

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Inhibice procesu anaerobní fermentace nedostatkem
vybraných chemických prvků**

Diplomová práce

Bc. Markéta Pápayová

Technologie zpracování a využití odpadů

**Školitel: Ing. Pavel Švehla, Ph.D.
Konzultant: Ing. Pavel Míchal, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibice procesu anaerobní fermentace vlivem vybraných chemických prvků" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4. 2019

Markéta Pápayová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Pavlu Švehlovi, Ph.D. za odborné vedení práce, veškeré konzultace, věcné připomínky, ochotu a vstřícnost. Dále bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Míchalovi, Ph.D. za konzultace, pomoc při průběhu experimentu a vstřícnost.

Inhibice procesu anaerobní fermentace vlivem vybraných chemických prvků

Souhrn

Anaerobní fermentace je proces, který je využíván k přeměně biologicky degradovatelného substrátu na energeticky bohatý bioplyn. Proces tvorby bioplynu je limitován mnoha faktory, mezi které patří například teplota, hodnota pH, koncentrace nižších mastných kyselin, přítomnost inhibičních látek či zastoupení živin a stopových prvků. Cílem diplomové práce bylo ověřit a kvantifikovat inhibiční vliv nedostatku vybraných chemických prvků na průběh anaerobní fermentace v bioplynových stanicích zpracovávajících pro výrobu bioplynu pouze velmi omezený okruh substrátů. Pozornost byla věnována především molybdenu, manganu, kobaltu a selenu. Základní hypotézou práce byl předpoklad, že nízký obsah, případně úplná absence vybraných prvků, jež zauímají funkci mikroživin pro mikroorganismy zodpovědné za proces anaerobní fermentace, povede k podstatnému zpomalení procesu a taktéž bude mít vliv na produkci bioplynu. Byly provedeny jednorázové kinetické testy produkce bioplynu v podmínkách s přidavkem různých kombinací řešených prvků. Množství dávkovaných prvků bylo zvoleno tak, aby se výsledná koncentrace prvků pohybovala přibližně 1,5 mg/kg sušiny selenu, 2 mg/kg sušiny molybdenu, 50 mg/kg sušiny manganu a 3 mg/kg sušiny v případě kobaltu. V rámci testů bylo využito inokulum pocházející z v praxi provozovaného anaerobního reaktoru, u kterého existuje předpoklad nedostatku těchto živin. Výsledky pak byly porovnány s testem provedeným s inokulem získaným v biologickém reaktoru stabilně fungující bioplynové stanice (BPS). Z kumulativní produkce bioplynu stanovené v rámci těchto testů a ze zastoupení metanu v bioplynu bylo zjištěno, že pro stabilní průběh anaerobní fermentace je nejvhodnějším řešením dávkování prvků v různých kombinacích. Individuální suplementace prvku neměla význam. Jako nejvhodnější byla zvolena kombinace molybdenu, manganu a kobaltu. Za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyšší produkce bioplynu a v něm zastoupeném metanu. V nejlépe hodnocené variantě bylo dosaženo dokonce o 11 % vyšší hodnoty produkce bioplynu než ve variantě s inokulem odebraným v reaktoru stabilně fungující BPS. Obsah metanu v bioplynu se pohyboval v rozmezí 80–90 %, čímž se také dostal na vyšší hodnoty než v případě inokula ze stabilně fungující BPS.

Klíčová slova: výroba bioplynu, bioplynové stanice, inhibice, mikroživiny, jednorázové kinetické testy

The Inhibition of the Anaerobic Digestion Process by the Lack of Selected Elements

Summary

Anaerobic fermentation is a process used for conversion of biologically degradable substrate into energy-rich biogas. The process of production of the biogas is limited by many factors, including for example temperature, pH value, concentration of volatile fatty acids, presence of inhibitory substances or nutrients and trace elements. The purpose of the diploma thesis was to verify and quantify the inhibitory effect of deficiency of selected chemical elements onto the course of anaerobic fermentation in biogas stations processing only limited number of substrates for biogas production. The chemical elements taken into consideration were primarily Molybdenum, Manganese, Cobalt and Selenium. The main hypothesis was an assumption that either a low concentration or a definite absence of selected chemical elements (functioning as micronutrients for organisms responsible for the process of anaerobic fermentation) would lead to a significant deceleration of the process of anaerobic fermentation and effect the production of biogas. Batch tests of biogas production in various conditions with the addition of different combination of said chemical elements were performed. The doses of the elements in the analyses were chosen to ensure the final concentration of elements to be approximately 1,5 mg/kg dry matter of Selenium, 2 mg/kg dry matter of Molybdenum, 50 mg/kg dry matter of Manganese and 3 mg/kg dry matter of Cobalt. An inoculum from a functioning anaerobic reactor with presumed lack of said nutrients was used within the analyses. These results were compared with results of analyses with an inoculum from a biological reactor of a stable biogas station. It was determined from a cumulative biogas production within the range of these analyses and from a presence of methane in biogas, that to ensure a stable process of anaerobic fermentation it is most effective to use doses of chemical elements in various combinations. An individual supplementation of the element was of no significance. The combination of Molybdenum, Manganese and Cobalt was determined to be the most sufficient; the highest production of biogas and methane in the gas was achieved under these conditions. In the most successful variant, it was achieved up to 11 % more biogas production than in the variant with an inoculum from a biological reactor of a stable biogas station. The volume of methane in the biogas was in a range of 80–90 %, which was also more than in the variant with an inoculum from a biological reactor of a stable biogas station.

Keywords: biogas production, biogas station, inhibition, micronutrients, single batch tests

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Anaerobní fermentace	10
3.1.1 Substrát pro výrobu bioplynu	10
3.1.2 Proces tvorby bioplynu	11
3.1.3 Vlastnosti a složení bioplynu	13
3.1.4 Využití bioplynu	15
3.2 Parametry ovlivňující proces	15
3.2.1 Teplota	16
3.2.2 pH.....	16
3.2.3 Zatížení organickými látkami	17
3.2.4 Poměr C:N	17
3.2.5 Nižší mastné kyseliny	17
3.2.6 Míchání objemu reaktoru.....	17
3.2.7 Přítomnost inhibičních sloučenin.....	17
3.2.8 Živiny a stopové prvky	18
3.3 Význam a funkce vybraných chemických prvků	18
3.3.1 Selen.....	19
3.3.2 Molybden	20
3.3.3 Železo.....	20
3.3.4 Wolfram	20
3.3.5 Nikl	20
3.3.6 Kobalt.....	21
3.3.7 Zinek	21
3.3.8 Měď.....	21
3.3.9 Barium	21
3.3.10 Hořčík a Mangan	22
3.4 Požadavky na živiny v procesu anaerobní fermentace	22
3.5 Inhibiční vliv nedostatku prvků	24
3.5.1 Zařízení zpracovávající energetické plodiny	25
3.5.2 Zařízení zpracovávající organickou frakci komunálního odpadu.....	25
3.5.3 Zařízení zpracovávající exkrementy a odpady z jatek	26
3.6 Dostupná řešení	27
4 Metodika	28
4.1 Zdroj inokula	28
4.2 Rozdělení experimentu	28

4.3	Příprava materiálu před nasazením testu.....	29
4.4	Nasazení testu	30
4.4.1	První série	30
4.4.2	Druhá série.....	30
4.5	Analytická stanovení.....	32
4.5.1	Stanovení sušiny a organické sušiny	32
4.5.2	Stanovení nižších mastných kyselin	33
4.5.3	Stanovení amoniakálního dusíku (N-amon)	33
4.5.4	Stanovení pH.....	33
4.5.5	Stanovení koncentrace prvků.....	33
4.5.6	Stanovení obsahu metanu v bioplynu	34
4.6	Stanovení produkce bioplynu.....	34
4.7	Zpracování dat	35
5	Výsledky	36
5.1	První série	36
5.1.1	Produkce bioplynu	36
5.1.2	Obsah metanu v bioplynu	36
5.2	Druhá série.....	37
5.2.1	Produkce bioplynu	37
5.2.2	Obsah metanu v bioplynu	41
6	Diskuze	43
7	Závěr.....	47
8	Literatura.....	48

1 Úvod

Anaerobní fermentace je jednou ze slibných technologií pro zpracování širokého spektra organických odpadů. Umožňuje výrobu bioplynu, jako potenciálního zdroje obnovitelné energie a zároveň je cestou, jak udržitelně hospodařit s odpady (Choong et al. 2016).

Existuje řada parametrů, které tento složitý proces ovlivňují (Krishna 2013). Mikroorganismy zodpovědné za průběh procesu jsou citlivé na podmínky prostředí (Baweja 2017). Jedním z předpokladů pro správnou funkci systému a stabilní průběh celého procesu je přítomnost živin a stopových prvků (Myszograj et al. 2018). Absence vybraných chemických prvků může mít značný vliv na průběh celého procesu. Tento problém je řešen zejména v souvislosti se zařízeními, které jako vstupní surovinu využívají pouze jeden typ substrátu. Často se s problémem setkáváme v souvislosti se zemědělskými bioplynovými stanicemi, kde je jako hlavní substrát využívána především kukuřičná siláž, čirok, travní siláž apod. (Evranos & Demirel 2015). Nízká koncentrace živin, či jejich úplná absence způsobuje významné problémy v průběhu celého procesu a může proces inhibovat. Výsledkem bývá nižší produkce bioplynu a nižší zastoupení metanu v bioplynu (Narra et al. 2016). Suplementace chemických prvků, jež hrají důležitou roli živin pro mikroorganismy je v těchto případech nezbytná (Xu et al. 2018). V tomto směru je nezbytné realizovat další studie za účelem dostatečného pochopení role jednotlivých prvků v celém procesu anaerobní fermentace a způsobu jejich doplnění do systému (Fermoso et al. 2015).

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je ověřit a kvantifikovat inhibiční vliv nedostatku určitých prvků na průběh procesu anaerobní fermentace ve fermentorech bioplynových stanic zpracovávajících pro výrobu bioplynu pouze velmi úzký okruh substrátů. Hlavní pozornost bude v tomto směru věnována selenu, molybdenu, manganu a kobaltu.

Základní hypotézou práce je předpoklad, že extrémně nízký obsah, resp. úplná absence, vybraných prvků majících roli mikroživin pro mikroorganismy zodpovědné za proces anaerobní fermentace bude vést k podstatnému zpomalení procesu a k významnému snížení produkce bioplynu. Zároveň se předpokládá, že doplnění chybějících živin povede ke zlepšení průběhu anaerobní fermentace, a tím i ke zlepšení vlastností produkovaného bioplynu.

3 Literární rešerše

3.1 Anaerobní fermentace

Pro ochranu a tvorbu životního prostředí představuje bioplyn a bioplynové systémy energetické zdroje s vysoce pozitivními přínosy. Ačkoliv zatím není bioplyn na trhu s energiemi schopen plně konkurovat fosilním palivům, má řadu možností pro budoucí využití. Bioplynové systémy ve všech možných provedeníh a uspořádáníh řadíme mezi plně obnovitelné energetické zdroje, jež transformují a spoluvyužívají solární energii (Straka et al. 2006).

V této souvislosti bude bioplyn získaný při zpracování odpadů, rostlinných a živočišných zbytků a energetických plodin hrát v budoucnu zásadní roli. Je universálním zdrojem obnovitelné energie. Může být využit jako náhrada již zmíněných fosilních paliv při výrobě elektřiny a tepla. Taktéž jej lze využít jako palivo pro vozidla, která pro svůj pohon využívají plynná paliva. Bioplyn bohatý na metan (biometan), může nahradit také zemní plyn při výrobě chemických látek a materiálů (Weiland 2010). Na rozdíl od jiných forem obnovitelné energie není výroba bioplynu geograficky omezená, což z něj dělá jednu z nejatraktivnějších variant pro tvorbu obnovitelné energie (Balat & Balat 2009). Anaerobní proces byl praktikován po staletí, nicméně je stále předmětem výzkumu (Zhang et al. 2016).

Dle Zirkler et al. (2014) se výroba bioplynu na začátku 21. století rychle rozrostla. Jako příklad lze uvést nárůst počtu bioplynových stanic v Německu. V roce 2002 fungovalo okolo 1600 bioplynových stanic, v roce 2011 počet vzrostl na 7000 zařízení. V České republice bylo v roce 2014 evidováno něco přes 500 bioplynových stanic. Podíl bioplynu na celkové produkci elektrické energie z obnovitelných zdrojů je 22,1 %. Bioplynové stanice můžeme rozdělit podle druhu zpracovávaného materiálu na zemědělské, čistírenské a ostatní. Převážnou část bioplynových stanic v České republice tvoří zemědělské, které využívají jako vstupní substrát cíleně pěstovanou biomasu (Geršl et al. 2014).

3.1.1 Substrát pro výrobu bioplynu

Biomasa je obecný pojem pro materiál vhodný pro využití k energetickým účelům. Za biomasu je v užším pojetí považována organická hmota rostlinného původu, vznikající na bázi fotosyntetické konverze sluneční energie. Nutno podotknout, že se v literatuře můžeme setkat s množstvím definic, které si často protiřečí. V širším pojetí si pod pojmem biomasa můžeme představit substanci biologického původu, která zahrnuje rostlinnou biomasu (fytomasu)

pěstovanou na půdě, hydroponicky nebo ve vodě, ale také biomasu živočišného původu nebo vedlejší organické produkty a organické odpady (Kára et al. 2007). Biomasa je čtvrtým největším zdrojem energie na světě. Představuje hned po uhlí, ropě a zemním plynem asi 14 % světové produkce primární energie. Obnovitelná biomasa je považována za důležitý zdroj energie po celém světě (Saxena et al. 2007). Při výrobě bioplynu se obvykle využívá produktů vzniklých při nakládání s odpady. Zejména se využívají kaly z čištění odpadních vod, zemědělský odpad a odpady průmyslové (Balat & Balat 2009). Mezi další zdroje biomasy můžeme řadit meziprodukty a zbytkové odpady z lesního hospodářství či energetické plodiny. Zdroje biomasy, které lze využít k výrobě energie pokrývají širokou škálu materiálů (Saxena et al. 2007).

Anaerobní fermentory byly původně navrženy pro zpracování kalů z odpadních vod a živočišného odpadu (hnůj). Čistírenský kal a hnůj nejsou biodegradovatelné substráty s největším potenciálem pro výrobu bioplynu. Ve velkém množství lze využít produkty zemědělství, zbytky plodin, taktéž odpady z potravinářského průmyslu, živočišné odpady, odpadní vody a organickou hmotu komunálního tuhého odpadu. Dále různé vedlejší produkty organického původu, jako jsou odpad z jatek, tuky a mastnoty z restaurací, organický domácí odpad a cíleně pěstované energetické plodiny (Mudhoo 2012). Wellinger et al. (2013) kategorizuje substrát do tří skupin. První skupinu charakterizuje jako substrát zemědělského původu jako je hnůj, krmný odpad, sklizňový odpad a energetické plodiny. Druhou skupinu tvoří odpad z domácností a obcí jako odděleně sbíraný bioodpad (v kontejnerech s organickým odpadem) nebo potravinový odpad. Do třetí skupiny zařazuje vedlejší produkty průmyslu jako je glycerin, vedlejší produkty zpracování potravin nebo odpad z odlučovačů tuků.

Přestože energie z biomasy je nákladnější než energie získaná z fosilních paliv, trendy v omezování oxidu uhličitého, emise regulované emisními předpisy, daně z uhlíku a dotace na energii z biomasy, by zajistili konkurenceschopnost vynaložených nákladů (Chynoweth et al. 2011).

3.1.2 Proces tvorby bioplynu

Již samotný název bio-plyn napovídá, že vzniká v biologickém procesu. V tomto procesu dochází k tvorbě směsice plynů z organické hmoty v anaerobním prostředí. V přírodě je tento proces velice rozšířen a probíhá spontánně například v rašeliníštích, na dně jezer, či v bacheru přežvýkavců. Organická hmota je přeměněna na bioplyn, jen malá část na novou biomasu nebo teplo (Kratochvílová et al. 2009).

Bioplyn je produkován anaerobními mikroorganismy, které degradují organický materiál ve čtyřech krocích: hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze (vznik kyseliny octové) a metanogeneze (vznik metanu) (Wellinger et al. 2013). To je patrné z obrázku č. 1 (Gavala et al. 2003). Jednotlivé stupně degradace jsou prováděny různými skupinami mikroorganismů, které jsou na sobě vzájemně závislé a mají různé požadavky na životní prostředí (Weiland 2010). Jde o koordinovanou metabolickou součinnost těchto mikrobiálních skupin (Straka et al. 2006).

