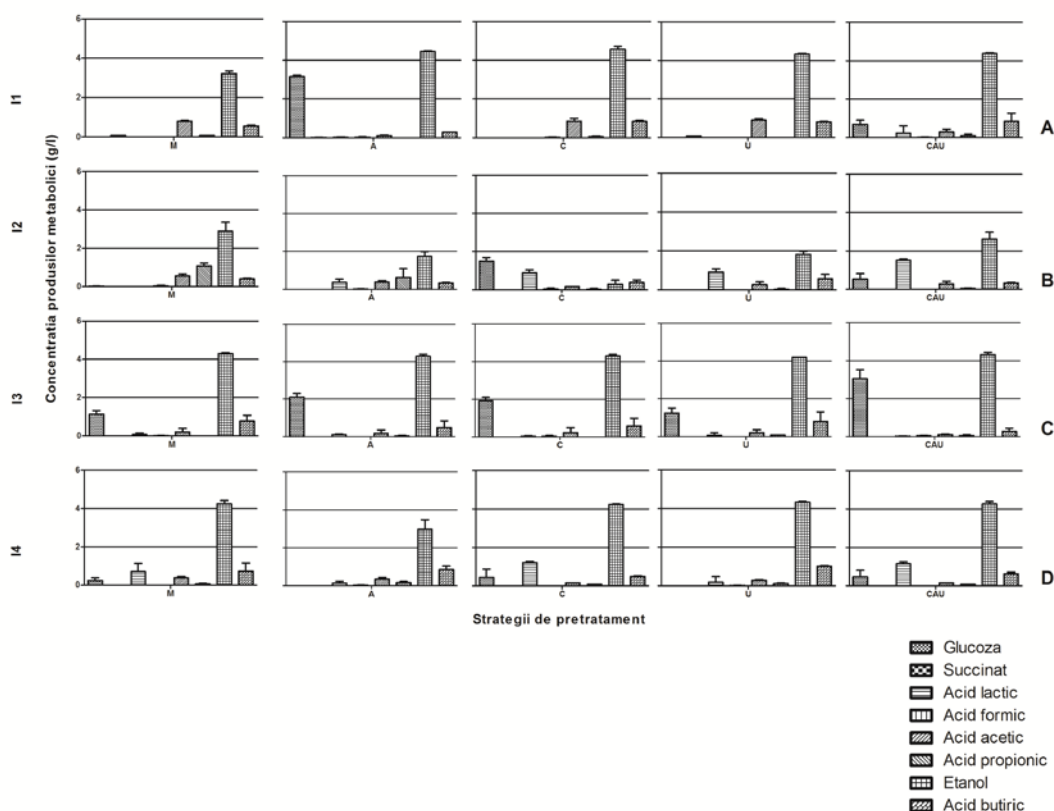


Figura 6.8. Concentrațiile glucozei și a produșilor metabolici rezultați în urma degradării anaerobe a apei uzate artificiale. **Panoul A-** I1; **Panoul B-** I2; **Panoul C-** I3 și **Panoul D-** I4. **M-** martor, **A-** pretratament cu acid, **C-** pretratament cu căldură, **U-** pretratament prin ultrasonicare și **CAU-** utilizarea tuturor pretratamentelor.

Concentrațiile acizilor succinic, lactic, formic acetic și propionic au variat considerabil în funcție de pretratamentele utilizate asupra microorganismelor provenite din cele patru medii diferite (Fig.6.8). Cea mai mare concentrație a acidului lactic a fost detectată în cazul microorganismelor provenite din I2 și supuse

tuturor pretratamentelor (1.52 g/l). Cea mai mare concentrație a acidului acetic a fost identificată atât în cazul populațiilor microbiene martor, nesupuse pretratamentelor, cât și a celor supuse pretratamentelor de căldură și ultrasonicare, provenite din I1 (0.9 g/l). În general, concentrațiile acidului propionic au fost neglijabile, doar în cazul atât a microorganismelor martor, nesupuse pretratamentelor, cât și a pretratamentului cu acid a celor provenite din I1 au înregistrat concentrații moderate (1.07 g/l și respectiv 0.62 g/l). Concentrațiile acizilor succinic și formic au fost neglijabile în toate condițiile fermentative.

Valorile pH-ului au fost de asemenea înregistrate de-a lungul etapei experimentale de degradare a apei uzate sintetice (Fig.6.9). Valoarea inițială a acestuia a fost de 6, înregistrându-se o scădere constantă pe durata proceselor fermentative de degradare a apei uzate sintetice, indiferent de originea inoculilor și pretratamentele la care aceștia au fost supuși. Mici diferențe în evoluția pH-ului au fost înregistrate între diferitele condiții experimentale. Valorile generale cele mai mari ale pH-ului au fost înregistrate în cazul bioreactoarelor inoculate cu populații microbiene provenite din I1 și I3, atingând o valoare finală medie de aproximativ 4. În cazul microorganismelor prelevate din I2 și I4, valoarea finală medie a pH-ului a fost înregistrată în jur de 3.5. Valorile finale cele mai acide ale pH-ului au fost identificate în cazul microorganismelor supuse unei combinații a tuturor pretratamentelor, provenite din I2 și I4, atingând valoarea de 3.15 și respectiv 3.12. Valoarea finală cea mai bazică a pH-ului a fost înregistrată în cazul microorganismelor supuse unei combinații a tuturor pretratamentelor, provenite din I3, atingând valoarea de 4.65 la sfârșitul etapei experimentale de degradare a apei uzate sintetice și generarea concomitentă a biohidrogenului.

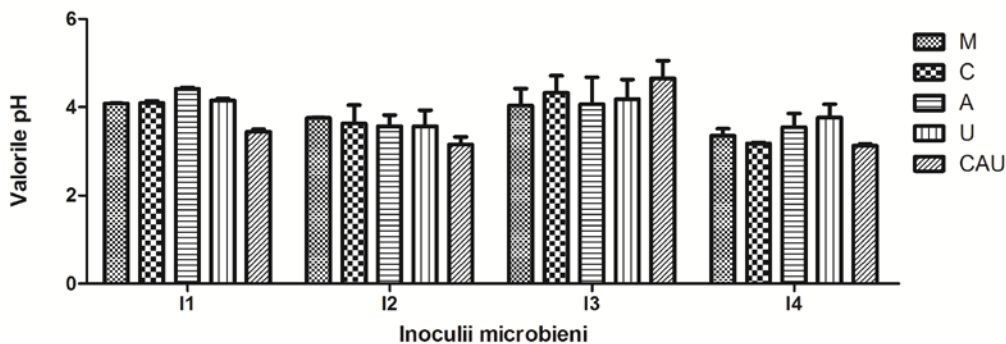


Figura 6.9. Valorile pH-ului înregistrate la sfârșitul experimentelor de producere a biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice; **C**- control, **A**- pretratament cu acid, **H**- pretratament cu căldură, **U**- pretratament prin ultrasonicare și **HAU**- utilizarea tuturor pretratamentelor.

6.2.3. Discuții

Diferitele metode de pretratament utilizate în cadrul acestei etape experimentale au generat răspunsuri diferite în ceea ce privește degradarea apei uzate sintetice și producția biohidrogenului. Acest lucru poate fi pus pe seama condițiilor foarte diferite de proveniență a microorganismelor, astfel inoculii utilizați

În procesele fermentative au avut o compoziție inițială foarte diferită (fapt arătat în subcapitolul anterior și tratat mai în detaliu în subcapitolul următor). De aceea se poate afirma faptul că nu există o strategie unică de pretratament a inoculilor utilizați în procesele de degradare a pelor uzate și producerea concomitentă a biohidrogenului, în scopul îmbogățirii microorganismelor producătoare de biohidrogen în detrimentul celor consumatoare de hidrogen. Astfel, inoculii microbieni trebuie tratați în mod unic, în funcție de compoziția taxonomică specifică a acestora. Au existat cazuri în care consorțiile microbiene martor, nesupuse pretratamentelor, au produs cantități mai mari de biohidrogen, indicând faptul că în unele cazuri ajustări minore ale sistemului fermentativ pot fi suficiente pentru a obține un inocul microbial optim pentru degradarea apelor uzate și producerea în paralel a biohidrogenului. Această abordare poate duce la scăderea considerabilă a costurilor de operare a unei stații industriale de producere a biohidrogenului în urma degradării apei uzate.

Bioreactoarele inoculate cu populațiile microbiene provenite din I2 au manifestat o producție generală scăzută a biohidrogenului, în timp ce bioreactoarele inoculate cu populații microbiene provenite din I4 au produs cele mai mari cantități de biohidrogen (Fig. 6.7). Aceste diferențe pot fi explicate de particularitățile apei uzate sintetice. Aceasta reprezintă un microecosistem ce oferă o nișă ecologică restrânsă. Acest lucru în sine afectează selectiv biodiversitatea microbială și răspunsul acestora asupra sistemului. Astfel, populațiile microbiene prelevate din I2, un mediu natural, diferit de apa uzată sintetică, nu au reușit să se adapteze parametrilor stricți ai acestui nou substrat organic. Pe de altă parte, microorganismele provenite din I4, un mediu similar cu apa uzată sintetică utilizată ca substrat fermentativ, au reușit să se adapteze eficient la noile condiții ecologice, producând cantități considerabile de biohidrogen (Fig. 6.10).

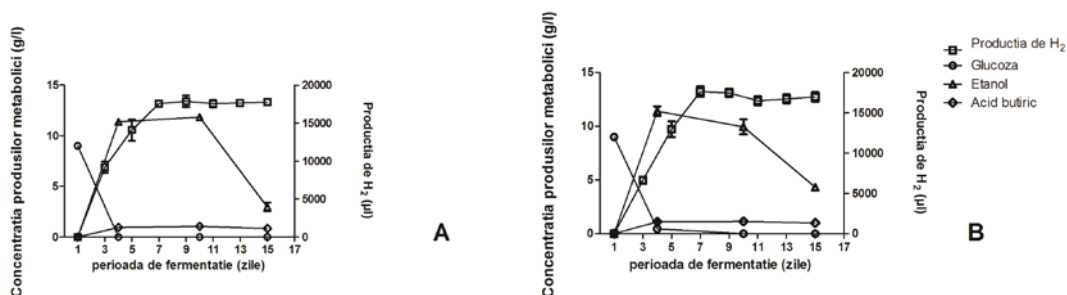


Figura 6.10. Rata de producție a biohidrogenului în paralel cu degradarea glucozei și acumularea etanolului și a acidului butiric, în timpul degradării apei uzate de către microorganismele provenite din I4, supuse pretratamentului cu acid (**Planșa A**) și pretratamentului prin ultrasonicare (**Planșa B**).

După cum era de așteptat, consumul glucozei (substratul organic) este corelat direct cu rata de producție a biohidrogenului. Astfel, există comunități microbiene capabile de degradarea rapidă și completă a substratului organic cu producerea simultană a biohidrogenului (Fig. 6.10). Aceste observații deschid drumul spre dezvoltarea și aplicarea unor tehnologii noi ce utilizează consorții microbiene special dezvoltate pentru a servi dublului rol de tratare biologică a apelor uzate și a producerii unei forme regenerabile de energie, sub forma biohidrogenului. Concentrațiile acizilor butiric și acetic de asemenea se corelează cu rata de producție

Studii și cercetări experimentale

a biohidrogenului, cum s-a observat și în etapele experimentale anterioare (Fig. 6.10). Concentrațiile cele mai ridicate a acestor metaboliți au fost identificate în situațiile în care s-au înregistrat producțiile cele mai mari de hidrogen, sugerând faptul că aceste căi metabolice sunt foarte importante pentru producția biohidrogenului în urma degradării apelor uzate. Deasemenea, concentrații ridicate atât ale acizilor propionic și lactic cât și ale etanolului, au fost asociate cu producții scăzute ale biohidrogenului. În aceste cazuri, căile metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesele de producere a biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice, au condus la generarea acestor metaboliți secundari în detrimentul formării hidrogenului. Astfel, monitorizarea tuturor acestor produși metabolici secundari, permite identificarea căilor metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesele de producere a biohidrogenului în urma degradării apei uzate, făcând posibil controlul, ajustarea și optimizarea proceselor fermentative.

6.3. Optimizarea procesului de producție a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale

6.3.1. Identificarea factorilor cheie ce influențează procesul de fermentație utilizând metoda Plackett-Burman și Taguchi

Având la bază cunoștințele obținute în etapele experimentale precedente, referitoare la **structura populațională** a microorganismele utilizate ca inoculi în procesele de producere al biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice, **efectul diferitelor** strategii de **pretratament** și îmbogățire asupra reorganizării acestora și **căile metabolice** adoptate de aceste consorții microbiene, a fost elaborată următoarea etapă experimentală. Aceasta reprezintă o strategie complexă de proiectare experimentală în urma căreia să rezulte gradul de implicare a diferiților factori considerați importanți pentru procesul de producere al biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice, cât și eventualele interacțiuni ce pot apărea între aceștia. Acesta este un pas experimental intermediar ce ne va aduce mai aproape de proiectarea și optimizarea unei tehnologii de producere al biohidrogenului în urma degradării apelor uzate comunale și industriale prin procese fermentative anaerobe guvernate de consorții microbiene atent selectate și îmbogățite în prealabil. În vederea identificării implicării acestor factori, s-a stabilit o reprezentare cibernetică a procesului fermentativ anaerob de producere a biohidrogenului, sub forma unei structuri de tip "intrări-ieșiri" (Fig. 6.11). Intrările sistemului sunt numite "factori de influență (**FI**)" iar ieșirile sistemului se numesc "funcții obiectiv (**FO**)". Obiectivul principal al proiectării experimentale este acela de a identifica o relație de conexiune, adesea având o formă predefinită, polinomială, între FO și FO, pentru un domeniu experimental definit în prealabil ca fiind de interes pentru pentru cercetarea abordată. Informațiile obținute în urma desfășurării acestor experimente pot fi utilizate pentru a genera utilizând metode statistice avansate, predicții și informații referitoare la gradul de influență a FI investigați asupra FO, cât și regiunea de optim pentru maximizarea răspunsurilor urmărite.

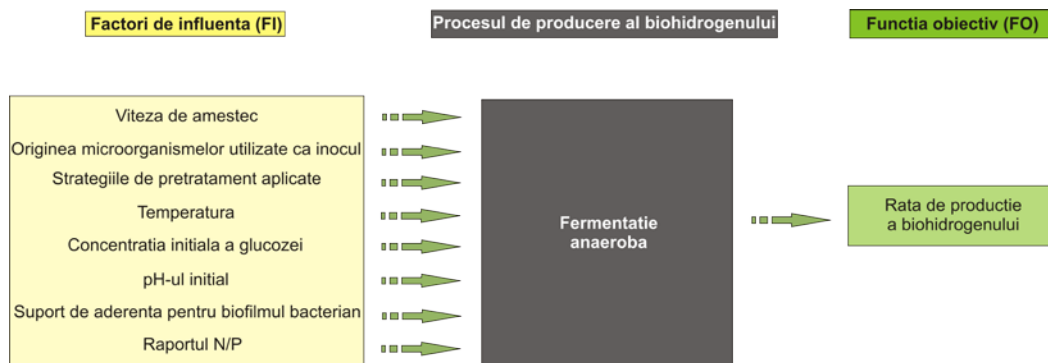


Figura 6.11. Reprezentarea cibernetică de tipul "cutiei negre" cu structură "intrări-ieșiri" a procesului de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apei uzate.

În prima etapă a proiectării experimentale au fost luați în considerare 8 FI cu 2 sau 3 nivele de variație (Tabelul 6.2). Pentru a identifica influența acestor FI asupra FO, s-a utilizat metoda de proiectare experimentală ortogonală Taguchi de tip L-18.

Tabelul 6.2. Matricea experimentală ortogonală Taguchi aplicată în prima etapă a proiectării statistice factoriale.

Linia experimentală	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0	0	0	0	0	0
3	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
4	-1	0	-1	-1	0	0	+1	+1
5	-1	0	0	0	+1	+1	-1	-1
6	-1	0	+1	+1	-1	-1	0	0
7	-1	+1	-1	0	-1	+1	1	+1
8	-1	+1	0	+1	0	-1	+1	-1
9	-1	+1	+1	-1	+1	0	-1	0
10	+1	-1	-1	+1	+1	0	-1	-1
11	+1	-1	0	-1	-1	+1	+1	0
12	+1	-1	+1	0	0	-1	-1	+1
13	+1	0	-1	0	+1	-1	+1	1
14	+1	0	0	+1	-1	0	-1	+1
15	+1	0	+1	-1	0	+1	0	-1
16	+1	+1	-1	+1	0	+1	-1	0
17	+1	+1	0	-1	+1	-1	0	+1
18	+1	+1	+1	0	-1	0	+1	-1

Rata de producție a biohidrogenului a fost monitorizată la intervale de 24 de ore pe o perioadă de 6 zile (Figura 6.12). Se observă faptul că "viteza medie" a ratei de producție a biohidrogenului diferă nu doar între diferite condiții experimentale, dar și în cadrul aceleiași linii experimentale în intervale diferite de timp. De exemplu, dacă luăm în considerare încercările experimentale 2 și 4, se observă o creștere în timp a ratei de producere a biohidrogenului, însă, dacă pentru linia experimentală 2 producția este mai accentuată în faza inițială (ex. după 24 ore prezintă o producție medie de 3 ml H₂) după care aceasta scade, urmând ca după 120 ore să manifeste o concentrație totală medie de doar 4.3 ml H₂, pentru linia experimentală 4, se observă după 24 ore o producție de 1.67 ml H₂ (mai mică decât în cazul liniei experimentale 2), însă după 120 ore obținem o concentrație medie de 27.8 ml H₂ (mult peste producția înregistrată de linia experimentală 2 în aceeași perioadă de timp).

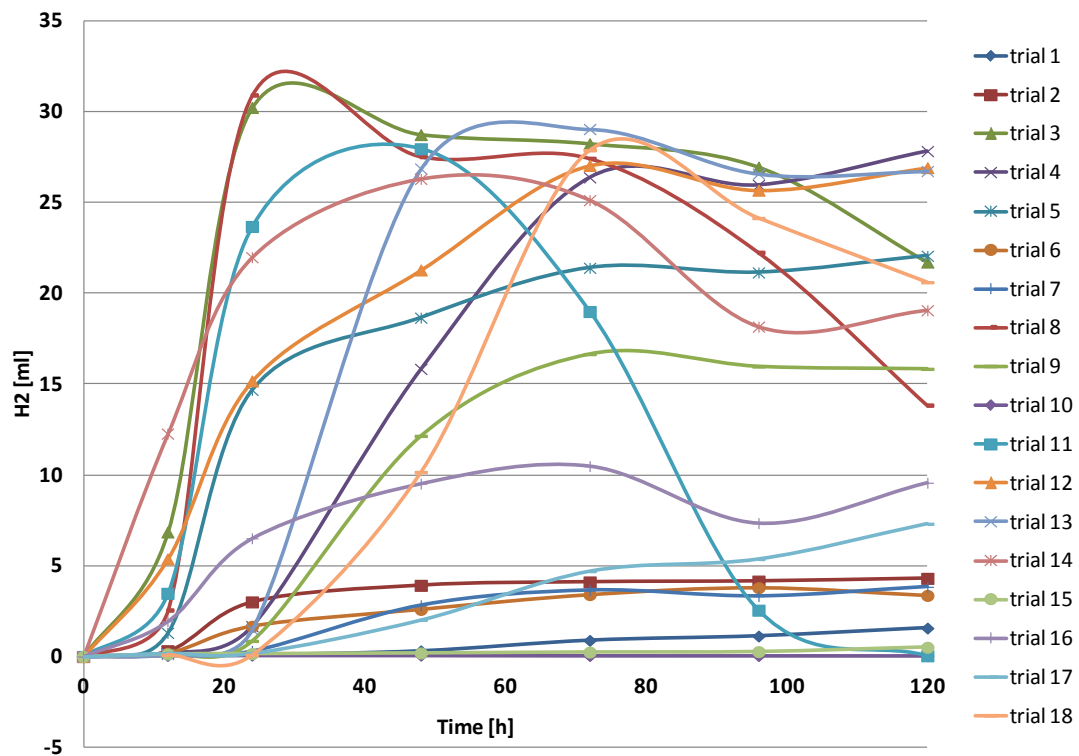
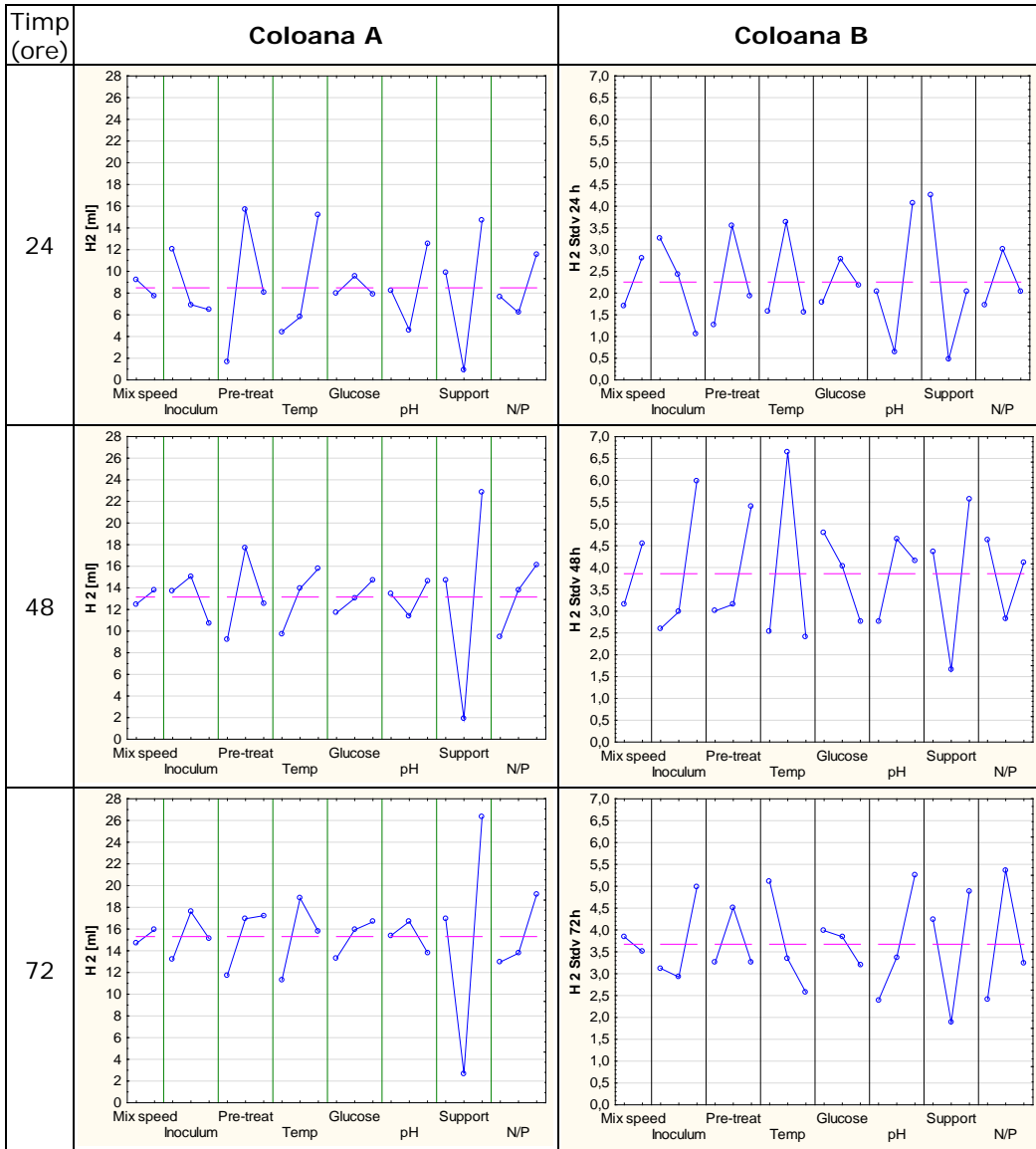


