

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



**Optimalizace provozu zemědělských bioplynových stanic
s využitím alternativních substrátů a inovativních metod
pro zpracování fermentačního zbytku**

.....
doktorská disertační práce

Autor: Ing. Pavel Míchal

Školitel: prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.

Konzultant: Ing. Pavel Švehla, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „**Optimalizace provozu zemědělských bioplynových stanic s využitím alternativních substrátů a inovativních metod pro zpracování fermentačního zbytku**“ vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat prof. Ing. Pavlu Tlustošovi, CSc. a Ing. Pavlu Švehlovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a cenné rady, které mi poskytli při psaní této doktorské disertační práce. Mé poděkování patří i Ing. Liz Mabel Vargas-Cáceres za pomoc při laboratorních analýzách i s vyhledáním literárních zdrojů. Dále děkuji celému kolektivu katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin za přátelské pracovní prostředí. V neposlední řadě děkuji i své rodině a rodičům za psychickou podporu a zázemí, které mi poskytovali během celého studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	3
2.1 Anaerobní digesce	3
2.2 Faktory ovlivňující anaerobní digesci.....	6
2.3 Bioplyn	11
2.4 Možnosti intenzifikace anaerobní digesce	13
2.5 Materiály využívané při anaerobní digesci	15
2.6 Alternativní plodiny vhodné k anaerobní digesci	18
2.7 Fermentační zbytek	19
2.8 Inovativní možnosti úpravy kapalné frakce fermentačního zbytku	22
2.9 Legislativní požadavky na využití, aplikaci a kvalitu fermentačního zbytku	25
3. Hypotézy a cíle práce	29
4. Publikované práce	31
4.1 Míchal et al. (2017). Anaerobic digestion of grass: The effect of temperature applied during the storage of substrate on the methane production	31
4.2 Míchal et al. (2018). Production of biogas from industrial hemp: The influence of hemp's growing stages and the strategy of fertilization	41
4.3 Švehla, Míchal et al. (2017). Nitrification in a completely stirred tank reactor treating the liquid phase of digestate: The way towards rational use of nitrogen.....	65
4.4 Míchal et al. (2017). Zpracování kapalné frakce fermentačního zbytku biologickou nitrifikací a tepelným zahuštěním.	77
4.5 Míchal et al. (2018). Dvoustupňová úprava fugátu jako cesta k produkci procesní vody.	89
5. Sumární diskuse	93
5.1 Hodnocení produkce bioplynu z alternativních substrátů.....	93
5.2. Aplikace inovativních metod úpravy kapalné frakce fermentačního zbytku	97
6. Závěr.....	102
7. Použitá literatura	104

1. Úvod

Anaerobní digesce je složitý proces, během kterého dochází k rozkladu organické hmoty za nepřístupu kyslíku pomocí anaerobních mikroorganismů za vzniku bioplynu a fermentačního zbytku. Na tento proces má vliv řada významných faktorů jako například teplota, doba zdržení či složení vstupních surovin. Bioplyn se z velké části skládá z energeticky bohatého methanu a oxidu uhličitého, v podstatně nižších koncentracích se mohou vyskytovat další plyny jako například vodík či sulfan. Vzniklý fermentační zbytek je směs nerozložených složek organických materiálů po anaerobní digesti. S procesem vzniku methanu se můžeme setkat jak v přírodě, kde k jeho vzniku dochází v rybníčních sedimentech, v rýžovištích či trvale zaplavených půdách, tak v průmyslově uplatňovaných biotechnologiích, mezi které patří produkce bioplynu na čistírnách odpadních vod či v posledních letech se intenzivně rozvíjejících bioplynových stanicích (Chynoweth et al., 2001).

Výzkum a následný rozvoj využití obnovitelných zdrojů energie úzce souvisí s energetickými krizemi 20. století a s postupným vyčerpáváním neobnovitelných zdrojů, v jejichž důsledku došlo k rozvoji bioplynových stanic jak v zahraničí, tak i v České republice. V našich podmínkách byl extrémní nárůst bioplynových stanic zaznamenán v období let 2008 – 2012, kdy došlo k výstavbě více než 250 provozů zemědělských bioplynových stanic (BPS). V současné době je v ČR instalováno 554 BPS, přičemž více než 70 % instalací tvoří zemědělské BPS, zároveň podíl bioplynu na obnovitelných zdrojích energie dosahuje 25 % (CZBA, 2018; AEBIOM, 2017).

Vzhledem k tomu, že proces vzniku bioplynu je již dobře popsán, se předmětem zájmu stává možnost využití různorodých organických materiálů, která souvisí se snahou o zvýšení substrátové diverzity BPS. Hlavní energetickou plodinou využívanou při produkci bioplynu je kukuřice, jejíž nesporné výhody spočívají v produkci velkého množství rostlinné biomasy s vysokým podílem degradovatelných látek (Ruifang et al., 2012), avšak podstatnou nevýhodou jejího pěstování je nedostatečný vegetační pokryv, který vede například k problémům s erozí půdy (Petříková, 2012). Jelikož je kukuřice dominantní energetickou plodinou pro tvorbu bioplynu a tvoří dle některých autorů až 80 % substrátu pro anaerobní digesti (Mast et al., 2014), vyvstává zde zároveň problém s jejími velkými produkcemi. Herrmann et al. (2017) uvádějí, že v sousedním Německu je pěstována již na 8 % obdělávané půdy obdobně jako v ČR (ČSÚ, 2018), z čehož pramení vyšší problémy spojené s nedostatečným vegetačním pokryvem. Z tohoto důvodu tak bude růst význam alternativních plodin jako například travních porostů či

dalších lignocelulózových materiálů (Triolo et al., 2011), které zabezpečí dostatečnou surovinovou základnu. Zároveň jejich pěstování povede k realizaci půdoochranných opatření.

Stále aktuálnější a částečně upozaděný problém je spojený s nadměrnými objemy vzniklého digestátu, jakožto konečnému produktu mokré anaerobní digesce, která je charakteristická vysokým obsahem vody (85 – 98 %) v produkovaném materiálu (Kathijotes et al., 2015; Kára et al., 2009; Vondra et al., 2018). Ten je kontinuálně produkován během celého roku (Gong et al., 2013), a proto na přibližně 1/3 BPS dochází k jeho separaci na pevný a kapalný podíl. Nakládání s digestátem, popřípadě jeho kapalnou frakcí – fugátem, však není dostatečně vyřešeno. Vedle toho jsou kladeny značné legislativní nároky na skladování a aplikaci vzniklého fermentačního zbytku na půdu jak v České republice (Škorvan et al., 2012), tak i v rámci Evropské Unie (Al Seadi et al., 2013). Tyto nároky jsou dále spojeny s obsahy rizikových prvků či s omezením volatilizace amoniakálního dusíku jak při jeho skladování, tak i při aplikaci. Během skladování fugátu totiž dochází ke ztrátě až 25 % amoniakálního dusíku (Paavola et Rintala, 2008), přičemž dalších až 46 % amoniakálního dusíku může být uvolněno při aplikaci na půdu (Riva et al., 2016). Ten se v produktech anaerobní digesce vyskytuje zpravidla v jednotkách gramů na litr (Risberg et al., 2017; Tlustoš et al., 2014) a tudíž omezení jeho těkání do atmosféry se společným využitím živin i obsažené vody je důležitým ekologickým aspektem nakládání s ním spojeným. Z výše popsanych důvodů tak pramení snaha o zakoncentrování a snížení ztrát živin, které vedou k rozvoji inovativních způsobů zpracování digestátu či fugátu, protože tyto materiály obsahují vedle vysokých obsahů živin i značné množství balastní vody, jejíž transport na půdu tak neúměrně prodražuje celý proces anaerobní digesce (Vondra et al., 2018).

2. Literární přehled

2.1 Anaerobní digesce

Proces anaerobní digesce či fermentace organických látek v anaerobních podmínkách je v přírodě běžně se vyskytující jev, jež je průmyslově aplikován v řadě biotechnologií. Jedná se o proces, během kterého směsná kultura mikroorganismů postupně rozkládá organickou hmotu (Dohányos et Šmejkalová, 2006), přičemž tento proces se skládá z dílčích fází – hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze a methanogeneze, které na sebe postupně navazují (Christy et al., 2014). Produkt jedné skupiny mikroorganismů se stává substrátem skupiny druhé, a proto výpadek jedné skupiny může způsobovat poruchy v celém systému. Konečnými produkty anaerobního rozkladu jsou: směs plynů (methan, oxid uhličitý, sulfan, vodík a dusík), nerozložený zbytek organické hmoty (fermentační zbytek neboli digestát), který je z hlediska hygienického a senzorického nezávadný pro prostředí, a vzniklá biomasa anaerobních mikroorganismů (Dohányos et Šmejkalová, 2006).

2.1.1 Hydrolýza

Prvním krokem anaerobního rozkladu je hydrolýza, která začíná v době, kdy prostředí obsahuje vzdušný kyslík, předpokladem pro její nastartování je dostatečný obsah vody – minimálně 50 % hmotnostního podílu (Pastorek et al., 2004). Během hydrolýzy dochází k rozkladu nerozpustných substrátů na menší části pomocí velkého množství hydrolytických mikroorganismů (např. *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Streptococcus*), které produkují různé hydrolytické enzymy. Mezi ně řadíme celulózu, celobiózu a amylázu (Cirne et al., 2007). Díky těmto enzymům jsou produkovány monomery, jež slouží opětovně jako substrát pro hydrolytické bakterie či jiné druhy bakterií (Vavilin et al., 1996). Během hydrolýzy tak dochází k rozkladu škrobu, celulózy, hemicelulózy, tuků a proteinů na menší molekuly cukrů, aminokyselin a mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Xie et al., 2012).

Přístupnost hydrolytických mikroorganismů k povrchu lignocelulóзовých materiálů představuje nejvíce omezující krok (Mata-Alvarez et al., 2000), jelikož anaerobní kultury nedokáží penetrovat velkou molekulu polysacharidů či lipidů (Kothari et al., 2014). Fáze mimobuněčného hydrolytického rozkladu často probíhá společně s acidogenezí (Straka et al., 2006) a zde platí, že zvýšení hydrolýzy například aplikací různých způsobů předúpravy vede k rychlejší anaerobní digestaci (Xie et al., 2011b).

2.1.2 Acidogeneze

Zpracovaný materiál po hydrolýze může obsahovat zbytky vzdušného kyslíku. V této fázi definitivně dochází ke stabilizaci anaerobního prostředí. Zajistí to četné kmeny fakultativních anaerobních mikroorganismů, které se aktivují v obou prostředích (Pastorek et al., 2004). Mosey et Fernandes (1989) uvádějí, že acidogeneze je nejrychlejší reakcí anaerobní digesce a společně s hydrolýzou probíhá přibližně 10x rychleji než methanogeneze.

Během acidogeneze dochází k rozkladu produktů hydrolýzy - aminokyselin a mastných kyselin s dlouhým řetězcem (Xie et al., 2012) pomocí bakterií (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*) na nižší mastné kyseliny (octová, propionová, máselná), alkoholy, H₂ a CO₂ (Kalyuzhnyi et al., 2000). Fermentací těchto látek se tvoří řada konečných produktů, které jsou závislé na charakteru počátečního substrátu a na podmínkách prostředí. Při nízkém parciálním tlaku vodíku jsou produkovány kyselina octová, CO₂ a H₂, při vyšším jsou tvořeny vyšší organické kyseliny, kyselina mléčná apod. (Dohányos et Šmejkalová, 2006).

Tato fáze anaerobního rozkladu je nejvíce náchylná ke změnám a tak v důsledku akumulace nižších mastných kyselin dochází k poklesu hodnoty pH, jež inhibuje proces methanogeneze (Gerardi, 2003) až pod optimální hodnotu pH hydrolýzy 4,5 – 5,5 (Veeken et al., 2000). Z tohoto pohledu je považováno okyselení za nejčastější příčinu selhání procesu anaerobní digesce (Stronach et al., 1986), na druhou stranu acidogenezi můžeme zvýšit pomocí zvýšení provozní teploty a tím dosáhnout vyšších výnosů bioplynu (Christy et al., 2014).

2.1.3 Acetogeneze

Tato třetí fáze vzniku bioplynu je často označována jako mezifáze, při které dochází k přeměně látek vzniklých při acidogenezi na H₂, CO₂ a kyselinu octovou (Dohányos et Šmejkalová, 2006). Této fáze anaerobní digesce se účastní bakterie, které jsou striktně anaerobní a jejich optimální aktivita je při pH 6 (Wood et Ljungdahl, 1991). Tyto organismy se také vyznačují dlouhou dobou růstu či vysokou citlivostí ke změně podmínek a jsou děleny do dvou základních skupin – syntrofní acetogeny a homoacetogeny (Xing et al., 1997).

Syntrofní acetogenní mikroorganismy jsou silně závislé na přítomnosti vodíku v prostředí, produkují kratší alifatické kyseliny, zejména kyselinu octovou a směs H₂ a CO₂ (Straka et al., 2006). Vysoký obsah H₂ však může brzdit tvorbu kyseliny octové, případně může inhibovat metabolismus acetogenních bakterií (Al Seadi et al., 2008). Tyto syntrofní mikroorganismy jsou v symbióze s methanogenními bakteriemi, které využívají vznikající

vodík jako substrát pro tvorbu methanu a napomáhají tím funkční rovnováze fermentačního procesu (Ust'ak et Váňa, 2005). Mezi tyto syntrofní acetogeny patří např. *Syntrophobacter wollii*, který rozkládá kyselinu propionovou na kyselinu octovou, H₂ a CO₂ (Archer et al., 1988). Vedle výše popsané skupiny se zde vyskytuje i skupina homoacetogenních mikroorganismů, která taktéž tvoří kyselinu octovou, avšak bez vzniku vodíku. Mezi tyto mikroorganismy patří *Clostridium thermoaceticum*, *Butyribacterium methylotrophicum*. Důležitými minoritními skupinami, které se účastní vzniku bioplynu, jsou také sulfátreduktanty a nitrátreduktanty, kde konečnými produkty jsou dusík a sulfan (Straka et al., 2006).

2.1.3.4 Methanogeneze

Závěrečná fáze vzniku bioplynu je realizována methanogenními organismy, které patří do skupiny archea (Christy et al., 2014) a vykazují extrémní citlivost na bezkyslíkaté prostředí. Pro všechny druhy methanogenních organismů je kyslík prudkým jedem i ve velmi nízkých koncentracích (Straka et al., 2006).

Tyto mikroorganismy tvoří methan jako vedlejší produkt svého metabolismu, ve kterém využívají vodík, oxid uhličitý, formiát nebo acetát jako zdroj energie ke svému růstu (Ostrem, 2004). Methanogenní organismy jsou nejdůležitější trofickou skupinou, mají vysoce specifické požadavky na substrát i životní podmínky, a vedle acetogenů zpracovávajících kyselinu propionovou, se často stávají limitujícím faktorem celého procesu (Dohányos et Šmejkalová, 2006), při kterém preferují mírně zásadité prostředí (Christy et al., 2014), pokles pH pod hodnotu 6 nemohou přežít (Davis et Cornwell, 1998).

Vlastní methanogeneze je pak tvorba methanu z kyseliny octové pomocí acetotrofních methanogenních organismů a tvorba methanu z CO₂ a H₂ hydrogenotrofními methanogenními bakteriemi (Straka et al., 2006). Hydrogenotrofní methanogeneze je nejčastější metabolická cesta, při které dochází k přeměně CO₂ a H₂ na methan (Cirne et al., 2007), kterého se účastní především koenzymy methanofuran či koenzym M (Duin et Mckee, 2008). Hydrogenní methanogeny (*Methannospirillum hungatei*, *Methanococcus receptaculi*) se vyznačují rychlou dobou zdvojení (6 hodin) oproti acetotrofním druhům (*Methanosarcina thermophila*) s dobou zdvojení 2,6 dne, zároveň jsou odolnější vůči změnám životních podmínek (Christy et al., 2014). Druhá cesta vzniku methanu je pomocí acetotrofních methanogenů, kteří přímo zpracovávají acetát na methan (Davis et Cornwell, 1998). Přítomnost vodíku v bioplynu svědčí o narušení rovnováhy mezi fázemi acidogeneze a acetogeneze a obvykle je provázena poklesem pH. Tento pokles může být například způsoben přetížením reaktoru, nevhodnou skladbou

substrátu, nebo inhibicí činnosti hydrogenotrofních bakterií (Straka et al., 2006; Dohányos, 1998; Dohányos et Záborská, 2002).

2.2 Faktory ovlivňující anaerobní digesci

Na průběh anaerobní digesce má vliv řada faktorů, přičemž vytvoření optima pro mikrobiální kulturu vede ke tvorbě bioplynu. Mezi tyto vlivy řadíme následující faktory (Straka et al., 2006).

2.2.1 Anaerobní prostředí

Základní podmínkou k produkci bioplynu je vytvoření anaerobního prostředí (Kára et al., 2008). Methanogenní mikroorganismy jsou striktní anaerobové (Schulz et Eder, 2004), avšak v důsledku vstupu různorodých materiálů do reaktorů nelze tuto podmínku zcela zaručit a pokud není množství kyslíku příliš vysoké, mohou ho ostatní bakterie spotřebovat ještě před tím, než dojde k narušení této křehké rovnováhy (Kratochvílová et al., 2009).

2.2.2 Teplota

Vznik methanu může probíhat ve velmi širokém rozpětí teplot od hodnot kolem 10 °C až po více než 100 °C (Wellinger, 1999). Většina autorů (Kothari et al., 2014; Singh et Prerna, 2009; Straka et al., 2006; Ward et al., 2008) rozděluje teplotní spektrum do základních teplotních intervalů (psychofilní, mezofilní, termofilní), avšak někteří autoři (Mao et al., 2015; Lee et al., 2009a) toto spektrum rozšiřují o hypertermofilní teplotu.

1. **Psychofilní** - optimum teplot se pohybuje v rozmezí od 10 °C do 20 °C. Tyto reaktory jsou však charakteristické nízkých zatížením a dobou zdržení v řádu stovek dnů (Hill et al., 2001).
2. **Mezofilní** - optimum teplot se pohybuje v rozmezí od 30 °C do cca 40 °C. Tento teplotní režim je méně náchylný ke změnám vnějších podmínek, avšak oproti termofilní teplotě dochází k nižší produkci bioplynu. Vedle toho je potřeba větších reaktorů, a pokud je vyžadována hygienizace substrátů, dochází k předřazení této úpravy vstupních surovin. Doba zdržení materiálu se pohybuje mezi 15 až 50 dny (Singh et Prerna, 2009; Tambone et al., 2015). Při mezofilní teplotě dochází k nižší rozložitelnosti substrátů a nedostatku nutrientů pro mikroorganismy (Mao et al., 2015).
3. **Termofilní** - optimum teplot se pohybuje od 50 °C do 60 °C. Při této teplotě dochází k vysoké aktivitě mikroorganismů, jejímž výsledkem je rychlé odbourání organické

hmoty a vyšší produkce bioplynu (DeBruyn et Hilborn, 2007). Ve srovnání s mezofilními procesy dochází k vyšší účinnosti odstranění patogenních organismů. Doba zdržení materiálu se pohybuje mezi 12 až 14 dny a během procesu je transformováno 30 až 60 % rozložitelného podílu do bioplynu. Nevýhodou jsou vyšší nároky na energii a řízení vlastního anaerobního procesu (Singh et Prerna, 2009), vyšší provozní náklady či nižší zastoupení methanu (Mao et al., 2015).

4. **Hypertermofilní** – optimum teplot se pohybuje v rozmezí od 70 °C do 80 °C. Tato teplota je však spíše považována za úpravu spojenou s kofermentací materiálů s vysokým obsahem bílkovin, tuků či patogenních organismů (Lee et al., 2009a), která vede v první řadě ke zvýšení stupně hydrolýzy (Wang et al., 2011). Tato teplota je však nižší než teploty běžně používané při tlakové hydrolýze (Wang et al., 2014).

2.2.3 Hodnota pH

Hodnota pH je velice důležitým faktorem pro růst anaerobních mikroorganismů, přičemž methanogeny jsou velmi citlivé na přítomnost kyselin, která může vést až k inhibici celého procesu (Kothari et al., 2014). Většinou je nutné udržovat hodnotu pH v neutrální oblasti mezi 6,5 – 7,5, přirozeně se však tato hodnota pohybuje nejčastěji v rozmezí 7,0 – 8,2 (Huber et al., 1982; Yang et Okos, 1987; Lee et al., 2009b; Kuča et Obroučka, 2008).

2.2.4 Poměr C:N a zastoupení nutrientů

Poměr uhlíkatých a dusíkatých látek je jedním z nejvýznamnějších parametrů sloužících k posuzování vhodnosti materiálů pro anaerobní digesci (Mao et al., 2015). Jako optimální poměr uvádí Weiland et al. (2006), Parkin et Owen (1986) a Pang et al. (2008) hodnotu C:N v rozmezí 20 až 30:1, přičemž proces nejčastěji probíhá při poměru 25:1. Wang et al. (2014) uvádějí hraniční poměr 27:1. Při širokém poměru C:N dochází k pomalé solubilizaci bílkovin, která má za následek nízkou koncentraci amoniakálního dusíku a mastných kyselin (Mao et al., 2015), což vede až k poklesu produkce bioplynu (Kothari et al., 2014). Naopak úzký poměr C:N vede k vyšší produkci amoniaku, který je toxický pro methanogeny a jeho důsledkem je nedostatečné využití uhlíku (Mao et al., 2015). Ideálního poměru je v prvozech BPS docíleno kofermentací většinou 3 až 5 substrátů (Wagner et al., 2013). Míchání substrátů má pozitivní vliv na produkci bioplynu (Divya et al., 2015), optimální zastoupení nutrientů (Sosnowski et al., 2003; Nkemka et Murto, 2010) a současně vede ke snížení rizika toxického působení amoniaku (Wu et al., 2010). Monofermentace, tedy dlouhodobé zpracovávání pouze jednoho

materiálu pro výrobu bioplynu, může v krajním případě znamenat i selhání vlastního anaerobního procesu (Pöschl et al., 2010).

Vedle hlavních živin uhlíku a dusíku, jež jsou nejdůležitějšími prvky a významně ovlivňují anaerobní digesci, jsou mezi hlavní živiny řazeny síra a fosfor. Kratochvílová et al. (2009) a Al Seadi et al. (2008) uvádějí optimální poměr C:N:P:S = 600:20:6:1. Zároveň Hinken et al. (2008) a Pobeheim et al. (2010) uvádějí, že nízká produkce methanu může být způsobena jak nedostatečným zastoupením makroprvků, tak i mikroprvků a jejich významný nedostatek může způsobit až selhání reaktoru (Demirel et Scherer, 2008). Z tohoto důvodu je třeba dbát na zastoupení mikroprvků jako Ni, Co, Mo, Fe či Se (Wellinger et al., 2013), kdy například Ni a Co mají vliv na správnou funkci enzymů mikroorganismů podílejících se na anaerobním rozkladném procesu (Pobeheim et al., 2011).

2.2.5 Toxické a inhibující látky

Na proces anaerobní fermentace má významný vliv i přítomnost toxických a inhibujících látek, které mohou působit v rámci procesu antagonisticky, synergicky, případně indiferentně v závislosti na složení substrátu a zastoupení mikrobiálních kultur (Chen et al., 2008; Risberg et al., 2017). Nejčastějšími inhibitory jsou amoniak a NMK, které však působí inhibičně pouze v nedisociovaných formách, jejichž zastoupení závisí na hodnotě pH (Dohányos, 2008). Mezi další inhibitory anaerobní digesce řadíme například sulfidy, těžké kovy či různé organické a anorganické látky (Chen et al., 2008). Govasmark et al. (2011) a Nilsson et al. (2000) řadí mezi inhibující látky i pesticidy, které mohou být obsažené jak na povrchu rostlinné biomasy, tak mohou být obsažené i v separovaných bioodpadech nebo v potravinářských odpadech využívaných jako substrát pro anaerobní digesci. Jejich akumulace tak může vést až k poruchám vlastního anaerobního procesu a v krajním případě může znamenat až jeho selhání.

2.2.5.1 Amoniak

V průběhu anaerobní digesce dochází k mineralizaci dusíkatých sloučenin. Minerální N se tak stává lépe přístupný a současně s tím dochází ke změně jednotlivých forem celkového dusíku (Schievano et al., 2009). Uvádí se, že 50 až 80 % celkového dusíku obsaženého v digestátu tvoří amoniakální forma dusíku (Makádi et al., 2012; Teglia et al., 2011a), která do digestátu přichází zpravidla v podobě proteinů nebo nukleových kyselin (Yang et al., 2015; Kayhanian, 1999). Většina amoniakálního dusíku však vzniká z moči a z hnoje (Hjort et al., 2010).

Toxicita amoniaku je závislá na hodnotě pH. Při zvýšení pH roste koncentrace volného amoniaku a tím i jeho toxicita (Borja et al., 1996), přičemž nejméně tolerantní skupinou na přítomnost amoniaku jsou methanogenní mikroorganismy (Kayhanian, 1994).

Yang et al. (2015) uvádějí, že obsah volného amoniaku je při termofilních teplotách asi 6x vyšší než při mezofilních teplotách. Z tohoto důvodu je anaerobní digesce při termofilních teplotách náchylnější k inhibici amoniakem (Khan et Nordberg, 2018). Chamy et al. (1998) a Hansen et al. (1998) k problému inhibice amoniakem uvádějí, že 50 % pokles v produkci methanu je spojen s koncentracemi N-amon v rozmezí hodnot od 1,7 do 14 g/l. Toto široké rozpětí inhibujících koncentrací amoniaku souvisí s rozdíly ve složení substrátů a inokula či dalšími podmínkami jako jsou pH a teplota (Xie et al., 2011a). Vysoké koncentrace amoniakálního dusíku mohou zároveň způsobovat i toxicitu digestátu při jeho aplikaci (Tigini et al., 2016).

2.2.5.2 Nižší mastné kyseliny

Nižší mastné kyseliny jsou organické kyseliny s krátkým uhlíkatým řetězcem a mezi nejdůležitější z nich patří kyselina octová, propionová, máselná, valerová, izovalerová či kapronová (Ahring et al., 1995). Ty jsou při anaerobní digestaci produktem acidogenních a acetogenních mikroorganismů. Zároveň jsou substrátem pro acetogeny, které z kyselin s řetězcem delším než dva uhlíky tvoří kyselinu octovou. Ta je pak využívána methanogeny (Pastorek et al., 2004; Straka et al., 2006). Změnou rovnováhy procesu dochází k růstu koncentrací NMK, které mají vliv na pokles hodnoty pH a vedou k inhibici procesu methanogeneze (Ahring et al., 1995). Ten může být způsobený digestcí substrátů, které jsou bohaté na snadno rozložitelné monosacharidy, polysacharidy či aminokyseliny. Acidogeny přetvoří tento substrát na NMK během jednoho až dvou dnů, čímž dojde k přesycení systému kyselinami, poklesu pH a následné inhibici celého procesu (Wagner et al., 2013).

2.2.5.3 Rizikové prvky

Rizikové prvky mají na proces anaerobní digesce, potažmo na rozvoj mikrobiální kultury, dva protichůdné vlivy. Tyto vlivy jsou závislé na celkové koncentraci rizikových prvků a dále závisejí například na hodnotě pH či na redox potenciálu (Zayed et Winter, 2000). Toxické působení rizikových prvků je nebezpečné pro anaerobní digestaci tím, že nejsou biologicky rozložitelné a dochází k jejich hromadění až do toxických koncentrací (Sterritt et Lester, 1980). Mohou inhibovat acidogenní i methanogenní mikroorganismy (Chen et al., 2008), přičemž proti inhibici rizikovými prvky jsou odolnější acidogenní mikroorganismy oproti methanogenním

(Zayed et Winter, 2000). Toxický efekt je připisován inhibici enzymů přerušením jejich vazby a navázáním kovu thiolovými nebo jinými skupinami na protein molekuly, případně mohou nahradit proteolytické skupiny přirozeně se vyskytujícími kovy (Vallee et Ulner, 1972). Zároveň je třeba brát v potaz, že i některé prvky jako Co, Ni jsou nezbytné pro optimální průběh anaerobní digesce, jelikož jsou nezbytné pro správnou funkci enzymů (Pobeheim et al., 2011). Mezi rizikové prvky řadí Jain et al. (1992) a Chen et al. (2008) As, Cr, Co, Cu, Cd, Hg, Mo, Ni, Pb a Zn.

Těžké kovy se v rámci anaerobní digesce mohou účastnit velkého množství fyzikálně-chemických reakcí. Například může docházet k jejich srážení ve formě sulfidů, hydroxidů či uhličitánů (Mosey et Hughes, 1975), dále může docházet k jejich sorpci na pevnou frakci biomasy (Shin et Kwon, 1998), případně mohou tvořit komplexy s rozpustnými sloučeninami (Hickey et al., 1989; Hayes et Theis, 1978). S těmito vlivy souvisí i působení kovů na jednotlivé fáze anaerobního procesu. Například měď působí toxicky na acidogeny, naopak na methanogeny má toxický vliv kadmium (Yu et Fang, 2001).

Legislativní požadavky na obsah rizikových prvků ve fermentačním zbytku jsou uvedeny v kapitole 2.9.

2.2.6 Chemické složení substrátů

Chemické složení substrátů využívaných při anaerobní digesci významně ovlivňuje stabilitu, účinnost a rychlost produkce bioplynu i methanu (Nges et al., 2012). Z tohoto důvodu je třeba znát složení substrátů, jelikož organická část materiálů se skládá ze dvou významných složek – snadno rozložitelných sloučenin (zejména sacharidy, tuky a bílkoviny) a obtížně degradovatelných částí jako jsou vláknina (celulóza, hemicelulóza a lignin), humínové kyseliny a fulvokyseliny (Batstone et al., 2002). Chemické složení vstupních materiálů tedy významně ovlivňuje produkci methanu a například teoretická výtěžnost methanu je nejvyšší u tuků 1018 l/kg, bílkovin 496 l/kg a u celulózy je to pouze 415 l/kg OS (organické sušiny; Triolo et al., 2011). Polysacharidy a jednoduché cukry vykazují výtěžnost methanu v rozmezí 750 až 900 l/kg OS (Straka et al., 2006). Vysoké zastoupení ligninu má naopak negativní vliv na rozložitelnost rostlinných materiálů (Oleszek et al., 2014). Produkce bioplynu z rostlinných materiálů je mimo jiné ovlivněna vývojovou fází rostlin, která má vliv na zastoupení ligninu a snadno rozložitelných částí jako je například škrob (Kandel et al., 2013), dále je ovlivněna poměrem zastoupení stonku a listů (Hübner et al., 2011). Velké množství snadno rozložitelných látek (škrob, tuky) však může vést při anaerobním rozkladu k vysokým koncentracím mastných

kyselin, které mohou způsobit inhibici anaerobního procesu (Neves et al., 2008; Lesteur et al., 2010). Naopak u organických látek s delším řetězcem umožní hydrolyza degradaci na monomery a tím dojde ke snadnějšímu rozkladu (Lesteur et al., 2010). Převážná část materiálů využívaných v anaerobní digesti obsahuje lignocelulózovou matici, která je odolná vůči enzymatickému rozkladu a z tohoto důvodu je vhodná aplikace předúpravy materiálů, která vede k urychlení hydrolyzy (Zhong et al., 2011).

2.2.7 Doba zdržení

Dalším významným parametrem, majícím vliv na produkci bioplynu, je doba zdržení. Ta souvisí s rozložitelností organického podílu a vyjadřuje dobu, po kterou se materiál zdrží v reaktoru (Kothari et al., 2014; Lindmark et al., 2014). Tento parametr dále záleží na teplotě procesu, kdy se doba zdržení u mezofilních reaktorů pohybuje od 10 do 40 dnů (Kothari et al., 2014). Tambone et al. (2015) naopak uvádějí tuto dobu v rozsahu 35 až 50 dnů. U termofilních reaktorů je doba zdržení přibližně 14 dnů v důsledku vyšší aktivity termofilních mikroorganismů. V neposlední řadě je třeba uvést, že platí úměra, nízká rozložitelnost – delší doba zdržení. Potřebná doba zdržení je tak ovlivněna chemickým složením substrátů a má vliv i na rychlost vzniku bioplynu (Nges et al., 2012; Kothari et al., 2014).

2.2.8 Zatížení fermentoru organickými látkami

Tento parametr vyjadřuje množství OS v kg vztažené na objem reaktoru v m^3 , které je přivedeno do reaktoru za jeden den (Kothari et al., 2014). Obvyklé zatížení při teplotě 35 °C leží mezi 0,5 a 1,5 kg OS/(m^3 .den) (Schulz et Eder, 2004). Zatížení reaktoru lze zvýšit na 3 kg OS/(m^3 .den), absolutní horní hranice je dosaženo při 5 kg OS/(m^3 .den) (Fernandes et al., 2008). Při překročení této hodnoty dochází k poklesu produkce bioplynu, které je způsobeno například inhibicí NMK (Lindmark et al., 2014).

2.3 Bioplyn

Hlavními konečnými produkty anaerobní digesce jsou bioplyn a digestát, přičemž nositelem energie je v tomto případě bioplyn, jehož energetická hodnota je závislá na obsahu methanu v bioplynu, který má v čisté podobě výhřevnost 35,8 MJ/ m^3 (Ust'ak et Váňa, 2006).

2.3.1 Složení bioplynu

Bioplyn obsahuje dvě základní (majoritní) složky a různé minoritní složky. Majoritními složkami jsou metan a oxid uhličitý, jejichž vzájemný poměr je různorodý. Obsah methanu se pohybuje v širokém rozmezí 50 – 85 %, zbylých 15 – 50 % zpravidla tvoří oxid uhličitý (Straka

et al., 2006). Obsah methanu v bioplynu z BPS se většinou pohybuje v užším rozmezí 60 – 65 % (Straka et al., 2006; Chynoweth et al., 2001), jeho množství a složení dále závisí na vstupním substrátu, který je využit při digesci (Oleszek et al., 2014). Minoritními složkami bioplynu jsou nespotřebované produkty acidogeneze – vodík a další složky jako sulfan, amoniak, vodní pára, siloxany či různé deriváty uhlovodíků, jejichž obsah se pohybuje ve stopových množstvích (Straka et al., 2006; Chynoweth et al., 2001). Největší problém v bioplynu může způsobovat vysoké zastoupení sulfanu, neboť spalováním vznikají oxidy síry, které kondenzují za vzniku kyseliny sírové (Mužik et Kára, 2009). Z tohoto důvodu je vhodné ho odstranit například přidávkem solí železa (FeCl_2 , FeCl_3), případně biologickou oxidací sulfanu za přítomnosti sulfát redukujících bakterií (SRB), jejichž konečným produktem je elementární síra (Kratochvílová et al., 2009; Žídek, 2003; Isa et al., 1986).

2.3.2 Využití bioplynu

Vzhledem k vysokému obsahu methanu je bioplyn považován za hodnotné palivo, jehož využití nabízí širokou škálu možností. Nejčastěji se jedná o přímé spalování nebo výrobu elektrické energie a tepla formou kogenerace (Pastorek et al., 2004; Straka et al., 2006). Moderním trendem je vedle produkce elektrické energie a tepla i výroba chladu pomocí trigenerace (Bruno et al., 2009). V současné době může být odpadní teplo využíváno například k vytápění rodinných domů či obecních budov, přičemž je stále větší snaha využívat toto teplo i k dosušování různých zemědělských surovin (obilí, ovoce, zelenina, řepné řízky) či ho lze využít i pro sušení dřeva či pilin, které mohou dále sloužit jako obnovitelný zdroj energie (Kosina, 2013; Koutný, 2013). Novou možností je využití odpadního tepla při tepelném zahušťování fermentačního zbytku (Vondra et al., 2018), které je podrobněji rozpracováno v kapitole 2.8.4.

Vedle spalování bioplynu může docházet k jeho úpravě formou dočišťování, při kterém se využívají metody absorpce, adsorpce, membránové separace či kryogenní separace. Aplikací těchto technik dojde ke zvýšení koncentrace methanu, který může být využit například v dopravě (CNG – compressed natural gas) či slouží jako náhrada za klasický zemní plyn, kdy dochází k jeho vtláčení do sítě plynového potrubí. Takto upravený bioplyn (biomethan) obsahuje 95 – 99 % methanu a pouze 1 – 4 % oxidu uhličitého, přičemž v dopravě je požadováno zastoupení methanu vyšší jak 97 % (Chynoweth et al., 2001; Smyth et al., 2011).

2.4 Možnosti intenzifikace anaerobní digesce

Intenzifikace anaerobní digesce lze dosáhnout různými způsoby. Největším problémem využívání materiálů v anaerobní digesci je kvalita organického podílu, který se obvykle skládá ze tří hlavních složek. První z nich je tvořena dobře rozložitelnými látkami – škrobem či bílkovinami, další skupinu tvoří nerozložitelné komponenty – lignin a keratin a poslední skupina je tvořena lignocelulózou, jejíž komplexy obsahují obtížně rozložitelné struktury a jejich předúprava je nezbytná při požadavku na vyšší výtěžek bioplynu (Carlsson et al., 2012). Hlavním cílem zařazení úpravy materiálů před vlastní anaerobní digescí je zmenšení velikosti částic, které povede k větší solubilizaci a tím dojde ke zvýšení biologické rozložitelnosti, případně k většímu využití organického podílu (Carlsson et al., 2012). Nejsnadnějším způsobem zvýšení účinnosti BPS je zavedení kofermentace (Wagner et al., 2013), která může vést k vyšší produkci bioplynu o 10 % (Pöschl et al., 2010). Další možnosti, které vedou k vyššímu biologickému rozkladu a lepší rozložitelnosti materiálů, budou dále diskutovány.

2.4.1. Mechanická předúprava

Využití mechanické předúpravy patří k nejsnadnějším způsobům úpravy vstupujících substrátů, jejímž cílem je zmenšení velikosti částic. To vede k vyšší produkci bioplynu (Hendriks et Zeeman, 2009). Hartmann et al. (2000) uvádí, že tato úprava zvyšuje aktivní povrch, který tak snáze podléhá enzymatickému rozkladu a vede ke zvýšení produkce methanu u lignocelulózových materiálů (slámy) až o 25 %, zároveň dochází ke zkrácení doby vlastní digesce o 23 až 59 % času v důsledku zrychlené hydrolyzy (Delgenés et al., 2002; Hartmann et al., 2000). Mezi tyto způsoby úpravy materiálů řadí Palmowski et Müller (2000) štěpkování, (velikost částic 20 – 50 mm), drcení (velikost částic 2 – 20 mm) a mletí (velikost částic 0,2 – 2 mm).

2.4.2 Chemická předúprava

Využití chemických činidel je spojeno hlavně s předúpravou lignocelulózových materiálů. Vede ke zvětšení aktivního povrchu a k narušení ligninu a hemicelulózy, které jsou tak snadno dostupné pro anaerobní mikroorganismy (Mao et al., 2015). Tento způsob úpravy je způsobem přidávkem zásaditých, kyselých nebo oxidačních činidel.

Aplikace zásaditých látek spočívá v dávkování činidel NaOH, KOH a Ca(OH)₂ (Shah et al., 2015), pomocí kterých dochází k přerušení vazeb mezi ligninem a polysacharidy.

Aplikace těchto činidel vede k hydrolýze esterů - zmydlování (saponifikaci; Mosier et al., 2005).

Kyselá předúprava lignocelulózových substrátů pomocí H_2SO_4 , HCl , HNO_3 či H_3PO_4 (Zheng et al., 2014) má za důsledek přerušení kovalentních a vodíkových vazeb i Van der Wallsových sil. Konečným důsledkem je solubilizace celulózy a hemicelulózy až na monosacharidy (Mao et al., 2015). Nevýhodou využívání kyselin jsou však vysoké pořizovací náklady a jejich korozivní účinky (Taherzadeh et Karimi, 2008). Výhodou však je hydrolýza celulózy a hemicelulózy (Zheng et al. 2014).

Nejvýznamnějším oxidačním činidlem je peroxid vodíku, pomocí kterého dochází k nárůstu produkce bioplynu v rozmezí 6,7 – 32 % (Song et al., 2014). Vedle toho je možné využít čistý kyslík (Zheng et al., 2014) či ozon (Mao et al., 2015). Touto technologií dochází k rozkladu hemicelulózy na jednoduché cukry, zároveň dochází ke snadnějšímu enzymatickému rozkladu ligninu (Hendriks et Zeeman, 2009).

Aplikací chemických látek však může docházet ke vzniku toxických sloučenin, které vznikají při rozkladu ligninu a zpravidla se jedná o různé fenolické sloučeniny, či jejich deriváty (Carrère et al., 2011; Hendriks et Zeeman, 2009; Ward et al., 2008).

2.4.3 Fyzikální předúprava

Do této kategorie řadí Zheng et al. (2014) tlakovou explozi (tzv. autohydrolýzu), úpravu pomocí horké vody (hydrotermolýzu) a vystavování materiálu účinkům ultrazvuku a mikrovln. Na rozdíl od chemické předúpravy zde nedochází ke vstupu chemikálií do procesu (Brandon et al., 2008). Při tlakové explozi dochází k využívání vysokých teplot (160 až 260 °C), vysokého tlaku (0,69 až 4,8 MPa) a krátké doby zdržení od 1 do 60 minut (Sun et Cheng, 2002; Tiehm et al., 1997). Za těchto podmínek dochází k hydrolýze na jednodušší cukry a furfuraly (Weil et al., 1997). U hydrotermolýzy dochází k aplikaci vysokých teplot a tlaků, v jejichž důsledku dochází k rozkladu buněčné struktury, hydrataci celulózy, solubilizaci hemicelulózy a k částečnému odstranění ligninu (van Walsum et al., 1996). Efektivita těchto předúprav je však velmi různorodá a významně závisí na chemickém složení a struktuře materiálů (Zheng et al., 2014).

2.4.4 Mikrobiální (biologická) předúprava

Využití mikroorganismů představuje environmentálně přívětivou předúpravu, jejíž hlavní přínosy jsou spojené s nízkými nároky na vstup energií a malou spotřebou chemikálií,

kteře jsou často inhibitory procesu digesce (Divya et al., 2014; Taherzadeh et Karimi, 2008). Perez et al. (2002), Phutela et al. (2011) a Taseli (2008) řadí mezi potenciální organismy, které dokáží rozkládat lignocelulózovou strukturu: *Coriolus versicolor*, *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Phanerochaete chrysosporium* a *Penicillium camemberti*. Zhong et al. (2011) toto spektrum rozšiřuje o některé druhy kvasinek (*Saccharomices cerevisiae* sp., *Coccidioides immitis* sp. a *Hansenula anomala* sp.) a celulólitických bakterií (*Bacillus licheniformis* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis* sp. a *Pleurotus Florida* sp.), které dokáží rozkládat celulózu a hemicelulózu a například *Pseudomonas Florida* sp. dokáže rozložit lignin. Nevýhodou biologické úpravy, v porovnání s ostatními uváděnými způsoby, je však dlouhý čas potřebný k rozvoji mikrobiální kultury, který se pohybuje v řádu týdnů v porovnání s fyzikální či chemickou předúpravou (Zheng et al., 2014; Taheryadeh et Karimi, 2008).

2.4.4.1 Silážování

Silážování je řazeno některými autory (Paavola et Rintala, 2008; McDonald et al., 1991; Wilkinson et al., 2003) mezi tradiční biologickou formu úpravy materiálů, která je známá již více než 200 let a jejímž prioritním cílem je uskladnění substrátů pro vhodnou dobu jejich využití v rámci anaerobní fermentace či jako krmiva pro hospodářská zvířata. Hlavním cílem silážování je tedy účinně konzervovat energii v plodinách pomocí bakteriální fermentace cukrů, která je zajišťována bakteriemi mléčného kvašení (BMK; Vervaeren et al., 2010). Vedlejším cílem je snížit ztráty biomasy (Emery et Mosier, 2012). Během silážování dochází k produkci kyseliny mléčné, čímž je sníženo pH. Tento pokles zamezí napadení substrátu škodlivými mikroorganismy – houbami, kvasinkami či bakteriemi (McDonald et al., 1991; Haigh et Parker, 1985; Pahlow et al., 2003). Hlavní výhodou silážování je hydrolýza hemicelulózy (Dewar et al., 1963), která vede k následné vyšší produkci methanu (Ambye-Jensen et al., 2013).

2.5 Materiály využívané při anaerobní digesci

Anaerobní digesce může jako substrát využívat velmi široké spektrum organických materiálů. Ty však musí splňovat níže uváděné podmínky (Kothari et al., 2014). Využívaný materiál musí být biodegradabilní (musí obsahovat převážně biologicky rozložitelnou organickou hmotu), nesmí být dřevnatý a musí obsahovat makro a mikroživiny.

Steffen et al. (1998) tyto materiály dělí do tří základních skupin:

1. **Substráty pocházející ze zemědělství** – kejda (drůbeže, skotu, prasat), hnůj, posklizňové zbytky a energetické plodiny
2. **Substráty pocházející z průmyslu** – potravinářské odpady pocházející z pivovarnického, mlékárenského, cukrovarnického, škrobárenského průmyslu a jateční odpady, dále se jedná o farmaceutický a biochemický průmysl a odpady z výroby celulózy a papíru
3. **Substráty pocházející z komunální sféry** – organická frakce směsných komunálních odpadů, kaly z čistíren odpadních vod, odpady z údržby zeleně a gastroodpady

Z výše uvedených skupin je patrné, že bioplyn může být vyráběn ze širokého spektra substrátů, avšak v zemědělských BPS jsou zpravidla využívána statková hnojiva a cíleně pěstované plodiny. Dominantně pěstovanou plodinou v těchto BPS je kukuřice, která je problematická z hlediska erozního rizika půdy, na druhé straně je charakteristická svými vysokými hektarovými výnosy. Mezi další materiály patří žitná siláž či cukrovarnické řízky (Kratochvílová et al., 2009).

Tabulka č. 1 zobrazuje produkci bioplynu a procentuální zastoupení methanu vztažené na 1 kg OS nejčastěji využívaných materiálů v anaerobní digesci. U biologicky rozložitelných odpadů - kategorie 20 Katalogu odpadů, případně u biologicky rozložitelných komunálních odpadů - BRKO, tato výtěžnost závisí na zastoupení biologicky rozložitelné složky, kdy například směsný komunální odpad má její zastoupení 48 %, odpad z tržišť 75 % (Kratochvílová et al., 2009).

Tabulka 1. Produkce bioplynu a zastoupení methanu vybraných materiálů

	Bioplyn	
	Produkce (l/kg OS)	Obsah CH ₄ (%)
Zemědělské materiály		
kejda skotu	200-500	60
kejda prasat	300-700	60-70
kukuřičná siláž	450-700	50-55
žitná siláž	550-680	55
travní siláž	550-620	54-55
vojtěška	500-700	52-65
cukrová řepa (listy i bulvy)	620-850	53-54
technické konopí	500-700	55-65
topinambur	480-590	52-60
Biologicky rozložitelné odpady		
separovaný BRKO	150-600	58-65
odpady z tržišť	400-600	60-65
odpady z údržby zeleně	550-680	55-65
zahradní odpad	400-600	50-60
Průmyslové odpady		
lihovarské výpalky	590-690	50-70
bramborové výpalky	400-700	58-65
jateční odpady	700-950	60-72

Kahiluoto et al., 2011; Kratochvílová et al., 2009; Koçar and Civaş, 2013; Lehtomäki et al., 2007; Wellinger et al., 2013

2.6 Alternativní plodiny vhodné k anaerobní digesti

Díky zvyšujícímu se podílu využívání energie z bioplynu roste poptávka po materiálech a energetických plodinách, které jsou schopné nahradit dominantně využívanou kukuřičnou siláž (Lehtomäki et al., 2008; Mast et al., 2014; Triolo et al., 2012), jejíž zastoupení mezi substráty pro produkci bioplynu představuje až 80 % (Mast et al., 2014). Mezi tyto alternativní materiály řadíme různé druhy trav a travních odpadů (Triolo et al., 2012; Meyer et al., 2014; Koch et al., 2009), technické konopí (Gissén et al., 2014; Kreuger et al., 2011), slunečnici topinambur (Long et al., 2016) nebo další plodiny jako například ozdobici čínskou či vojtěšku (Menardo et al., 2013; Hakl et al., 2012). Tyto materiály jsou charakteristické variabilní sušinou v rozmezí 10 až 50 % a produkcí methanu v rozmezí 0,27 – 0,39 m³ z kg OS (Lehtomäki et al., 2008; Koch et al., 2009). Výhodou alternativních materiálů je, že při jejich produkci a využívání nedochází k omezení produkce potravinářských plodin (Hengsen et al., 2011; Bühle et al., 2012).