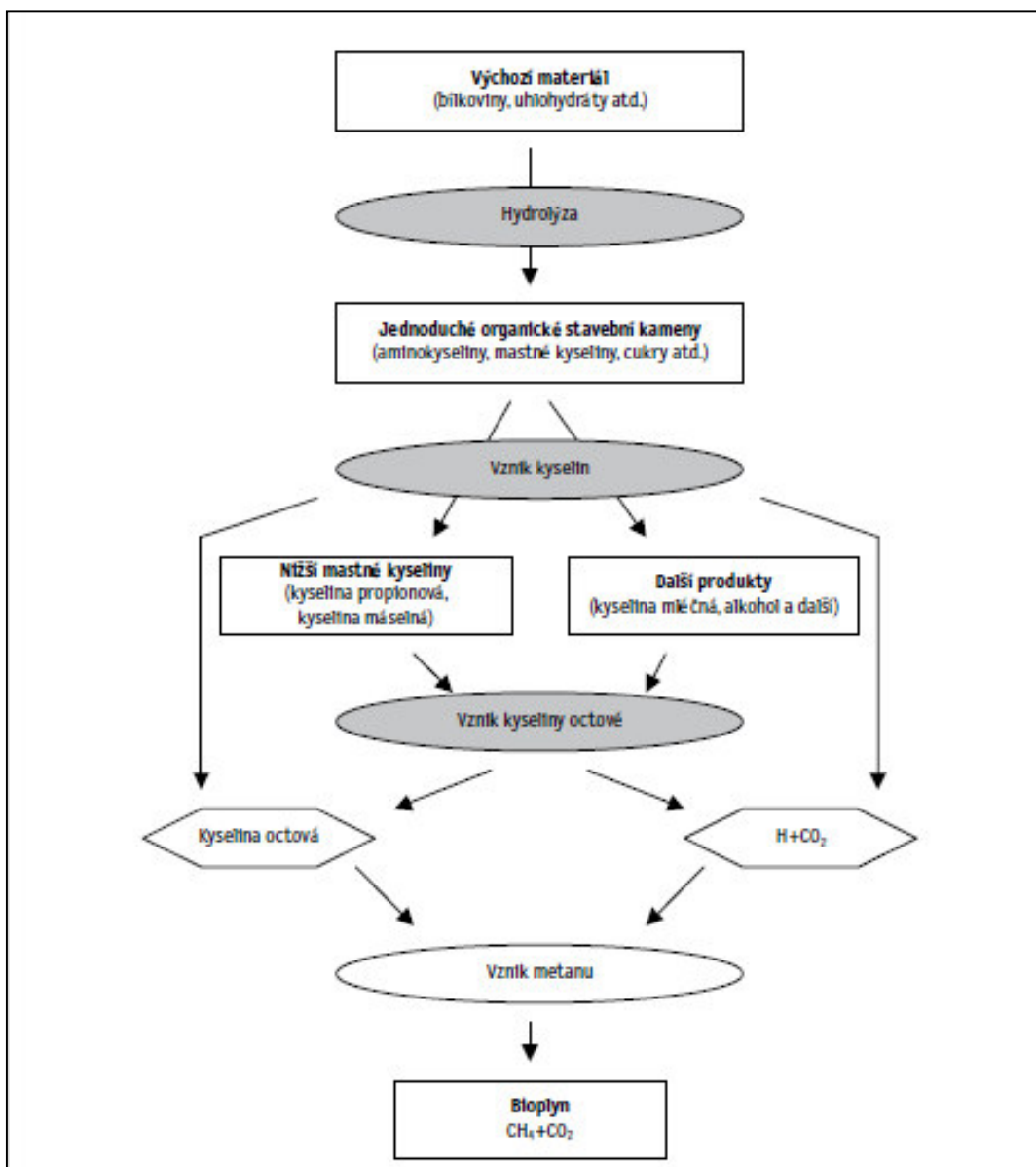
V první fázi skupina anaerobních mikroorganismů, především celulóznic bakterií, působí na polymery. Větší molekuly polymerů se enzymatickou hydrolýzou rozkládají na monomery menší velikosti. Další extracelulární enzymy mikroorganismů, jako je celuláza, proteáza, amyláza a lipáza externě enzymují organický materiál. Polysacharidy se hydrolyzují na monosacharidy, proteiny na peptidy nebo aminokyseliny a tuky se hydrolyzují na glycerol a mastné kyseliny. Rychlost hydrolýzy je poněkud pomalejší, než následná tvorba kyselin (Khoiyangbam 2011).

Vytvořené meziprodukty jsou pak v acidogenezi dále rozkládány kyselinotvornými bakteriemi. Výsledkem je tvorba nižších mastných kyselin spolu s amoniakálním dusíkem (N-amon), oxidem uhličitým a sirovodíkem (Baweja 2018).

Následuje acetogeneze, tedy tvorba kyseliny octové, vodíku a oxidu uhličitého z produktů předchozích fází acetogenními bakteriemi (Straka et al. 2006). Tento proces je závislý především na tlaku, teplotě a podmínkách fermentoru (Paul & Roy 2018).

Poslední fází anaerobního rozkladu organické hmoty je metanogeneze. Metanogeny přeměňují kyselinu octovou a různé jednovuhlíkaté substráty na metan a oxid uhličitý (Baweja 2018). Metanogenní fáze probíhá přibližně pětikrát pomaleji než předchozí fáze (Kára et al. 2007).

Uvedené fáze procesu jsou následné, při kontinuálním provozu však probíhají současně. Pokud je anaerobní proces rozdělen technologicky do dvou stupňů, v prvním stupni obvykle probíhá hydrolytická nebo hydrolytická a acidogenní fáze. Acetogenezi nelze úplně prostorově oddělit od metanogenní fáze, vzhledem k syntrofickému vztahu autogenních bakterií produkujících vodík a metanogenních hydrogenotrofních bakterií (Straka et al. 2006).



Obrázek č. 1. Schématické představení anaerobního rozkladu (Gavala et al. 2003).

3.1.3 Vlastnosti a složení bioplynu

Nejdůležitějšími složkami bioplynu jsou metan (CH_4), oxid uhličitý (CO_2) a sírné složky (zejména H_2S). Dle Balat & Balat (2009) se bioplyn obecně skládá z metanu (55 až 65 %), oxidu uhličitého (35 až 45 %), dusíku (0 až 3 %), vodíku (0 až 1 %) a sulfanu. Složení bioplynu je uvedeno v tabulce č. 1. Metan je nejjednodušší alkan, bezbarvý, netoxický a bez zápachu (Trávníček & Kotek 2015).

Tabulka č. 1. Složení bioplynu (Balat & Balat 2009).

Typické zastoupení (%)	
Metan (CH₄)	55-65
Oxid uhličitý (CO₂)	35-45
Sulfan (H₂S)	0-1
Dusík	0-3
Vodík	0-1
Kyslík	0-2
Amoniak	0-1

Složení bioplynu závisí na typu suroviny podrobené procesu rozkladu a podmínkách procesu (Zieminski & Frac 2012). Mudhoo (2012) taktéž upozorňuje na fakt, že kompozice substrátu je hlavním faktorem při určování výtěžku metanu a rychlosti produkce metanu z anaerobního rozkladu. Čím více biologicky odbouratelného substrátu, tím vyšší je výtěžek plynu ze systému.

Kára et al. (2007) uvádí dvě klíčové vlastnosti bioplynu. První z nich je výhřevnost. Hodnota výhřevnosti bioplynu je určena obsahem metanu. Ostatní minoritní plyny v bioplynu mají prakticky zanedbatelný energetický význam. Druhou vlastností je hranice zápalnosti. Hranice zápalnosti metanu ve směsi se vzduchem je 5-15 % objemových. Tato koncentrace metanu již tvoří výbušnou směs. Zápalná teplota bioplynu, respektivě metanu se pohybuje v oblasti 650-750 °C. Bioplyn je těžší než vzduch a je pro živočichy i člověka jedovatý.

Straka et al. (2006) uvádí, že chemická skladba minoritních komponentů bioplynu je velice pestrá. Příměsí dalších minoritních plynů mohou signalizovat přítomnost některých chemických prvků v materiálu nebo poruchy průběhu anaerobní fermentace. Například vysoký obsah oxidu uhličitého znamená, že nebyly vytvořeny optimální podmínky pro anaerobní fermentaci. Vyšší obsah kyslíku poukazuje na zavzdušňování pracovního prostoru, což je nežádoucí stav z hlediska bezpečnosti. Pokud je v bioplynu přítomen vodík, nemění se jeho energetické vlastnosti. Poukazuje to však na fakt, že byla narušena rovnováha mezi acidogenní a metanogenní fází (nejčastěji způsobeno nadměrným zatížením reaktoru). Při vyšším obsahu sulfanu dochází k potížím při konečném využití bioplynu (Kára et al. 2007).

3.1.4 Využití bioplynu

Bioplyn má řadu možností pro konečné využití. Tradičně byl bioplyn užíván jako palivo pro kotle k výrobě tepla, nebo kogeneraci tepla a elektrické energie v zařízeních pro kombinovanou výrobu tepla i elektřiny (CHP- combined heat and power). V elektrárnách na výrobu tepla a elektřiny je elektrická energie vyráběna spalováním paliva (zemní plyn, bioplyn). Následně se využívá jednotka rekuperace tepla k zachycování tepla ze spalovacího systému. Toto teplo může být přeměněno na užitečnou tepelnou energii, obvykle ve formě páry a horké vody. Systémy pro kombinovanou výrobu tepla a elektřiny jsou standardně vybaveny čtyřtaktním nebo vznětovým motorem. Bioplyn může být také použit v kotli k výrobě páry. Slouží k pohonu motorů nebo turbín (Wellinger et al. 2013).

Aby mohl být bioplyn použit jako náhrada za zemní plyn, musí být zbaven nežádoucích složek, kterými jsou především sulfan, oxid uhličitý a voda. V reálném provozu jsou ověřeny a používány metody založené zejména na absorpčním a na adsorpčním principu. Další perspektivní metodou se jeví membránová separace (Čermáková 2009). Pokud je bioplyn zpracován na biometan s přibližně 98% obsahem metanu v zařízení na úpravu bioplynu, má biometan stejné vlastnosti jako zemní plyn (Wellinger 2013).

Jako další z možností pro využití bioplynu se jeví aplikace kombinovaných technologií chlazení, vytápění a výroby energie známá jako trigenerační systém. Tento systém je poháněn bioplynem jako obnovitelným zdrojem energie za produkce tepla, chladu a elektrické energie (Leonzio 2018).

3.2 Parametry ovlivňující proces

Aspekty ovlivňující proces výroby bioplynu jsou neustále předmětem zkoumání. Tvorba bioplynu, který má být použit pro výrobu obnovitelné energie, spočívá ve stabilním a konzistentním provozním výkonu fermentoru, při co nejvyšší možné výkonnosti (Zhang et al. 2016). Abychom mohli provádět efektivní řízení a kontrolu procesu, je zapotřebí hlídat určité parametry fermentačního procesu (Kratochvílová et al. 2009).

Mikrobiální společenství v procesu anaerobní fermentace je složeno z několika skupin mikroorganismů, které žijí synergicky či antagonisticky. To vede k různým reakcím na změny prostředí, v němž se nachází. Když je činnost jedné skupiny mikroorganismů potlačena, ovlivní to růst skupiny mikroorganismů na ní navazující. Mikrobiální populace se mění, což může snížit účinnost procesu, případně jej i zastavit (Kiran et al. 2016). Vzhledem ke složitosti procesů anaerobní fermentace byly analyzovány a popsány mnohé faktory

ovlivňující výkon anaerobního fermentoru.

Ty lze rozdělit do tří hlavních tříd:

- charakteristiky vstupní suroviny
- konstrukce reaktoru
- provozní podmínky (Krishna 2013).

Mezi provozní podmínky ovlivňující proces můžeme zařadit: nutnost dosažení anaerobních podmínek, teplotu, míchání, pH, zatížení organickými látkami, obsah nižších mastných kyselin, dostupnost mikro a stopových živin, poměr uhlíkatých a dusíkatých látek a přítomnost toxických látek (Bajpai 2017).

3.2.1 Teplota

Dle Dobre et al. (2014) je za jeden z hlavních faktorů ovlivňujících proces anaerobní fermentace považována teplota. V závislosti na teplotě reakčního média jsou určité skupiny mikroorganismů stimulovány, jiné inhibovány, což vyvolává různé stupně biologické rozložitelnosti organických látek a ovlivňuje množství a kvalitu vyrobeného bioplynu. Rychlost tvorby bioplynu se s rostoucí teplotou zvyšuje, ale množství produkovaného metanu se snižuje. Bylo zjištěno, že teplota mezi 30 ° C a 35 ° C je nejefektivnější pro stabilní a kontinuální výrobu metanu. Není-li tento rozsah udržován, vyrobený bioplyn bude obsahovat vyšší procento oxidu uhličitého a dalších plynů (Baweja et al. 2018). Bakterie podílející se na rozkladu lze na základě jejich tepelného optima rozdělit do tří skupin, a to na psychrofilní (5-15°C), mezofilní (35-40°C) a termofilní (50-65°C) (Kratochvílová et al. 2009). S teplotou úzce souvisí i vliv tlaku, ten však nebyl předmětem rozsáhlých výzkumů. Byla ovšem ověřena vysoká tolerantnost metanogenů vůči tlakovým podmínkám (Straka et al. 2006).

3.2.2 pH

Další faktor, jenž musí být konstantně sledován a případně i regulován je hodnota pH. Rozsah přijatelného pH je teoreticky v rozmezí od 5,5 do 8,5. Pro většinu metanogenů je však optimální rozmezí pH mezi 6,7 a 7,4 (Balat & Balat 2009). Hodnota pH závisí na charakteru chemických látek vyskytujících se ve fermentoru, na neutralizační kapacitě směsi a na průběhu biochemických procesů. Při poklesu pH se produkce plynu zpomaluje a může dojít k akumulaci kyselin (Baweja et al. 2018).

3.2.3 Zatížení organickými látkami

Zatížení fermentoru organickými látkami je jedním z důležitých parametrů (Baweja et al. 2018). Nižší zatížení snižuje produkci bioplynu a je také nevýhodné z hlediska ekonomiky provozu. Naopak při nadměrném zatížení hrozí riziko hromadění nižších mastných kyselin v systému, což činí prostředí ve fermentoru toxickým a vede k selhání fermentoru (Paul & Roy 2018). Děje se tak v důsledku zvýšené tvorby mastných kyselin, které následně snižují hodnotu pH (Kwietniewska & Tys 2014).

3.2.4 Poměr C:N

Pro efektivní fungování systému je nutné zachovat správný poměr uhlikatých a dusíkatých látek v substrátu. Obecně bylo zjištěno, že během anaerobní fermentace využívají mikroorganismy uhlík 25-30krát rychleji než dusík. Abychom splnili tento požadavek, potřebují mikroorganismy poměr uhlíku a dusíku 20-30:1 (Balat & Balat 2009). Vysoký poměr C:N má za následek nižší produkci bioplynu a to díky rychlé spotřebě dusíku metanogeny. Na druhou stranu nižší poměr C:N způsobuje akumulaci amoniaku, který je pro metanogeny toxický. Optimálního poměru lze dosáhnout mícháním materiálů s vysokým a nízkým poměrem C:N (Baweja et al. 2018).

3.2.5 Nižší mastné kyseliny

Nižší mastné kyseliny jsou důležitými meziprodukty anaerobní fermentace. Řadíme mezi ně organické kyseliny o počtu atomů uhlíku 1-6 (C_1 - C_6). Tvorba nižších mastných kyselin (NMK) probíhá v acidogenezi a acetogenezi. Jejich zvýšená tvorba úzce souvisí s hodnotou pH, která v důsledku hromadění kyselin klesá pod optimální hranici (Paul & Roy 2018).

3.2.6 Míchání objemu reaktoru

Míchání je důležitou funkční charakteristikou anaerobních fermentorů. Nedostatečné promíchání vede k následujícím problémům- nerovnoměrné rozložení substrátů, enzymů a mikroorganismů, neúplná stabilizace substrátu a snížení produkce metanu (Bajpai 2017). Příliš intenzivní míchání mikroorganismy stresuje, na druhou stranu jeho absence vede k pění (Adekunle & Okolie 2015).

3.2.7 Přítomnost inhibičních sloučenin

Metanogenní mikroorganismy v anaerobních systémech jsou většinou citlivé na přítomnost toxických sloučenin, což znamená zásadní omezení procesu. Tyto inhibiční látky mohou být

příčinou narušení nebo selhání anaerobního fermentoru (Bajpai 2017). Obvykle zahrnují amoniak, sloučeniny síry, ionty lehkých kovů, ionty těžkých kovů a některé organické látky (Chen et al. 2008). Podrobným přehledem inhibičních vlivů prvků se ve své studii zabývá Chen (2014). Toxikanty dělí na organické (chlorfenoly, halogenované alifatické látky a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem) a anorganické látky (amoniak, sulfidy a těžké kovy).