Figura 6.12. Media Evoluției biohidrogenului pe perioada celor 120 de ore de fermentare a apei uzate sintetice, pentru toate cele 18 linii experimentale.



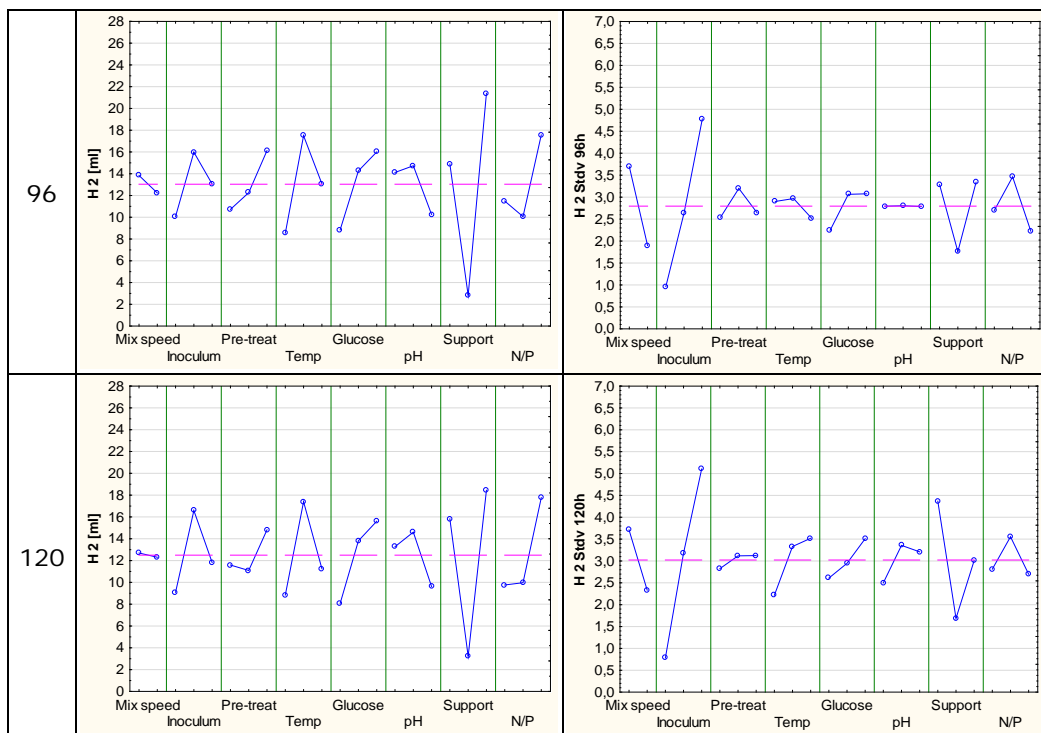


Figura 6.13. Dinamica efectelor FI asupra FO (producția biohidrogenului) de-a lungul celor 120 de ore de fermentare (**Coloana A**), cât și asupra deviației standard experimentale (**Coloana B**).

În urma acestei prime matrici experimentale au fost determinate efectele FI asupra FO, la intervale de 24 de ore (Fig. 6.13). Pentru o mai bună comparație, axele au fost aduse la aceeași valoare maximă. În urma acestor analize, s-a observat faptul că majoritatea FI, mai puțin suportul pentru formarea biofilmului, manifestă tendințe schimbătoare de-a lungul derulării experimentelor, cauzând un răspuns a FO într-un anumit punct al derulării experimentelor, urmat de un răspuns opus asupra aceleiași FO într-un alt punct al derulării procesului fermentativ. Amplitudinea efectelor acestor FI asupra FO variază deasemenea de-a lungul derulării proceselor fermentative. De exemplu, modificarea pretratamentelor de la nivelul 1 la nivelul 2 duce la o creștere a producției medii de biohidrogen cu 14 ml la 24 de ore. Aceeași variație însă duce la 96 de ore la o creștere a producției hidrogenului de doar 2 ml. În general, cele mai mici variații ale producției biohidrogenului este cauzată de viteza de agitație a bioreactoarelor, în timp ce variația cea mai mare este dată de tipurile de suport microbian. Trebuie menționat faptul că stabilitatea procesului (deviația standard) în funcție de FI considerați. Astfel este nevoie de o interpretare a datelor atât în context statistic cât și în context fenomenologic.

Datorită fluctuațiilor în timp a magnitudinii și direcție a influențelor FI asupra răspunsului FO în etape diferite ale procesului fermentativ, este importantă determinarea momentului experimental când influența acestora asupra FO este

semnificativă. Astfel s-a stabilit ca perioada de 120 de ore de fermentație să reprezinte zona de interes deoarece în acest punct procesul devine mai stabil, efectele majorității FI au mai mult sau mai puțin aceeași amplitudine, variând între 5 și 8 unități (ml H₂), excepție făcând viteza de agitare a bioreactoarelor (un efect foarte mic) și tipul de suport microbial (variație între 13 și 15 unități). În urma acestor analize s-au determinat condițiile optime de operare a bioreactoarelor de dimensiuni mici în vederea producerii biohidrogenului în urma degradării apei uzate sintetice (Tabelul 6.3.). Predicțiile obținute nu au fost însă confirmate experimental, fapt ce sugerează existența anumitor interacțiuni ascunse între FI analizați.

Tabelul 6.3. Predicție a condițiilor optime de operare a bioreactoarelor pentru maximizarea FO, rezultată în urma analizei primei matrici experimentale.

FI	Nivelul	Producția de H ₂ prezisă (ml)	Producția de H ₂ măsurată (ml)
Viteza de agitare	1	40,42	25,58
Originea inoculului	2		
Pretratamentul utilizat	3		
Temperatura	2		
Glucosa	3		
pH	2		
Tipul de suport pentru biofilmul bacterian	3		
N/P	3		

Pentru aprofundarea înțelegerii influenței FI asupra FO și pentru identificarea eventualelor interacțiuni dintre aceștia s-a elaborat un nou model experimental. Astfel viteza de agitație a bioreactoarelor a fost exclusă datorită influenței mici manifestate asupra FO iar nivelele de variație a FI au fost reduse la 2. Pentru a avea posibilitatea însă de a cerceta 3 nivele de variație referitoare la tipul inoculului și 4 nivele referitoare la tipul pretratamentelor, au fost dezvoltate două matrici experimentale de tip L8 Taguchi pentru a acoperii toate nivelele propuse (Tabelul 6.4.). De asemenea s-au reprodus două linii experimentale din etapa experimentală anterioară pentru verificarea reproductibilității sistemului.

Tabelul 6.4. Cele două matrici experimentale Taguchi aplicate în etapa a doua a proiectării statistice factoriale.

Linia experimentală	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇
1	0	+1	+1	-1	-1	+1	-1
2	0	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	-1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
4	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	0	-1	+1	-1	+1	-1	+1
6	0	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
1	+1	+2	-1	+1	-1	+1	+1
2	0	0	-1	-1	+1	+1	+1
3	+1	0	+1	+1	+1	+1	-1

4	0	+2	+1	-1	-1	+1	-1
5	0	0	+1	+1	-1	-1	+1
6	+1	+2	+1	-1	+1	-1	+1
7	0	+2	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	0	-1	-1	-1	-1	-1
9	+1	0	0	0	-1	-1	+1
10	0	0	0	+1	0	+1	+1

Și în acest caz a fost înregistrată producția biohidrogenului la intervale de 24 de ore, pe toată durata perioadei de fermentare (120 de ore) (Fig. 6.14). Se observă faptul că doar trei linii experimentale au înregistrat o rată de producție a biohidrogenului de 30 ml la finalul celor 120 de ore de fermentație (liniile 1,2 și 6 în cel de-al doilea set experimental). Analizând variațiile factorilor de influență pentru aceste trei condiții experimentale, se observă faptul că prezintă același raport N/P, restul FI analizați fiind fie la nivelul de variație superior fie la cel inferior.

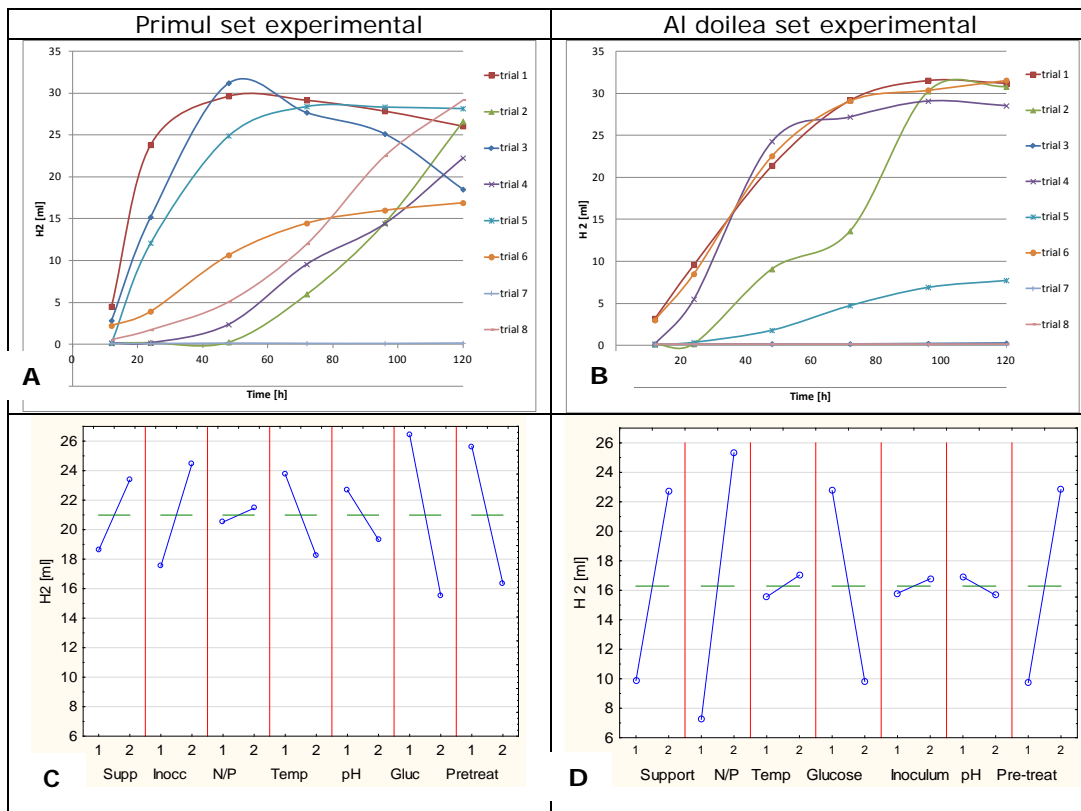


Figura 6.14. Evoluția celor două matrici experimentale Taguchi aplicate în etapa a doua a proiectării statistice factoriale; **A și B** - rata de producție a biohidrogenului de-a lungul celor 120 ore de degradare a apei uzate sintetice; **C și D** - efectul FI asupra FO la 120 ore de fermentare anaerobă a apei uzate sintetice.

În continuare s-a realizat un test pentru prezența interacțiunilor FI pentru toate perechile posibile (21 pentru fiecare caz) pentru ambele matrici experimentale (Fig. 6.15.). În urma acestui test s-au putut identifica și ierarhiza aceste interacțiuni, în funcție de indexul de severitate (IS). Au fost identificate în total un număr de 18 interacțiuni pentru prima matrice experimentală și 15 interacțiuni pentru cea de-a doua.

Number of interactions between two factors calculated = 21					Number of interactions between two factors calculated = 21				
#	Interacting Factor Pairs (Order based on SI)	Columns	SI(%)	Col	#	Interacting Factor Pairs (Order based on SI)	Columns	SI(%)	Col
1	N/P x pH	3 x 5	77.58	6	1	Support x Temp	1 x 3	58.19	6
2	N/P x Temp	3 x 4	63.79	7	2	Gluc x pH	4 x 6	58.19	7
3	Inocul x Temp	2 x 4	62.5	6	3	Inocul x Pretreat	5 x 7	57.25	6
4	Support x N/P	1 x 3	58.69	2	4	Support x pH	1 x 6	50.96	2
5	Inocul x pH	2 x 5	57.81	7	5	Temp x Gluc	3 x 4	50.96	7
6	Support x Pretreat	1 x 7	54.87	6	6	Gluc x Inocul	4 x 5	50	6
7	Support x pH	1 x 5	52.5	4	7	Inocul x pH	5 x 6	50	4
8	Temp x pH	4 x 5	47.49	1	8	Support x Inocul	1 x 5	49.99	1
9	Support x Gluc	1 x 6	45.12	7	9	Temp x Inocul	3 x 5	49.99	7
10	pH x Pretreat	5 x 7	42.18	2	10	Temp x Pretreat	3 x 7	49.03	2
11	Inocul x N/P	2 x 3	41.3	1	11	pH x Pretreat	6 x 7	49.03	1

#	Interacting Factor Pairs (Order based on SI)	Columns	SI(%)	Col	#	Interacting Factor Pairs (Order based on SI)	Columns	SI(%)	Col
11	Inocul x N/P	2 x 3	41.3	1	11	pH x Pretreat	6 x 7	49.03	1
12	Temp x Gluc	4 x 6	37.49	7	12	N/P x Inocul	2 x 5	42.74	7
13	N/P x Pretreat	3 x 7	36.2	6	13	N/P x Temp	2 x 3	41.8	6
14	Support x Temp	1 x 4	32.49	7	14	N/P x pH	2 x 6	41.8	7
15	Inocul x Gluc	2 x 6	29.16	6	15	Temp x pH	3 x 6	29.99	6
16	Gluc x Pretreat	6 x 7	23.17	2	16	Support x Pretreat	1 x 7	4.8	2
17	N/P x Gluc	3 x 6	22.41	6	17	Gluc x Pretreat	4 x 7	4.8	6
18	Inocul x Pretreat	2 x 7	20.31	2	18	Support x N/P	1 x 2	4.09	2
19	Support x Inocul	1 x 2	6.52	2	19	N/P x Gluc	2 x 4	4.09	2
20	Temp x Pretreat	4 x 7	5.17	2	20	Support x Gluc	1 x 4	2.94	2
21	pH x Gluc	5 x 6	5.17	2	21	N/P x Pretreat	2 x 7	2.41	2

Figura 6.15. Identificarea și ierarhizarea efectului interacțiunilor dintre FI asupra FO.

În pasul următor al proiectării experimentale este necesară identificarea gradului de influență a acestor interacțiuni. Astfel, a fost concepută următoarea fază experimentală în scopul atingerii unei rezoluții experimentale mai mari, ce poate identifica și discrimina influențele semnificative a acestor interacțiuni asupra FO (Tabel 6.5.). Având ca punct de plecare cele trei combinații experimentale anterioare ce au dus la producțiile cele mai mari de hidrogen, a fost dezvoltat un model experimental factorial fracțional de tipul 2(5-1). Acesta are o rezoluție suficient de bună pentru a identifica atât efectele principale ale FI analizați, cât și interacțiunile de ordin doi dintre aceștia.

Pentru a testa reproductibilitatea procesului, modelul experimental conține una din cele trei combinații menționate anterior, și anume linia experimentală 2 din cea de-a doua matricea experimentală elaborată în cadrul etapei experimentale 2. Aceasta a devenit linia experimentală 15. Deoarece în urma analizei etapei anterioare, temperatura de fermentare și concentrația inițială a pH-ului au generat variații mici ale FO, acestea nu au fost incluse în matricea experimentală de față, fiind setate la valorile corespunzătoare combinației experimentale 2 din cadrul celei

de-a doua matrice experimentală (etapa experimentală 2). Analizele experimentale au arătat însă o scădere a producției de hidrogen în cazul acestei linii experimentale în comparație cu aceleași condiții investigate în etapa anterioară. Această instabilitate a procesului poate fi explicată de faptul că inoculii microbieni utilizați în aceste sisteme fermentative de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apei uzate artificiale, suferă ușoare modificări de la o etapă experimentală la alta. Acest lucru se întâmplă chiar dacă mediile și condițiile de prelevare sunt relativ aceleași, din pricina diferențelor sezoniere, a neomogenității probelor prelevate, condițiile atmosferice, perioada de păstrare etc..

Tabelul 6.5. Matricea experimentală aplicată în etapa a treia a proiectării statistice factoriale fracționale.

Linia experimentală	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	+1	-1	+1	-1	-1
2	+1	+1	-1	-1	-1
3	-1	-1	-1	-1	-1
4	-1	+1	+1	-1	-1
5	+1	-1	-1	+1	-1
6	+1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	+1	+1	-1
8	-1	+1	-1	+1	-1
9	+1	-1	-1	-1	+1
10	+1	+1	+1	-1	+1
11	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	+1	-1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	+1	-1	+1	+1
15	-1	-1	-1	+1	+1
16	-1	+1	+1	+1	+1

Considerând domeniul de investigare a FI se observă faptul că variațiile tipului de inocul și ale concentrației glucozei au produs efecte mici asupra FO. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că există diferențe relativ minore între cele două tipuri de inoculi, fapt susținut și de asemănarea relativă a habitatelor de proveniență a acestora. Se pare că indiferent de concentrația glucozei, cel puțin în ceea ce privește domeniul investigat, aceste microorganisme s-au comportat asemănător din punct de vedere al producției biohidrogenului. Acest lucru sugerează faptul că inclusiv concentrația minimă a glucozei investigată a fost suficientă pentru dezvoltarea normală a microorganismelor implicate în procesele de degradare a apei uzate sintetice și producerea în paralel a biohidrogenului. Oferind acestor microorganisme cantități mai mari de substrat organic nu a determinat și o dezvoltare mai accentuată a acestora și deci o producție mai mare a biohidrogenului. La prima vedere acest lucru este neobișnuit, însă dacă avem în vedere faptul că apa uzată în sine reprezintă un mediu complex, extrem, cu nișe ecologice specifice, ce limitează considerabil dezvoltarea microorganismelor implicate în producerea biohidrogenului, atunci această teorie se potrivește situației descrise.