2.6.1. Tráva a travní odpady

Travní porosty mají z globálního pohledu významnou roli v zemědělství, jelikož pokrývají 69 % zemědělské půdy, respektive 26 % celkové plochy kontinentů a jsou považovány za tradiční materiál využívaný k produkci bioplynu (Prochnow et al., 2009). V České republice zauímají trvalé travní porosty 13 % plochy (ČSÚ, 2018). Naopak travní odpady pocházející z údržby parků, zahrad, sportovišť (Hengsen et al., 2011; McEniry et al., 2011), případně i z okolí silnic a dálnic (Meyer et al., 2014; Voinov et al., 2015), nejsou v současné době k těmto energetickým účelům využívány a mohou tak představovat dobrý zdroj biomasy pro anaerobní digesti (Meyer et al., 2014; Piepenschneider et al., 2016).

Travní odpady se vyznačují vysokou tvorbou biomasy a sušiny z hektaru - 6 až 8 tun sušiny v závislosti na dané seči (Voinov et al., 2015; Piepenschneider et al., 2016) a výtěžností methanu 0,22 – 0,39 m³ z kg OS (Meyer et al., 2014; Piepenschneider et al., 2016). Vedle toho odpady z údržby zahrad se vyznačují průměrnou produkcí methanu 0,33 m³ z kg OS (Triolo et al., 2012). Prochnow et al. (2009) uvádějí produkci methanu z různých trav v rozpětí 0,14 až 0,63 m³ methanu z kg OS. Při pohledu na tabulku uváděnou v kapitole 2.5 je patrné, že produkce methanu z těchto materiálů může být v některých případech obdobná jako produkce methanu z kukuřičné siláže. Za nespornou výhodu těchto materiálů považují Triolo et al. (2012) jejich nízkou cenu, jelikož se v řadě případů jedná o „odpadní materiál“.

2.6.2. Technické konopí (*Cannabis sativa* L.)

Technické konopí (*Cannabis sativa* L.) představuje další alternativu k tradičně využívaným materiálům. Jeho výnos biomasy v sušině se pohybuje v rozmezí 6,6 – 18,0 t/ha (Struik et al., 2000; Prade et al., 2011; Pakarinen et al., 2011; Gissén et al., 2014). Výtěžnost methanu z kg OS pak dosahuje 0,25 – 0,30 m³ (Kreuger et al., 2011; Heirmann et al., 2009), přičemž procentuální zastoupení methanu v bioplynu se pohybuje v rozmezí 47 – 61 % (Adamovičs et al., 2014). Nespornou výhodou pěstování technického konopí je jeho nenáročnost, omezení růstu plevelů v důsledku rychlého pokrytí povrchu a díky svému bohatému kořenovému systému má též zlepšující vliv na půdní strukturu (Bosca et Karus, 1998; Kirkegaard et al., 2008).

2.6.3. Slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus* L.)

Slunečnice topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) je rostlina pěstovaná pro své vysoké výnosy biomasy, kdy nadzemní biomasa dosahuje výnosů sušiny 12 – 30 t/ha, výnos sušiny podzemní biomasy se pohybuje v rozmezí 6 – 8 t/ha (Kays et Nottingham, 2008; Izdebski, 2009; Gunnarson et al., 1985). K energetickým účelům lze využít jak nadzemní, tak i podzemní biomasu, která je bohatá na inulim (Kowalczyk-Juško et al., 2012; Long et al., 2016). Produkce bioplynu z nadzemní biomasy se pohybuje v rozmezí od 0,4 do 0,7 m³ z kg sušiny a výtěžnost bioplynu z hlíz pak dosahuje hodnoty 0,6 m³ z kg sušiny. Zastoupení methanu v bioplynu produkovaném při anaerobní digesci se u této rostliny pohybuje v rozmezí od 50 do 70 % (Kays et Nottingham, 2008; Ciccoli et al., 2018; Gunnarson et al., 1985; Seppälä et al., 2013).

2.7 Fermentační zbytek

Vedlejším, neméně významným, produktem anaerobní digesce je fermentační zbytek neboli digestát, který na BPS vzniká ve velkých objemech a na jehož využití, skladování, případně i kvalitu jsou kladeny vysoké nároky (Koszel et Lorencowicz, 2015; Albuquerque et al., 2012a; Qin et al., 2018). Při anaerobní digesci dochází k transformaci části organického podílu do bioplynu (Chen et al., 2016; Risberg et al., 2017), zbývající organický podíl je transformován z labilního do stabilního stavu (Albuquerque et al., 2012b). Digestát je hodnocen jako materiál, který má vysoký hnojivý potenciál. Ten je spojen s vysokými koncentracemi jak makro, tak i mikro živin (Albuquerque et al., 2012b; Risberg et al., 2017). Aplikací digestátu (i jeho složek) na půdu dochází ke zvýšení půdní úrodnosti (Tambone et al., 2015). Nejsnadnější úpravou digestátu je jeho odvodňování, které je v posledních letech stále častější aplikováno na zemědělských BPS (Dennehy et al., 2018). Tato jednoduchá fyzikální úprava

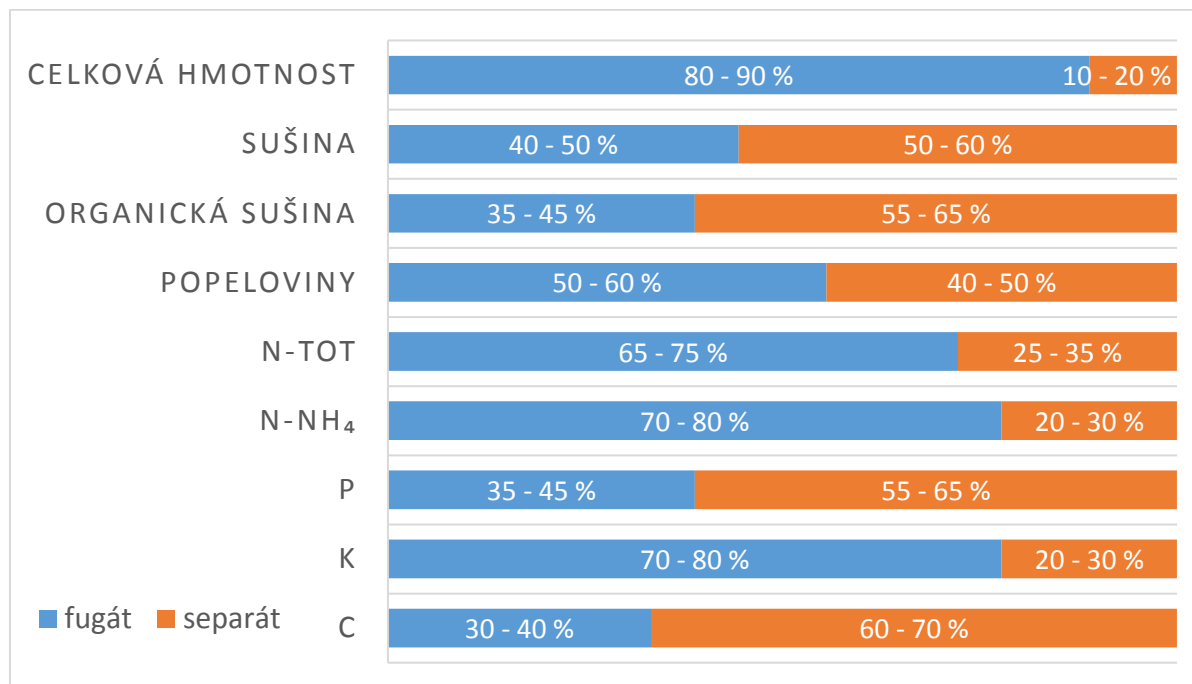
spočívá v mechanické separaci digestátu na bubnových sítích, případně na sítopásových lisech (Tambone et al., 2015; Rehl et Müller, 2011). Ke zvýšení účinnosti separace může být využito i flokulantů (Rehl et Müller, 2011). Vzniklé produkty jsou označovány jako separát (pevná frakce) a fugát (kapalná frakce).

Nežádoucí environmentální problém fermentačního zbytku je spojený s volatilizací amoniakálního dusíku, emisemi oxidu dusného a také s transportem dusičnanů do podzemních vod, ke kterému dochází při aplikaci nadměrných dávek digestátu na zemědělskou půdu (Vondra et al., 2018; Li et al., 2018; Riva et al., 2016). Neméně významným problémem je i skladování jeho velkých objemů (Bolzonella et al., 2018; Koszel et Lorencowicz, 2015; Qin et al., 2018). Vondra et al. (2018) ve své studii uvádějí, že na 1 MW instalovaného elektrického výkonu vznikne ročně 15 až 20 tisíc m³ digestátu. Z tohoto důvodu je aktuálním tématem řešení nalezení vhodných metod vedoucích k omezení objemů jak vznikajícího fermentačního zbytku, tak i fugátu.

2.7.1. Digestát

Digestát je materiál, který se vyznačuje nízkou sušinou většinou v rozmezí 2 – 15 % (Kathijotes et al., 2015; Albuquerque et al., 2012a; Kára et al., 2009) s mírně alkalickou hodnotou pH v rozmezí 7,4 až 8,3, tmavě šedou až černou barvou a obsahem amoniakálního dusíku v čerstvé hmotě od 0,9 do 5 g/l (Teglia et al., 2011b; Gómez et al., 2005; Molinuevo-Salces et al., 2013; Albuquerque et al., 2012b; Risberg et al., 2017). Vedle toho digestáty obsahují relativně vysoké koncentrace fosforu a draslíku (Koszel et Lorenzowicz, 2015; Tambone et al., 2009). Podíl zastoupení živin a dalších složek v jednotlivých frakcích digestátu je uvedeno v grafu 1. Tambone et al. (2015) a Vázquez-Rowe et al. (2015) uvádějí, že digestát obsahuje minimální koncentrace patogenů v porovnání se vstupními materiály. Jejich snížení bylo dosaženo kombinací teploty (mezofilní, termofilní) a doby zdržení v rozmezí 35 – 50 dnů. Kvalita digestátu dále záleží na kvalitě a složení vstupního materiálu a množství přivedených organických látek do reaktoru (Risberg et al., 2017; Dennehy et al., 2018; Al Seadi et al., 2013).

Graf 1. Distribuce vybraných parametrů v procentech mezi separát a fugát (Wellinger et al., 2013)



2.7.2. Separát

Separát vzniká společně s fugátem mechanickou separací digestátu (Tambone et al., 2015; Rehl et Müller, 2011), přičemž z celkové hmotnosti digestátu má separát zastoupení pouze 10 až 20 % (Wellinger et al., 2013). Jeho sušina se zpravidla pohybuje v rozmezí od 20 do 30 % a je závislá na vstupních materiálech a technologii separace (Rehl et Müller, 2011). Vedle toho obsahuje poměrně malé množství dusíku - pouze 25 až 35 % obsaženého v původním digestátu. Na druhé straně však obsahuje vysoké procento fosforu - 55 až 65 % z množství obsaženého původně v digestátu (Hjorth et al., 2010; Wellinger et al., 2013). Vedle toho obsahuje separát i relativně velké množství Mg a Ca (Tlustoš et al., 2014). Vzhledem ke své dobré biologické stabilitě a nízké mikrobiální aktivitě (Tambone et al., 2015) je možné ho snadno kompostovat (Tlustoš et al., 2014; Knoop et al., 2018) či dále dosoušet (Knoop et al., 2018), případně využívat jako pěstební substrát (Tlustoš et al., 2014) či hnojivo. V případech, kde nelze využít separát jako hnojivo, uvádí Kolář et al. (2010) možnost využití separátu jako paliva v podobě briket či pelet.

2.7.3. Fugát

Fugát, obdobně jako separát, vzniká mechanickým odvodněním digestátu (Tambone et al., 2015; Rehl et Müller, 2011). Vyznačuje se vysokými koncentracemi amoniakálního dusíku

(zpravidla jednotky g/l) a draslíku (70 – 80 % z původního digestátu) a současně je charakterizován nízkým zastoupením uhlíku a tím pádem poměrem C:N zpravidla nižším než 10:1 (Gong et al., 2013; Paavola et Rintala, 2008; Sigurnjak et al., 2017). Jeho pH se pohybuje v rozmezí od 7,5 do 8,5 (Botheju et al., 2010; Tigrini et al., 2016) a v rámci BPS je nejčastěji využíván jako ředící medium BPS pro optimalizaci sušiny vstupujícího substrátu (Paavola et Rintala, 2008; Koszel et Lorencowicz, 2015). Při aplikaci na zemědělskou půdu jsou vysoké koncentrace amoniaku nežádoucí z hlediska volatilizace do ovzduší (Albaquerque et al., 2012b; Tambone et al., 2015; Li et al., 2018). Tyto vysoké koncentrace amoniakálního dusíku také vedou k rychlé nitrifikaci v půdním prostředí (Risberg et al., 2017; Albaquerque et al., 2012b) a sekundárně mohou přispívat k eutrofizaci vod (Qin et al., 2018; Tambone et al., 2015).

Vzhledem k tomu, že digestát je produkován průběžně během roku (Gong et al., 2013) vznikají vysoké nároky na skladování fermentačního zbytku (Paavola et Rintala, 2008), úpravu a omezení environmentálních dopadů, jež se v poslední době stávají stále více diskutovaným a řešeným problémem (Dennehy et al., 2018; Li et al., 2018; Qin et al., 2018).

2.8 Inovativní možnosti úpravy kapalně frakce fermentačního zbytku

Snahy o inovativní možnosti úpravy fugátu vychází z velkých objemů tohoto konečného produktu anaerobní digesce. Jejich hlavním cílem je většinou snížení objemu vzniklého fugátu, který povede k úsporám skladovacích kapacit (Fechter et Kraume, 2016) a zároveň dojde k zakoncentrování živin (Al Saedi et al., 2013; Fuchs et Drogg, 2015). Aktuálně řešenými metodami úpravy fugátu se proto stávají aplikace membránové filtrace, stripování amoniaku, srážení struvitu či tepelného zahušťování (Vázquez-Rowe et al., 2015; Bolzonella et al., 2018). Novou možností též může být využití řas pro produkci biomasy (Qin et al., 2018) či nitrifikace fugátu (Botheju et al., 2010).

2.8.1. Membránové procesy

Membránové procesy vedou k efektivnímu zakoncentrování fugátu (Gong et al., 2013; Hjorth et al., 2010) a k produkci vody (permeátu), která může být vypouštěna do prostředí (Dumitru, 2014; Hjorth et al., 2010). Tyto procesy jsou založené na prostupu kapaliny přes syntetickou polopropustnou membránu, kdy na jedné straně jsou díky rozdílnému tlaku zachyceny neprostupné části v koncentrované podobě a na druhé straně je produkována nezávadná voda (permeát; Davis, 2010; Dumitru, 2014). Mezi membránové procesy řadíme mikrofiltraci, ultrafiltraci, nanofiltraci a reverzní osmózu. Rozdíly mezi těmito technologiemi

spočívají ve velikosti pórů a molekulární hmotnosti zachycených částic. Tyto velikosti se pohybují od průměru 0,1 – 10 μm pro mikrofiltraci, až po reverzní osmózu schopnou separace velice malých částic (0,0001 μm ; Gong et al., 2013; Hjorth et al., 2010; Holloway et al., 2007; Diltz et al., 2007; Davis, 2010; Dumitru, 2014; Mulder, 1996).

2.8.2 Stripování amoniaku

V průběhu stripování amoniaku z fugátu dochází k vyloučení těkavého amoniaku proudem plynu (Guštin et Marinšek-Logar, 2011; Tao et Ukwuani, 2015), který je jímán do kyseliny, v jejímž prostředí dochází k tvorbě soli (Törnwall et al., 2017; Tao et Ukwuano, 2015). Tento proces je ovlivněn hodnotou pH, teplotou či tlakem (Jiang et al., 2014; Sheets et al., 2015). Nevýhodou této metody jsou vysoké náklady nutné pro úpravu pH, aplikaci chemických činidel a zahřívání reaktoru, ve kterém proces probíhá (Jiang et al., 2014). Výhodou však může být využití nespotřebovaného odpadního tepla z bioplynové stanice, které je při anaerobní digesti využito pouze z 20 až 40 % (Anwar et Tao, 2016; Vondra et al., 2018).

2.8.3. Srážení struvitu

Srážení struvitu je dobře známé a využívané při získávání dusíku a fosforu z odpadních vod ve formě sloučeniny $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sýkorová et al., 2014; Harrison et al., 2011). Srážení je dosaženo aplikací sloučenin obsahujících Mg^{2+} (MgCl_2 , MgO či $\text{Mg}(\text{OH})_2$; Sýkorová et al., 2014; Sheets et al., 2015). Sheets et al. (2015) však uvádějí, že srážení struvitu je u fugátu velmi problematické a například Törnwall et al. (2017) ve své práci zjistili, že během srážení trvajícího 60 minut bylo získáno pouze 42 % amoniakálního dusíku obsaženého v původním digestátu, respektive došlo k získání pouze 80 % dusíku během tři hodiny trvajícího srážení.

2.8.4 Tepelné zahušťování

Tepelné zahušťování je dlouhodobě ověřená technologie, jejíž využití je známé z úpravy různých procesních a odpadních vod. Největší předností této úpravy je snížení nároků na skladování (Vondra et al., 2018; Bamelis et al., 2015). Nevýhodou jsou však vysoké náklady na spotřebu energií, zejména pak na dodávky tepla (Vondra et al., 2018). Jeho potřeba však může být snížena díky snadné dostupnosti tepla z kombinované výroby tepla a elektrické energie na BPS (Anwar et Tao, 2016). Uvádí se, že pouze 20 až 40 % vyrobeného tepla je využito k vytápění anaerobního reaktoru a zbytek je považován za odpadní teplo. Toto nevyužité odpadní teplo pak může sloužit při tepelném zahušťování (Vondra et al., 2018). Drog et al. (2015) a Fechter et Kraume (2016) uvádějí jako vhodnou možnost tepelného zahuštění na 50 % původního objemu fugátu, protože takto zahuštěný materiál bude mít sušinu

v rozmezí 10 – 12 % v porovnání s původním surovým materiálem, přičemž zahuštěný produkt bude stále čerpatelný. Během zahušťování dochází k produkci vody, která je zkondenzována a jímána v podobě kondenzátu (destilátu) a vyznačuje se nízkými koncentracemi všech chemických látek včetně amoniakálního dusíku (Bonmatí et Flotats; 2003; Al Seadi et al., 2013; Chiumenti et al., 2013). Takto produkovaná voda může být využita k závlahám (Heviánková et al., 2014) či jako procesní voda k ředění materiálů v rámci provozu BPS (Vondra et al., 2018; Khan et Nordberg, 2018). Na druhé straně je vzniklý zahuštěný fugát bohatý na živiny a vyznačuje se vysokým hnojivým potenciálem (Chiumenti et al., 2013; Heviánková et al., 2014; Li et al., 2016). Nespornou výhodou této technologie je uzavřený systém odpařování, který minimalizuje emise škodlivin do ovzduší (Bonmatí et Flotats, 2003).

2.8.5. Nitrifikace kapalně frakce fermentačního zbytku

Nitrifikace je biologický proces transformace anorganického dusíku, který je dobře znám při čištění odpadních vod s následnou redukcí na plynný dusík pomocí denitrifikace (Reeves, 1972; Chudoba et al., 1991). Při samotné nitrifikaci dochází k biochemické oxidaci amoniakálního dusíku, kdy hlavním elektronovým akceptorem je kyslík. Jedná se o proces, který se skládá ze dvou navazujících stupňů, kdy při prvním kroku dochází k oxidaci N-amon na dusitany (NO_2^-) pomocí bakterií *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* nebo *Nitrosocystis* (Chudoba et al., 1991). Tyto druhy bakterií jsou souhrnně označovány jako AOB (Ammonia Oxidising Bacteria; Blackburne et al., 2008). V dalším kroku pak dochází k oxidaci dusitanů na dusičnany (NO_3^-) pomocí bakterií z rodů *Nitrobacter*, *Nitrospira* nebo *Nitrocystis*. Tyto bakterie jsou označovány jako NOB (Nitrite Oxidising Bacteria; Blackburne et al., 2008). Nitrifikace je zajišťována chemoautotrofními gram negativními bakteriemi, které využívají CO_2 jako zdroj uhlíku patří mezi striktní aeroby a současně je potřeba jim zajistit dostatek kyslíku pro oxidaci substrátu (Gerardi, 2002; Reeves, 1972). Níže uváděná rovnice pak sumárně popisuje nitrifikaci.



Aplikace nitrifikace v prostředí fugátu je žádoucí ze dvou hlavních důvodů. Prvním důvodem je omezení volatilizace amoniaku při skladování i aplikaci na zemědělskou půdu (Tambone et al., 2015; Li et al., 2018), která je závislá na hodnotě pH. Při vyšším pH je ve fugátu obsaženo velké množství těkavého amoniakálního dusíku ve formě těkavého NH_3 (Botheju et al., 2010). Další výhodou této transformace je převedení amoniakálního dusíku do dusičnanové formy, která je stabilnější a snadněji přístupná pro rostliny (Takemura et al., 2016).

Technologické propojení nitrifikace s následným tepelným zahuštěním však může efektivně transformovat N-amon na dusičnany, čímž dojde k omezení volatizace amoniaku (Risberg et al., 2017; Li et al., 2018) a zakoncentrování živin ve fugátu se současnou produkcí technologické vody (Chiumenti et al., 2013; Vondra et al., 2018). Nevýhodou tohoto systému však může být nebezpečí snadného transportu dusičnanů do podzemních vod v důsledku vysokých dávek takto zakoncentrovaných produktů (Haraldsen et al., 2011; Al Seadi et al., 2013).

2.9 Legislativní požadavky na využití, aplikaci a kvalitu fermentačního zbytku

Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, kvalita vznikajícího digestátu, respektive i jeho separovaných složek, je významně ovlivňována kvalitou surovin vstupujících do procesu anaerobní digesce (Risberg et al., 2017). Ta se následně odráží v legislativních požadavcích na kvalitu a aplikaci materiálů pocházejících z BPS (digestát, separát, fugát). Z toho pramení i nároky spojené s ochranou ovzduší a podzemních vod. V legislativních podmínkách České republiky je tato problematika řešena jak formou zákonů, tak i formou zpřesňujících vyhlášek. Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva jsou digestáty, fugáty i separáty označeny jako organická a organominerální hnojiva (typ 18.1), která vznikají anaerobní fermentací při výrobě bioplynu. Nařízení vlády č. 262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí a akčním programem ve znění pozdějších novel, dále definuje digestát a fugát jako hnojiva s rychle uvolnitelným dusíkem (poměr C:N < 10), přičemž digestát má dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb. sušinu 3 - 13 % a minimální obsah celkového dusíku ve vzorku je 0,3 %. Fugát má dle této vyhlášky sušinu do 3 % a minimální obsah celkového dusíku ve vzorku 0,1 %. Separát je naopak považován za hnojivo s pomalu uvolnitelným dusíkem (C:N > 10) a sušinou nad 13 %, minimální obsah celkového dusíku ve vzorku je 0,5 %.

2.9.1. Skladování a aplikace fermentačního zbytku na zemědělskou půdu

Skldování a aplikace produktů z BPS je v České republice upraveno vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv. V § 5 je uvedeno, že kapalná organická a organominerální hnojiva se skladují v nepropustných nadzemních, případně částečně zapuštěných nádržích nebo v zemních jímkách, volně ložená tuhá organická a organiminerální hnojiva se skladují ve stavbách zabezpečených stejným způsobem jako stavby pro skladování tuhých statkových hnojiv s vyloučením přítoku

povrchových nebo podzemních vod. V § 7 této vyhlášky jsou dále stanoveny maximální aplikační dávky organických a statkových hnojiv se sušinou nad 13 % (separát) na maximálně 20 tun sušiny na hektar v průběhu 3 let. Maximální aplikační dávka organických a statkových hnojiv se sušinou nejvýše 13 % (digestát, fugát) je stanovena na 10 tun sušiny v průběhu 3 let.

Tato vyhláška také v § 7 stanovuje dobu, během které musí dojít k zapravení hnojiv do půdy. U tekutých statkových nebo kapalných organických hnojiv se tyto materiály musí zapravit nejpozději do 24 hodin po jejich aplikaci, pro tuhá statková nebo organická hnojiva platí nutnost jejich zapravení nejpozději do 48 hodin.

Neméně důležitým právním předpisem je zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech, který stanovuje požadavky na rovnoměrné hnojení a zákaz hnojení na sněhem pokrytou, zamrzlou, zaplavenou či přemokřenou půdu. Konkrétní termín období zákazu hnojení je pak stanoven v nařízení vlády č. 262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí a akčním programu, kde je pro hnojiva s rychle uvolnitelným dusíkem zákaz jeho aplikace v období od 15.11. do 15.2. pro klimatický region 0 - 5 (region velmi teplý, teplý až po mírně teplý-vlhký region), respektive od 5.11. do 28.2. pro klimatický region 6 - 9 (mírně teplý-vlhký až po chladný region).

2.9.2. Obsah rizikových prvků ve fermentačním zbytku

Legislativa v oblasti obsahů rizikových prvků v digestátech a jeho separovaných produktech je upravena dvěma předpisy. Obsah rizikových prvků v materiálech se sušinou nejvýše 13 % a nad 13 % jsou upraveny vyhláškou č. 474/2000 Sb. (novela č. 131/2014 Sb), avšak pokud se jedná pouze o aplikaci na zemědělskou půdu. Tyto limitní koncentrace jsou uváděny níže v tabulce č. 2. Novela této vyhlášky (vyhláška MZe č. 237/2017 Sb.) zavádí sledování mikroorganismů *Salmonella sp.*, *Escherichia coli* a enterokoků v organických hnojivech a substrátech, při jejichž výrobě byly použity odpady z čistíren odpadních vod. Obsahy rizikových prvků ve fermentačním zbytku nejsou v rámci Evropské unie konkrétně definovány a Saveyn et Eder (2014) uvádějí jejich navrhované obsahy, které jsou uvedené v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 2. Obsahy rizikových prvků v organických hnojivech

	Cd	Pb	Hg	As	Cr	Cu	Mo	Ni	Zn
sušina	mg/kg sušiny								
do 13 %	2	100	1	20	100	250	20	50	1200
nad 13 %	2	100	1	20	100	150	20	50	600

Tabulka č. 3. Návrh Evropské Unie na obsahy rizikových prvků v organických hnojivech

Cd	Pb	Hg	As	Cr	Cu	Mo	Ni	Zn
mg/kg sušiny								
1,5	120	1	-	100	200	-	50	600

Digestáty, které nesplňují požadavky legislativy hnojiv (vznikly zpracováním odpadů v odpadové BPS), jsou hodnoceny na základě zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech a vyhlášky Ministerstva životního prostředí č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady a v případě aplikace jsou považovány za rekultivační digestáty (Tabulka č. 4). Ty jsou děleny do třech tříd a současně pro ně platí maximální přípustná vlhkost 98 %, zároveň přepočtený obsah dusíku na sušinu nesmí přesáhnout 0,3 % hmotnosti a pH musí být v rozmezí 6,5 – 9,0. Rekultivační digestáty tak mohou být využity na nezemědělskou a lesní půdu, respektive jejich využití je pouze pro rekultivační účely, případně mohou sloužit jako technologický materiál skládky. Pokud však budou vzniklé digestáty obsahovat nadlimitní koncentrace rizikových prvků, jsou dle platné legislativy označovány za nebezpečné odpady.

Tabulka č. 4. Obsahy rizikových prvků v rekultivačních digestátech

	Cd	Pb	Hg	As	Cr	Cu	Ni	Zn	PCB	PAU
mg/kg sušiny										
Třída I	2	200	1	10	100	170	65	500	0,02	3
Třída II	3	300	1,5	20	250	400	100	1200	0,2	6
Třída III	4	400	2	30	300	500	120	1500	-	-

2.9.3. Nitrátová směrnice

Nitrátová směrnice je předpis Evropské unie (91/676/EHS), který slouží k ochraně vod před znečištěním dusičnany ze zemědělství a má za cíl snížit eutrofizaci vod. V podmínkách České republiky je uplatněna v § 33 vodního zákona (zákon č. 254/2001 Sb., o vodách), který definuje zranitelné oblasti a povinnost jejich revize nejméně jednou za 4 roky. Hlavním prováděcím předpisem je nařízení vlády č. 262/2012 Sb.. Nitrátová směrnice tak stanovuje maximální množství dusíku na hektar, které smí být v těchto oblastech použito (až 230 kg/ha pro řepku a ozimou pšenici v třetí výnosové hladině). Vedle toho je část nařízení uplatněna v zákoně č. 156/1998 Sb., o hnojivech. Tato omezení jsou uvedena v kapitole 2.9.1.

2.9.4. Ochrana ovzduší

Emise amoniaku ze zemědělství jsou v ČR zakotveny v zákoně č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší, přičemž tato problematika je dále specifikována formou vyhlášek a metodických pokynů. Vznikající emise jsou řešeny pouze pro chovy hospodářských zvířat s celkovou projektovanou roční emisí amoniaku nad 5 tun (vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 415/2012 Sb.), avšak dle zpřesňujícího Metodického pokynu k chovům hospodářských zvířat vydaným Ministerstvem životního prostředí není považováno anaerobní zpracování zemědělských biologicky rozložitelných odpadů (kejda, chlévská mrva, podestýlka atd.) v BPS za proces snižující emise amoniaku, protože nebyly prokázány snižující účinky anaerobní digesce na emise amoniaku. Problematika emisí methanu však v uváděných předpisech řešena není.

3. Hypotézy a cíle práce

Disertační práce je zaměřena na optimalizaci provozu bioplynových stanic, přičemž pozornost je věnována zejména ověření možnosti využití dosud opomíjených snadno dostupných substrátů pro výrobu bioplynu a návrhu racionálního postupu nakládání s fermentačním zbytkem. Jako substrát pro výrobu bioplynu byly testovány vybrané rostliny v různých fázích ontogeneze. Návrh racionalizace nakládání s fermentačním zbytkem pak spočíval v nitrifikaci a následném tepelném zahuštění jeho kapalné frakce.

Hypotézy

1. Testované substráty (rozdílné druhy trav, technické konopí) budou produkovat množství bioplynu srovnatelné s konvenčně pěstovanou kukuřicí.
2. Je předpoklad, že rostliny v rozdílné fázi vývoje mají různý obsah a složení organických látek a biomasy. Toto rozdílné složení se sekundárně projeví různou produkcí bioplynu a odlišným zastoupením methanu.
3. Úpravou podmínek při skladování rostlinných materiálů před jejich zpracováním anaerobní digescí dojde ke změně biologické rozložitelnosti těchto materiálů. To povede k vyšší produkci bioplynu, resp. methanu.
4. Předpokládáme, že i v agresivním prostředí fugátu je možno iniciovat biochemický proces nitrifikace. Pomocí něj lze těkavý amoniakální dusík převést do stabilnější nitrátové formy a zároveň dostatečně snížit hodnotu pH.
5. Předpokládáme, že nitrifikovaný fugát lze následně podrobit tepelnému zahuštění, které umožní zakoncentrování živin a produkci relativně čisté procesní vody.

Cíle

1. Ověřit vhodnost různých druhů trav a technického konopí k produkci bioplynu v zemědělských bioplynových stanicích.
2. Stanovit maximální výtěžnost bioplynu a methanu v závislosti na různé vývojové fázi testovaných rostlin.
3. Zjistit vliv teplotních podmínek při skladování rostlinných materiálů, před jejich zpracováním anaerobní digescí, na výtěžnost a kvalitu bioplynu.
4. Nalézt podmínky umožňující iniciaci a dlouhodobé udržení procesu nitrifikace v prostředí fugátu.

5. Popsat vlastnosti produktů tepelného zahušťování surového a nitrifikovaného fugátu a navrhnout možnosti využití těchto produktů.

4. Publikované práce

4.1 Míchal et al. (2017). Anaerobic digestion of grass: The effect of temperature applied during the storage of substrate on the methane production

Autoři: Míchal, P., Švehla, P., Plachý, V., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Environmental Technology. 38 (13-14). 1716-1724.



Anaerobic digestion of grass: the effect of temperature applied during the storage of substrate on the methane production

Pavel Michal^a, Pavel Švehla^a, Vladimír Plachý^b and Pavel Tlustoš^a

^aDepartment of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague – Suchbát, Czech Republic; ^bDepartment of Microbiology, Nutrition and Dietics, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague – Suchbát, Czech Republic

ABSTRACT

Within this research, biogas production, representation of methane in biogas and volatile solids (VSs) removal efficiency were compared using batch tests performed with the samples of intensively and extensively planted grasses originating from public areas. Before the batch tests, the samples were stored at different temperatures achievable on biogas plants applying trigeneration strategy (−18°C, +3°C, +18°C and +35°C). Specific methane production from intensively planted grasses was relatively high (0.33–0.41 m³/kg VS) compared to extensively planted grasses (0.20–0.33 m³/kg VS). VSs removal efficiency reached 59.8–68.8% for intensively planted grasses and 34.6–56.5% for extensively planted grasses. Freezing the intensively planted grasses at −18°C proved to be an effective thermal pretreatment leading to high biogas production (0.61 m³/kg total solid (TS)), high representation of methane (64.0%) in biogas and good VSs removal efficiency (68.8%). The results of this research suggest that public areas or sport parks seem to be available, cheap and at the same time very effective feedstock for biogas production.

ARTICLE HISTORY

Received 14 March 2016
Accepted 22 September 2016

KEYWORDS

Anaerobic digestion; biogas; methane; grass; trigeneration

1. Introduction

Methane-rich biogas can be produced from a wide range of feedstocks (organic fraction of municipal waste, animal manure and slurry, agricultural and energy crops, etc.) through anaerobic digestion and can replace fossil fuels used in both heat and electricity generation, for vehicles [1], and for cooling via trigeneration [2].

Grasslands play an important role in the global agriculture, as they cover 69% of the world's agricultural area or 26% of the total land area. Grass has been traditionally used as the principal livestock forage. Currently, considering its high potential for biogas production, the grass is also frequently used as a substrate in agricultural biogas plants. Future utilization can also include the production of lignocellulosic bioethanol and synthetic biofuels [3]. The grasslands do not require the addition of fertilizers and annual ploughing of soil [4]. Intensive grasslands are dominated by a small number of grass species [5]. Griffin et al. [6] found that nitrogen fertilization has an effect on the number of grass species and increasing nitrogen fertilization also positively influences nitrogen and lignin concentrations [7]. The majority of grass is located on

permanent grasslands [8]. Additional supplies of grass can come from edges of roadsides, airports, public and chateau parks or sport parks (e.g. football pitch, golf course and racecourses). Green garden waste represents also a significant source of grass [9]. Herbaceous phytomass from natural grasslands, gardens and parks is an easily available substrate for biogas production. It often represents the cheapest biomass feedstock for biogas production [10]. Furthermore, in contrast to maize and other crops, the use of grass for energy production will not affect food prices [11].

Lehtomäki et al. [12] stated that grasses according to their relatively high methane potential can be a suitable crop for biogas production in Northern countries (as shown in the example of Finland). Moreover, other authors suggest the use of grass as a substrate for biogas plants also in Belgium [13], Ireland and other European temperate zone countries [4]. The use of grass as the sole substrate for biogas production seems not to be suitable due to a potential lack of trace elements (especially cobalt and selenium) [14], mixing problems, floating of the grass at the liquor surface, blocking pipes and pumps by the grass fibres [15], and the wrapping of longer grass particles around moving

devices which can cause failures in biogas plant [3]. However, the co-fermentation of grass from public areas with other traditional substrates for anaerobic digestion (e.g. manure, sludge or maize) seems to be a promising solution [16].

Prochnow et al. [3] proved that the methane yield from grass depends strongly on the representation of different grass species and varieties. Biogas yield (or more precisely methane yield) within the anaerobic digestion of grass could reach values comparable to maize representing currently the most preferred substrate for biogas production in agricultural biogas plants. Methane production from grass may differ significantly depending on given conditions. For intensive and extensive grasslands it can vary from 0.33 to 0.39 m³/kg volatile solid (VS) and from 0.1 to 0.3 m³/kg VS [13,17,18], respectively [13,18]. The methane yield for maize varied from 0.2 to 0.4 m³/kg VS [13,17,19,20]. Variable biogas yield during the process of anaerobic digestion of grass is caused mainly by variable anaerobic biodegradability of the feedstock. The herbage chemical composition is a very important factor from the point of view of biogas (as well as methane) production. Lignin and (hemi)cellulose content, potential crystallization of cellulose, proportion of saccharides, the presence of toxic components, ash content and nutrients represent very important factors influencing biodegradability of grass biomass [12,21–23]. These factors can even vary among plants of the same species according to cultivation method, plant part, harvest time/age/growth stage and genotype. Grass biomass comprises 25–40% cellulose, 15–50% hemicellulose and 10–30% lignin, depending on the species and environmental conditions [24].

Employing a suitable method of pretreatment of the grass biomass prior to the digestion process leading to optimization of the size and structure of grass particles could improve the rate of anaerobic degradation significantly, thanks to the acceleration of hydrolytic phase. This way, the methane yield during anaerobic digestion of grass could be maximized [25–27]. The pretreatment could be realized using varied mechanical (grinding, milling), chemical (alkali treatment), thermal (heat treatment, freezing/thawing) and/or biological (treatment by enzymes) processes [28]. All these methods lead to cell disruption [29,30]. Freezing causes the formation of intracellular crystals which can mechanically damage the cell membranes [31] and consequently lead to the release of intracellular and cell wall polymers (especially polysaccharides, proteins, lipids and other macromolecules) into the liquid phase. High temperature influences the representation of total solids (TSs) in grass which can be easily stored, pretreated and consequently used in winter and spring periods. Additionally, applying

higher storage temperature leads to increased surface, enabling higher microbial activity and higher biogas production [3]. However, in general, no comprehensive study comparing the influence of different temperatures applied during the storage of grass before its anaerobic digestion is available within current the literature. We can see a growing number of biogas plants where only the heat and electric power are produced. But the modern trend is to utilize maximum energy so the application of trigeneration could increase the performance of the biogas plant [2].

The main objective of this paper was to determine and compare biogas production within anaerobic digestion of grass originated from two different sources where the grass was stored under different temperature regimes (+3°C, +18°C and +35°C). Batch tests quantifying biochemical methane production were applied for this purpose. Additionally, analogical experiments were performed with the samples of grass from the same sources which were thermally pretreated by freezing at –18°C. Moreover, the efficiency of anaerobic degradation process of grass stored under different temperature regimes quantified by the decrease in VS was evaluated. The temperatures mentioned above were chosen in line with the trend of the application of trigeneration within anaerobic digestion where heat, electric power and cold can be simultaneously produced.

2. Material and methods

2.1. Inoculum for batch tests

Inoculum was obtained from the Krásná Hora nad Vltavou biogas plant which operates at mesophilic conditions (39°C). Animal slurry (60% of weight) and maize silage (40% of weight) serve as the main substrates for the anaerobic reactor of this biogas plant. The inoculum was degassed and subsequently stored at a temperate room for 10 days at 40°C in order to minimize the effect of inoculum on biogas production without any treatment of inoculum. The average pH of the inoculum was 8.2 and the VSs concentration was 71.1% of TSs. The TS concentration reached 62 g/l and soluble chemical oxygen demand (COD) was 2200 mg/L.

2.2. Grass biomass used for the experiments

Two sources of grass were used for this experiment. The first one was collected from a football pitch (intensively planted grass, area 90 m × 65 m) and the second one from a public park (extensively planted grass, area 20 m × 20 m). The samples were obtained in the

second half of April. For extensively planted grass the second cut was used as the sample for the experiment. Considering the fact that intensively planted grass is chopped every week, 10th cut was used as the sample of intensive grass. All samples were taken from Prague-Suchdol location (intensively planted grass 50° 07'48.6" N 14°22'43.6" E; extensively planted grass 50° 07'50.6" N 14°22'12.0" E).

The amount of fertilizers applied on intensively fertilized grass was: 560 kg/ha of nitrogen, 410 kg/ha of potassium and 120 kg/ha of phosphorus. The amount of water supplied within the irrigation for cultivating the grass was 70 m³. The amount of fertilizers applied on extensive planted grass was: 75 kg/ha of nitrogen, 75 kg/ha of potassium and 75 kg/ha of phosphorus. This type of grass was irrigated only by water precipitation. Fertilizers were applied during the vegetative season from April to October.

The physicochemical characteristics of particular grass cuttings are listed in Table 1.

The intensively planted grasses consist of only four grass species with following representation in dominance of plants (50% *Festuca rubra* L., 35% *Lolium perenne* L., 10% *Poa pratensis* L. and 5% *Lolium multiflorum* L.) but extensive cuttings consist of many more species (consist of monocot and dicot species with a majority of monocot grass –25% *L. perenne* L., 15% *F. rubra* L., 10% *Arrhenatherum elatius* L. and 15% *P. pratensis* L.; and dicot species –5% *Trifolium pratense* L., 10% *Trifolium repens* L., 8% *Plantago lanceolata* L., 2% *Potentilla reptans* L. and 10% *Taraxacum officinale*).

2.3. Storage of grass before batch tests

Before anaerobic digestion the samples of grass were stored under different temperature regimes (freezing at –18°C, +3°C, +18°C and +35°C) in order to simulate conditions easily achievable on biogas plants if they applied the trigeneration process. The storage of all tested samples at defined temperatures lasted for one week. The samples treated at –18°C were stored in a freezer,

at +3°C were stored in refrigerator, at +18°C were stored in a room which was air conditioned and samples treated at +35°C were stored at a dryer (Elsko MF5, Czech Republic). Finally, all samples were dried at 40°C to the constant weight before being milled (Retsch mill SM 100, Retsch GmbH, Germany). The samples were dried for better homogenization, better representativeness of the samples, and finally for same weight of material used in batch tests (0.70 ± 0.002 g), also used for the determination of TS, VS, N_{tot}, crude fibre and lipids in the samples.

2.4. Biochemical methane potential tests for the quantification of biogas production (batch tests)

The biochemical methane potential (BMP) tests were performed according to [32] and modified procedure of [33]. Each sample assay was carried out in five replications, and each assay was performed in 120 mL glass bottles. Inoculum and substrate were added to bottles where 30 mL of inoculum was mixed with grass samples (VS 0.70 ± 0.002 g) and distilled water was added to each bottle to adjust the final volume to 80 mL. The inoculum to substrate ratio was 1.9 (VS basis). Bottles were sealed with butyl rubber stoppers and plastic seal. The volume of biogas produced during BMP test was determined by the volumetric method where the produced gas volume is recorded when the levels of the confining liquid in the audiometer tube and in the levelling bottle are the same [32]. A blank assay (only inoculum) was used to determine biogas production resulting from inoculum itself – this biogas production was subtracted from each sample and thus the real biogas production was obtained and the biogas production was subsequently corrected to standard conditions (0°C, 101.325 kPa). The same amount of inoculum was added to each bottle. Fermentation was carried out under mesophilic conditions at 40°C. Batch tests lasted for 57 days. Gas samples were taken through the butyl rubber stoppers. During the first two weeks of the tests, the biogas production was measured every day of the batch tests, in the following two weeks was measured every second day and rest of the time the biogas production was quantified once a week. Gas composition (especially the representation of methane) was analysed twice per week during the first four weeks and later weekly.

Having finished the batch tests, the efficiency of organic matter removal was quantified by the comparison of VS concentration at the beginning and at the end of the experiment. VS removal efficiency was calculated according to Equation (1) where the contribution of

Table 1. Physicochemical analyses of intensively and extensively planted grass.

	Intensively planted grass	Extensively planted grass
TS (%)	28.2 ± 0.42	21.3 ± 2.25
VS (% TS)	93.7 ± 0.49	88.3 ± 0.86
Crude fiber (% TS)	4.6 ± 0.24	3.6 ± 0.31
Lipids (% TS)	0.5 ± 0.06	0.3 ± 0.04
Ash (% TS)	6.3 ± 0.49	11.6 ± 0.86
N (% TS)	4.0 ± 0.10	3.2 ± 0.10
C (% TS)	38.5 ± 0.55	37.6 ± 0.54
H (% TS)	5.6 ± 0.25	5.5 ± 0.10
S (% TS)	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.16
C/N	9.6 ± 0.11	11.8 ± 0.26

inoculum VS removal was taken into consideration:

$$VS_{\text{removal}}(\%) = \frac{[cVS_{1(S+n)} - cVS_{2(S+n)}] - [cVS_{1(I)} - cVS_{2(I)}]}{[cVS_{1(S+n)} - cVS_{1(I)}]} \cdot 100\% \quad (1)$$

where $cVS_{1(S+n)}$: VS concentration of sample + inoculum at the start; $cVS_{2(S+n)}$: VS concentration of sample + inoculum at the end; $cVS_{1(I)}$: VS concentration of inoculum at the start; $cVS_{2(I)}$: VS concentration of inoculum at the end.

The parameters T80 and T90 were determined as well. The values of T80 and T90 correspond to time which is needed to produce 80% and 90% of the maximum gas production during the experiment, respectively [34].

2.5. Analytical methods

TS, VS, COD and pH were determined according to standard methods [35]. TS were determined by the TSs dried at 103–105°C according to method SM 2450-B, using drying oven (Ecocell 55, Czech Republic). VSs were determined by the annealing of the sample at 550°C according to method SM 2540-E, using muffle furnace (ELSKLO MF5, Czech Republic). COD was measured by the colorimetric method SM 5220-D, using the spectrophotometer HACH DR/4000 (Hach, Germany). pH was measured by electrometric method SM 4500-H⁺ B, using a pH meter IQ 150 equipped with an IS FET PH77-SS electrode (IQ Scientific Instruments, USA).

Crude fibre was determined according to the crude fibre method – the crude fiber analysis in feeds, using the Fiber Analyzer 2000 (Ankom Technology, USA) [36]. Lipids were measured according to the EC regulation No. 152/2009 [37], using the solvent extractor SER 146 (VELP Scientifica, Italy). The total concentrations of elements N, C, H, S and C/N were analysed according to the Dumas combustion method [38], using the

elemental analyser VARIO MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany).

The representation of CH₄ in the biogas was determined using a gas chromatograph (DANI Master GC, Italy), equipped with a thermal conductivity detector and a 90 m × 0.37 mm column (Restec). Hydrogen was used as the carrier gas. Injection volume was 0.2 mL, injector temperature was 110°C, and the detector and oven temperature was 195°C.

2.6. Statistical analyses

Means and standard error for five replications in each sample were calculated for grass biogas production. Data from the batch tests were analysed using the one-way ANOVA method (with Tukey HSD test) of STATISTICA 12 (StatSoft, Tulsa, USA), where differences between pretreatments were significant at .001 probability levels.

3. Results and discussion

3.1. The influence of temperature applied during the storage on biogas production

The experiments proved that the temperature applied during the storage influences the biogas and methane production (Table 2). Specific biogas and methane production related to 1 kg of TS varied from 0.29 to 0.61 m³/kg and from 0.18 to 0.39 m³/kg respectively, during this experiment. Most of the samples were characterized by methane production from 0.28 to 0.33 m³/kg TS. The highest biogas production was achieved from frozen samples (stored at –18°C). It was caused by a phase change of water into ice, which mechanically damaged cell membranes. Water included in the cell walls during the freezing damaged the complicated structure of lignin, cellulose and hemicellulose into short chains and promotes solubility of organic matter

Table 2. Biogas production, methane and carbon dioxide representation in biogas, specific methane production (mL/1 g TS and VS) and VS removal efficiency.

Pretreatment	Biogas production (mL/g _{TS})	CH ₄ from TS (mL/g)	CH ₄ from VS (mL/g)	CH ₄ (%)	T 80% (days)	T 90% (days)	VS removal (%)
–18 INT	607.4 ^e ± 11.17	388.8	412.7	64.0	11	18	68.8 ± 3.15
+3 INT	501.1 ^{ab} ± 7.57	310.8	334.5	62.0	10	15	59.8 ± 5.11
+18 INT	522.2 ^b ± 8.17	328.9	351.7	63.0	10	14	62.2 ± 1.31
+35 INT	511.3 ^b ± 12.22	313.6	336.9	61.3	11	17	61.1 ± 5.06
–18 EXT	465.5 ^a ± 8.48	288.5	330.4	62.0	9	13	55.8 ± 1.87
+3 EXT	394.8 ^d ± 7.98	245.8	279.4	62.3	9	12	49.1 ± 4.04
+18 EXT	286.2 ^c ± 4.59	178.9	204.5	62.5	9	12	34.6 ± 3.89
+35 EXT	468.8 ^a ± 11.13	280.5	313.4	59.8	10	15	56.5 ± 1.71

Treatment abbreviations: –18 INT: –18 EXT intensively/extensively planted grass stored at –18°C; +3 INT: +3 EXT intensively/extensively planted grass stored at +3°C; +18 INT: +18 EXT intensively/extensively planted grass stored at +18°C; +35 INT: and +35 EXT intensively/extensively planted grass stored at +35°C. Pretreatment with same letter (a–e) was not significantly different.