3.2.8 Živiny a stopové prvky

Mikroorganismy vyžadují pro svůj růst a stabilitu řadu prvků, resp. živin. V případě absence živin je nutné zvážit jejich doplnění pro správnou funkci systému. Dusík, fosfor, vápník, síra, hořčík, draslík a stopové prvky jako je nikl, železo, zinek, kobalt, měď a mangan jsou důležitými živinami. Přidání těchto živin vede v případě jejich nedostatku v původním substrátu ke zlepšení výkonu fermentoru a výsledkem je vyšší produkce metanu (Baweja 2018). Detailnímu významu a funkci jednotlivých prvků v procesu anaerobní fermentace je věnována kapitola 3.3.

3.3 Význam a funkce vybraných chemických prvků

Mezi základní stopové prvky uvedené v literatuře patří nikl (Ni), kobalt (Co), molybden (Mo), železo (Fe), selen (Se) a wolfram (W) pro metanogeny a zinek (Zn) a mangan (Mn) pro hydrolytické bakterie. Nedostatek těchto základních prvků může ovlivnit funkci a aktivitu klíčových enzymů mikroorganismů zainteresovaných v procesu, změnit podmínky prostředí a vést k selhání fermentoru. Možný vliv stopových prvků na anaerobní fermentaci závisí na podmínkách prostředí, jejich obsahu v substrátech, biologické dostupnosti a aktivitě mikroorganismů (Wu et al. 2018). Kromě toho by některé stopové prvky mohly podporovat produkci metanu, ovlivnit výkonnost systému a míru konverze biomasy. Dosud zveřejněné zprávy se však primárně zaměřují na vliv jediného prvku na fermentaci. Důležitou roli však hrají i různé kombinace vybraných prvků (Zhang et al. 2016). Zkoumání mechanismu a funkce stopových prvků v procesu anaerobní fermentace se dostává do popředí. Především je výzkum zaměřen na způsob jejich využití, což je pro skutečné aplikace velice důležité (Ye et al. 2018). Přehled základních funkcí vybraných prvků je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2. Základní funkce vybraných prvků (Matheri et al. 2016).

Prvek	Funkce v buňkách mikroorganismů
<i>Bor (B)</i>	kofaktor enzymů
<i>Vápník (Ca)</i>	membránová propustnost, ovlivnění toxických účinků jiných kovů, zvýšení toxických účinků jiných kovů
<i>Chrom (Cr)</i>	metabolismus glukózy
<i>Kobalt (Co)</i>	součást enzymů, inhibitor metabolismu
<i>Měď (Cu)</i>	součást enzymů, inhibitor metabolismu, snížení toxicity jiných kovů
<i>Železo (Fe)</i>	akceptor elektronů, redoxní reakce
<i>Hořčík (Mg)</i>	enzymový aktivátor
<i>Mangan (Mn)</i>	aktivátor enzymů bakterií, stabilizátor bakterií produkujících metan, redoxní reakce, kofaktor enzymů
<i>Molybden (Mo)</i>	kofaktor enzymů, inhibitor sirných bakterií
<i>Nikl (Ni)</i>	syntéza koenzymů, kofaktor ureázy
<i>Selen (Se)</i>	hydrogenáza v bakteriích produkujících metan
<i>Síra (S)</i>	kofaktor enzymů, součást bílkovin, meziproduct metabolismu
<i>Zinek (Zn)</i>	součást enzymů, stimulátor buněčného růstu, hydrogenáza v bakteriích produkujících metan

3.3.1 Selen

Selen je jeden ze stopových prvků, který se v procesu anaerobní fermentace ukázal jako stěžejní. Je důležitou mikroživinou pro mikroorganismy, uplatňuje se při tvorbě selenoproteinů. Přidání selenu do procesu anaerobní fermentace vede ke zlepšení jeho účinnosti a musí být přesně propočteno (Jain & Hullebusch 2015). Biologická dostupnost a toxicita závisí na chemické formě, ve které se vyskytuje a na dávkování (Lenz & Lens 2009). Selen je složkou několika anaerobních mikrobiálních enzymů a některých mikrobiálních nukleových kyselin. Obvyklým enzymem obsahujícím selen je formát dehydrogenasa (FDH). Enzymy závislé na selenu mají tendenci být velmi reaktivní při neutrálním pH, vyskytují se při nízkém redox potenciálu a mohou pomáhat metabolizovat mastné kyseliny (Kayhanian & Rich 1995).

3.3.2 Molybden

Molybden je také součástí mnoha důležitých enzymů. Nicméně, může také inhibovat sulfátredukující bakterie, což omezuje tvorbu sulfidů při anaerobní fermentaci (Wu et al. 2016). Molybden je přítomen v enzymu FDH, který katalyzuje oxidaci propionátu. Enzym molybdenu se syntetizuje pouze tehdy, když je molybden přítomen v systému. Bylo prokázáno, že molybden a wolfram jsou potřeba pro redukci CO_2 na CH_4 (Myszograj et al. 2018).

3.3.3 Železo

Železo se stalo jednou z nejvýznamnějších přísad pro zlepšení výkonu anaerobní fermentace, díky svým vodivým vlastnostem a nízké ceně (Romero-Güiza et al. 2016). Železo hraje v anaerobních procesech významnou roli, především díky své extrémně velké redukční kapacitě. Pomáhá aktivovat řadu enzymů. Kromě toho může železo vytvářet sulfidové sraženiny a podporovat vylučování extracelulárních polymerů (Kayhanian & Rich 1995). Význam železa závisí na jeho redoxních vlastnostech a na jeho zapojení do energetického metabolismu. Používá se v dopravním systému metanogenních bakterií pro konverzi CO_2 na CH_4 . Také působí jako vazebná složka při srážení sulfidů. Má význam také při snižování obsahu sírovodíku v bioplynu (Myszograj et al. 2018).

3.3.4 Wolfram

Wolfram se nachází, stejně jako molybden a selen, v enzymech, jako je FDH. Některé metanogenní mikroorganismy jej obsahují. Enzym obsahující wolfram je syntetizován, když je k dispozici buď wolfram, nebo molybden (Myszograj et al. 2018).

3.3.5 Nikl

Mnoho anaerobních mikroorganismů je závislých na niklu, pokud jsou oxid uhličitý a vodík jejich jediným zdrojem energie. Většina niklu je převzata buňkami ve sloučenině s názvem F-faktor 430 (F430). F430 byl nalezen u všech metanogenních mikroorganismů, které byly kdy zkoumány. Navíc CODH (enzym oxidu uhelnatého dehydrogenázy) je protein obsahující nikl a může pomoci redukovat síru. Metanogeny obsahují neobvyklý Ni-tetrapyrrol působící v posledním kroku tvorby metanu (Wu et al. 2016). Úloha niklu v metanogenezi souvisí s následujícími enzymy: CODH, methylreduktasou, hydrogenázami a syntézou F430. Nikl je významnou součástí roztoku prvků, které se využívají pro zlepšení stability procesu anaerobní fermentace (Myszograj et al. 2018).

3.3.6 Kobalt

Kobalt je přítomen ve specifických enzimech a korinoidech (název skupiny vitamínů B₁₂). Je zapotřebí pro syntézu vitamínu B₁₂ (kyanobalamin) a aktivuje karboxypeptidázu. Je známo, že korinoid, jako je vitamin B₁₂, obsahující kobaltový iont, se váže na koenzym M (CoM) metylázu. Je nezbytný pro enzym methyltransferasu, který katalyzuje přenos jedné methylové skupiny. Obvyklý enzym oxidu uhelnatého dehydrogenázy (CODH) používá kobalt také. CODH hraje zásadní roli v acetogenním procesu. Některé laboratorní testy potvrdily pozitivní vliv přidávání kobaltu na metanogenezi (Myszograj et al. 2018). To je ve shodě s Wu et al. (2016), kteří taktéž vyzdvihují důležitost kobaltu ve specifických enzimech. Také upozorňují na jeho zásadní roli při tvorbě acetátu.

3.3.7 Zinek

Zinek je přítomen v poměrně vysokých koncentracích v těle mnoha metanogenů. Může být považován za katalyzátor, který funguje v mnoha enzymatických procesech (Wu et al. 2016). Ačkoli je zinek součástí enzymů, jako je FDH, superoxid dismutáza (SODM) a hydrogenáza, dosud se neprokázalo, že hraje klíčovou roli v procesu metanogeneze (Myszograj et al. 2018).

3.3.8 Měď

Úloha mědi v metanogenezi je předmětem zkoumání. Měď byla zjištěna v buňkách mnoha kmenů metanogenních mikroorganismů, ale nebylo zjištěno, že by došlo k výraznému stimulačnímu účinku na výrobu bioplynu. Účinek mědi v metanogenezi byl studován pouze v souvislosti s doplněním mědi, jako součásti směsi s jinými prvky. V současné době není možné s jistotou porozumět roli mědi při výrobě bioplynu (Myszograj et al. 2018).

3.3.9 Barium

Přídavek baria byl zkoumán ve studii Wyman et al. (2019). Jeho přidání modifikovalo chemickou rovnováhu zkoumaného systému změnou rozpustnosti některých stopových prvků a tím i jejich biologické dostupnosti. Nejvyšší odchylka byla zjištěna v rozpustnosti zinku, která se zvyšovala s nárůstem množství baria. Hydrolytická aktivita byla ovlivněna při dávkách vyšších než 200 mg/l, zatímco degradace celulózy byla inhibována při dávkách 2000 mg/l. Účinky přidání baria byly pouze na hydrolytickou aktivitu a nebyly zjištěny žádné účinky v následujících anaerobních krocích. Znalost role baria je důležitá v tom, že přispívá k pochopení procesu a dynamiky chemické rovnováhy v anaerobním systému.

3.3.10 Hořčík a Mangan

Mangan stabilizuje tvorbu enzymu methyltransferázy v mikroorganismech produkujících metan a působí jako akceptor elektronu při anaerobních respiračních procesech. Je často zaměnitelný s hořčíkem v kinázových reakcích. Není dosud zcela jasné, zda má koncentrace těchto kovů zásadnější vliv na průběh anaerobní fermentace. Stejně jako u mědi byly role manganu a hořčíku v metanogenezi studovány pouze doplněním ve směsích s dalšími prvky (Myszograj et al. 2018).

3.4 Požadavky na živiny v procesu anaerobní fermentace

Koncentrace živin potřebná v procesu anaerobní fermentace se může výrazně lišit v závislosti na provozní teplotě (mezofilní nebo termofilní), druhu substrátu a také typu metanogenů (Takashima et al. 2011). Tabulka č. 3 zobrazuje „ideální“ zastoupení živin, včetně možných forem doplnění, v případě jejich nedostatku (Krishna 2013).

Tabulka č. 3. Koncentrace živin, potřebná pro uspokojivý průběh anaerobní fermentace (Krishna 2013).

Prvek	Potřeba (mg/g CHSK vstupního substrátu)	Požadovaná koncentrace (mg/l)	Typická forma přidání
Makronutrienty			
Dusík	5-15	50	NH ₃ , NH ₄ Cl, NH ₄ HCO ₃
Fosfor	0,8-2,5	10	NaH ₂ PO ₄
Síra	1-3	5	MgSO ₄ .7H ₂ O
Mikronutrienty			
Železo	0,03	10	FeCl ₂ .4H ₂ O
Kobalt	0,003	0,02	CoCl ₂ .2H ₂ O
Nikl	0,004	0,02	NiCl ₂ .6H ₂ O
Zinek	0,02	0,02	ZnCl ₂
Měď	0,004	0,02	CuCl ₂ .2H ₂ O
Mangan	0,004	0,02	MnCl ₂ .4H ₂ O
Molybden	0,004	0,05	NaMoO ₄ .2H ₂ O
Selen	0,004	0,08	Na ₂ SeO ₃
Wolfram	0,004	0,02	NaWO ₄ .2H ₂ O
Bor	0,004	0,02	H ₃ BO ₃
Běžné kationty			
Sodík	x	100-200	NaCl, NaHCO ₃
Draslík	x	200-400	KCl
Vápník	x	100-200	CaCl ₂ .2H ₂ O
Hořčík	x	75-250	MgCl ₂

3.5 Inhibiční vliv nedostatku prvků

Anaerobní fermentace je proces, který zahrnuje velké množství chemických, biochemických a mikrobiologických reakcí. Jako biologický proces vyžaduje přítomnost chemických prvků, jež zastávají funkci makro a mikroživin. Chemické prvky jsou nezbytné pro optimální růst a vývoj mikroorganismů. Správný poměr živin, stejně jako biologická dostupnost živin, je nezbytná pro správnou funkci fermentorů a stabilitu procesu. V souladu s tím bylo prokázáno, že přidavek určitých prvků do vstupní suroviny úzce souvisí se zvýšením produkce bioplynu (Ward et al. 2008). Doplnění mikronutrientů v případě jejich nedostatečného zastoupení přispívá ke stabilitě procesu a úspoře energie (Suárez et al. 2014). Kovy jsou důležité ve všech biochemických procesech jakéhokoliv živého organismu. Z 95 přirozeně se vyskytujících prvků periodické tabulky má minimálně 25 základní biologickou funkci. V posledních letech se přítomnosti mikroprvků v průběhu procesu anaerobní fermentace věnuje stále větší pozornost. Ukázalo se, že přísun mikronutrientů je důležitý pro stabilizaci a optimalizaci produkce bioplynu. V systémech s nižší koncentrací mikroprvků, či jejich úplnou absencí neprobíhá tvorba bioplynu uspokojivě (Menon et al. 2017). Biologická dostupnost, jak makro, tak mikro prvků má vliv na mikrobiální složení a převládající procesy ve fermentoru. Výzva a do značné míry nepoznaná oblast výzkumu v oblasti anaerobní fermentace spočívá v pochopení rolí stopových prvků při výrobě bioplynu. Jedná se hlavně o mezery ve znalostech zahrnujících chemii kovů, fyzikální interakce kovů a pevných látek, mikrobiologii a optimalizaci technologií (Fermoso et al. 2015). Obecně je nutno se tímto problémem zabývat především v zařízeních, kde je jako vstupní surovina využíván pouze jeden druh substrátu. Zde je předpoklad nerovnováhy živin a v důsledku toho nižší tvorba bioplynu. Můžeme sem zařadit systémy, kde je jako substrát využíván pouze živočišný hnůj, pouze organická frakce komunálních odpadů, či odpady z jatek nemíchané s jinými substráty (Xu et al. 2018). Fermoso et al. (2015) uvádí, že navzdory celkově stoupajícímu zájmu o výrobu bioplynu z obnovitelných zdrojů, je problematice inhibice procesu nedostatkem mikroživin věnována menší pozornost. Dostupnost stopových kovů jako mikroživin hraje bezpochyby velmi významnou roli ve výkonu a stálosti fermentorů. V zařízeních, jež zpracovávají jako výhradní substrát energetické plodiny, živočišné exkrementy, zbytky plodin, organickou frakci komunálního tuhého odpadu nebo jakýkoliv jiný typ organického odpadu řešíme stejné problémy. Požadavky fermentorů na přítomnost stopových kovů jsou často v literatuře opomínány (Demirel & Scherer 2011). Výroba bioplynu, stejně jako účinnost procesu anaerobní fermentace závisí na substrátech, které mají být fermentovány.

Nicméně je třeba vzít v úvahu i fakt, že u některých prvků se s problémy můžeme setkat při jejich nízké, ale i příliš vysoké koncentraci (Myszograj et al. 2018).

3.5.1 Zařízení zpracovávající energetické plodiny

Jak již bylo zmíněno, s nižšími koncentracemi stopových prvků se setkáváme v zařízeních, jež zpracovávají jako jediný substrát energetické plodiny. Zde je primární vstupní surovinou mono-substrát. Jako příklad lze uvést mono-fermentaci za použití krmné řepy, cukrové řepy, čiroku či silážní kukuřice. Z těchto plodin je přednostně využívána silážní kukuřice, z důvodu jejího většího výtěžku metanu na hektar. U těchto plodin jsou koncentrace některých prvků nízké či nulové již při vstupu. V případě silážní kukuřice se zpravidla setkáváme především s nedostatkem niklu a kobaltu (Evranos & Demirel 2015). Pobeheim et al. (2010) zkoumali účinek přidání směsi stopových prvků v reaktorech, kde byla hlavní vstupní surovinou silážní kukuřice. Důraz byl kladen především na doplnění niklu, kobaltu a molybdenu. Z výsledků bylo zřejmé, že po přidání směsi stopových prvků s vyšším obsahem niklu a kobaltu se výtěžek metanu zvýšil až o 30 %. V případě samotného molybdenu nebylo zvýšení zaznamenáno. Jako nejvhodnější se jevil přírůstek 10,6 $\mu\text{M}/\text{kg}$ sušiny zpracovávaného substrátu s výtěžkem metanu 407 l/kg sušiny v případě niklu a 2 μM kobaltu/kg sušiny s výtěžkem 371 l/kg sušiny. Úplná eliminace niklu z roztoku prvků výrazně snížila tvorbu metanu a stabilitu fermentoru. Význam niklu a kobaltu byl prokázán i ve studii Pobeheim et al. (2011). Předmětem zkoumání byl taktéž reaktor pracující se silážní kukuřicí. Bylo zjištěno, že při nižších koncentracích niklu a kobaltu dochází ke zvýšené akumulaci organických kyselin a poklesu pH. Značný vliv měly zvláště koncentrace niklu pod 0,1 mg/kg čerstvého substrátu a celkové koncentrace kobaltu pod 0,02 mg/kg. Narra et al. (2016) studovali anaerobní fermentaci rýžové slámy s vysokým obsahem pevných látek. Výkonnost byla monitorována více než 6 měsíců. Byla zaznamenána přibližně o 40 % vyšší produkce bioplynu v důsledku zvýšení koncentrace niklu a kobaltu přírůstkem 15 (Ni) a 10 (Co) mg/kg sušiny slámy.