Toate cele 10 perechi de interacțiuni posibile au fost deasemenea detectate. În urma analizei acestora, a reieșit faptul că jumătate dintre ele sunt semnificative pentru FO. S-a obținut atât o clasificare a importanței relative cât și identificarea direcțiilor de influență a FI și a interacțiunilor dintre aceștia asupra FO (Fig. 6.16).

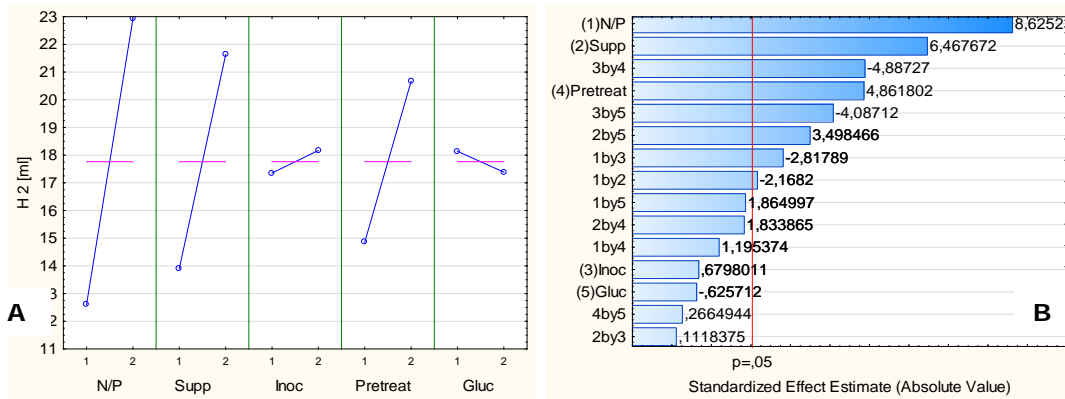


Figura 6.16. Clasificarea importanței relative și identificarea direcțiilor de influență a FI și a interacțiunilor dintre aceștia, asupra FO; **A** - analiza efectelor principale; **B** - reprezentare Pareto.

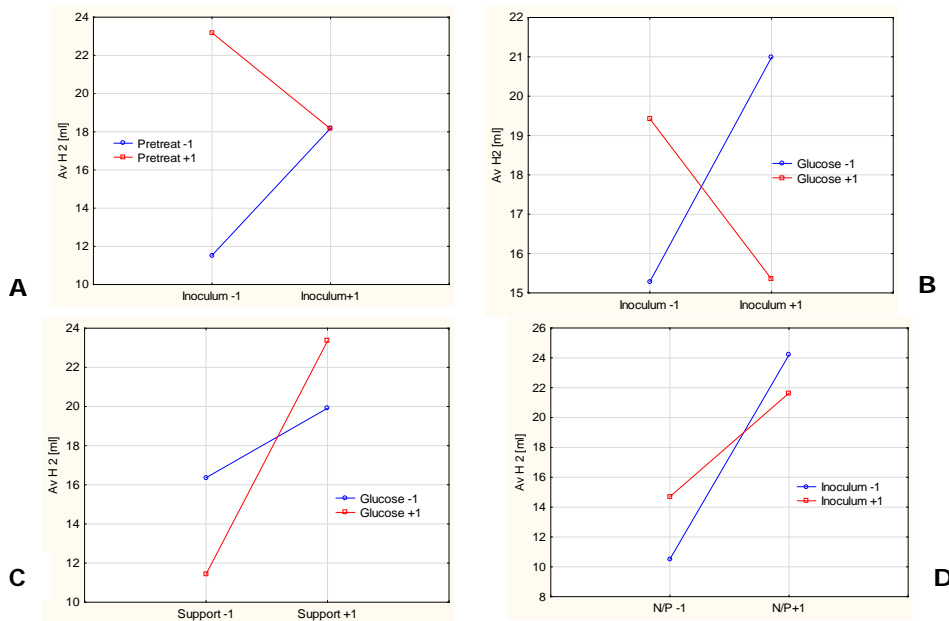


Figura 6.17. Reprezentarea efectelor interacțiunilor FI asupra FO; **A** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și pretratamentele la care acesta a fost supus; **B** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și concentrația glucozei; **C** - efectele interacțiunilor dintre prezența sau absența suportului de aderare a biofilmului microbial și concentrația glucozei; **D** - efectele interacțiunilor dintre tipul inocului și raportul dintre N/P.

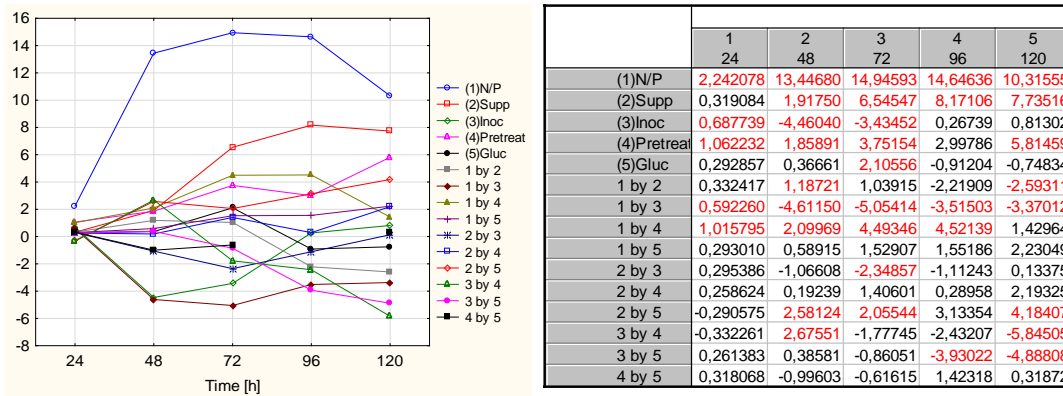


Figura 6.18. Evoluția în timp a influenței efectelor și interacțiunilor FI asupra FO.

6.3.2. Optimizarea procesului de producție al biohidrogenului utilizând ca substrat fermentescibil apă uzată rezultată în urma proceselor industriale de producere a berii, prin metoda suprafeței de răspuns

Având în vedere informațiile esențiale obținute în etapa experimentală precedentă, s-a realizat o strategie experimentală factorială completă cu scopul de a dezvolta și optimiza un proces de producție al biohidrogenului în urma degradării apelor uzate provenite din industria alimentară. Ca substrat fermentativ s-a ales apa uzată provenită din procesele industriale de producere a berii din cadrul fabricii de bere Timișoreana, Localitatea Timisoara, România. Această etapă experimentală a fost împărțită deasemenea în mai mulți pași. În primul pas s-a dezvoltat o abordare experimentală factorială completă în vederea discriminării influenței anumitor factori (suport de atașare a biofilmului microbial, temperatura de fermentație, valoarea pH-ului inițial și concentrația substratului organic) asupra procesului de producere al biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din procesele tehnologice de producere a berii. Această abordare experimentală completă oferă avantajul de a genera o rezoluție suficient de mare pentru a nu exista suprapuneri ale efectelor sau interacțiunilor dintre diferiții factori de influență analizați. Factorii de influență analizați au fost aleși pe baza rezultatelor obținute în etapele experimentale anterioare, fiind testați la nivele joase și înalte, codate cu (-1) și respectiv (+1) (Tabelul 6.6.). Au fost propuse două matrici experimentale, fiecare conținând 8 linii experimentale diferite. Prima matrice experimentală a fost dezvoltată în jurul nivelului (-1) pentru prezența substratului de aderență a biofilmului în timp ce cea de-a doua matrice experimentală a fost dezvoltată pentru nivelul (+1) al aceluiași factor de influență. Motivul acestei abordări este faptul că prezența sau absența substratului de aderență pentru biofilmul bacterian este un factor de influență calitativ, spre deosebire de restul factorilor luați în considerare, aceștia fiind de tip cantitativ.

Tabelul 6.6. Matricea experimentală factorială completă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.

Linia experimentală	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1
3	-1	-1	1	-1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	-1	1
11	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	-1	1
15	1	1	1	-1
16	1	1	1	1

În continuare, utilizând cele trei variabile independente considerate relevante (temperatura, valorile pH-ului inițial și concentrația inițială a glucozei), s-a dezvoltat o strategie experimentală multifactorială central-compusă pentru optimizarea producției biohidrogenului utilizând ca substrat fermentescibil apă uzată provenită în urma proceselor de producție a berii (Tabelul 6.7.). Componenta factorială a acestei proiectări experimentale este de tipul 2^3 factori cu 8 încercări experimentale. Cele 6 puncte axiale sunt localizate la o distanță de $\alpha = 1,287$ de centrul modelului experimental, valoare ce îi asigură caracterul de ortogonalitate. Modelul experimental prezintă deasemenea două puncte în centru. Rata de producție a biohidrogenului a fost monitorizată la intervale de 24 de ore pe o perioadă de 120 de ore (Fig. 6.19). Linia experimentală ce a generat producția cea mai mare de biohidrogen a fost linia 12, unde valorile temperaturii și ale glucozei au fost fixate în centrul experimental în timp ce valoarea pH-ului a fost stabilită la nivelul superior (Tabelul 6.8.). Astfel, o analiză preliminară a rezultatelor acestor două matrici experimentale sugerează o influență puternică a valorii inițiale a pH-ului asupra FO, urmată de temperatura mediului de fermentație.

Tabelul 6.7. Matricea experimentală multifactorială Placket-Bunman și central-compusă de optimizare a producției biohidrogenului în urma degradării apei uzate provenite din industria berii.

Linia experimentală	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.28	0	0
10	1.28	0	0
11	0	-1.28	0
12	0	1.28	0
13	0	0	-1.28
14	0	0	1.28
15	0	0	0
16	0	0	0

Tabelul 6.8. Detaliile și rezultatele aplicării matricii experimentale multifactoriale Placket-Burnman și central-compuse.

	X1 T (°C)	X2 pH	X3 Glucosa (g/l)	H ₂ (ml) 1	H ₂ (ml) 2	H ₂ (ml) 3	H ₂ (ml) Media	Deviația Standard
1	25	4,8	5	9,70	5,69	10,60	8,66	2,61
2	25	4,8	15	15,39	1,11	12,35	9,62	7,52
3	25	6,5	5	23,04	22,74	21,25	22,34	0,96
4	25	6,5	15	25,20	25,20	25,30	25,23	0,06
5	37	4,8	5	5,17	14,79	4,88	8,28	5,64
6	37	4,8	15	18,38	1,96	4,71	8,35	8,79
7	37	6,5	5	22,28	12,53	9,19	14,67	6,80
8	37	6,5	15	6,89	17,32	11,53	11,92	5,22
9	23,28	5,65	10	20,72	21,82	10,47	17,67	6,26
10	38,72	5,65	10	11,18	10,82	9,29	10,43	1,01
11	31	4,56	10	7,97	0,04	0,91	2,97	4,35
12	31	6,74	10	28,47	25,68	27,39	27,18	1,41
13	31	5,65	3,56	11,07	16,50	17,28	14,95	3,38
14	31	5,65	16,44	24,94	24,56	28,27	25,92	2,04
15	31	5,65	10	26,78	23,26	13,21	21,08	7,04
16	31	5,65	10	17,93	23,85	23,20	21,66	3,25

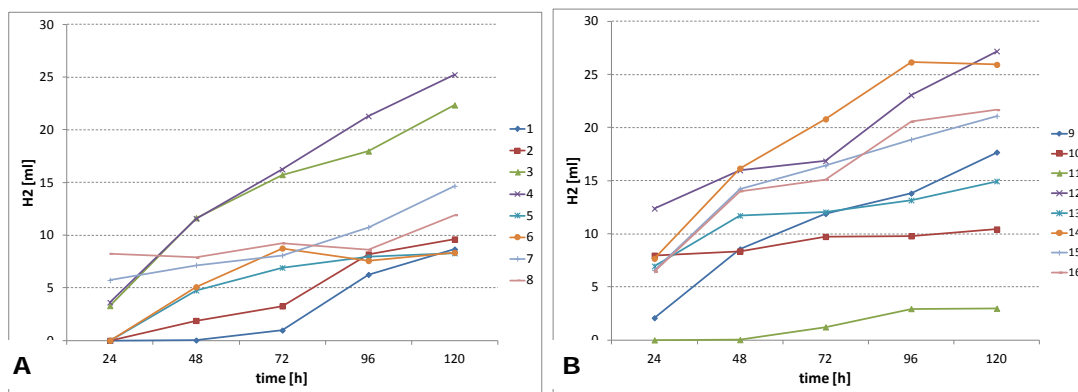


Figura 6.19. Evoluția în timp a producției biohidrogenului în urma aplicării matricii experimentale multifactoriale; **A** - matricea experimentală de tip Plackett-Burman; **B** - matricea experimentală de tip central-compus.

Prelucrarea statistică de analiză a varianței (ANOVA) a modelului experimental central compus, sugerează faptul că atât efectele lineare și pătrate ale temperaturii și ale pH-ului cât și interacțiile acestora de ordin 1, sunt semnificative din punct de vedere statistic, pentru sistemul investigat de degradare a apei uzate provenite din procesele industriale de fermentare a berii cu producerea simultană a biohidrogenului utilizând un consorțiu microbial îmbogățit selectiv (Tabelul 6.9.). În același timp, efectul principal al concentrației inițiale a glucozei, efectul pătrat și interacțiunile de ordin întâi a acestui factor, sunt nesemnificative din punct de vedere statistic în domeniul investigat. Lipsa integrării prezintă o valoare a p-ului puțin peste $\alpha=0,05$ fiind astfel ușor semnificantă (este semnificantă la nivelul α de 0.10).

Tabelul 6.9. Anliza ANOVA a modelului polinomial de ordin doi.

	Suma pătratelor	Gradul de libertate	Pătratul mediei	Valoarea F	Valoarea p
X1 Temperatura	270,935	1	270,935	11,63704	0,001725
X1 (Q)	260,138	1	260,138	11,17333	0,002075
X2 pH	1314,436	1	1314,436	56,45696	0,000000
X2 (Q)	185,342	1	185,342	7,96069	0,008033
X3 Glucoza	61,992	1	61,992	2,66265	0,112237
X3 (Q)	0,236	1	0,236	0,01013	0,920420
X1X2	140,261	1	140,261	6,02441	0,019553
X1X3	15,980	1	15,980	0,68634	0,413363
X2X3	0,291	1	0,291	0,01250	0,911647
Lipsa integrării	273,054	5	54,611	2,34561	0,062915
Eroare pură	768,309	33	23,282		
Total SS	3290,973	47			

În pasul următor s-au identificat și clasificat efectele variabilelor independente în funcție de magnitudinea acestora asupra FO (Fig. 6.20). Se observă

faptul că efectul cel mai puternic asupra FO în sistemul analizat, îl are modificarea valorii pH-ului inițial, de la nivelul inferior la cel superior.

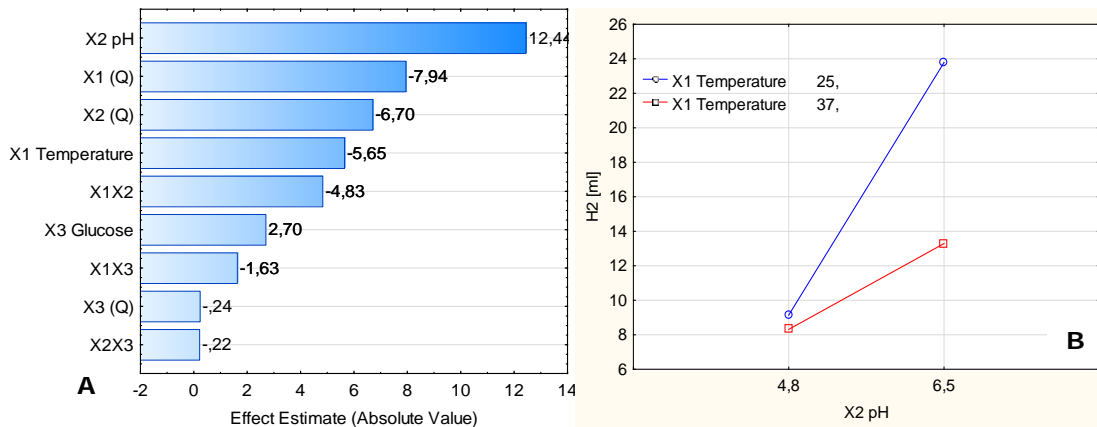


Figura 6.20. Clasificarea importanței relative și identificarea direcțiilor de influență a FI și a interacțiunilor dintre aceștia, asupra FO; **A** - histograma Pareto; **B** - analiza efectului interacțiunilor dintre temperatura de fermentare și valoarea pH-ului inițial asupra FO.

Analiza interacțiunii dintre temperatura de fermentare și valoarea pH-ului inițial indică faptul că creșterea producției biohidrogenului, pe măsură ce ne deplasăm de la nivelul inferior al pH-ului inițial spre cel superior, este mai accentuată la o temperatură joasă în comparație cu o temperatură mai ridicată. Deasemenea, se observă o evoluție în timp a efectelor FI de-a lungul etapei de fermentare (120 de ore) asupra FO (Fig. 6.21). Astfel, efectele principale ale pH-ului inițial și a temperaturii de fermentare tind să devină mai pregnante în timp.

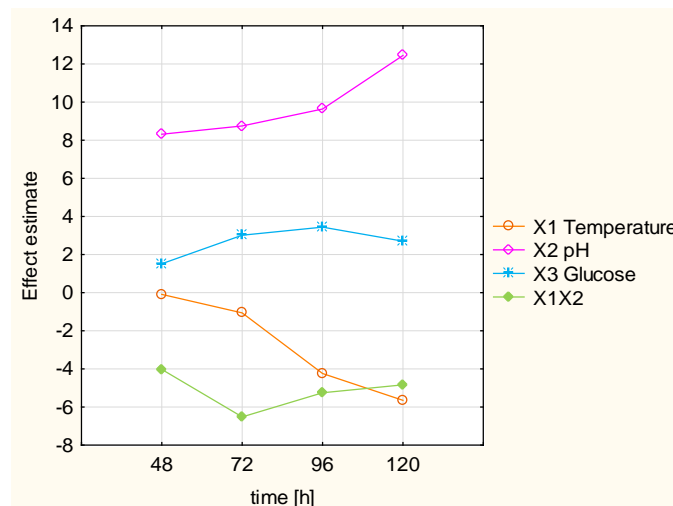


Figura 6.21. Evoluția în timp a efectelor principale asupra FO.

Ținând cont de FI codați, modelul polinomial de ordinul doi folosit pentru datele experimentale este reprezentat în ecuația 48 (Fig. 6.22):

$$Y = 20,95 - 2,83X_1 + 6,22X_2 + 1,35X_3 - 2,42X_1X_2 - 0,82X_1X_3 - 0,11X_2X_3 - 3,97X_1^2 - 3,35X_2^2 - 0,12X_3^2 \quad (6.48)$$

unde variația de 60% în producția de biohidrogen este explicată de modelul $R^2_{adj}=0,60$.

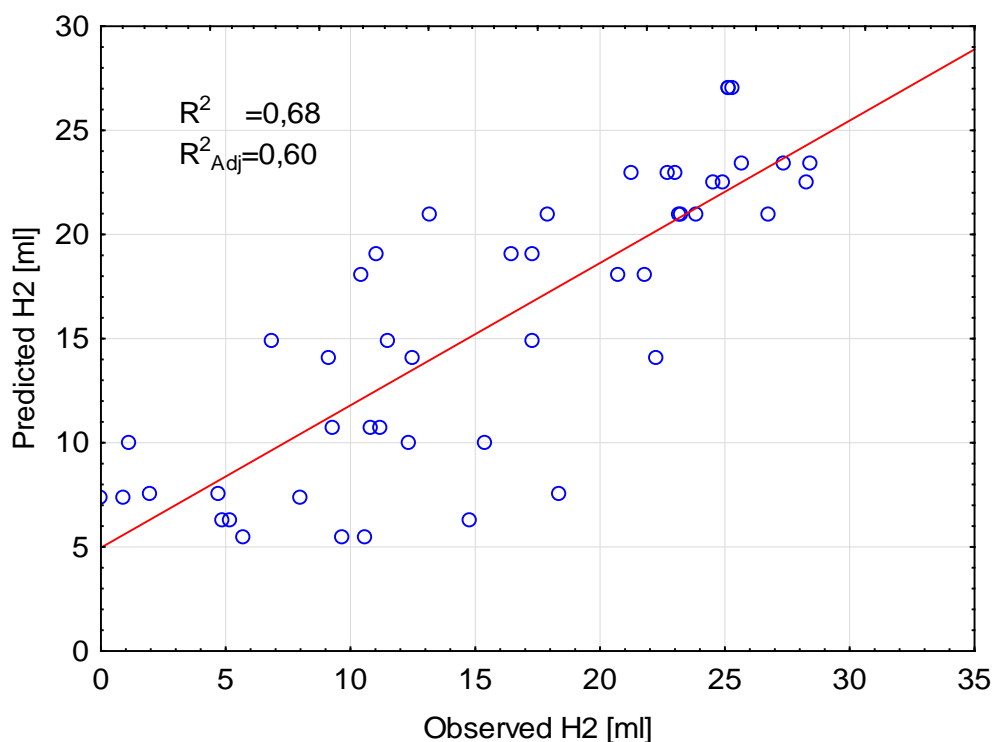


Figura 6.22. Valorile observate împreună cu valorile prezise a producției biohidrogenului în urma analizei experimentale.