[28]. Freezing and subsequent thawing helps to release insoluble organics into soluble ones [39]. By this way, a higher proportion of readily solubilized organics was accessible for biological attack during the tests with frozen grass. This fact promoted enzymatic hydrolysis and enhanced biogas production from anaerobic digestion and fermentation processes [40]. The lowest methane production was observed for the sample of extensively planted grass stored at +18°C (0.20 m³ CH₄/kg VS). Generally, a surprising trend of methane production for extensively planted grass stored at +3°C; +18°C and +35°C was observed (0.28, 0.20 and 0.31 m³/kg VS, respectively). This was probably caused by different activities of microorganisms during the storage of grass at applied temperature values. The psychrophilic temperature +3°C is characteristic by minimizing the activity of aerobic as well as anaerobic microorganisms, which leads to reduced enzyme activity or altered transport of nutrients [41]. Therefore, the intensity of the degradation of grass matter is very low at +3°C and almost all organic matter contained in raw grass is available for the biogas production during subsequent BMP test. On the other hand, during the storage of grass realized at +18°C, much more intensive degradation processes could be expected compared to +3°C owing to high activity of mesophilic aerobic organisms at 18°C (bacteria, fungi – f.e. *Aspergillus* or *Penicillium*, whose activity started at a temperature about +15°C) [42]. Thus, a significant portion of easily degradable organic

matter is converted into gaseous emissions (CO₂, NH₃, N₂O, CH₄ and H₂O) already during the storage process [43], and it is not available for biogas production. During the storage realized at the temperature of +35°C, the representation of TS increased significantly compared to +18°C (23.1% and 18.2%, respectively). Insufficient humidity of the sample stored at +35°C probably led to the decrease in the microbial activity [44] compared with the sample stored at 18°C. Additionally, the temperature +35°C exceeds the maximum enabling high activity of many species of mesophilic fungi and bacteria [42]. Thus, the loss of substrate during the storage was lower at +35°C compared with +18°C. The low methane yield for extensively planted grass stored at +18°C corresponds to the low VS degradation efficiency of this sample which reached only 34.6%, in comparison with other samples where VS degradation reached 49.1–68.8% (Table 2).

The methane production from grasses stored at +35°C varied from 0.31 to 0.34 m³ CH₄/kg from VS and corresponded with [18], who investigated methane production from lawn cuttings dried at 60°C. They observed that BMP of the tested biomass varied from 0.29 to 0.39 m³ CH₄/kg VS and methane production from wild plants varied from 0.1 to 0.3 m³ CH₄/kg VS. Our results are also in accordance with [17], who described the methane production 0.36 m³ CH₄/kg VS.

The biogas production, respectively cumulative biogas production (Figure 1) can be split into three

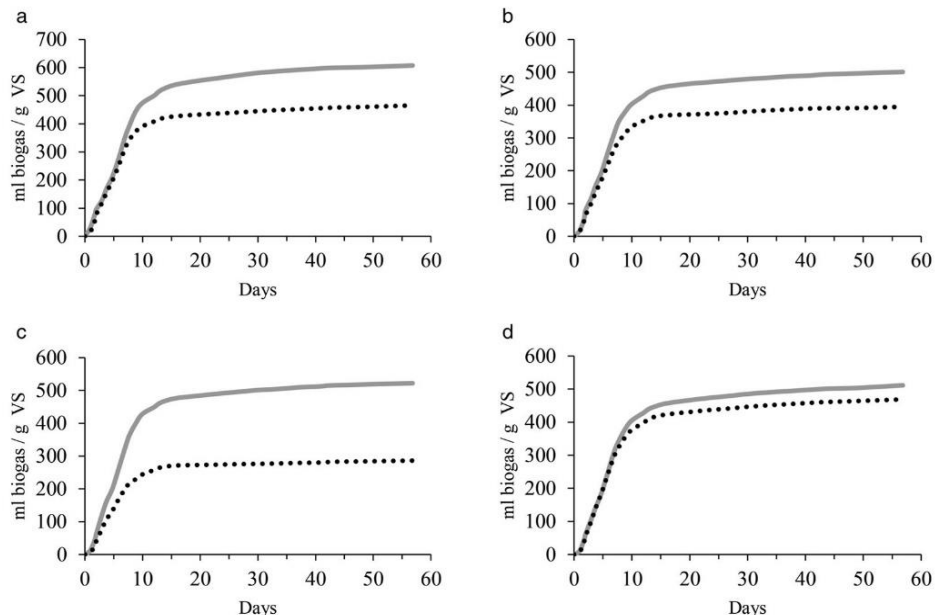


Figure 1. Biogas cumulative production during the batch tests according to different pretreatments (a: -18°C; b: +3°C; c: +18°C; d: +35°C; full line: intensively planted grass; and dotted line: extensively planted grass).

phases. The first is characterized by a sharp increase in biogas production. This is connected with a high concentration of substrate which is available for the anaerobic bacteria. During this phase, a significant increase in the representation of CH_4 in biogas can be seen (Figure 2). This phase corresponds approximately with T80. The second phase is characterized by a moderate biogas production and corresponds to the data in the interval from T80 to T90. The last phase is characterized by a low biogas production until the end of the experiment. T80 and T90 corresponded with results of [34], who described the biogas formation during the 40 days of BMP test of lucerne biomass. Their samples reached T80 on 10th day and T90 reached between the 15th and 20th day. Our results were similar because samples reached T80 around 10th day and T90 from 12th to 18th day.

3.2. The influence of temperature applied during the storage on the representation of methane in biogas

The composition of biogas in all tested samples was similar where the maximum methane representation was observed in the sample of intensively planted grass stored at -18°C which reached 72.2% of methane on ninth day of fermentation.

Figure 2 presents methane concentration in all samples. An upward trend at the beginning of the experiment which is represented by a peak is obvious, as all easily degradable compounds were utilized during this phase of batch tests. These values for maximum methane composition were in the range from 62.9% to 72.2%. After this peak we can see a decrease in stable methane concentrations around 60–64%. Average methane representation during the whole experiment ranged from 59.8% to 64.0% for particular variants. This trend in the representation of methane in biogas during the batch tests corresponded with [45] who found out that the methane content at the beginning of the experiment with the grass had upward trend and reached a maximum of 63–66% in the first week and after a few weeks the methane content decreased to stable values of 59–61%. The same trend, but with higher methane portion, described [17] who stated that during the first weeks the methane content increased up to 66–74% and then it was stabilized between 64% and 66%. Generally, methane representation in biogas produced from grass is diverse according to the given conditions. Asam et al. [17] presented CH_4 representation from 64.2% to 66.6% [45], published lower methane representation in biogas produced from grass – 56.2% and [20] stated that biogas produced from wild grass had methane representation 62.5%,

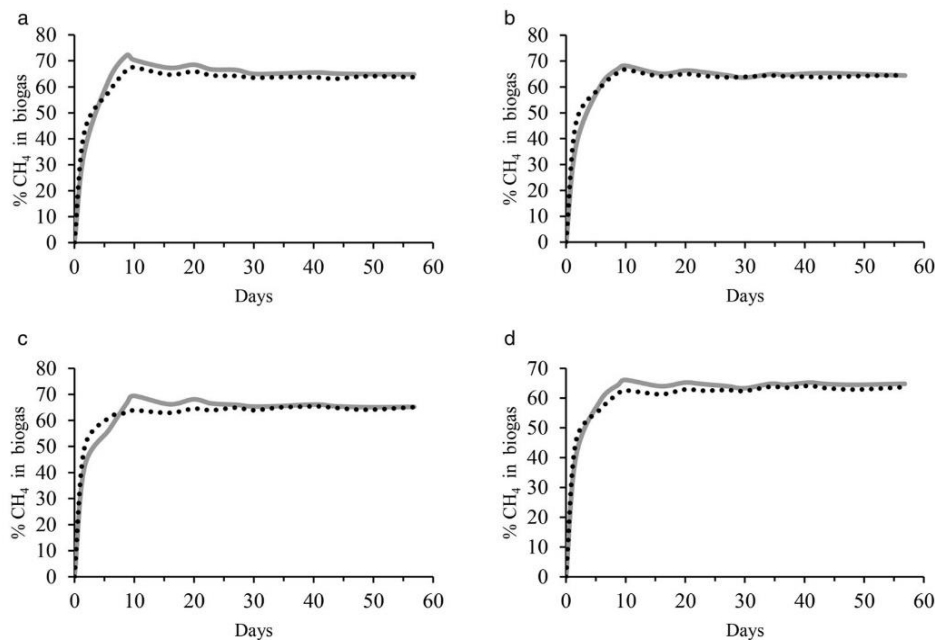


Figure 2. Concentration of methane according to different pretreatments (a: -18°C ; b: $+3^\circ\text{C}$; c: $+18^\circ\text{C}$; d: $+35^\circ\text{C}$; full line: intensively planted grass; and dotted line: extensively planted grass).

which was practically identical to our results with the extensive grass (Table 2).

3.3. The differences of biogas production and the representation of methane in biogas for intensively and extensively planted grass

Biogas production, respectively methane production was higher from all intensively planted grasses compared to extensively planted ones (Figures 1 and 2). Intensively planted grass produced higher methane yield reaching from 0.33 to 0.41 m³ from kg of VS. Extensively planted grass was characterized by methane production in the range of 0.20–0.33 m³ from 1 kg of VS. These values are similar to results of [13], who illustrated that grass grown as intensive crop released in the range of 0.32–0.35 m³ CH₄ from kg of VS, and that from extensively planted grass only 0.23 m³ CH₄ from kg of VS. Triolo et al. [20] stated that wild grass produced 0.31 m³ CH₄ from kg VS, respectively from 0.37 to 0.44 m³ CH₄ from kg of VS from *festulolium* which is a cross between *Festuca* spp. and *L. multiflorum* and corresponds to intensively planted grass. The results published by [13] and [20] are in agreement with our results (Table 2) confirming higher methane potential of intensively planted grass comparing with extensively planted grass. Taking into consideration different representations of particular grass species in the samples of intensively and extensively planted grass used for this experiment (see Section 2.2), certain influence of this fact on the differences of methane yield for different sources of grass cannot be excluded [3].

3.4. VSs removal efficiency

The VS removal efficiency for particular variants ranged between 34.6% (±3.9) and 68.8% (±3.2) (Table 2). The highest VS removal efficiency was found for sample stored at –18°C. The lowest VS degradation was found for a sample of extensively planted grass stored at +18°C corresponding with the lowest biogas production (see Section 3.1). Considering all variants performed, VS removal efficiency reached 63.0% (±3.5) and 49% (±8.8) for intensively and extensively planted grasses, respectively. These results are in agreement with [18], who found that biomass of lawn cuttings is easily biologically degradable in anaerobic conditions which enabled VS removal efficiency to reach 66.6% (±8.5), respectively 44.9% (±12.5) for wild plants. Their grass samples were dried at 60°C and milled for a maximum size of 1 mm. Our results were also confirmed by [46], who evaluated VS removal efficiency during anaerobic digestion of grass. They proved that anaerobic digestion of grasses

can only remove 37–67% of VS. Similarly, Asam et al. [17] described that the conversion of VS into the biogas varied between 35% and 70%. These findings corresponded with our results. Large differences in VS removal efficiency presented in the literature could be attributed to the applied pretreatment of grass and also to the differences in the substrate characteristics, harvest time and methods of reactor operation [47].

Conclusion

Grass originating from public areas or sport parks is suitable to be used as a renewable energy resource for biogas production and can be grown in high biomass yields at locations where other energy crops would not be grown. The experiment proved that the biogas (as well as methane) production during anaerobic digestion of grass is influenced by the way of the growing of grass (extensive or intensive) and by the temperature applied during the storage of grass. Intensively planted grass produced methane ranging from 0.33 to 0.41 m³/kg VS and extensively planted grasses produced 0.20–0.33 m³/kg VS. Freezing had a positive effect on biogas production. Frozen samples of intensively and extensively planted grass produced by 2.4% and 6.1% more methane than samples stored at +35°C, respectively. Simultaneously, VS removal efficiency was up to 12.6% higher in case of frozen sample compared to the sample stored at +35°C. The highest methane content was observed for the frozen samples (64.0% and 62.0% for intensively and extensively planted grass, respectively).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Czech University of Life Sciences Prague, CIGA project number 20152013.

References

- [1] Weiland P. Biogas production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(4):849–860.
- [2] Bruno JC, Ortega-López V, Coronas A. Integration of absorption cooling system into micro gas turbine trigeneration systems using biogas: case study of a sewage treatment plant. *Appl Energy.* 2009;86(6):837–847.
- [3] Prochnow A, Heiermann M, Plochl M, et al. Bioenergy from permanent grassland – a review: 1. Biogas. *Bioresour Technol.* 2009;100(21):4931–4944.
- [4] Smyth BM, Murphy JD, O'Brien C. What is the energy balance of grass biomethane in Ireland and other

- temperate northern European climates? *Renew Sust Energy Rev.* 2009;13(9):2349–2360.
- [5] Hopking A, Holz B. Grassland for agriculture and nature conservation: production, quality and multifunctionality. *Agron Res.* 2006;4(1):3–20.
- [6] Griffin T, Giberson E, Wiedenhoef M. Yield response of long-term mixed grassland swards and nutrient cycling under different nutrient sources and management regimes. *Grass Forage Sci.* 2002;57(3):268–278.
- [7] Cherney JH, Johnson KD, Lechtenberg VL, et al. Biomass yield, fiber composition and persistence of cool-season perennial grasses. *Biomass.* 1986;10(3):175–186.
- [8] Peetersm A. Importance, evolution, environmental impact and future challenges of grasslands and grassland-based systems in Europe. *Grass Sci.* 2009;55(3):113–125.
- [9] Hensgen F, Richter F, Wachendorf M. Integrated generation of solid fuel and biogas from green cut material from landscape conservation and private households. *Bioresour Technol.* 2011;102(22):10441–10450.
- [10] McEniry J, O’Kiely P, Crosson P, et al. The effect of feedstock cost on biofuel cost as exemplified by biomethane production from grass silage. *Biofuels Bioprod Biorefin.* 2011;5(6):670–682.
- [11] Böhle L, Hensgen F, Donnison I, et al. Life cycle assessment of the integrated generation of solid fuel and biogas from biomass (IFBB) in comparison to different energy recovery, animal-based and nonrefining management systems. *Bioresour Technol.* 2012;111:230–239.
- [12] Lehtomäki A, Huttunen S, Lehtinen TM, et al. Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresour Technol.* 2008;99(8):3267–3278.
- [13] Gerin PA, Vliegen F, Jossart JM. Energy and CO₂ balance of maize and grass as energy crops for anaerobic digestion. *Bioresour Technol.* 2008;99(7):2620–2627.
- [14] Thamsiriroj T, Nizami AS, Murphy JD. Why does mono-digestion of grass silage fail in long term operation? *Appl Energy.* 2012;95(3):64–76.
- [15] Thamsiriroj T, Murphy JD. The difficulties associated with mono-digestion of grass as exemplified by commissioning a pilot scale digester. *Energy Fuel.* 2010;24(8):4459–4469.
- [16] Hidaka T, Arai S, Okamoto S, et al. Anaerobic co-digestion of sewage sludge with shredded grass from public green spaces. *Bioresour Technol.* 2013;130:667–672.
- [17] Asam ZZ, Poulsen TG, Nizami AS, et al. How can we improve biomethane production per unit of feedstock in biogas plants? *Appl Energy.* 2011;88(6):2013–2018.
- [18] Triolo JM, Pedersen L, Qu H, et al. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresour Technol.* 2012;125:226–232.
- [19] Braun R, Wellinger A. Potential of co-digestion. Tulln: IEA Bioenergy; 2003.
- [20] Triolo JM, Sommer SG, Moller HB, et al. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour Technol.* 2011;102(20):9395–9402.
- [21] Gunaseelan N. Predicting ultimate methane yields of *Jatropha curcus* and *Morus indica* from their chemical composition. *Bioresour Technol.* 2009;100(13):3426–3429.
- [22] Deren CW, Snyder GH, Tai PYP, et al. Biomass production and biochemical methane potential of seasonally flooded inter-generic and inter-specific saccharum hybrids. *Bioresour Technol.* 1991;36(2):179–184.
- [23] McEniry J, O’Kiely P. Anaerobic methane production from five common grassland species at sequential stages of maturity. *Bioresour Technol.* 2013;127:143–150.
- [24] Nizami AS, Korres NE, Murphy JD. A review of the integrated process for the production of grass biomethane. *Environ Sci Technol.* 2009;43(22):8496–8508.
- [25] Amon T, Kryvoruchko V, Hopfner-Sixt K, et al. Optimierung der methanerzeugung aus energiepflanzen mit dem methanenergiesystem. Wien: Universität für Bodenkultur, Institut für Landtechnik, Departments Nachhaltige Agrarsysteme; 2006.
- [26] Hendriks ATWM, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 2009;100(1):10–18.
- [27] Kumar L, Arantes V, Chandra R, et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour Technol.* 2012;103(1):201–208.
- [28] Montusiewicz A, Lebioccka M, Rozej A, et al. Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. *Bioresour Technol.* 2010;101(10):3466–3473.
- [29] Bien JB, Malina G, Bien JD, et al. Enhancing anaerobic fermentation of sewage sludge for increasing biogas generation. *J Environ Sci Health Part A.* 2004;39(4):939–949.
- [30] Elliott A, Mahmood T. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Res.* 2007;41(19):4273–4286.
- [31] Thomashow MF. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 1998;118(1):1–8.
- [32] Vorein Deutscher Ingenieur (DE). Fermentation of organic materials – Characterization, of substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests – Richtlinie 4630: VDI-Gesellschaft Energietechnik (DE); 2006.
- [33] Mast B, Lemmer A, Oechsner H, et al. Methane yield potential of novel perennial biogas crops influenced by harvest date. *Ind Crop Prod.* 2014;58:194–203.
- [34] Haki J, Fuksa P, Habart J, et al. The biogas production from lucerne biomass in relation to term of harvest. *Plant Soil Environ.* 2012;58(6):289–294.
- [35] Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD, editors. APHA: standard methods for the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington (DC): American Public Health Association; 2005.
- [36] ANKOM.com [Internet]. Macedon (NY): Crude Fiber Analysis in Feeds – Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I); [cited 2016 Jun 1]. Available from: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_1_Crude_Fiber_A2000.pdf
- [37] EU commission regulation No 152/2009 [Internet]. Brussels: Commission regulation (EC) No 152/2009; [cited 2016 Jun 1]. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:054:0001:0130:EN:PDF>
- [38] Winkler R, Botterbrodt S, Rabe E, et al. Stickstoff-/Proteinbestimmung mit der dumas-methode in getreide und getreideprodukten. *Getreide Mehl Brot.* 2000;54:86–91.

- [39] Jan TW, Adav SS, Lee DJ, et al. Hydrogen fermentation and methane production from sludge with pretreatments. *Energy Fuel*. 2008;22(1):98–102.
- [40] Bundhoo ZMA, Mohee R, Hassan AM. Effect of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review. *J Environ Manage*. 2015;157:20–48.
- [41] D'Amico S, Collins T, Marx JC, et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep*. 2006;7(4):385–389.
- [42] Batt AC, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. London: Academic Press; 2014.
- [43] Paillat JM, Robin P, Haussouna M, et al. Predicting ammonia and carbon dioxide emissions from carbon and nitrogen biodegradability during animal waste composting. *Atmos Environ*. 2005;39(36):6833–6842.
- [44] Liang C, Das KC, McClendon, WR. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresour Technol*. 2003;86(2):131–137.
- [45] De Moor S, Velghe F, Wierinck I, et al. Feasibility of grass co-digestion in an agricultural digester, influence on process parameters and residue composition. *Bioresour Technol*. 2013;150:187–194.
- [46] Xie S, Lawlor PG, Frost JP, et al. Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage. *Bioresour Technol*. 2011;102(10):5728–5733.
- [47] Jagadabhi PS, Kaparaju P, Rintala J. Two-stage anaerobic digestion of tomato, cucumber, common reed and grass silage in leach-bed reactors and upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresour Technol*. 2011;102(7):4726–4733.

4.2 Míchal et al. (2018). Production of biogas from industrial hemp: The influence of hemp's growing stages and the strategy of fertilization

Autoři: Míchal, P., Švehla, P., Kaplan, L., Tlustoš, P.

Publikace připravena k odeslání do redakční rady časopisu Journal of Environmental Sciences

31 **1. Introduction**

32 According to the European Commission Renewable Energy Directive 2009/28/EC
33 (European Commission, 2009), we can see a growing interest in renewable energy production
34 which should contribute 20% by 2020 on total energy consumption in the EU. This goal should
35 be achieved for example by producing the biogas in agricultural biogas plants (BGP) where the
36 most frequently used material served as the substrate for biogas production is a silage maize
37 (Mast et al., 2014). However, intensive cultivation of maize can cause problems with soil
38 erosion, which subsequently causes low biodiversity. This intensive cultivation also generates
39 problems with pesticide pollution of soil and water. Additionally, intensive nitrate leaching
40 into ground water is connect with the intensive maize production as well (Norris et al., 2016).
41 Last, but not least is problem with competition of using maize for food and non-food purposes.
42 Abovementioned facts represent the main reasons for searching for the alternative plants and
43 materials useful for biogas production. These innovative substrates include lignocellulosic
44 biomass such as agricultural residues, herbaceous crops or forestry residues. These raw
45 materials are abundant and inexpensive, with a high content of cellulose and hemicellulose
46 (Kim and Dale, 2004). Thus, the application of substrates for biogas production can reduce the
47 potential land use conflicts between food and energy production based on food crops (Gissén
48 et al., 2014). Consequently, there is an interest to explore alternative annual energy crops with
49 low establishment costs fitted into standard crop rotations (Finnan and Styles, 2013).

50 Hemp is considered as a break crop and can be used by tillage farmers to improve diseases
51 and weed control, as well as to improve soil structure with its extensive root system. This
52 practice is well known to increase the yield of subsequent crops such as wheat by as much as
53 20 % (Bosca and Karus, 1998; Kirkegaard et al., 2008). It's cultivation started at least
54 5000 years ago in Central Asia (Fraanje, 1996) and nowadays we can see awakening great
55 interest as a renewable source for many industrial products (González-García et al., 2010).

56 Hemp can be cultivated for non-food use in various applications: fibers can be used for
57 making ropes, cloth and paper, while the seeds can be used as a protein rich food or feed and
58 the woody core can be used as animal bedding (Kuglarz et al., 2014). The new opportunity
59 includes thermal insulation (Kymäläinen and Sjöberg, 2008), bioethanol production (Sipos et al.,
60 2010) or direct energy use for briquette and pellet production (Prade et al., 2011). Hemp
61 gives a high biomass yield per ha. Its high biomass yield results in high area-efficiency, which

62 reduces competition with food and feed crops for arable land (Bosca and Karus, 1998). Due to
63 its robustness and adaptability, hemp is well situated to the Central European climate. It is
64 fast growing (more than 3 m in 100 days) with biomass yield 7 – 30 t of DM/ha and is a spring
65 crop with 120 – 150 days cropping cycle and can also be an excellent predecessor in crop
66 rotation in particular before winter cereals such as wheat (Kreuger et al., 2011; Prade et al.,
67 2012; Ingraio et al., 2015). Another factors supporting using of hemp represent a low
68 requirement for pesticides, good weed suppression and improvement for soil health justify
69 the use of the hemp as an energy crop (Bosca and Karus, 1998; Kok et al., 1994). Additionally,
70 the hemp can take up heavy metals and toxic elements from the soil. The heavy metals
71 concentration in plants does not limit their use in briquette production as bioenergy resources
72 (Rulkens, 2008). Hemp has a low environmental impact compared to several other annual
73 crops commonly used in Europe for production of renewable fuels such as maize, wheat,
74 rapeseed and sugar beets (Werf, 2004). It's energy potential is higher than those of many
75 other energy crops common in northern Europe, e.g. maize or sugar beet for biogas
76 production and reed canary grass as solid biofuel (Prade et al., 2011).

77 The main competitors for biogas production are maize and sugar beet which gave a high
78 biomass yield where maize (DM 15.4 – 25.9 t/ha) and sugar beet (10.7 – 23.0 t/ha) have often
79 a similar or only slightly higher biomass yield than hemp (6.6 – 31.3 t/ha; Achilles et al., 2006;
80 Heiermann et al., 2009; Ion et al., 2015; Brauer-Siebrecht et al., 2016; Kreuger et al., 2011;
81 Prade et al., 2012; Gissén et al., 2014). By this reason, the possibility to apply the hemp as the
82 substrate for biogas production was studied in the past (Kreuger et al., 2011; Pakarinen et al.,
83 2011; Heiermann et al., 2009) but without investigation of the possibility to harvest the hemp
84 in early growth stages. Simultaneously, the effectivity of the application of the byproducts of
85 BGPs operation - solid phase of digestate (SPD) and liquid phase of digestate (LPD) - for the
86 fertilization of the hemp produced as the substrate for biogas production was not evaluated
87 until the present time.

88 Final endproduct of BGP is digestate, which is characterized by a low DM content ranging
89 from 2 – 12 % (Kára et al., 2009) with a large annually production on average ranging from
90 15 to 20 m³ per 1 MW_{el} of installed capacity (Vondra et al., 2018). Digestate provide a broad
91 range of nutrients like nitrogen, potassium, phosphorus, sulphur, calcium and magnesium
92 (Nkoa, 2014) and can be used as an organic amedment or fertilizer with positive effect on soil

93 organic matter (Tambone et al., 2015; García-Sánchez et al., 2015). It's recycling in agricultural
94 system plays an important role connected with reducing of use of mineral fertilizers
95 (Albaquerque et al., 2012). While SPD, respectively LPD is byproduct of solid-liquid separation
96 of digestate (Tambone et al., 2015). Dry matter of solid phase varied between 20 – 30 % (Rehl
97 and Müller, 2013) with high content of phosphorus and carbon (Wellinger et al., 2013). It can
98 be composted (Tambone et al., 2015), dried and combusted (Kolář et al., 2010) or directly
99 applied on a soil. On the other hand, the liquid phase represents a major volume of original
100 digestate, representing 80 - 90% of the mass of digestate (Wellinger et al., 2013). It's dry
101 matter varied between 2 – 6 % (Vondra et al., 2018). It contains high amount of ammonia
102 nitrogen and potassium comparable to mineral fertilizers (Tambone et al., 2015; Wellinger et
103 al., 2013).

104 The aim of this study was to quantify the biogas and methane yield during anaerobic
105 digestion of industrial hemp. Different growing stages of the hemp were compared from this
106 point of view. Moreover, the effectivity of the fertilization of the hemp's plants using LPD, SPD
107 and combination of SPD and LPD was compared with the conventional NPK fertilization
108 strategy with the aim to quantify hemp's biomass production and consequently also biogas
109 and methane production.

110 **2. Material and Methods**

111 The experiment was divided into two parts. First part was based on the realization of field
112 plot experiment simulating hemp breeding under different systems of fertilization.
113 Subsequent second part was based on performing the series of anaerobic batch tests
114 quantifying biogas production from the samples of hemp gained during the field plot
115 experiment. All the experiments were performed with hemp cultivar Tiborszálási. This cultivar
116 is characterized by short cultivation period reaching 105 - 110 days for fibre production, for
117 seed production is required cultivation period lasting for 140 days and can reach 4 metres high
118 with THC content under 0.2 % of dry matter (Finta, 2012).

119 **2.1. Hemp cultivation and characteristics of fertilizers**

120 The plot experiment was established on the experimental field of the Czech University of
121 Life Sciences Prague (50°07'40" N 14°22'33" E) where the soil of the experimental site is sandy

122 loam Chernozem. The long-term annual air temperature is 9.1 °C and the total sum of
 123 precipitation is 495 mm (Kulhanek et al., 2016). The experiment was arranged in three
 124 replications, size of each plot was 2.5 m × 5 m and seed density was 70 kg per hectare. Plants
 125 were sown to a depth of 0.03 m and no pesticides were applied during the growing period.
 126 Four treatments according to the source of fertilizers (NPK mineral fertilizers, LPD, SPD,
 127 combination of LPD and SPD in ratio 1:1 according to N content). LPD as well as SPD originated
 128 from the agricultural BGP Krasna Hora nad Vltavou. The amount of these materials was
 129 determined with the aim to apply the same amount of nitrogen as compared with the variant
 130 with NPK fertilizer. The characteristics of fertilizers (LPD, SPD) used for this experiment is listed
 131 in Table 1 and exact amount of macronutrients (N, P and K) added on the field experiment is
 132 presented in Table 2.

133 Table 1: Characteristics of digestate fractions

	DM	ODM	pH
	%	% of DM	
SPD	21.3	85.2	8.5
LPD	6.9	69.8	8.1

134 DM – dry matter, ODM – organic dry matter

135 NPK variant was fertilized before sowing by N (calcium ammonium nitrate – 27 % N), P
 136 (triple superphosphate – 21 % P) and K (potassium chloride – 50 % K) with a dose of nitrogen
 137 150 kg/ha. The same amount of nitrogen was applied in other variants - 27.8 t/ha of SPD in
 138 second variant, 13.9 t/ha of SPD as a basic fertilization with subsequent three doses of LPD
 139 (7.2 t/ha in each dose) in total sum of 21.6 t/ha of LPD in third variant. This LPD was applied
 140 32 days after the sowing, 39 days, respectively 46 days after the sowing. The last variant was
 141 fertilized only with LPD, where the total LPD amount was 43.2 t/ha. This variant was fertilized
 142 before sowing with a 21.6 t/ha of LPD and three subsequent doses (each dose of 7.2 t/ha) of
 143 LPD was applied in same days as in previous variant. Other incoming nutrients on the plot
 144 experiment is stated in Table 2.

145

146 Table 2: Amount of macronutrients added on the field experiment (in kg per hectare)

	N	P	K
	kg/ha		
NPK	150.0	20.0	150.0
SPD	152.0	18.0	177.4
SPD + LPD	152.7	14.1	133.3
LPD	153.3	10.2	89.2

147

148 **2.2. Harvesting of the hemp plants for biogas production**

149 Hemp plants for biogas production were harvested in 4 different development stages: five
 150 leaf pair, flower formation, beginning of flowering and seed maturity marked in tables and in
 151 the text situated below as a symbols I, II, III and IV, respectively. Three plants of each
 152 replication at different growing stages were sampled and subsequently used for the
 153 experiments quantifying the biogas production and other physicochemical analyses.

154 **2.3. Inoculum for batch tests**

155 Inoculum was obtained from BGP Krasna Hora nad Vltavou which is operated at mesophilic
 156 conditions (39 °C). Livestock slurry (60 % of weight) and maize silage (40 % of weight) serve as
 157 the main substrates for the anaerobic reactor of this BGP. The DM of the inoculum was 6.1 %
 158 with ODM content 71.7 % of DM, the pH was 8.2. The inoculum was stored and degassed at
 159 thermostatic box for 10 days at 40 °C in order to minimise the effect of inoculum on biogas
 160 production.

161 **2.4. Biochemical methane potential tests for the quantification of biogas production** 162 **(batch tests)**

163 The biochemical methane potential (BMP) tests were performed according to test VDI
 164 4630 (VDI, 2006) modified by Mast et al. (2014). Each sample assay was carried out in five
 165 replications in 120 mL glass bottles. Inoculum and substrate were added to the bottles where
 166 30 mL of inoculum was mixed with different hemp samples (DM 0.70 ± 0.002 g). Demineralized
 167 water was added to each bottle to adjust the final volume of 80 mL. Bottles were sealed with
 168 butyl rubber stoppers and plastic seal. A blank assay (only inoculum) was used to determine
 169 biogas production resulting from inoculum itself – this biogas production was subtracted from
 170 each sample. Thus, the real biogas production was obtained. The biogas production was

171 subsequently corrected to standard conditions (0 °C, 101.3 kPa). The same amount of
172 inoculum was added to each bottle. Fermentation was carried out under mesophilic
173 conditions at 40 °C. Batch tests lasted for 60 days. Gas samples were taken through the butyl
174 rubber stoppers. During the first two weeks of the tests, the biogas production was measured
175 every day of the batch tests, the following two weeks was measured once per two days and
176 the rest of the time, the biogas production was quantified once per a week. Gas composition
177 (especially the representation of methane) was analysed twice per week during the first 4
178 weeks and later weekly.

179 Having finished the batch tests, the parameters T80 and T90, which served as an intensity
180 of biogas forming were determined as well. The values of T80 and T90 correspond to time
181 which is needed to produce 80 % and 90 % of the total gas production gained during the
182 experiment, respectively (Hakl et al., 2012).

183 **2.5. Analytical methods**

184 DM and ODM were determined according to standard procedures (Greenberg et al.,
185 2005). The total concentrations of elements C, N, H and C/N were determined with the use of
186 Vario MACRO cube (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany). The pH was measured
187 using a pH meter IQ 150 (IQ Scientific instrument, U.S.A.) equipped with IS FET PH77-SS
188 electrode (HACH, U.S.A.).

189 The representation of CH₄ in the biogas was determined using a gas chromatograph (DANI
190 Master GC, Italy), equipped with a thermal conductivity detector and a 2 m × 1 mm column
191 (Restec ShinCarbon ST, U.S.A.). Hydrogen was used as the carrier gas. Injection volume was
192 0.2 mL, injector temperature was 110 °C, the detector and oven temperature was 195 °C.

193 **2.6. Statistical analyses**

194 Means and standard deviation (s. d.) were calculated for three replications of hemp's plant
195 samples in plot experiment. Similarly, these parameters were calculated for five replications
196 for hemp's biogas production in each BMP test samples. BHY (biogas hectare yield) and MHY
197 (methane hectare yield) were calculated manually based on DM of the plants per hectare and
198 specific biogas, respectively methane production. This calculation is stated in equation 1,
199 respectively 2. Data from the batch tests and hectare DM yield were analysed using oneway

200 ANOVA method (with Tukey HSD test) of STATISTICA 12 (StatSoft, Tulsa, USA), where
201 differences between particular variants were significant at 0.001 probability levels.

$$202 \quad \text{BHY [m}^3\text{/ha]} = \text{DM (t/ha)} \times \text{specific biogas production (m}^3\text{/t DM)} \quad (1)$$

$$203 \quad \text{MHY [m}^3\text{/ha]} = \text{DM (t/ha)} \times \text{specific methane production (m}^3\text{/t DM)} \quad (2)$$

204 **3.0 Results and discussion**

205 **3.1 Biomass yield depending on hemp's growing stage**

206 The field experiment proved that the harvest time of hemp plants influenced DM content
207 of the hemp where the content of DM increased gradually during the growing season (Table
208 3). While about 21 % was measured for I. harvest, for the IV. harvest around 32 % was
209 observed for all the variants performed. In accordance with our results, Kreuger et al. (2011)
210 found that DM of the hemp plants harvested in August or September reached 30.9 % and
211 30.5 %, respectively. Prade et al. (2011) and Pakarinen et al. (2011) also investigated DM yield
212 of hemp plants. These authors observed DM content reaching around 30 % for harvest in
213 September and October (seed maturity). Heiermann et al. (2009) described DM for fresh hemp
214 plant 31.1 % of DM but they didn't present exact harvest time.

215 Dry matter production per hectare increased significantly during the growing season.
216 Average DM yield production for all variants in the last harvest performed within this research
217 was 10.9 t/ha (Table 3). Almost eighteen times higher biomass production per hectare was
218 observed for the IV. harvest (10.9 t/ha) comparing with the I. harvest (0.6 t/ha). Our results
219 are relatively close to literature data. Gissén et al. (2014) reported that hemp biomass of
220 autumn harvest during 4 year experiment was in the range from 6.6 to 13 t/ha, in first year of
221 the field experiment reached 11 – 13 t/ha. Pakarinen et al. (2011) reached the production of
222 DM corresponding with 14 t/ha. Prade et al. (2011) and Kreuger et al. (2011) reported that
223 hemp biomass of autumn harvest was in the range from 13 to 17 t/ha.

224 **3.2. Chemical composition of the hemp biomass**

225 The development of the plants during the growing season also significantly influenced the
226 chemical composition of the hemp biomass. Basic physicochemical characteristics of the
227 hemp's biomass could be seen in Table 4. Gradual increase of the content of ODM in DM was
228 observed during the growing season. Whereas for the young plants samples of the I. harvest

229 reached ca. 80 %, in the IV. harvest, the representation of ODM reached 91 %. This significant
230 effect of the growth stage on DM yield is well documented for grasslands in the literature
231 (Hakl et al., 2012; McEniry and O'Kielly, 2013; Stolarski et al., 2017). The final ODM content is
232 in accordance with Prade et al. (2012) and Heiermann et al. (2009) who reported that autumn
233 harvest of industrial hemp is characterized with ODM content ranging from 92.0 % to 92.5 %
234 for September harvest, where Pakarinen et al. (2011) gained even higher ODM content of
235 96.6 % in dry matter for the September harvest.

236 As could be seen from Table 4, the average representation of carbon in dry matter started
237 from 36.8 % in the biomass gained during the I. harvest to 43.1 % on average founded in the
238 samples from the IV. harvest. Simultaneously with increasing representation of carbon in DM
239 during the plant growth, we can see a decreasing representation of nitrogen. The most
240 important element for plant growth. The representation of nitrogen in the samples gained at
241 I. harvest was in the range from 3.2 % (LPD + SPD) to 3.6 % (NPK). During the plant growth,
242 representation of nitrogen decrease to the range between 1.0 and 1.3 % for the last harvest.
243 Prade et al. (2012) reported higher carbon content and lower nitrogen content reaching
244 45.0 % and 1.1 %, respectively, for the autumn harvest. The differences in organic matter
245 characteristics of byproducts of the operation of BGP used as the fertilizers within this
246 research probably influenced concentration of carbon and nitrogen in the plant samples.
247 Plants fertilized with SPD as well as with SPD + LPD showed higher carbon content in
248 comparison with NPK. The difference increased during the growing season from 2 % (I.harvest)
249 to 6 % (II. harvest). The plants fertilized with LPD were characterised by higher nitrogen
250 concentration in comparison with SPD and SPD + LPD. Higher concentration of easily available
251 nitrogen where the ammonium nitrogen prevails over organic nitrogen in LPD reflect in a
252 higher nitrogen content in the plant matter which is in accordance with Grigatti et al. (2011)
253 who reported influence of using anaerobically digested slurries on plant N utilization.
254 Increasing representation of carbon combined with gradual utilization of nitrogen leads to
255 increasing C:N ratio, which is very important factor for subsequent anaerobic digestion (Amon
256 et al., 2007a; Wang et al., 2014).

257

258 Table 3: Specific biogas production, methane production and concentration, T80 and T90 during the biochemical methane potential test, respectively dry
 259 matter yield per hectare, biogas hectare yield (BHY) and methane hectare yield (MHY)

harvest	sample	Specific biogas production	Specific CH ₄ production	Specific CH ₄ production	CH ₄	T 80	T 90	plant DM	DM	BHY	MHY	Mean MHY
		L/kg DM	L/kg DM	L/kg ODM	%	days	days	%	t/ha	m ³ /ha	m ³ /ha	m ³ /ha
I	NPK	411.2 ± 10.8 ^{a, CDE}	248.8	308.7	60.5	21.6	29.4	21.22 ± 0.25	0.6 ^{a, C}	249	151	156
	SPD	407.2 ± 7.4 ^{a, CDE}	248.0	309.4	60.9	21.4	28.5	21.39 ± 0.25	0.6 ^{a, C}	254	155	
	LPD + SPD	408.7 ± 7.9 ^{a, CD}	249.3	311.5	61.0	21.8	29.0	21.44 ± 0.88	0.6 ^{a, C}	233	142	
	LPD	416.7 ± 8.4 ^{a, CD}	252.9	316.0	60.7	20.8	27.9	21.46 ± 0.18	0.7 ^{a, C}	289	175	
II	NPK	427.2 ± 7.4 ^{a, BC}	255.0	306.5	59.7	26.6	34.3	26.49 ± 1.62	5.3 ^{a, AB}	1717	1025	1148
	SPD	387.2 ± 12.3 ^{c, E}	236.2	290.0	61.0	25.8	33.4	28.59 ± 9.21	6.1 ^{a, AB}	1902	1160	
	LPD + SPD	401.4 ± 14.4 ^{b, CDE}	244.5	292.9	60.9	25.7	33.2	27.08 ± 10.05	6.4 ^{a, AB}	2095	1276	
	LPD	387.9 ± 7.7 ^{bc, DE}	238.6	297.2	61.5	26.5	34.7	28.87 ± 2.60	6.0 ^{a, AB}	1836	1129	
III	NPK	425.0 ± 12.0 ^{a, ABC}	257.6	295.9	60.6	18.5	30.7	31.84 ± 3.69	6.6 ^{a, AB}	2814	1705	1766
	SPD	424.4 ± 9.6 ^{a, ABC}	255.9	299.7	60.3	18.3	30.1	30.30 ± 0.41	7.2 ^{a, AB}	3034	1830	
	LPD + SPD	375.2 ± 20.5 ^{b, DE}	230.0	311.8	61.3	17.0	26.4	29.25 ± 4.25	6.9 ^{a, AB}	2581	1582	
	LPD	402.3 ± 9.9 ^{ab, CDE}	245.0	283.4	60.9	19.2	33.4	31.91 ± 3.79	7.9 ^{a, AB}	3198	1948	
IV	NPK	451.2 ± 6.7 ^{a, AB}	269.4	290.0	59.7	18.8	32.5	32.51 ± 1.14	10.3 ^{a, A}	4661	2783	2953
	SPD	451.1 ± 8.3 ^{a, AB}	268.4	289.4	59.5	20.2	32.0	32.51 ± 2.18	12.0 ^{a, A}	5431	3232	
	LPD + SPD	462.3 ± 18.3 ^{a, A}	275.5	302.2	59.6	18.2	26.8	32.13 ± 1.73	10.9 ^{a, A}	5044	3006	
	LPD	449.4 ± 11.3 ^{a, AB}	270.1	295.6	60.1	19.4	30.3	31.87 ± 1.73	10.3 ^{a, A}	4642	2790	

260 Table abbreviation: NPK (mineral variant), SPD – solid phase of digestate, LPD – liquid phase of digestate, SPD + LPD – combination of SPD and LPD. Statistical differences between each harvest
 261 (stage of the growth) is display by a small alphabetical letters (a-c) where same letters was not significantly different. Statistical differences between all tested variants is display by a large
 262 alphabetical letters (A-E) where same letters was not significantly different. Standard deviation of specific biogas production was calculated from five replication. Standard deviation of plant DM
 263 was calculated from 3 replications.

264 Table 4: Physicochemical analyses of hemp samples during the different growth stages

		Physicochemical analyses				
harvest	sample	ODM	C	N	H	C/N
		(% of DM)	(% of DM)	(% of DM)	(% of DM)	(% of DM)
I	NPK	80.60 ± 0.02	36.32 ± 0.16	3.56 ± 0.06	5.33 ± 0.04	10.21 ± 0.14
	SPD	80.14 ± 0.04	36.92 ± 0.20	3.29 ± 0.11	5.47 ± 0.02	11.24 ± 0.44
	SPD + LPD	80.04 ± 0.04	37.23 ± 0.60	3.24 ± 0.16	5.47 ± 0.07	11.49 ± 0.37
	LPD	80.05 ± 0.03	36.84 ± 0.11	3.46 ± 0.16	5.49 ± 0.05	10.67 ± 0.54
II	NPK	83.20 ± 0.02	36.76 ± 0.19	2.56 ± 0.04	5.36 ± 0.04	14.36 ± 0.27
	SPD	81.44 ± 0.03	38.84 ± 0.18	2.24 ± 0.10	5.58 ± 0.05	17.36 ± 0.87
	SPD + LPD	83.47 ± 0.01	38.46 ± 0.45	2.14 ± 0.12	5.51 ± 0.06	18.06 ± 1.22
	LPD	80.26 ± 0.04	36.69 ± 0.59	2.40 ± 0.13	5.31 ± 0.10	15.37 ± 1.12
III	NPK	87.03 ± 0.01	41.93 ± 0.24	1.56 ± 0.10	6.03 ± 0.07	26.90 ± 1.88
	SPD	85.40 ± 0.03	41.32 ± 0.17	1.63 ± 0.01	5.97 ± 0.01	25.36 ± 0.23
	SPD + LPD	73.77 ± 0.03	31.80 ± 1.31	1.57 ± 0.15	4.74 ± 0.23	20.43 ± 2.79
	LPD	86.46 ± 0.01	40.01 ± 0.57	1.90 ± 0.14	5.85 ± 0.06	21.17 ± 1.88
IV	NPK	92.87 ± 0.00	43.25 ± 0.34	1.29 ± 0.14	6.35 ± 0.02	33.74 ± 4.06
	SPD	92.76 ± 0.01	43.15 ± 0.18	1.03 ± 0.08	6.30 ± 0.03	42.26 ± 3.39
	SPD + LPD	91.18 ± 0.00	42.81 ± 0.23	1.14 ± 0.06	6.26 ± 0.01	37.66 ± 1.99
	LPD	91.37 ± 0.01	43.14 ± 0.30	1.11 ± 0.05	6.29 ± 0.01	39.11 ± 2.01

265 Standard deviation of the results was calculated from 3 replications.

266

267

268

269

270

271 **3.3. The influence of the hemp's growing stages on biogas and methane production**

272 The experiment proved that the stage of the growth of the hemp influenced the quantity
273 of biogas as well as methane production. The highest specific biogas production (related to
274 DM or ODM) was achieved for the samples from the IV. harvest. However, the biogas (as well
275 as methane) production is very similar among the different harvest times. Specific biogas
276 production related to 1 kg of DM (Table 3) varied from 375 to 462 L/kg (418 L/kg on average)
277 where the methane yield varied from 230 to 276 L/kg (253 L/kg on average). Methane yield
278 from 1 kg of ODM varied from 283 to 316 L/kg (300 L/kg on average). Average specific
279 methane production was higher than the value observed by Kreuger et al. (2011) who reached
280 the methane production 245.0 L/kg of ODM during only 30 days of anaerobic test. Our results
281 are closer to Pakarinen et al. (2011) who produced 290.0 L/kg of methane from 1 kg of ODM
282 and 275 L/kg of DM. Simultaneously, the methane production from DM gained by Pakarinen
283 et al. (2011) is higher comparing with our research from all tested variants (253 L/kg of DM).
284 If we would like to focus on the last harvest, the methane production ranged from 289 to
285 302 L/kg (294 L/kg on average) of ODM during our experiment which is in agreement with
286 Pakarinen et al. (2011). Heiermann et al. (2009) also reached the methane yield from ODM
287 with production of 301 L/kg, which is almost the same as the value presented by Pakarinen et
288 al. (2011).

289 **3.4. The comparison of gained hemp's specific methane production with other crops**

290 In comparison with other crops useful as the substrate for biogas production we reached
291 similar values of methane yield during the experiment with hemp ranging from 0.28 to
292 0.32 L/kg of ODM. The specific methane production from maize is in the range from 0.29 to
293 0.36 L/kg of ODM (Amon et al., 2007b; Hermann et al., 2012). For maize harvested in wax
294 ripeness, the specific methane production reached 0.33 L/kg of ODM (Amon et al., 2007b) and
295 for ensiled triticale it fluctuated between 0.24 and 0.34 L/kg of ODM (Hermann et al., 2011;
296 Amon et al., 2007b). Alternative materials like different grasses produced wide range of
297 specific methane, where red clover, cockfoot, cup plant and perennial ryegrass show specific
298 methane production in the range from 0.14 to 0.28 L/kg of ODM (McEniry and O'Kiely, 2013;
299 Mast et al., 2014). Intensive and extensive grasses or Lucerne biomass shows methane
300 production reaching from 0.28 to 0.43 L/kg of ODM (Michal et al., 2017; Hakl et al., 2012). The

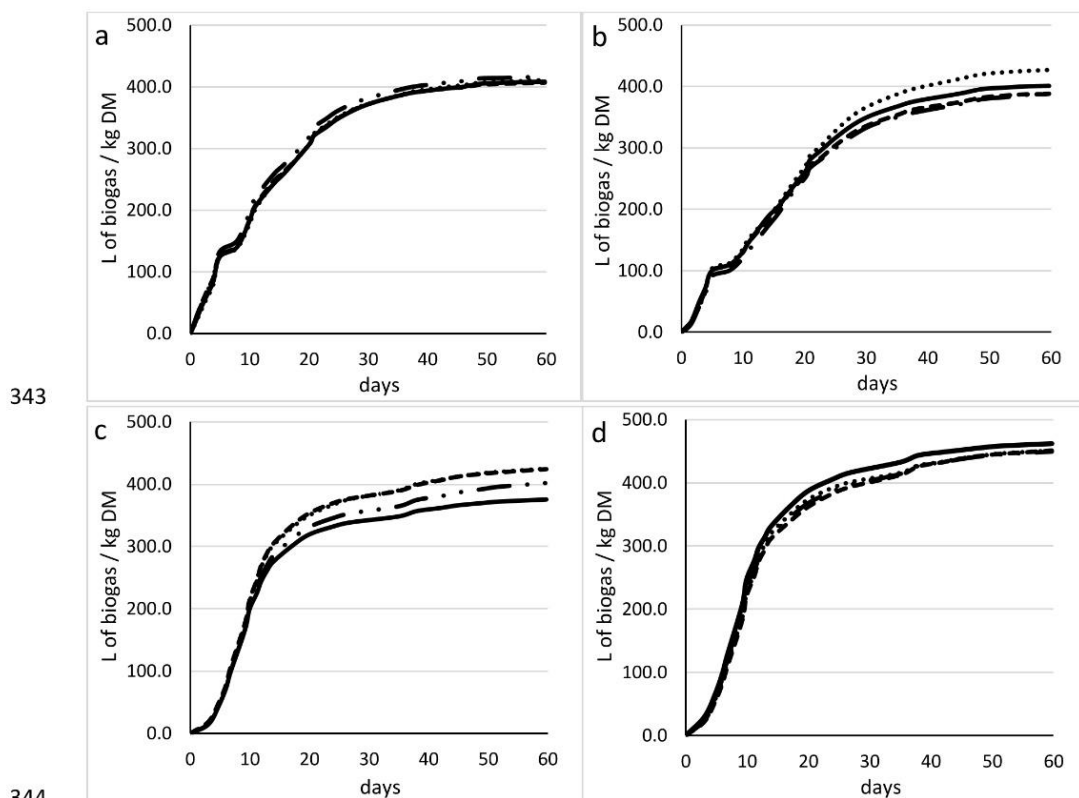
301 observed methane production gained in our experiment find no differences between methane
302 yield compared with maize or grass biomass. Taking into the consideration fundamental effect
303 of the hectare yield of the biomass on the final intensity of general biogas production (see
304 above), the biogas as well as methane production related to one hectare is discussed in
305 Chapter 3.7 with the aim to compare more objectively the suitability of hemp for biogas
306 production with other crops.