3.5.2 Zařízení zpracovávající organickou frakci komunálního odpadu

Potravinový odpad a kuchyňský odpad obecně obsahují nízké koncentrace stopových prvků, především kobaltu, niklu, selenu, molybdenu a wolframu (Facchin et al. 2013). Je-li potravinový odpad použit jako jediný substrát, je nutno doplnit mikroživiny, aby se předešlo poruchám fermentoru (Xu et al. 2018). Existuje velké množství studií, které potvrzují klíčovou roli stopových prvků v procesu zpracování odpadů z potravin. Přidání stopových

prvků má výrazný vliv na stabilitu procesu (Zhang et al. 2015). Menon et al. (2017) se zabývali zvýšením produktivity bioplynu dvoufázové termofilní anaerobní fermentace. Jako substrát byl použit potravinový odpad. Byl zkoumán vliv přídavku 4 prvků- vápníku, hořčíku, kobaltu a niklu. Bylo zjištěno, že přídavek těchto prvků by mohl zvýšit produkci metanu a stabilizovat metanogenní fázi procesu anaerobního rozkladu. Ve většině případů tyto prvky nejsou přítomny v optimálních koncentracích, a proto proces obvykle funguje v suboptimálních rychlostech nebo dokonce selže. Zhang et al. (2012) spojují klesající výkonnost procesu s nízkou hladinou kobaltu, železa, niklu a molybdenu. Bylo potvrzeno, že doplněním roztoku s přítomností zmíněných prvků se situace výrazně zlepšila. Facchin et al. (2013) poukazují na důležitost kobaltu, molybdenu, selenu, niklu a wolframu. Z výsledků provedené studie plyne, že vyšší koncentrace selenu a molybdenu zvýšily produkci metanu o 30 až 40 %. Doplnění směsi kobaltu, niklu, molybdenu a wolframu dokonce o 45 - 65%. Ve Švédsku byl zkoumán vliv přidávání stopových prvků v různých kombinacích při anaerobní fermentaci organické frakce tuhých komunálních odpadů. Ty jsou charakteristické vysokými obsahy bílkovin a tuků. Pro optimální degradaci tuků a bílkovin je třeba zajistit správný růst acetogenů a metanogenů. Správná koncentrace niklu, železa a kobaltu je pro organismy nezbytná. Tento předpoklad byl potvrzen a zároveň bylo jako nejučinnější vyhodnoceno podávání kombinace všech tří prvků (Moestedt et al. 2016).

3.5.3 Zařízení zpracovávající exkrementy a odpady z jatek

Mono-fermentace živočišného hnoje způsobuje nerovnováhu živin a nízkou produkci bioplynu. I zde je pro zvýšení účinnosti procesu potřeba doplnění stopových kovů (Xu et al. 2018). Moestedt et al. (2016) se zabývali přidáním stopových prvků v případě mono-fermentace odpadů z jatek. Ve studii bylo zjištěno, že absence niklu, kobaltu a železa má značný vliv na průběh procesu. To potvrzují výsledky studie Ortner et al. (2015), kteří se také zabývali optimálními podmínkami pro zpracování odpadů z jatek. I zde je zdůrazněna absence stopových prvků v daném typu substrátu a nutnost jejich dodání je předpokladem správně fungujícího systému.

3.6 Dostupná řešení

Jednou z možností, jak doplnit potřebné množství stopových kovů je jejich přidání do procesu anaerobní fermentace, nejčastěji ve formě solí. Kovy mohou být dávkovány buď jednotlivě, či ve směsích (Thanh et al. 2016).

Namísto dávkování chemických forem prvků do fermentoru je možno využít substráty bohaté na stopové kovy (Choong et al. 2016). Míchání substrátů se jeví jako perspektivní možnost (Ye et al. 2018). Například Ratanatamskul et al. (2015) se zabývá přidáváním kalů z čistíren odpadních vod nebo výluhů ze skládek. V těchto případech je nutná především znalost jejich složení a přesně vypočtená dávka. Při vyšších dávkách hrozí zvýšená koncentrace rizikových látek v digestátu, resp. fugátu, který je dále využíván jako organické hnojivo. V obou případech bylo potvrzeno, že jejich společná fermentace s odpady s nízkým obsahem stopových kovů kompenzuje nedostatek stopových kovů. To je ve shodě s Liao et al. (2014), kteří se zabývali mícháním potravinového odpadu se skládkovými výluhy.

González- Suárez et al. (2014) se ve své studii zabývali doplněním stopových kovů za účelem zvýšení výtěžku metanu. Jako alternativa klasického doplnění kovů ve formě solí byly zvoleny přírodní minerály s vyšším obsahem železa, niklu, manganu a kobaltu. Tato studie potvrdila, že dávkovací strategie minerálu má stimulační účinek na produkci metanu při anaerobní fermentaci kukuřice. Studie nahrazení uměle vytvořených solí přírodními minerály jsou náročné. Je nutné odlišovat různé chemické formy kovů a brát zřetel na jejich různou biologickou dostupnost v procesu anaerobní fermentace. Na druhou stranu je to do budoucna jedna z perspektivních možností, jak tento problém řešit bez nutnosti užívat chemické přísady.

4 Metodika

Pokus byl založen ve Výzkumné stanici České zemědělské univerzity, Červený Újezd. Průběh anaerobní fermentace byl charakterizován zejména množstvím vzniklého bioplynu a zastoupením metanu v tomto bioplynu. Za účelem sledování kumulativní produkce bioplynu byly použity jednorázové batch testy (Rosenbegr 2010). Pro měření obsahu metanu v bioplynu byl využit plynový chromatograf.

4.1 Zdroj inokula

Testovány byly vzorky z BPS Dřevec a Žabovřesky. U BPS Dřevec je průběh anaerobní fermentace bezproblémový. Pro provoz jsou využívány především kukuřičná siláž, kejda a mrva. Pomocnou surovinou bývá také travní senáž. Narozdíl od BPS Žabovřesky, kde je jako jediný substrát využívána kukuřičná siláž a siláž čiroku. V zařízeních, která zpracovávají pouze jeden či velmi úzký okruh substrátu chybí potřebné živiny (viz. kapitola 3.5). Existuje předpoklad, že extrémně nízký obsah vybraných prvků, či jejich úplná absence vede ke značnému zpomalení procesu a významnému snížení produkce bioplynu v biologickém reaktoru BPS Žabovřesky. Cílem pokusu je prokázat zlepšení průběhu celého procesu za pomoci přídatku vybraných prvků.

4.2 Rozdělení experimentu

Pokus byl realizován ve dvou sériích. Experiment trval v případě obou sérií 40 dnů. První série sloužila k ověření aktivity inokula. Aktivita byla ověřena se substráty, které jsou pro mikroorganismy zodpovědné za průběh anaerobní fermentace snadno dostupným zdrojem živin. Jako substrát byla zvolena kyselina octová, kyselina propionová a glukóza. V druhé sérii bylo účelem ověřit efekt vlastního přídatku prvků, konkrétně molybdenu, manganu, selenu a kobaltu. Testovány byly varianty bez přídatku prvků a následně s přidáním samotného selenu, kombinace manganu a molybdenu a kombinace manganu, molybdenu a kobaltu.

4.3 Příprava materiálu před nasazením testu

Vzorky byly ponechány v klidu po dobu 10 dní při teplotě 40 °C za účelem proběhnutí anaerobního rozkladu zbytkového substrátu obsaženého v inokulu a za účelem separace a odstranění bioplynu obsaženého v těchto vzorcích. Inokulum bylo před nasazením testu rozmixováno za účelem homogenizace materiálu. Pro rozmixování inokula byl použit mixér ROBOT COUPE MP 350 V. V. Doba mixování činila 5 minut, přičemž inokulum bylo rozmixováno na velikost částic přibližně 3- 4 mm.

Před nasazením každé série testů byly provedeny základní analýzy- stanovení sušiny, organické sušiny, nižších mastných kyselin (NMK), amoniakálního dusíku (N-amon), pH a počáteční koncentrace vybraných chemických prvků.

Tabulka č. 4. Základní parametry inokula.

BPS	sušina (%)	org. sušina (% ze sušiny)	suma NMK (mg/l)	N-amon (g/l)	pH
Žabovřesky (1. série)	8,02	77,6	301	3,64	8,73
Žabovřesky (2. série)	8,02	77,6	301	3,64	8,73
Dřevec (1. série)	8,55	74,1	220	1,98	7,72
Dřevec (2. série)	7,58	78	65	2,61	8,16

Tabulka č. 5 představuje počáteční koncentrace vybraných chemických prvků v inokulu. Pro srovnání jsou uvedeny koncentrace prvků z BPS Dřevec a Červené Janovice, kde je průběh anaerobní fermentace bezproblémový.

Tabulka č. 5. Koncentrace prvků v inokulu v mg/kg sušiny.

BPS	Be	Co	Cu	Fe	As	Mn	Mo	Ni	Pb	Zn	Se
Žabovřesky	0	0,3	27	2000	1,7	210	2,7	3,4	1,5	220	0,1
Dřevec	0,06	1,3	35	1444	0,7	234	1,1	6,2	2,4	226	0,6
Č. Janovice	0,04	1,9	82	4200	0,5	275	1,3	5,5	0,9	280	0,9

4.4 Nasazení testu

4.4.1 První série

Test probíhal v 6- ti variantách s pěti opakováními. Jako substrát byly využity kyselina octová, kyselina propionová a glukóza. Substrát byl dávkován v množství odpovídajícím počátečnímu zatížení 0,2 g CHSK na 1 g organické sušiny inokula spolu s inokulem do testovacích lahvíček o objemu 120 ml, které byly následně doplněny na objem 80 ml demineralizovanou vodou. Průměr množství z každé varianty je uveden v tabulce č. 6. U variant s kyselinou octovou byla provedena úprava pH, aby bylo shodné s pH ve variantě s glukózou. Bylo přidáno 1-2 ml roztoku hydroxidu sodného (100 g /l). Přidání NaOH není zahrnuto v celkové hmotnosti. Následně byly lahvičky opatřeny septem a víčkem, hermeticky uzavřeny a kultivovány v termoboxu při teplotě 40 °C.

Tabulka č. 6. Založení pokusu.

varianta	inokulum (g)	směrodatná odchylka (g)	substrát (g)	směrodatná odchylka (g)	celkem (g)	směrodatná odchylka (g)
Žabovřesky+ kys. octová	30,0405	0,0294	0,3510	0,0025	80,4604	0,3692
Žabovřesky+ kys. propionová	30,0209	0,0229	0,2452	0,0032	80,0939	0,1221
Žabovřesky+ glukóza	30,0308	0,0215	0,4504	0,0010	80,9492	0,5407
Dřevec+ kys. octová	29,0436	0,0340	0,4442	0,0027	81,1213	0,5517
Dřevec+ kys. propionová	29,0508	0,0363	0,4412	0,0010	80,4042	0,2657
Dřevec+ glukóza	29,0709	0,0164	0,4420	0,0009	80,5499	0,2617

4.4.2 Druhá série

Test probíhal v 15- ti variantách se třemi opakováními. Postup založení druhé série testu byl totožný s první sérií. Jako substrát byly využity kyselina octová a glukóza. Z testu byla vyřazena varianta s kyselinou propionovou. Pro přidání prvků byl ve 250 ml baňce připraven roztok, který obsahoval 0,3005 g sloučeniny obsahující Se; 0,0225 g sloučeniny obsahující Mo; 0,6225 g sloučeniny obsahující Mn a 0,0675 g sloučeniny obsahující Co. Uvedená dávka prvků se váže k hmotnosti celé chemické sloučeniny. Obsah samotného prvku je dán jeho hmotnostním zlomkem v dané sloučenině. Dávka jednotlivých prvků byla volena tak, aby pro tyto prvky došlo k navýšení jejich koncentrace na hodnoty uvedené v tabulce č. 7. Tyto hodnoty byly dle zkušenosti provozovatelů BPS identifikovány jako vhodné z hlediska

optimální funkce systému (Rosenberg 2019). Chemické formy přidávaných prvků jsou uvedeny v tabulce č. 7. I v této sérii bylo upraveno pH, přídavek roztoku NaOH je uveden v tabulce č. 9. Množství přidaného NaOH není zahrnuto v celkové hmotnosti.

Tabulka č. 7. Chemické formy a požadovaná koncentrace přidávaných prvků.

Prvek	Chemická forma	Koncentrace (mg/kg sušiny)
Selen	Na ₂ SeO ₃	1,5
Mangan	MnSO ₄ *H ₂ O	50
Molybden	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4(H ₂ O)	2
Kobalt	CoCl ₂	3

Tabulka č. 8. Založení pokusu s přidáním prvků.

varianta	inokulum (g)	směrodatná odchylka (g)	Vzorek (g)	směrodatná odchylka (g)	celkem (g)	směrodatná odchylka (g)
Inokulum Dřevce	30,0196	0,0117	0,0000	0,0000	80,6584	0,3044
Dřevce+kys.octová	30,0277	0,0195	0,3451	0,0012	80,2904	0,0958
Dřevce+glukóza	30,0295	0,0204	0,4507	0,0007	80,1913	0,1339
Inokulum Žabovřesky	30,0210	0,0063	0,0000	0,0000	80,2346	0,1574
Žabovřesky+kys. octová	30,0320	0,0315	0,3498	0,0022	80,3694	0,0766
Žabovřesky+glukóza	30,0436	0,0055	0,4510	0,0005	80,2608	0,1444
Žabovřesky+Se	30,0264	0,0263	0,0000	0,0000	80,4284	0,3009
Ž. +Se+kys. octová	30,0174	0,0223	0,3523	0,0008	80,3855	0,1904
Ž. +Se+ glukóza	30,0336	0,0148	0,4506	0,0003	80,2947	0,1131
Ž. +Mo+Mn	30,0308	0,0085	0,0000	0,0000	80,3489	0,1570
Ž+Mo+Mn+kys. octová	30,0164	0,0106	0,3493	0,0008	80,3282	0,0959
Ž+Mo+Mn+glukóza	30,0287	0,0333	0,4504	0,0005	80,4011	0,0457
Ž+Mo+Mn+Co	30,0129	0,0077	0,0000	0,0000	80,2493	0,1249
Ž+Mo+Mn+Co+kys. octová	30,0467	0,0171	0,3489	0,0013	80,2871	0,1240
Ž+Mo+Mn+Co+glukóza	30,0340	0,0215	0,4504	0,0009	80,3855	0,0142

Tabulka č. 9. Úprava pH.

Varianta	NaOH 100 g/l (ml)
Dřevec+kys. octová	1,63
Žabovřesky+kys. octová	1,73
Žabovřesky. +Se+kys. octová	1,62
Žabovřesky+Mo+Mn+kys. octová	1,64
Žabovřesky+Mo+Mn+Co+kys. octová	1,65

4.5 Analytická stanovení

4.5.1 Stanovení sušiny a organické sušiny

Do misky z hliníkové folie, předem zvážené na analytických váhách (m_1) se přidá cca 30 g inokula. Následně je zvážena miska i se vzorkem (m_2). Miska se vzorkem se umístí do sušárny a vysuší do konstantní hmotnosti při 105 °C. Následně je umístěna do exsikátoru. Vysušená miska se znovu zváží (m_3) (Švehla 2012).