În vederea concluzionării rezultatelor obținute din modelul experimental central compus, au fost aplicate metodologiile suprafeței de răspuns și a conturului de răspuns pentru concentrații diferite ale glucozei (Fig. 6.23).

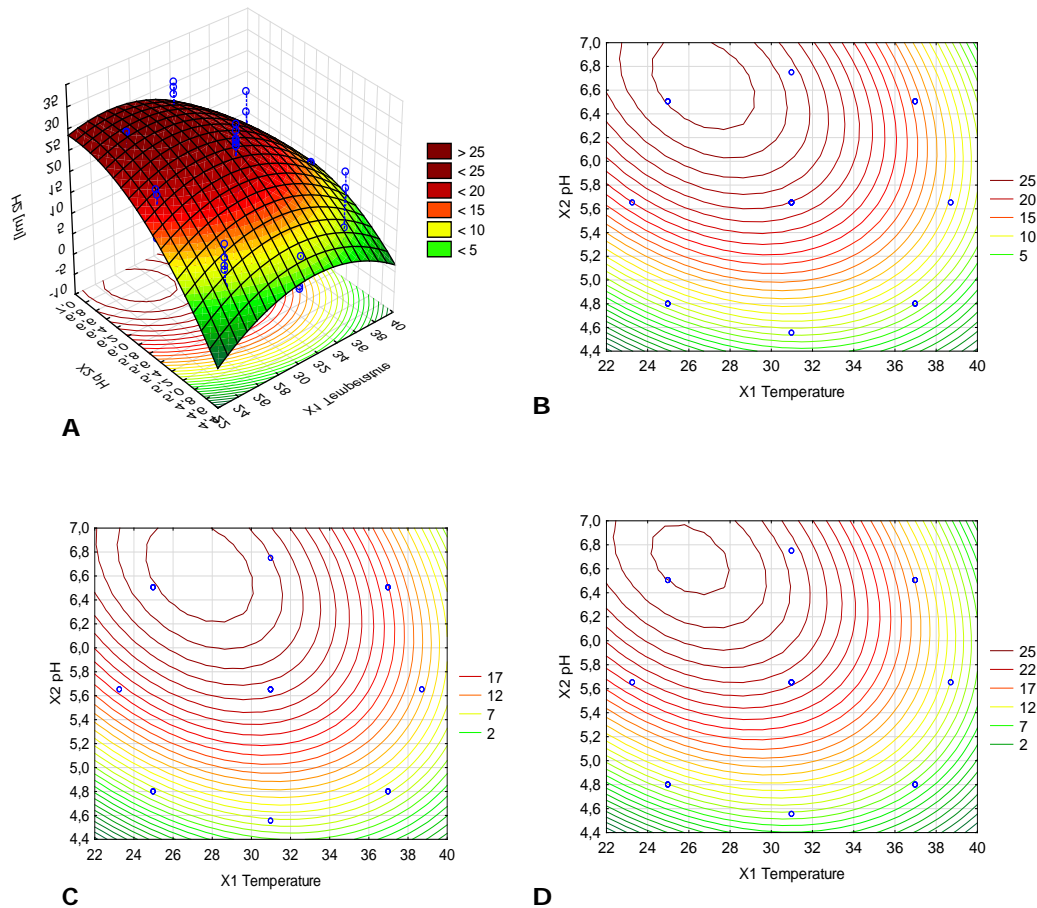


Figura 6.23. Analiza suprafeței de răspuns (A) și a conturului de răspuns (B, C și D) pentru producția biohidrogenului ca o funcție a temperaturii și a pH-ului (concentrația inițială a glucozei este menținută constant la 5, 10 și respectiv 15 g/l).

Se observă influența foarte redusă pe care diferitele concentrații inițiale ale glucozei le are asupra FO. Acest lucru confirmă observațiile realizate în etapele experimentale anterioare, utilizând ca substrat fermentativ apă uzată sintetică. Cu toate acestea, punctul staționar se află în exteriorul domeniilor experimentale investigate. Analiza canonică a metodei suprafeței de răspuns indică o posibilă tendință de creștere a FO, fapt sugerat de faptul că doi dintre coeficienții canonici sunt apropiați de zero ($\lambda_1 = -0,002995$; $\lambda_2 = -0,099786$; $\lambda_3 = -4,65529$). În acest caz însă, nu se poate localiza exact punctul staționar deoarece acesta se află în afara zonei investigate. Metoda conturului de răspuns aplicată celor trei niveluri ale concentrației inițiale ale glucozei (inferior, central și superior), sugerează o zonă de optim pentru obținerea unei FO maxime, în zona unei temperaturi fermentative de 27°C și a unui pH inițial de 6.7. Acest lucru confirmă influența relativ scăzută pe care concentrația inițială a glucozei o are asupra FO.

Având în vedere aceste observații, s-a decis eliminarea concentrației inițiale a glucozei din modelul matematic (Ecuția 6.49), considerând că acest FI este nesemnificativ statistic în domeniul investigat pentru FO analizată. Astfel s-a determinat o nouă zonă de optim a FO, situată la o temperatură fermentativă de 26.7°C și la un pH inițial de 6.66, cu o precizie a producției biohidrogenului de 25.57 ml la un interval de confidență de $\pm 95\%$ (21,7; 29,3).

$$Y = -343,22 + 9,05X_1 + 74,42X_2 - 0,47X_1X_2 - 0,11X_1^2 - 4,64X_2^2 \quad (6.49)$$

unde valorile coeficienților apar necodificate.

Această zonă de optim a FO (punctul staționar) a fost verificată experimental în trei paralele experimentale diferite. Media producției biohidrogenului a fost de 28 ml, valoare ce se află în intervalul de confidență de $\pm 95\%$ al maximumului prezis. Astfel, noul model empiric, din care a fost eliminată concentrația inițială a glucozei (nesemnificativă statistic), având un coeficient de determinare $R^2_{adj}=0,62$, a reușit să prezică cu succes comportamentul FI asupra FO în cadrul domeniului investigat.

6.4. Modelarea matematică și simularea proceselor de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate

În vederea investigării încorporării tehnologiei dezvoltate de degradare a apelor reziduale în paralel cu producerea biohidrogenului în procesul tehnologic clasic de epurare a apelor reziduale, s-au realizat o serie de modelări matematice și simulări, utilizat programul BioWin. Acesta este un pachet software dedicat modelării și simulării proceselor fizice, chimice și biologice prezente în stațiile de epurare a apelor reziduale. Programul încorporează 50 de variabile și 60 de procese unitare aerobe și anaerobe. Utilizarea acestui program în vederea simulării proceselor tehnologice prezente în cadrul unei stații de epurare a apelor reziduale, presupune o serie de etape succesive interconectate.

Primul pas îl reprezintă proiectarea configurației tehnologice a procesului de epurare a apei uzate. Pentru a realiza acest lucru, a fost utilizată ca model schema tehnologică a stației de epurare a apei uzate provenite din orașul Timișoara, utilizând datele obținute în urma unei campanii extinse de monitorizare a parametrilor operaționali realizată de-a lungul unui an (Anexele 2 și 3). În tehnologia actuală au fost eliminate decantoarele primare, două bucăți fiind folosite pentru realizarea proceselor de defosforizare chimică, iar alte 2 ca bazine de retenție pentru ape meteorice. Renunțarea la decantoarele primare a fost determinate de concentrația redusă a materiei organice din apele uzate. Sistemul de canalizare fiind unitar determină o scădere substanțială a concentrației substanțelor organice din aceste ape uzate. Fluxul tehnologic al acestei stații de epurare este format din linia apei și linia nămolului (Anexa 4 și Fig. 6.24, 6.25 și 6.26). Linia apei conține două trepte principale de epurare: o treaptă mecanică și o treaptă biologică.

Treapta mecanică este alcătuită din:

- căminul de intrare;
- instalație pentru descărcarea vidanajelor;
- grătarele rare și dese (4+4); 2 prese x 4 m³/h;
- stația de pompare pentru apa uzată;
- deznisipatoare și separatoare de grăsimi (4 buc.).

Treapta biologică este alcătuită din:

- bazinul biologic (o parte inițială anaerobă urmată de o parte aerobă);
- decantoarele secundare (4 decantoare noi - 8500 m³, 4 decantoare reabilitate - 3650 m³).

Linia nămolului (cca. 13133 m³/an) este alcătuită dintr-o stație de pompare a nămolului în exces și a nămolului recirculat, 2 bazine tampon pentru nămolul în exces (2x3509 m³), îngroșător mecanic cuplat cu filtru presă cu bandă pentru reducerea umidității nămolului până la un conținut minim de 20% substanță uscată și trei linii de întroșare și deshidratare a nămolului.

Stația de epurare a orașului Timișoara este proiectată pentru a satisface următorii parametri: 440.000 LE; Q zi mediu = 2.400 l/s; Q zi maxim = 3.000 l/s; CBO₅ = 22.000 kg/zi; suspensii solide (ss) = 28.000 kg/zi; amoniu = 5.400 kg/zi; fosfați = 1.600 kg/zi).

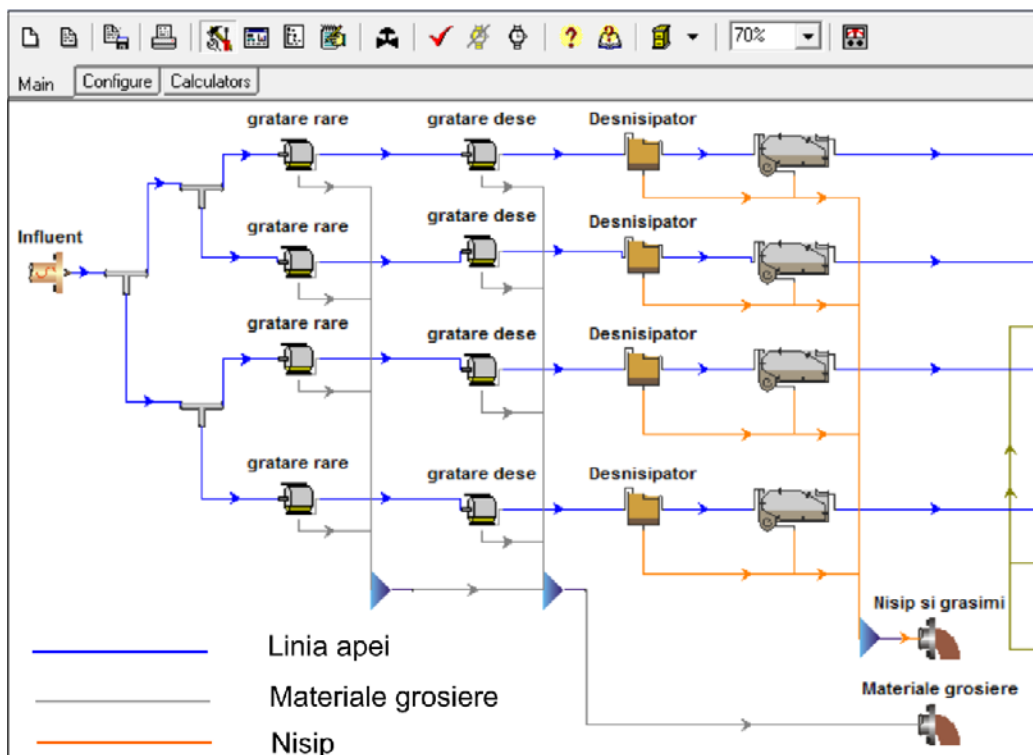


Figura 6.24. Proiectarea configurației tehnologice a treptei mecanice, parte a procesului de epurare a apelor uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

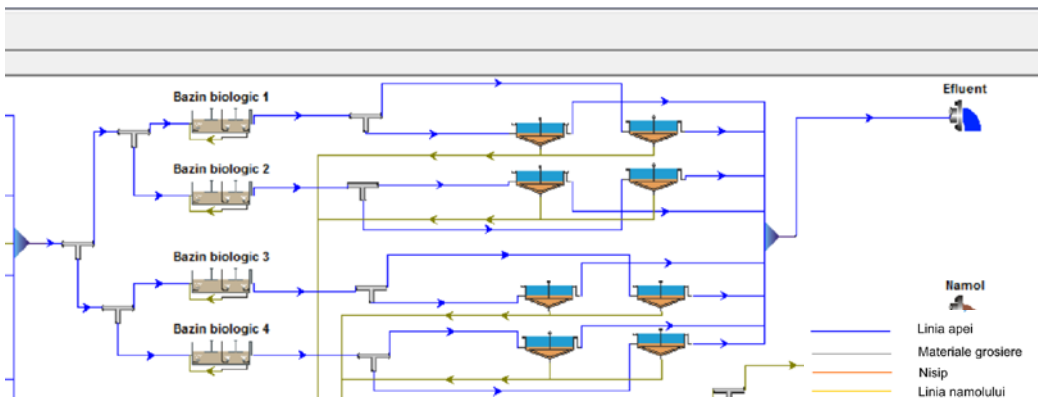


Figura 6.25. Proiectarea configurației tehnologice a treptei biologice, parte a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

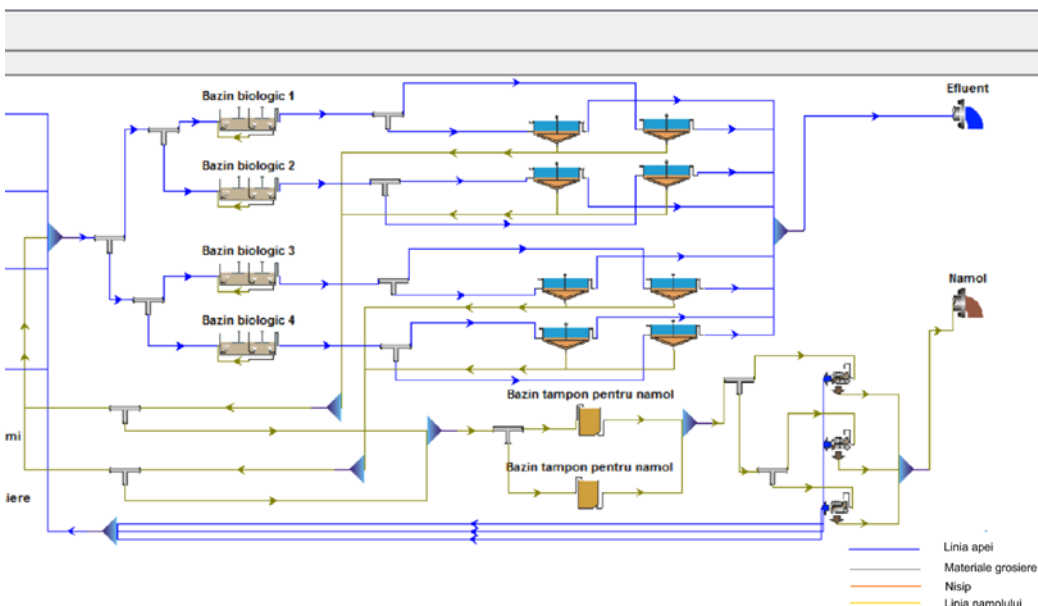


Figura 6.26. Proiectarea configurației tehnologice a liniei nămolului, parte a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

A doua etapă principală realizată în vederea modelării și simulării proceselor tehnologice de epurare a apelor reziduale o reprezintă calibrarea modelului stației de epurare utilizând datele obținute din diferite puncte de monitorizare prelevate de-a lungul unui an. O serie de parametri au fost investigați atât la intrarea și ieșirea apei uzate din stația de epurare cât și în diferite puncte considerate importante pentru evaluarea corectă și completă a proceselor desfășurate. În plus, s-a realizat o campanie adițională de monitorizare a acestor parametri în diferite puncte ale stației de epurare pentru a completa datele existente. Utilizând toate aceste informații, s-a

realizat ajustarea modelului până când răspunsurile obținute în urma modelării matematice și a simulării, referitoare la parametri investigați au fost comparative cu observațiile efectuate in situ, la stația de epurare (Fig. 6.27).

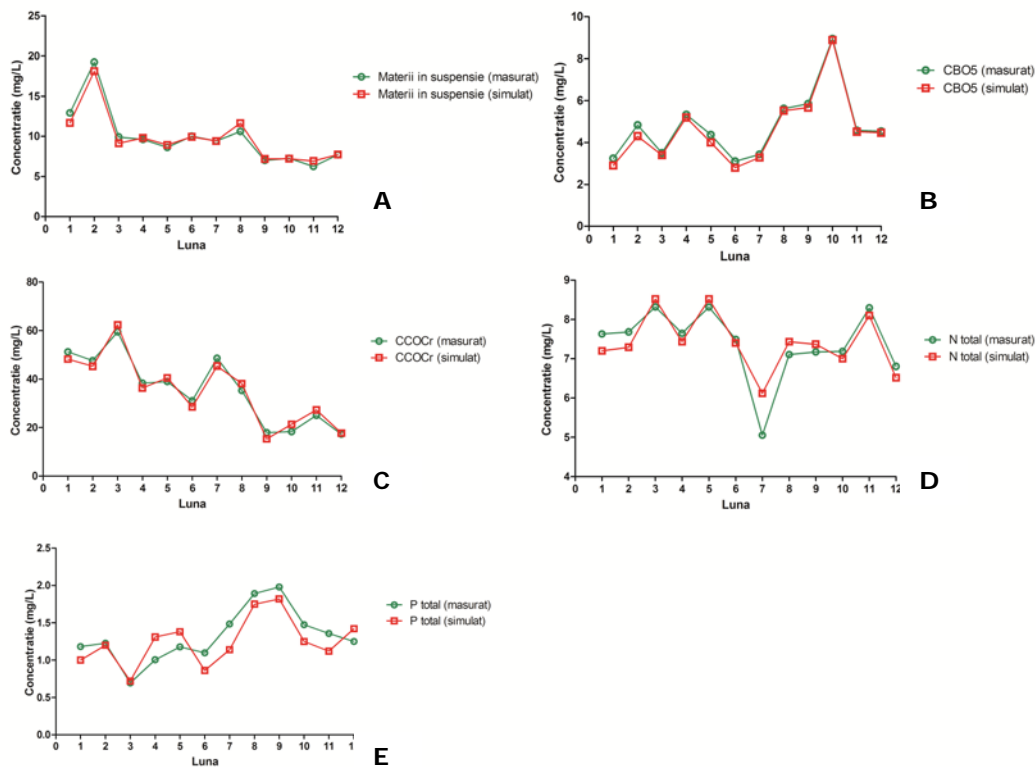


Figura 6.27. Calibrarea modelului matematic ce descrie procesul tehnologic desfășurat în cadrul stației de epurare al orașului Timișoara, utilizând programul BioWin; **A** - concentrația măsurată comparată cu concentrația prezisă statistic a materiilor în suspensie, **B** - concentrația măsurată comparată cu concentrația prezisă statistic a CBO₅, **C** - concentrația măsurată comparată cu concentrația prezisă statistic a CCOCr, **D** - concentrația măsurată comparată cu concentrația prezisă statistic a N total, **E** - concentrația măsurată comparată cu concentrația prezisă statistic a P total.

În cele din urma, având modelul calibrat, s-au realizat investigații privind aplicarea scenariilor ce conțin noile tehnologii propuse de degradare a apelor reziduale cu producerea simultană a bihidrogenului în cadrul stației de epurare Timișoara, pentru a testa funcționalitatea acestora (Fig.6.28). Astfel, modificările majore s-au realizat la nivelul treptei biologice de epurare a apelor reziduale, prin înlocuirea treptei anoxice din cadrul bazinelor biologice, cu bioreactoare proiectate pentru a degrada anaerob apele reziduale cu generarea concomitentă a bihidrogenului. Motivele principale pentru care s-a decis asupra acestei strategii sunt legate de oferirea unei soluții alternative ieftine, capabile de a satisface nevoia de epurare a apelor uzate în paralel cu producerea unor cantități semnificative de

biohidrogen. Bioreactoarele proiectate în scopul înlocuirii zonei anoxice din treapta biologică de epurare avansată a apelor uzate sunt capabile de a degrada anaerob apa uzată provenită direct din vatra centrelor populate în amestec cu apa și nămolul recirculat din decantoarele secundare, producând cantități semnificative de biogaz bogat în hidrogen, servind în același timp ca și etapă operațională pentru dezvoltarea denitrificării materiei organice prezente în acestea. Astfel se realizează o alternativă ieftină de producere a biohidrogenului prin dezvoltarea acestor elemente tehnologice capabile de a servi dublul rol de degradare și denitrificare a apelor uzate în paralel cu generarea bioenergiei. În vederea stabilizării procesului tehnologic de epurare a apelor reziduale în paralel cu producerea biohidrogenului, s-au realizat ajustări minore în procesul tehnologic, în special în cazul volumului de apă recirculat de la decantoarele secundare spre treapta biologică de epurare.