307 **3.5. The rate of biogas production**

308 Very sharp increase of biogas caused probably by the presence of easily available
309 substrates for bacteria, was observed during approximately 10 initial days of the test
310 (Figure 1). This trend also corresponds with fast increase of methane concentration in biogas
311 during the first days of the experiment (Figure 2). Subsequently, moderate production of
312 biogas until the day ca. 25 was found. Finally, low biogas production where only 10 % of biogas
313 formed during another 25 - 30 days of experiment was characteristic for all tested variants.
314 Time needed for the production of 80 and 90 % of biogas produced during whole 60 days
315 lasting experiment (T80 and T90) was determined with the aim to describe precisely the
316 course of the experiments. The curves describing the biogas production from all harvests are
317 presented in a Figure 1. 80% of biogas production was formed in 17 - 27 days where slightly
318 shorter time was observed for the samples from the III. and IV. harvest (Table 3 and Fig. 1).
319 90 % of biogas production was formed during 28 - 35 days. The trend of biogas formation is
320 expressed in Figure 1.

321 Kreuger et al. (2011) investigated T90 for industrial hemp in a two years experiment and
322 in their work observed that 90 % of biogas formed during first 15 - 17 days for the first year,
323 while for the second year was T90 more than 21 days. The longer time of biogas forming,
324 observed in our experiment in the range from 28 to 35 days, is probably related with three
325 factors like plant maturity which increase in plant non-digestible matter (Massé et al., 2011),
326 content of TKN (total Kjeldahl nitrogen) and C/N ratio which varied around the harvest time
327 and should influence the biogas kinetics (Ragaglini et al., 2014). Last factor is connected with
328 the presence of inhibitors in hemp during the plant growth like apolar phenols, monoterpenes
329 and terpenols which described Kortekass et al. (1995), where this inhibition can be seen
330 around fifth day in Figure 1 (graph 1a and 1b), respectively in methane forming in Figure 2b.

331 In comparison with other alternative materials suitable for biogas production, Míchal et al.
 332 (2017) investigated the biogas production from grass where T80 and T90 reached during 9 –
 333 11 and 12 to 18 days, respectively. Hakl et al. (2012) also investigated biogas dynamics from
 334 Lucerne pastures where T80 reached on 10th day and T90 reached between 15th and 20th
 335 day. On the other hand, for maize very fast biogas formation of T90 was achieved after 10 days
 336 of fermentation for a September harvest (Mast et al., 2014). At all events, relatively long time
 337 necessary to reach T80 and T90 indicates that each operator of BGP which would like to use
 338 hemp as the substrate for biogas production should monitor and eventually also optimize
 339 hydraulic retention time and other technological parameters in the fermenters. The best
 340 solution seems to be co-digestion of the hemp's with different other substrates which can
 341 improve the biogas production with improved the dilution of inhibitory substances or nutrient
 342 balance and subsequently can influenced biodegradability of the material (Hagos et al., 2017).

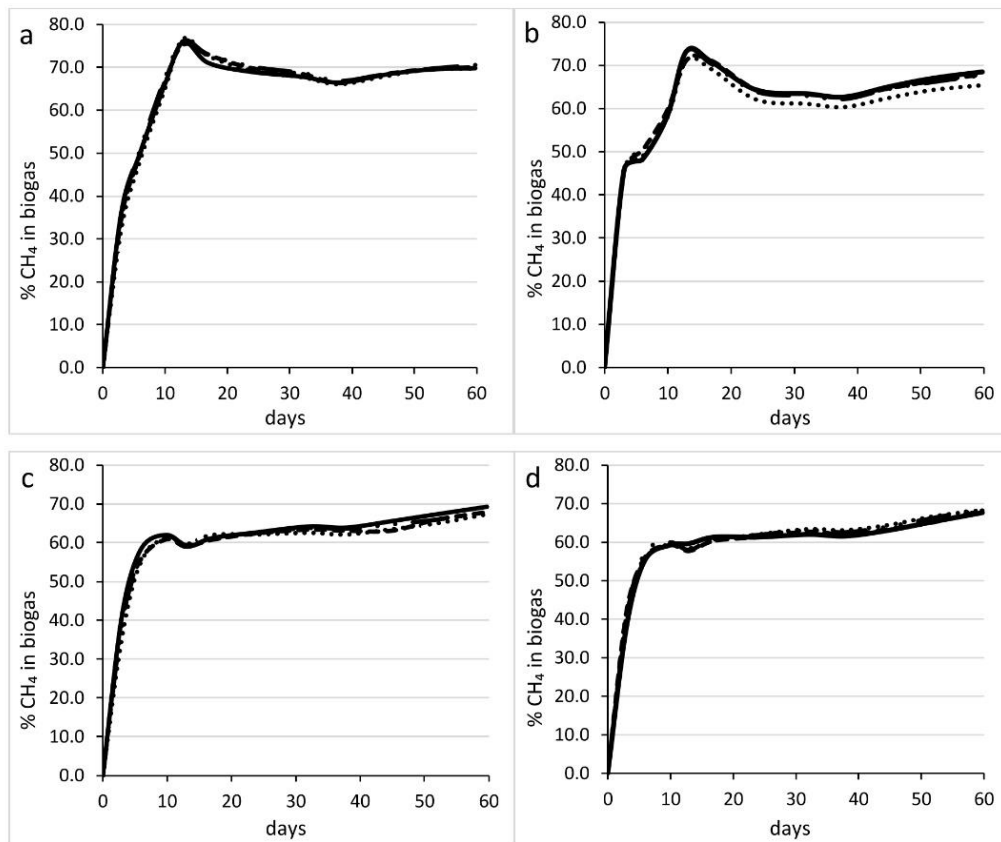


345 Figure 1: Biogas cumulative production during the batch tests (a: I. harvest, b: II. harvest, c: III.
 346 harvest, d: IV. harvest; dotted line: NPK, full line: SPD + LPD, shaded line: SPD, shaded line with
 347 dottes: LPD)

348 **3.6 The quality of the biogas**

349 Figure 2 presents methane concentration for the samples from all stages of the growth of the
350 hemp. From this graph, we can see very fast increase of the representation of methane in the
351 biogas during the first days of the test. For the I. and II. harvest, it reached around 75% after
352 15 days. Similar trend was observed also for all other tested variants differing in maximum
353 percentage around 60 % of methane for the III. and IV. harvest in 10 days. After that, the
354 representation of methane in the biogas decrease in samples from I. and II. harvest to
355 concentrations around 64 – 66 %, while almost constant concentrations reaching 62 – 64 %
356 was observed for III. and IV. harvest. During the last two weeks of the experiment, slight
357 increase of the representation of methane up to 67 – 69 % was observed. The average
358 methane concentration for all samples during the 60 days of experiment reached from 59.5
359 to 61.5 % (60.5 ± 0.6 % in average, Table 3). No significant differences were observed for
360 particular hemp's growing stages as well as for different fertilizers. The evaluation of the
361 biogas composition during anaerobic digestion of hemp was not intensively studied in
362 scientific literature until present time. Heiermann et al. (2009) as the only authors dealing with
363 this problem found that hemp variety Feodora 19 reached only 53 % of methane in biogas but
364 without any information about the harvest time. Thus, our results indicate that even
365 significantly higher representation of methane in biogas comparing with Heiermann et al.
366 (2009) could be reached during the fermentation of the hemp.

367 The trend of methane forming founded during this research is very similar to Kandel
368 et al. (2013) who observed, during the tests with reed canary grass the methane concentration
369 in the range from 25 % to 75 % with sharp increase at beginning of the experiment connected
370 with highest methane concentration continuing to the stable concentration around 60 % of
371 methane at the end of the experiment.



372

373

374 Figure 2: Methane concentration in biogas during the batch tests (a: I. harvest, b: II. harvest,
 375 c: III. harvest, d: IV. harvest; dotted line: NPK, full line: SPD + LPD, shaded line: SPD, shaded
 376 line with dots: LPD)

377 3.7. Specific biogas and methane hectare yield of hemp's plant

378 From the previous results of field plot experiment and biogas production from BMP test
 379 were estimated values of biogas hectare yield (BHY) and methane hectare yield (MHY). This
 380 value is presented in Table 3, where significant increase of plant DM weight during the growing
 381 season representing the main factor determining the final hectare yield of biogas in particular
 382 harvests. The average BHY, respectively MHY, varied from 256 and 156 m³/ha for the I. harvest
 383 to the values of 4945 and 2953 m³/ha observed for the IV. harvest, respectively. Thus, if we
 384 compare the I. and IV. harvest, we will find a nineteen times higher methane production in
 385 the IV. harvest. Simultaneously, the III. harvest produced only 60 % of the IV. harvest.
 386 Pakarinen et al. (2011) reached MHY of 3066 m³/ha, while Gissén et al. (2014) produced wide

387 range of MHY reaching only 1650 – 1950 m³/ha, where the first year of their four year
388 experiment reached an ideal DM yield (11 – 13 tons DM) with MHY of 2750 – 3250 m³/ha. On
389 the other hand, plants like energy dock, switchgrass or reed canary grass showed lower MHY
390 than industrial hemp (1172 to 2753 m³/ha; Mast et al., 2014). Values typical for maize is higher
391 than industrial hemp and varying in a wide range from 2897 to 9056 m³/ha (Herrmann et al.,
392 2012; Ragaglini et al., 2014; Mast et al., 2014).

393 **4. Conclusion**

394 Our results confirmed that industrial hemp is able to produce suitable high yield biomass for
395 biogas production. The application of byproducts produced during the operation of biogas
396 plants itself (liquid as well as solid phase of digestate) showed similar biomass yield as
397 compared with the conventional NPK fertilization, introducing cheap source of nutrients. The
398 biogas as well as methane production was influenced mainly by the stage of the hemp's
399 growth where the highest values (460 L/kg DM) were gained from the IV. harvest. Mean
400 hectare dry matter yield varied significantly from 0.6 tons at I. sampling up to 10.9 tons at the
401 last one. Thus, the methane hectare yield increased fundamentally during the growing season
402 from 142 to 3232 m³ per hectare. The results clearly proved that total methane production is
403 substantially affected by hemp biomass yield, not by the amount of biogas and methane
404 produced per unit of dry matter. The hemp harvested in the growth stage of seed maturity
405 could represent suitable alternative which could partially replace conventional substrates for
406 biogas production.

407 **Acknowledgement**

408 Financial support for these investigations was provided by NAZV projects No. QJ 1210085 and
409 QK 1710176 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic. The authors would like to
410 thank Frantisek Jelínek for his help with the laboratory experiment and to Renata Míchalová
411 for revision of the English text.

412 **References**

- 1) Achilles, A., Achilles, W., Brenndörfer, M., Einschütz, K., Frisch, J., Fritzsche, S. 2006. Betriebsplanung Landwirtschaft 2006/07. Darmstadt. Germany. KTBL.
- 2) Albaquerque, J. A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M. P. 2012a. Agricultural use of digestate for

horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy*. 43. 119-128.

- 3) Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Machmüller, A., Hopfner-Sixt, K., Bodiroza, V., Hrbek, R., Friedel, J., Pötsch, E., Wagenristl, H., Schreiner, M., Zollitsch, W. 2007a. Methane production through anaerobic digestion of various energy crops grown in sustainable crop rotations. *Bioresource Technology*. 98. 3204-3212.
- 4) Amon, T., Amon, B., Kryvoruchko, V., Zollitsch, W., Mayer, K., Gruber, L. 2007b. Biogas production from maize and dairy cattle manure – influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 118 (1-4). 173-182.
- 5) Bauer-Sibert, W., Jacobs, A., Christen, O., Götze, P., Koch, H.-J., Rücknagel, J., Märländer, B. 2016. Silage maize and sugar beet for biogas production in rotations and continuous cultivation: Dry matter and estimated methane yield. *Agronomy*. 6 (2). 1-12.
- 6) Bosca, I., Karus, M. 1997. The cultivation of hemp: Botany, varieties, cultivation and harvesting. *Hemptech*. Sebastopol.
- 7) European Commission. 2009. Council directive of 23 April 2009 on the promotion of the use of energy from renewable sources and amending and subsequently repeat in Directives 2001/77/EC and 2003/30/EC. <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32009L0028>>. Accessed 5.6.1999.
- 8) Finnan, J., Styles, D. 2013. Hemp: A more sustainable annual energy crop for climate and energy policy. *Energy Policy*. 58. 152-162.
- 9) Finta, Z. 2012. Influence of the increasing the oil content on its fatty acid composition and some agronomic traits in hemp - doctoral thesis. Szent István University.
- 10) Fraanje, P. J. 1996. Cascading of renewable resources hemp and reed. *Industrial Crops and Products*. 6. 201-212.
- 11) García-Sánchez, M., Siles, J. A., Cajthaml, T., García-Romera, I., Tlustoš, P., Száková, J. 2015. Effect of digestate and fly ash applications on soil functional properties and microbial communities. *European Journal of Soil Biology*. 71. 1-12.

- 12) Gissén, C., Prade, T., Kreuger, E., Nges, I. A., Rosenqvist, H., Svensson, S. E., Lantz, M., Mattsson, J. E., Börjesson, P., Björnsson, L. 2014. Comparing energy crops for biogas production – Yields, energy input and costs in cultivation using digestate and mineral fertilisation. *Biomass and Bioenergy*. 64. 199-210.
- 13) González-García, S., Hospido, A., Feijoo, G., Moreira, M.T.. 2010. Life cycle assessment of raw materials for non-wood pulp mills: Hemp and flax. *Resources, Conservation and Recycling*. 54 (11). 923-930.
- 14) Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., Eaton, A. D. (eds.). 2005. *APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. American Public Health Association. Washington DC.
- 15) Grigatti, M., Di Girolamo, G., Chincarini, R., Caivatta, C., Barbanti, L. 2011. Potential nitrogen mineralization, plant utilization efficiency and soil CO₂ emissions following the addition of anaerobic digested slurries. *Biomass and Bioenergy*. 35. 4619-4629.
- 16) Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C. Lu, X. 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 76. 1485-1496.
- 17) Hakl, J., Fuksa, P., Habart, J., Šantrůček, J. 2012. The biogas production from lucerne biomass in relation to term of harvest. *Plant, Soil and Environment*. 58 (6). 289-294.
- 18) Heiermann, M., Ploechl, M., Linke, B., Schelle, H., Herrmann, C. 2009. Biogas Crops-Part I: Specifications and suitability of field crops for anaerobic digestion. *Agricultural Engineering International CIGR*. 11. 1-17.
- 19) Herrmann, C., Heiermann, M., Idler, C. 2011. Effects of ensiling, silage additives and storage period on methane formation of biogas crops. *Bioresource Technology*. 102 (8). 5153-5161.
- 20) Herrmann, A., Rath, J. 2012. Biogas production from maize: Current state, challenges and prospects. 1. Methane yield potential. *BioEnergy Research*. 5 (4). 1027-1042.

- 21) Ingraio, C., Giudice, A., L., Bacenetti, J., Tricase, C., Dotelli, G., Fiala, M., Siracusa, V., Mbohwa, C. 2015. Energy and environmental assessment of industrial hemp for building applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 51. 29-42.
- 22) Ion, V., Temocico, G., Dumbravă, M., Bășă, A. G. 2015. Biomass yield at maize under different technological conditions. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*. 15 (3). 173-176.
- 23) Kandel, P. T., Sutaryo, S., Møller, H. B., Jørgensen, U., Lærke, E. P. 2013. Chemical composition and methane yield of reed canary grass as influenced by harvesting time and harvest frequency. *Bioresource Technology*. 130. 659-666.
- 24) Kára, J., Pastorek, Z., Mazancová, J., Hanzlíková, I. 2009. New mixtures and technologies for biogas production at biogas plants of agricultural type processing livestock slurry. *Research in Agricultural Engineering*. 55 (2). 62-68.
- 25) Karus M, Vogt D. 2004. European hemp industry: cultivation, processing and product lines. *Euphytica*. 140 (1-2). 7-12.
- 26) Kim, S., Dale, B. E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*. 26(4). 361-75.
- 27) Kirkegaard, J., Christen, O., Krupinsky, J., Layzell, D. 2008. Break crop benefits in temperate wheat production. *Field Crops Research*. 107. 185–195.
- 28) Kok, C. J., Coenen, G. C. M., de Heij, A. 1994. The effect of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) on selected soilborne pathogens. *Journal of International Hemp Association*. 1. 6-9.
- 29) Kolář, L., Kužel, S., Peterka, J., Borová-Batt, J. 2010. Agrochemical value of the liquid phase of wastes from fermenters during biogas production. *Plant, Soil and Environment*. 56 (1). 23-27.
- 30) Kortekass, S., Soto, M., Vicent, T., Field, J. A., Lettinga, G. 1995. Contribution of Extractives to Methanogenic Toxicity of Hemp black liquor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80 (5). 383-388.

- 31) Kreuger, E., Prade, T., Escobar, F., Svensson S.-E., Englund, J.-E., Björnsson, L. 2011. Anaerobic digestion of industrial hemp – Effect on harvest time on methane energy yield per hectare. *Biomass and Bioenergy*. 35. 893-900.
- 32) Kuglarz, M., Gunnarsson, I. B., Svensson S. E., Prade, T., Johansson, E., Angelidaki, I. 2014. Ethanol production from industrial hemp: Effect of combined dilute acid/steam pretreatment and economic aspects. *Bioresource Technology*. 163. 236-243.
- 33) Kulhánek, M., Balík, J., Černý, J., Sedlář, O., Vašák, F. 2016. Evaluating of soil sulphur forms changes under different fertilizing systems during long-term field experiments. *Plant, Soil and Environment*. 62 (9). 408-415.
- 34) Kymäläinen, H.-R., Sjöberg, A.-M. 2008. Flax and hemp fibres as raw materials for thermal insulation. *Buildings and Environment*. 43. 1261-1269.
- 35) Mankowski, J., Kolodziej, J. 2008. Increasing heat of combustion of briquettes made of hemp shives. In: *International Conference on Flax and Other Bast Plants*. pp. 344–352. ISBN: 978-0-9809664-04.
- 36) Massé, D., Gilbert, Y., Savoie, P., Bélanger, G., Parent, G., Babineau, D. 2011. Methane yield from switchgrass and reed canarygrass grown in Eastern Canada. *Bioresource Technology*. 102. 10286-10292.
- 37) Mast, B., Lemmer, A., Oechsner, H., Reinhardt-Hanish, A., Claupein, W., Graef-Hönninger, S. 2014. Methane yield potential of novel perennial biogas crops influenced by harvest date. *Industrial Crops and Products*. 58. 194-203.
- 38) McEniry, J., O’Kiely, P. 2013. Anaerobic methane production from five common grassland species at sequential stages of maturity. *Bioresource Technology*. 127. 143-150.
- 39) Míchal, P., Švehla, P., Plachý, V., Tlustoš, P. 2017. Anaerobic digestion of grass: The effect of temperature applied during the storage of substrate on the methane production. *Environmental Technology*. 38 (13-14). 1716-1724.
- 40) Nkoa, R. 2014. Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 34 (2). 473-492.

- 41) Norris, S. T., Blackshaw, R. P., Dunn, R. M., Crichley, N. R., Smith, K. E., Williams, J. R., Randall, N. P., Murray, P. J. 2016. Improving above and below-ground arthropod biodiversity in maize cultivation system. *Applies Soil Ecology*. 108. 25-46.
- 42) Pakarinen, A., Maijala, P., Stoddard, F. L., Santanen, A., Tuomainen, P., Kymäläinen, M., Viikari, L. 2011. Evaluation of annual bioenergy crops in boreal zone for biogas and ethanol production. *Biomass and bioenergy*. 35 (7). 3071-3078.
- 43) Prade, T., Svensson, S. E., Andersson, A., Mattsson, J. E. 2011. Biomass and energy yields of industrial hemp grown for biogas and solid fuel. *Biomass and Bioenergy*. 35 (7). 3040-3049.
- 44) Prade, T., Svensson, S.-E., Mattsson, J.E. 2012. Energy balances for biogas and solid biofuel production from industrial hemp. *Biomass Bioenergy*. 40. 36-52.
- 45) Ragaglini, G., Dragoni, F., Simone, M., Bonari, E. 2014. Suitability of giant reed (*Arundo donax* L.) for anaerobic digestion: Effect of harvest time and frequency on the biomethane yield potential. *Bioresource Technology*. 152. 107-115.
- 46) Rehl, T., Müller, J. 2011. Life cycle assessment of biogas digestate processing technologies. *Resources, Conservation and Recycling*. 56. 92-104.
- 47) Rulkens, W. 2008. Sewage sludge as a biomass resource for the production of energy: overview and assessment of the various options. *Energy and Fuels*. 22 (1). 9-15.
- 48) Sankari H. 2000. Comparison of bast fibre yield and mechanical fibre properties of hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*. 11. 78-84.
- 49) Sipos, B., Kreuger, E., Svensson, S.-E., Reczey, K., Bjornsson, L., Zacchi, G. 2010. Steam pretreatment of dry and ensiled industrial hemp for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 34. 1721-1731.
- 50) Stolarki, J. M., Krzyzaniak, M., Warziński, K., Tworkowski, J., Szczukowski, S. 2017. Perennial herbaceous crops as a feedstock for energy and industrial purposes: Organic and mineral fertilizers versus biomass yield and efficient nitrogen utilization. *Industrial Crops and Products*. 107. 244-259.

- 51) Struik, P. C., Amaducci, S., Bullard, M. J., Stutterheim, N. C., Venturi, G., Cromack, H. T. H. 2000. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops Products*. 11. 107-118.
- 52) Tambone, F., Terruzzi, L., Scaglia, B., Adani, F. 2015. Composting of the solid fraction of digestate derived from pig slurry: Biological process and compost properties. *Waste Management*. 35. 55-61.
- 53) van der Werf, H. M. G. 2004. Life Cycle Analysis of field production of fibre hemp, the effect of production practices on environmental impacts. *Euphytica*. 140 (1-2). 13-23.
- 54) Vondra, M., Máša, V., Bobák, P. 2018. The energy performance of vacuum evaporators for liquid digestate treatment in biogas plants. *Energy*. 146. 141-155.
- 55) Vorein Deutscher Ingenieure. 2006. Fermentation of organic materials – Characterization, of substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests – Richtlinie 4630: VDI-Gesellschaft Energietechnik.
- 56) Wang, F., Hidaka, T., Tsumori, J. 2014. Enhancement of anaerobic digestion of shredded grass by co-digestion with sewage sludge and hyperthermophilic pretreatment. *Bioresource Technology*. 169. 299-306.
- 57) Wellinger, A., Murphy, J. D., Baxter, D. 2013. *The biogas handbook – Science, production and applications*. Woodhead. Cambridge. p. 501. ISBN: 978-0-85709-498-8.

4.3 Švehla, Míchal et al. (2017). Nitrification in a completely stirred tank reactor treating the liquid phase of digestate: The way towards rational use of nitrogen

Autoři: Švehla, P., Radechovská, H., Páček, L., Míchal, P., Hanč, A. Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Waste Management. 64. 96-106.



Contents lists available at ScienceDirect

Waste Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/wasman

Nitrification in a completely stirred tank reactor treating the liquid phase of digestate: The way towards rational use of nitrogen



Pavel Svehla, Helena Radechovska, Lukas Pacek, Pavel Michal*, Ales Hanc, Pavel Tlustos

Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcka 129, Prague 165 21, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2016

Revised 22 March 2017

Accepted 27 March 2017

Available online 3 April 2017

Keywords:

Digestate

Free nitrous acid

Inhibition

Liquid phase

Nitrification

Nutrients

ABSTRACT

The nitrification of the liquid phase of digestate (LPD) was conducted using a 5 L completely stirred tank reactor (CSTR) in two independent periods (P1 – without pH control; P2 – with pH control). The possibility of minimizing nitrogen losses during the application of LPD to the soil as well as during long-term storage or thermal thickening of LPD using nitrification was discussed. Moreover, the feasibility of applying the nitrification of LPD to the production of electron acceptors for biological desulfurization of biogas was assessed. Despite an extremely high average concentration of ammonia and COD in LPD reaching 2470 and 9080 mg/L, respectively, nitrification was confirmed immediately after the start-up of the CSTR. N-NO₃ concentration reached 250 mg/L only two days after the start of P1. On the other hand, P1 demonstrated that working without pH control is a risk because of the free nitrous acid (FNA) inhibition towards nitrite oxidizing bacteria (NOB) resulting in massive nitrite accumulation. Up to 30.9 mg/L of FNA was present in the reactor during P1, where the NOB started to be inhibited even at 0.15 mg/L of FNA. During P2, the control of pH at 7.0 resulted in nitrogen oxidation efficiency reaching 98.3 ± 1.5% and the presence of N-NO₃ among oxidized nitrogen 99.6 ± 0.4%. The representation of volatile free ammonia within total nitrogen was reduced more than 1000 times comparing with raw LPD under these conditions. Thus, optimum characteristics of the tested system from the point of view of minimizing the nitrogen losses as well as production of electron acceptors for the desulfurization of biogas were gained in this phase of reactor operation. Based on the results of the experiments, potential improvements and modifications of the tested system were suggested.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Digestate is produced as a by-product of anaerobic digestion of organic matter. A specific type of digestate is produced during the operation of biogas plants. In many cases, the digestate produced in biogas plants is separated into solid and liquid phases with the aim of optimizing the use of the nutrients contained in the digestate and to reduce the costs of transporting the digestate from the biogas plant to land (Al Seadi et al., 2013; Bauer et al., 2009; Rehl and Müller, 2011). The liquid phase of digestate (LPD) contains relatively high concentrations of total ammonia nitrogen (TAN; the sum of N-NH₄⁺ and free ammonia - FA) reaching mostly several hundreds of milligrams or several grams per litre (e.g. Botheju et al., 2010; Xu et al., 2014; Zekker et al., 2015). Also the concentration of phosphorus, potassium and other nutrients is relatively high in LPD (Al Seadi et al., 2013; Kolář et al., 2008; Chiumenti et al., 2013). Presently, the LPD produced at agricultural

biogas plants is usually stored in lagoons situated on the premises of the plants on a relatively long-term basis, and it is consequently applied to the soil, where it serves as a source of nutrients for plants in the growing season. However, the LPD contains a large amount of ballast water in which the concentration of nutrients is still limited. Simultaneously, legislation limits the amount of nitrogen that can be applied to soil in the EU states (European Commission, 1991). This fact reduces the possibility of utilizing LPD directly in situ. Therefore, the economic benefits of working with raw LPD may be decreased by the costs of transporting the LPD from the biogas plant to farms (Rehl and Müller, 2011). At the same time, the present-day approach to handling LPD causes intense emission of ammonia during storage and the application of the LPD (Whelan et al., 2010). These losses of nitrogen could be significant, not only from the perspective of environmental protection, but also simply because of the decrease in the amount of nutrients supplied to plants with LPD. Due to the reasons presented above, in some cases it is necessary to treat LPD with the aims of recovering the nutrients in concentrated form, contributing to environmental protection, or minimizing nitrogen loss. In order

* Corresponding author.

E-mail address: michalp@af.czu.cz (P. Michal).<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.03.041>

0956-053X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

to treat the LPD, various physico-chemical or biological processes such as struvite precipitation (Münch and Barr, 2001; Song et al., 2011), stripping of ammonia (Guštin and Marinšek-Logar, 2011), sorption on zeolite, biochar or other materials (Cardoso et al., 2015; Kizito et al., 2015), incorporation of nutrients into the biomass of a specific algae (Prajapati et al., 2014; Tale et al., 2014), forward osmosis and subsequent reverse osmosis or other membrane processes (Al Seadi et al., 2013; Holloway et al., 2007), or thermal thickening by vacuum evaporation (Chiumenti et al., 2013) could be applied. Nevertheless, all the above mentioned methods require relatively high operational costs.

Nitrification in combination with a suitable additional process could also be advantageously used within LPD treatment aimed at the reasonable use of nitrogen. The nitrification represents biochemical oxidation of TAN to nitrite and thence to nitrate. Firstly, the TAN is converted to nitrite by ammonia oxidizing bacteria (AOB). Consequently, the nitrite is converted to nitrate using the activity of nitrite oxidizing bacteria (NOB). The genus *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* and *Nitrosocystis* represent typical AOB, whereas *Nitrobacter*, *Nitrospira* or *Nitrocystis* belong to the important NOB genus (Daims et al., 2015; Painter, 1970). Moreover, the results presented by Daims et al. (2015) indicate that the genus *Nitrospira* may even be able to directly convert TAN to nitrate. During nitrification of extremely highly nitrogen-loaded water streams, such as LPD, the pH decreases as the result of the acidification of the water environment caused by H^+ production (Painter, 1970). At the same time, the representation of volatile FA within TAN falls significantly with decreasing pH value (Anthonisen et al., 1976). Therefore, the nitrification process induced in the environment of LPD could minimize the loss of nitrogen caused by the volatilization of FA during storage and application of LPD (Botheju et al., 2010). Additionally, the nitrate which could be, from the perspective of potential volatilization, considered as in “stabilized” nitrogen form, is introduced into the LPD. For the treatment of LPD using thermal thickening leading to minimizing the volume of LPD, the pH should be also decreased with the aim of minimizing volatilization of ammonia within this process (Chiumenti et al., 2013). Thus, nitrification could be applied with the aims of improving the pH of the LPD and introducing the nitrate into LPD before its thermal thickening (Botheju et al., 2010). Another potential use of nitrate (or nitrite) produced during the nitrification of LPD consists of their application as an electron acceptor for autotrophic denitrification in biogas cleaning by hydrogen sulphide scrubbing and bio-oxidation of captured sulphides (Doğan et al., 2012; Pokorna et al., 2015; Pokorna and Zabranska, 2015).

The nitrification of LPD has been successfully completed by several authors during the last few years (Botheju et al., 2010; Cydzik-Kwiatkowska et al., 2013; Magrí et al., 2013; Scaglione et al., 2013; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2011). However, most of the available papers evaluate the biological processes ensuring ammonia removal from LPD without the ambition to reuse the nitrogen. In these cases, the nitrification (or more precisely its short-cut version – nitrification) represents one stage of LPD treatment by nitrification/denitrification or partial nitrification/anaerobic ammonium oxidation – anammox (Cydzik-Kwiatkowska et al., 2013; Magrí et al., 2013; Scaglione et al., 2013; Zhang et al., 2011). An extremely high concentration of TAN in LPD and resulting FA and/or free nitrous acid (FNA) or NO_2^- inhibition of AOB and NOB (Anthonisen et al., 1976; Buday et al., 1999) significantly complicates the start-up of traditional nitrification with nitrate as a dominant final product in the environment of LPD. NOB are generally much more sensitive towards FA/FNA/ NO_2^- inhibition compared to AOB. Anthonisen et al. (1976) postulated that FA starts to inhibit NOB in a range of 0.1–1.0 mg/L, whereas more resistant NOB tolerate a concentration up to 10–150 mg/L. FNA seems to be an

especially strong inhibitor of NOB activity where even 0.011 mg/L of $N-HNO_2$ corresponding with 0.037 mg/L of FNA may inhibit anabolic processes of NOB (Vadivelu et al., 2006a). On the other hand, even dissociated NO_2^- was presented as an NOB inhibitor inducing 50% inhibition at a concentration of 198 mg/L $N-NO_2^-$ (Buday et al., 1999). Due to the risk of FA/FNA/ NO_2^- inhibition, the necessity to dilute the LPD entering into the nitrification reactor to initial TAN concentration lower than 800 mg/L was reported by Xu et al. (2014). Moreover, nitrite accumulation was observed by these authors despite the abovementioned dilution of digestate. Botheju et al. (2010) achieved massive nitrate production without significant nitrite accumulation during digestate nitrification. However, it was necessary to pre-acclimate the inoculum for 20 days before the experiment. In addition, the hydraulic retention time (HRT) was extremely long (>33 days). Thus, the efficiency of the system operated by Botheju et al. (2010) was very low. The ability of NOB to produce nitrate efficiently, at high nitrogen loading rates (NLR), was not confirmed. Taking into consideration the fact, that AOB as well as NOB belong among aerobic bacteria, the availability of dissolved oxygen is essential from the point of view of a satisfactory course of nitrification applied to highly nitrogen-loaded water streams. Pacek et al. (2015) proved that the nitrification of highly nitrogen-loaded reject water (1450 ± 165 mg/L of TAN) producing nitrate as sole final product could be efficiently operated at a dissolved oxygen concentration of 3.0 mg/L in a completely stirred tank reactor (CSTR), whereas the decrease of dissolved oxygen to 0.7 mg/L leads to a massive accumulation of nitrite. On the contrary, when sequencing batch reactor (SBR) technology was applied, even a dissolved oxygen concentration reaching up to 7.5 mg/L was not able to prevent the accumulation of nitrite owing to significantly stronger FA and FNA inhibition pressure towards NOB in SBR compared to the CSTR (Svehla et al., 2014).

The aim of this paper is to define the optimal conditions for the nitrification of LPD based on the intended subsequent processing of nitrified LPD. Potential direct application to soil, long-term storage as well as thermal thickening of nitrified LPD is expected in this context. Moreover, the possibility of using the nitrified LPD as the source of electron acceptors for biogas cleaning will be also discussed. Attention was paid primarily to the acceleration of the treatment process start-up, to the control of final nitrification product (nitrate versus nitrite) representation and to the control of the nitrification process efficiency. With respect to minimization of nitrogen losses, the reduction of the proportion of nitrogen present in the form of volatile FA at least by 90% was required. With regard to a relatively high toxicity of nitrite to plants (Court et al., 1962; Singh et al., 2007), minimization of nitrite accumulation was required during the nitrification process for potential application of nitrified LPD to soil. The paper also aims to suggest suitable ways for subsequent research in this field.

2. Material and methods

2.1. Reactor set-up

The experiments were carried out in a 5 L laboratory-scale nitrification reactor with LPD as an influent. The reactor was aerated using a coarse bubble system. A peristaltic pump was used to transport the LPD into the laboratory model. The LPD was supplied continuously into the CSTR where the feeding rate of the peristaltic pump was dependent on the actual NLR applied. The reactor was operated according to the principle of CSTR using the biomass cultivated in the form of a suspension (activated sludge). The source of the inoculum for the start-up of the reactor is described in chapter 2.2. The reactor was combined with a sedimentation tank (1 L).

The sludge was continuously recirculated from the sedimentation tank to the reactor using the peristaltic pump. In accordance with Jenicek et al. (2004) and Svehla et al. (2014), with the aim of maximizing the sludge retention time (SRT) no excess sludge was withdrawn from the reactor. Only minor sludge losses were caused by its escaping with the effluent water. Thanks to this strategy, an SRT in the range of 10–35 days was maintained throughout the whole experiment. The actual value of SRT in the reactor was determined by the intensity of the escape of solid particles from the reactor which was dependent mainly on the actual value of HRT. The average biomass concentration in the reactor quantified as volatile suspended solids (VSS) reached 5.58 g/L. However, a certain portion of this matter was created by VSS present in raw LPD entering into the reactor (Table 2). All experiments were performed at laboratory temperatures (23 ± 2) °C with no oxygen limitation (the dissolved oxygen concentration varied within the range of 3.0 and 7.4 mg/L) with the aim of preventing the inhibiting effect of the low oxygen concentration on the activity of nitrifying bacteria (Pacek et al., 2015).

The experiment was divided into two independent phases. First, the reactor was operated without pH control for 30 days within Period 1 (P1). Consequently, Period 2 (P2), lasting for 90 days, was initiated. The value of the pH was controlled in this phase of the reactor operation with the aim of evaluating the possibility of improving the efficiency of the nitrification process as well as the representation of nitrate and nitrite between nitrification final products. During the first 60 days of P2, the pH was set at 7.0. Subsequently, the adjusted pH value was lowered to 6.5. An NaOH solution was dosed into the reactor using peristaltic pumps with the aim of improving the pH value. The GRYF sensor PCI 321 XB2 and GRYF MAGIC XBC measuring and controlling system (GRYF HB, Czech Republic) were used for the maintenance of the required pH value in the system. At the beginning of both periods (P1 as well as P2), the reactor was inoculated with nitrifying biomass (see below, chapter 2.2). The HRT and NLR was controlled during the experiment with the aim of quantifying approximately the productivity of the reactor. The overall volume of LPD treated during P1 and P2 corresponded to 14.5 and 60.2 L, respectively.

2.2. Start-up of the reactor

For each period of the reactor operation (P1 and P2), the reactor was inoculated with nitrifying activated sludge gained from the flow of recirculated sludge at the Prague central wastewater treatment plant. The concentration of this sludge was 10 g/L (expressed as total suspended solids - TSS). The method of inoculating the reactor was based on findings presented by Pacek et al. (2016). When starting the reactor operation, the whole reactor container was filled with an activated sludge used as an inoculum. Then, the LPD inflow was initiated. The characteristics of the inoculum are presented in Table 1.

2.3. LPD used for the experiments

The LPD used for this experiment originated from an agricultural biogas plant using pig slurry and grass silage as the main

sources of the substrate for biogas production. Thermophilic conditions (55–57 °C) are applied in the anaerobic reactor of this biogas plant. The basic parameters of LPD used for this experiment are presented in Table 2.

2.4. Analytical methods

Once a week, the TAN, N-NO₂⁻ and N-NO₃⁻ concentration in raw LPD used as the influent and in the effluent from the reactor were measured with the aim of evaluating the nitrification process. Simultaneously, chemical oxygen demand (COD) of centrifuged samples taken from the influent and the effluent was determined in order to evaluate the efficiency of the dissolved organic matter removal at the same intervals. A Rotina 420 centrifuge (Hettich GmbH & Co. KG, Germany) was used for centrifugation of samples where the speed of rotation corresponded to 9500 rpm and the G-force corresponded to 12.007. The samples were treated for 12 min using the centrifuge. Additionally, total nitrogen (N-tot) was measured at least once every two weeks in the influent as well as in the effluent. Alkalinity, TSS and VSS were monitored once every two weeks in the influent. VSS were also measured once a week in the reactor with the aim of quantifying the nitrifying biomass. The concentrations of TAN, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻, COD, TSS, and VSS were measured in accordance with the standard methods (APHA, 2005). The N-tot concentration was determined using a HACH DR/4000 photometer (Hach Lange, Germany) by HACH method number 10071. Organic nitrogen (N-org) concentration was calculated as the difference between N-tot concentration and inorganic nitrogen concentration (the sum of TAN, N-NO₂⁻ and N-NO₃⁻ concentration). The alkalinity of the influent was determined by titration of the sample with hydrochloric acid (0.1 mol/L) up to pH 4.5. The results of alkalinity (Table 2) are presented in the number of mmol/L of strong monohydric acid needed to achieve a pH of 4.5 in the sample. The temperature, pH, and dissolved oxygen concentration in the reactor were gauged continually using GRYF sensors PCI 321 XB2 and KCI 12 XB4 (GRYF HB, Czech Republic). With the aim to describe more precisely the quality of nitrified LPD and to compare it with the quality of raw LPD, the concentration of other important nutrients (Ca, K, Mg, P and S) and selected risk elements (Cd, Pb, Hg, As, Cr, Cu, Mo, Ni, Zn) in the effluent from the reactor as well as in the influent was quantified on a one-time basis. The samples taken on day 32 of Period 2 were analysed for this purposes. Cd, Pb, As, Cr, Cu, Mo, Ni, Zn, Ca, K, Mg and S were determined according to Zakova et al. (2016) using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Agilent 720, Agilent Technologies Inc., USA) equipped with a two channel peristaltic pump, a Sturman-Masters spray chamber and a V-groove pneumatic nebulizer. By this way, so called pseudototal content of the elements expressing the amount of the elements extractable with aqua regia was analysed. The pseudototal content of Hg was measured according to Šípková et al. (2016) using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent 7700x, Agilent Technologies Inc., USA), equipped with an autosampler ASX-500, a three-channel peristaltic pump and a MicroMist nebulizer. The determination of

Table 1
The characteristics of the inoculum.

Parameter (unit)	Value
pH	7.4
TAN (mg/L)	12.0
N-NO ₃ ⁻ (mg/L)	5.5
N-NO ₂ ⁻ (mg/L)	0.0
TSS (mg/L)	10,000
VSS (mg/L)	8150

Table 2
The composition of the LPD fed into the reactor.

Parameter (unit)	Value
pH	8.1 ± 0.1
Alkalinity (mmol/L)	97 ± 15
COD (mg/L)	9080 ± 1240
TAN (mg/L)	2470 ± 190
N-tot (mg/L)	2780 ± 230
TSS (mg/L)	3130 ± 370
VSS (mg/L)	2780 ± 320

Ca, K, Mg, P, S, Cd, Pb, Hg, As, Cr, Cu, Mo, Ni and Zn in the samples of influent and effluent was realized in 3 repetitions where average values and standard deviations were presented within the results.

2.5. Calculations

The concentrations of FA (C_{FA}) and FNA (C_{FNA}) in mg/L were calculated in accordance with Anthonisen et al. (1976) (Eqs. (1) and (2)):

$$C_{FA} = \frac{17}{14} \cdot \frac{c(\text{TAN}) \cdot 10\text{pH}}{\exp\left(\frac{6334}{273+T}\right) + 10\text{pH}} \quad (1)$$

$$C_{FNA} = \frac{46}{14} \cdot \frac{c(\text{N-NO}_2^-)}{\exp\left(\frac{-2300}{273+T}\right) \cdot 10\text{pH}} \quad (2)$$

where $c(\text{TAN})$ and $c(\text{N-NO}_2^-)$ represent the actual total concentrations of TAN and N-NO_2^- , respectively in mg/L, and T is the temperature in degrees centigrade.

The nitrogen oxidation efficiency (NOE) in% was calculated according to Eq. (3):

$$\text{NOE (\%)} = \frac{c(\text{N-NO}_2^-) + c(\text{N-NO}_3^-)}{c(\text{N-NO}_2^-) + c(\text{N-NO}_3^-) + c(\text{TAN})} \cdot 100\% \quad (3)$$

where $c(\text{N-NO}_2^-)$, $c(\text{N-NO}_3^-)$ and $c(\text{TAN})$ represent the concentrations of N-NO_2^- , N-NO_3^- and TAN in the effluent from the reactor.

The nitrite accumulation ratio (NiAR) in% was calculated according to Eq. (4):

$$\text{NiAR (\%)} = \frac{c(\text{N-NO}_2^-)}{c(\text{N-NO}_2^-) + c(\text{N-NO}_3^-)} \cdot 100\% \quad (4)$$

where $c(\text{N-NO}_2^-)$ and $c(\text{N-NO}_3^-)$ represent the concentrations of N-NO_2^- and N-NO_3^- in the effluent from the reactor.

3. Results and discussion

3.1. Experiments without pH control – Period 1

3.1.1. The initiation and the stability of the nitrification process

Despite extremely high concentrations of TAN and COD in raw LPD, the nitrification process with nitrate as the main final product was initiated immediately after the start of the experiment. An N-NO_3^- concentration reaching 250 mg/L was observed in the effluent as soon as two days after the start of the experiment, where 1540 mg/L was measured on day 21 (Fig. 1A). These findings clearly confirmed high activity of AOB as well as NOB. Simultaneously with the increase of the N-NO_3^- concentration, a gradual increase of the TAN concentration was observed in the effluent from the reactor during first 15 days of the experiment. Then, it was stabilised in the range of 1000–1250 mg/L (Fig. 1A). The

results indicated that the TAN coming into the reactor with the LPD was partially converted to N-NO_3^- and partially it remained in its original form. The N-NO_2^- concentration did not exceed 50 mg/L during the first 21 days of the reactor operation. In accordance with the fact that very low concentrations of nitrogen forms were present in the reactor at the moment of the process initiation (Table 1), the concentrations of total nitrogen in the effluent and in the raw LPD were gradually equalized. During our experiment, no dilution of raw LPD entering into the reactor or long-term pre-acclimation of nitrifying bacteria mentioned by Xu et al. (2014) and Botheju et al. (2010), respectively, was needed for satisfactory initiation of the nitrification process with nitrate as the dominant final product observed during the first 21 days of the reactor operation. The biomass adapted to the conditions prevailing in the reactor naturally by a gradual increase of the nitrogen forms concentration resulting from the method of the reactor inoculation.

However, a gradual increase of N-NO_2^- concentration was observed after day 21 which was accompanied by an N-NO_3^- concentration decrease. While 47 mg/L of N-NO_2^- was measured on day 21, on day 30, the concentration of N-NO_2^- had increased to 1022 mg/L (Fig. 1A).

3.1.2. The pH value and its influence on the inhibition of nitrification bacteria

The initial pH of the inoculum (measured on day 0) was 7.4 (Table 1). A subsequent decrease of the pH observed, despite the slightly alkaline characteristic of raw LPD (Table 2), confirmed the immediate start of the nitrification process (Painter, 1970). Due to this, the conditions achieved by Xu et al. (2014) using external acidification with the aim of supporting the start-up of the nitrification of the anaerobic digester effluent were attained naturally during our research. From day 2 until day 21, the value of pH ranged between 6.1 and 6.5 (Fig. 2A). Subsequently, a sudden decrease to 5.2 was registered between days 21 and 22. The reason for this significant change in the pH value during this phase of the reactor operation is not quite obvious. However, even significantly lower minimum pH values reaching 3–4 were observed by Botheju et al. (2010) during the nitrification of digestate at certain phases of the nitrification reactor's operation.

The decrease in the pH value discovered in our reactor on day 21 is a positive development with respect to a potential minimization of nitrogen loss during storage, application or thermal thickening of nitrified LPD (Botheju et al., 2010; Chiumenti et al., 2013). On the other hand, it resulted in a significant increase of FNA concentration despite the fact that a relatively low N-NO_2^- concentration reaching 47 mg/L was actually measured in the reactor. The FNA concentration reached 0.15 mg/L at this time (Fig. 2B). At the same time, even 0.011 mg/L of N-HNO_2 corresponding with 0.037 mg/L of FNA may inhibit anabolic processes of NOB (Vadivelu et al., 2006a). This fact probably induced the massive accumulation

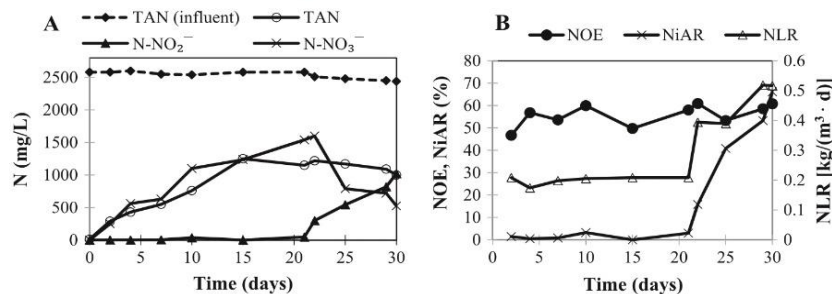


Fig. 1. Results of Period 1 – TAN, N-NO_2^- and N-NO_3^- concentrations in the effluent compared to TAN concentration in the influent (A); NLR, NOE and NiAR (B).

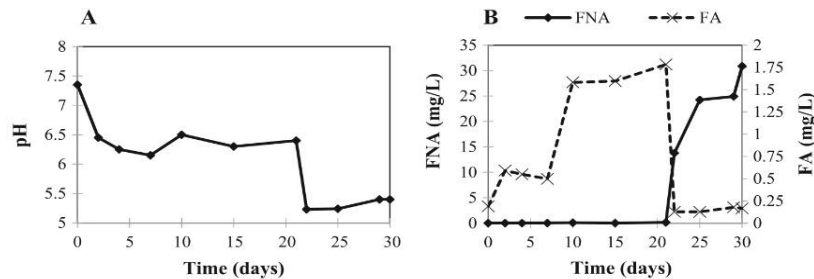


Fig. 2. Results of Period 1 – pH value (A); FA and FNA concentration (B).

of N-NO_2^- after day 21 of the reactor operation (300 mg/L measured on day 22, Fig. 1A). Thus, the biomass was exposed to an extremely high concentration of FNA reaching 13.8 mg/L on this day (Fig. 2B). Under such conditions even the inhibition limit 0.2–2.8 mg/L of FNA for NOB presented by Anthonisen et al. (1976) was exceeded several times. The subsequent reactor operation was characterised by further increases of N-NO_2^- and also FNA concentration (Fig. 1A and 2B). The maximum FNA concentration (30.9 mg/L) was achieved on day 30. Under such high FNA concentration, the restoration of NOB activity could not be expected (Anthonisen et al., 1976; Vadivelu et al., 2006a) and even AOB activity could have been endangered (Vadivelu et al., 2006b). Therefore, the experiment was interrupted and subsequent tests were performed with the pH control.