Celková sušina je vypočtena podle vztahu:

$$\% \text{ sušiny} = (m_3 - m_1) / (m_2 - m_1) \times 100 (\%) \quad (1).$$

Pro stanovení organické sušiny ve vzorku se miska i se vzorkem žihá do konstantní hmotnosti v peci při teplotě 550 °C. Po vyžihání a vychladnutí v exsikátoru se miska opět převáží (m_4). Organická sušina je vypočtena podle vztahu:

$$\% \text{ organické sušiny} = (m_3 - m_4) / (m_3 - m_1) \times 100 (\%) \quad (2).$$

4.5.2 Stanovení nižších mastných kyselin

Pro stanovení koncentrace NMK byl použit kapalinový chromatograf s plamenově ionizačním detektorem TRACE 1310, Termofisher. Základní parametry přístroje: název kolony- DB-FFAP, výrobce Agilent technologies, délka kolony 30 m, průměr kolony 0,25 mm, tloušťka filmu naneseného v koloně 0,25 μm , teplota detektoru 165 °C. Konkrétně byly stanoveny kyseliny - octová, propionová, máselná, izomáselná, izovalerová, valerová a kapronová.

4.5.3 Stanovení amoniakálního dusíku (N-amon)

Koncentrace amoniakálního dusíku byla stanovena indofenolovou metodou pomocí spektrofotometrických postupů. Měření bylo provedeno na spektrofotometru HACH DR/4000, při vlnové délce $\alpha = 655 \text{ nm}$, v jednocentimetrových kyvetách. Principem metody je reakce amoniaku, chlornanu a salicylanu v alkalickém prostředí za vzniku sloučeniny indofenolového typu. V alkalickém prostředí dochází k disociaci této sloučeniny na modré indofenolové barvivo vhodné pro spektrofotometrická stanovení. Reakce je katalyzována nitroprusidem sodným, a jelikož jeho roztok je zbarven žlutě, tak výsledné zbarvení proměřovaných roztoků je zelené. Pro zabránění rušivého vlivu kationtů hořčíku a vápníku je využíván přídatek citronanu sodného (Horáková 2000).

Vzorky byly předem odstředěny na odstředivce SIGMA 2-16P. Doba odstředění činila 10 minut při 13 500 otáčkách za minutu.

4.5.4 Stanovení pH

Pro stanovení hodnoty pH byl použit pH metr WTW 3110, elektroda SenTix 21. Elektroda po ponoření do vzorku měří automaticky. Elektrodu je nutno mezi jednotlivými měřeními opláchnout destilovanou vodou.

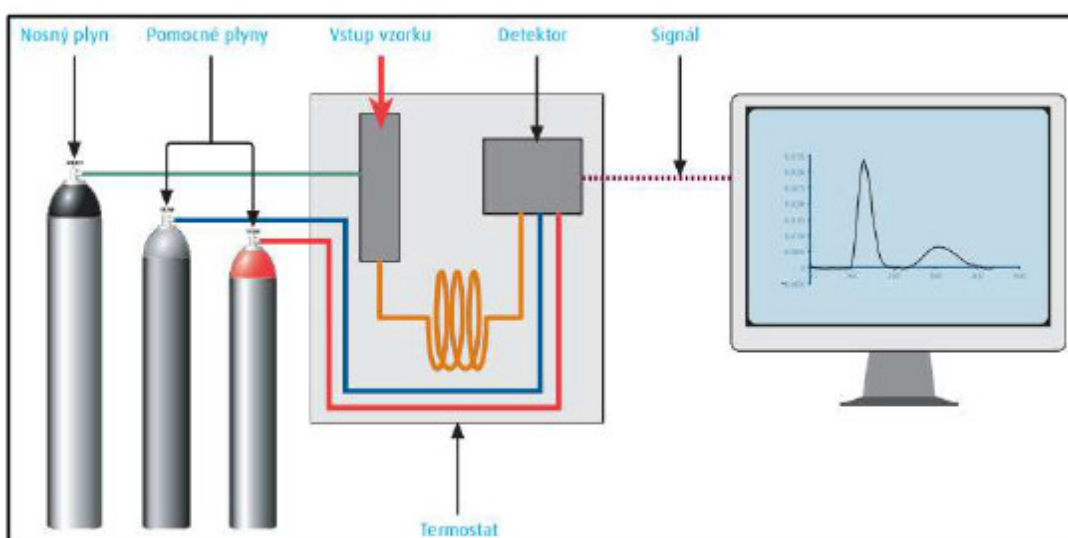
4.5.5 Stanovení koncentrace prvků

Pro stanovení koncentrace jednotlivých prvků byla použita metoda emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Před vlastní analýzou na ICP-OES byl proveden rozklad digestátu, resp. fugátu. Rozklad proběhl v mikrovlnném systému ETHOS při použití vysokotlakého rotoru. Doba trvání rozkladu byla 37 minut při zvyšujícím se výkonu 800 až 1000 W a teplota rozkladu dosahovala 160 až 210 °C v médiu obsahujícím 8 ml HNO_3 a 2 ml H_2O_2 . Poté byla v systému VAC 100 částečně odpařena HNO_3 a zbylý roztok byl převeden do zkumavky o objemu 25 ml pomocí demineralizované vody. Takto vzniklý roztok byl následně

analyzován metodou ICP-EOS, norným plynem byl argon, přístroj ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc.

4.5.6 Stanovení obsahu metanu v bioplynu

Měření obsahu metanu a oxidu uhličitého probíhalo za použití vysokoúčinného plynového chromatografu Master GC (DANI Instruments a. s.). Zde je využíván teplotně vodivostní detektor (TCD), nosným plynem je vodík a pro kalibraci je využíván kalibrační plyn Linde (směs 60 % CH₄ a 40 % CO₂). Principem metody je rozdělení složek mezi dvě fáze – fází pohyblivou (mobilní) a fází nepohyblivou (stacionární). Díky tomu je následně možné jednotlivé složky ze vzorku kvalitativně identifikovat a zároveň i kvantifikovat. Obrázek č. 2 schématicky představuje plynový chromatograf.



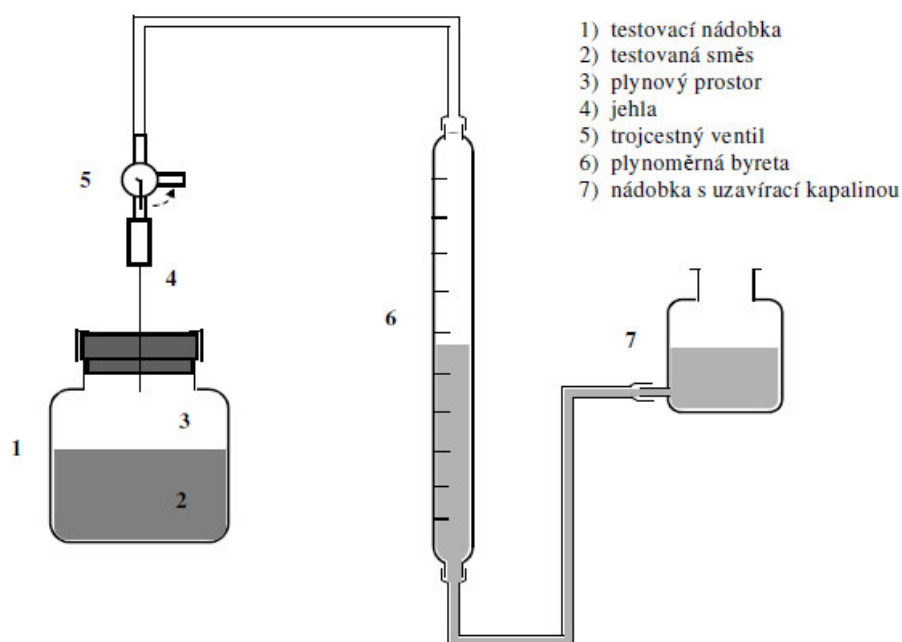
Obrázek č. 2. Schéma plynové chromatografie (<http://www.linde-gas.cz>).

V první sérii testů byl určen obsah metanu vždy u tří vzorků z každé varianty. První dva týdny bylo měření provedeno dvakrát v průběhu týdne, poté jednou za týden. V případě druhé série testu měření probíhalo vždy jednou týdně a to u dvou vzorků z každé varianty.

4.6 Stanovení produkce bioplynu

Produkce bioplynu byla měřena pravidelně, z počátku testu jednou denně, s blížícím se koncem testu a klesající produkcí bioplynu se frekvence měření postupně snižovala. Takto bylo umožněno sledování celkové produkce bioplynu a také jeho průběh. Měření bylo

prováděno na plynoměrné byretě (obrázek č. 3). Ta byla naplněna roztokem neabsorbujícím složky bioplynu – především CO₂, který se ve vodě velmi snadno rozpouští a to ovlivňuje měření (je používán roztok NaCl titrovaný na methylovanž) (Rosenberg 2010).



Obrázek č. 3. Schéma měření produkce bioplynu plynoměrnou byretou (Rosenberg 2010).

Celá aparatura je složena z kultivačního boxu se stálou teplotou 38 - 40°C. V boxu je prostor pro kultivaci vzorku a pro provádění měření. Samotné měření začíná uvolněním trojcestného kohoutu tak, aby plyn mířil do byrety a byl uzavřen výpustní otvor. Propíchně se septum lahvičky a čeká se, až plyn přejde do byrety. Poté se uchopí dělicí nálevka ze stojanu, ručně se vyrovná hladina v nádobce s hladinou v byretě a zaznamená se naměřená hodnota. Následně se pomocí trojcestného ventilu vypustí plyn a pokračuje se v měření dalších vzorků (Rosenberg 2010).

U druhé série experimentů byla zjišťována také hodnota produkce bioplynu ze substrátu (tzv. čistá produkce), která byla u vzorků s nadávkovaným substrátem zjištěna jako rozdíl produkce bioplynu v příslušné variantě s přídavkem daného substrátu a ve variantě obsahující pouze inokulum bez přídavku jakéhokoliv substrátu.

4.7 Zpracování dat

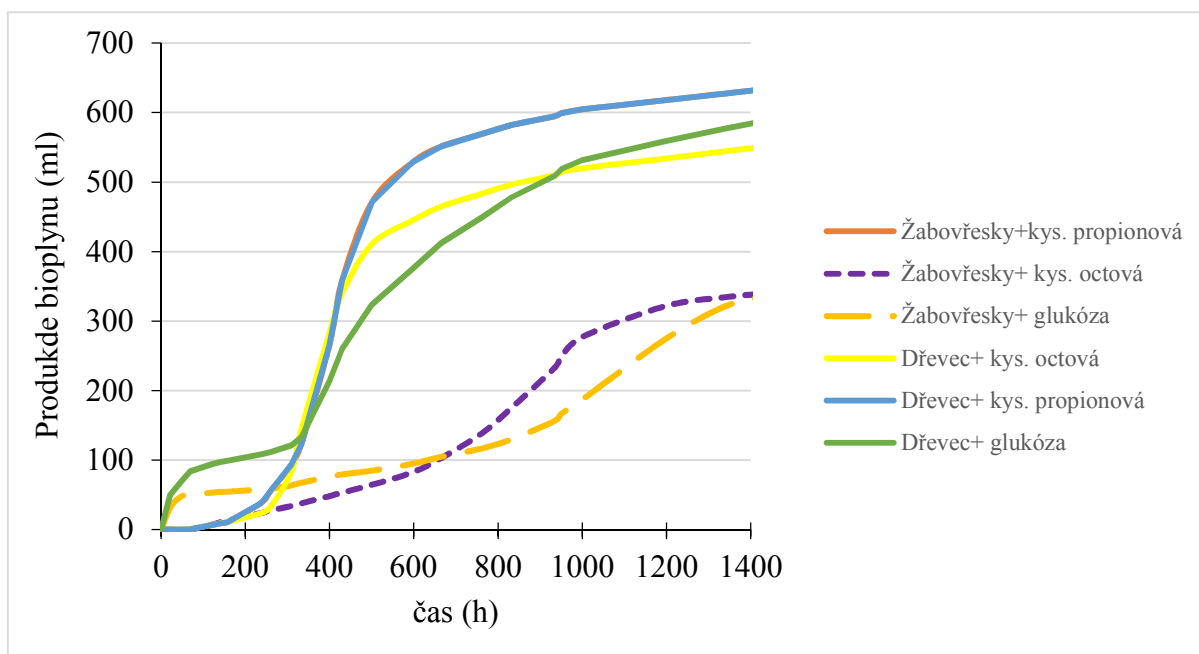
Pro zpracování dat, tvorbu grafů, matematické a statistické operace byl využit program Microsoft Excel 2007.

5 Výsledky

5.1 První série

5.1.1 Produkce bioplynu

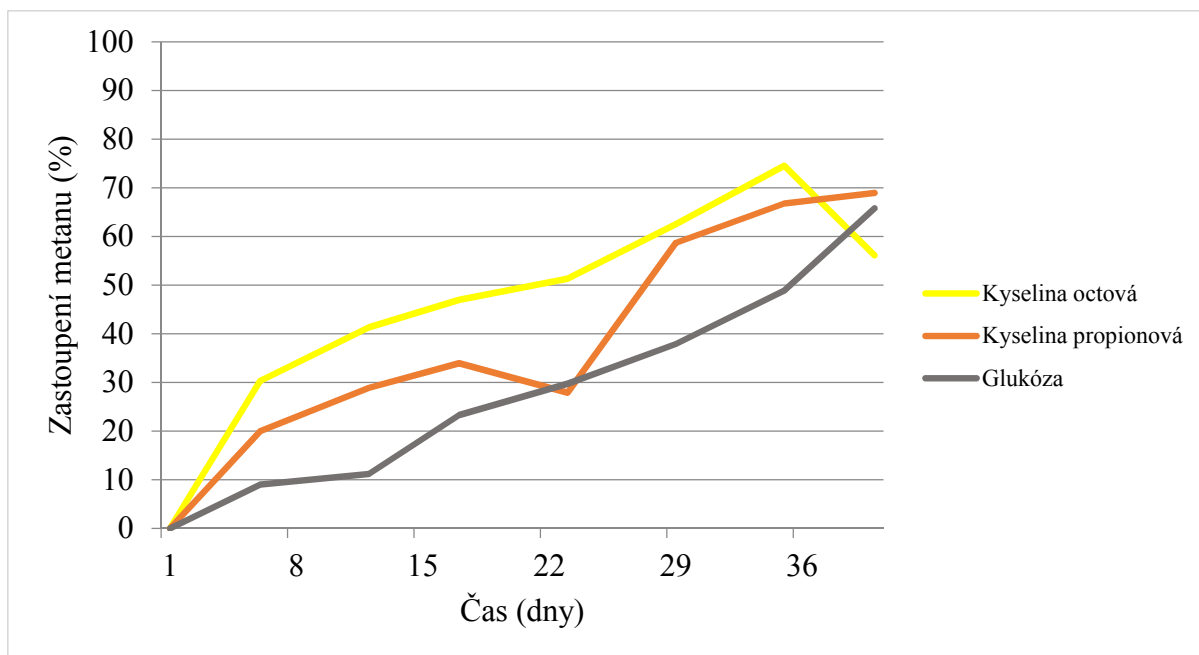
Na obrázku č. 4 je vyobrazeno srovnání produkce bioplynu z biomasy odebrané v BPS Dřevec a Žabovřesky v závislosti na použitém typu substrátů. Nejvyšší produkce byla u obou BPS zaznamenána v případě, kdy byla jako substrát zvolena kyselina propionová. Křivky se v tomto případě překrývají. Při porovnání produkce bioplynu, kde byla jako substrát zvolena glukóza, bylo zjištěno, že v případě BPS Žabovřesky je produkce o 43 % nižší než u BPS Dřevec. Ve variantě, kde byla jako substrát zvolena kyselina octová je produkce nižší o 38 %.



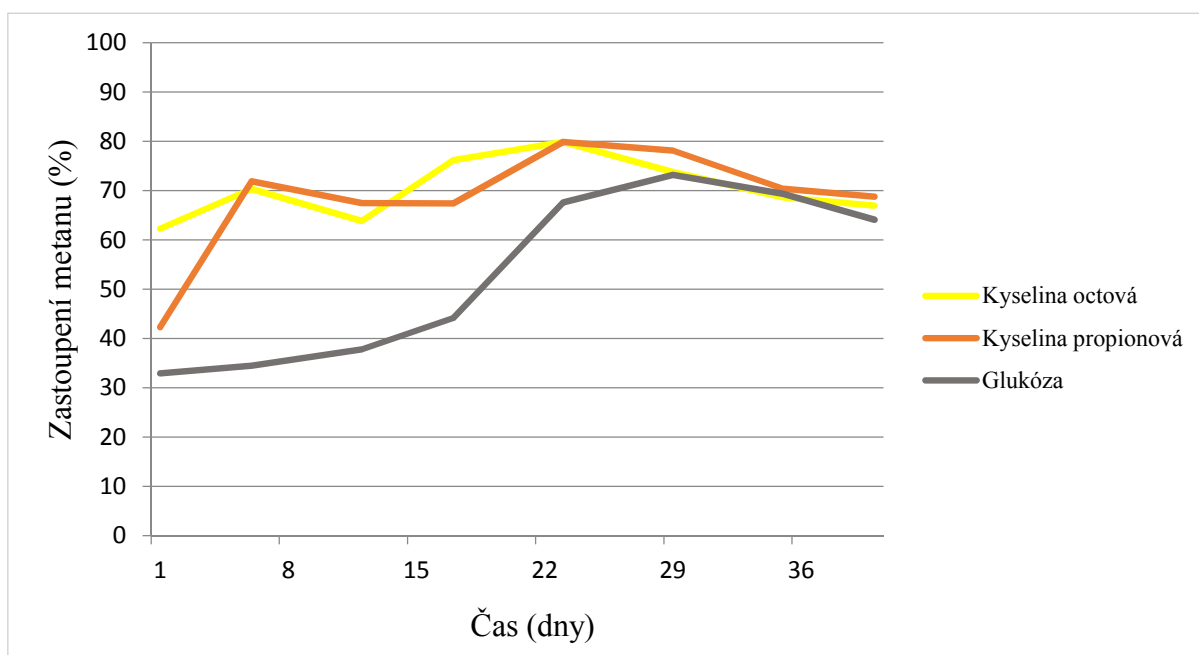
Obrázek č. 4. Kumulativní produkce bioplynu BPS Žabovřesky a Dřevec.