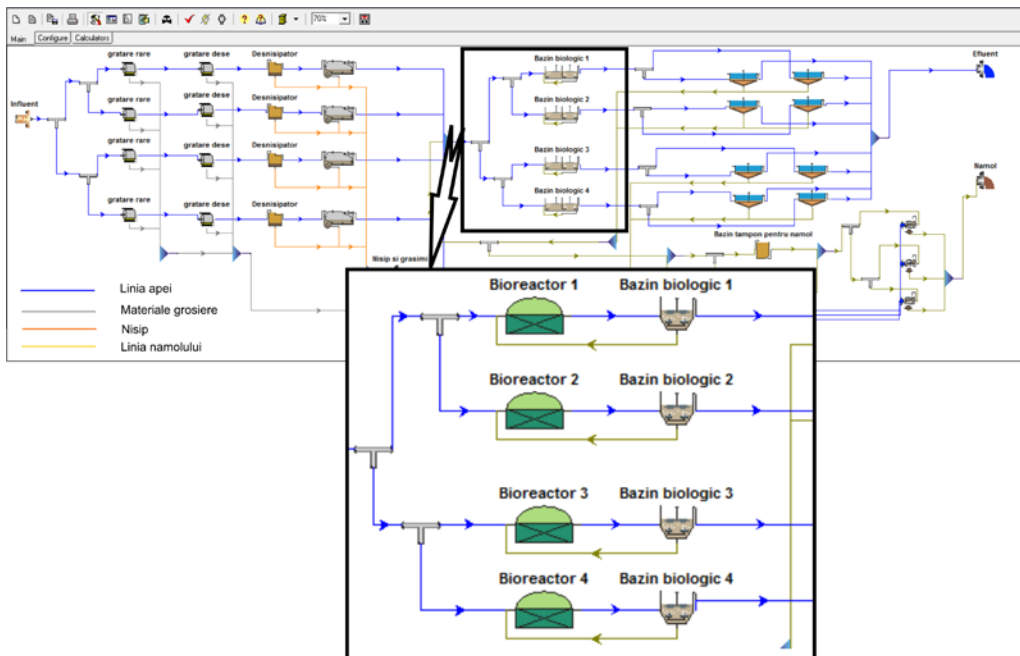


Figura 6.28. Proiectarea configurației tehnologice de producere a biohidrogenului prin înlocuirea treptei anaerobe a epurării biologice, ca parte integrată în procesul de epurare a apelor uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

S-au realizat astfel simulări dinamice, urmărindu-se un răspuns la încărcarea variabilă în timp a influențului și a variațiilor climatice, pentru a se monitoriza fiabilitatea unor astfel de modificări tehnologice și operaționale (Fig. 6.29 și 6.30.A). Se observă în urma simulărilor realizate cu ajutorul pachetului software BioWin, o variație sezonieră relativ accentuată a cantității de biogaz produs, corelată atât cu cantitatea de materie organică disponibilă în apa uzată, cât și cu debitele de apă înregistrate la intrarea în stația de epurare și temperatura ambientală. Compoziția biogazului este de asemenea supusă variațiilor sezoniere, în special în ceea ce privește conținutul de hidrogen, acesta variând între 25 și 45% din totalul de biogaz produs. În ceea ce privește concentrația de CO_2 , acesta este relativ constant în compoziția biogazului (aproximativ 4-4.5% din totalul de biogaz produs). Concentrațiile O_2 și a CH_4 au fost în cea mai mare parte aproape de 0%, excepție

făcând metanul ce a atins în luna noiembrie o concentrație de 5% din totalul de biogaz produs. În urma acestor simulări se observă astfel o producție zilnică totală a biohidrogenului situată în medie în jurul valorii de 180 m³/h (cu un minim de 40 m³/h și un maxim de 280 m³/h). Această producție rezultă în urma înlocuirii unei etape clasice de denitrificare cu o alta ce joacă dublul rol, atât cel de denitrificare, cât și cel de producere a biohidrogenului. În plus, această tehnologie poate fi supusă unui proces de optimizare în urma căruia se pot atinge concentrații ale biohidrogenului de peste 50%, după cum s-a demonstrat experimental în capitolele anterioare.

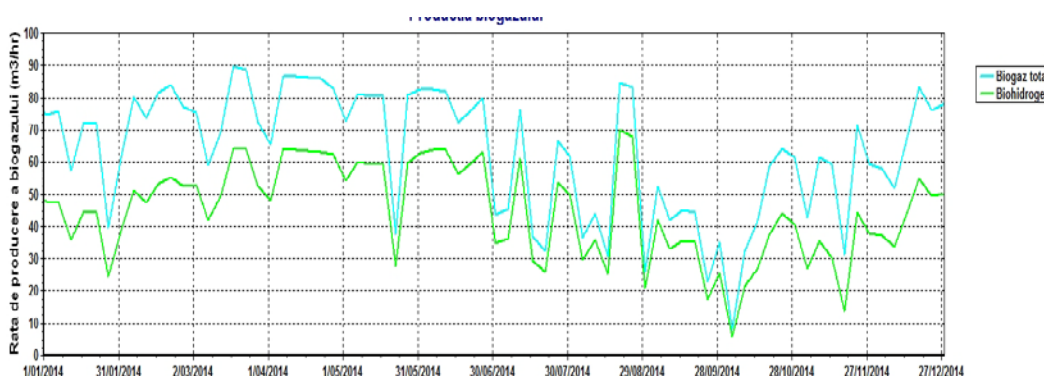


Figura 6.29. Rata de producere a biogazului împreună cu rata de producere a biohidrogenului de-a lungul unui an pentru unul dintre cele patru bioreactoare proiectate prin înlocuirea treptei anaerobe a epurării biologice, ca parte integrată în procesul de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

Deasemenea, în paralel cu producția biohidrogenului, s-au urmărit o serie de parametri în vederea monitorizării efectelor noilor tehnologii integrate asupra calității efluentului (Fig.6.30.B). S-a constatat faptul că în majoritatea cazurilor s-au obținut răspunsuri similare sau chiar mai bune referitoare la concentrația parametrilor investigați. De exemplu, concentrația suspensiilor solide în efluent a scăzut considerabil de la valori situate în jurul unei medii de 9.5 mg/L în cazul operării clasice a stației de operare, la valori în medie de 6 mg/L, în cazul aplicării soluției bioenergetice propuse. Și în cazul concentrației finale ale CCOCr se observă o ușoară îmbunătățire față de tehnologia clasică (o medie de 30%), în special în ceea ce privește diminuarea fluctuațiilor sezoniere. Concentrațiile finale ale CBO₅ și P total prezintă valori apropiate de cele înregistrate in situ, în timp ce concentrațiile finale ale N total înregistrează valori ușor ridicate în urma aplicării elementelor tehnologice noi în comparație cu valorile înregistrate in situ în cadrul stației de epurare a orașului Timișoara. În concluzie, încorporarea elementelor tehnologice noi de producere a biohidrogenului în cadrul procesului de epurare a apelor uzate din cadrul stației de epurare a orașului Timișoara nu doar rezultă în generarea unei forme de energie regenerabile sub forma biohidrogenului ci și îmbunătățește calitativ efluentul acesteia prin dezvoltarea treptei biologice de epurare, în special cea de denitrificare.

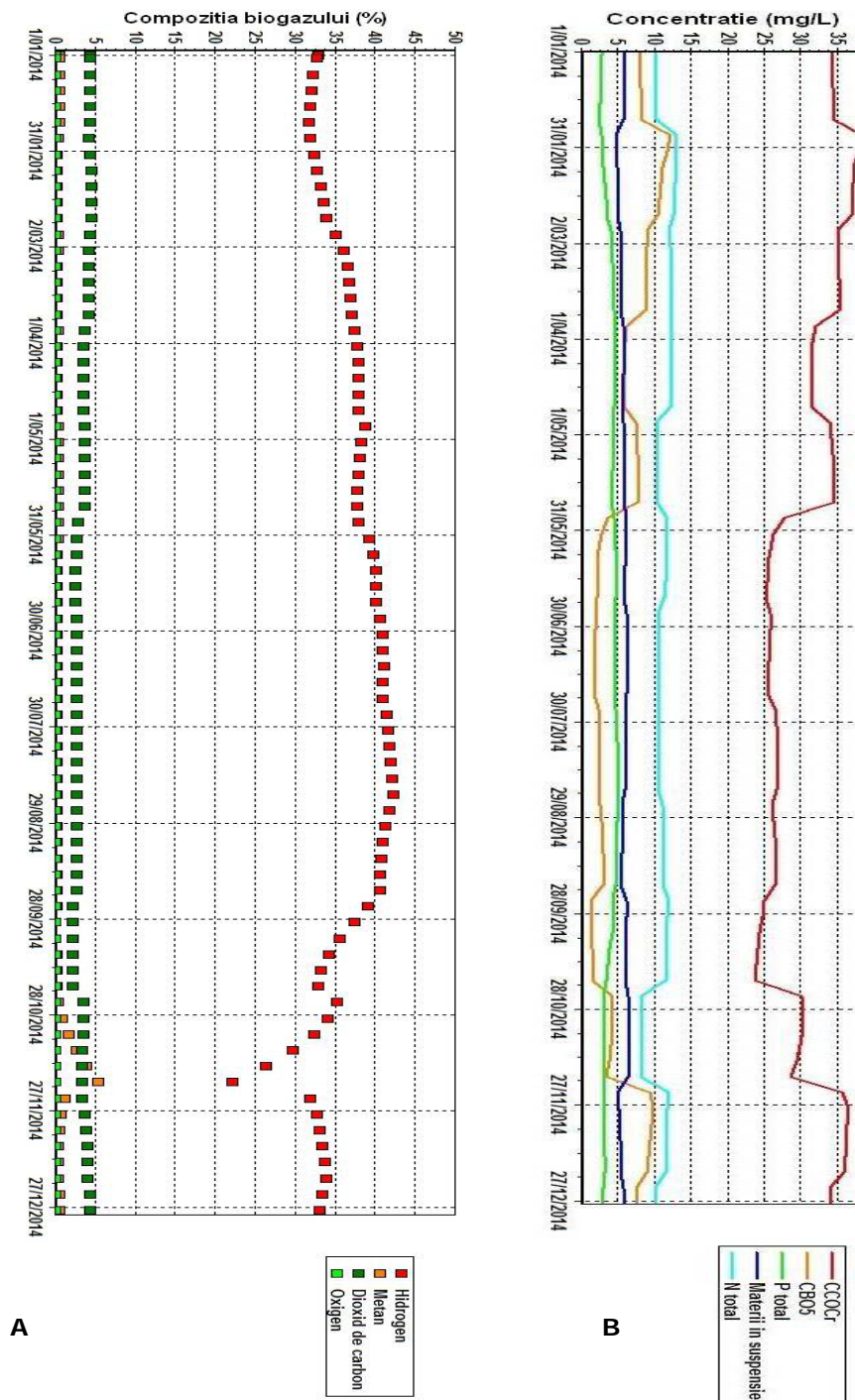


Figura 6.30. Compoziția biogazului (A) și caracteristicile efluentului (B) de-a lungul unui an, simulate în urma implementării schemei bioenergetice ca parte integrată în procesul de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

7. CONCLUZII GENERALE, CONTRIBUȚII ȘI ELEMENTE DE ORIGINALITATE

7.1. Conținutul lucrării

Subiectul abordat este de foarte mare actualitate, înscriindu-se pe linia cerințelor novatoare actuale, privind studiul proceselor de epurare a apelor reziduale corelat cu valorificarea, sub forma de biohidrogen, a potentialului energetic al maselor organice existente în acestea. Concentrațiile ridicate în mase organice și temperaturile apelor reziduale sunt caracteristici determinante pentru derularea proceselor anaerobe mezofile și termofile pentru producerea biohidrogenului în paralel cu eliminarea compusilor de amoniu și de fosfor din apele uzate, deversate în emisarii naturale. Acest concept se înscrie în cerințele și recomandările Uniunii Europene legate de implementarea unor tehnologii de epurare moderne prin care să se asigure, atât protecția mediului înconjurător cât și valorificarea resurselor alternative de energie.

Lucrarea este structurată pe 7 capitole, dezvoltată pe 142 de pagini, conține 4 anexe, 23 de tabele, 60 de figuri, 49 de relații matematice și o listă bibliografică cu 160 de titluri.

În primul capitol, "Introducere" se pun în evidență cerințele minime de calitate pentru apele epurate deversate în emisarii naturale, necesitatea stabilirii unor tehnologii adecvate pentru îndepărtarea poluanților existenți atât în apele reziduale comunale cât și cele generate de unitățile industriilor alimentare, și a celor care se impun pentru valorificarea energetică a maselor organice din namolul rezultat, sub forma de biogaz și biohidrogen. Obiectivele cercetării sunt în concordanță cu cerințele Comunității Europene de a se asigura, prin tehnologiile utilizate, atât protecția mediului înconjurător, cât și valorificarea resurselor alternative de energie.

În cel de al doilea capitol "Caracteristicile apelor reziduale" se prezintă caracteristicile atât a apelor uzate menajere cât și cele provenite de la industria alimentară, cu accent pe industria de fabricare a berii. Aceste ape reziduale, având conținut mare de materii organice justifică utilizarea unor tehnologii de epurare, combinate cu cele de producere a biogazului și a biohidrogenului.

În cel de al treilea capitol, "Tehnologii bioenergetice pentru epurarea apelor reziduale", este prezentată evoluția în timp a sistemelor de epurare a apelor reziduale, fiind evidențiate: metodele de epurare; sistemele clasice de epurare utilizate pentru apele uzate menajere și cele industriale; tehnologii de epurare a apelor reziduale cu obținere de biogaz; tehnologii cu reactoare anaerobe, capabile de generarea biohidrogenului.

În cel de al patrulea capitol, "Procese biologice implicate în epurarea apelor reziduale", sunt prezentate aspectele de ordin general cu privire la utilizarea digestiei anaerobe pentru tratamentul apelor uzate și stabilizarea reziduurilor organice; produsii finali ai digestiei anaerobe (biogaz, efluent tratat și namol

neutralizat cu caracteristici fertilizante pentru agricultura); procesele tratamentului anaerob (hidroliza, formarea acizilor și acetogeneza, metanogeneza, cinetica metanogenezei și metabolismul bacteriilor; factorii de mediu și de exploatare (compoziția și concentrația substratului organic, conținutul de acizi, pH-ul, temperatura mediului, raportul dintre componenta minerală și organică, amestecul și recircularea, inhibitorii, durata de fermentare, sistemul de alimentare-evacuare, doza de încărcare); cinetica proceselor de fermentare anaerobă; metabolismul bacterian implicat în degradarea substratului organic cu producerea simultană a biohidrogenului; termodinamica proceselor anaerobe; noțiuni de proiectare experimentală.

Următorul capitol, "Etapă și metode experimentale abordate", prezintă materialele și metodele elaborate și aplicate în cadrul cercetărilor experimentale. Sunt detaliate astfel următoarele metode utilizate: obținerea inoculilor microbiene capabile de a degrada apele uzate reziduale în paralel cu generarea unor cantități considerabile de biohidrogen; determinarea completă a diferitelor specii de microorganisme implicate în principalele procese biologice ce stau la baza producerii biohidrogenului în urma fermentației anaerobe a substanțelor organice complexe prezente în apele reziduale; proiectarea și modul de operare a bioreactoarelor utilizate în experimentele de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale; strategiile statistice de proiectare experimentală utilizate pentru a optimiza procesul de producere al biohidrogenului în urma degradării anaerobe a substanțelor organice prezente în diferite tipuri de ape reziduale; metodele analitice utilizate în timpul derulării experimentelor în vederea monitorizării atât a diferiților parametri implicați în procesele biotehnologice investigate, cât și a răspunsurilor generate de sistemele studiate.

În cadrul celui de al șaselea capitol, "Studii și cercetări experimentale", sunt tratate rezultatele obținute în urma abordărilor experimentale. Astfel, în prima parte a acestui capitol sunt prezentate și discutate aspectele microbiologice implicate în procesele de degradare a apelor reziduale cu obținerea simultană a biohidrogenului. În cea de-a doua parte a acestui capitol sunt prezentate abordările statistice de proiectare experimentală aplicate în vederea identificării influenței factorilor implicați în procesele de degradare a apelor reziduale și producția concomitentă a biohidrogenului. De asemenea, pe baza informațiilor obținute în urma acestor analize statistice avansate, s-a elaborat o tehnologie de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate rezultate în urma proceselor industriale de producere a berii. Această tehnologie a fost supusă unei strategii avansate de proiectare experimentală, modelare matematică și simulare, în vederea optimizării ratei de degradare a apei uzate și a producției biohidrogenului.

În capitolul șapte, "Concluzii generale contribuții și elemente de originalitate", sunt prezentate problemele specifice abordate în cadrul prezentei lucrări, concluziile generale rezultate în urma cercetării doctorale, contribuțiile și elementele de originalitate și nu în ultimul rând, o serie de propuneri și recomandări pentru direcțiile de studiu viitoare.

7.2. Concluzii generale

Omenirea se confruntă în prezent cu o accentuată creștere demografică la nivel global. Această creștere manifestă repercursiuni accentuate și de cele mai multe ori ireversibile, atât asupra integrității biosferei cât și asupra resurselor

energetice ale planetei. Mai specific, principalele probleme majore actuale ale umanității se referă la cerințele energetice tot mai ridicate, în condițiile în care aceasta provine în cea mai mare parte din surse neregenerabile, în curs de epuizare, cu impact negativ profund asupra mediului. Totodată, o altă problemă majoră, care de altfel agravează și mai mult situația generată de arderea combustibililor fosili cu eliberarea simultană atât a gazelor cu efect de seră cât și a altor compuși nocivi, se referă la managementul deșeurilor organice, în special sub forma apelor uzate menajere și industriale.

Gestionarea acestor deșuri ridică două mari probleme principale referitoare atât la **i)** costurile mari necesare epurării volumelor aflate în creștere a apelor uzate menajere și industriale, cât și la **ii)** impactul accentuat negativ pe care aceste ape uzate îl au asupra mediului, în cazurile în care acestea nu sunt epurate corespunzător. În același timp însă, aceste deșuri organice înmagazinează cantități foarte mari de energie, care ar putea fi recuperată odată cu degradarea și epurarea lor.

În prezent, există tehnologii capabile de a accesa o parte din energia acumulată în unele deșuri organice, sub formă de biogaz cu conținut mare de metan. Însă, aceste procese tehnologice au o rată de conversie scăzută, iar metanul astfel obținut oferă o aplicație limitată din punct de vedere energetic. În plus, prin combustia acestuia, sunt eliberați o serie de compuși ce contribuie la efectul de seră observabil din ce în ce mai pregnant la nivel global în ultimii ani, accelerând astfel acest proces nociv cu repercursiuni ireversibile asupra mediului.

Abordarea noastră, în cadrul cercetării doctorale de față, are ca scop dezvoltarea și optimizarea unei tehnologii de valorificare energetică a apelor uzate, prin realizarea unei tranziții de la tehnologia clasică de epurare a apelor uzate, la o tehnologie nouă de producere a biohidrogenului în urma procesului de degradare anaerobă a apelor reziduale în cadrul stațiilor de epurare a apelor uzate comunale și industriale. Hidrogenul reprezintă un transportor energetic versatil ce poate fi utilizat direct într-o gamă largă de procese tehnologice. Mai mult, în urma utilizării acestuia, sunt eliberați ca produși secundari doar vapori de apă. Avantajul acestei abordări de producere a hidrogenului în comparație cu tehnologiile existente, este și acela de a realiza o pretratare, sau chiar în unele cazuri o tratare biologică completă, a acestor ape reziduale, în paralel cu generarea unei surse regenerabile de energie, cu un impact redus asupra mediului. Acest lucru v-a atrage după sine scăderea dramatică atât a costurilor de gestionare și epurare a apelor uzate comunale și industriale cât și a costurilor legate de producerea hidrogenului.

Pentru a dezvolta o astfel de tehnologie de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apelor reziduale, este necesară depășirea unui număr de bariere tehnologice. Acestea se referă în primul rând la:

- **Obținerea unui inocul microbial capabil de producerea unor cantități considerabile de biohidrogen în urma degradării apelor reziduale;** în condiții optime, anumite specii de microorganisme strict anaerobe sunt capabile de a produce 4 moli de H_2 în urma degradării unui mol de glucoză ($C_6H_{12}O_6$). Utilizarea însă a unor populații pure de microorganisme, formate doar din câteva specii, ridică probleme mari de operativitate a procesului. Apele uzate supuse degradării de către aceste populații necesită o sterilizare în prealabil, lucru ce ar duce la creșterea considerabilă a costurilor de operare. Utilizarea însă a unor consorții microbiene mixte, crează probleme referitoare la faptul că în aceste populații, există atât specii producătoare de H_2 cât și specii consumatoare de H_2 .