A maximum FA concentration reaching 1.6–1.8 mg/L was achieved between days 10 and 21 during Period 1. Despite the inhibiting level for NOB in the range of 0.1–1.0 mg/L (Anthonisen et al., 1976) being exceeded, no massive N-NO_2^- accumulation was observed until day 21 which indicates that FNA was a much more important NOB inhibitor compared to FA during this period of reactor operation.

3.1.3. Nitrogen oxidation efficiency, nitrite accumulation ratio and nitrogen oxidation rate

During all of Period 1 the nitrogen oxidation efficiency (NOE) values ranged between 47 and 61% (Fig. 1B). The limitation of achievable NOE is caused by the reduced alkalinity of the treated LPD which is insufficient for the compensation of H^+ production and from it we observed the resulting pH decrease (Painter, 1970; Jenicek et al., 2004). The achieved NOE is similar to the results of the experiment performed under comparable conditions with reject water (Jenicek et al., 2004). Nitrite accumulation ratio (NiAR) did not exceed 4% until day 21 (Fig. 1B). However, after day 21 it increased gradually up to 66% as the result of massive NOB inhibition. Thus, the conditions applied during Period 1 do not seem to be suitable for the requirement to minimize NiAR value.

The NLR was kept around 0.2 $\text{kg}/(\text{m}^3 \text{d})$ during the first 21 days of the reactor operation. Subsequently, it was gradually increased to 0.52 $\text{kg}/(\text{m}^3 \text{d})$ (Fig. 1B). Taking into consideration the values of NOE achieved in the reactor, the nitrogen oxidation rate and specific nitrogen oxidation rate reached up to 0.31 $\text{kg}/(\text{m}^3 \text{d})$ and 2.31 $\text{mg}/(\text{gVSS}\cdot\text{d})$, respectively during this period of the reactor operation.

3.2. Experiments with pH control – Period 2

3.2.1. The initiation and the stability of the nitrification process

Similarly, as in the case of the experiments performed without the pH control, TAN was converted to N-NO_3^- immediately after the

beginning of the experiment (Fig. 3A). No massive N-NO_2^- accumulation was observed during any of Period 2. The N-NO_2^- concentration did not exceed 30 mg/L. The TAN concentration in the effluent did not exceed 60 mg/L until day 47. A temporary increase of the TAN concentration to 400 mg/L registered on day 55 seems to be the result of exceeding the optimum LPD feeding rate when the NLR reached 0.64 $\text{kg}/(\text{m}^3 \text{d})$ and the nitrifying bacteria were not able to nitrify all the TAN incoming into the reactor (Fig. 4A). Therefore, the NLR was intentionally reduced on this day. As a result of this change in feeding strategy, the TAN concentration in the effluent decreased again to 60 mg/L on day 61. The subsequent long-term increase of TAN concentration observed after day 68 was caused by the change of the pH control strategy (the adjusted value was changed from 7.0 to 6.5). Nitrifying bacteria prefer slightly alkaline pH value reaching 7–9 (Painter, 1970) whereas the value of 6.5 applied during the days 61–90 is outside this interval. For this reason, the TAN concentration increased up to 780 mg/L in this phase of the reactor operation (Fig. 3A). This finding is in accordance with Jenicek et al. (2004) who observed massive accumulation of TAN (almost 40% of the TAN measured in the influent) in the reactor treating reject water when the pH was not controlled. On the contrary, more than 99% of TAN was successfully oxidized by these authors when a pH control ensuring a value falling in the abovementioned optimal range for nitrifying bacteria was applied.

The sum of TAN, N-NO_3^- and N-NO_2^- concentrations in the effluent was higher compared to the concentration of TAN in the influent during some measurements. The reason for this phenomenon is that a certain portion of pure water contained originally in the raw LPD evaporated during the retention of the LPD in the nitrification reactor. In this way, the LPD was thickened to a certain extent and the concentration of various chemical compounds, including nitrogen forms, increased. At relatively constant conditions (mainly temperature and aeration intensity) applied during this research, the volume of water which evaporated each day was almost constant. However, if the HRT is extended significantly, the percentage of the losses of water through evaporation (related to volume of raw LPD) increases significantly. Therefore, the phenomenon of thickening was observed mainly during the last 30 days of Period 2 (Fig. 3A) characterised by long HRT reaching 13–14 days on a long-term basis (Fig. 4A). Also the transformation of part of organic nitrogen into inorganic forms in the nitrification reactor may to a certain extent support the increase of the sum of TAN, N-NO_3^- and N-NO_2^- concentrations. However, this phenomenon seems not to be as significant from this point of view (see chapter 3.3.4). Certain losses of water caused by evaporation and the resulting thickening of LPD must also be expected in a full scale system, where the intensity of this process will be determined by local conditions including actual HRT.

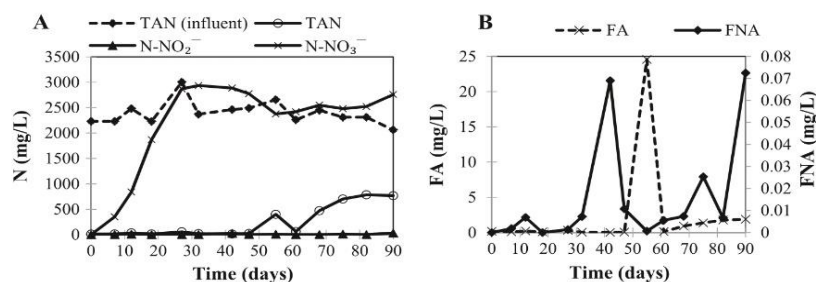


Fig. 3. Results of Period 2 – TAN, N-NO₂⁻ and N-NO₃⁻ concentrations in the effluent compared to TAN concentration in the influent (A); FA and FNA concentration (B).

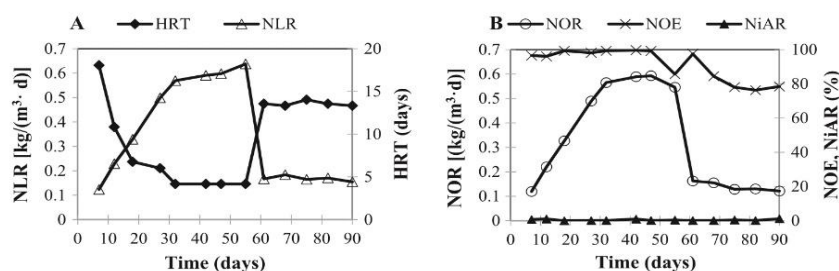


Fig. 4. Results of Period 2 – HRT and NLR (A); NOE, NOR and NiAR (B).

3.2.2. Inhibiting factors affecting nitrification activity

Due to the pH control, the pH value reached 7.00 ± 0.05 and 6.50 ± 0.05 during first 60 days and during the rest of Period 2, respectively with the exception of day 55 when the pH increased to 8.0 on a short-term basis. Under such conditions, the biomass inhibition induced by FA and/or FNA was significantly weaker during Period 2 compared to Period 1. FA and FNA concentration did not exceed 1.88 and 0.07 mg/L, respectively, with the exception of day 55 (Fig. 3B). On day 55, the FA concentration increased to 24.6 mg/L as a consequence of a pH increase to 8.0. Exceeding the optimum LPD feeding rate by TAN at the maximum applied NLR reaching $0.64 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ (Fig. 4A) seems to be responsible for this temporary pH deviation. In this phase, the intensity of acidification during the LPD nitrification (Painter, 1970) was restricted by the limited potency of nitrification process resulting in a pH increase observed on day 55. The exceeding of the optimum LPD feeding rate by TAN on day 55 is discussed more precisely in chapter 3.2.3. In any event, FA inhibition limits for NOB were significantly exceeded on day 55 (Anthonisen et al., 1976). However, no massive nitrite accumulation (indicating a strong limitation in NOB activity) was observed even in this phase of the reactor operation (Fig. 3A). Taking into consideration these results, the resistant culture able to adapt to relatively high FA concentrations reached on a short-term basis in the reactor was probably developed in the reactor within its long-term operation in accordance with Turk and Mavinic (1989).

3.2.3. Nitrogen oxidation efficiency, nitrite accumulation ratio and nitrogen oxidation rate

Keeping the pH value at 7.0 enabled the reactor to achieve an NOE reaching $98.3 \pm 1.5\%$ during the first 47 days of the observation (Fig. 4B). Despite the decrease of the adjusted pH value to 6.5 after day 60, NOE reaching at least 75% was achieved through the end of the experiment. These results confirmed the positive

effect of pH control on NOE during nitrification of highly nitrogen-loaded water streams observed during the nitrification (or more precisely nitrification) of reject water by Jenicek et al. (2004).

The NLR was intentionally gradually increased during the first 55 days of the experiment from 0.12 to $0.64 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ (Fig. 4A). While an NLR of $0.60 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ on day 47 produced an NOE of 99% (Fig. 4B), the increase of NLR to 0.64 on day 55 induced the decrease of NOE to 86% which clearly demonstrated an exceedance of the optimum LPD feeding rate through the presence of TAN in the effluent in this phase of the experiment. According to this, the approximate maximum NLR enabling the complete transformation of TAN to nitrate seems to be a value of $0.60 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ under the conditions applied during Period 2. Consequently, the NLR was reduced radically to 0.15 – $0.18 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ for the rest of Period 2 with the aim of stabilizing the process. This led to the recovery of excellent NOE values which reached 97% on day 61. Thus, after having temporarily exceeded the optimum LPD feeding rate, the reversibility of high NOE was proved. The decrease of NOE observed during the rest of Period 2 (Fig. 4B) was caused by the change of the pH control strategy (the adjusted value was changed from 7.0 to 6.5) in accordance with Jenicek et al. (2004).

Considering the actual NOE, the maximum nitrogen oxidation rate reaching $0.59 \text{ kg}/(\text{m}^3 \text{ d})$ was registered on day 47 (Fig. 4B) exceeding many times the maximum values achieved by Botheju et al. (2010). The specific nitrogen oxidation rate reached $4.41 \text{ mg}/(\text{gVSS d})$ on this day. However, taking into consideration the radical decrease of NLR performed to stabilize the process, such high values of the nitrogen removal rate were not re-established during the rest of Period 2. Thus, the ability of the system to ensure such high nitrogen oxidation rate levels on a long-term basis should be verified within additional research (see chapter 3.4.1). The productivity of the reactor treating the LPD seems to be significantly lower compared to the systems treating reject water. In the

research by Jenicek et al. (2004), the system treating reject water using the nitrification/denitrification process was able to nitrify ammonia satisfactorily even at NLR levels exceeding 1.5 kg/(m³ d) under comparable conditions. The chemical composition of the LPD (especially extremely high COD concentrations exceeding values usual for reject water multiple times) seems to be responsible for this observation. NiAR did not exceed 2% during all of Period 2, where the change of the pH control strategy made on day 61 (the target pH value changed from 7.0 to 6.5) did not have any measurable effect on this parameter (Fig. 4B).

3.3. Chemical composition of nitrified LPD

Considering the fact, that the application of nitrified LPD to soil (directly or after subsequent thermal thickening) is one of the most important expected applications of this material (see above), the chemical composition of the effluent from the reactor represents very important aspect of the treatment process. From this point of view, the nutrition of agricultural crops, potential toxicity of nitrified LPD towards crops as well as environment protection were also emphasised during this research together with minimization of nitrogen losses and other aspects mentioned above.

3.3.1. Nitrogen forms

Total nitrogen (N-tot) present in the LPD could be divided into TAN, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ and organic nitrogen (N-org) forms. Nitrification of LPD results in significant changes of the representation of these forms. By this way, the risk of nitrogen losses, the agricultural value of LPD as well as potential environmental risks connected with its application to soil could be changed significantly after the nitrification process. The proportion of TAN, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ and organic nitrogen (N-org) in N-tot in the effluent during selected phases of reactor operation were compared with the values characteristic for raw LPD serving as the influent for the nitrification reactor during this research (Table 3). Taking into consideration variable concentrations of N-tot in raw LPD (chapter 3.3.5), percentage expression was used. Additionally, the proportion of nitrogen present in the form of FA (N-FA) was evaluated with the aim to compare the risk of nitrogen losses during the storage and during the application of LPD to soil. Taking into consideration that N-FA represents part of TAN, it is not included in the sum of nitrogen forms creating N-tot.

Considering actual conditions prevailing in the reactor, the data gathered during Period 1 were divided into two separated phases in Table 3. Firstly, the phase ending on day 21 was evaluated. Then, the period starting on day 22 which was characterised by massive nitrite accumulation was separately assessed. Similarly, Period 2 was divided into parts lasting for days 1–47 and 68–90, respectively, taking into consideration the different pH values applied during these phases (see chapter 2.1). Taking into account unstable conditions between days 47 and 67 of Period 2 (see Figs. 3 and 4), this phase of the reactor operation was not included in Table 3.

As can be seen in Table 3, the nitrification process induced in the environment of LPD led to a radical decrease of the proportion of N-FA compared to raw LPD in which it represented 8.1% of N-tot. The lowest proportion of N-FA (0.007% on average) was definitely

achieved on days 1–47 during Period 2 proving the conditions applied during this phase (with pH control value of 7.0 almost all the TAN was converted to nitrate) to be optimal from the point of view of minimization of nitrogen losses during the handling of LPD. In this case, the proportion of N-FA was decreased even more than 1000 times. Although several times higher proportions of N-FA (0.033% on average) were observed on days 68–90, during Period 2 (pH control of 6.5), these results seem to be still very positive. A lower pH did not enable a more significant increase of the proportion of N-FA although the actual TAN concentration increased rapidly in this phase compared to days 1–47 (Fig. 3A). Similarly, a low pH (Fig. 2A) resulted in low proportion of N-FA (0.05% on average) even on days 1–21 of Period 1, although TAN concentration reached up to 1250 mg/L in this phase of the reactor operation (Fig. 1A).

TAN, as well as N-NO₃⁻, represent suitable forms of nitrogen from the point of view of plant nutrition. N-NO₃⁻ which is introduced into the LPD within the described technology is characteristic with higher mobility which seems to be more suitable compared to TAN from the point of view fast transport into the plants (Pilbeam, 2015). It is beneficial mainly from the point of view of the application of nitrified LPD during growing season.

With the aim to prevent eutrophication of natural water resources, the legislation limits the total amount of nitrogen that can be applied to soil with LPD as well as with other fertilizers while concrete values are adjusted to different regional conditions (e.g. European Commission, 1991) depending on the local extent of the risk of the contamination of natural water by nitrogen compounds. So, the dosages of nitrified LPD to the soil must meet the standards valid for the locality where it will be applied. The amount of specific chemical nitrogen forms (TAN, N-NO₃⁻ and N-NO₂⁻) applied to land is usually not limited strictly within the legislation.

However, the application of nitrified LPD during non-growing season represents slightly higher environmental risk compared to the application of raw LPD by the reason of higher mobility of N-NO₃⁻ (Pilbeam, 2015) than TAN and its potential faster transfer into natural water resources.

N-NO₂⁻ represents an even significantly larger environmental risk compared to N-NO₃⁻. It is toxic to plants where its concentration in soil water exceeding 0.9 mg/L was identified as the limit of the toxicity (Court et al., 1962; Singh et al., 2007). Thus, if we would like to apply nitrified LPD to soil (directly, after long-term storage or after thermal thickening), the presence of nitrite in the effluent should be minimized with the aim to prevent the exceeding of this toxic level. Taking into consideration very variable conditions prevailing at different localities on which nitrified LPD could be applied, it is very complicated to suggest objectively a maximum amount of nitrite which could be applied to soil without the risk of temporary exceeding this value after the application of nitrified LPD to soil at the locality. The variability of the physico-chemical properties of the soil (mainly the soil type and the humidity), the intensity of precipitations, the method of the soil management (particularly the depth of potential ploughing after the application of nitrified LPD) and many other factors are very important from this point of view. Taking into the consideration

Table 3
The proportion of the various nitrogen forms in the influent and effluent.

Nitrogen form (%)	Influent	Period 1 (days 1–21)	Period 1 (days 22–30)	Period 2 (days 1–47)	Period 2 (days 68–90)
TAN	88.1 ± 2.2	41.7 ± 4.8	37.1 ± 4.5	1.52 ± 1.31	18.48 ± 3.15
N-FA	8.1 ± 1.0	0.05 ± 0.02	1.49 ± 3.01	0.007 ± 0.007	0.033 ± 0.008
N-NO ₃ ⁻	1.20 ± 0.20	48.4 ± 4.1	22.9 ± 11.6	87.4 ± 1.5	70.5 ± 3.3
N-NO ₂ ⁻	0.08 ± 0.04	0.77 ± 0.73	32.0 ± 12.8	0.37 ± 0.38	0.31 ± 0.34
N-org	10.60 ± 1.30	8.50 ± 1.05	8.82 ± 0.63	8.20 ± 0.95	8.35 ± 1.30

these factors, maximum safe dose of N-NO_2^- could be estimated in each concrete case. For example, if the LPD will be applied in the amount of $5 \text{ m}^3/\text{ha}$ (corresponding with $5 \text{ L}/\text{m}^2$), seepage of the liquid to a depth of 0.2 m and the humidity of the soil corresponding to 30% will be expected, nitrite contained in 0.5 L of nitrified LPD will penetrate the soil characteristics by a total volume of ca. 200 L in which ca. 60 L of soil water will be present. Thus, if the concentration of N-NO_2^- in nitrified LPD reaches 100 mg/L, 50 mg of N-NO_2^- will be diluted into ca. 60 L resulting in an N-NO_2^- concentration in soil water slightly higher than 0.8 mg/L. Thus, the concentration limit mentioned by Court et al. (1962) and Singh et al. (2007) will still not be exceeded. Naturally, this is only one concrete example, actual concentration of N-NO_2^- in soil water will change significantly based on local conditions (see above). Additionally, the above presented calculation is very approximate, being only illustrative.

Positively, the nitrite represents a relatively unstable nitrogen form which could be relatively easily biochemically oxidized to nitrate within nitrification or reduced within denitrification (Painter, 1970). Taking into consideration the above presented discussion, it seems to be reasonable to perform additional research focused on the study of the dynamic of the migration and biochemical transformations of N-NO_2^- in the soil after the application of nitrified LPD.

At all events, the conditions applied on days 22–30 of Period 1 seem to be very unsuitable from the point of view the presence of nitrite in the effluent. N-NO_2^- represented 32.0% of N-tot on average at actual concentrations reaching up to 1022 mg/L in this phase of the reactor operation (Table 3, Fig 1A). On the contrary, values not higher than 0.4% on average at N-NO_2^- concentrations below 30 mg/L were observed during the whole of Period 2 seeming to be safe from the point of view the toxicity of nitrite to plants even regardless of actual conditions.

The proportion of N-org decreased very poorly in the effluent from the reactor compared to the influent (Table 3) which is in accordance with the discussion presented in chapter 3.3.4.

3.3.2. Other nutrients

During this research the influence of the nitrification of LPD on the content of other basic nutrients (Ca, K, Mg, P and S) was also evaluated on a one-time basis. For this purpose, the samples of the raw LPD serving as the influent for the nitrification reactor and the effluent taken on day 32 of Period 2 were analysed. The results proved that the biological treatment of LPD in the nitrification reactor did not result in significant changes of the concentration of any particular nutrients (Table 4).

In accordance with Al Seadi et al. (2013), Kolář et al. (2008) or Chiumenti et al. (2013), a relatively high content of particular nutrients (especially K, S, P and Ca) was observed in dry matter (DM) of raw as well as nitrified LPD. Taking into consideration the liquid nature of LPD, the concentration of monitored nutrients expressed in mg/L is presented in Table 4. Thus, the concentration of nutrients in nitrified LPD could be easily compared to the concentrations of the different nitrogen forms presented in chapters 3.1.1 and 3.2.1.

3.3.3. Heavy metals and other risk elements

Actual legislation related to the application of digestate, LPD and separated solid phase of digestate to soil strictly defines the concentration limits of various heavy metals and other risk elements which should not be exceeded in the case of agricultural use of these materials. The samples of the influent and the effluent of the nitrification reactors taken on day 32 of Period 2 were analysed for this purpose. The results were compared with the legislation limits valid in various countries which are presented in mg of risk elements contained in 1 kg of DM (Table 5). Taking into consideration that the LPD used for this study was collected at a biogas plant operated in the Czech Republic where the application of LPD to soil in this country is also expected, the limits valid for the Czech Republic were primarily discussed. Also the limits valid for other selected countries (UK and Germany) are presented in Table 5. Additionally, a non-binding proposal for the EU aiming to unify the requirements for European countries is mentioned in this table.

The results proved that the treatment of LPD in the nitrification reactor did not result in any significant changes in the concentration of evaluated risk elements. The samples of raw LPD (influent) as well as nitrified LPD (effluent) were within the limits defined by the legislation valid in various countries. Taking into consideration the data presented in Table 5, the potential subsequent thermal thickening (Chiumenti et al., 2013) leading to the reduction of the volume several times (and simultaneously adequately increasing the concentration of risk elements) should not lead to the exceeding of these limits.

3.3.4. Organic matter

A very low COD removal efficiency reaching 22.6% on average was recorded in the experiments. These results indicate poor biological degradability of organic compounds contained in the LPD under the conditions applied. In accordance with this, N-org were not converted in larger extent into inorganic forms of nitrogen (Table 3). The fact that the biologically degradable organic matter present in the substrate for biogas production was decomposed already in the anaerobic digester before the LPD was originated seems to be responsible for these findings. Taking into consideration the facts presented above, a similar structure of organic compounds present in the nitrified LPD compared to raw LPD could be expected.

3.3.5. Variability of the properties of nitrified LPD

The results related to the chemical composition of nitrified LPD cannot be generalized for potential treatment of LPD originated under different conditions. The particular parameters of nitrified LPD could fluctuate significantly according to local conditions prevailing on the given biogas plant. Mainly the representation of different materials in the substrate for biogas production and the technological arrangement of anaerobic digestion will dramatically influence the properties of raw LPD including N-tot concentration, the content of other nutrients as well as the potential presence of risk elements or other contaminants. On the other hand, the data presented in Table 3 seem to be useful from the point of view of primary prediction of the representation of particular nitrogen forms under conditions analogical with this research. In accor-

Table 4

The content of the nutrients in the influent and effluent.

	Influent (mg/kg DM)	Influent (mg/L)	Effluent (mg/kg DM)	Effluent (mg/L)
Ca	6590 ± 380	264 ± 15	6450 ± 410	258 ± 16
K	103,000 ± 4000	3730 ± 150	89,300 ± 7200	3570 ± 290
Mg	461 ± 123	18.4 ± 4.9	510 ± 150	20.4 ± 6.0
P	6720 ± 240	269 ± 9	6120 ± 230	245 ± 9
S	9970 ± 520	399 ± 21	10100.0 ± 600	403 ± 22

Table 5

The content of the selected risk elements in the influent and effluent.

	Influent (mg/kg DM)	Effluent (mg/kg DM)	Czech Republic ^a	UK ^b	Germany ^c	EU proposal ^d
Cd	0.13 ± 0.06	0.11 ± 0.04	2	1.5	1.5	1.5
Pb	2.54 ± 1.24	2.47 ± 1.54	100	200	150	120
Hg	0.08 ± 0.006	0.09 ± 0.01	1.0	1.0	1.0	1.0
As	1.95 ± 0.39	2.02 ± 0.73	20	–	–	20
Cr	3.70 ± 1.63	4.18 ± 3.17	100	100	100	100
Cu	39.9 ± 18.9	34.9 ± 11.9	250	200	100	250
Mo	1.62 ± 0.65	1.46 ± 0.48	20	–	–	–
Ni	7.72 ± 3.26	7.17 ± 2.98	50	50	50	50
Zn	101 ± 58	88 ± 42	1200	400	400	1200

^a Ministry of Agriculture of the Czech Republic (2014).^b British Standards Institution (2010).^c Siebert (2008).^d Saveyn and Eder (2014).

dance with Saveyn and Eder (2014) and Tampio et al. (2016) who quantified risk elements in digestate originated on agricultural biogas plants, the content of heavy metals in nitrified LPD produced within our experiments fulfilled the requirements defined by the legislation (see chapter 3.3.3). On the other hand, the presence of such elements in the substrate for biogas production will result in higher concentrations in nitrified LPD (Al Seadi et al., 2013; Kupper et al., 2014). Similarly, potential risk of the presence of specific persistent organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) or polychlorinated biphenyls (PCBs) must be expected in the case of the contamination of the substrate (Al Seadi and Lukehurst, 2012).

3.4. Application of the results

In accordance with Botheju et al. (2010), it seems to be feasible to “stabilize” nitrogen contained in raw LPD using the nitrification process thanks to the pH decrease and nitrate production. Simultaneously, the nitrification of LPD in the system described within this paper seems to be applicable as the pre-treatment of LPD ensuring the minimization of NH₃ emission during subsequent thermal thickening (Chiumenti et al., 2013). This research also confirmed the possibility efficiently producing oxidized nitrogen forms usable as acceptors of electrons for autotrophic denitrification applied within biogas cleaning by hydrogen sulphide scrubbing and bio-oxidation of captured sulphides (Doğan et al., 2012; Pokorna et al., 2015; Pokorna and Zabranska, 2015). Our results proved that the oxidized nitrogen could be produced directly in the biogas plant using LPD originated as a by-product of the biogas plant operation. On the other hand, the above presented experiments have some limitations and the results produce further topics for subsequent research. Despite the fact that the possibility to successfully initiate and operate the nitrification process in the environment of LPD was proved within this research, stable conditions were not achieved for any extended period of reactor operation. This is caused by the fact that different parameters such as NLR and pH were changed significantly during the experiment with the aim to identify quickly basic properties of the system and to find out the reaction of the biomass to these changes. The text situated below aims to summarize the possibilities for the utilization of results for practical application of the tested system and particularly for the verification and improvements of its characteristics.

3.4.1. Suggestions for objective identification of maximum achievable nitrogen oxidation rate

During future experiments, it will be necessary to prevent simultaneous changes of several parameters within short periods of reactor operation. It seems to be necessary operate the reactor

at a controlled and stable value of pH during long-term operation of the reactor. Based on the results of Period 2, the value of pH reaching 7.0 seems to be optimal from this point of view. Under such conditions, the NLR should be increased step by step from the values applied at the start of Period 1 and Period 2 (ca. 0.2 kg/(m³ d)) to values approaching 0.60 kg/(m³ d) which enabled the complete transformation of TAN to nitrate during Period 2. Progressive application of NLR values reaching 0.20, 0.30, 0.40, 0.50 and 0.60 kg/(m³ d) is recommended where after each change of the NLR value, it will be necessary to operate the reactor under constant conditions for a period lasting for at least one month with the aim of stabilizing the system. Each observation indicating a disruption of the stability of the nitrification process (especially uncontrolled pH increases similar to the pH deviation during day 55 of Period 2) should immediately result in the reduction of the NLR to the level applied during the previous step of the gradual increase of NLR. Finally, the reactor should be operated for a period lasting at least three months under the maximum NLR level ensuring satisfactory operation of the system. By this way, the maximum achievable NOR of the tested system could be objectively quantified.

All the above mentioned experiments were performed using the LPD originated from one concrete biogas plant. However, the chemical composition (N-tot and TAN concentration, pH, COD value as well as other parameters) of LPD produced at different biogas plants could differ significantly because of the variable structure of the substrate used for biogas production as well as the variable technological conditions applied for anaerobic digestion (Al Seadi et al., 2013). Thus, the inhibition effect of FA and/or FNA could differ significantly during the treatment of LPD originating at different biogas plants. Consequently, the maximum achievable NOR and other basic characteristics of the system could be affected by this fact. Similarly, the maximum achievable NOR could be significantly influenced by the content of organic matter quantified by the COD value of each concrete sample of LPD. Therefore, during the start-up of the nitrification reactor treating the LPD, as well as during its regular operation, the actual conditions prevailing in the reactor must be strictly taken into the account.

3.4.2. Prevention of nitrite production during nitrification

The presence of nitrite in nitrified LPD which is planned to be applied to soil should be minimized (see chapter 3.3.1). Simultaneously, considering the oxidation stage of nitrogen in nitrite (III) and nitrate (V), the effectivity of nitrite used as an electron acceptor for biogas desulfurization is 1.67 times lower compared to nitrate which makes nitrate the preferred nitrification final product in this case.

The results of Period 2 clearly demonstrated that the NiAR as well as N-NO₂ concentrations in the effluent from the nitrification reactor could be maintained at very low levels, preventing a toxic

effect to plants using a pH control of 7.00 ± 0.05 as well as 6.50 ± 0.05 . Taking into consideration FNA and/or nitrite's strong inhibition effect towards NOB (Anthonisen et al., 1976; Buday et al., 1999), it seems to be necessary to prevent any temporary restriction of NOB activity inducing increases of $N\text{-NO}_2^-$ concentration in the nitrification reactor. Such situations seem to be highly risky from the point of view of secondary long-term inhibition of NOB as in the case of the operation of the reactor on days 22–30 of Period 1 (Fig. 1A) where significant changes of pH and NLR resulting in the limitation of NOB activity were characteristic for this phase of the reactor operation. Also temporary restriction of dissolved oxygen availability may result in massive long-term $N\text{-NO}_2^-$ accumulation (Pacek et al., 2015).

3.4.3. Maximization of nitrogen oxidation efficiency

Based on the results presented in chapters 3.1.3 and 3.2.3, the maximization of NOE and minimization of TAN concentration in the effluent could be achieved by a pH control at a level of 7.0. Using this method, up to 100% of the TAN was oxidized to nitrate where the TAN concentration did not exceed 60 mg/L. This is beneficial for the minimizing of ammonia emissions during the direct application of nitrified LPD to soil as well as during its long-term storage or thermal thickening (see chapter 3.3.1). Simultaneously, it is useful for subsequent autotrophic denitrification applied to biogas cleaning, because the maximum amount of oxidized nitrogen usable as an acceptor of electrons is produced.

On the other hand, a pH control of a lower value may represent a successful strategy from the point of view of minimization of nitrogen losses. Within this research, the representation of N-FA was dramatically reduced at pH value 6.5 although the actual concentration of TAN increased significantly compared to the operation of the reactor at a pH value reaching 7.0 (see chapter 3.3.1). Therefore, additional research aimed at the evaluation of the potential possibility of decreasing the cost for alkali supplying thanks to the operation of the reactor at lower pH values seems to be reasonable.

With the aim to prevent the thickening of LPD in the nitrification reactor taking place as the consequence of evaporation of water (see chapter 3.2.1), it seems to be reasonable to compensate the evaporation by the addition of an adequate amount of distilled water. For this purpose, continual monitoring of the intensity of the flow of the influent raw LPD as well as effluent nitrified LPD will be necessary. By this way, the volume of distilled water required per day will be determined as the difference of the volume of raw LPD incoming into the reactor per day and the volume of nitrified LPD escaping the reactor daily. This improvement of the system will result in the enhancement of the objectivity of the evaluation of its basic characteristic including NOE.

3.4.4. Potential problems resulting from the application of the nitrification of LPD on biogas plants

Regarding the long-term storage of nitrified LPD, the potential occurrence of heterotrophic denitrification using the rest of the organic matter contained in nitrified LPD as a substrate and from it a resulting loss of nitrogen in the form of dinitrogen gas cannot be excluded. In addition, the extent of the potential risk of alkalization of LPD as a consequence of the denitrification process (Painter, 1970) and subsequent increase in the intensity of NH_3 emission is also questionable. On the other hand, the biological degradability of the organic compounds contained in raw LPD seems to be very poor (see chapter 3.3.4). Additionally, the majority of the degradable organic matter will be decomposed in the nitrification reactor where extremely low concentration of biologically degradable COD could be expected in nitrified LPD. In any event, these aspects should be verified in the future.

The operation of the biological reactor applying nitrification for LPD treatment is essentially connected to energy consumption, particularly, for supplying the air into the reactor. Thus, the economic aspects connected to the energetic demands must be evaluated for each concrete biogas plant individually.

4. Conclusions

Nitrification could be advantageously used with the aim of minimizing nitrogen losses during the storage and/or the application of LPD as well as for the pre-treatment before thermal thickening of LPD. It also could be applied to the production of electron acceptors for the biological desulfurization of biogas. Despite the extremely high concentration of TAN and COD in LPD used for the experiment, the nitrification process with $N\text{-NO}_3^-$ as a final product began immediately after the start of the reactor operation. The pH control of 7.0 enabled the reactor to convert practically all TAN to nitrate decreasing the representation of volatile N-FA more than 1000 times compared to raw LPD, which is optimal for minimizing the nitrogen losses during storage application or thermal thickening of the nitrified LPD. Simultaneously, the high efficiency of the conversion of TAN to $N\text{-NO}_3^-$ is beneficial for the production of electron acceptors for the biological desulfurization of biogas. Uncontrolled decreases of pH to values lower than ca. 5.5, similar to other sudden changes of environmental conditions prevailing in the nitrification reactor seem to be a high risk with respect to potential FNA inhibition towards nitrifying bacteria resulting in nitrite accumulation in the effluent from the reactor. Although very promising results were gained during the experiments, additional research is recommended with the aim of verifying and improving the basic characteristics of the tested system taking into the consideration variable chemical composition of raw LPD.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support given by the University-wide internal grant agency of CULS Prague – CIGA, project number 20152013 and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic under NAZV project No. QK1710176.

References

- Al Seadi, T., Drog, B., Fuchs, W., Rutz, D., Janssen, R., 2013. Biogas digestate quality and utilization. In: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (Eds.), *The Biogas Handbook – Science, Production and Applications*. Woodhead Publishing, pp. 267–301.
- Al Seadi, T., Lukehurst, C.T., 2012. Quality Management of Digestate from Biogas Plants Used as Fertiliser. IEA Bioenergy, Task 37. <http://www.iea-biogas.net/_download/publi-task37/digestate_quality_web_new.pdf> (Accessed 12.09.12).
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B.S., Srinath, E.G., 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Feder.* 48 (5), 835–852.
- APHA, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater. In: Greenberg, A.E., Clesceri, L.S., Eaton, A.D. (Eds.), 21st ed. American Public Health Association, Washington DC.
- Bauer, A., Mayr, H., Hopfner-Sixt, K., Amon, T., 2009. Detailed monitoring of two biogas plants and mechanical solid-liquid separation of fermentation residues. *J. Biotechnol.* 142 (1), 56–63.
- Botheju, D., Svalheim, Ø., Bakke, R., 2010. Digestate nitrification for nutrient recovery. *Open Waste Manage.* 3, 1–12.
- British Standards Institution, 2010. Publicly Available Specification 110:2010 Specification for Whole Digestate, Separated Liquor and Separated Fibre Derived from the Anaerobic Digestion of Source-segregated Biodegradable Materials. <http://www.wrap.org.uk/sites/files/wrap/PAS110_vis_10.pdf> (Accessed 12.02.2010).
- Buday, J., Drtil, M., Hutňan, M., Derco, J., 1999. Substrate and product inhibition of nitrification. *Chem. Pap.* 53, 379–383.
- Cardoso, A.M., Martha, B., Horn, M.B., Ferret, L.S., Carla, M.N., Azevedo, C.M.N., Pires, M., 2015. Integrated synthesis of zeolites 4A and Na-P1 using coal fly ash for application in the formulation of detergents and swine wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* 287, 69–77.

- Chiumentì, A., da Borso, F., Chiumentì, R., Teri, F., Segantin, P., 2013. Treatment of digestate from a co-digestion biogas plant by means of vacuum evaporation: tests for process optimization and environmental sustainability. *Waste Manage.* 33 (6), 1339–1344.
- Court, M.N., Stephens, R.C., Wais, J.S., 1962. Nitrite toxicity arising from the use of urea as a fertilizer. *Nature* 194, 1263–1265.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M., Bernat, K., Wojnowska-Baryła, I., Truchan, T., 2013. Treatment of high-ammonium anaerobic digester supernatant by aerobic granular sludge and ultrafiltration processes. *Chemosphere* 90, 2208–2215.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, J., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Rasmus, H., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504–509.
- Doğan, E.C., Türker, M., Dağaçsan, L., Arslan, A., 2012. Simultaneous sulfide and nitrite removal from industrial wastewaters under denitrifying conditions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17 (3), 661–668.
- European Commission, 1991. Council Directive of 12 December 1991 Concerning the Protection of Waters Against Pollution Caused by Nitrates from Agricultural Sources (91/676/EEC) <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:31991L0676>>. Accessed 31.12.1991.
- Guštin, S., Marinšek-Logar, R., 2011. Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process Saf. Environ. Prot.* 89 (1), 61–66.
- Holloway, R.W., Childress, A.E., Dennett, K.E., Cath, T.Y., 2007. Forward osmosis for concentration of anaerobic digester centrate. *Water Res.* 41, 4005–4014.
- Jeníček, P., Svehla, P., Zabravská, J., Dohányos, M., 2004. Factors affecting nitrogen removal by nitrification/denitrification. *Water Sci. Technol.* 49 (5–6), 73–79.
- Kizito, S., Wu, S., Kirui, W.K., Lei, M., Lu, Q., Baha, H., Donga, R., 2015. Evaluation of slow pyrolyzed wood and rice husks biochar for adsorption of ammonium nitrogen from piggy manure anaerobic digestate slurry. *Sci. Total Environ.* 505, 102–112.
- Kolář, L., Kužel, S., Peterka, J., Štindl, P., Plát, V., 2008. Agrochemical value of organic matter of fermenter wastes in biogas production. *Plant Soil Environ.* 54 (8), 321–328.
- Kupper, T., Bürge, D., Bachmann, H.J., Güsewell, S., Mayer, J., 2014. Heavy metals in source-separated compost and digestates. *Waste Manage.* 34, 867–874.
- Magrí, A., Béline, F., Dabert, P., 2013. Feasibility and interest of the anammox process as treatment alternative for anaerobic digester supernatants in manure processing – an overview. *J. Environ. Manage.* 131, 170–184.
- Ministry of Agriculture of the Czech Republic, 2014. Decree of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No 131/2014 on Requirements on fertilizers <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/chronologicky-prehled/Legislativa-MZe_puvodni-zneni_vyhlaska-2014-131-novela-474-2000.html>. Accessed 17.07.14.
- Münch, E.V., Barr, K., 2001. Controlled struvite crystallisation for removing phosphorus from anaerobic digester sidestreams. *Water Res.* 35 (1), 151–159.
- Pilbeam, D.J., 2015. Chapter 2 - nitrogen. In: Barker, A.V., Pilbeam, D.J. (Eds.), *Handbook of Plant Nutrition*. second ed. Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 17–63.
- Pacek, L., Svehla, P., Bartacek, J., Radechovsky, J., Hrnčirova, H., Shejbalova, S., Balik, J., Jeníček, P., 2015. Direct and indirect effects of oxygen limitation on nitrification process applied to reject water treatment. *Desalin. Water Treat.* 56 (3), 598–607.
- Pacek, L., Svehla, P., Hrnčirova, H., Radechovsky, J., 2016. Rapid achievement of nitrification in CSTR and SBR treating reject water at high ammonia levels. *Desalin. Water Treat.* 57 (34), 15958–15969.
- Painter, H.A., 1970. A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Res.* 4, 393–450.
- Pokorna, D., Carceller, J.M., Paclík, L., Zabravská, J., 2015. Biogas cleaning by hydrogen sulfide scrubbing and bio-oxidation of captured sulfides. *Energy Fuel.* 29 (7), 4058–4065.
- Pokorna, D., Zabravská, J., 2015. Sulfur-oxidizing bacteria in environmental technology. *Biotechnol. Adv.* 33 (6), 1246–1259.
- Prajapati, S.K., Kumar, P., Malik, A., Vijay, V.K., 2014. Bioconversion of algae to methane and subsequent utilization of digestate for algae cultivation: a closed loop bioenergy generation process. *Bioresour. Technol.* 158, 174–180.
- Rehl, T., Müller, J., 2011. Life cycle assessment of biogas digestate processing technologies. *Resour. Conserv. Recy.* 56, 92–104.
- Saveyn, H., Eder, P., 2014. End-of-Waste Criteria for Biodegradable Waste Subjected to Biological Treatment (Compost & Digestate): Technical Proposals. Final Report. December 2013. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Prospective Technological Studies, Seville (Spain). <<http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=6869>> (Accessed 14.01.14).
- Scaglione, D., Tornotti, G., Teli, A., Lorenzoni, L., Ficara, E., Canziani, R., Malpei, F., 2013. Nitrification denitrification via nitrite in a pilot-scale SBR treating the liquid fraction of co-digested piggy/poultry manure and agro-wastes. *Chem. Eng. J.* 228, 935–943.
- Siebert, S., 2008. Quality requirements and quality assurance of digestion residuals in Germany. In: ECN/ORBIT Workshop The future for Anaerobic Digestion of Organic Waste in Europe. Nuremberg, Germany.
- Singh, M., Pabbi, S., Bhattacharya, A.K., Singh, A.K., 2007. Nitrite accumulation in coastal clay soil of India under inadequate subsurface drainage. *Agric. Water Manage.* 91, 78–85.
- Šípková, A., Szakova, J., Hanc, A., Tlustos, P., 2016. Mobility of mercury in soil as affected by soil physicochemical properties. *J. Soils Sedim.* 16, 2234–2241.
- Song, Y.-H., Qiu, G.-L., Yuan, P., Cui, X.-Y., Peng, J.-F., Zeng, P., Duan, L., Xiang, L.-C., Qian, F., 2011. Nutrients removal and recovery from anaerobically digested swine wastewater by struvite crystallization without chemical additions. *J. Hazard. Mater.* 190, 140–149.
- Svehla, P., Bartacek, J., Pacek, L., Hrnčirova, H., Radechovsky, J., Hanc, A., Jeníček, P., 2014. Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria during sludge liquor treatment: influence of feeding strategy. *Chem. Pap.* 68 (7), 871–878.
- Tale, M., Ghosh, S., Kapadnis, B., Kale, S., 2014. Isolation and characterization of microalgae for biodiesel production from Nisargruna biogas plant effluent. *Bioresour. Technol.* 169, 328–335.
- Tampio, E., Salo, T., Rintala, J., 2016. Agronomic characteristics of five different urban waste digestates. *J. Environ. Manage.* 169, 293–302.
- Turk, O., Mavinic, D.S., 1989. Stability of nitrite build-up in an activated sludge system. *J. Water Pollut. Con. Feder.* 61 (8), 1440–1448.
- Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., Fux, C., Keller, J., 2006a. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4442–4448.
- Vadivelu, V.M., Keller, J., Yuan, Z.G., 2006b. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 830–839.
- Whelan, M.J., Everitt, T., Villa, R., 2010. A mass transfer model of ammonia volatilisation from anaerobic digestate. *Waste Manage.* 30, 1808–1812.
- Xu, J., Vujic, T., Deshusses, M.A., 2014. Nitrification of anaerobic digester effluent for nitrogen management at swine farms. *Chemosphere* 117, 708–714.
- Zakova, N., Szakova, J., Tremlova, J., Najmanova, J., Tlustos, P., 2016. The soil-plant-feed transport of selenium and other essential micronutrients in diet of sport and recreational horses at two different locations. *J. Anim. Feed Sci.* 25, 317–325.
- Zekker, I., Rikmann, E., Tenno, T., Kristel Kroon, K., Seiman, A., Loorits, L., Fritze, H., Tuomivirta, T., Priit Vabamäe, P., Raudkivi, M., Mandel, A., Tenno, T., 2015. Start-up of low-temperature anammox in UASB from mesophilic yeast factory anaerobic tank inoculum. *Environ. Technol.* 36, 214–225.
- Zhang, M., Lawlor, P.G., Wu, G., Lynch, B., Zhan, X., 2011. Partial nitrification and nutrient removal in intermittently aerated sequencing batch reactors treating separated digestate liquid after anaerobic digestion of pig manure. *Bioprocess Biosys. Eng.* 34, 1049–1056.

4.4 Míchal et al. (2017). Zpracování kapalné frakce fermentačního zbytku biologickou nitrifikací a tepelným zahuštěním.

Autoři: Míchal, P., Švehla, P., Páček, L., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Waste Forum. 10 (4). 299-309.

Zpracování kapalné frakce fermentačního zbytku biologickou nitrifikací a tepelným zahuštěním

Pavel MÍCHAL, Pavel ŠVEHLA, Lukáš PACEK, Pavel TLUSTOŠ

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha 6 – Suchbátka, Czech Republic
e-mail: michalp@af.czu.cz; svehla@af.czu.cz

Souhrn

Tento příspěvek je zaměřen na dvoustupňovou úpravu kapalné frakce fermentačního zbytku (tzv. fugátu) umožňující řešit problémy spojené s velkou produkcí fermentačního zbytku v rámci provozu zemědělských bioplynových stanic, které byly v posledních letech v ČR vybudovány. Tato úprava spočívá v biologické nitrifikaci dusíku obsaženého ve fugátu a následném tepelném zahuštění nitrifikovaného fugátu. Nitrifikace umožní oxidaci významné části amoniakálního dusíku na dusičnanu a zároveň vede k poklesu pH fugátu, čímž mohou být minimalizovány ztráty dusíku těkáním amoniaku v průběhu skladování fugátu i jeho aplikace na zemědělskou půdu. Zahuštění využívající přebytečné teplo produkované kogeneračními jednotkami pak vede k radikálnímu snížení objemu fugátu a k produkci destilátu. Zahuštěný fugát s vysokým obsahem dusičnanů může být využit jako cenné hnojivo, přičemž náklady na jeho dopravu jsou podstatně nižší než v případě surového fugátu, sníží se i riziko zhuňování půdy častými pojezdy zemědělské techniky aplikující fugát. Nabízí se i využití destilátu jako procesní vody například pro optimalizaci sušiny substrátu vstupujícího do anaerobního reaktoru bioplynové stanice. V rámci příspěvku jsou prezentovány prvotní výsledky výzkumu v této oblasti. Ty naznačují, že nitrifikační proces může být úspěšně iniciován a může kontinuálně probíhat i v agresivním prostředí fugátu, přičemž nitrifikace vede ke snížení pH fugátu až o několik jednotek. Hlavním faktorem ovlivňujícím vlastnosti produktů odpařovacího procesu je hodnota pH zahušťovaného fugátu.

Klíčová slova: Fermentační zbytek, fugát, živiny, nitrifikace, tepelné zahušťování

Úvod

Fermentační zbytek (často označovaný též jako digestát) produkovaný v rámci provozu bioplynových stanic je v řadě případů separován na dvě složky: na pevnou frakci (tzv. separát) a na kapalnou frakci (tzv. fugát). Separát může být následně dosoušen a využit pro řadu účelů (stelivo, pěstební substrát či jeho složka, surovina pro výrobu kompostu či vermikompostu apod.)^{1,2}. Fugát, charakteristický nízkou sušinou do 5 %, představuje v tomto případě v podstatě odpadní proud, přičemž nakládání s ním je spojeno s řadou problémů³. Současnou běžnou praxí nakládání s fugátem je jeho relativně dlouhodobé skladování v uskladňovacích nádržích a jeho následná aplikace na zemědělskou půdu. Fugát obsahuje relativně velké množství živin, zejména amoniakálního dusíku (N-amon). Poměrně vysoký je ve fugátu i obsah draslíku, hořčíku a vápníku či fosforu³⁻⁵. N-amon se vyskytuje ve dvou disociačních formách, kterými jsou amonný kationt (NH_4^+) a nedisociovaný amoniak (NH_3 , free ammonia - FA). Poměr těchto forem je dán fyzikálně-chemickými podmínkami, přičemž zásadní význam má v tomto ohledu zejména hodnota pH a teplota. Zastoupení těkavého NH_3 se zvyšuje s rostoucí hodnotou pH a s rostoucí teplotou^{6,7}. Fugát je charakteristický mírně zásaditou hodnotou pH (cca 7,5 – 8,5). Za těchto podmínek je již zastoupení nedisociovaného NH_3 poměrně vysoké, v závislosti na teplotě činí cca 4 – 20 %⁶.

Těkavý NH_3 při skladování fugátu i přímo během jeho aplikace na půdu uniká do ovzduší, což je nežádoucí jak z environmentálního⁸, tak z ekonomického hlediska (ztráta dusíku). Podíl ztrát může činit až 30 % z celkového množství dusíku původně obsaženého ve fugátu⁹. Živiny jsou přes relativně vysoké koncentrace N-amon, fosforečnanů a dalších látek ve fugátu rozptýleny v poměrně velkém množství balastní vody. To navyšuje náklady na skladování, přepravu a následnou aplikaci tohoto materiálu na půdu. Vysoká frekvence pojezdů zemědělské techniky aplikující velké objemy fugátu je navíc spojena

i se zvýšeným rizikem zhutnění půdy. Problémy s uplatněním digestátu nebo jeho kapalné složky (fugátu) jsou slabým článkem provozu současných BPS. Přitom vyvinutí vhodné technologie pro zpracování fugátu může vést k plošnému využití separace digestátu a celkově i k racionalizaci využití látek v něm obsažených.