5.1.2 Obsah metanu v bioplynu

Z obrázku č. 5 je patrné, že v případě BPS Žabovřesky bylo zastoupení metanu v bioplynu na začátku pokusu nulové, narozdíl od BPS Dřevec, kde byla zaznamenána tvorba metanu již v prvních dnech (obrázek č. 6). Varianta Žabovřesky s kyselinou octovou ve 4. týdnu stoupla na přibližně stejné hodnoty zastoupení metanu jako BPS Dřevec, viz obrázek č. 6. V 5. týdnu zastoupení metanu kleslo. V posledním dnu experimentu se varianty s glukózou a kyselinou propionovou u obou BPS dostaly na srovnatelné hodnoty zastoupení metanu.



Obrázek č. 5. Zastoupení metanu v bioplynu BPS Žabovřesky.



Obrázek č. 6. Zastoupení metanu v bioplynu BPS Dřevec.

5.2 Druhá série

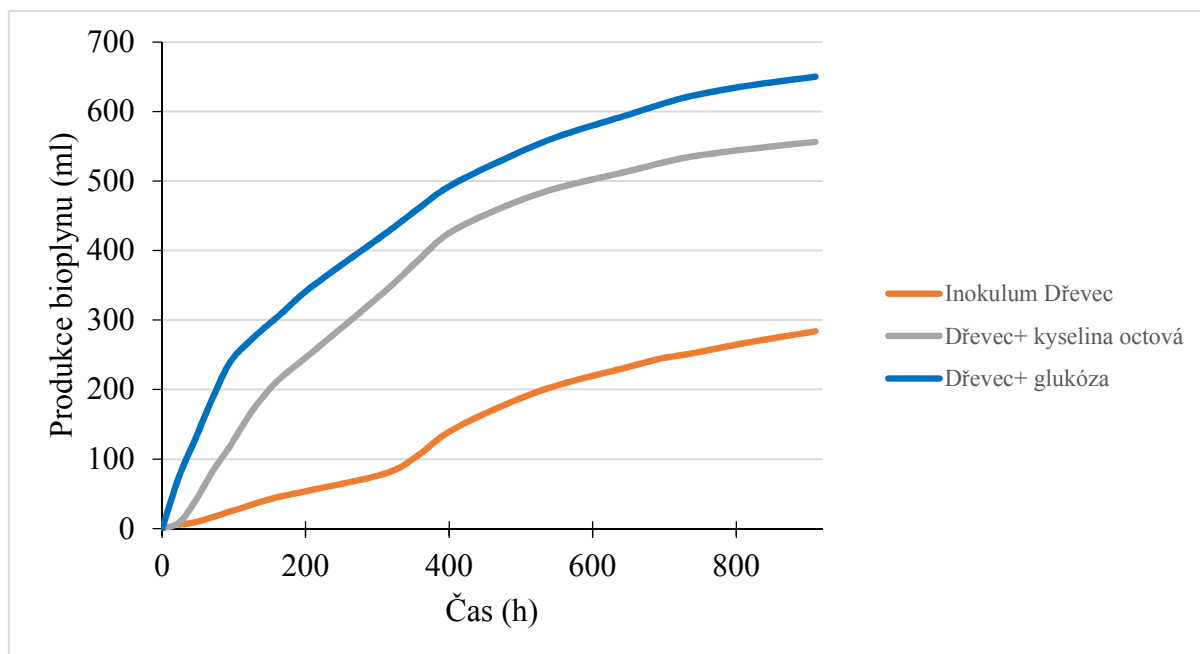
5.2.1 Produkce bioplynu

Obrázek č. 7 představuje kumulativní produkci bioplynu z biomasy odebrané v BPS Dřevec v závislosti na použitém typu substrátu.

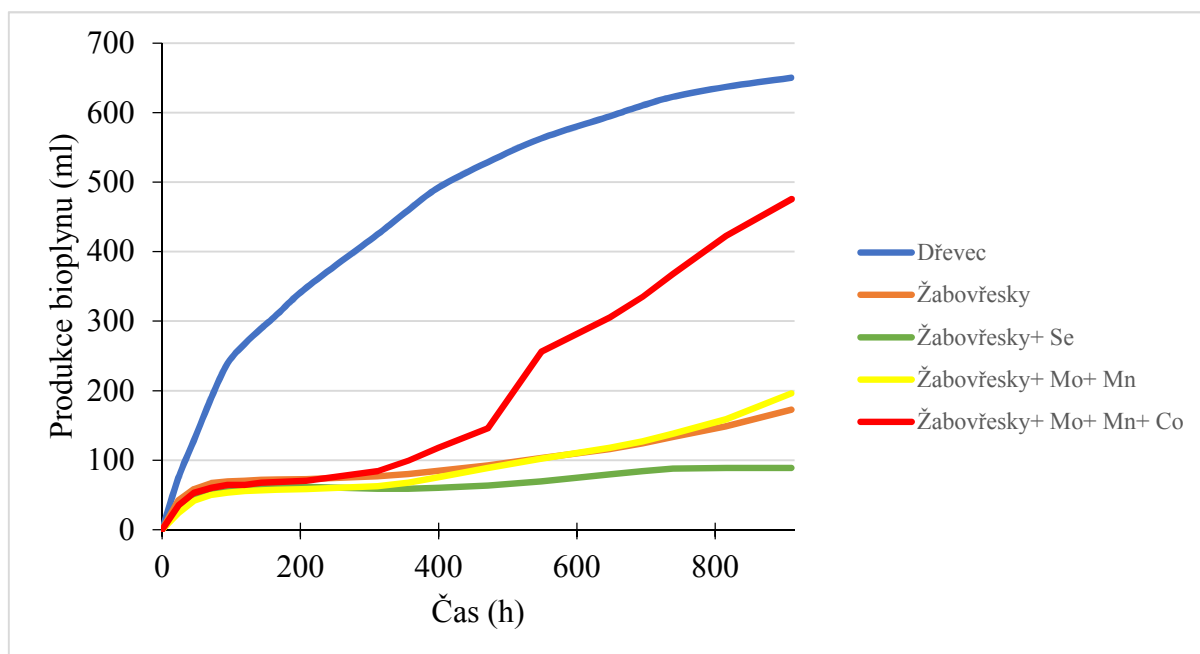
Obrázky č. 8 a 9 představují srovnání produkce bioplynu z biomasy odebrané v BPS Dřevec a Žabovřesky v závislosti na použitém typu substrátu s přidáním vybraných prvků.

Čistá produkce ze substrátu v případě inokula odebraného z BPS Dřevce činila 272 ml v případě kyseliny octové a 366 ml v případě glukózy.

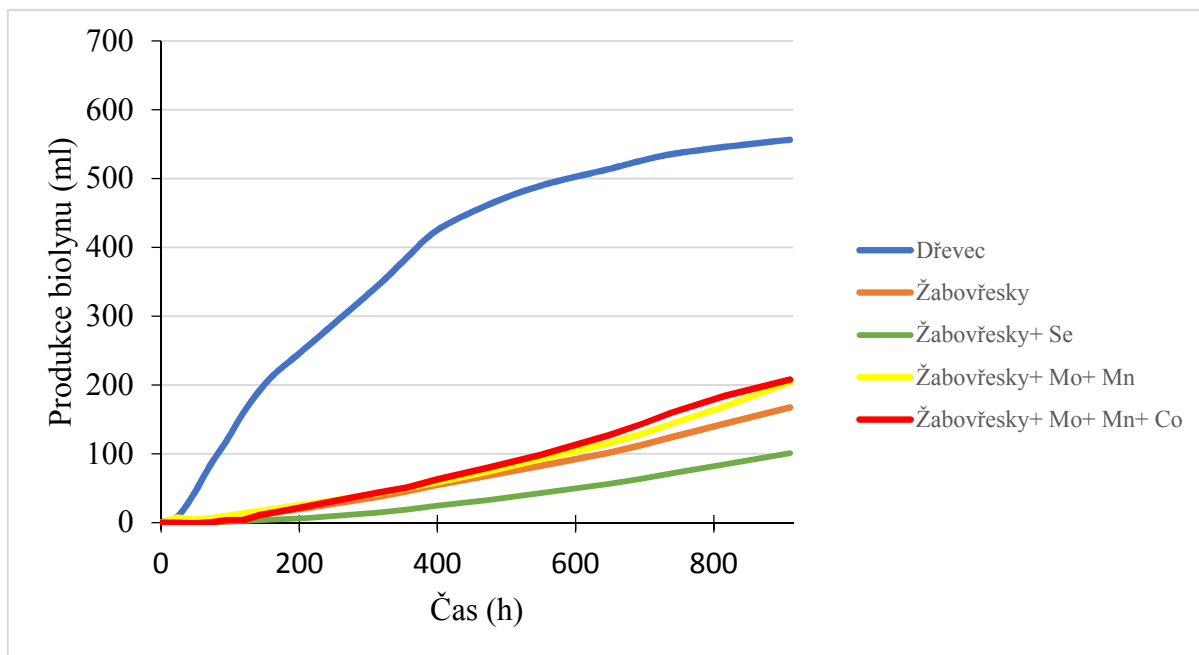
Čistá produkce v případě inokula odebraného z BPS Žabovřesky činila 91 ml v případě kyseliny octové a 97 ml v případě glukózy.



Obrázek č. 7. Kumulativní produkce bioplynu BPS Dřevce.

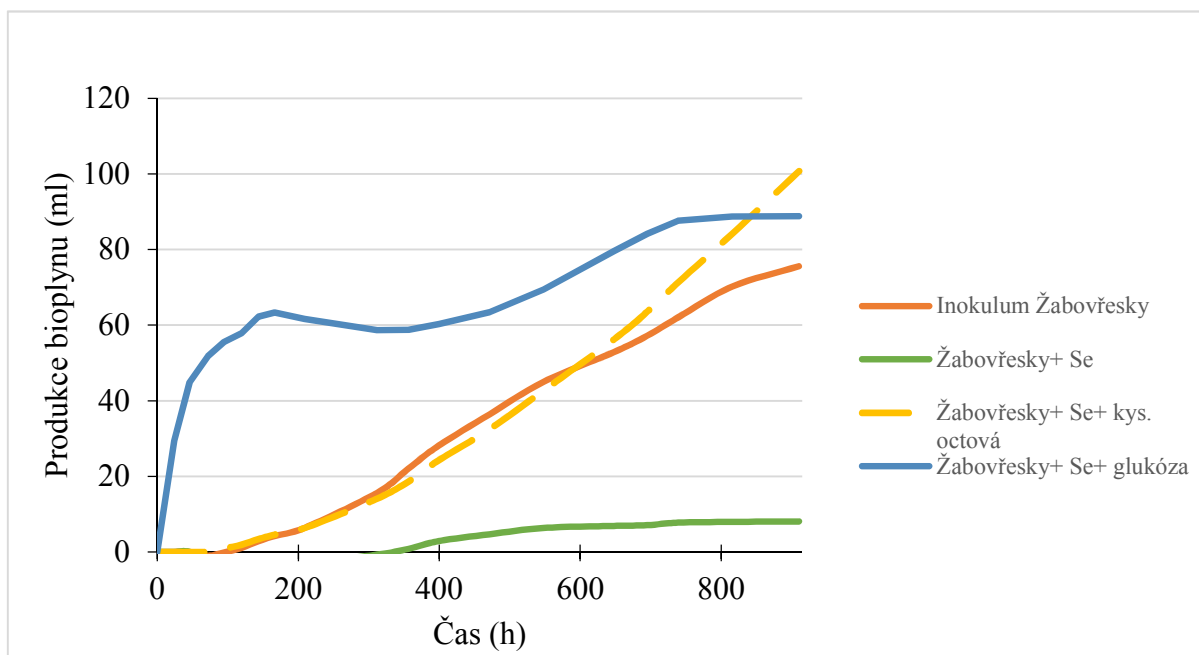


Obrázek č. 8. Kumulativní produkce bioplynu - glukóza.



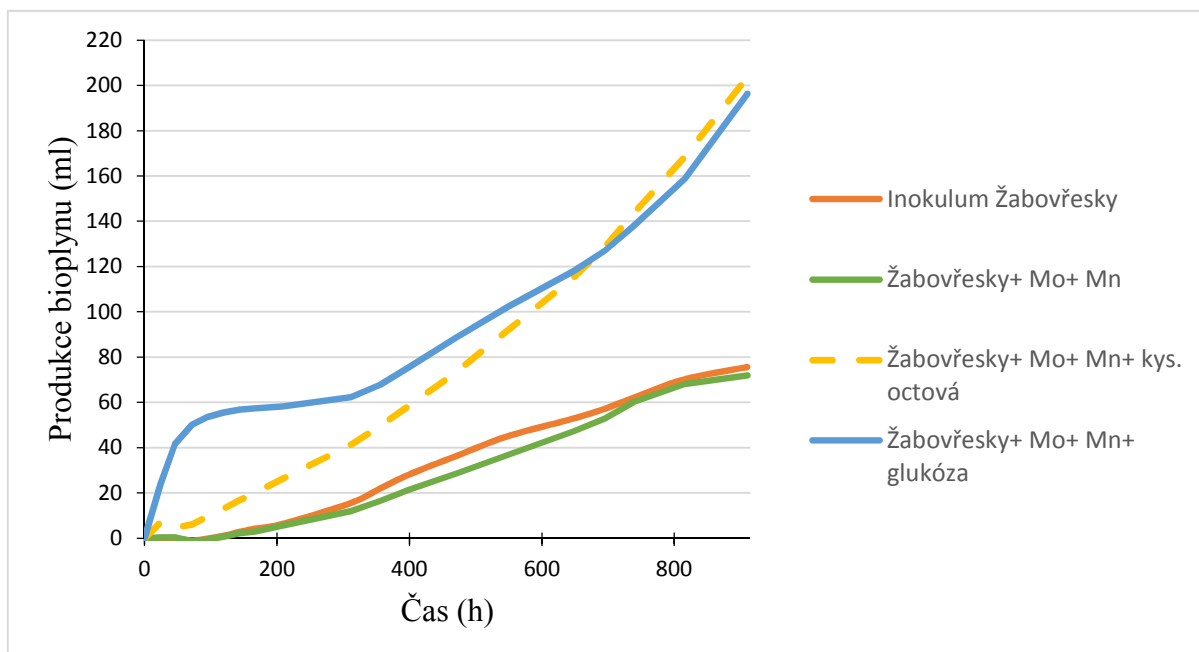
Obrázek č. 9. Kumulativní produkce bioplynu - kyselina octová.

Obrázky č. 10, 11 a 12 zobrazují vliv přidání konkrétních prvků na množství produkovaného bioplynu.