- **Rata scăzută de degradare a apelor reziduale**; deoarece apele uzate provenite atât din vatra centrelor populate, cât și în urma proceselor tehnologice industriale, reprezintă un substrat foarte complex și limitant din punct de vedere ecologic, acestea sunt degradate cu mari dificultăți de către microorganisme.

- **Rata generală scăzută a producției biohidrogenului**; datorită faptului că procesul de producție a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate reprezintă un proces complex, dinamic, acesta este guvernat de o serie de factori fizici, chimici și biologici ca: dezvoltarea bacterilor producătoare și consumatoare de hidrogen, substratul utilizat, nutrienții inorganici, condițiile de operare a bioreactoarelor, etc.. Până în prezent, nu se cunoaște cu siguranță amplitudinea influenței acestor factori asupra ratei de producție a H_2 .

- **Lipsa modelelor matematice capabile de a reproduce și descrie complet procesele implicate în producția biohidrogenului în urma degradării apelor uzate**; datorită complexității și dinamicii acestor sisteme, studiile de modelare și simulare a acestor procese sunt sporadice și incomplete.

Pentru a depăși aceste bariere tehnologice, au fost trasate următoarele obiective ale cercetării doctorale:

- obținerea unui **inocul microbial complex**, capabil de producția biohidrogenului în urma degradării eficiente a apelor uzate;

- dezvoltarea unui **proces complex de producere a biohidrogenului** în urma degradării anaerobe a apelor reziduale;

- descifrarea **căilor metabolice** cheie implicate în procesele de producere a biohidrogenului în urma fermentării anaerobe a apelor reziduale;

- identificarea atât a **gradului de influență** cât și a **interacțiunilor** prezente la nivelul diversilor factori fizici, chimici și biologici ce influențează procesul fermentativ de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor uzate;

- **optimizarea** proceselor de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apelor uzate;

- **modelarea matematică și simularea** proceselor implicate în producția biohidrogenului prin degradarea anaerobă a apelor uzate;

- **diseminarea** la scară largă a rezultatelor cercetării doctorale.

Rezolvarea acestor obiective ne aduc mai aproape de realizarea unei tehnologii viabile de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale. Această tehnologie poate fi adaptată utilizării atât în stațiile de preepurare a apelor uzate rezultate în urma proceselor tehnologice din industria alimentară, cât și în stațiile de epurare a apelor uzate menajere. Astfel, prin utilizarea locală la scară largă a acestei tehnologii, se aștern primii pași spre o industrie globală cu impact redus asupra mediului, bazată pe hidrogen.

7.3. Contribuții și elemente de originalitate

Cercetările doctorale au fost realizate atât în laboratoarele de Producere a Biogazului și Microbiologia și Chimia Apei din cadrul Departamentului de Hidrotehnică al Universității "Politehnica" din Timișoara, cât și în laboratoarele de Biologie moleculară și Biotehnologii din cadrul Institutului de Cercetări Biologice al Academiei Maghiare, Szeged, Ungaria.

Tehnologiile bioenergetice, prin implementare pe linia apei a digestoarelor în serie (regim de funcționare termofil și mezofil), reprezintă sisteme avansate aplicabile în cazul în care treapta mecanică reține substanțele grosiere și

anorganice, rămânând ca în apa de scurgere să se regăsească doar cele biodegradabile. Se recomandă ca apele uzate să fie colectate separat de cele meteorice, pentru evitarea diluțiilor accentuate. Strategia de cercetare doctorală aplicată, s-a axat pe obținerea biohidrogenului în cadrul proceselor mezofile (25-38°C) de degradare a apelor reziduale, cu realizarea de inoculi microbieni îmbogățiți selectiv.

În cadrul acestei lucrări s-au realizat o serie de contribuții personale corelate la obiectivele propuse. Astfel s-a demonstrat potențialul valorificării unei resurse moderne de energie sub forma biohidrogenului prin procesul de fermentare anaerobă acidogenă a apelor uzate reziduale. Deasemenea s-a dezvoltat o tehnologie avansată de epurare a apelor reziduale, caracterizată printr-un flux tehnologic simplificat, stabil, ce necesită investiții reduse de aplicare și funcționare. Contribuțiile cercetării doctorale sunt descrise pe scurt în cele ce urmează:

- **Identificarea grupelor principale de microorganisme implicate în procesul de producere a biohidrogenului.** Acest pas este necesar explorării acestor procese, stând la baza identificării unui consorțiu microbial optim, atât pentru generarea biohidrogenului cât și pentru degradarea (și astfel preepurarea, sau chiar în unele cazuri epurarea biologică completă) apelor reziduale. Pentru obținerea unor populații microbiene capabile de a produce biohidrogen în urma degradării apelor uzate, au fost investigate și prelevate probe dintr-o serie de habitate diverse din punct de vedere ecologic, bogate în substanțe organice complexe. Microorganismele prelevate din aceste habitate au fost utilizate ca inoculi în bioreactoare de mici dimensiuni. În urma acestor experimente comparative realizate utilizând ca substrat fermentativ apă uzată sintetică, obținând astfel un sistem model, constant și reproductibil, s-au evidențiat cele mai importante grupe de microorganisme implicate în procesele complexe de degradare a substratului organic cu producție simultană de biohidrogen. Acest lucru a fost posibil datorită utilizării metodelor noi metagenomice de înaltă rezoluție, pe lângă metodele clasice de monitorizare genetică și cultivare microbială pe medii de cultură specifice. Abordarea metagenomică permite analiza completă a populațiilor microbiene, chiar și a celor ce nu pot fi cultivate pe medii de cultură. Acest lucru deschide o serie de oportunități ce până de curând erau nerealizabile. În plus, metoda metagenomică ne oferă pe lângă informații calitative, și informații cantitative asupra consorțiilor microbiene analizate. Astfel, ținând cont de aceste informații, putem înțelege mai bine modificările ce au loc în structura acestor populații microbiene, putând monitoriza, controla și chiar crea un consorțiu microbial complex îmbogățit selectiv, optim pentru producerea biohidrogenului în paralel cu degradarea apelor reziduale.

- **Evidențierea efectelor diferitelor strategii de pretratament asupra consorțiilor microbiene utilizate în procesul de producere a biohidrogenului.** Deoarece abordarea noastră experimentală utilizează inoculi formați din populații microbiene complexe, este necesară o strategie de eliminare a microorganismelor consumatoare de H_2 și o îmbogățire a celor producătoare de H_2 . Astfel, s-a optat pentru aplicarea unor metode de pretratament a acestor comunități microbiene, bazate pe diferențele fiziologice dintre aceste grupe de microorganisme. Pretratamentele adoptate au constat în aplicarea diferitelor șocuri fizice și chimice, în urma cărora bacteriile metanogene, ce nu formează în general spori de rezistență, vor fi dramatic reduse, în timp ce bacteriile producătoare de H_2 , în general capabile de a forma spori de rezistență, rămân neafectate. Utilizarea acestor inoculi supuși pretratamentelor, în experimente de degradare a apei uzate sintetice,

au relevat diferențele majore existente în rata de producție a biohidrogenului în funcție de pretratamentul aplicat. Mai mult, s-a evidențiat faptul că nu există un singur pretratament optim utilizabil pentru toate populațiile microbiene. Astfel, se poate concluziona că trebuie ținut cont de originea consorțiului microbial în alegerea tipului de pretratament ce urmează a fi aplicat, pentru maximizarea răspunsului dorit.

• **Obținerea unui inocul microbial potrivit pentru degradarea apelor reziduale cu producerea concomitentă a biohidrogenului.** Unul dintre obstacolele majore a aplicării la scară industrială a tehnologiilor biologice de producere a hidrogenului, se referă la dificultatea obținerii unui inocul microbial capabil de a degrada apele reziduale cu producerea concomitentă a biohidrogenului. Acest lucru este guvernat de complexitatea acestor substraturi organice. Pe de altă parte, având în vedere volumele mari de apă uzate produse de centrele populate sau de procesele industriale, inoculul utilizat pentru a degrada aceste substraturi și a produce biohidrogen trebuie să fie relativ accesibil și în același timp să nu necesite costuri mari de proiectare și îmbogățire. Astfel, s-au realizat experimente de producere a biohidrogenului în urma fermentării apei uzate sintetice (un sistem model), utilizând ca inocul populațiile microbiene supuse pretratamentelor în pasul experimental anterior. Acestea au fost îmbogățite în prealabil utilizând mediu de cultură lichid DMI. Acest pas are ca scop, pe lângă îmbogățirea microorganismelor producătoare de H_2 ce au supraviețuit pretratamentelor, și aclimatizarea acestora la noile condiții de fermentare. Astfel, în urma acestor experimente s-a stabilit faptul că aceste consorții microbiene necesită o proiectare, selecție și îmbogățire strict raportată la particularitățile atât a provenienței acestora, cât și la natura apei uzate fermentate. S-a decis astfel, ținând cont și de accesibilitatea inoculului microbial împreună cu costurile de proiectare a acestuia, asupra inoculului provenit din treapta de denitrificare a stației de epurare a orașului Timișoara, supus pretratamentului prin căldură. Această alegere a fost confirmată și de rezultatele obținute în etapele experimentale următoare. Pe lângă rezultatele bune obținute de-a lungul etapelor experimentale utilizând acest inocul, au fost luate în calcul și aspectele tehnice și financiare ale acestei abordări la scară industrială. Treapta de denitrificare a stației de epurare reprezintă o sursă permanentă, constantă și ieftină pentru acest inocul. Pretratamentul prin căldură reprezintă alternativa cea mai viabilă tehnico-financiar în cazul unei aplicări industriale, putând fi parte integrată a procesului, utilizând căldura generată de diferite procese industriale.

• **Identificarea rutelor metabolice adoptate de microorganismele implicate în procesul de producere a biohidrogenului.** Un pas important în înțelegerea și astfel optimizarea acestor sisteme fermentative de producere a biohidrogenului utilizând ape uzate, îl reprezintă înțelegerea în intimitate a fenomenelor metabolice ce guvernează tranziția substratului organic, spre H_2 . Astfel s-au analizat statistic datele referitoare atât la degradarea substratului organic cât și la producerea diferiților produși metabolici, raportat la rata de producție a biohidrogenului. În urma acestor investigații, s-au putut evidenția principalele corelații semnificative statistic între degradarea substratului în paralel cu generarea anumitor produși metabolici și rata de producție a biohidrogenului. De asemenea s-au putut trasa principalele rute metabolice adoptate de microorganismele producătoare de H_2 , în urma degradării apelor reziduale. Aceste observații deschid calea atât pentru aplicarea unor metode de optimizare a acestor procese biotehnologice, cât și pentru modelarea și simularea acestora.

• **Identificarea principalilor factori fizici, chimici și biologici implicați în procesul de producere a biohidrogenului.** O altă problemă majoră în dezvoltarea și aplicarea la scară industrială a unei tehnologii de producere a biohidrogenului în urma fermentării apelor reziduale, o reprezintă rata scăzută a producției acestuia, chiar și în cazul utilizării unui inocul microbial corespunzător. Acesta se datorează complexității acestui proces, guvernat de o serie de factori fizici, chimici și biologici. Astfel, pentru a crește considerabil rata de producție a biohidrogenului este necesară o ajustare a tuturor acestor factori. Pentru a putea face asta însă, este nevoie de a stabili care dintre acești factori sunt sau nu importanți pentru procesul vizat. Astfel, s-au identificat un număr de 8 factori considerați importanți față de rata de producție a biohidrogenului. Aceștia au fost supuși unei analize de proiectare experimentală ortogonală Taguchi utilizând ca substrat apă uzată sintetică. În urma analizei statistice a acestei matrici experimentale, au fost identificați principalii factori de influență asupra FO (rata de producție a biohidrogenului), fiind însă identificate în același timp și o serie de interacțiuni între acești factori, cu o puternică influență asupra FO. Rezoluția oferită însă de acest model experimental necesită în continuare o serie de abordări multifactoriale în urma cărora să identificăm măsura în care acești FI și interacțiunile dintre ei influențează răspunsul vizat, astfel încât să identificăm zona de optim a procesului.

• **Ierarhizarea efectelor factorilor de influență cât și a interacțiunilor dintre aceștia asupra procesului de producere a biohidrogenului.** În vederea optimizării procesului de producere a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale, sunt necesare date adiționale referitoare la ierarhizarea efectelor FI și a interacțiunilor dintre aceștia asupra FO. Astfel, s-a elaborat un nou plan experimental utilizând apă uzată sintetică, alcătuit din două etape consecutive, reducând numărul FI studiați, eliminând pe cei considerați irelevanți în urma experimentelor anterioare. Această abordare experimentală multifactorială oferă o rezoluție suficient de mare pentru a identifica interacțiunile prezente între FI și relevanța acestora față de FO. Odată identificate atât aceste interacțiuni cât și gradul de influență al factorilor analizați, asupra FO, s-a obținut o imagine în timp a acestor efecte. Astfel putem observa o variație în timp atât a intensității cât și a direcției acestor efecte asupra FO. Aceste informații sunt vitale în stabilirea unei strategii de optimizare a acestor procese biotehnologice în flux continuu, cu un timp de retenție al substratului prestabilit.

• **Dezvoltarea și optimizarea procesului de producție a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apei uzate provenite din procesele industriale ale fermentării berii.** Realizând o ierarhizare a efectelor diferiților factori de influență și a interacțiunilor dintre aceștia asupra funcției obiectiv (rata de producție a biohidrogenului), utilizând un sistem model (apa uzată sintetică), obținem un punct de plecare valoros în încercarea de a proiecta și optimiza un proces de producție a biohidrogenului utilizând diferite tipuri de ape uzate, atât comunale cât și industriale. Pentru a testa acest lucru, s-a dezvoltat o strategie de optimizare a procesului de producție a biohidrogenului, utilizând ca substrat fermentescibil apă uzată rezultată în urma proceselor tehnologice din cadrul fabricii de bere Timișoreana. Această strategie a constat din două etape experimentale, o etapă experimentală factorială completă în vederea discriminării influenței anumitor factori asupra FO, urmată de o etapă experimentală multifactorială central-compusă pentru optimizarea propriuzisă a FO (rata de producție a biohidrogenului). Aceste

experimente au fost însoțite de investigații metagenomice și metabolice în vederea monitorizării complete a procesului biotehnologic de producere a biohidrogenului în urma degradării anaerobe a apei uzate provenite în urma proceselor tehnologice de producere a berii. Zona de optim prezisă statistic în urma acestor proiectări experimentale a fost confirmată experimental, fiind situată în intervalul de confidență de $\pm 95\%$ al maximumului prezis. Astfel, noul model empiric, având un coeficient de determinare $R^2_{adj}=0,62$, a reușit să prezică cu succes comportamentul FI asupra FO în cadrul domeniului investigat. Aceste rezultate confirmă faptul ca, aplicând această abordare experimentală împreună cu datele obținute în fazele experimentale anterioare, putem proiecta și optimiza o strategie de degradare a oricărui tip de apă uzată bogată în substanțe organice, realizând dublul rol de producere a unei surse regenerabile de energie sub forma H_2 , împreună cu pretatarea sau chiar tratarea completă a acestor ape reziduale.

• **Modelarea matematică și simularea proceselor de producție a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale.** Pentru o optimizare mai eficientă a acestor procese în diferite situații operaționale, cât și pentru testare in silico a aplicabilității acestor tehnologii este nevoie de realizarea unor modele matematice adecvate, capabile de a descrie corect multitudinea de factori ce influențează procesul de producție a biohidrogenului în urma degradării apelor reziduale. Acest lucru necesită modelarea grupelor principale de FI (Factori de Influență) ce acționează asupra FO (Funcției Obiectiv). Abordarea utilizată în cadrul tezei de doctorat tratează aceste grupe principale sub diferite module matematice. Astfel avem trei module principale ce descriu procesul de fermentare anaerobă a apelor uzate cu producția paralelă a biohidrogenului și anume: un modul fizic, unul chimic și unul biologic. Aplicând această abordare, s-a reușit modelarea și descrierea matematică a proceselor tehnologice complexe ce au loc în cadrul unei stații de epurare. Obținând astfel o descriere matematică corectă a proceselor ce au loc în stația de epurare a apelor reziduale ce provin din orașul Timișoara, s-au putut testa diferite configurații alternative a proceselor tehnologice. Astfel s-a demonstrat faptul că prin înlocuirea treptei biologice anaerobe cu un bioreactor capabil de degradarea apelor reziduale în amestec cu nămolul recirculat, se pot obține cantități semnificative de biohidrogen în paralel cu păstrarea sau chiar îmbunătățirea în unele cazuri a calității efluentului. În plus, prin desfășurarea unei campanii de optimizare a proceselor fermentative se pot atinge valori semnificativ mai mari a ratei producției biohidrogenului, fapt demonstrat experimental în capitolele anterioare.

• **Stabilirea tehnologiilor bioenergetice** pentru epurarea apelor uzate menajere din centrele populate și a celor provenite din unitățile industriei alimentare. Scopul general al cercetării doctorale este acela de a propune un sistem tehnologic de producere a biohidrogenului, cu posibilă aplicație în stațiile de epurare precum și în industria alimentară, aducând astfel producerea hidrogenului prin intermediul proceselor fermentative mai aproape de comercializare.

• **Înlocuirea decantoarelor primare** din cadrul tehnologiilor de epurare cu digestoare dispuse în serie sau în paralel. Prin eliminarea de pe linia tehnologică a apei a decantoarelor primare și înlocuirea lor cu digestoare (operate în serie sau în paralel), se pot obține reduceri importante asupra investițiilor în stațiile de epurare. În cazurile în care digestoarele incluse pe linia apei neutralizează și efectele nămolului, se obțin, prin eliminarea decantoarelor primare, reduceri importante asupra costurilor de investiție. În cadrul acestui concept, digestoarele introduse pe

linia apei, au o dublă funcționalitate. În primul rând asigură, în urma proceselor de degradare anaerobă, producerea de biohidrogen. De asemenea, acestea dezvoltă semnificativ treapta biologică de denitrificare.

- **Identificarea mecanismelor microbiologice** privind producerea de biohidrogen în cadrul proceselor acidogene, sau de biogaz în cadrul proceselor metanogene. Procesul de producere a biohidrogenului prin intermediul degradării fermentative este des întâlnit în condiții anoxice. În timpul procesului de fermentație, substratul organic este inițial convertit la piruvat, pe căi glicolitice. Acesta este apoi oxidat la acetil Co-A, care poate fi convertit la acetil fosfat generând astfel ATP și acetat. Astfel procesele de fermentație anaerobe permit producția în masă a hidrogenului prin procese relativ simple, dintr-un spectru larg de deșeurii organice, incluzând ape uzate comunale sau provenite din industria alimentară.

- **Diseminarea rezultatelor.** În cadrul cercetării doctorale, rezultatele obținute au fost diseminate prin publicarea a **8 lucrări științifice** (3 indexate BDI și 5 indexate ISI) cât și prin participarea la **6 conferințe internaționale** și **3 Workshopuri naționale**.

7.4. Propuneri și recomandări

- Având la bază informațiile obținute în cadrul cercetării doctorale de față, se recomandă analiza pe viitor a unor sisteme biotehnologice de producere a hidrogenului, proiectate în serie. În treapta inițială se dezvoltă o fermentație termofilă (50-55°C), cu o producere a biohidrogenului de 25-30%. În treapta următoare se realizează o fermentație mezofilă (28-35°C), unde v-a fi fermentat în continuare efluentul rezultat din prima treaptă. Această temperatură de 28°C s-a dovedit prin cercetări experimentale, ca fiind avantajos sub aspect economic, datorită faptului că la o creștere cu 1°C, consumul energetic poate depăși capacitatea de generare a energiei. Fermentația termofilă realizată în prima treaptă, necesită încălzirea bioreactoarelor (digestoarelor), însă treapta a doua, mezofilă, nu necesită un consum energetic pentru ridicarea temperaturii apei uzate fermentate deoarece aceasta se răcește la 28°C, temperatură benefică valorificării maselor organice, sub forma biohidrogenului. Cercetările doctorale în acest sens au fost realizate la temperaturi mezofile diferite, cuprinse între 25°C și 38°C. Aceste investigații au testat capacitatea de separare a hidrogenului și efectul de temperatură asupra acestui sistem tehnologic.

- Această tehnologie bioenergetică se poate aplica cu succes la epurarea apelor reziduale menajere provenite din localitățile rurale și urbane, cu recomandarea de a utiliza o stație de epurare centralizată. În plus, această tehnologie bioenergetică se poate aplica cu succes în mod deosebit pentru epurarea apelor reziduale provenite din industria alimentară (fabrici de bere, zahăr, conserve, etc.), datorită conținutului foarte ridicat de materii organice prezente. Cercetările în domeniul producerii biohidrogenului în digestoare cu trepte diferite de temperatură (dispuse în serie sau paralel), impun o cercetare multidisciplinară, realizată de colective complexe, specifice.