Optimalizovat využití živin obsažených ve fugátu je možno různými přístupy, které jsou zpravidla založeny na zakoncentrování živin či jejich získání v relativně čisté podobě¹⁰. Známé jsou fyzikálně-chemické metody vedoucí k získání amonného dusíku, popřípadě k současnému získávání amonného dusíku a fosforu – například stripování amoniaku, či srážení struvitu¹¹. Čistě biologickou metodou je převedení živin obsažených ve fugátu do biomasy řas či vyšších rostlin¹². Zmíněné způsoby zpracování fugátu jsou však více či méně selektivní, tedy s jejich pomocí jsme schopni získávat pouze jednu (např. stripování amoniaku), dvě (dusík a fosfor při srážení struvitu) nebo několik (inkorporace do biomasy řas) živin. Ostatní cenné látky obsažené v surovém fugátu není možno zpravidla využít. Navíc jsou všechny výše uvedené postupy spojeny s produkcí odpadního materiálu, tedy vody zbavené vybraných živin. Čištění takové odpadní vody je přitom velice komplikované, neboť fugát obsahuje pestrou škálu nejrůznějších chemických látek. Zásadním problémem z hlediska biologického čištění takového proudu odpadní vody je vysoký obsah těžko biologicky rozložitelných organických látek charakteristický pro materiál, který již prošel anaerobním biologickým rozkladem v biologickém reaktoru bioplynové stanice.

Cestu umožňující zachovat při zpracování fugátu v koncentrovaném proudu v podstatě všechny živiny a současně se vyvarovat produkce odpadní vody může představovat tepelné zahušťování fugátu vedoucí k odpaření významné části balastní vody¹³, popřípadě aplikace membránových procesů (zpravidla ultrafiltrace a reverzní osmóza, resp. jejich kombinace)^{3,11,14}. Membránové procesy představují poměrně složité a nákladné systémy. Tento příspěvek se zaměřuje zejména na variantu zpracování fugátu jeho tepelným zahušťováním. To je velice energeticky náročné¹⁵, nicméně pokud zohledníme skutečnost, že většina zemědělských BPS provozovaných na území ČR nedokáže využívat veškeré teplo produkované kogeneračními jednotkami, naskytá se možnost jeho využití právě pro tepelné zahušťování fugátu vedoucí k zakoncentrování veškerých živin do jednoho produktu omezeného objemu. Destilát získaný v průběhu procesu (kondenzované páry balastní vody) by navíc bylo možno v areálu bioplynové stanice využít jako procesní vodu, zejména pro úpravu obsahu vody v substrátu vstupujícím do anaerobního reaktoru. Abychom při tepelném zahušťování zamezili únikům amoniaku do destilátu, resp. do ovzduší, je však nutné nejprve upravit hodnotu pH fugátu do mírně kyselé oblasti ($\leq 6,0$). Nejjednodušší metodou, jak tohoto cíle dosáhnout, je dávkování minerální kyseliny¹³. Nevýhodou tohoto přístupu je však vysoká spotřeba chemikálií a z ní plynoucí provozní náklady. Problémem může být i okyselování půdy po aplikaci takto upraveného fugátu.

Nabízí se však možnost docílit úpravy pH fugátu před jeho tepelným zahuštěním bez dávkování chemických činidel. Tato možnost spočívá v nitrifikaci N-amon obsaženého ve fugátu. Nitrifikace představuje biochemickou oxidaci N-amon na dusičnany a je součástí přirozeného koloběhu dusíku ve vodním prostředí. Tato biochemická transformace probíhá ve dvou krocích a podílejí se na ní dvě nezávislé skupiny nitrifikačních bakterií. N-amon je nejprve oxidován na dusitanový dusík (N-NO_2^-) činností nitritačních organismů (ammonium oxidizing bacteria - AOB) rodů *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* a dalších. Následně je N-NO_2^- převáděn na dusičnanový dusík (N-NO_3^-) v rámci činnosti nitratačních organismů (nitrite oxidizing bacteria - NOB) rodů *Nitrobacter*, *Nitrospira* a dalších. Oxidované formy dusíku (N-NO_2^- a N-NO_3^-) přitom nejsou těkavé a z tohoto hlediska je možno je považovat za „stabilní“ formu dusíku. Nitrifikace je v kombinaci s denitrifikací i základním principem odstraňování sloučenin dusíku z odpadních vod. Při nitrifikaci, přesněji v průběhu její první fáze - nitritace, jsou uvolňovány ionty H^+ . V případě vodního prostředí s velmi vysokou koncentrací N-amon a nedostatečnou kyselinovou neutralizační kapacitou (což je i případ fugátu) proto dochází při nitrifikaci k poklesu hodnoty pH⁶. Díky tomu je zároveň s produkcí oxidovaných forem dusíku po nitrifikaci radikálně sníženo riziko ztrát dusíku těkáním amoniaku, neboť i v případě, že významná část N-amon není při nitrifikaci převedena na oxidované formy, zastoupení těkavého NH_3 je minimální.

Se zpracováním fugátu s využitím nitrifikace nejsou v ČR dosud žádné zkušenosti. Na druhou stranu je však za účelem optimalizace tohoto procesu možno využít výsledky získané při dlouhodobých experimentech zaměřených na zpracování kalové vody či jiných odpadních vod charakteristických

vysokou koncentrací sloučenin dusíku¹⁶⁻¹⁸. Překážkou pro úspěšnou iniciaci a dlouhodobé udržení nitrifikačního procesu v prostředí fugátu může být vysoká koncentrace N-amon. Ten je sice substrátem pro AOB, ale zároveň na tyto organismy (zejména ve formě FA) od určité koncentrace působí inhibičně. Ještě citlivější jsou v tomto směru NOB. Navíc, přechodná akumulace N-NO₂⁻, ke které dochází v případě činnosti AOB a současně inhibici aktivity NOB, může nitrifikační organismy sekundárně inhibovat ještě silněji z důvodu zvýšeného výskytu volné kyseliny dusité (HNO₂, free nitrous acid – FNA)^{6,17}.

Cílem tohoto příspěvku je ověřit možnost iniciace a dlouhodobého udržení nitrifikačního procesu v agresivním prostředí fugátu a posoudit vliv různých faktorů na průběh tohoto procesu. Zároveň si klade za cíl navrhnout optimální podmínky pro tepelné zahušťování surového fugátu tak, aby bylo možno zvolit vhodnou strategii pro dvoustupňovou úpravu fugátu v soustavě nitrifikace – tepelné zahuštění, která bude realizována v dalších fázích výzkumu.

Experimentální část

Test zaměřený na simulaci nitrifikace v prostředí fugátu probíhal v laboratorním modelu biologického reaktoru zkonstruovaného z plexiskla, jehož pracovní objem činil 1,5 l. Za reaktorem byla zařazena dosazovací nádrž o objemu 0,25 l. K inokulaci systému nitrifikující biomasou byl využit vratný aktivovaný kal odebraný z biologického stupně čištění na městské čistírně odpadních vod. V okamžiku zahájení provozu byl celý objem reaktoru naplněn aktivovaným kalem o koncentraci (NL) cca 10 g/l, teprve poté bylo zahájeno kontinuální dávkování fugátu. Průběh zpracování reaktoru v daných podmínkách (prakticky nulová koncentrace N-amon v reaktoru při zahájení provozu reaktoru) byl analogický s dříve provedeným experimentem s kalovou vodou vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu¹⁹. Reaktor byl provozován jako aktivační systém v režimu směšovací aktivace způsobem analogickým s postupy aplikovanými při biologickém čištění odpadních vod²⁰. Provzdušňování aktivační směsi bylo zajištěno vzduchovacím motorkem používaným v akvaristice. Přečerpávání tekutin v rámci modelu bylo realizováno pomocí peristaltických čerpadel. Fugát použitý jako vstup do reaktoru byl odebrán z bioplynové stanice zpracovávající zejména prasečí kejdu, travní hmotu a masokostní moučku. Koncentrace N-amon v použitém fugátu se pohybovala mezi 2,4 a 2,9 g/l, přičemž představovala dominantní chemickou formu dusíku v tomto fugátu. Hodnota pH dosahovala v průměru 8,2. Fugát byl charakteristický velice vysokým obsahem organických látek, přičemž hodnota CHSK odstředěného vzorku činila průměrně 8,3 g/l. Homogenizovaný vzorek vykazoval dokonce hodnoty CHSK okolo 20 g/l. Zatížení reaktoru se v průběhu provozu reaktoru pohybovalo mezi 0,17 a 0,70 kg/(m³·d). Tomu odpovídala hydraulická doba zdržení fugátu v reaktoru v rozsahu 4 – 15 dnů. V rámci těchto prvotních experimentů byl reaktor provozován po dobu 54 dnů. Hodnota pH nebyla regulována, což limitovalo celkovou účinnost převedení N-amon na oxidované formy ve shodě s průběhem nitrifikačního procesu v kalové vodě vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu¹⁶.

V průběhu celého experimentu bylo jednou týdně prováděno spektrofotometrické měření koncentrace N-amon ve vstupním fugátu a koncentrací jednotlivých forem dusíku (N-amon, N-NO₂⁻ a N-NO₃⁻) na odtoku z reaktoru. Ve stejném intervalu byla sledována i hodnota CHSK fugátu na vstupu a výstupu. Kontinuálně pak byla pomocí měřicího systému Magic XBC (GRYF HB, spol. s r.o.) měřena teplota a hodnota pH v reaktoru. Pravidelně byla také sledována koncentrace kyslíku v reaktoru, která byla ve snaze zabránit limitaci výkonnosti reaktoru a hromadění dusitanů v odtoku¹⁸ udržována na hodnotách převyšujících 2,5 mg/l.

Za účelem posouzení efektivity nitrifikačního procesu byl použit parametr „účinnost převedení N-amon na oxidované formy“ (E (ox)), jehož hodnota byla vypočtena dle následující rovnice 1:

$$E(ox) = \frac{c(N-NO_2^-) + c(N-NO_3^-)}{c(N-NO_2^-) + c(N-NO_3^-) + c(N-amon)} \cdot 100 \% \quad (1),$$

ve které $c(\text{N-NO}_2^-)$, $c(\text{N-NO}_3^-)$ a $c(\text{N-amon})$ představují koncentraci jednotlivých forem dusíku na odtoku z reaktoru.

Koncentrace volného amoniaku -FA (C_{FA}) a volné kyseliny dusité - FNA (C_{FNA}) v mg/l byly vypočteny dle následujících rovnic (rovnice 2 a 3)⁶:

$$C_{\text{FA}} = \frac{17}{14} \cdot \frac{c(\text{N-amon}) \cdot 10^{\text{pH}}}{\exp\left(\frac{6334}{273+T}\right) + 10^{\text{pH}}} \quad (2)$$

$$C_{\text{FNA}} = \frac{46}{14} \cdot \frac{c(\text{N-NO}_2^-)}{\exp\left(\frac{-2300}{273+T}\right) \cdot 10^{\text{pH}}} \quad (3),$$

kde $c(\text{N-amon})$ a $c(\text{N-NO}_2^-)$ představuje aktuální celkovou koncentraci N-amon a N-NO_2^- v mg/l, T je teplota ve °C a pH aktuální hodnota pH v systému.

K pokusům zaměřeným na tepelné zahušťování fugátu byla využita laboratorní odparka BÜCHI Rotavapor R-215 s vakuovou pumpou V-700 a regulátorem podtlaku V-850. Prvotní pokusy zaměřené na odpařování balastní vody z fugátu probíhaly za sníženého tlaku (300 mBar) s využitím vodní lázně temperované na teplotu 95 °C. Při tepelném zahušťování byl produkován zahuštěný fugát a destilát vznikající kondenzací vodní páry v chladiči, který je součástí použité odparky. Zpracovávány byly vzorky fugátu o objemu 200 ml. Před zahájením vlastní odpařování byly vzorky přidavkem kyseliny sírové o molární koncentraci 0,1 mol/l okyseleny ze slabě alkalické hodnoty typické pro fugát na hodnoty 6,0; 5,0; resp. 4,0. Následně byly vzorky tepelně zahuštěny na 50 % původního objemu. Z původního objemu fugátu 200 ml bylo tedy 100 ml převedeno do destilátu. Ve vzorcích surového fugátu, zahuštěného fugátu i destilátu byla sledována hodnota pH, koncentrace amoniakálního dusíku a měrná elektrická vodivost (konduktivita).

Testy byly realizovány s fugátem produkováným v rámci tří BPS provozovaných na území ČR (BPS 1, BPS 2 a BPS 3). BPS 1 a BPS 2 zpracovávají převážně cíleně pěstovanou biomasu a exkrementy hospodářských zvířat, BPS 3 využívá jako substrát pro výrobu bioplynu zejména separované bioodpady a biologicky rozložitelné odpady z kuchyně a stravoven (gastroodpad).

V rámci experimentu byl kvantifikován podíl amoniakálního dusíku zůstávajícího v zahuštěném fugátu a jeho podíl přecházející do destilátu. Určovány byly také ztráty dusíku během odpařovacího procesu. Tepelné zahušťování jednotlivých vzorků bylo realizováno ve třech opakováních, přičemž níže uvedené výsledky jsou aritmetickými průměry z těchto tří pokusů.

Veškeré chemické rozborů vzorků byly prováděny ve shodě s postupy uvedenými v práci²¹. N-amon byl stanovován spektrofotometricky indofenolovou metodou, N-NO_3^- a N-NO_2^- byly kvantifikovány spektrofotometricky s 2,6 dimethylfenolem, respektive s amidem kyseliny sulfanylové a NED dihydrochloridem, hodnota CHSK byla stanovována dichromanovou metodou (spektrofotometrickou semimikrometodou).

Výsledky a diskuse

LABORATORNÍ TEST HODNOTÍCÍ NITRIFIKACI FUGÁTU

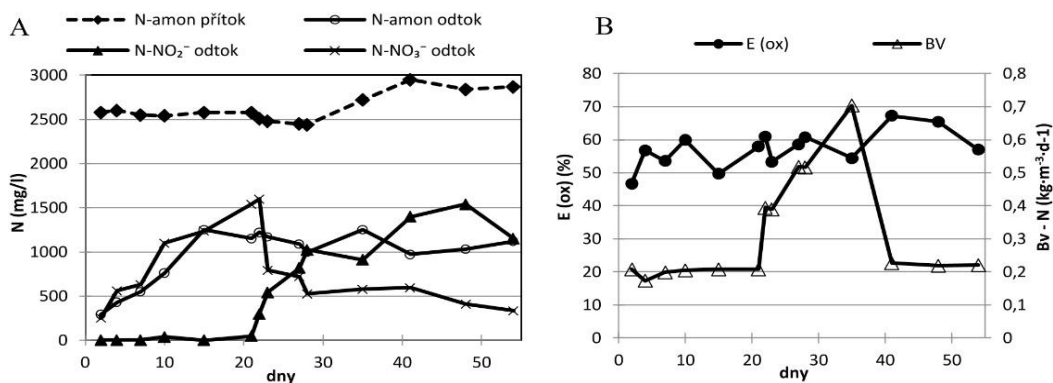
Změny koncentrace sloučenin dusíku v odtoku z nitrifikačního reaktoru

Přes extrémně vysokou koncentraci N-amon a organických látek ve zpracovávaném fugátu se podařilo od počátku experimentu iniciovat nitrifikační proces s dusičnany jako konečným produktem. To svědčí o vysoké aktivitě nitrifikačních (AOB) i nitratačních (NOB) bakterií. Již dva dny po zahájení experimentu byla v odtoku z reaktoru zaznamenána koncentrace N-NO_3^- 250 mg/l, přičemž do 21. dne rovnoměrně stoupala až na 1540 mg/l (obrázek 1A). Současně docházelo k nárůstu koncentrace N-amon v odtoku. Z vývoje koncentrací jednotlivých forem dusíku v odtoku je zřejmé, že přibližně polovina N-amon byla v této fázi převedena na N-NO_3^- a druhá polovina zůstávala v odtoku. Produkce N-NO_2^- byla do 21. dne provozu reaktoru velice nízká. Od 21. dne experimentu byl (patrně v souvislosti se

zvýšením zatížení reaktoru – obrázek 1B a poklesem pH v reaktoru – obrázek 2A) zaznamenaný pozvolný nárůst koncentrace N-NO_2^- , který byl doprovázen poklesem koncentrace N-NO_3^- . Zatímco 21. den byla naměřena koncentrace N-NO_2^- 47 mg/l, 28. den již činila 1022 mg/l. Koncentrace N-amon v odtoku se od 15. dne ustálila na hodnotách mezi 950 a 1250 mg/l.

Postupný nárůst koncentrace celkového dusíku (sumy N-amon, N-NO_3^- a N-NO_2^-) v odtoku z reaktoru v prvních cca 15ti dnech byl zapříčiněn postupným přísunem fugátu bohatého na N-amon do prostředí reaktoru, který byl původně naplněn aktivovaným kalem s koncentrací dusíku nepřevyšující 20 mg/l. V dalším průběhu experimentu byla v některých případech naopak zaznamenána situace, ve které součet koncentrací jednotlivých forem dusíku v odtoku převyšoval koncentraci N-amon v přítoku. K tomu došlo zejména okolo 20. dne provozu reaktoru. Hlavním důvodem tohoto jevu byl patrně provoz reaktoru při relativně nízkém zatížení, kdy při malém průtoku docházelo k zahušťování fugátu odpařením vody z reaktoru. Tuto domněnku potvrzuje i skutečnost, že po následném zvýšení zatížení reaktoru (a tím i průtoku fugátu reaktorem) již nebyl tento jev tak významný (obrázek 1). K odparu sice pochopitelně docházelo v průběhu celého experimentu, nicméně při vyšším průtoku reaktorem neměl takový vliv na koncentrace sledovaných látek, neboť objem odpařené vody byl ve vztahu k průtoku zanedbatelný. Určitý vliv na bilanci dusíku v systému mohla mít i případná mineralizace organického dusíku v nitrifikačním reaktoru. Ta by mohla být významná zejména ve fugátu z anaerobních reaktorů bioplynových stanic, ve kterých nedochází k dostatečně účinnému rozkladu organické hmoty. V každém případě je záměrem autorů tohoto příspěvku se v rámci navazujících experimentů podrobněji věnovat biochemickým přeměnám sloučenin dusíku, které by v reaktoru mohly probíhat souběžně s nitrifikací.

Zjištění, že při vhodné volbě strategie zpracování nitrifikačního procesu je možno nitrifikaci okamžitě iniciovat přes extrémní chemické složení zpracovávané vody je ve shodě se závěry plynoucími z experimentů provedených s kalovou vodou vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu na velkých městských čistírnách odpadních vod¹⁹. Výsledky prezentované v rámci tohoto příspěvku tedy potvrzují předpoklad, že v mnoha ohledech bude nitrifikace v prostředí fugátu probíhat podobně jako v případě biologického čištění kalové vody, přestože fugát obsahuje N-amon ve výrazně vyšší koncentraci než kalová voda a několikanásobně vyšší ve fugátu je i hodnota CHSK kvantifikující obsah organických látek.

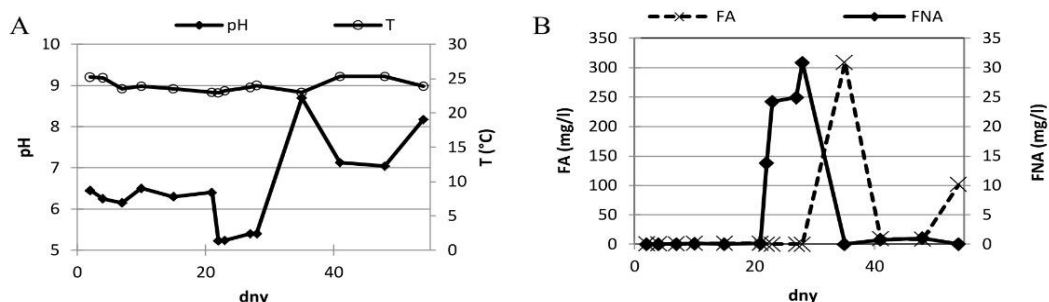


Obrázek 1: Nitrifikace fugátu – koncentrace N-amon ve vstupním fugátu a koncentrace N-amon, N-NO_2^- a N-NO_3^- v odtoku z reaktoru (A); objemové zatížení dusíkem - BV a účinnost převedení N-amon na oxidované formy – E (ox) (B)

Hodnota pH a její vliv na inhibici nitrifikace

Do 21. dne pokusu se hodnota pH v reaktoru pohybovala mezi 6,1 a 6,5 (obrázek 2A). Následně ale došlo k poklesu pH až na 5,2. To mělo i při relativně nízké koncentraci N-NO_2^- (47 mg/l měřeno 21. den) za následek poměrně významný nárůst koncentrace volné kyseliny dusité (FNA), viz obrázek 2B. Již 22. den byla zaznamenána koncentrace FNA dosahující 13,8 mg/l. Přitom již rozmezí koncentrace FNA

0.2 – 2.8 mg/l bývá z hlediska aktivity NOB označováno jako inhibiční⁶. Některé novější studie naznačují, že FNA může inhibovat činnost NOB dokonce při koncentraci 0,037 mg/l²². Z tohoto důvodu byla patrně od 21. dne aktivity NOB významně omezena, což se projevilo strmým nárůstem koncentrace N-NO₂⁻ (obrázek 1A) a současně logicky i dalším vzrůstem koncentrace FNA (obrázek 2B). Ta vzrostla na extrémní hodnoty dosahující až 30,9 mg/l. Za těchto podmínek již ve shodě s Vadivelu et al.²³ došlo i k potlačení aktivity AOB, což se v důsledku absence acidifikace prostředí při jejich činnosti⁷ projevilo strmým nárůstem pH až na 8,7 (měřeno 35. den experimentu). Tento nárůst pH na jedné straně eliminoval inhibiční působení FNA, na druhou stranu však vyvolal nárůst koncentrace volného amoniaku (FA) až na extrémní hodnoty dosahující 35. den až 308 mg/l (obrázek 2B).



Obrázek 2: Nitrifikace fugátu – hodnota pH a teplota v reaktoru (A) a jejich vliv na koncentraci FA a FNA (B)

Za těchto podmínek již nelze očekávat uspokojivou funkci NOB ani AOB^{6,23}. Přesto se v dalším průběhu experimentu činnost reaktoru obnovila, což se projevilo určitým poklesem pH již při dalším měření. I dále však přes významné snížení zatížení reaktoru (obrázek 1B) docházelo k silným fluktuacím v hodnotě pH a tedy i k přechodnému extrémnímu nárůstu koncentrace toxických forem dusíku.

Účinnost převedení N-amon na oxidované formy

Účinnost převedení N-amon na oxidované formy (E (ox)) se po celou dobu provozu reaktoru pohybovala v rozmezí 47 – 67 %. Omezení účinnosti procesu v podmínkách bez regulace pH je dáno nedostatečnou kyselinovou neutralizační kapacitou zpracovávaného fugátu (respektive příliš nízkým poměrem mezi kyselinovou neutralizační kapacitou a koncentrací N-amon), přičemž pokles pH způsobený nitrifikačním procesem následně limituje aktivitu nitrifikačních organismů⁷. Hodnoty E (ox) zjištěné v rámci tohoto experimentu jsou ve shodě s výsledky získanými při obdobných testech zaměřených na nitritaci kalové vody¹⁶.

Zatížení reaktoru se v prvních 21 dnech provozu reaktoru pohybovalo okolo 0,2 kg/(m³·d). Následně bylo postupně zvyšováno (obrázek 1B). Při hodnotě 0,70 kg/(m³·d) dosažené 35. dne došlo ke strmému nárůstu hodnoty pH (obrázek 2A) svědčícímu o snížení účinnosti nitrifikace (nedochází k tak intenzivní produkci H⁺ charakteristické pro nitrifikaci, resp. nitritaci⁷). Proto bylo zatížení reaktoru sníženo na původní hodnotu okolo 0,2 kg/(m³·d). Z provedených experimentů však nebylo možno učinit jednoznačný závěr, zda nárůst hodnoty pH způsobilo primárně přetížení reaktoru či extrémní nárůst koncentrace FNA v této fázi jeho provozu (viz výše).

Rizika plynoucí z výsledků testu zaměřeného na nitrifikace fugátu a náměty na navazující experimenty

Nízké hodnoty pH jsou příhodné pro tepelné zahušťování nitrifikovaného fugátu. Na druhou stranu je však potřeba brát na zřetel vliv aktuální hodnoty pH v nitrifikačním reaktoru na koncentraci FA a zejména FNA. Jejich inhibiční působení na nitrifikační organismy může v daných podmínkách silně ovlivňovat nejen zastoupení konečných produktů nitrifikace, ale v extrémních případech může vést i ke kolapsu

celého procesu. V rámci dosavadních experimentů bylo také zjištěno, že i prudké změny v zatížení reaktoru dusíkem mohou vyvolat nestabilitu procesu. Systém se jeví jako velice náchylný zejména k inhibici aktivity NOB. Ukázalo se, že razantní nekontrolovaný pokles pH v nitrifikačním reaktoru (v našem případě z hodnoty cca 6,4 na cca 5,2) může vést k masivní akumulaci dusitanů v odtoku z nitrifikačního reaktoru a k riziku kolapsu biologického procesu. Vzhledem k toxickému vlivu N-NO_2^- na některé rostliny²⁴ je však při využití nitrifikovaného a následně tepelně zahuštěného fugátu v zemědělství naším zájmem minimalizovat zastoupení N-NO_2^- mezi produkty nitrifikace. V každém případě bude za účelem identifikace optimálních podmínek pro nitrifikaci fugátu zapotřebí v rámci navazujícího výzkumu realizovat dlouhodobější experimenty, při kterých bude biomasa vystavena po delší dobu neměnným podmínkám. Jako perspektivní se jeví zejména varianta s možností kontinuální regulace pH v reaktoru a velice pozvolným zvyšování zatížení reaktoru dusíkem.

VLIV PH NA TEPELNÉ ZAHUŠŤOVÁNÍ SUROVÉHO FUGÁTU

V rámci prvotních experimentů zaměřených na tepelné zahušřování surového fugátu bylo potvrzeno, že hlavním faktorem ovlivňujícím distribuci N-amon v zahušřovaném fugátu a v destilátu i další vlastnosti těchto dvou produktů, je hodnota pH fugátu při zahájení odpařovacího procesu. S klesající hodnotou pH vzrůstal podíl N-amon zůstávajícího v zahušřovaném fugátu a klesal podíl N-amon přecházejícího do destilátu. Při hodnotě pH 6,0 činil podíl N-amon v zahušřovaném fugátu u jednotlivých vzorků 63 – 80 % (viz tabulka 1), podíl N-amon v destilátu 7 – 14 %.

Zbytek (8 – 30 %) pak připadal na ztráty N-amon v plynné formě (viz tabulka 1). Lepších výsledků bylo u BPS 1 a BPS 2 v tomto směru dosaženo při hodnotách pH 5,0 a 4,0, přičemž výsledky při těchto hodnotách nevykazovaly příliš významné rozdíly. U BPS 3 naopak nebyly zaznamenány velké rozdíly u vzorků okyselených na pH 6,0 a 5,0. Výrazně lepší výsledky byly u této BPS naopak zaznamenány při pH 4,0. Úplně nejvyšší podíl N-amon v zahušřovaném fugátu (90 %) byl pozorován u vzorků z BPS 2 okyselených na pH 5,0, resp. 4,0. Podíl N-amon v destilátu nepřekročil při hodnotách pH 4,0 ani 5,0 v žádném ze vzorků 7 %. U vzorků z BPS 1 a BPS 3 zahušřovaných při pH 4,0 pak nepřekročil 2 %. Nejmenší ztráty dusíku (cca 4 %) byly zaznamenány u vzorku z BPS 2 zahušřovaného při hodnotě pH 5,0. Avšak u vzorku z BPS 3 činily ztráty i při pH 4,0 celých 20 %, při hodnotách pH 5 a 6 byly u této BPS ještě výrazně vyšší (tabulka 1). V každém případě je překvapující velký rozdíl mezi ztrátami dusíku u jednotlivých BPS. Zdá se, že v tomto směru mohla hrát roli skutečnost, že při úpravě pH vzorků fugátu před tepelným zahušřováním dávkováním roztoku kyseliny došlo ke změně, resp. nárůstu, objemu vzorku, který byl v rámci těchto experimentů zanedbán. Nárůst objemu fugátu však mohl způsobit u některých vzorků významnější změnu v koncentraci dusíku ve vzorku fugátu a z ní plynoucí zkreslení výpočtu procentuálního zastoupení dusíku v zahušřovaném fugátu, destilátu a dusíku připadajícího na ztráty. U vzorků s vyšší hodnotou kyselinové neutralizační kapacity (zejména BPS 3) byly dávky roztoku kyseliny logicky vyšší a to patrně vedlo k určitému zkreslení výpočtu ztrát dusíku. Dalšími faktory ovlivňujícími přesnost výpočtu bilance dusíku může být také omezená možnost ukončit destilaci přesně ve chvíli, kdy byla odpařena 1/2 původního objemu fugátu a chyba stanovení N-amon, která může dosahovat v daných podmínkách až 5 %. V každém případě bude nezbytné se v rámci navazujících experimentů na všechny faktory ovlivňující přesnost bilance dusíku při odpařovacím procesu detailněji zaměřit a eliminovat jejich vliv.

Výsledky získané v rámci tohoto experimentu jsou srovnatelné s literárními údaji. Například Chiumenti et al.¹³ také dospěli k závěru, že hodnota pH fugátu je hlavním faktorem ovlivňujícím průběh odpařovacího procesu a vlastnosti jeho produktů. Zatímco při zahušřování surového neupraveného fugátu charakteristickou hodnotou pH v rozmezí 7,6 – 7,9 bylo 78 % N-amon převedeno do destilátu, úprava pH na 5,0 vedla k tomu, že 97,5 % N-amon zůstalo v zahušřovaném fugátu. Při hodnotě pH 3,5 tento podíl vzrostl dokonce na 99,2 %.

Tabulka 1: Bilance amoniakálního dusíku po odpaření při různých hodnotách pH vstupního fugátu

vzorek	pH (surový fugát)	pH (po úpravě)	koncentrace N-amon (mg/l)			N-amon v zahuštěném fugátu (%)	N-amon v destilátu (%)	ztráty N-amon (%)
			surový fugát	zahuštěný fugát	destilát			
BPS 1	8,2	6,0	2 500	3 680	710	74	14	12
		5,0		4 080	160	82	3	15
		4,0		4 030	67	81	1	18
BPS 2	7,7	6,0	1 900	3 030	460	80	12	8
		5,0		3 420	240	90	6	4
		4,0		3 410	190	90	5	5
BPS 3	8,0	6,0	4 750	5 970	650	63	7	30
		5,0		6 250	150	66	2	32
		4,0		7 510	70	79	1	20

Hodnota pH surového fugátu v okamžiku zahájení odpařování má pochopitelně významný vliv i na další vlastnosti zahuštěného fugátu i destilátu. V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty pH a konduktivity pro tyto produkty tepelného zahušťování fugátu. Konduktivita destilátu významně klesá s poklesem hodnoty pH, což jasně prokazuje pokles koncentrace elektrolytů v destilátu. V případě hodnoty pH 5,0 a 4,0, nepřesahovala konduktivita 1 mS/cm a dosahuje tedy hodnot splňujících limit pro pitnou vodu. Na druhou stranu jsou to hodnoty o 2 – 3 řády vyšší než hodnoty typické pro destilovanou vodu⁷. Výrazně vyšší hodnoty převyšující 3 mS/cm byly zaznamenány u všech vzorků zpracovaných při pH 6. Nejnižší hodnota (0,22 mS/cm) byla zaznamenána u destilátu získaného tepelným zahušťováním fugátu produkovaného na BPS 3 při hodnotě pH 4,0. Ve všech vzorcích zahuštěného fugátu byly zaznamenány velice vysoké hodnoty konduktivity pohybující se v řádu desítek mS/cm.

Tabulka 2: Hodnoty pH a konduktivity v produktech tepelného zahušťování fugátu

vzorek	pH		zahuštěný fugát		destilát	
	surový fugát	po úpravě	pH	konduktivita (mS/cm)	pH	konduktivita (mS/cm)
BPS 1	8,2	6,0	6,7	39	9,3	3,2
		5,0	5,4	41	8,6	0,7
		4,0	4,4	45	7,5	0,5
BPS 2	7,7	6,0	6,8	19	9,1	3,2
		5,0	5,8	20	8,4	0,9
		4,0	5,1	28	5,4	0,5
BPS 3	8,0	6,0	6,5	48	9,3	4,3
		5,0	5,4	53	7,5	0,9
		4,0	4,4	52	3,8	0,2

Náměty na navazující výzkum v oblasti tepelného zahušťování fugátu

V rámci výše popsaného experimentu zaměřeného na tepelné zahušťování fugátu byla z hlediska obsahu živin hlavní pozornost věnována N-amon, u kterého je vysoké riziko přestupu z kapalně do plynné fáze. U dalších základních živin (zejména fosforu a draslíku) lze vzhledem k jejich fyzikálně-chemickým vlastnostem předpokládat, že po tepelném zahuštění v podstatě beze zbytku zůstanou v kapalně frakci, resp. v zahuštěném fugátu. Za předpokladu aplikace optimálních podmínek

odpařovacího procesu a zachování cca 80 – 90 % N-amon v tepelně zahuštěném fugátu (viz tabulka 1), je tedy možno očekávat, že zpracování fugátu tepelným zahuštěním nepovede k zásadním změnám v poměru N, P a K v tepelně zahuštěném fugátu ve vztahu k surovému fugátu před jeho úpravou. V každém případě autoři příspěvku počítají s ověřením těchto předpokladů v rámci navazujícího výzkumu.

Zatím byly samostatně simulovány nitrifikace a tepelné zahušťování surového fugátu, přičemž v dalších fázích řešení projektu se počítá s integrací obou procesů, tedy se zpracováním fugátu v soustavě nitrifikace/tepelné zahuštění. Tepelně zahušťován již nebude surový fugát, nýbrž fugát, který byl nejprve podroben biologické předúpravě nitrifikací. To v rámci dosud provedených experimentů nebylo možné, neboť nebylo k dispozici dostatečné množství nitrifikovaného fugátu, jehož vlastnosti navíc nebyly stabilní. V rámci navazujících experimentů se bude potřeba zaměřit na detailnější identifikaci faktorů způsobujících ztráty dusíku při odpařování. Budou vyvíjeny snahy navrhnout podmínky umožňující docílit ještě nižší intenzity přechodu amoniakálního dusíku do destilátu.

Pozornost bude nutno v rámci navazujících experimentů věnovat také riziku zvýšeného obsahu těžkých kovů a dalších rizikových látek v zahuštěném fugátu. Tepelné zahuštění logicky povede nejen ke zvýšení obsahu živin, ale zároveň i k zakoncentrování těchto látek. Existuje tedy nebezpečí, že i v případě splnění limitů obsahu rizikových látek v surovém, resp. nitrifikovaném, fugátu dle aktuálních legislativních předpisů²⁵, těmto předpisům nevyhoví konečný produkt dvoustupňové úpravy fugátu, tedy tepelně zahuštěný nitrifikovaný fugát. V každém případě se jeví jako nezbytné u každého konkrétního vzorku před aplikací upraveného fugátu na zemědělskou půdu provádět testy ekotoxicity²⁶.

Z hlediska praktické aplikace tepelného zahušťování fugátu může poměrně zásadní problém představovat velká energetická náročnost tohoto procesu. Z dosud realizovaných zahraničních aplikací pro tepelné zahušťování surového fugátu je zřejmé, že k odpaření 1 kg vody je potřeba přibližně 1 kWh tepla. Dle dostupných zdrojů je proto k realizaci takového systému potřeba cca 75 % zbytkového odpadního tepla produkovaného v rámci provozu BPS²⁷. Tento údaj ale nelze považovat za univerzálně platný, bude se měnit v závislosti na místních podmínkách. V každém případě, pro BPS, které nenacházejí jiné uplatnění pro zbytkové teplo, se jeví jako reálné uvažovat o jeho využití pro tepelné zahuštění surového, resp. nitrifikovaného fugátu.

Závěry

Zpracování fugátu v soustavě nitrifikace/tepelné zahuštění představuje perspektivní variantu pro úpravu fugátu produkovaného v rámci provozu bioplynových stanic, která může vést k efektivnějšímu využití tohoto materiálu. Byla potvrzena možnost iniciovat a provozovat nitrifikaci v agresivním prostředí fugátu. V nitrifikovaném fugátu je výrazně snížena hodnotou pH, rozdíl v pH surového a nitrifikovaného fugátu může činit i několik jednotek. To je příznivé z hlediska potenciálního tepelného zahušťování nitrifikovaného fugátu. Na druhou stranu bylo zjištěno, že za určitých okolností hrozí nekontrolovatelné výkyvy hodnoty pH v nitrifikačním reaktoru, které mohou vyvolat masivní akumulaci dusitanů v odtoku či dokonce zastavit nitrifikační proces. Pro další fázi výzkumu bude tedy zapotřebí regulovat pH v reaktoru. Průběh tepelného zahušťování fugátu ovlivňuje zejména hodnota pH zahušťovaného fugátu. V rámci navazujících experimentů bude již tepelně zahušťován nitrifikovaný fugát, přičemž technologické uspořádání odpařovacího procesu bude zapotřebí optimalizovat z hlediska minimalizace obsahu N-amon v destilátu a z pohledu minimalizace ztrát dusíku.

Poděkování

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení projektu podporovaného MZe ČR v rámci NAZV, registrační číslo projektu QK1710176. Autoři děkují poskytovateli dotace za finanční podporu výzkumu.

Literatura

1. Tlustoš P., Kaplan L., Dubský M.: Sborník z konference Racionální použití hnojiv 2014. Powerprint s.r.o., Praha. 36 (2014).
2. Drosig B., Fuchs W., Al Seadi T., Madsen M., Linke B.: Nutrient recovery by biogas digestate processing, IEA Bioenergy (2015)
3. Al Seadi T., Drosig B., Fuchs W., Rutz D., Janssen R.: The Biogas Handbook - Science, Production and Applications. Chapter 12 – Biogas digestate quality and utilization. Woodhead Publishing Limited (2013).
4. Botheju D., Svalheim Ø., Bakke R.: The open waste management journal. 3, 1 (2010).
5. Kolář L., Kužel S., Peterka J., Borová-Batt J.: Plant Soil and Environ. 54, 321 (2008).
6. Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S., Srinath E.G.: J. Water Poll. Contr. Fed 48, 835 – 852 (1976).
7. Pitter P.: Hydrochemie. Vydavatelství VŠCHT, Praha (1999).
8. Renard J.J., Calidonna S.E., Henley M.V.: J. Hazard. Mater. 108, 29 (2004).
9. Hlušek J.: Statková hnojiva. www.mendelu.cz. (2004)
10. Tampio E., Marttinen S., Rintala J.: J. Clean. Prod. 125, 22 (2016).
11. Došek M., Holba M., Černý M.: Sborník z konference Odpadové Fórum 2015, příspěvek č. (033). Dostupné z: <http://www.odpadoveforum.cz/TVIP2015/index.html>. (2015)
12. Prajapati S. K., Kumar P., Malik A., Vijay V. K.: Bioresource Technol. 158, 174 (2014).
13. Chiumenti A., da Borso F., Chiumenti R., Teri F., Segantin P.: Waste Manage. 33, 1339 (2013).
14. Holloway R.W., Childress A.E., Dennett K.E., Cath T.Y.: Water Res. 41, 4005 (2007).
15. Novák J., Bartlovská L., Cibulka I., Dohnal V., Chuchvalec P., Kolafa J., Malijevský A., Matouš J., Řehák K., Slavíček P., Šobr J., Voňka P.: Fyzikální chemie pro bakalářský a magisterský kurz. VŠCHT, Praha. (2008).
16. Jeníček P., Svehla P., Zabranska J., Dohányos M.: Water Sci. Technol. 49, 73(2004).
17. Svehla P., Bartacek J., Pacek L., Hrnčirova H., Radechovsky J., Hanc A., Jeníček P.: Chem. Pap. 68, 871.(2014).
18. Pacek L., Švehla P., Bartáček J., Radechovský J., Hrnčířová H., Shejbalová S., Balík J., Jeníček P.: Desalin. Water Treat. 56, 598 (2015).
19. Pacek L., Švehla P., Hrnčířová H., Radechovský J.: Desalin. Water Treat. 57, 15958 (2016).
20. Chudoba J., Dohányos M., Wanner J.: Biologické čištění odpadních vod, SNTL Praha (1991).
21. Horáková M. a kolektiv: Analytika vody. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (2003).
22. Vadivelu V.M., Yuan Z.G., Fux C., Keller J.: Environ. Sci. Technol. 40, 4442 (2006).
23. Vadivelu V.M., Keller J., Yuan Z.G.: Biotechnol. Bioeng. 95, 830 (2006).
24. Court M.N., Stephens R.C., Wais J.S.: Nature 194, 1263 (1962).
25. Ministerstvo zemědělství České republiky (2014). Vyhláška č. 131/2014 Sb., kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, ve znění pozdějších předpisů, a vyhláška č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv [cit. 27. 11. 2017]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/chronologicky-prehled/Legislativa-MZe_puvodni-zneni_vyhlaska-2014-131-novela-474-2000.html.
26. Jančula D., Zezulka Š., Došek M., Beklová M., Havelková B., Maršálek B.: Acta Univ. Agric. et Silv. Mendel.Brun. 65, 1183 (2017).
27. Míchal P., Švehla P., Tlustoš P. In Racionální použití hnojiv 2016. Praha: Powerprint, 2016. s. 113 – 116, ISBN: 978-80-213-2691-0

Treatment of the Liquid Phase of Digestate Using Biological Nitrification and Thermal Thickening

Pavel MICHAL, Pavel SVEHLA, Lukas PACEK, Pavel TLUSTOS

Department of Agro-Environmental Chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýčká 129, Prague – Suchbát, 165 21, Czech Republic
e-mail: michalp@af.czu.cz, svehla@af.czu.cz

Summary

This paper deals with two-stage treatment of the liquid phase of digestate (so called fugate or liquid digestate) enabling to solve the problems connected with large production of digestate during the operation of agricultural biogas plants which were constructed intensively during last years in the Czech Republic. The treatment consists of the biological nitrification of ammonia contained in the fugate and consequent thermal thickening of all nutrients contained in fugate pre-treated by the nitrification. Nitrification ensures partial conversion of ammonia to nitrate and simultaneously induces pH decrease in the fugate. By this way, the nitrogen losses during the storage and during the application of fugate to soil which are mainly caused by the volatilization of free ammonia could be minimized. Thermal thickening utilizing excess of heat produced by cogeneration units consequently leads to radical decrease of the volume of fugate where valuable distilled liquor will be produced. Thickened fugate could be applied as fertilizer where the costs for the transport of this material will be reduced significantly in the comparison with raw fugate. Also the risk of the compacting of the soil by frequent driving of agricultural vehicles will be reduced significantly. The distilled liquor produced during the thermal thickening could be used as the process water e.g. for the optimisation of the content of dry matter in the substrate for anaerobic reactor of biogas plant. Primary results of the research in the field of combined treatment of the fugate by nitrification and subsequent thermal thickening are presented within this paper. The results indicated that the nitrification process could be successfully initiated and operated in the aggressive environment of fugate where the pH of fugate could decrease even by several units thanks to initiation of nitrification. The main factor influencing the course of thermal thickening of raw fugate was the pH value reached during the evaporation process.

Keywords: digestate; fugate; nitrogen; nitrification; thermal thickening

Acknowledgement

This paper was prepared within the project supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic under NAZV project no. QK1710176. The authors gratefully thank the donor for the financial support of the research.

4.5 Míchal et al. (2018). Dvoustupňová úprava fugátu jako cesta k produkci procesní vody.

Autoři: Míchal, P., Švehla, P., Vargas, C. L. M., Tlustoš, P.

Publikováno v časopise: Vodní Hospodářství. 68 (4). 44-46.

Dvoustupňová úprava fugátu jako cesta k produkci procesní vody

Pavel Míchal, Pavel Švehla, Liz Mabel Vargas Cáceres, Pavel Tlustoš

Abstrakt

Príspevek se zabývá problematikou zpracování kapalné frakce fermentačního zbytku vznikajícího při provozu bioplynových stanic (tzv. fugátu) dvoustupňovou úpravou spočívající v nitrifikaci a následném tepelném zahuštění nitrifikovaného fugátu. Konečnými produkty jsou zahuštěný nitrifikovaný fugát využitelný jako komplexní kapalné hnojivo a destilát, který může být v rámci bioplynových stanic (BPS) zpětně využit jako procesní voda. Nitrifikace vede k převedení části amoniakálního dusíku na dusičnanovou formu a zároveň k významnému poklesu pH fugátu. Ten je pozitivně vzhledem k minimalizaci přechodu zbyvajících amoniakálního dusíku do destilátu. Důraz je v rámci příspěvku kladen zejména na možnost využití destilátu. Prezentovány jsou základní charakteristiky surového fugátu, nitrifikovaného fugátu i jednotlivých produktů tepelného zahuštění. V těchto frakcích byly sledovány parametry jako pH, koncentrace N-amon, N-NO₃ a N-NO₂, CHSK či nižších mastných kyselin. Sledována byla i elektrická vodivost.

Klíčová slova

fermentační zbytek – fugát – procesní voda – nitrifikace – tepelné zahušťování – destilát

Úvod

Problematika BPS jako obnovitelného zdroje energie je vysoce diskutovaným tématem jak v České republice, tak i v Evropské unii. V ČR je v současné době v provozu 554 bioplynových stanic, z čehož je 383 zemědělských. V celé Evropské unii se nachází přibližně 12 tisíc zemědělských BPS z celkového počtu 17 tisíc [1]. Vedle energeticky bohatého bioplynu jsou vedlejším produktem anaerobní digesce velké objemy suspenze, která již prošla anaerobním rozkladem. Jedná se o tekutý materiál se sušinou obvykle okolo 10 %, který je označován jako digestát, respektive fermentační zbytek. Fermentační zbytek je v některých provozech BPS separován na dvě složky: na pevnou složku (tzv. separát) a na kapalnou frakci (tzv. fugát).

Separát je charakterizován poměrně vysokou sušinou 20–30 % a může být následně využit pro řadu účelů (hnojivo, stelivo, písečná substrát či jeho složka apod.). Z celkové hmotnosti digestátu zaujímá separát pouze 10 až 20 % a je v něm koncentrováno přibližně 60 % fosforu [2].

Naopak fugát se vyznačuje nízkou sušinou 0,8–4 %, přičemž obsahuje relativně vysoké koncentrace živin – zejména amoniakálního dusíku (N-amon, 5–15 % sušiny; koncentrace v jednotkách g/l), draslíku (0,1 % sušiny), ale i fosforu (cca 1 % sušiny, většinou desítky až stovky mg/l) [3, 4, 5]. Z celkového množství představuje fugát 80–90 % hmotnosti digestátu [2]. Běžnou praxí nakládání s fugátem je jeho poměrně dlouhodobé skladování v areálu BPS a následná aplikace na zemědělskou půdu jakožto zdroje živin pro rostliny.

Vysoké koncentrace N-amon ve fermentačním zbytku, resp. ve fugátu jsou způsobeny transformací organicky vázaného dusíku přítomného v různých organických substrátech (hnůj, kejda či jateční odpady) během anaerobní fermentace [6]. Amoniakální dusík zahrnuje amonný iont (NH₄⁺) a nedisociovaný amoniak (NH₃). Zastoupení obou forem je dáno fyzikálně-chemickými podmínkami, zásadní význam má v tomto ohledu hodnota pH a teplota. Zastoupení těkavého NH₃ se zvyšuje s rostoucí hodnotou pH a s rostoucí teplotou [7, 8, 9]. Fugát je přitom charakteristický mírně zásaditou hodnotou pH, která se pohybuje v rozmezí 7,5 až 8,5 [4], proto je zastoupení nedisociovaného NH₃ ve fugátu poměrně vysoké. Při aplikaci fugátu na zemědělskou půdu i při jeho skladování dochází tedy k uvolňování NH₃ do ovzduší, což má negativní vliv na lidské zdraví [10] a stav životního prostředí obecně. Zároveň dochází i ke ztrátám dusíkaté živiny, která je nezbytná pro vývoj rostlin.