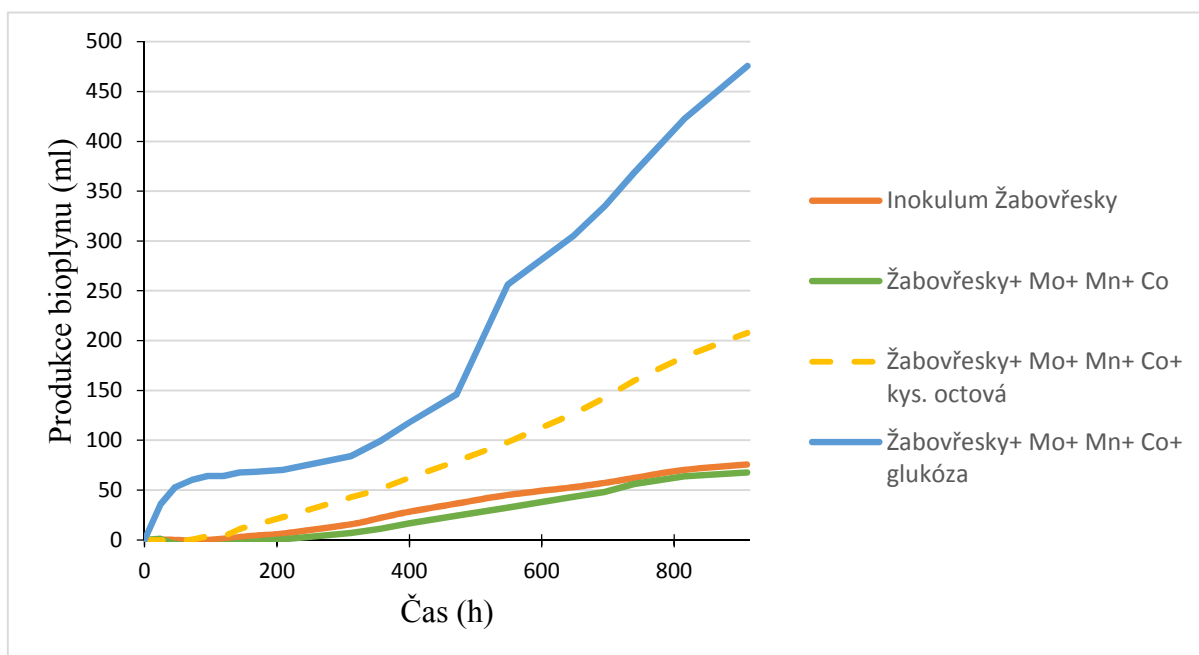
Obrázek č. 10. Kumulativní produkce bioplynu - přidavek selenu.

Po přidavku selenu ke zvoleným substrátům činila čistá produkce 81 ml v případě glukózy a 92 ml v případě kyseliny octové.



Obrázek č. 11. Kumulativní produkce bioplynu - přidavek molybdenu a manganu.

Přidání kombinace molybdenu a manganu mělo pozitivní výsledek. Ve variantě s glukózou čistá produkce činila 124 ml, ve variantě s kyselinou octovou 132 ml.



Obrázek č. 12. Kumulativní produkce bioplynu - přidavek molybdenu, manganu a kobaltu.

Po přidání kombinace molybdenu, manganu a kobaltu byla zaznamenána nejvyšší produkce bioplynu. Ve variantě s glukózou činila čistá produkce 408 ml a ve variantě s kyselinou octovou 140 ml.

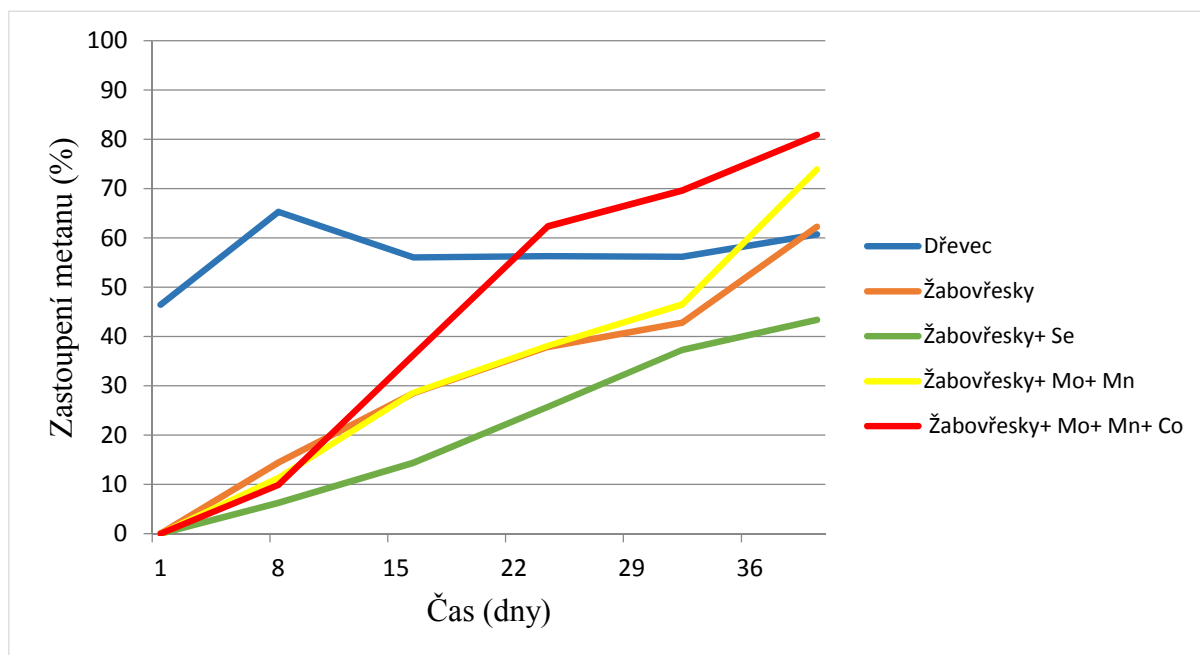
5.2.2 Obsah metanu v bioplynu

Obrázky č. 13 a 14 představují zastoupení metanu v bioplynu po přidání vybraných prvků v závislosti na zvoleném typu substrátu.

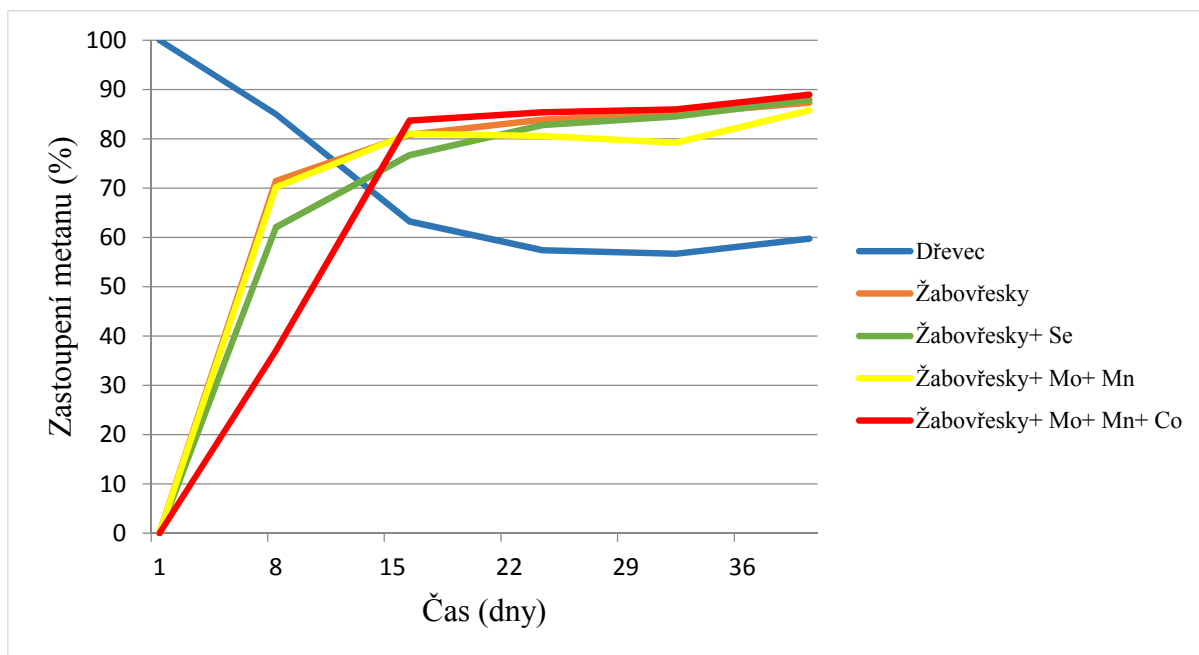
Zastoupení metanu v bioplynu u variant s inokulem z BPS Dřevec se v obou typech substrátu pohybovalo okolo 60 %.

V případě inokula z BPS Žabovřesky se po přidavku chemických prvků ve variantě s glukózou zastoupení metanu zvyšovalo postupně, přičemž nejvyššího obsahu metanu bylo dosaženo po přidání kombinace všech 3 prvků. Ve variantě s kyselinou octovou bylo zastoupení metanu vyšší již v prvním týdnu experimentu. V této variantě nebylo zaznamenáno výrazné zlepšení po přidání vybraných prvků.

Po přidání všech 3 prvků v kombinaci se substrátem glukózou se zvýšila čistá produkce bioplynu o 311 ml a zastoupení metanu na konci testu z 63 % na 81 %.



Obrázek č. 13. Zastoupení metanu v bioplynu - glukóza.



Obrázek č. 14. Zastoupení metanu v bioplynu - kyselina octová.

6 Diskuze

Výsledky první série testů potvrdily předpoklad, že v zařízeních, jež zpracovávají pouze jediný druh substrátu, se potýkají s problémy, jako je výrazně nižší produkce bioplynu. Při porovnání inokula odebraného v objektech BPS Žabovřesky a BPS Dřevce bylo vyzorováno, že BPS zpracovávající pouze silážní kukuřici trpí nedostatkem vybraných prvků a produkce bioplynu byla v této souvislosti o 38 – 43 % nižší (obrázek č. 4) v porovnání s BPS, u které je složení substrátu rozmanité. To je ve shodě s Narra et al. (2016), kde taktéž zaznamenali rozdíl v produkci bioplynu mezi 37 – 46 %. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi výslednou produkcí bioplynu ve variantě s kyselinou octovou a s glukózou. Ve variantě s kyselinou propionovou bylo překvapivě dosaženo stejných hodnot produkce bioplynu v případě inokula z BPS Dřevce i Žabovřesky. Vzhledem k faktu, že v BPS Žabovřesky neprobíhá anaerobní fermentace uspokojivě, není pravděpodobné, že by výsledky mohly být totožné. Možnou příčinou je zanesení živin spolu s dávkovaným substrátem. V druhé sérii testu byla tato varianta vyřazena a pokračovalo se pouze s kyselinou octovou a glukózou. Zastoupení metanu v bioplynu bylo v posledním týdnu měření totožné u obou BPS. V inokulu odebraném v reaktoru BPS Žabovřesky byla naměřena vyšší suma NMK (tabulka č. 4), což může mít spojitost s nedostatkem vybraných prvků. Na souvislost mezi nedostatkem prvků a hodnotou NMK upozorňují ve své práci Paul & Roy (2018), kteří se domnívají, že absence prvků může mít negativní vliv na tvorbu a další rozklad NMK a proces může být výrazně zpomalen či inhibován. Zhang et al. (2015) potvrzují vliv vybraných prvků na tvorbu NMK. Kayhanian & Rich (1995) také vyzdvihují důležitou roli selenu při tvorbě NMK. Jagadabhi et al. (2019) zaznamenali, že po suplementaci železa, niklu, kobaltu a molybdenu klesla hodnota NMK až o 18 %. Suplementace prvků tedy nemusí nutně zvýšit produkci bioplynu, ale může mít vliv na udržení stability procesu.

Z naměřených počátečních koncentrací vybraných prvků (tabulka č. 5) je patrné, že nižší koncentrace byly zaznamenány i u prvků, které nebyly součástí experimentu. Počáteční koncentrace železa v případě inokula z BPS Žabovřesky je téměř o polovinu nižší než počáteční koncentrace v inokulu BPS Červené Janovice. Řada autorů se shoduje, že železo je jedním z klíčových prvků procesu. Existuje pravděpodobnost, že přidavek železa by mohl zlepšit výsledky testů. Feroso et al. (2009) popisuje, že železo může mít pozitivní vliv na biologickou dostupnost ostatních prvků. Trojnásobně nižších hodnot bylo naměřeno i u počáteční koncentrace mědi v inokulu z BPS Žabovřesky oproti inokulu z BPS Červené Janovice. Je na zvážení, zda tyto hodnoty mohou mít souvislost, jelikož

Myszograj et al. (2018) upozorňuje, že úloha mědi v procesu je zatím nejistá a je potřeba dalších studií k potvrzení či vyvrácení jejího pozitivního přínosu.

V druhé sérii testu bylo potvrzeno, že suplementací vybraných prvků lze zvýšit množství produkovaného bioplynu. V testované variantě, kdy byl suplementován pouze samotný selen byl zaznamenán negativní výsledek. V hodnotách čisté produkce byla v případě kyseliny octové naměřena totožná produkce bioplynu jako bez přídavku prvku a ve variantě s glukózou produkce klesla o 5 %. Důvodem, proč samotný selen proces inhiboval, mohl být jeho přídavek v nadměrném množství. Myszograj et al. (2018) upozorňuje, že hranice mezi optimální dávkou prvku a dávkou, která již proces inhibuje je nízká. Lenz & Lens (2009) a Jain & Van Hullebusch (2015), se také shodují na nutnosti přesného propočtení dávky selenu, která následně vede ke zlepšení procesu. Wyman et al. (2019) se zabývali dávkováním samotného baria, přičemž stanovili hodnoty, při kterých dochází k inhibici procesu, viz kapitola 3.3.9. Suplementace prvků do procesu má význam jen tehdy, pokud jsou jejich koncentrace nízké či nulové. Stále je nutné zaměřit se na fakt, že vybrané prvky jsou běžně řazeny mezi toxické a jejich účinky se odvíjí od množství, které je dávkováno. Existuje také pravděpodobnost, že efekt jednotlivých prvků je závislý na koncentraci ostatních prvků a míra zlepšení po suplementaci se odvíjí od kombinace těchto prvků. To mohlo být příčinou, proč nebylo dosaženo uspokojivých výsledků ve variantě se samotným selenem. Myszograj et al. (2018) uvádí, že přítomnost jednoho prvku může ovlivnit speciaci jiného a tím i jeho biologickou dostupnost. Evranos et al. (2015) se také zabývali zlepšením procesu v případě mono-fermentace silážní kukuřice. Studie byla zaměřena na vliv niklu, kobaltu a molybdenu. I v tomto případě suplementace samotného niklu a samotného kobaltu neměla vliv na množství produkovaného bioplynu, ale nebylo zaznamenáno ani výrazné zhoršení procesu.

Zastoupení metanu ve variantě, kde byl přidán samotný selen bez přídavku substrátu se pohyboval okolo 60 %, to je méně, než bylo zaznamenáno ve variantě se samotným inokulem. Stejnou hodnotu zaznamenal Evranos et al. (2015) při přidávání samotného niklu. Na rozdíl od Pobeheim et al. (2010), kteří pozorovali, že přidání samotného kobaltu zvýšilo množství produkovaného metanu o 15 %. Pobeheim et al. (2011) pozorovali, že v reaktorech, které byly zpočátku fermentace omezeny nedostatečným množstvím niklu, nedošlo k významným rozdílům v produkci bioplynu a zastoupení metanu po jeho individuálním doplnění.

Zastoupení metanu v bioplynu se zvýšilo na hranici 90 % po přidání kyseliny octové. Glukóza neměla na obsah metanu pozitivní vliv a jeho zastoupení se pohybovalo pouze okolo 40 %.

V případě kombinace molybdenu a manganu se čistá produkce zvýšila v kombinaci s přidávanými substráty. Produkce bioplynu inokula z BPS Žabovřesky byla původně o 73 % nižší než u inokula z BPS Dřevec ve variantě s glukózou, přidavkem molybdenu a manganu bylo docíleno zvýšení čisté produkce o 7 %. Ve variantě s kyselinou octovou byla produkce bioplynu inokula z BPS Žabovřesky nižší o 66 % než u inokula z BPS Dřevec, přidavkem molybdenu a manganu bylo docíleno zvýšení čisté produkce bioplynu o 15 %.

Zastoupení metanu v bioplynu se ve všech variantách kromě glukózy pohybovalo okolo 85 %. V případě glukózy byl nárůst postupný a obsahu metanu nad 70 % bylo dosaženo až v posledním dnu měření. Evranos et al. (2015) při suplementaci niklu a kobaltu také nezaznamenali vliv na obsah metanu v bioplynu. Pobeheim et al. (2011) dávkovali kombinaci niklu a kobaltu, přičemž bylo zjištěno, že správně zvolený poměr těchto prvků má pozitivní vliv a fermentor je schopen pracovat při vyšším zatížení organickými látkami.

Jako nejvhodnější se jeví varianta doplnění směsi manganu, molybdenu a kobaltu. V této variantě byla pozorována nejvyšší produkce bioplynu i obsah metanu. Hodnota čisté produkce bioplynu ve variantě s glukózou dokonce převýšila čistou produkci bioplynu inokula z BPS Dřevec. Produkce bioplynu inokula z BPS Žabovřesky byla původně o 73 % nižší než u inokula z BPS Dřevec ve variantě s glukózou, přidavkem manganu, molybdenu a kobaltu bylo docíleno zvýšení produkce o 84 %. V této variantě bylo zaznamenáno největší zlepšení, hodnota čisté produkce bioplynu byla o 11 % vyšší než produkce bioplynu inokula z BPS Dřevec. Ve variantě s kyselinou octovou byla produkce bioplynu inokula z BPS Žabovřesky nižší o 66 %, přidavkem manganu, molybdenu a kobaltu bylo docíleno zvýšení produkce bioplynu o 17 %.