- De asemenea, este importantă stabilirea raportului C/N din compoziția apelor de alimentare, corectarea făcându-se prin adăugarea suplimentară de culturi modificări

genetice (soia, sfecla de zahăr, salcia energetică), obținute din utilizarea nămolului deshidratat provenit de la stațiile de epurare a apelor reziduale. Deasemenea, în viitor, se recomandă extinderea cercetărilor pe sisteme continue de producere a biohidrogenului, la scară pilot, utilizând ca substrat fermentescibil diferite tipuri de ape uzate.

- În plus, se recomandă experimentarea unor sisteme hibride de producere a biohidrogenului, în două etape. O primă etapă reprezentând o fermentare anaerobă cu producere a biohidrogenului, urmată de o fermentare în fotobioreactoare a efluentului rezultat din prima etapă. Astfel, compușii organici simpli împreună cu produșii metabolici rezultați în urma fermentării în absența luminii în primul bioreactor, pot fi degradați în continuare în cel de-al doilea fotobioreactor, cu producție paralelă de biohidrogen. Astfel se realizează o epurare avansată a apelor reziduale în paralel cu o producție mai mare de biohidrogen.

- O altă direcție de cercetare recomandată se referă la cercetări direcționate spre dezvoltarea unor pile de combustie capabile să utilizeze direct biohidrogenul produs în urma degradării fermentative a apelor uzate, generând electricitate. În plus, se recomandă dezvoltarea unor celule de combustie microbiene, capabile de conversia directă a efluentului rezultat în urma fermentației deșeurilor organice, în H_2 , maximizând astfel rata de conversie a acestora în energie.

Anexe

Anexa 1. Valorile limită corespunzătoare fiecărei clase de calitate a apelor de suprafață

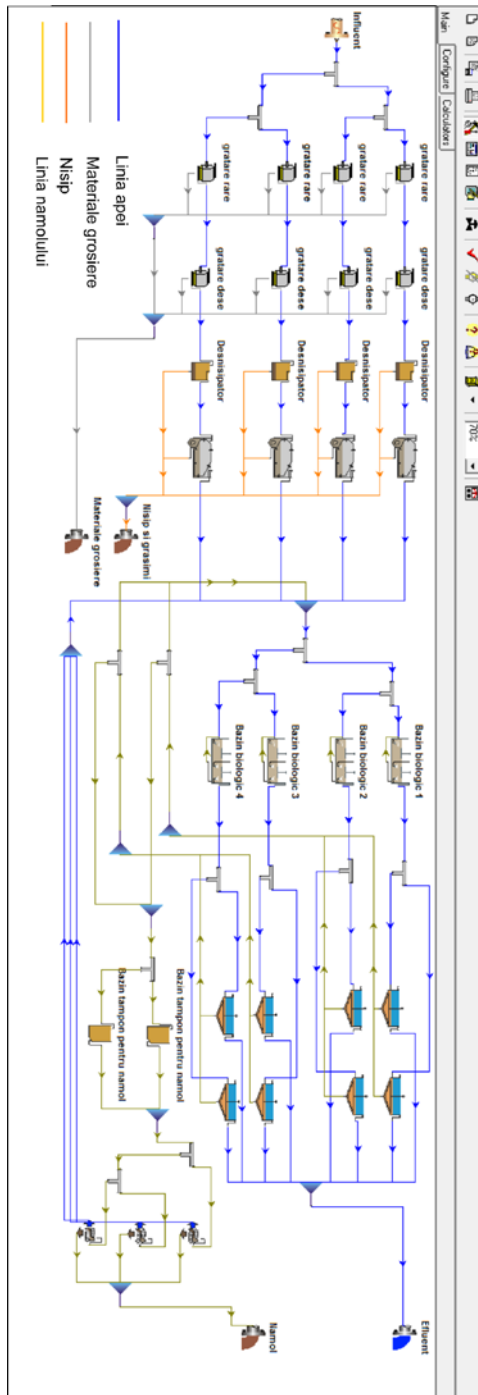
Valori limită pe clase	U.M.	Clasa de calitate				
		I	II	III	IV	V
Indicatori fizici						
Temperatura	°C	Nu se normează				
pH	-	Cuprins între 6,5 - 8,5				
Regimul oxigenului						
Oxigen dizolvat	mg/l	7	6	5	4	<4
CBO5	mg/l	3	5	10	25	>25
CCO-Mn	mg/l	5	10	20	50	>50
CCO-Cr	mg/l	10	25	50	125	>125
Nutrienți						
Amoniu <i>N-NH4+</i>	mg/l	0,2	0,3	0,6	1,5	> 1,5
Azotiți	mg/l	0,01	0,06	0,12	0,3	>0,3
Azotați	mg/l	1	3	6	15	>15
Azot total, N	mg/l	1,5	4	8	20	>20
Ortofosfați P-PO43-	mg/l	0,05	0,1	0,2	0,5	>0,5
Fosfor total P	mg/l	0,1	0,2	0,4	1	> 1
Clorofila „a”	μg/l	25	50	100	250	>250
Ioni generali, salinitate						
Reziduu filtrabil uscat la 105°	mg/l	fond	500	1000	1300	1300
Sodiu Na+	mg/l	fond	50	100	200	>300
Calciu Ca2+	mg/l	75	150	200	300	>300
Magneziu Mg 2+	mg/l	fond	25	50	100	>100
Fier total	mg/l	fond	0,1	0,3	1,0	> 1,0
Mangan total	mg/l	fond	0,05	0,1	0,3	>0,3
Cloruri Cl-	mg/l	fond	100	250	300	>300
Sulfați SO42-	mg/l	80	150	250	300	>300
Metale (fracțiune dizolvată)						

Zinc Zn^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	5	10	25	>25
Cupru Cu^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	5	4	8	>8
Crom total Cr^{3+}, Cr^{6+}	$\mu\text{g/l}$	fond	2	4	10	> 10
Plumb Pb^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	1	2	5	>5
Cadmiu Cd^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	0,1	0,2	0,5	>0,5
Mercur Hg^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	0,1	0,15	0,3	>0,3
Nichel Ni^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	1,0	2,0	5,0	>5,0
Metale (concentrație totală)						
Zinc Zn^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	100	200	500	>500
Cupru Cu^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	20	40	100	>100
Crom total $Cr^{3+}+Cr^{6+}$	$\mu\text{g/l}$	fond	50	100	250	>250
Plumb Pb^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	5	10	25	>25
Cadmiu Cd^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	1	2	5	>5,0
Mercur Hg^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	0,1	0,2	0,5	>0,5
Nichel Ni^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	50	100	250	>250
Arsen As^{2+}	$\mu\text{g/l}$	fond	5	10	25	>25
Substanțe toxice organice						
Fenoli	$\mu\text{g/l}$	fond	1	20	50	>50
Detergenți anionici activi	$\mu\text{g/l}$	fond	500	750	1000	>1000
AOX	$\mu\text{g/l}$	10	50	100	250	>250
Hidrocarburi petroliere	$\mu\text{g/l}$	fond	100	200	500	>500
Lindan (γ- HCH)	$\mu\text{g/l}$	0,05	0,1	0,2	0,5	>0,5
pp1 DDT	$\mu\text{g/l}$	0,001	0,01	0,02	0,05	>0,05

Anexa 2. Caracteristicile apei uzate menajere la intrarea in stația de epurare a orașului Timișoara.

Per.	T aer (°C)		T apa (°C)		pH		MS (mg/L)		CBO5 (mg/L)		CCOCr (mg/L)		N total (mg/L)		P total (mg/L)	
	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
Ian.	-11	6	13	18	7.3	7.9	48	324	35	19.0	195	364	19.85	41.45	1.64	3.76
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	0.142057143		13.66666667		7.6		186		112.5		279.5		30.655		2.7	
Feb.	-23	4	8	13	7	7.9	90	275	65	18.5	64	331	20.84	51.5	1.52	2.97
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	-7.696428571		10.20214286		7.45		182.5		125		197.5		35.17		2.345	
Mar.	-4	8	10.5	18	7.3	7.9	57	175	55	22.0	113	360	29.5	35.6	1.52	4.19
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	2.681818182		13.62272727		7.6		116		137.5		236.5		32.55		3.855	
Apr.	-2	12	15	18	7.4	7.6	57	443	55	22.5	68	654	19.6	42.6	1.1	5
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	7.722222222		16.5		7.5		250		140		361		31.1		3.05	
Mai	6	18	17	23	7.4	7.7	76	425	65	20.5	77.4	333	24.76	47.2	2.2	3.9
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	13.5		18.86363636		7.55		290.5		135		205.2		35.98		3.05	
Iun.	10	25	19	23	7.3	7.9	64	374	60	24.5	89	256	24.76	47.2	1.5	4.3
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	17.9		21.6		7.6		21.9		152.5		172.5		35.98		2.9	
Iul.	12	25	19	25.6	7.2	7.9	67	326	60	15.5	110	323	24.8	34.6	1.3	3.9
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	19.72727273		24.33181818		7.55		196.5		107.5		216.5		29.7		2.6	
Aug.	11	24	20	25.8	7	7.6	77	475	60	15.5	135	350	24.8	34.6	2.24	4.17
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	17.27272727		22.77272727		7.3		276		107.5		242.5		29.7		3.205	
Sept.	7	18	18	22	7.3	8	72	324	60	13.5	162	378	31.4	38.7	2.8	4.2
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	15.15		20.3		7.65		198		97.5		270		35.05		3.5	
Oct.	0	19	17	23	7.4	7.9	73	407	80	16.0	170	460	30.2	38.5	2.3	4.1
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	8.260869565		19.1173913		7.65		240		120		315		34.35		3.2	
Nov.	1	12	18	20	7.3	7.9	59	190	50	14.5	64	476	30.4	36.2	2.5	4.3
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	5.857142857		18.45238095		7.6		124.5		97.5		270		33.3		3.4	
Dec.	-18	5	14	18	7	7.8	88	265	80	17.4	114	362	23.4	46.4	1.65	4.2
	media		media		media		media		media		media		media		media	
	-3.176470588		16.11764706		7.4		176.5		127		239		34.9		2.925	

Anexa 3. Caracteristicile apei uzate menajere la legna din stația de epurare a onguiz Timișoara.																
Per.	T aer (°C)		T apa (°C)		pH		MS (mg/L)		CBOD ₅ (mg/L)		CCO _{5r} (mg/L)		N total (mg/L)		P total (mg/L)	
Ian.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	-11	6	13	18	7	7.9	5	30	1	5	28	107	5.3	9.3	0.23	1.7
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Feb.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	-23	4	8	13	6.9	8	1	139	1	14	3.1	127	2.69	10.4	0.67	2.95
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Mar.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	-4	8	10.5	17	7	7.9	4	27	1	7	9	104	4.9	10.3	0.19	1.26
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Apr.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	-2	12	13	16.3	7	8	4	17	2	11	13	96	4.6	10.5	0.07	2.81
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Mai	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	6	18	16.1	21	7.1	8.4	5	32	1	8	6	109	6.7	9.4	0.44	1.9
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Iun.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	10	25	19	23.6	7.4	8.1	3	21	1	9	16	48	6.92	8.6	0.2	1.8
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Iul.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	12	25	19	25.6	7.1	8.1	3	24	1	6	12	104	3.51	6.18	0.58	2.47
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Aug.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	11	24	21	25.8	7	8.1	3	43	1	11	16	73	5.2	9.75	0.7	3.7
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Sept.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	7	18	21.9	24.9	6.9	7.9	2	20	1	13	14	34	5.17	8.6	0.75	2.99
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Oct.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	0	19	17.5	24	7	7.9	4	58	1	19	8	60	4.77	9.05	0.16	2.63
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Nov.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	1	12	16.9	19.8	7	7.8	3	13	1	11	9	83	7.3	9.12	0.6	2.02
	media		media		media		media		media		media		media		media	
Dec.	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim	minim	maxim
	-18	5	14.1	18	6.9	7.6	4	12	2	8	11	36	3.44	9.1	0.73	1.96
	media		media		media		media		media		media		media		media	



Anexa 4. Proiectarea configurației tehnologice a procesului de epurare a apei uzate a orașului Timișoara, utilizând programul BioWin.

Bibliografie

- [1] Adams, M. W. W., Stiefel, E. I. (1998). "*Biological Hydrogen Production: Not So Elementary.*" *Science* 282(5395): 1842-1843.
- [2] Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., Domínguez-Espinosa, R. (2004). "*Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater.*" *Trends in Biotechnology* 22(9): 477-485.
- [3] Antony, J. (2006). "*Taguchi or classical design of experiments: a perspective from a practitioner.*" *Sensor Review* 26(3): 227-230.
- [4] Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K. (2009). "*Microbial culture selection for biohydrogen production from waste ground wheat by dark fermentation.*" *International Journal of Hydrogen Energy* 34(5): 2195-2200.
- [5] Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., Oztekin, R. (2008). "*Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: Effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate.*" *International Journal of Hydrogen Energy* 33(7): 1813-1819.
- [6] Armfield (2006). *W 8 anaerobic digester*. Instruction manual.
- [7] Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Lövitusz, É., Bélafi-Bakó, K. (2011). "*Application of Plackett–Burman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E. coli* (XL1-BLUE).*" *International Journal of Hydrogen Energy* 36(21): 13949-13954.
- [8] Balat, H., Kirtay, E. (2010). "*Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects.*" *International Journal of Hydrogen Energy* 35(14): 7416-7426.
- [9] Barker, D. J., Stuckey, D. C. (1999). "*A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems.*" *Water Research* 33(14): 3063-3082.
- [10] Barreto, L., Makihira, A., Riahi, K. (2003). "*The hydrogen economy in the 21st century: a sustainable development scenario.*" *International Journal of Hydrogen Energy* 28(3): 267-284.
- [11] Baston, O., NEAGU, C. (2013). "*Establishing the optimal conditions for fructose production from chicory inulin.*" *Romanian Biotechnological Letters* 18(3): 8263-8270.
- [12] **Boboescu, I. Z.**, Gherman, V., Mirel, I., Maróti, G., Negrea, A., Ciopec, M., Motoc, M. (2013). "*Development of a two-step fermentative biohydrogen production process using selectively enriched microbial populations as inoculum.*" *Chemistry magazine* 64(8): 919-926.
- [13] **Boboescu, I. Z.**, Gherman, V. D., Ilie, M., Mirel, I., Vintila, T., Maroti, G. (2013). "*Exploitation of experimental design methods and mathematical modeling for improving fermentative biohydrogen production processes*" *Rom. Biotech. Lett* In press.
- [14] **Boboescu, I. Z.**, Gherman, V. D., Mirel, I., Pap, B., Tengölics, R., Rákhely, G., Kovács, K. L., Kondorosi, É., Maróti, G. (2013). "*Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment based on the selective enrichment of the fermentation ecosystem.*" *International Journal of Hydrogen Energy*.

- [15] **Boboescu, I. Z.**, Mirel, I., Gherman, V. (2011). "Status of fermentative biohydrogen production. A review." *Buletinul Științific al Universității "POLITEHNICA" din Timișoara* 56(70): 117-122.
- [16] Boni, M. R., Scaffoni, S., Tuccinardi, L., Viotti, P. (2013). "Development and calibration of a model for biohydrogen production from organic waste." *Waste Management* 33(5): 1128-1135.
- [17] Box, G. E., Wilson, K. (1951). "On the experimental attainment of optimum conditions." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13(1): 1-45.
- [18] Cai, J., Wu, Q., Wang, G., Deng, C. (2013). "Fermentative hydrogen production by a new mesophilic bacterium *Clostridium* sp. 6A-5 isolated from the sludge of a sugar mill." *Renewable Energy* 59: 202-209.
- [19] Chang, F.-Y., Lin, C.-Y. (2004). "Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor." *International Journal of Hydrogen Energy* 29(1): 33-39.
- [20] Cheong, D.-Y., Hansen, C. (2006). "Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(4): 635-643.
- [21] Chong, M.-L., Sabaratnam, V., Shirai, Y., Hassan, M. A. (2009). "Biohydrogen production from biomass and industrial wastes by dark fermentation." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(8): 3277-3287.
- [22] Chornet, E., Czernik, S. (2002). "Renewable fuels: Harnessing hydrogen." *Nature* 418(6901): 928-929.
- [23] Chou, C.-H., Wang, C.-W., Huang, C.-C., Lay, J.-J. (2008). "Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(5): 1550-1558.
- [24] Cortright, R. D., Davda, R. R., Dumesic, J. A. (2002). "Hydrogen from catalytic reforming of biomass-derived hydrocarbons in liquid water." *Nature* 418(6901): 964-967.
- [25] Daniela-Cornelia, P. A. (2005). *Contributii la studiul proceselor de fermentare anaeroba in vederea obtinerii de biogaz*. Inginerie civila. Timisoara, "Politehnica" din Timisoara. Teza doctorat: 167.
- [26] Das, D., Veziroglu, T. N. (2008). "Advances in biological hydrogen production processes." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(21): 6046-6057.
- [27] Das, D., Veziroglu, T. N. (2001). "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature." *International Journal of Hydrogen Energy* 26(1): 13-28.
- [28] Dima, M. (1984). *Instalatii de producere a biogazului. Dezvoltarea productiei de energie*. I. Ursu. Cluj-Napoca, Editura Dacia. 3: 141-166.
- [29] Dima, M. (1998). *Epurarea apelor uzate urbane*. Iasi.
- [30] Dima, M., Meglei, V., Dima, B., Badea, C. (2002). *Bazele epurarii biologice a apelor uzate*. Iasi, Editura Tehnopress.
- [31] Dincer, I. (2002). "Technical, environmental and exergetic aspects of hydrogen energy systems." *International Journal of Hydrogen Energy* 27(3): 265-285.
- [32] Espinoza-Escalante, F. M., Pelayo-Ortiz, C., Gutiérrez-Pulido, H., González-Álvarez, V., Alcaraz-González, V., Borjes, A. (2008). "Multiple response optimization analysis for pretreatments of Tequila's stillages for VFAs and hydrogen production." *Bioresource Technology* 99(13): 5822-5829.

- [33] Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., Nicolet, Y. (2007). "Structure/Function Relationships of [NiFe]- and [FeFe]-Hydrogenases." *Chemical Reviews* 107(10): 4273-4303.
- [34] Frascari, D., Cappelletti, M., Mendes, J. D. S., Alberini, A., Scimonelli, F., Manfreda, C., Longanesi, L., Zannoni, D., Pinelli, D., Fedi, S. (2013). "A kinetic study of biohydrogen production from glucose, molasses and cheese whey by suspended and attached cells of *Thermotoga neapolitana*." *Bioresource Technology* 147: 553-561.
- [35] Gadhamshetty, V., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., Johnson, D. C. (2010). "Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(2): 479-490.
- [36] Gallert, C., Henning, A., Winter, J. (2003). "Scale-up of anaerobic digestion of the biowaste fraction from domestic wastes." *Water Research* 37(6): 1433-1441.
- [37] Gallert, C., Winter, J. (2008). *Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems*. Biotechnology Set, Wiley-VCH Verlag GmbH: 17-53.
- [38] Gherman, V. D., **Boboescu, I. Z.**, Pap, B., Kondrosi, É., Gherman, G., Maróti, G. (2013). "An acidophilic bacterial-archaeal-fungal ecosystem linked to formation of ferruginous crusts and stalactites." *Geomicrobiology Journal*.
- [39] Ghosh, D., Hallenbeck, P. C. (2010). "Response surface methodology for process parameter optimization of hydrogen yield by the metabolically engineered strain *Escherichia coli* DJT135." *Bioresource Technology* 101(6): 1820-1825.
- [40] Giurconiu, M., Mirel, I., Carabet, A., Chivereanu, D., Florescu, C., Staniloiu, C. (2002). *Constructii si instalatii hidroedilitare*. Timisoara, Editura de Vest.
- [41] Gray, C. T., Gest, H. (1965). "Biological Formation of Molecular Hydrogen: A "hydrogen valve" facilitates regulation of anaerobic energy metabolism in many microorganisms." *Science* 148(3667): 186-192.
- [42] Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., Steyer, J.-P. (2010). "Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: A review." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(19): 10660-10673.
- [43] Hafez, H., Elbeshbishy, E., Nakhla, G., El Nagggar, M. H. (2011). "Simulating the impact of suppression of methanogenesis in continuous flow biohydrogen reactors." *International Journal of Hydrogen Energy* 36(10): 5885-5894.
- [44] Hallenbeck, P. C. (2005). "Fundamentals of the fermentative production of hydrogen." *Water Sci Technol* 52(1-2): 21-29.
- [45] Hallenbeck, P. C., Abo-Hashesh, M., Ghosh, D. (2012). "Strategies for improving biological hydrogen production." *Bioresour Technol* 110: 1-9.
- [46] Hallenbeck, P. C., Benemann, J. R. (2002). "Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes." *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12): 1185-1193.
- [47] Hallenbeck, P. C., Ghosh, D. (2009). "Advances in fermentative biohydrogen production: the way forward?" *Trends in Biotechnology* 27(5): 287-297.
- [48] Hamilton, C., Hilgsmann, S., Beckers, L., Masset, J., Wilmotte, A., Thonart, P. (2010). "Optimization of culture conditions for biological hydrogen production by *Citrobacter freundii* CWBI952 in batch, sequenced-batch and semicontinuous operating mode." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(3): 1089-1098.