Pres relativně vysoký obsah živin ale fugát zároveň obsahuje i velké objemy balastní vody. To vede ke zvýšeným nárokům na objem uskladňovacích nádrží. Problém dlouhodobého skladování fugátu je zásadní hlavně v období zákazu hnojení, které je v České republice zakotveno v nařízení vlády č. 262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí a akčním programu. Fugát je na základě tohoto nařízení hodnocen jako hnojivo s rychle uvolnitelným dusíkem a zákaz jeho aplikace je v období od 15. 11. do 15. 2. pro klimatický region 0–5 (tzn. region velmi teplý, teplý až po mírně teplý–mírně vlhký region), respektive od 5.11. do 28.2 pro klimatický region 6–9 (mírně teplý–vlhký až po chladný region). V Evropě se požadavky na skladování digestátu, resp. fugátu velmi různí a záleží na legislativních úpravách jednotlivých států. Maximální přípustná doba skladování se pohybuje od 4 do 9 měsíců [2]. Zároveň i doprava digestátu či jeho kapalné frakce do vzdálenějších oblastí (více než 20 km) neúměrně prodražuje ekonomiku celého provozu BPS [11].

Za účelem dosažení optimální sušiny materiálu vstupujícího do anaerobního reaktoru BPS je zpravidla substrát potřeba ředit. To platí zejména při zpracování substrátů s vyšší sušinou. V celém procesu anaerobní digesce tak má významnou úlohu voda, které musí být zajištěn dostatečný přísun. Jako ředící médium zpravidla bývá používán právě fugát, jehož neustálá recirkulace v systému však může vést k provozním problémům způsobeným nárůstem koncentrace N-amon či jiných látek až na úroveň inhibující proces [2]. Nabízí se tedy možnost zakonzentrovat živiny obsažené ve fugátu vhodným postupem do jednoho proudu a druhý proud (prakticky čistou vodu) použít jako ředící médium pro úpravu sušiny substrátu či k jiným účelům (čištění technologických součástí BPS, užitková voda pro obsluhu BPS atd.) [12]. Frakce, ve které je zakonzentrována většina živin i jiných látek, může mít charakter pevné hmoty. Na druhou stranu je však v některých případech vhodnější koncentrovaný proud vznikající úpravou fugátu produkovat ve formě kapaliny. Kraume [11] například uvádí, že optimální je situace, kdy cca 50 % původního objemu případně na kapalný zahuštěný proud a zbylých 50 % představuje dále využitelná „čistá voda“.

Vysoký obsah balastní vody ve fugátu a snaha o racionalizaci využití v něm obsažených živin i této balastní vody podporují rozvoj nových metod nakládání s fermentačním zbytkem, respektive s fugátem. Známé jsou fyzikálně-chemické metody vedoucí k získání amoného dusíku, popřípadě k současnému získávání amoného dusíku a fosforu – například stripování či srážení struvitu. Uplatnění mohou v těchto souvislostech nalézt také membránové procesy či sorpce [5].

Zajímavou alternativou představuje také odpařování balastní vody při tepelném zahušťování využívajícím odpadní teplo produkované kogeneračními jednotkami [2], popřípadě jeho kombinace s biologickou předúpravou fugátu nitrifikací [13]. Konečnými produkty zpracování fugátu v soustavě nitrifikace/tepelné zahuštění jsou zahuštěný nitrifikovaný fugát využitelný jako komplexní kapalné hnojivo a destilát, který může být v rámci BPS zpětně využit jako procesní voda. Nitrifikace fugátu realizovaná podobným způsobem jako při čištění odpadních vod vede k převedení části (popřípadě veškerého) amoniakálního dusíku obsaženého v surovém fugátu na dusičnanovou formu a zároveň dochází k významnému poklesu pH fugátu do mírně kyselé oblasti (6,0 či méně). Pokles pH je pozitivní vzhledem k minimalizaci těkání amoniaku při dlouhodobém skladování nitrifikovaného fugátu, resp. při jeho přímé aplikaci na půdu. V případě dvoustupňové úpravy nitrifikace/tepelné zahuštění je zásadní i z pohledu snížení intenzity přechodu zbyvajících amoniakálního dusíku do destilátu při tepelném zahušťování nitrifikovaného fugátu. Dusičnany vyprodukované při nitrifikaci lze z pohledu rizika ztrát dusíku považovat za stabilní formu, u které by nemělo při manipulaci s fugátem docházet k jejímu úniku do atmosféry, resp. do destilátu [5].

Hlavním cílem tohoto příspěvku je vyhodnotit možnosti využití destilátu, vznikajícího při tepelném zahušťování nitrifikovaného fugátu jako procesní vody využitelné v areálu BPS.

Metodika

V rámci pokusů byla v prvním kroku realizována nitrifikace fugátu v laboratorním reaktoru o provozním objemu 5 litrů. Tento fugát pocházel z BPS, která zpracovává bioodpady a biologicky rozložitelné odpady z kuchyní a stravoven (gastroodpady). V nitrifikačním reaktoru bylo dlouhodobě udržováno pH na hodnotě 6,0. Popis funkce nitrifikačního reaktoru je uveden v práci [13].

V navazujícím kroku byly vzorky nitrifikovaného fugátu (odtoku z nitrifikačního reaktoru) tepelně zahuštěny přibližně na 50 % pů-

vodního objemu. Zbývajících 50 % původního objemu fugátů přešlo do destilátu (vody vznikající kondenzací par produkovaných při tepelném zahušťování nitrifikovaného fugátu). Ve fázi tepelného zahušťování bylo použito 200 ml nitrifikovaného fugátu, přičemž výsledky prezentované v níže uváděných **tabulkách 1 a 2** jsou průměry hodnot ze tří měření. K tepelnému zahuštění byla využita odparka BÜCHI Rotavapor R-215 s vakuovou pumpou V-700 a regulátorem podtlaku V-850. Výsledky rozborů zaznamenané u vzorků zahuštěného nitrifikovaného fugátu byly vždy srovnány s hodnotami získanými pro surový fugát (materiál vstupující do nitrifikačního reaktoru) a fugát po nitrifikaci (odtok z nitrifikačního reaktoru). Odpařování probíhalo za sníženého tlaku (300 mbar) s využitím vodní lázně temperované na teplotu 95 °C. Teplota vznikající páry se při daném tlaku pohybovala okolo 70 °C. V rámci chemických rozborů byly ve vzorcích surového fugátu, nitrifikovaného fugátu, zahuštěného nitrifikovaného fugátu (destilačního zbytku) i destilátu dle Horákové a kol. [14] stanovovány hodnoty těchto parametrů:

- hodnota pH;
- koncentrace N-amon, N-NO₃⁻, N-NO₂⁻ [mg/l];
- chemická spotřeba kyslíku dichromanovou spektrofotometrickou semimikrometodou [mg/l];
- konduktivita [mS/cm].

Byly taktéž sledovány koncentrace nižších mastných kyselin (NMK) v surovém fugátu, fugátu po nitrifikaci a v produktech tepelného zahušťování nitrifikovaného fugátu pomocí plynového chromatografu Thermo Fischer scientific Trace 1310 s FID detektorem.

Výsledky a diskuse

Z výsledků prezentovaných v **tabulce 1 a 2** jsou zřejmé základní rozdíly v charakteristikách surového fugátu, nitrifikovaného fugátu a jednotlivých produktů procesu tepelného zahuštění. Z **tabulky 1** je patrné, že v důsledku nitrifikace dochází v souladu s [8] k poklesu hodnoty pH (z 8,4 na 6,1) a k poklesu koncentrace N-amon z 3 600 mg/l na 5,9 mg/l. Pokles koncentrace N-amon byl logicky doprovázen nárůstem koncentrace dusičnanového dusíku (z prakticky neměřitelných hodnot na 5 650 mg/l). Výskyt dusitanového dusíku v nitrifikovaném fugátu nebyl u zpracovávaných vzorků významný. Nesoulad v koncentraci celkového dusíku ve fugátu vstupujícího do nitrifikačního reaktoru a ve fugátu nitrifikovaném je patrně způsoben částečnou mineralizací organického dusíku v reaktoru a odparem určité části vody [5]. Významný je také pokles hodnoty CHSK_{RL} (tedy CHSK odstředěného vzorku kvantifikující organické rozpustné látky) z 12 000 na 2 400 mg/l. Ten potvrzuje poměrně vysokou aktivitu aerobních heterotrofních organismů v nitrifikačním reaktoru [15]. Na druhé straně můžeme při srovnání surového a nitrifikovaného fugátu pozorovat nárůst konduktivity z 33,7 mS/cm na 49,8 mS/cm. Ten se také dá vysvětlit mineralizací organických látek, která patrně vedla ke zvýšení koncentrace elektrolytů v odtoku z reaktoru. Nezanedbatelnou roli může i v tomto ohledu hrát také výše zmíněné zahuštění směsi v důsledku odparu vody.

Dále je zřejmé, že v důsledku tepelného zahušťování dochází k nárůstu koncentrace N-NO₃⁻ v tepelně zahuštěném fugátu oproti nitrifikovanému fugátu před zahuštěním z 5 650 mg/l až na 14 470 mg/l. Tyto hodnoty v zásadě odpovídají skutečnosti, že prakticky veškerý dusičnanový dusík zůstal v zahuštěném fugátu, jehož objem byl cca poloviční ve srovnání s nitrifikovaným fugátem před zahuštěním. Oproti tomu hodnota CHSK_{RL} se v důsledku zahuštění zvýšila více než 4x (z 2 400 na 10 900 mg/l). To je zřejmě způsobeno přechodem částí organických látek vyskytujících se v nerozpustné formě do formy rozpustné v důsledku vysoké teploty panující v destilační aparatuře. Nejsou vyloučeny ani změny v chemické struktuře organických látek, které by také mohly částečně vysvětlit tento jev. Z údajů uvedených v **tabulce 1** je také patrné, že do destilátu přechází velmi malé množství jednotlivých forem dusíku, koncentrace celkového dusíku v něm nepřekračuje 5 mg/l. V souvislosti s relativně nízkým obsahem elektrolytů v de-

stilátu byly v tomto proudu zaznamenány o minimálně 3 řády nižší hodnoty konduktivity ve srovnání s ostatními proudy. Z **tabulky 1** je dále patrné, že do destilátu přechází určité množství organických látek kvantifikovatelných pomocí parametru CHSK, jehož hodnota dosahovala v tomto proudu 110 mg/l. Tato skutečnost může být zapříčiněna přítomností určitého množství těkavých NMK v nitrifikovaném fugátu a jejich částečným transferem do destilátu (viz **tabulka 2**).

Tabulka 2 zobrazuje koncentrace NMK. Je z ní patrné, že surový fugát před nitrifikací obsahoval vysoké koncentrace jednotlivých kyselin. To svědčí o nedokonalém anaerobním rozkladu v reaktoru BPS, ze které byl vzorek odebrán. V důsledku aerobního rozkladu organické hmoty v nitrifikačním reaktoru došlo k rapidnímu poklesu koncentrace NMK. Koncentrace jednotlivých NMK v zahuštěném fugátu, respektive v destilátu je s ohledem na jejich nízký obsah v nitrifikovaném fugátu před zahuštěním poměrně vysoká. Zajímavá je také změna v zastoupení jednotlivých NMK v produktech zahuštění ve srovnání s původním nitrifikovaným fugátem. Toto zjištění může indikovat průběh chemických změn organické hmoty při procesu zahušťování. Jedná se však pouze o prvotní výsledky, které bude potřeba ověřit v rámci navazujícího výzkumu.

Závěr

Z výsledků dosud provedených experimentů je zřejmé, že do destilátu vznikajícího při tepelném zahušťování nitrifikovaného fugátu (potenciální procesní kapaliny) přechází poměrně malé množství jednotlivých forem dusíku. Na druhou stranu se zdá, že koncentrace organických látek v destilátu může být relativně významná, patrně zvláště při vyšších koncentracích těkavých nižších mastných kyselin v nitrifikovaném fugátu. Přestože chemické složení destilátu v žádném případě nedosahuje kvality například destilované vody, z předběžných výsledků výzkumu prezentovaných v rámci tohoto příspěvku vyplývá, že má smysl se i nadále zabývat možností aplikace postupu nitrifikace/tepelné zahuštění jako metody pro zpracování fugátu, včetně myšlenky využívat destilát produkovaný v rámci tohoto procesu v provozu bioplynové stanice jako procesní vodu, například k ředění vstupních surovin. Zároveň se jeví jako reálné uvažovat o využití zahuštěného nitrifikovaného fugátu jako komplexního kapalného hnojiva.

Poděkování: Projekt vznikl za finanční podpory Národní agentury pro zemědělský výzkum QK1710176.

Literatura/References

- [1] European Biomass Association. *AEBIOM statistical report*. AEBIOM, Brussels, 2016.
- [2] Wellinger, A.; Murphy, J.; Baxter, D. *The biogas handbook – Science, production*

Tabulka 1. Základní charakteristiky jednotlivých frakcí

Parametr	Vzorek			
	Surový fugát	Nitrifikovaný fugát	Zahuštěný fugát	Destilát
CHSK _{RL} (mg/l)	12 000	2 400	10 900	110
N-NH ₄ ⁺ (mg/l)	3 600	5,9	10,6	2,3
N-NO ₃ ⁻ (mg/l)	-	5 650	14 470	1,9
N-NO ₂ ⁻ (mg/l)	-	0,34	0,99	0,03
Konduktivita (mS/cm)	33,7	49,8	99,0	0,02
pH	8,4	6,1	5,79	7,19

Tabulka 2. Koncentrace nižších mastných kyselin u jednotlivých forem fermentačního zbytku

Parametr (koncentrace v mg/l)	Surový fugát	Nitrifikovaný fugát	Zahuštěný fugát	Destilát
k. octová	3555	16,4	16,0	7,60
k. propionová	731	0	43,0	0
k. izomáselná	144	15,5	4,50	9,90
k. máselná	448	0	6,50	0
k. izovalerová	296	19,5	0	0
k. valerová	36	19,0	0	0
k. kapronová	18	0	0	0

- and application. ns. Woodhead Publishing, Cambridge, 2013.
- [3] Kolář, L.; Kužel, S.; Peterka, J.; Borová-Batt, J. Agrochemical value of the liquid phase of wastes from fermenter during biogas production. *Plant Soil and Environ.* 56 (2010) 23–27.
 - [4] Straka, F.; Čiahotný, K.; Dohányos, M.; Jeníček, P.; Kajan, M.; Lacek, P.; Záborská, J. Bioplyn. Příručka pro výuku, projekci a provoz bioplynových systémů. GAS s.r.o., Říčany, 2010.
 - [5] Guštin, S.; Logar, R. Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *PROCESS SAF ENVIRON.*, 89 (2011) 61–66.
 - [6] Anthonisen, A. C.; Loehr, R. C.; Prakasam, T. B. S.; Srinath, E.G. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed.* 48 (1976) 835–852.
 - [7] Pitter, P. *Hydrochemie*. VŠCHT, Praha, 1999.
 - [8] Park, S.; Bae, W. Modeling kinetics of ammonium oxidation and nitrite oxidation under simultaneous inhibition by free ammonia and free nitrous acid. *Process Biochem.* 44 (2009) 631–640.
 - [9] Butterbach-Bahl, K.; Gundersen, P.; Ambus, P.; Augustin, J.; Beier, C.; Boeckx, P. Nitrogen processes in terrestrial ecosystems. In: *The European Nitrogen Assessment*, Sutton, M. A.; Howard, C. M.; Erismann, J. W.; Billen, G.; Bleekes, A.; Grenfeld, P.; van Grimsven, H.; Grizzetti, B. (ed.), University Press, Cambridge, 2010.
 - [10] Kraume, M.; Fechter, M. Treatment of digestate from biogas production – status and trends. In: *Energy from biomass and biogas*. Vilnius, 2010.
 - [11] Ruiz-Hernando, M.; Martínez-Elorza, G.; Labanda, J.; Llorens, J. Dewaterability of sewage sludge by ultrasonic, thermal and chemical treatments. *CHEM ENG J.*, 230 (2013) 102–110.
 - [12] Švehla, P.; Radechovská, H.; Míchal, P.; Páček, L.; Tlustoš, P. (2016). Řízení procesu nitrifikace kapalných frakcí fermentačního zbytku s ohledem na další postup zpracování tohoto materiálu. In: *Kaly a odpady 2016*. Senec, 2016.
 - [13] Švehla, P.; Radechovská, H.; Páček, L.; Míchal, P.; Hanč, A.; Tlustoš, P. Nitrification in a completely stirred tank reactor treating the liquid phase of digestate: The way towards rational use of nitrogen. *Waste Manage.* 64 (2017) 96–106.
 - [14] Horáková, M. a kol. *Analytika vody*. VŠCHT, Praha, 2003.
 - [15] Meng, Q.; Yang, F.; Liu, L.; Meng, F. Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. *J. Environ. Sci.* 20 (2008) 933–939.

Ing. Pavel Míchal (autor pro korespondenci)

Ing. Pavel Švehla, Ph.D.

Bc. Liz Mabel Cáceres Vargas

prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc.

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin
Česká zemědělská univerzita v Praze
Kamýcká 129
165 00 Praha 6 – Suchbátka
michalp@af.czu.cz**

Tento článek byl recenzován a je otevřen k diskusi do 30. června 2018. Rozsah diskusního příspěvku je omezen na 2 normostrany A4, a to včetně tabulek a obrázků. Příspěvky posílejte na e-mail stransky@vodnihospodarstvi.cz.

5. Sumární diskuse

Tématem produkce bioplynu z různých rostlinných materiálů se zabývalo mnoho studií, přičemž hlavní pozornost se soustředila na tradiční substráty (kukuřice, cukrovarnické řízky, organická frakce směsných komunálních odpadů), ale jen málo z nich se věnovalo problematice dalších rostlin vhodných k jejich využití v BPS. Současně s tím je v posledních letech zaměřována vědecká aktivita na nalezení vhodné metody pro úpravu vznikajících velkých objemů fermentačního zbytku – digestátu, ale i jeho složek (separátu, fugátu). Řešení výše nastíněných problémů je v současné době velmi aktuální a potřebné, jak v rovině hledání alternativních zdrojů substrátu pro výrobu bioplynu, tak i z pohledu nakládání s fermentačním zbytkem.

V první části sumární diskuse (podkapitola 5.1) jsou shrnuty poznatky z vědeckých publikací (podkapitoly 4.1 a 4.2), ve kterých jsou naše výsledky zaměřeny na možnost uplatnění alternativních plodin (různé druhy trav, technické konopí) v anaerobní digestaci, jejichž začlenění by mohlo vést k diverzifikaci surovinové základny BPS. V kapitole 5.1 je dále diskutována problematika rychlosti produkce bioplynu ze sledovaných materiálů, současně je vyhodnocen i vliv teploty skladování na produkci a kvalitu vznikajícího bioplynu z různých druhů trav. U experimentu s technickým konopím je sledována tvorba a kvalita produkované biomasy v jednotlivých růstových fázích ve vztahu k množství a kvalitě produkovaného bioplynu a methanu.

Ve druhé části sumární diskuse (podkapitola 5.2) jsou diskutovány poznatky z dalších publikovaných prací (podkapitoly 4.3, 4.4 a 4.5). Zde jsou posuzovány možnosti zpracování kapalně frakce fermentačního zbytku (fugátu). Ten je na BPS produkován ve velkých objemech, přičemž nakládání s ním není dostatečně vyřešeno. Zpracování fugátu je v rámci této disertační práce řešeno dvoustupňovým systémem nitrifikace-tepelné zahušťování, při kterém nejprve dochází k transformaci amoniakálního dusíku (N-amon) do dusičnanové formy (N-NO_3^-) s následnou redukcí objemu pomocí tepelného zahuštění.

5.1 Hodnocení produkce bioplynu z alternativních substrátů

5.1.1 Sledování vývoje rostlin na produkci biomasy

Vliv fáze ontogeneze rostlin na obsah a množství sušiny produkované biomasy byl sledován u rostlin technického konopí (podkapitola 4.2) v průběhu polního pokusu ve čtyřech vývojových fázích rostlin (fáze pěti pravých listů – 1. sklizeň, tvorba květu – 2. sklizeň, fáze

květu – 3 sklizeň, zralost 50 % semen – 4. sklizeň) v různém systému hnojení (NPK, separát, fugát a dělená dávka separátu a fugátu). Bylo prokázáno, že s posunem k vyšším vývojovým fázím rostlin dochází k nárůstu sušiny z 21 % u první sklizně až po 32 % u poslední sklizně. Současně dochází i ke změně zastoupení OS. Z 80 % podílu OS u první sklizně došlo k nárůstu až na 93 % OS u čtvrté sklizně. To je ve shodě s Haklem et al. (2012) a McEniry et O'Kielly (2013), kteří ve svých studiích popisují změnu sušiny, respektive OS v průběhu vývoje různých trav. V jejich studiích byl prokázán nárůst sušiny mezi jednotlivými sklizněmi v rozmezí hodnot od 16 % do 26 % (Hakl et al., 2012), respektive nárůst v zastoupení OS v rozmezí hodnot od 90 % do 93 % (McEniry et O'Kielly, 2013). Konkrétní hodnoty OS během vývoje rostlin technického konopí však dosud nebyly publikovány. Hektarové výnosy sušiny prokázaly statisticky průkazný nárůst v rozmezí od 0,6 do 0,7 t/ha u první sklizně až po 10,3 až 12,0 tuny sušiny z hektaru u čtvrté sklizně. V rámci jednotlivých sklizní však nebyly prokázány statisticky významné rozdíly ve výnosech mezi jednotlivými variantami hnojení. Pakarinen et al. (2011) ve své studii uvedli výnos 14 tun sušiny biomasy z hektaru pro zářijovou sklizeň, Prade et al. (2011) dosáhli výnosu sušiny z hektaru během tříletého pokusu v rozmezí od 13 do 17 t/ha pro podzimní sklizeň, Kreuger et al. (2011) uvádějí výnos 15,6 tuny sušiny z hektaru. V porovnání s těmito autory pak Gissén et al. (2014) publikovali široké rozpětí výnosů víceletého pokusu rostlin technického konopí v rozmezí od 6,6 tuny/ha až po 13 t/ha. Námi dosažené výnosy z poslední sklizně jsou nižší v porovnání s většinou diskutovaných autorů, avšak nejvyšší zjištěný výnos (12,0 t/ha) je blízký nižším výnosům uvedeným ve studii Prade et al. (2011) a zároveň dosahuje výnosu srovnatelného se studií Gissén et al. (2014), jejichž výnos biomasy konopí se v prvním sledovaném roce pohyboval v rozmezí od 11 do 13 t/ha.

5.1.2 Produkce a kvalita bioplynu z alternativních plodin

Produkce bioplynu a obsah methanu v bioplynu vyprodukovaném z trav sklizených z intenzivně obhospodařovaného hřišťového trávníku a extenzivně pěstované trávy v parku byla hodnocena v kombinaci s různou teplotou skladování (-18 °C, +3 °C, +18 °C a +35 °C) sklizené trávy před zahájením testu produkce bioplynu (podkapitola 4.1). Produkce bioplynu a kvalita methanu rostlin technického konopí byla naopak sledována v různé ontogenezi rostlin a v různém systému hnojení. Tyto výsledky byly publikovány v podkapitole 4.2.

Vyšší produkce bioplynu z trav bylo dosaženo u intenzivně obhospodařovaných hřišťových trávníků oproti extenzivně obhospodařovaným parkovým trávníkům. Systém obhospodařování trávníků se významně projevil na množství a kvalitě bioplynu. U hřišťového

trávníku došlo k aplikaci 560 kg N/ha, 410 kg K/ha a 120 kg P/ha, přičemž tento trávník byl vedle přísunu vody ve srážkách (roční úhrn srážek 495 mm/m²; Kulhánek et al., 2016) také zavlažován dalšími 670 mm/m². Parkový trávník byl naopak hnojen pouze 75 kg N/ha, 75 kg K/ha a 33 kg P/ha, trávník nebyl zavlažován. Toto intenzivní hnojení se tak projevilo v rozdílném druhovém i fyzikálně-chemickém složení travních materiálů (tabulka č. 1, podkapitola 4.1). Intenzivně obhospodařované trávníky vykázaly vyšší produkci methanu z OS (0,33 – 0,41 m³) v porovnání s extenzivně obhospodařovanými trávníky (0,20 – 0,33 m³), což je ve shodě s Piepenschneider et al. (2016) i Mayer et al. (2014), kteří uvádějí nižší výtěžnost methanu z OS pro trávníky z okolí silnic. Ta je dle Piepenschneidera et al. (2016) v rozmezí od 0,21 do 0,24 m³ methanu z kg OS, avšak Meyer et al. (2014) ve své studii uvádějí širší rozpětí výtěžnosti methanu v rozmezí od 0,22 do 0,39 m³ z kg OS. Triolo et al. (2012) a Gerin et al. (2008) dospěli k závěru, že různé druhy travních materiálů pocházejících z údržby zahradních trávníků produkují množství methanu z kg OS v rozmezí od 0,32 do 0,35 m³. Je tedy zřejmé, že systém obhospodařování má významný vliv na produkci methanu.

Zjištěné produkce methanu z OS se u rostlin technického konopí v jednotlivých sklizních významně statisticky neliší. Produkce methanu z kg OS se u všech sledovaných variant pohybovala v rozmezí od 0,28 do 0,32 m³ z kg OS. To je ve shodě s Pakarinen et al. (2011), Prade et al. (2011) či Heiermann et al. (2009), kteří uvádějí produkci methanu z kg OS u rostlin technického konopí v rozmezí od 0,25 do 0,30 m³. Při porovnání s výše diskutovanými produkcemi methanu z různých travních materiálů je zřejmé, že specifická produkce methanu technického konopí je vyšší v porovnání s výtěžností methanu z trávníků z okolí silnic (0,21 do 0,24 m³; Piepenschneider et al., 2016) a zároveň dosahuje vyšších, případně obdobných výtěžností methanu z extenzivně obhospodařovaných parkových trávníků (0,20 – 0,33 m³). Naopak při porovnání s intenzivně pěstovanými trávami (0,33 – 0,41 m³) dosahuje technické konopí nižší výtěžnosti methanu z kg OS.

Současně s produkcí methanu z OS bylo v publikovaných experimentech sledováno zastoupení methanu v bioplynu. Průměrné hodnoty zastoupení methanu byly u různých trav v rozmezí hodnot od 59,8 do 64,0 %. Pro rostliny technického konopí bylo zastoupení methanu v bioplynu v rozmezí od 59,5 do 61,5 %. Zastoupení methanu v bioplynu produkovaném z pěstovaných trav je tak vyšší v porovnání s Triolo et al. (2012). Zároveň zastoupení methanu v bioplynu produkovaném z rostlin technického konopí dosahuje blízkých hodnot s Triolo et al. (2012), kteří uvádějí průměrnou hodnotu 58,3 ± 1,1 %. Průběh produkce methanu během

anaerobní digesce pak v obou případech odpovídal stavu, který ve své studii popsali Kandel et al. (2013) pro vývoj zastoupení methanu u rostlin chrastice rákosovité.

Vzhledem k velmi podobným výsledkům specifické produkce methanu (0,28 - 0,32 m³ z kg OS) u jednotlivých vývojových fází rostlin technického konopí, byly na základě výnosu sušiny z hektaru vypočteny hektarové výnosy bioplynu, respektive methanu. Průměrná hektarová produkce methanu byla pro závěrečnou sklizeň 2953 m³. To je na spodní hranici hektarové produkce methanu z kukuřice (2897 m³ až 9056 m³; Ragaglini et al., 2014; Mast et al., 2014). V porovnání s jinými alternativními plodinami (krmný šťovík, proso prutnaté či chrastice rákosovitá), jejichž hektarová produkce methanu se pohybuje v rozmezí 1172 až 2753 m³ (Mast et al., 2014), je produkce methanu z hektaru technického konopí stále vyšší.

5.1.3 Rychlost produkce bioplynu

Součástí kapitol 4.1 a 4.2 je stanovení rychlosti tvorby bioplynu, která vyjadřuje dobu, za kterou dojde ke vzniku 80 % (T80), respektive 90 % (T90) bioplynu. Stanovení této rychlosti úzce souvisí se specifickou a kumulativní produkcí bioplynu.

Rychlost produkce bioplynu stanovená u různých trav se pro T80 pohybovala v rozmezí 9 – 11 dnů, pro T90 byla v rozmezí 12 – 18 dnů. Rychlost T80 byla shodná s Haklem et al. (2012), avšak pro T90 byla zjištěna rychlejší produkce bioplynu v porovnání s výše diskutovanými autory, kteří ve své studii uvádějí rychlost T90 v rozmezí 15 – 20 dnů. V našem experimentu tak došlo k rychlejší produkci bioplynu ze sledovaných materiálů, která může například souviset s použitou úpravou materiálu. Při porovnání s rychlostí T90 u kukuřice (10 dnů; Mast et al., 2014) je námi zjištěná rychlost produkce bioplynu stále pomalejší. Parametr T80 i T90 je u rostlin technického konopí v porovnání s trávami daleko pomalejší. Hodnota T80 se u rostlin technického konopí pohybovala v rozmezí od 17 do 27 dnů, respektive pro T90 se tato hodnota pohybovala v rozmezí od 27 do 35 dnů. Obdobné genexe tvorby 80 % bioplynu byly pro rostliny technického konopí prokázány experimentem Kreuger et al. (2011). Současně byla během pokusu s technickým konopím zjištěna inhibice produkce bioplynu fenolickými látkami, kterou popsali Kortekass et al. (1995). Tyto fenolické látky vznikají během vývoje rostlin konopí a prokazatelně znamenaly zpomalení rychlosti formování bioplynu u druhé vývojové fáze rostlin. Parametr T80 dosáhl v tomto případě hodnoty 26 – 27 dnů, respektive T90 dosáhl hodnoty 33 až 35 dnů. Z porovnání těchto hodnot u různých travních materiálů (u kterých se hodnota parametru T80 i T90 pohybovala v rozmezí od 9 do 18 dnů) jsou patrné téměř dvojnásobné rychlosti formování bioplynu pro anaerobní digesci technického

konopí. Při porovnání rychlosti s dobře rozložitelnou kukuřicí je pak zřejmé, že travní materiály mohou dosahovat obdobných rychlostí tvorby bioplynu. Při aplikaci v reálném provozu v BPS pak pomalejší geneze bioplynu z technického konopí (v některých případech i travních materiálů) mohou znamenat vyšší nároky na dobu zdržení materiálu v anaerobním reaktoru.

5.1.4 Sledování vlivu teploty skladování na výtěžnost bioplynu

V rámci experimentu s různými druhy trav byl sledován vliv teploty skladování čerstvé biomasy na produkci bioplynu, respektive na zastoupení methanu. Skladování při teplotě pod bodem mrazu (-18 °C) mělo pozitivní vliv na výtěžnost bioplynu, jelikož takto upravené materiály vykázaly statisticky významně vyšší produkci bioplynu z intenzivně obhospodařovaného hřišťového trávníku (0,61 m³ z kg sušiny) oproti ostatním variantám. U extenzivně obhospodařovaného parkového trávníku nebyl vliv tohoto způsobu skladování statisticky průkazný. U varianty skladované při -18 °C byla stanovena produkce bioplynu 0,47 m³/kg sušiny, stejně jako u sušené varianty skladované při teplotě 35 °C. Vyšší produkce bioplynu, respektive methanu u úpravy mražením, byla pravděpodobně způsobena dezintegrací buněk díky přeměně vody obsažené v rostlinné matrici na led (Montusiewicz et al., 2010). Po rozmražení se tak zvýšila přístupnost organického podílu mikroorganismům (Jan et al., 2008). Tento efekt se následně projevil intenzivnější enzymatickou hydrolýzou, díky které se zvýšila produkce bioplynu, respektive methanu (Bundhoo et al., 2015).

5.2. Aplikace inovativních metod úpravy kapalné frakce fermentačního zbytku

5.2.1 Aplikace nitrifikace pro úpravu kapalné frakce fermentačního zbytku

Experimenty zaměřené na nitrifikaci kapalné frakce fermentačního zbytku měly za cíl ověřit možnost iniciace a dlouhodobého udržení nitrifikačního procesu v těchto extrémních podmínkách (podkapitola 4.3, 4.4 a 4.5).

Proces nitrifikace v prostředí kapalné frakce fermentačního zbytku byl simulován v laboratorních podmínkách s využitím modelu fungujícího na principu tzv. směšovací aktivace (CSTR – Completely Stirred Tank Reactor). Tento systém je výhodný vzhledem ke stabilitě podmínek panujících v reaktoru a k minimalizaci inhibičních vlivů, kterým je vystavena nitrifikační biomasa (Chudoba et al., 1991; Švehla et al., 2014). V první etapě provozu trvající 55 dnů byl reaktor provozován bez regulace hodnoty pH, přičemž objem reaktoru činil 1,5 litru. Následně došlo v rámci druhé etapy trvající 90 dnů k zavedení regulace pH a

k využití laboratorního reaktoru o objemu 5 litrů. Již během prvních dnů první etapy provozu reaktoru došlo v důsledku nitrifikace k rychlému nárůstu koncentrace dusičnanů, kdy druhý den byla zjištěna koncentrace N-NO_3^- 250 mg/l. Za tři týdny tato hodnota dosáhla 1540 mg/l. Takto rychlý průběh iniciace nitrifikace je ve shodě s Pacek et al. (2016) či Švehla et al. (2014). Nevýhodou průběhu procesu nitrifikace bez redukce pH však byly stále vysoké koncentrace N-amon na odtoku dosahující 1000 – 1250 mg/l (graf č. 1, podkapitola 4.3; obrázek č. 1A, podkapitola 4.4). Účinnost převedení N-amon na oxidované formy tak byla pouze 60 %, mezi 40. a 50. dnem první etapy se účinnost pohybovala kolem 67 – 68 %. Tato hodnota je blízká hodnotám dosaženým v publikaci Botheju et al. (2010) zaměřující se na nitrifikaci digestátu v systému SBR (Sequencing Batch Reactor). Autoři uvádějí 75 % účinnost převedení N-amon na N-NO_3^- . Tato účinnost je ve shodě s výsledky získanými při testech zaměřených na nitrifikaci kalové vody (Švehla et al., 2010). Odtokové charakteristiky reaktoru byly v rámci první etapy značně nestabilní. To platí v první řadě pro hodnotu pH, která v určitých fázích provozu reaktoru klesala až na 5,2. To je samozřejmě vhodné z hlediska minimalizace úniků amoniaku při skladování fugátu, jeho aplikaci na půdu či následném tepelném zahušťování. Na druhou stranu výkyvy v hodnotě pH způsobovaly dramatickou fluktuaci koncentrace toxických forem dusíku, zejména koncentrace nedisociovaného amoniaku a volné kyseliny dusité (FNA, free nitrous acid), které inhibovaly aktivitu nitrifikačních organismů, zejména NOB. Proto došlo k nekontrolovanému nárůstu koncentrace toxických dusitanů až ke koncentracím N-NO_2^- 1000 mg/l. To samozřejmě vedlo k dalšímu nárůstu koncentrace volné kyseliny dusité (13,8 mg/l po třech týdnech, následně až 30,9 mg/l). Tento nárůst pak znamenal inhibici celého procesu nitrifikace. Anthonisen et al. (1976) uvádějí, že inhibice volnou kyselinou dusitou může nastat již při její koncentraci pohybující se v rozmezí od 0,2 do 2,8 mg/l a například Vadivelu et al. (2006a) zjistili, že inhibice může nastat dokonce při koncentraci 0,037 mg/l. V našem provozu tak tedy došlo k několikanásobnému překročení těchto koncentrací, které následně vyvolalo potlačení aktivity NOB a následně i odolnějších AOB, což je ve shodě s Vadivelu et al. (2006b). Z těchto důvodů byla první etapa provozu reaktoru v této fázi ukončena.

Na základě zkušeností z první etapy se v rámci druhé etapy za účelem stabilizace nitrifikačního procesu přikročilo k regulaci nitrifikace pomocí úpravy pH přidavkem NaOH. Ihned po zahájení provozu reaktoru, v rámci této etapy, došlo opět k rychlému nárůstu koncentrace dusičnanů, což je i v tomto případě ve shodě Pacek et al. (2016) či Švehla et al. (2014), avšak koncentrace dusitanů během celé této etapy provozu nepřekročila 30 mg/l. Ustálení hodnoty pH nejprve na hodnotě 7,0 (prvních 60 dnů etapy), později 6,5 (následujících

30 dnů, viz podkapitoly 4.3 a 4.4) se pozitivně projevilo na odtokových charakteristikách, kdy více než 99 % vstupního N-amon bylo převedeno do oxidovaných forem. V porovnání s nekontrolovanou fází procesu v první etapě v tomto případě, díky stabilním podmínkám panujícím v reaktoru, nedošlo k potlačení aktivity NOB bakterií a vedlo k účinné transformaci N-amon na N-NO_3^- . Odtokové charakteristiky nitrifikačního reaktoru jsou detailněji vyhodnoceny v podkapitole 4.5, přičemž na odtoku se vyskytují velice nízké koncentrace N-amon (5,9 mg/l) i N-NO_2^- (0,34 mg/l) při koncentraci N-NO_3^- dosahující průměrně 5 650 mg/l.

5.2.2 Úprava kapalné frakce fermentačního zbytku s využitím tepelného zahušťování

Podkapitoly 4.3, 4.4 a 4.5 se věnují problematice tepelného zahušťování kapalné frakce fermentačního zbytku, jelikož tato metoda efektivně řeší možnost snížení objemu surového fugátu a zakoncentrování v něm obsažených živin. Vedlejším produktem tepelného zahušťování je destilační zbytek neboli destilát. Prvotní úprava pH surového fugátu do kyselých hodnot přidávkem kyseliny sírové potvrdila snižující se intenzitu volatilizace N-amon během jeho tepelného zahušťování. Okyselení surového fugátu do nízkých hodnot pH (5,0 a 4,0) vedlo k zakoncentrování N-amon v tepelně zahuštěném produktu. Tímto způsobem bylo zakoncentrováno až 90 % amoniakálního dusíku. Na druhou stranu vyšší hodnota pH (6,0) vedla k akumulaci pouze 63 až 74 % N-amon v zahuštěném produktu, přičemž 7 – 14 % původního N-amon bylo analyzováno v destilačním zbytku. Tento úbytek množství N-amon v zahuštěném fugátu je nesporně způsoben křehkou rovnováhou mezi volným amoniakem a jeho iontovou podobou, jejichž zastoupení je závislé na hodnotě pH (Hadj et al., 2009). K podobnému výsledku dospěli i Chiumenti et al. (2013), kteří se ve své studii věnovali okyselování fugátu přidávkem 35 % kyseliny sírové až do hodnoty pH 3,5 s následným tepelným zahuštěním. Ve své studii zjistili, že při pH 3,5 dochází k zakoncentrování až 99,2 % N-amon v tepelně zahuštěném fugátu. Pouze 0,8 % amoniakálního dusíku stanovili ve vzniklém destilátu. Velmi podobných hodnot blížících se zakoncentrování N-amon do zahuštěného fugátu, respektive zanedbatelnému přechodu amoniaku do vzniklého destilátu, bylo dosaženo pomocí tepelného zahušťování nitrifikovaného fugátu s hodnotou pH 6,1. Tyto výsledky jsou uvedeny v podkapitole 4.5. Důsledkem dvoustupňového systému nitrifikace-tepelné zahušťování došlo k efektivnímu převedení N-amon do N-NO_3^- . V nitrifikovaném fugátu bylo obsaženo pouze 0,2 % původního N-amon, z tohoto množství pak díky následnému tepelnému zahuštění přešlo do destilátu pouze 40 % N-amon, což je méně než 0,1 % procenta N-amon obsaženém v surovém fugátu před zahuštěním.

V podkapitole 4.5 byly vedle koncentrací jednotlivých forem dusíku publikovány i hodnoty chemické spotřeby kyslíku (CHSK), konduktivity a hodnoty pH pro jednotlivé frakce systému nitrifikace-tepelné zahušťování. Během nitrifikace dochází v důsledku aerobní oxidace organických látek ke změně obsahu CHSK. To bylo pozorováno poklesem hodnoty CHSK z 12 000 mg/l na 2 400 mg/l, následné tepelné zahušťování pak znamenalo nárůst na hodnotu 10 900 mg/l. Obdobných nárůstů koncentrací bylo dosaženo i u koncentrace N-NO₃⁻, což je důležité z pohledu zakoncentrování živin. Snahou o efektivní zakoncentrování živin v prostředí fugátu se věnovalo několik vědeckých studií (Bonmatí et Flotats, 2003; Bonmatí et al., 2003, Chiumenti et al., 2013 či Li et al., 2016; Khan et Nordberg, 2018), avšak s využitím různých úprav bez aplikace předchozí nitrifikace. Khan et Norberg (2018) ve své studii uvádějí, že membránovými procesy je možné zakoncentrovat N-amon i prvky jako fosfor či síra do dvojnásobných koncentrací, přičemž vzniklý permeát je možné využívat jako technologickou vodu v rámci provozu BPS. Zakoncentrování živin výše uváděnými postupy (odpařování, membránové procesy) je efektivní z pohledu snížení objemu surových materiálů, avšak dostatečně neřeší například problematiku omezení volatilizace N-amon při následném tepelném zahuštění (Risberg et al., 2017; Li et al., 2016) či přítomnost vyšších koncentrací NMK při aplikaci na půdu (Botheju et al., 2010).

5.2.3 Koncentrace rizikových prvků a nižších mastných kyselin v jednotlivých stupních úpravy kapalné frakce fermentačního zbytku

V podkapitole 4.3 jsou publikovány analýzy obsahů vybraných rizikových prvků před procesem nitrifikace u surového fugátu přicházejícího do nitrifikačního reaktoru a též v jeho odtoku, který vyjadřuje tyto charakteristiky v průběhu jeho provozování (tabulka 5, podkapitola 4.3). V rámci srovnání bylo zjištěno, že vlastní nitrifikací nedošlo k významným změnám v koncentracích těchto prvků. Problematika rizikových prvků je současně uvedena v podkapitole 4.3 v kontextu legislativních požadavků jak České republiky, tak i dalších států. Pokud budeme uvažovat o využití ať už nitrifikovaného fugátu, případně i v kombinaci s tepelným zahuštěním, je třeba bezpodmínečně splnit legislativní podmínky České republiky vyplývající vyhlášky č. 131/2014 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva, případně z vyhlášky č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. Možnost zařazení tepelného zahuštění například na 50 % původního objemu nepřichází v úvahu u takových fermentačních zbytků, jejichž koncentrace rizikových prvků bude na minimálně 50 % koncentrace stanovené ve výše uváděných vyhláškách. Z tohoto pohledu je tak důležité

důsledně sledovat kvalitu vstupních materiálů, která se následně odráží v kvalitě vznikajícího fugátu (Li et al., 2018; Risberg et al., 2017).

V podkapitole 4.5 byla řešena problematika obsahu NMK v systému nitrifikace-tepelné zahušťování a jejich přechod mezi jednotlivými produkty tohoto dvoustupňového systému. Koncentrace NMK se odvíjí od kvality vstupních surovin (Li et al., 2018; Risberg et al., 2017) a také závisí na vlastní technologii a řízení anaerobního procesu (Ahring et al., 1995). V našem případě došlo díky aerobní oxidaci k rozkladu 98,6 % všech NMK obsažených v surovém fugátu na cca 70 mg/l. Pokles koncentrace NMK je dobře dokumentován u nitrifikace odpadních vod, kde NMK slouží jako zdroj uhlíku pro heterotrofní nitrifikační bakterie (Zheng et al., 2018; Lee et al., 2014). Tento pokles obsahů NMK je důležitý při aplikaci fugátů s vysokými koncentracemi NMK, před kterými varují například Hjorth et al. (2010). Ty se při správném chodu anaerobního reaktoru zpravidla pohybují v rozmezí od 100 mg/l do 300 mg/l (Zhang et al., 2012; Maldaner et al., 2018; Lehtomäki et al., 2007), avšak v extrémních případech může tato koncentrace dosáhnout 15 000 až 20 000 mg/l (Banks et al., 2011; Zhang et al., 2012). Jejich zvýšené koncentrace pak vedou k vyšší mobilitě rizikových prvků v půdě díky poklesu hodnoty pH (Zygmunt et Banel, 2009). Vedlejší benefit nitrifikace tak nespočívá pouze v převedení N-amon do N-NO₃⁻, ale vede i k omezení problémů souvisejících s koncentrací NMK a jejich následnou aplikací ať už v surové či zahuštěné formě.

6. Závěr

V krátkém rozmezí let 2008 až 2012 došlo k intenzivnímu budování zemědělských BPS. Tato zařízení byla instalována zejména ve snaze o zvýšení podílu energie vyrobené z obnovitelných zdrojů energie. S masivním rozvojem těchto technologií však vyvstávají různé problémy, kterým v době výstavby BPS nebyla věnována patřičná pozornost. V řadě případů je možno očekávat nedostatek vhodného substrátu pro výrobu bioplynu. Ještě větším problémem může být obrovská produkce fermentačního zbytku. Manipulace s tímto zbytkem je spojena s nejrůznějšími technickými a environmentálními problémy. V rámci této disertační práce byla komplexně řešena problematika optimalizace produkce bioplynu v BPS právě z těchto dvou významných úhlů pohledu.

První část výzkumu se věnovala využití alternativních plodin jakožto potenciální náhrady kukuřice využívané v dnešní době pro produkci bioplynu jako dominantní cíleně pěstované plodiny. V našich publikovaných příspěvcích jsme potvrdili, že má smysl uvažovat o využití alternativních materiálů – travních odpadů či technickém konopí. Bylo prokázáno, že produkce bioplynu z intenzivně obhospodařovaných travníků ($0,55 - 0,64 \text{ m}^3 \text{ z kg OS}$) i extenzivně obhospodařovaných parků ($0,33 - 0,53 \text{ m}^3 \text{ z kg OS}$), v řadě případů dosahuje obdobných hodnot jako silážní kukuřice ($0,45$ až $0,70 \text{ m}^3 \text{ z kg OS}$). Specifická produkce bioplynu z technického konopí ($0,48 - 0,58 \text{ m}^3 \text{ z kg OS}$) je sice oproti hnojené trávě nižší, avšak i zde platí, že dosahuje hodnot na spodní hranici rozsahu typického pro silážní kukuřici.

Druhá část výzkumu byla zaměřena na dvoustupňovou úpravu fugátu postupem nitrifikace-tepelné zahušťování, přičemž reflektuje aktuální problémy spojené s nadměrnou produkcí fermentačního zbytku a nutností řešení situace spojené s jeho zpracováním při současném dodržení všech legislativních předpisů. Bylo prokázáno, že nitrifikaci lze účinně aplikovat i v extrémním prostředí fugátu, které je charakteristické vysokými koncentracemi N-amon i dalších látek. Účinnost převedení N-amon na N-NO_3^- může v těchto podmínkách dosahovat až 100 %, což je žádoucí z hlediska minimalizace ztrát dusíku při manipulaci s fugátem. Dlouhodobým pokusem bylo zjištěno, že v prostředí fugátu je možné účinně snížit hodnotu pH až na 5,0, avšak tyto výsledky zatím nebyly publikovány.

Zároveň bylo prokázáno, že zařazení tepelného zahušťování vede v kombinaci s předešlou nitrifikací fugátu k efektivnímu zakoncentrování živin při minimální intenzitě úniku amoniaku do destilátu. Destilát je pak možno využít v rámci BPS jako procesní vodu.

Zde je však třeba brát v potaz, že zařazení tepelného zahušťování je možné pouze při úpravě takového fugátu, jehož parametry splní i po této úpravě legislativou stanovené limity koncentrací rizikových prvků a dalších polutantů.

7. Použitá literatura

- Adamovičs, A., Dubrovskis, V., Platače, R. 2014. Productivity of industrial hemp and its utilisation for anaerobic digestion. In: Brebbia, C.A., Magagaril, E.R., Khodorovsky M.Y. (eds.) Energy Production and Management in the 21st Century. WIT Press. Great Britain. p. 1045-1055. ISBN: 978-1-84564-816-9.
- Ahring, B. K., Sandberg, M., Angelidaki, I. 1995. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43 (3). 559-565.
- Al Seadi, T., Rutz, D., Prassl, H., Köttner, M., Finsterwalder, T., Volk, S., Janssen, R. 2008. Biogas handbook. University of Southern Denmark Esbjerg. Niels Bohrs Vej 9 – 10, DK - 6700 Esbjerg, Denmark. p. 125. ISBN: 978-87-992962-0-0.
- Al Seadi, T., Drog, B., Fuchs, W., Rutz, D., Janssen, R. 2013. Biogas digestate quality and utilization. In: Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D. (eds.). *The Biogas Handbook - Science, production and applications*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge. p. 267-301. ISBN: 9780857094988.
- Albuquerque, J. A., de la Fuente, C., Campoy, M., Carrasco, L., Nájera, I., Baixauli, C., Caravaca, F., Roldán, A., Cegarra, J., Bernal, M. P. 2012a. Agricultural use of digestate for horticultural crop production and improvement of soil properties. *European Journal of Agronomy*. 43. 119-128.
- Albuquerque, J. A., De la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M. P. 2012b. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy*. 40. 181-189.
- Ambye-Jensen, M., Johansen, K. S., Didion, T., Kádár, Z., Schmidt, J. E., Meyer, A. S. 2013. Ensiling as biological pretreatment of grass (*Festulolium Hykor*): The effect of composition, dry matter, and inocula on cellulose convertibility. *Biomass and Bioenergy*. 58. 303-312.
- Anthonisen, A., Loehr, R., Prakasam, T., Srinath, E. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 48 (5). 835-852.
- Anwar, S. W., Tao, W. 2016. Cost benefit assessment of a novel thermal stripping - acid absorption process for ammonia recovery from anaerobically digested dairy manure. *Water Practactice & Technology*. 11 (2). 355-364.