Obsah metanu v bioplynu se pohyboval v rozmezí 80 – 90 %, čímž se dostal na vyšší hodnoty než v případě inokula z BPS Dřevec, u kterého se zastoupení metanu pohybovalo okolo 60 %. Tím bylo potvrzeno, že přidavek kombinace prvků má značný vliv jak na produkci bioplynu, tak na zastoupení metanu v bioplynu a jejich správné dávkování vede k výraznému zlepšení procesu. Z dosud publikovaných prací jednoznačně vyplývá, že strategie dávkování prvků by měla být založena na jejich správné kombinaci a individuální dávkování prvků nemá ve

většině případů pozitivní vliv. Autoři se shodují, že stěžejními prvky jsou železo, kobalt, nikl, mangan, molybden a selen (Yazdanpanah et al. 2018).

V případě mono-fermentace silážní kukuřice je vyzdvihován vliv především niklu, kobaltu, manganu, molybdenu a selenu, což potvrzují výsledky druhé série testu. Facchin et al. (2013), Menon et al. (2017), Moestedt et al. (2016), či Zhang et al. (2012), se ve svých pracích zabývali přidavkem zmíněných prvků. Všichni uvedení autoři se shodli na pozitivních výsledcích v případě dávkování směsí.

Důležitým parametrem při sledování vlivu přidavku prvků je čas. Experiment trval 40 dnů. Zastoupení metanu v bioplynu ve všech variantách rostlo s přibývajícím počtem dní. Dosud publikované studie ve většině případů trvaly déle než 100 dnů. Evranos et al. (2015) zaznamenal, že zlepšení bylo přímo úměrné narůstající délce experimentu. V tomto ohledu je nutné zvážit případné prodloužení experimentu v rámci budoucího testování.

Neméně, důležitá je také forma, ve které jsou prvky do procesu přidávány. Nejčastěji je využíváno chemických sloučenin. Existují však alternativy v podobě míchání vstupních substrátů se substráty bohatými na vybrané prvky. Choong et al. (2016) a Ye et al. (2018) se shodují, že míchání vstupních substrátů může snížit množství užívaných chemických přísad. Zároveň je nutné, aby byla známa počáteční koncentrace vybraných prvků v substrátech. Ratanatamskul et al. (2015) či Liao et al. (2014) poukazují na fakt, že klíčem k úspěšnému doplnění prvků v podobě míchání vstupních substrátů je přesně vypočtená dávka substrátů a podrobná znalost jejich složení.

7 Závěr

Sérií testů byla potvrzena základní hypotéza práce. Příliš nízký obsah prvků, které zaujímají funkci mikroživin pro mikroorganismy zodpovědné za stabilní průběh anaerobní fermentace, vedl ke značnému snížení produkce bioplynu a obsahu metanu v bioplynu.

Přidání kombinace prvků do procesu anaerobní fermentace umožnilo zvýšit množství produkovaného bioplynu v nejlépe hodnocené variantě, čímž bylo dosaženo o 11 % vyšší hodnoty produkce bioplynu než ve variantě s inokulem odebraným v reaktoru stabilně fungující BPS. Obsah metanu v bioplynu se pohyboval v rozmezí 80–90 %, čímž se také dostal na vyšší hodnoty než v případě inokula ze stabilně fungující BPS. Pozitivní vliv dávkování jednotlivých prvků samostatně nebyl potvrzen.

Z práce jednoznačně vyplývá, že přítomnost mikronutrientů je významným limitujícím faktorem celého procesu. Z doposud provedených studií je patrné, že vysoké koncentrace vybraných chemických prvků mohou proces inhibovat, avšak jejich příliš nízká koncentrace působí stejné problémy. Pozornost by v tomto směru měla být věnována především volbě správných koncentrací prvků a jejich nejefektivnějším kombinacím.

Jeví se jako účelné také zvážit formu dávkování prvků do procesu. Doposud bylo ve většině případů užíváno chemických sloučenin. Jako vhodná alternativa se jeví míchání vstupních substrátů. Zde by (za předpokladu nízkého obsahu rizikových látek) bylo možno využít například kaly z ČOV.

8 Literatura

- Adekunle KF, Okolie JA. 2015. A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology* **6** (3): 205.
- Bajpai, P. 2017. Process Parameters Affecting Anaerobic Digestion. Pages 13-27 in *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*. Springer, Singapore.
- Balat M, Balat H. 2009. Biogas as a renewable energy source - a review. *Energy Sources, Part A* **31** (14): 1280-1293.
- Baweja M, Baredar P, Lal RR. 2018. Parametric Evaluation of Bio-Digestion Process - A Review. *American Journal of Energy Engineering* **6** (1): 6-9.
- Čermáková J. 2009. Nové trendy ve využití bioplynu. In *Sborník příspěvků ze semináře „Energie z biomasy X“*. Vysoké učení technické, Brno. Available from <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/nove-trendy-ve-vyuziti-bioplynu> (accessed March 2019).
- Demirel B, Scherer P. 2011. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy* **35** (3): 992-998.
- Dobre P., Nicolae F., Matei F. 2014. Main factors affecting biogas production - an overview. *Romanian Biotechnological Letters* **19** (3): 9283-9286.
- Evranos B, Demirel B. 2015. The impact of Ni, Co and Mo supplementation on methane yield from anaerobic mono-digestion of maize silage. *Environmental technology* **36** (12): 1556-1562.
- Facchin V, Cavinato C, Pavan P, Bolzonella D. 2013. Batch and continuous mesophilic anaerobic digestion of food waste: effect of trace elements supplementation. *Chemical Engineering Transactions* **32**: 457-462.

Fermoso FG, Bartacek J, Jansen S, Lens PNL. 2009. Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application. *Science of The Total Environment* **407** (12): 3652-3667.

Fermoso FG, Van Hullebusch ED, Guibaud G, Collins G, Svensson BH, Carliell-Marquet C, Frunzo L. 2015. Fate of trace metals in anaerobic digestion. *Biogas Science and Technology*: 171-195.

Gavala HN, Angelidaki I, Ahring BK. 2003. Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. Pages 57-93 in *Biomethanation I*. Berlin, Heidelberg, Springer.

Geršl M, Mareček J, Šotnar M, Kudělka J, Koutný T, Vítěz T, Krčálová E. 2014. Mineralogicko-chemická charakteristika fermentačních zbytků při výrobě bioplynu a možnosti jejich využití pro zlepšení vlastností půd. Mendelova univerzita, Brno. Available from http://eagri.cz/public/web/file/357316/Mineralogicko_chemicka_charakteristika_MZe_2014_devzdana_prace_tisk.pdf (accessed March 2019).

González-Suárez A, Perenda-Reyes I. 2018. Bioavailability and dosing strategies of mineral in anaerobic mono-digestion of maize straw. *Engineering in Life Sciences* **18** (8): 562-569.

Horáková M. 2000. *Analytika vody*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.

Chen JL, Ortiz R, Steele TW, Stuckey DC. 2014. Toxicants inhibiting anaerobic digestion: a review. *Biotechnology advances* **32** (8): 1523-1534.

Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology* **99** (10): 4044-4064.

Choong YY, Norli I, Abdullah AZ, Yhaya MF. 2016. Impacts of trace element supplementation on the performance of anaerobic digestion process: A critical review. *Bioresource technology* **209**: 369-379.

Chynoweth DP, Owens JM, Legrand R. 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable energy* **22** (1-3): 1-8.

Jagadabhi PS, Kaparaju P, Väisänen A, Rintala J. 2019. Effect of macro-and micro-nutrients addition during anaerobic mono-digestion of grass silage in leach-bed reactors. *Environmental technology*, **40**(4): 418-429.

Jain R, van Hullebusch ED. 2015. Role of selenium in the anaerobic digestion. Page 12 in *The 4th International Conference on Research Frontiers in Chalcogen Science & Technology*. Institute for Water Education, Delft.

Kára J, Pastorek Z, Příbyl E. 2007. Výroba a využití bioplynu v zemědělství. Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha. Available from <https://docplayer.cz/5999995-Cr-vyroba-a-vyuziti-bioplynu-v-zemedelstvi.html> (accessed March 2019).

Kayhanian M, Rich D. 1995. Pilot-scale high solids thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste with an emphasis on nutrient requirements. *Biomass and bioenergy* **8** (6): 433-444.

Khoiyangbam RS, Gupta N, Kumar S. 2011. Biogas technology: towards sustainable development. The Energy and Resources Institute, New Delhi. Available from https://www.researchgate.net/publication/261136066_Biogas_Technology_towards_sustainable_development (accessed March 2019).

Kiran EU, Stamatelatou K, Antonopoulou G, Lyberatos G. 2016. Production of biogas via anaerobic digestion. Pages 259-301 in Luque R, Lin CSK, Wilson K, editors. *Handbook of Biofuels Production (Second Edition)*. Woodhead Publishing, Amsterdam.

Kratochvílová Z, Habart J, Sladký V, Jelínek F, Rosenberg T, Stupavský V, Dvořáček T. 2009. Průvodce výrobou a využitím bioplynu. České sdružení pro biomasu. Available from <https://biom.cz/cz/knihovna/pruvodce-vyrobou-a-vyuzitim-bioplynu> (accessed March 2019).

Krishna RH. 2013. Role of factors influencing on anaerobic process for production of biohydrogen: future fuel. *International Journal of Advanced Chemistry* **1** (2): 31-38.

Kwietniewska E, Tys J. 2014. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and sustainable energy reviews* **34**: 491-500.

Lenz M, Lens PN. 2009. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Science of the Total Environment* **407** (12): 3620-3633.

Leonzio G. 2018. An innovative trigeneration system using biogas as renewable energy. *Chinese Journal of Chemical Engineering* **26** (5): 1179-1191.

Liao X, Zhu S, Zhong D, Zhu J, Liao L. 2014. Anaerobic co-digestion of food waste and landfill leachate in single-phase batch reactors. *Waste Management* **34**: 2278-2284.

Linde Group. 2019. Technické plyny Česká republika. Linde Group. Available from <https://www.linde-gas.cz/cs/index.html> (accessed March 2019).

Matheri AN, Belaid M, Seodigeng T, Ngila JC. 2016. The role of trace elements on anaerobic codigestion in biogas production. Available from <https://ujcontent.uj.ac.za/vital/access/services/Download/uj:20371/SOURCE1> (accessed March 2019).

Menon A, Wang JY, Giannis A. 2017. Optimization of micronutrient supplement for enhancing biogas production from food waste in two-phase thermophilic anaerobic digestion. *Waste management* **59**: 465-475.

Moestedt J, Nordell E, Yekta SS, Lundgren J, Martí M, Sundberg C, Björn A. 2016. Effects of trace element addition on process stability during anaerobic co-digestion of OFMSW and slaughterhouse waste. *Waste management* **47**: 11-20.

Mudhoo A. 2012. *Biogas production: pretreatment methods in anaerobic digestion*. John Wiley & Sons.

Myszograj S, Stadnik A, Pluciennik-Koropczuk E. 2018. The Influence of Trace Elements on Anaerobic Digestion Process. *Civil and Environmental Engineering Reports* **28** (4): 105-115.

- Narra M, Balasubramanian V, Kurchania A, Pathak BS, Shyam M. 2016. Enhanced biogas production from rice straw by selective micronutrients under solid state anaerobic digestion. *Bioresource technology* **220**: 666-671.
- Ortner M., Rameder M., Rachbauer L., Bochmann G., Fuchs W. 2015. Bioavailability of essential trace elements and their impact on anaerobic digestion of slaughterhouse waste. *Biochemical engineering journal* **99**: 107-113.
- Paul S, Roy PC. 2018. "Anaerobic Digestion of Biomass Waste : A Comprehensive Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology* **4** (4): 1099-1103.
- Pobeheim H, Munk B, Johansson J, Guebitz GM. 2010. Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource technology*, **101** (2): 836-839.
- Pobeheim H., Munk B., Lindorfer H., Guebitz GM. 2011. Impact of nickel and cobalt on biogas production and process stability during semi-continuous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage. *Water research* **45** (2): 781-787.
- Rajagopal R, Massé DI, Singh G. 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource technology* **143**: 632-641.
- Ratanatamskul C, Wattanayommanaporn O, Yamamoto K. 2015. An on-site prototype two-stage anaerobic digester for co-digestion of food waste and sewage sludge for biogas production from high-rise building. *International Biodeterioration & Biodegradation* **102**: 143-148.
- Romero-Güiza MS, Vila J, Mata-Alvarez J, Chimenos JM, Astals S. 2016. The role of additives on anaerobic digestion: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **58**: 1486-1499.
- Rosenberg T. 2010. Předpis pro provádění laboratorních jednorázových testů produkce bioplynu (nepublikováno) s. 6.

Rosenberg T. 2019. Osobní sdělení. 1. 4. 2019.

Saxena RC, Adhikari DK, Goyal HB. 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **13** (1): 167-178.

Straka F, Dohányos M, Záborská J, Jeníček P, Dědek J, Malijecký A, Novák J, Oldřich J, Kunčarová M. 2006. Bioplyn – příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů. GAS, Říčany.

Suárez AG, Nielsen K, Köhler S, Merencio DO, Reyes IP. 2014. Enhancement of anaerobic digestion of microcrystalline cellulose (MCC) using natural micronutrient sources. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **31** (2): 393-401.

Švehla P. 2012. Cvičení z předmětu odpadních vod. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Takashima, M, Shimada, K, Speece, RE. 2011. Minimum requirements for trace metals (iron, nickel, cobalt, and zinc) in thermophilic and mesophilic methane fermentation from glucose. *Water environment research* **83** (4): 339-346.

Thanh PM, Ketheesan B, Yan Z, Stuckey D. 2016. Trace metal speciation and bioavailability in anaerobic digestion: a review. *Biotechnology advances* **34** (2): 122-136.

Trávníček P, Kotek L. 2015. Risks associated with the production of biogas in Europe. *Process Safety Progress* **34** (2): 172-178.

Ward AJ, Hobbs PJ, Holliman PJ, Jones DL. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource technology* **99** (17): 7928-7940.

Weiland P. 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology* **85** (4): 849-860.

Wellinger A, Murphy JD., Baxter D (ed.). 2013. *The biogas handbook: science, production and applications*. Woodhead Publishing, Oxford.

- Wu LJ, Kobayashi T, Kuramochi H, Li YY, Xu KQ. 2016. Effects of potassium, magnesium, zinc, and manganese addition on the anaerobic digestion of de-oiled grease trap waste. *Arabian Journal for Science and Engineering* **41** (7): 2417-2427.
- Xu F, Li Y, Ge X, Yang L, Li Y. 2018. Anaerobic digestion of food waste – Challenges and opportunities. *Bioresource technology* **247**: 1047-1058.
- Xu R, Zhang K, Liu P, Khan A, Xiong J, Tian F, Li X. 2018. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresource technology* **247**: 1119-1127.
- Yazdanpanah A, Ghasimi DS, Kim MG, Nakhla G, Hafez H, Keleman M. 2018. Impact of trace element supplementation on mesophilic anaerobic digestion of food waste using Fe-rich inoculum. *Environmental Science and Pollution Research*, **25** (29): 29240-29255.
- Ye M, Liu J, Ma C, Li YY, Zou L, Qian G, Xu ZP. 2018. Improving the stability and efficiency of anaerobic digestion of food waste using additives: a critical review. *Journal of Cleaner Production* **192**: 316-326.
- Zhang C, Lian J, Jiang Z, Guo J, Guo Y, Gou C. 2016. A study of the kinetics and the effect of trace elements on mixed anaerobic fermentative biogas production by ternary quadratic general rotary unitized design. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **30** (1): 90-99.
- Zhang L, Ouyang W, Lia A. 2012. Essential role of trace elements in continuous anaerobic digestion of food waste. *Procedia Environmental Sciences* **16**: 102-111.
- Zhang Q, Hu J, Lee D-J. 2016. Biogas from anaerobic digestion processes: research updates. *Renewable Energy* **98**: 108-119.
- Zhang W, Wu S, Guo J, Zhou J, Dong R. 2015. Performance and kinetic evaluation of semi-continuously fed anaerobic digesters treating food waste: role of trace elements. *Bioresource technology* **178**: 297-305.

Zieminski K, Frac M. 2012. Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology* **11** (18): 4127-4139.

Zirkler D, Peters A, Kaupenjohann M. 2014. Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and bioenergy* **67**: 89-98.