- [49] Han, S.-K., Shin, H.-S. (2004). "Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste." *International Journal of Hydrogen Energy* 29(6): 569-577.
- [50] Han, S.-K., Shin, H.-S. (2004). "Performance of an Innovative Two-Stage Process Converting Food Waste to Hydrogen and Methane." *Journal of the Air & Waste Management Association* 54(2): 242-249.
- [51] Handelsman, J. (2004). "Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68(4): 669-685.
- [52] Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., Hussy, I. (2002). "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimisation." *International Journal of Hydrogen Energy* 27(11-12): 1339-1347.
- [53] Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. (2007). "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress." *International Journal of Hydrogen Energy* 32(2): 172-184.
- [54] Hedderich, R., Forzi, L. (2005). "Energy-Converting [NiFe] Hydrogenases: More than Just H_2 Activation." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 10(2-4): 92-104.
- [55] Holladay, J. D., Hu, J., King, D. L., Wang, Y. (2009). "An overview of hydrogen production technologies." *Catalysis Today* 139(4): 244-260.
- [56] Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L. (2003). "Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora." *Biotechnology and Bioengineering* 84(6): 619-626.
- [57] I, M., Ionescu, G., Nacu, A., Mitrașcă, M. (1999). *Consideration regarding the wastewater biological treatment*. C. Internațională. Debrecen
- [58] Jurcoane, S., Sasarman, E., Rosu, A., Banu, A., Lupescu, I., Tamba, B. R., Radoi, F. *Tratat de biotehnologie*. Timisoara.
- [59] Kalogo, Y., Bagley, D. M. (2008). "Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source." *Bioresource Technology* 99(3): 540-546.
- [60] Kapdan, I. K., Kargi, F. (2006). "Bio-hydrogen production from waste materials." *Enzyme and Microbial Technology* 38(5): 569-582.
- [61] Kennedy, M., Krouse, D. (1999). "Strategies for improving fermentation medium performance: a review." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23(6): 456-475.
- [62] Khanna, N., Kumar, K., Todi, S., Das, D. (2012). "Characteristics of cured and wild strains of *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 for the improvement of biohydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy* 37(16): 11666-11676.
- [63] Khin, T., Annachhatre, A. P. (2004). "Novel microbial nitrogen removal processes." *Biotechnology Advances* 22(7): 519-532.
- [64] Kraemer, J., Bagley, D. (2007). "Improving the yield from fermentative hydrogen production." *Biotechnology Letters* 29(5): 685-695.
- [65] Legea 265/2006 privind protecția mediului înconjurător.
- [66] Legea "apelor nr.107/ 1996 completată și modificată."
- [67] Lettinga, G. (1995). "Anaerobic digestion and wastewater treatment systems." *Antonie van Leeuwenhoek* 67(1): 3-28.
- [68] Levin, D. B., Chahine, R. (2010). "Challenges for renewable hydrogen production from biomass." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(10): 4962-4969.

- [69] Levin, D. B., Pitt, L., Love, M. (2004). "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application." *International Journal of Hydrogen Energy* 29(2): 173-185.
- [70] Li, C., Fang, H. H. P. (2007). "Fermentative Hydrogen Production From Wastewater and Solid Wastes by Mixed Cultures." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37(1): 1-39.
- [71] Lin, P.-Y., Whang, L.-M., Wu, Y.-R., Ren, W.-J., Hsiao, C.-J., Li, S.-L., Chang, J.-S. (2007). "Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: Metabolic study and mathematical model simulation." *International Journal of Hydrogen Energy* 32(12): 1728-1735.
- [72] Liu, X., Li, R., Ji, M., Han, L. (2013). "Hydrogen and methane production by co-digestion of waste activated sludge and food waste in the two-stage fermentation process: Substrate conversion and energy yield." *Bioresource Technology* 146: 317-323.
- [73] Liu, X., Ren, N., Song, F., Yang, C., Wang, A. (2008). "Recent advances in fermentative biohydrogen production." *Progress in Natural Science* 18(3): 253-258.
- [74] Long, C., Cui, J., Liu, Z., Liu, Y., Long, M., Hu, Z. (2010). "Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(13): 6657-6664.
- [75] Maeda, T., Sanchez-Torres, V., Wood, T. (2007). "Enhanced hydrogen production from glucose by metabolically engineered *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(4): 879-890.
- [76] Massanet-Nicolau, J., Dinsdale, R., Guwy, A. (2008). "Hydrogen production from sewage sludge using mixed microflora inoculum: Effect of pH and enzymatic pretreatment." *Bioresource Technology* 99(14): 6325-6331.
- [77] Mata-Alvarez, J., Macé, S., Labrés, P. (2000). "Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives." *Bioresource Technology* 74(1): 3-16.
- [78] Mathews, J., Wang, G. (2009). "Metabolic pathway engineering for enhanced biohydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(17): 7404-7416.
- [79] Meher Kotay, S., Das, D. (2008). "Biohydrogen as a renewable energy resource—Prospects and potentials." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(1): 258-263.
- [80] Meyer, J. (2007). "[FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(9): 1063-1084.
- [81] Mirel, I. (1997). *Biogazul sursa de energie pentru consumatorii din mediul rural*. Instalatii pentru constructii si confort ambiental, Timisoara.
- [82] Mirel, I. (1997). *Biogazul sursa de energie pentru gospodariile individuale din mediul rural*. Instalatii pentru constructii si confort ambiental, Timisoara.
- [83] Mirel, I. (2007). *Biogazul, resursă neconvențională de energie*. Z. A. T. Cercetări în domeniul energiilor neconvenționale în zona de Vest a României. Timisoara.
- [84] Mirel, I. (2007). "The optimization of the plants exploitation for producing and using biogas." *Buletinul științific al UP Timișoara, seria Mecanică* 52 (66): 32-38.
- [85] Mirel, I., Chivoreanu, D., Carabet, A. (1998). *Construction and instalation with biogas for individual households and dwelling quarters*. TEMPO-HP, Cacak.

- [86] Mirel, I., Cret, Z., Mitrașcă, M. (2000). "Used waters with high organic charge." *Analele Universității din Oradea* 5(2): 7-14.
- [87] Mirel, I., Damian, C., Bone, S. T., **Boboescu, I. Z.** (2010). "Tehnologii bioenergetice pentru epurarea avansată a apelor uzate menajere provenite de pe vatra centrelor populate." *Provocările noilor tehnologii în managementul apei* 1(1): 26-40.
- [88] Mirel, I., Florescu, C., Staniloiu, C., Gherman, v., **Boboescu, I. Z.** (2013). *Producerea și valorificarea biogazului în fermele agrozootehnice de tip familial. Instalatii pentru constructii și confort ambiental*, Timisoara.
- [89] Mirel, I., Florescu, C., Staniloiu, C., Isacu, M. (2012). "Evoluția tehnologiilor de epurare a apelor reziduale provenite de pe vatra centrelor populate." *ARA* 1(1): 78-88.
- [90] Mirel, I., Ghergheș, C., Barabas, K., Ghergheș, V. (2004). *Urban wastewater sludge neutralization and exploitation*. MicroCAD International Scientific Conference Miskolc.
- [91] Mirel, I., Ghergheș, V., Popescu, D., Ghergheș, C., Pantea, E. (2004). *Installation to produce and utilize biogas in countryside*. MICROCAD 2004 International Scientific Conference, Miskolc
- [92] Mirel, I., Man, E., Chivereanu, D., Carabeț, A. (1998). "Instalații de biogaz pentru cvartale de locuințe." *Analele Universității din Oradea* 1(1): 3-10.
- [93] Mirel, I., Man, E., Popescu, D., Barabas, K. (2006). "Biomass Sources of Energy for Rural House-Keeping." *Scientific Bulletin of the „Politehnica” University of Timisoara* 51(65): 347-352.
- [94] Mirel, I., Nacu, A. (1999). "Considerations on wastewater with high level of organic matter treatment." *Studii și cercetări științifice, Biologie* 1(4): 327-330
- [95] Mirel, I., Pantea, E., Pop, A., Gherman, V. (2007). "Consideratii privind obtinerea biohidrogenului din ape uzate cu incarcare organica mare." *Revista AGIR* 3(4): 12-16
- [96] Mirel, I., Pantea, E., Romocea, T., Mitrașcă, M. (2007). *Westwater treatment technologies of beer industries of Romania* Joint international conference on long-term experiments, agricultural research and natural resources, Debrecen-Nyirlugos.
- [97] Mirel, I., Popescu, D. (1998). *Valorificarea energetica a reziduurilor organice pentru ridicarea gradului de confort și de protecție a mediului inconjurator în mediul rural*. Instalatii pentru constructii și confort ambiental, Timisoara.
- [98] Mirel, I., Popescu, D., Bănățean, G., Varga, M. (2000). *Biogas - how to produce and utilize in industrial equipment*. Simpozionului Internațional "Biogazul"-oportunități și soluții.
- [99] Mirel, I., Popescu, D., Klein, L. (1997). "Consideratii privind productia și utilizarea biogazului în instalatii de tip gospodaresc." *Mediul și industria* 1(1).
- [100] Mirel, I., Staniloiu, C., Florescu, C. (2001). *Consideratii privind tratarea și valorificarea namolurilor rezultate de la statiile de epurare orasenesti*. Imbunatatirile funciare între prezent și viitor, Timisoara.
- [101] Mirel I., M. E., Chivereanu D., Carabeț A., (1996). "Biogas Installations in Romania." *Buletinul științific al Universității "Politehnica" din Timișoara. Facultatea de Hidrotehnică* 1(1): 33-38.
- [102] Mohan, S. V., Raghavulu, S. V., Mohanakrishna, G., Srikanth, S., Sarma, P. N. (2009). "Optimization and evaluation of fermentative hydrogen production and wastewater treatment processes using data enveloping analysis (DEA)

- and Taguchi design of experimental (DOE) methodology." International Journal of Hydrogen Energy 34(1): 216-226.
- [103] Mu, Y., Wang, G., Yu, H.-Q. (2006). "Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures." Bioresource Technology 97(11): 1302-1307.
- [104] Mu, Y., Yu, H.-Q., Wang, G. (2007). "A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process." Water Research 41(5): 1152-1160.
- [105] Mullai, P., Yogeswari, M., Sridevi, K. (2013). "Optimisation and enhancement of biohydrogen production using nickel nanoparticles-A novel approach." Bioresource Technology.
- [106] Nath, K., Das, D. (2011). "Modeling and optimization of fermentative hydrogen production." Bioresource Technology 102(18): 8569-8581.
- [107] Nath, K., Das, D. (2011). "Modeling and optimization of fermentative hydrogen production." Bioresour Technol 102(18): 8569-8581.
- [108] Nath, K., Muthukumar, M., Kumar, A., Das, D. (2008). "Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen." International Journal of Hydrogen Energy 33(4): 1195-1203.
- [109] Neagu, C., Borda, D. (2013). "Modelling the growth of *Fusarium graminearum* on barley and wheat media extract." Rom. Biotech. Lett 18(4): 8489 - 8498
- [110] Negulescu, M. (1978). *Epurarea apelor uzate orășenești*. București.
- [111] Nishio, N., Nakashimada, Y. (2004). High Rate Production of Hydrogen/Methane from Various Substrates and Wastes. Recent Progress of Biochemical and Biomedical Engineering in Japan I, Springer Berlin Heidelberg. 90: 63-87.
- [112] Ntaikou, I., Gavala, H., Kornaros, M., Lyberatos, G. (2008). "Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*." International Journal of Hydrogen Energy 33(4): 1153-1163.
- [113] Ntaikou, I., Gavala, H. N., Lyberatos, G. (2010). "Application of a modified Anaerobic Digestion Model 1 version for fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract by *Ruminococcus albus*." International Journal of Hydrogen Energy 35(8): 3423-3432.
- [114] NTPA 001/2005 - Normativ privind stabilirea limitelor de încărcare cu poluanți a apelor uzate evacuate în resursele de apă, Monitorul Oficial al României.
- [115] NTPA 002/2002 - Normativ privind stabilirea limitelor de încărcare cu poluanți a apelor uzate evacuate în resursele de apă.
- [116] O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasingkha, N., Dhamwichukorn, S., Birkeland, N.-K. (2008). "Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by *Thermoanaerobacterium*-rich sludge." International Journal of Hydrogen Energy 33(4): 1221-1231.
- [117] Ognean, T., Vaicum, L. M. (1987). *Modelarea proceselor de epurare biologică*. București.
- [118] Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., Noike, T. (2000). "Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes." Water Sci Technol 41(3): 25-32.
- [119] Olin, B. (1998). "Design of Experiments in Quality Engineering." Technometrics 40(4): 350-350.
- [120] Pan, C. M., Fan, Y. T., Xing, Y., Hou, H. W., Zhang, M. L. (2008). "Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. *Fanp2*." Bioresource Technology 99(8): 3146-3154.

- [121] Pantea, E. (2010). *Studiul proceselor de epurare a apelor reziduale provenite de la unitățile alimentare. Teză de doctorat.*
- [122] Pașca, D., Bularda, M. D.-. (2002). *Bazele microbiologice de producere a biogazului.* Cluj-Napoca.
- [123] Pinzi, S., Leiva, D., Arzamendi, G., Gandia, L., Dorado, M. (2011). "Multiple response optimization of vegetable oils fatty acid composition to improve biodiesel physical properties." *Bioresource Technology* 102(15): 7280-7288.
- [124] Popescu, D. C. (2006). *Contribuții la studiul proceselor de fermentare anaerobă în vederea obținerii de biogaz - teza de doctorat.*
- [125] Prakasham, R. S., Sathish, T., Brahmaiah, P. (2010). "Biohydrogen production process optimization using anaerobic mixed consortia: a prelude study for use of agro-industrial material hydrolysate as substrate." *Bioresour Technol* 101(14): 5708-5711.
- [126] Presura, A. (2013). *Contributii teoretice si experimentale asupra modalitatilor de eficientizare energetica a statiei de epurare a apelor uzate prin utilizarea surselor neconventionale.* Inginerie civila. Bucuresti, Universitatea Politehnica din Bucuresti. Teza doctorat.
- [127] Ray, S., Reaume, S. J., Lalman, J. A. (2010). "Developing a statistical model to predict hydrogen production by a mixed anaerobic mesophilic culture." *International Journal of Hydrogen Energy* 35(11): 5332-5342.
- [128] Ren, J., Gao, S., Tan, S., Dong, L. (2013). "Prediction of the yield of biohydrogen under scanty data conditions based on GM (1, $i> N$)." *International Journal of Hydrogen Energy* 38(30): 13198-13203.
- [129] Ren, J., Gao, S., Tan, S., Dong, L. (2013). "Prediction of the yield of biohydrogen under scanty data conditions based on GM(1,N)." *International Journal of Hydrogen Energy* 38(30): 13198-13203.
- [130] Rittmann, B. E., Krajmalnik-Brown, R., Halden, R. U. (2008). "Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy." *Nat Rev Micro* 6(8): 604-612.
- [131] Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M., Simonet, P. (2003). "Extraction of DNA from soil." *European Journal of Soil Biology* 39(4): 183-190.
- [132] Robescu, D. (2009). *Modelarea proceselor biologice de epurare a apelor uzate.* Bucuresti, Editura Politehnica Press.
- [133] Robescu, D., Lanyi, S., Verestoy, A., Robescu, D. (2004). *Modelarea si simularea proceselor de epurare* Bucuresti, Editura Tehnica.
- [134] Robescu, D., Robescu, D., Lanyi, S., Constantinescu, I. (2000). *Tehnologii, instalatii si echipamente pentru epurarea apei.* Bucuresti, Editura Tehnica.
- [135] Rogoveanu-Radosavlevici (2013). *Cercetari teoretice si experimentale asupra epurarii in regim anaerob a apelor uzate.* Inginerie civila. Bucuresti, Universitatea politehnica din Bucuresti. Teza doctorat.
- [136] Rupprecht, J., Hankamer, B., Mussgnug, J. H., Ananyev, G., Dismukes, C., Kruse, O. (2006). "Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology* 72(3): 442-449.
- [137] Saxena, R. C., Seal, D., Kumar, S., Goyal, H. B. (2008). "Thermo-chemical routes for hydrogen rich gas from biomass: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12(7): 1909-1927.
- [138] Segneanu, E. (2006). *Modernizarea statiilor de epurare.* Inginerie civila. Timisoara, "Politehnica" din Timisoara. Teza doctorat: 195.

- [139] Sharma, P., Capalash, N., Kaur, J. (2007). "An improved method for single step purification of metagenomic DNA." *Molecular Biotechnology* 36(1): 61-63.
- [140] Silva, P. J., van den Ban, E. C. D., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F. T., Hagen, W. R. (2000). "Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*." *European Journal of Biochemistry* 267(22): 6541-6551.
- [141] Venkata Mohan, S., Agarwal, L., Mohanakrishna, G., Srikanth, S., Kapley, A., Purohit, H. J., Sarma, P. N. (2011). "Firmicutes with iron dependent hydrogenase drive hydrogen production in anaerobic bioreactor using distillery wastewater." *International Journal of Hydrogen Energy* 36(14): 8234-8242.
- [142] Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V., Sarma, P. N. (2008). "Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate." *Bioresource Technology* 99(1): 59-67.
- [143] Venkata Mohan, S., Vijaya Bhaskar, Y., Murali Krishna, P., Chandrasekhara Rao, N., Lalit Babu, V., Sarma, P. N. (2007). "Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition." *International Journal of Hydrogen Energy* 32(13): 2286-2295.
- [144] Vignais, P. M. (2008). "Hydrogenases and H(+)-reduction in primary energy conservation." *Results Probl Cell Differ* 45: 223-252.
- [145] Vignais, P. M., Billoud, B. (2007). "Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview." *Chemical Reviews* 107(10): 4206-4272.
- [146] Vintila, T., Neo, S., Vintila, D., **Boboescu, I. Z.**, Gherman, V. (2013). "Microbiota from brewery wastewater treatment plant as inoculum for biogas production." *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* In press.
- [147] Wang, J., Wan, W. (2008). "Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(12): 2934-2941.
- [148] Wang, J., Wan, W. (2008). "The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models." *Science in China Series B: Chemistry* 51(11): 1110-1117.
- [149] Wang, J., Wan, W. (2008). "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(20): 5392-5397.
- [150] Wang, J., Wan, W. (2009). "Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(1): 235-244.
- [151] Wang, J., Wan, W. (2009). "Factors influencing fermentative hydrogen production: A review." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(2): 799-811.
- [152] Wang, J., Wan, W. (2009). "Kinetic models for fermentative hydrogen production: A review." *International Journal of Hydrogen Energy* 34(8): 3313-3323.
- [153] Wang, J., Wan, W. (2011). "Combined effects of temperature and pH on biohydrogen production by anaerobic digested sludge." *Biomass and Bioenergy* 35(9): 3896-3901.

- [154] Wang, Y., Zhao, Q.-B., Mu, Y., Yu, H.-Q., Harada, H., Li, Y.-Y. (2008). "Biohydrogen production with mixed anaerobic cultures in the presence of high-concentration acetate." *International Journal of Hydrogen Energy* 33(4): 1164-1171.
- [155] Watkinson, A. J., Murby, E. J., Costanzo, S. D. (2007). "Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling." *Water Research* 41(18): 4164-4176.
- [156] Xiao, Y., Zhang, X., Zhu, M., Tan, W. (2013). "Effect of the culture media optimization, pH and temperature on the biohydrogen production and the hydrogenase activities by *Klebsiella pneumoniae* ECU-15." *Bioresour Technol* 137: 9-17.
- [157] Yoshida, A., Nishimura, T., Kawaguchi, H., Inui, M., Yukawa, H. (2006). "Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh-* and *frd-*inactivated *Escherichia coli* strains." *Applied Microbiology and Biotechnology* 73(1): 67-72.
- [158] Zakrzewski, M., Goesmann, A., Jaenicke, S., Jünemann, S., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Al-Soud, W. A., Sørensen, S., Pühler, A., Schlüter, A. (2012). "Profiling of the metabolically active community from a production-scale biogas plant by means of high-throughput metatranscriptome sequencing." *Journal of Biotechnology* 158(4): 248-258.
- [159] Zhu, H., Béland, M. (2006). "Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge." *International Journal of Hydrogen Energy* 31(14): 1980-1988.
- [160] Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Van't Riet, K. (1990). "Modeling of the bacterial growth curve." *Applied and environmental microbiology* 56(6): 1875-1881.