- Archer, D. B., Robertson, J. A., Peck, M. W. 1988. Microbiology and biochemistry of biogas production from solid waste. In: Landfill Gas and Anaerobic Digestion of Solid Waste. Harwell Lab. Oxfordshire. p. 393-405. ISBN: 070581159X.
- Bamelis, L., Blancke, S., Camargo-Valero, M. A., De Clercq, L., Haumont, A., De Keulenaere, B., Delvigne, F., Meers, E. Michels, E., Ramirez-Sosa, D. R., Ross, A. B., Smeets, H., Tarayre, C., Tarayre, N., Williams, P. T. 2015. Techniques for nutrient recovery from digestate derivatives. BIOREFINE. p. 42.
- Banks, C. J., Chesshire, M., Heaven, S., Arnold, R. 2011. Anaerobic digestion of source-segregated domestic food waste: Performance assessment by mass and energy balance. *Bioresource Technology*. 102. 612-620.
- Batstone, D. J., Keller, J., Angelidaki, I., Kalyuzhnyi, S., Pavlostathis, S. G., Rozzi, A. 2002. The IWA anaerobic digestion model N81 (ADM1). *Water, Science and Technology*. 45. 65-73.
- Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J. 2008. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. *Biodegradation*. 19. 303-312.
- Bolzonella, D., Fatone, F., Gottardo, M., Frison, N. 2018. Nutrients recovery from anaerobic digestate of agro-waste: Techno-economic assessment of full scale applications. *Journal of Environmental Management*. 216. 111-119.
- Bonmatí, A., Campos, E., Flotats, X. 2003. Concentration of pig slurry by evaporation: Anaerobic digestion as the key process. *Water Science and Technology*. 48 (4). 189-94.
- Bonmatí, A., Flotats, X. 2003. Pig slurry concentration by vacuum evaporation: Influence of previous mesophilic anaerobic digestion process. *Journal of the Air and Waste Management Association*. 53 (1). 21-31.
- Borja, R., Sánchez, E., Weiland, P. 1996. Influence of ammonia concentration on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Process Biochemistry*. 31 (5). 477-483.
- Bosca, I., Karus, M., 1997. The cultivation of hemp: Botany, varieties, cultivation and harvesting. *Hemptech*. Sebastopol. California. p. 184. ISBN: 1886874034.
- Botheju, D., Svalheim, Ø., Bakke, R. 2010. Digestate nitrification for nutrient recovery. *The Open Waste Management Journal*. 3. 1-12.
- Brandon, S. K., Eiteman, M. A., Patel, K., Richbourg, M. M., Miller, D. J., Anderson, W. F. 2008. Hydrolysis of Tifton 85 bermudagrass in a pressurized batch hot water reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83. 505-512.

- Bruno, J. C., Ortega-López, V., Coronas, A. 2009. Integration of absorption cooling systems into micro gas turbine trigeneration systems using biogas: Case study of a sewage treatment plant. *Applied Energy*. 86. 837-847.
- Bühle, L., Hengsen, F., Donnison, I., Heinsoo, K., Wachendorf, M. 2012. Life cycle assessment of the integrated generation of solid fuel and biogas from biomass (IFBB) in comparison to different energy recovery, animal-based and nonrefining management systems. *Bioresource Technology*. 111. 230-239.
- Bundhoo, Z. M. A., Mohee, R., Hassan, A. M. 2015. Effect of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*. 157. 20-48.
- Carlsson, M., Lagerkvist, A., Morgan-Sagastume, F. 2012. The effects of substrate pre-treatment on anaerobic digestion systems: A review. *Waste Management*. 32. 1634-1650.
- Carrère, H., Monlau, F., Barakat, A., Dumas, C., Steyer, J. 2011. Biogas from lignocellulosic biomass: Interest of pretreatments. In: *Progress in Biogas II – Biogas production from agricultural biomass and organic residues*. FnBB. Stuttgart-Hohenheim. p. 83-88. ISBN: 3940706027.
- Ciccoli, R., Sperandei, M., Petrazzuolo, F., Broglia, M., Chiarini, L., Correnti, A., Farneti, A., Pignatelli, V., Tabacchioni, S. 2018. Anaerobic digestion of the above ground biomass of Jerusalem Artichoke in a pilot plant: Impact of the preservation method on the biogas yield and microbial community. *Biomass and Bioenergy*. 108. 190-197.
- Cirne, D. G., Lehtomäki, A., Björnsson, L., Blackall, L. L. 2007. Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*. 103. 516-527.
- CZBA. 2018. Statistika výroby bioplynu [online]. CZBA. 2018 [cit. 2018-06-10]. Dostupné z <<http://www.czba.cz/statistiky-vyroby-bioplynu.html>>.
- Český statistický úřad. Definitivní údaje o sklizni zemědělských plodin - 2017. [online]. Český statistický úřad 16. února 2018 [cit. 2018-07-05]. Dostupné z <<https://www.czso.cz/csu/czso/definitivni-udaje-o-sklizni-zemedelskych-plodin-2017>>.
- Davis, L. M., Cornwell, A. D. 1998. *Introduction to environmental engineering*. 3rd edition. New York. p. 223. ISBN: 0071152342.
- Davis, L. M. 2010. *Water and wastewater engineering*. McGraw-Hill. New York. p. 1296. ISBN: 9780071713856.

- DeBruyn, J., Hilborn, D. 2007. Anaerobic digestion basics. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Ontario. p. 7.
- Delgenés, J. P., Penaud, V., Moletta, R. 2002. Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes Chapter 8. p. 201-228. In: Mata-Alvarez, J. 2002. Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA Publishing. Cornwall. p. 336. ISBN: 9781900222143.
- Demirel, B., Scherer, P. 2008. Production of methane from sugar beet silage without manure addition by a single-stage anaerobic digestion process. *Biomass and Bioenergy*. 32. 203-209.
- Dennehy, C., Lawlor, P. G., McCabe, M. S., Cormican, P., Sheahan, J., Jiang, Y., Zhan, X., Gardiner, G. E. 2018. Anaerobic co-digestion of pig manure and food waste; Effects on digestate biosafety, dewaterability, and microbial community dynamics. *Waste Management*. 71. 532-541.
- Dewar, W. A., McDonald, P., Whittenbury, R. 1963. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 14. 411-417.
- Diltz, R. A., Marolla, T. V., Henley, M. V., Li, L. 2007. Reverse osmosis processing of organic model compounds and fermentation broths. *Bioresource Technology*. 98. 686-695.
- Divya, D., Gopinath, L. R., Christy, P. M. 2014. A review on trends issues and prospects for biogas production in developing countries. *International Research Journal of Environmental Sciences*. 3 (1). 62-69.
- Divya, D., Gopinath, L. R., Christy P. M. 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42. 690-699.
- Dohányos, M., Zábranská, J., Jeníček, P., Fialka, P., Kajan, M. 1998. Anaerobní čistírenské technologie. 1.vyd. Noel 2000. Brno. 343 s. ISBN 80-86020-19-3.
- Dohányos, M., Zábranská, J. 2002. Bioplyn – teorie, výroba, využití. In: Možnosti výroby a využití bioplynu v České republice. CZ BIOM. Praha. Třeboň. 98 s. ISBN: 80-238-9402-1.
- Dohányos, M., Šmejkalová, P. 2006. Biotechnologie v ochraně životního prostředí. VŠCHT. Praha. 124 s.
- Dohányos, M. Anaerobní reaktor není černou skřínkou - teoretické základy anaerobní fermentace. [online]. BIOM 17. listopadu 2008 [cit. 2018-07-15]. Dostupné z: <<https://biom.cz/cz/odborne-clanky/anaerobni-reaktor-neni-cernou-skrinkou-teoreticke-zaklady-anaerobni-fermentace> >.

- Drosg, B., Fuchs, W., Al Seadi, T., Madsen, M., Linke, B. 2015. Nutrient recovery by biogas digestate processing. In: Baxter, D. (ed.). IEA Bioenergy, Task 37 - Energy from Biogas. IEA Bioenergy. Esbjerg. p. 11. ISBN: 978910154168.
- Duin, E. C., Mckee, M. L. 2008. A new mechanism for methane production from methyl-coenzyme M reductase as derived from density functional calculations. *Journal of Physical Chemistry*. 112. 2466-2482.
- Dumitru, M. 2014. Studies concerning the utilisation of digestate in biogas plants. *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development*. 14 (1). 115-120.
- Emery, I. R., Mosier, N. S. 2012. The impact of dry matter loss during herbaceous biomass storage on net greenhouse gas emissions from biofuels production. *Biomass and Bioenergy*. 39. 237-246.
- European Biomass Association. 2018. AEBIOM statistical report 2017: European Bioenergy Outlook. AEBIOM. Brussels. p. 264.
- Fechter, M., Kraume, M. 2016. Digestate treatment techniques. *Technical Transactions*. 113 (1). 95–106.
- Fernandes, J., Perez, M., Romero, L. I. 2008. Effect of substrate concentration on dry mesophilic anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFSMW). *Bioresource Technology*. 99 (14). 6075-6080.
- Fuchs, W., Drosg, B. 2013. Assessment of the state of the art of technologies for the processing of digestate residue from anaerobic digesters. *Water Science and Technology*. 67 (9). 1984-1993.
- Gerardi, M. H. 2002. *Wastewater microbiology: Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. John Wiley & Sons. New York. p. 193. ISBN: 9780471065081.
- Gerardi, M. H. 2003. Toxicity. In: *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley & Sons. New Jersey. p. 105-115. ISBN: 9780471206934.
- Gerin, P. A., Vliegen, F., Jossart, J. M. 2008. Energy and CO₂ balance of maize and grass as energy crops for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 99 (7). 2620-2627.
- Gissén C., Prade, T., Kreuger, E., Nges, I. A., Rosenqvist, H., Svensson, S. E., Lantz, M., Mattsson, J. E., Börjesson, P., Björnsson, L. 2014. Comparing energy crops for biogas production – Yields, energy input and costs in cultivation using digestate and mineral fertilisation. *Biomass and Bioenergy*. 64. 199-210.

- Gómez, X., Cuetos M. J., García, A. I., Morán, A. 2005. Evaluation of digestate stability from anaerobic process by thermogravimetric analysis. *Thermochimica Acta*. 426 (1-2). 179-84.
- Gong, H., Yan, Z., Liang, K. Q., Jin, Z. Y., Wang, K. J. 2013. Concentrating proces of liquid digestate by disk tube-reverse osmosis system. *Desalination*. 326. 30-36.
- Govasmark, E., Ståb, J., Holen, B., Hoornstra, D., Nesbakk, T., Salkinoja-Salonen, M. 2011. Chemical and microbiological hazards associated with recycling of anaerobic digested residue intended for agricultural use. *Waste Management*. 31 (12). 2577-2583.
- Gunnarson, S., Malmberg, A., Mathisen, B., Theander, O., Thyselius, L., Wünsche, U. 1985. Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) for biogas production. *Biomass*. 7. 85-97.
- Guštin, S., Marinšek-Logar, R. 2011. Effect of pH, temperature and air flow rate on the continuous ammonia stripping of the anaerobic digestion effluent. *Process Safety and Environmental Protection*. 89 (1). 61-66.
- Hadj, T. B. E., Astals, S., Gali, A., Mace, S., Mata-Alvarez, J. 2009. Ammonia influence in anaerobic digestion of OFMSW. *Water Science and Technology*. 59 (6). 1153-1158.
- Haigh, P. M., Parker, J. W. G. 1985. Effect of silage additives and wilting on silage fermentation, digestibility and intake, and on liveweight change of young cattle. *Grass and Forage Science*. 40. 429-436.
- Hakl, J., Fuksa, P., Habart, J., Šantrůček, J. 2012. The biogas production from lucerne biomass in relation to term of harvest. *Plant, Soil and Environment*. 58 (6). 289-294.
- Hansen, K. H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. 1998. Anaerobic digestion of swine manure: Inhibition by ammonia. *Water Resource*. 32. 5-12.
- Haraldsen, T. K., Andersen, U., Krogstad, T., Sørheim, R. 2011. Liquid digestate from anaerobic treatment of source-separated household waste as fertilizer to barley. *Waste Management and Research*. 29 (12). 1271-76.
- Harrison, M., Johns, M. R., White, E. T., Mehta, C. M. 2011. Growth rate kinetics for struvite crystallisation. *Chemical Engineering Transactions*. 25. 309-314.
- Hartmann, H., Angelidaki, I., Ahring, B. K. 2000. Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration. *Water Science and Technology*. 41 (3). 145-153.
- Hayes, T. D., Theis, T. L. 1978. The distribution of heavy metals in anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Federation*. 50 (1). 61-69.

- Heiermann, M., Plöchl, M., Linke, B., Schelle, H., Herrmann, C. 2009. Biogas Crops-Part I: Specifications and suitability of field crops for anaerobic digestion. *Agricultural Engineering International: The CIGR Ejournal*. 11. 1-17.
- Hendriks, A. T. W. M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100. 10-18.
- Hengsen, F., Richter, F., Wachendorf, M. 2011. Integrated generation of solid fuel and biogas from green cut material from landscape conservation and private households. *Bioresource Technology*. 102 (22). 10441-10450.
- Herrmann, A., Kage, H., Taube, F., Sieling, K. 2017. Effect of biogas digestate, animal manure and mineral fertilizer application on nitrogen flows in biogas feedstock production. *European Journal of Agronomy*. 91. 63-73.
- Heviánková, S., Kyncl, M., Kodymová, J. 2014. Study and research on cleaning procedures of anaerobic digestion products. *GeoScience Engineering*. 60 (4). 39-50.
- Hickey, R. F., Vanderwielen, J., Switzenbaum, M. S. 1989. The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Water Research*. 23 (2). 207-219.
- Hill, D. T., Taylor, S. E., Grift, T. E. 2001. Simulation of low temperature anaerobic digestion of dairy and swine manure. *Bioresource Technology*. 78 (2). 127-131.
- Hinken, L., Urban, I., Haun, E., Urban, I., Weichgrebe, D., Rosenwinkel, K. H. 2008. The valuation of malnutrition in the mono-digestion of maize silage by anaerobic batch tests. *Water Science and Technology*. 58 (7). 1458–1459.
- Hjorth, M., Christensen, K. V, Christensen, M. L., Sommer, S. G. 2010. Solid-liquid separation of animal slurry in theory and practice: A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 30. 153-180.
- Holloway, R. W., Childress, A. E., Dennett, K. E., Cath, T. Y. 2007. Forward osmosis for concentration of anaerobic digester centrate. *Water Research*. 41 (17). 4005-4014.
- Huber, H., Thomm, M., Konig, H., Theis, G., Stetter, K. O. 1982. *Methanococcus thermolithotrophicus*, a novel thermophilic lithotrophic methanogen. *Archives of Microbiology*. 132. 47-50.
- Hübner, M., Oechsner, H., Koch, S., Seggl, A., Hrenn, H., Schmiedchen, B., Wilde, P., Miedaner, T. 2011. Impact of genotype, harvest time and chemical composition on the methane yield of winter rye for biogas production. *Biomass and Bioenergy*. 35. 4316-4323.

- Chamy, R., Poirrier, P., Schiappacasse, M. C., Alkalay, D., Guerrero, L. 1998. Effect of ammonia content in the biodegradability of the salmon industry wastes. *Bioprocess Engineering*. 19. 1-5.
- Chen, R., Roos, M. M., Zhong, Y., Marsh, T., Roman, M. B., Ascencio, W. H., Uribe, L., Lorio, L. U., Kirk, D., Reinhold, D. M., Chavarria, J. A. M., Ruiz, D. B., Pereira, J. F. A., Montero, W. R., Srivastava, A., Liao, W. 2016. Responses of anaerobic microorganisms to different culture conditions and corresponding effects on biogas production and solid digestate quality. *Biomass and Biotechnology*. 85. 84-93.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 99 (10). 4044-4064.
- Chiumenti, A., Borso, F., Chiumenti, R., Teri, F., Segantin, P. 2013. Treatment of digestate from a co-digestion biogas plant by means of vacuum evaporation: Tests for process optimization and environmental sustainability. *Waste Management*. 33 (6). 1339-1344.
- Christy, P. M., Gopinath, L. R., Divya, D. 2014. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 34. 167-173.
- Chudoba, J., Wanner, J., Dohányos, M. 1991. *Biologické čištění odpadních vod*. SNTL. Praha. 465 s. ISBN: 8003006112.
- Chynoweth, P. D., Owens, J. M., Legrand, R. 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*. 22. 1-8.
- Isa, Z., Grusenmeyer, S., Verstraete, W. 1986. Sulfate reduction and relatively methane production in high-rate anaerobic digestion: Technical aspects. *Applied and Environmental Microbiology*. 51 (3). 572-578.
- Izdebski, W. 2009. Jerusalem artichoke - Potential and possibilities of use in power industry. *TEKA Commission of Motorization and Energetics in Agriculture*. 9. 93-98.
- Jain, S. K., Gujral, G. S., Jha, N. K., Vasudevan, P. 1992. Production of biogas from *Azolla pinnata* R.Br and *Lemna minor* L.: Effect of heavy metal contamination. *Bioresource Technology*. 41. 273-277.
- Jan, T. W., Aday, S. S., Lee, D. J., Wu, R. M., Su, A., Tay, J.-H. 2008. Hydrogen fermentation and methane production from sludge with pretreatments. *Energy and Fuels*. 22 (1). 98-102.
- Jiang, A., Zhang, T., Zhao, Q. B., Li, X., Chen, S., Frear, C. S. 2014. Evaluation of an integrated ammonia stripping, recovery, and biogas scrubbing system for use with anaerobically digested dairy manure. *Biosystems Engineering*. 119. 117-126

- Kahiluoto, H., Kuisma, M., Havukainen, J., Luoranen, M., Karttunen, P., Lehtonen, E., Horttanainen. 2011. Potential of agrifood wastes in mitigation of climate change and eutrophication – Two case regions. *Biomass and Bioenergy*. 35. 1983-1994.
- Kalyuzhnyi, S., Veeken, A., Hamelers, B. 2000. Two-particle model of anaerobic solid state fermentation. *Water Science and Technology*. 41. 43-50.
- Kandel, P. T., Sutaryo, S., Møller, B. H., Jørgensen, U., Lærke, P. E. 2013. Chemical composition and methane yield of reed canary grass as influenced by harvesting time and harvest frequency. *Bioresource Technology*. 130. 659-666.
- Kára, J., Hutla, P., Pastorek, Z. 2008. Využití organických odpadů ze zemědělské výroby a venkovských sídel. Metodická příručka Ministerstva zemědělství ČR. Výzkumný ústav zemědělské techniky. Praha. 102 s. ISBN: 978-80-86884-40-0.
- Kára, J., Pastorek, Z., Mazancová, J., Hanzlíková, I. 2009. New mixtures and technologies for biogas production at biogas plants of agricultural type processing livestock slurry. *Research in Agricultural Engineering*. 55 (2). 62-68.
- Kathijotes, N., Petrova, V., Zlatareva, E., Kolchakov, V., Marinova, S., Ivanov, P. 2015. Impacts of biogas digestate on crop production and the environment: A Bulgarian case study. *American Journal of Environmental Sciences*. 11 (2). 81-89.
- Kayhanian, M. 1994. Performance of a high-solids anaerobic digestion proces under various ammonia concentrations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 59. 1285-1292.
- Kayhanian, M., 1999. Ammonia inhibition in high-solids biogasification: An overview and practical solutions. *Environmental Technology*. 20. 355-365.
- Kays, S. J., Nottingham, S. F. 2008. Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: *Helianthus tuberosus* L. Taylor & Francis group, LLC. Boca Baton. p. 498. ISBN: 9781420044959.
- Khan, E. U., Nordberg, A. 2018. Membrane distillation proces for concentration of nutrients and water recovery from digestate reject water. *Separation and Purification Technology*. 206. 90-98.
- Kirkegaard, J., Christen, O., Krupinsky, J., Layzell, D. 2008. Break crop benefits in temperate wheat production. *Field Crops Research*. 107 (3). 185-195.
- Knoop, C., Dornack, C., Raab, T. 2018. Effect of drying, composting and subsequent impurity removal by sieving on the properties of digestate from municipal organic waste. *Waste Management*. 72. 168-177.

- Koçar, G., Civaş, N. 2013. An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 28. 900-916.
- Koch, K., Wichern, M., Lübken, M., Horn, H. 2009. Mono fermentation of grass silage by means of loop reactors. *Bioresource Technology*. 100. 5934-5940.
- Kolář, L., Kužel, S., Peterka, J., Borová-Batt, J. 2010. Agrochemical value of the liquid phase of wastes from fermenters during biogas production. *Plant, Soil and Environment*. 56 (1). 23-27.
- Kortekass, S., Soto, M., Vicent, T., Field, J. A., Lettinga, G. 1995. Contribution of extractives to methanogenic toxicity of hemp black liquor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80 (5). 383-388.
- Kosina, L. Využití odpadního tepla z bioplynové stanice. [online]. BIOM. 5. srpna 2013 [cit. 2018-06-30]. Dostupné z <<https://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-odpadniho-tepla-z-bioplynovy-stance>>.
- Koszel, M., Lorencowicz, E. 2015. Agricultural use of biogas digestate as a replacement fertilizers. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 7. 119-124.
- Kothari, R., Pandey, A. K., Kumar, S., Tyagi, V. V., Tyagi, S. K. 2014. Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 39. 174-195.
- Koutný, R. Využití tepla z bioplynové stanice. [online]. *Zemědělec*. 18. května 2013 [cit. 2018-06-26]. Dostupné z <<https://zemedelec.cz/vyuziti-tepla-z-bioplynovy-stance/>>.
- Kowalczyk-Juśsko, A., Józwiakovski, K., Gizińska, M., Zarajczyk, J. 2012. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as renewable energy raw material. *TEKA Commission of Motorization and Energetics in Agriculture*. 12 (2). 177-121.
- Kratochvílová, Z., Habart, J., Sladký, V., Jelínek, F., Rosenberg, T., Stupavský, V., Dvořáček, T. 2009. Průvodce výrobou využitím bioplynu 3.vyd. CZ Biom. Praha. 157 s. ISBN: 978-80-903777-5-2.
- Kreuger, E., Prade, T., Escobar, F., Svensson S.-E., Englund, J.-E., Björnsson, L. 2011. Anaerobic digestion of industrial hemp – Effect on harvest time on methane energy yield. *Biomass and Bioenergy*. 35 (2). 893-900.
- Kuča, R., Obroučka, K. Možnosti zpracování obtížně využitelných organických odpadů procesem anaerobní digesce. [online]. BIOM 29. listopadu 2011 [cit. 2018-06-25]. Dostupné z <<https://biom.cz/cz/odborne-clanky/moznosti-zpracovani-obtizne-vyuzitelnych-organickyh-odpadu-procesem-anaerobni-digesce>>.

- Kulhánek, M., Balík, J., Černý, J., Sedlář, O., Vašák, F., 2016. Evaluating of soil sulphur forms changes under different fertilizing systems during long-term field experiments. *Plant, Soil and Environment*. 62 (9). 408-415.
- Lee, D. H., Behera, S. K., Kim, J., Park, H. S. 2009a. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: A lab scale study. *Waste Management*. 29. 876-882.
- Lee, M., Hidaka, T., Hagiwara, W., Tsuno, H. 2009b. Comparative performance and microbial diversity of hyperthermophilic and thermophilic co-digestion of kitchen garbage and excess sludge. *Bioresource Technology*. 100. 578-585.
- Lee, S. W., Chue, A. S. M., Yeoh, H. K., Ngoh, G. C. 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*. 235. 83-90.
- Lehtomäki, A., Huttunen, S., Rintala, J. A. 2007. Laboratory investigations on co-digestion of energy crops and crop residues with cow manure for methane production: Effect of crop to manure ratio. *Resources, Conservation and Recycling*. 51. 591-609.
- Lehtomäki, A., Huttunen, S., Lehtinen, T. M., Rintala, J. A. 2008. Anaerobic digestion of grass silage in batch leach bed processes for methane production. *Bioresource Technology*. 99 (8). 3267-3278.
- Lesteur, M., Bellon-Manuel, V., Gonzales, C., Latrille, E., Roger, J. M., Junqua, G., Steyer, J. P. 2010. Alternative methods for determining anaerobic biodegradability: A review. *Process Biochemistry*. 45. 431-440.
- Li, X., Guo, J., Dong, R., Ahring, B. K., Zhang, W. 2016. Properties of plant nutrient: Comparison of two nutrient recovery techniques using liquid fraction of digestate from anaerobic digester treating pig manure. *Science of the Total Environment*. 544. 774-781.
- Li, Y., Liu, H., Li, G., Luo, W., Sun, Y. 2018. Manure digestate storage under different conditions: Chemical characteristics and contaminant residuals. *Science of the Total Environment*. 639. 19-25.
- Lindmark, J., Thorin, E., Fdhila, R. B., Dahlquist, E. 2014. Effects of mixing on the result of anaerobic digestion: Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 40. 1030-1047.
- Long, X., Shao, H., Liu, L., Liu, L., Liu, Z. 2016. Jerusalem artichoke: A sustainable biomass feedstock for biorafinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 54. 1382-1388.
- Makádi, M., Tomócsik, A., Orosz, V. 2012. Digestate: A new nutrient source – review. In: Kumar, S. D. (ed.). *Biogas*. InTech. Rijeka. p. 295–310. ISBN: 9789535102045.

- Maldaner, L., Wagner-Riddle, C., VanderZaag, A. C., Gordon, R., Duke, C. 2018. Methane emissions from storage of digestate at a dairy manure biogas facility. *Agricultural and Forest Meteorology*. 258. 96-107.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G. 2015. Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 45. 540-555.
- Mast, B., Lemmer, A., Oechsner, H., Reinhard-Hanisch, A., Claupein, W., Graef-Hönniger, S. 2014. Methane yield potential of novel perennial biogas crops influenced by harvest date. *Industrial Crops and Products*. 58. 194-203.
- Mata-Alvarez, J., Mace, S., Llabres, P. 2000. Anaerobic digestion of organic wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*. 74. 3-16.
- McDonald, P., Henderson, A. R., Heron, S. J. E. 1991. *The biochemistry of silage*. Marlow. Bucks. p. 340. ISBN: 978-0948617225.
- McEniry, J., O'Kiely, P., Crosson, P., Groom, E., Murphy, J. D. 2011. The effect of feedstock cost on biofuel cost as exemplified by biomethane production from grass silage. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 5 (6). 670-682.
- McEniry, J., O'Kiely, P. 2013. Anaerobic methane production from five common grassland species at sequential stages of maturity. *Bioresource Technology*. 127. 143-150.
- Menardo, S., Bauer, A., Theuretzbacher, F., Piringner, G., Nilsen, P. J., Balsar, P. 2013. Biogas production from steam-exploded *Miscanthus* and utilization of biogas energy and CO₂ in greenhouses. *Bioenergy Research*. 6. 620-630.
- Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí. 2018. Metodický pokyn k zařazování chovů hospodářských zvířat podle zákona č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší, k výpočtu emisí znečišťujících látek z těchto stacionárních zdrojů a k seznamu technologií snižujících emise z těchto stacionárních zdrojů. 24 s.
- Meyer, A. K. P., Ehimen, E. A., Holm-Nielsen, J. B. 2014. Bioenergy production from roadside grass: A case study of the feasibility of using roadside grass for biogas production in Denmark. *Resources, Conservation and Recycling*. 93. 124-133.
- Molinuevo-Salces, B., Gómez, X., Morán, A., García-González M. C. 2013. Anaerobic co-digestion of livestock and vegetable processing wastes: Fibre degradation and digestate stability. *Waste Management*. 33 (6). 1332-1338.
- Montusiewicz, A., Lebiocka, M., Rozej, A., Zacharska, E., Pawlowski, L. 2010. Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. *Bioresource Technology*. 101 (10). 3466-3473.

- Mosey, F. E., Fernandes, X. A. 1989. Patterns of hydrogen in biogas from the anaerobic digestion of milk sugars. *Water Science and Technology*. 21. 187-196.
- Mosey, F. E., Hughes, D. A. 1975. The toxicity of heavy metal ions to anaerobic digestion. *Journal of Water Pollution and Control*. 74. 18-39.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzaple, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 96 (6). 673-686.
- Mulder, M. 1996. Basic principles of membrane technology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. p. 564. ISBN: 9780792342489.
- Mužik, O., Kára, J. Možnosti výroby a využití bioplynu v ČR. [online]. *Biom* 4. března 2009 [cit. 2018-05-20]. Dostupné z < <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/moznost-vyroby-a-vyuziti-bioplynu-v-cr> >.
- Nařízení vlády č. 235/2016 Sb., o stanovení zranitelných oblastí. In: *Sbírka zákonů*. 11. 7. 2016. ISSN: 1211-1244.
- Nařízení vlády č. 262/2012 Sb., o stanovení zranitelných oblastí. In: *Sbírka zákonů*. 4. 7. 2012. ISSN: 1211-1244.
- Neves, L., Goncalo, E., Oliveira, R., Alves, M. M. 2008. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. *Waste Management*. 28. 965-972.
- Nges, I. A., Escobar, F., Fu, X., Björnsson, L. 2012. Benefits of supplementing an industrial waste anaerobic digester with energy crops for increased biogas production. *Waste Management*. 32. 53-59.
- Nilsson, M.-L., Kylin, H., Sundin, P. 2000. Major extractable organic compounds in the biologically degradable fraction of fresh, composted and anaerobically digested household waste. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil Plant Science*. 50 (2). 57-65.
- Nkemka, V. N., Murto, M. 2010. Evaluation of biogas production from seaweed in batch tests and in UASB reactors combined with the removal of heavy metals. *Journal of Environmental Management*. 91. 1573-1579.
- Oleszek, M., Król, A., Tys, J., Matyka, M., Kulik, M. 2014. Comparison of biogas production from wild and cultivated varieties of reed canary grass. *Bioresource Technology*. 156. 303-306.

- Paavola, T., Rintala, J. 2008. Effects of storage on characteristics and hygienic quality of digestates from four co-digestion concepts of manure and biowaste. *Bioresource Technology*. 99. 7041-7050.
- Pacek, L., Švehla, P., Bartáček, J., Radechovský, J. 2016. Rapid achievement of nitrification in CSTR and SBR treating reject water at high ammonia levels. *Desalination and Water Treatment*. 57 (34). 15958-15969.
- Pahlow, G., Muck, R. E., Driehuis, F., Oude-Elferink, S. J. W. H., Spoelstra, S. F. 2003. Microbiology of ensiling. In: Buxton, D. R. (ed.). *Silage science and technology*. American Society of Agronomy. Madison. p. 31-93. ISBN: 0891181512130.
- Pakarinen, A., Majjala, P., Stoddard, F. L., Santanen, A., Tuomainen, P., Kymäläinen, M., Viikari, L. 2011. Evaluation of annual bioenergy crops in boreal zone for biogas and ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 35 (7). 3071-3078.
- Palmowski, L., Müller, J. 2000. Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. 41. 155-162.
- Pang, Y. Z., Liu, Y. P., Li, X. J., Wang, K. S., Yuan, H. R. 2008. Improving biodegradability and biogas production of corn stover through sodium hydroxide solid state pretreatment. *Energy Fuels*. 22 (4). 2761-2766.
- Parkin, G. F., Owen, W. F. 1986. Fundamentals of anaerobic-digestion of waste-water sludges. *Journal of Environmental Engineering-ASCE*. 112 (5). 867-920.
- Pastorek, Z., Kára, J., Jevič, P. 2004. *Biomasa: Obnovitelný zdroj energie*. FCC Public. Praha. 288 s. ISBN: 80-86534-06-5.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: An overview. *International Microbiology*. 5. 53-63.
- Petříková, V. Bioplyn – kukuřice – krmný šťovík. [online]. BIOM. 19. března 2012 [cit. 2018-05-10]. Dostupné z < <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplyn-kukurice-krmny-stovik> >.
- Phutela, U. G., Sahni, N., Sooch, S. S. 2011. Fungal degradation of paddy straw for enhancing biogas production. *Indian Journal of Science and Technology*. 4 (6). 660-665.
- Piepensneider, M., Bühle, L., Hensgen, F., Wachendorf, M. 2016. Energy recovery from grass of urban roadside verges by anaerobic digestion and combustion after pre-processing. *Biomass and Bioenergy*. 85. 278-287.

- Pobeheim, H., Munk, B., Johansson, J., Guebitz, G. M. 2010. Influence of trace elements on methane formation from a synthetic model substrate for maize silage. *Bioresource Technology*. 101. 836-839.
- Pobeheim, H., Munk, B., Lindorfer, H., Guebitz, G. M. 2011. Impact of nickel and cobal on biogas production and proces stability during semi-continous anaerobic fermentation of a model substrate for maize silage. *Water Research*. 45. 781-787.
- Pöschl, M., Ward, S., Owende, P. 2010. Evaluation of energy efficiency of various biogas production and utilization pathways. *Applied Energy*. 87. 3305-3321.
- Prade, T., Svensson, S. E., Andersson, A., Mattsson, J. E. 2011. Biomass and energy yields of industrial hemp grown for biogas and solid fuel. *Biomass and Bioenergy*. 35 (7). 3040-3049.
- Prochnow, A., Heiermann, M., Plöchl, M., Linke, B., Idler, C., Amon, T., Hobbs, P. J. 2009. Bioenergy from permanent grassland – A review: 1. Biogas. *Bioresource Technology*. 100 (21). 4931-4944.
- Qin, L., Liu, L., Wang, Z., Chen, W., Wei, D. 2018. Efficient resource recycling from liquid digestate by microalgae-yeast mixed culture and the assessment of key gene transcription related to nitrogen assimilation in microalgae. *Bioresource Technology*. 264. 90-97.
- Ragaglini, G., Dragoni, F., Simone, M., Bonari, E. 2014. Suitability of giang reed (*Arundo donax* L.) for anaerobic digestion: Effect of harvest time and frequency on the biomethane yield potential. *Bioresource Technology*. 152. 107-115.
- Reeves, T. G. 1972. Nitrogen removal: A literature review. *Water Pollution Control Federation*. 44 (10). 1895-1908.
- Rehl, T., Müller, J. 2011. Life cycle assessment of biogas digestate processing technologies. *Resources, Conservation and Recycling*. 56. 92-104.
- Risberg, K., Cederlund, H., Pell, M., Arthurson, V., Schnürer, A. 2017. Comparative characterization of digestate versus pig slurry and cow manure – Chemical composition and effects on soil microbial activity. *Waste Management*. 61. 529-538.
- Riva, C., Orzi, V., Carozzi, M., Acutis, M., Boccasile, G., Lonati, S., Tambone, F., D'Imporzano, G., Adani, F. 2016. Short-term experiments in using digestate products as substitutes for mineral (N) fertilizer: Agronomic performance, odours, and ammonia emission impacts. *Science of the Total Environment*. 547. 206-214.
- Ruifang, G., Xufeng, Y., Wanbin, Z., Xiofen, W., Shaojiang, Ch., Xu, Ch., Zongjun, C. 2012. Methane yield throught anaerobic digestion for various maize varieties in China. *Bioresource Technology*. 118. 611-614.

- Saveyn, H., Eder, P. 2014. End-of-waste criteria for biodegradable waste subjected to biological treatment (compost & digestate): Technical proposals - Final report. European Commission Joint Research Centre. Seville. p. 312.
- Seppälä, M., Antti, L., Rintala, J. 2013. Screening of novel plants for biogas production in northern conditions. *Bioresource Technology*. 139. 355-362.
- Shah, F. A., Mahmood, Q., Rashid, N., Pervez, A., Raja, I. A., Shah, M. M. 2015. Co-digestion, pretreatment and digester design for enhanced methanogenesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42. 627-642.
- Sheets, J. P., Yang, L., Ge, X., Wang, Z., Li, Y. 2015. Beyond land application: Emerging technologies for the treatment and reuse of anaerobically digested agricultural and food waste. *Waste Management*. 44. 94–115.
- Shin, H.-S., Kwon, J.-C. 1998. Degradation and interaction between organic concentrations and toxicity of 2,4,6 - trichlorophenol in anaerobic system. *Biotechnology Techniques*. 12 (1). 39-43.
- Schievano, A., Adani, F., Tambone, F., Imporzano, G. D., Scaglia, B., Genevini, P. L. 2009. What is the digestate? In: Adani, F., Schievano, A., Boccasile, G. (eds.). *Anaerobic digestion: Opportunities for agriculture and environment*. ARAL. Milano. p. 7-18. ISBN: 9788890374609.
- Schulz, H., Eder, B. 2004. *Bioplyn v praxi: teorie - projektování - stavba zařízení - příklady*. 1. vyd. HEL. Ostrava. 168 s. ISBN: 80-86167-21-6.
- Sigurnjak, I., Vaneeckhaute, C., Michels, E., Ryckaert, B., Chekierre, G., Tack, F. M. G., Meers, E. 2017. Fertilizer performance of liquid fraction of digestate as synthetic nitrogen substitute in silage maize cultivation for three consecutive years. *Science of the Total Environment*. 599-600. 1885-1894.
- Singh, S. P., Prerna, P. 2009. Review of recent advantages in anaerobic packed-bed biogas reactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 13. 1569-1575.
- Smyth, B. M., Smyth, H., Murphy, J. D. 2011. Determining the regional potential for a grass biomethane industry. *Applied Energy*. 88. 2037-2049.
- Song, Z., Liu, X., Yan, Z., Yuan, Y., Liao, Y. 2014. Comparison of seven chemical pretreatments of corn straw for improving methane yield by anaerobic digestion. *PLoS One* 9. 93801.

- Sosnowski, P., Wieczorek, A., Ledakowicz, S. 2003. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research*. 7. 609-616.
- Steffen, R., Szolar, O., Braun, R. 1998. *Feedstocks for anaerobic digestion*. Tulln University of Agricultural Sciences. Vienna. p. 29.
- Sterritt, R. M., Lester J. N. 1980. Interaction of heavy metals with bacteria. *Science of the Total Environment*. 14 (1). 5-17.
- Straka, F., Dohányos, M., Záborská, J., Jeníček, P., Dědek, J., Malijevský, A., Novák, J., Oldřich, J., Kunčarová, M. 2006. *Bioplyn*. GAS s.r. o. Praha. 706 s. ISBN: 80-7238-090-6.
- Stronach, S., Rudd, T., Lester, J. N. 1986. Toxic substances in anaerobic digestion. In: *Anaerobic digestion proces in industrial waste water treatments*. Springer-Verlag. London. p. 71-92. ISBN: 978-3-642-71215-9.
- Struik, P. C., Amaducci, S., Bullard, M. J., Stutterheim, N. C., Venturi, G., Cromack, H. T. H. 2000. Agronomy of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) in Europe. *Industrial Crops and Products*. 11 (2-3). 107-118.
- Sun, Y., Cheng, J. J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technology*. 83. 1-11.
- Sýkorová, E., Wanner, J., Beneš, O. 2014. Analýza znovuzískávání fosforu srážením struvitu z kalových vod na vybraných čistírnách odpadních vod. *Chemické Listy*. 108. 610-614.
- Škorvan, O., Holba, M., Plotěný, K. Jak naložit s produkty anaerobní digesce v souladu se zákonem [online]. *Odpady*. 12. dubna 2012 [cit. 2018-06-21]. Dostupné z <<https://odpady-online.cz/jak-nalozit-s-produkty-anaerobni-digesce-v-souladu-se-zakonom/>>.
- Švehla, P., Jeníček, P., Habart, J., Hanč, A., Balík, J. 2010. Testování vlivu vybraných faktorů na průběh nitrifikace kalové vody. *Chemické Listy*. 104. 343-348.
- Švehla, P., Bartáček, J., Páček, L., Hrnčířová, H., Radechovský, J., Hanč, A., Jeníček, P. 2014. Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria during sludge liquor treatment: Influence of feeding strategy. *Chemical Papers*. 68 (7). 871-878.
- Taherzadeh, M. J., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9. 1621-1651.
- Takemura, K., Endo, R., Shibuya, T., Kitaya, Y. 2016. Modifications of concentrations of plant macronutrient ions in digestate from anaerobic digestion during nitrification processes. *Journal of Residuals Science and Technology*. 13 (3). 207-14.

- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F. 2009. Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource Technology*. 100 (12). 3140-3142.
- Tambone, F., Terruzzi, L., Scaglia, B., Adani, F. 2015. Composting of the solid fraction of digestate derived from pig slurry: Biological process and compost properties. *Waste Management*. 35. 55-61.
- Tao, W., Ukwuani, A. T. 2015. Coupling thermal stripping and acid absorption for ammonia recovery from dairy manure: Ammonia volatilization kinetics and effects of temperature, pH and dissolved solids content. *Chemical Engineering Journal*. 280. 188-196.
- Taseli, B. K. 2008. Fungal treatment of hemp-based pulp and paper mill wastes. *African Journal of Biotechnology*. 7 (3). 286-289.
- Teglia, C., Tremier, A., Martel, J. L. 2011a. Characterization of solid digestates: Part 1, Review of existing indicators to assess solid digestates agricultural use. *Waste and Biomass Valorization*. 2 (1). 43-58
- Teglia, C., Tremier, A., Martel, J. L. 2011b. Characterization of solid digestates: Part 2, Assessment of the quality and suitability for composting of six digested products. *Waste and Biomass Valorization*. 2 (2). 113-126.
- Tiehm, K., Nickel, U., Neis. 1997. The use of ultrasound to accelerate the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Science and Technology*. 36. 121-128.
- Tigini, V., Franchino, M., Bona, F., Varese, G. C. 2016. Is digestate safe? A study on its ecotoxicity and environmental risk on a pig manure. *Science of the Total Environment*. 551-552. 127-132.
- Tlustoš, P., Kaplan, L., Dubský, M., Bazalová, M., Száková, J. 2014. Stanovení fyzikálních a chemických vlastností pevných a kapalných složek digestátu bioplynových stanic. Česká zemědělská univerzita v Praze. Praha. 25 s. ISBN: 9788021325135.
- Törnwall, E., Pettersson, H., Thorin, E., Schwede, S. 2017. Post-treatment of biogas digestate - An evaluation of ammonium recovery, energy use and sanitation. *Energy Procedia*. 142. 957-963.
- Triolo, J. M., Sommer, S. G., Moller, H. B., Weisbjerg, M. R., Jiang, X. Y. 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresource Technology*. 102. 9395-9402.

- Triolo, J. M., Pederson, L., Qu, H., Sommer, S. G. 2012. Biochemical methane potential and anaerobic biodegradability of non-herbaceous and herbaceous phytomass in biogas production. *Bioresource Technology*. 125. 226-232.
- Ust'ak, S., Váňa, J. 2005. Bioplynová fermentace biomasy a biologicky rozložitelných odpadů. CZ Biom. VÚRV, v.v.i. Praha. 180 s. ISBN: 80-86555-78-X.
- Vadivelu, V. M., Yuan, Z. G., Fux, C., Keller, J. 2006a. The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched *Nitrobacter* culture. *Environmental Science and Technology*. 40 (14). 4442-4448.
- Vadivelu, V. M., Keller, J., Yuan, Z. G. 2006b. Effect of free ammonia and free nitrous acid concentration on the anabolic and catabolic processes of an enriched *Nitrosomonas* culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 95 (5). 830-839.
- Vallee, B. L., Uner, D. D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual Review of Biochemistry*. 41. 91-128.
- van Walsum, G. P., Allen, S. G., Spenser, M. J., Laser, M. S., Antal, M. J., Lynd, L. R. 1996. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 57-58. 157-170.
- Vavilin, V. A., Rytov, S. V., Lokshina, L. Y. 1996. A description of hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic matter. *Bioresource Technology*. 56. 229-237.
- Vázquez-Rowe, I., Golkowska, K., Lebuf, V., Vaneckhaute, C., Michels, E., Meers, E., Benetto, E., Koster, D. 2015. Environmental assessment of digestate treatment technologies using LCA methodology. *Waste Management*. 43. 442-459.
- Veeken, A., Kalyuzhnyi, S., Scharff, H., Hamelers, B. 2000. Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. *Journal of Environmental Engineering*. 126. 1076-1081.
- Vervaeren, H., Hostyn, K., Ghekiere, G., Willems, B. 2010. Biological ensilage additives as pretreatment for maize to increase the biogas production. *Renewable Energy*. 35. 2089-2093.
- Voinov, A., Arodudu, O., van Duren, I., Morales, J., Qin, L. 2015. Estimating the potential of roadside vegetation for bioenergy production. *Journal of Cleaner Production*. 102. 213-225.
- Vondra, M., Máša, V., Bobák, P. 2018. The energy performance of vacuum evaporators for liquid digestate treatment in biogas plants. *Energy*. 146. 141-155.
- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 474/2000 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva ve znění pozdějších předpisů. In: *Sbírka zákonů*. 13. 12. 2000. ISSN: 1211-1244.
- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 377/2013 Sb., o skladování a způsobu používání hnojiv. In: *Sbírka zákonů*. 25. 11. 2013. ISSN: 1211-1244.

- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 131/2014 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva ve znění pozdějších předpisů. In: Sběrka zákonů. 3. 7. 2014. ISSN: 1211-1244.
- Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 237/2017 Sb., o stanovení požadavků na hnojiva ve znění pozdějších předpisů. In: Sběrka zákonů. 28. 7. 2017. ISSN: 1211-1244.
- Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 341/2008 Sb., o podrobnostech nakládání s biologicky rozložitelnými odpady. In: Sběrka zákonů. 26. 8. 2008. ISSN: 1211-1244.
- Vyhláška Ministerstva životního prostředí č. 415/2012 Sb., o přípustné úrovni znečišťování a jejím zjišťování a o provedení některých dalších ustanovení zákona o ochraně ovzduší. In: Sběrka zákonů. 21. 11. 2012. ISSN: 1211-1244.
- Wagner, O. A., Lins, P., Malin, C., Reitschuler, Ch., Illmer, P. 2013. Impact of protein, lipids and cellulose-containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Science of the Total Environment*. 458-460. 256-266.
- Wang, F., Tsuno, H., Hidaka, T., Tsubota, J. 2011. Promotion of polylactide degradation by ammonia under hyperthermophilic anaerobic conditions. *Bioresource Technology*. 102 (21). 9933-9941.
- Wang, F., Hidaka, T., Tsumori, J. 2014. Enhancement of anaerobic digestion of shredded grass by co-digestion with sewage sludge and hyperthermophilic pretreatment. *Bioresource Technology*. 169. 299-306.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., Jones, D. L. 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 99. 7928-7940.
- Weil, J., Sarikaya, A., Rau, S.-L., Goetz, J., Ladisch, C., Brewer, M. 1997. Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 68. 21-40.
- Weiland, P. 2006. State of the art of solid-state digestion – recent developments. In: *Solid-state digestion – state of the art and further R&D requirements*, 24. Gulzower Fachgespräche. p. 22-38.
- Wellinger, A. 1999. Process design of agricultural digesters. Nova Energie GmbH. Ettenhausen. p. 28.
- Wellinger, A., Murphy, J. D., Baxter, D. 2013. *The biogas handbook – Science, production and applications*. Woodhead. Cambridge. p. 501. ISBN: 978-0-85709-498-8.
- Wilkinson, J. M., Bolsen, K. K., Lin, C. J. 2003. History of silage. In: *Silage science and technology*. American Society of Agronomy. Madison. ISBN: 0891181512130.

- Wood, H. G., Ljungdahl, L. 1991. Autotrophic character of acetogenic bacteria. In: Variations in autotrophic life. Academic Press. San Diego. p. 201-250. ISBN: 0126403600.
- Wu, X., Yao, W., Zhu, J., Miller, C. 2010. Biogas and CH₄ productivity by co-digesting swine manure with three crop residues as an external carbon source. *Bioresource Technology*. 101. 4042-4047.
- Xie, S., Lawlor, P. G., Frost, J. P., Hu, Z., Zhan, X. 2011a. Effect of pig manure to grass silage ratio on methane production in batch anaerobic co-digestion of concentrated pig manure and grass silage. *Bioresource Technology*. 102. 5728-5733.
- Xie, S., Frost, J. P., Lawlor, P. G., Wu, G., Zhan, X. 2011b. Effects of thermo-chemical pretreatment of grass silage on methane production by anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 102 (19). 8748-8755.
- Xie, S., Lawlor, P. G., Frost, J. P., Wu, G., Zhan, X. 2012. Hydrolysis and acidification of grass silage in leaching bed reactor. *Bioresource Technology*. 114. 406-413.
- Xing, J., Criddle, C., Hickey, R. 1997. Effect of a long-term periodic substrate perturbation on an anaerobic community. *Water Resource*. 31. 2195-2204.
- Yang, L., Xu, F., Ge, X., Li, Y. 2015. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 44. 824-834.
- Yang, S. T., Okos, M. R. 1987. Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure cultures of methanogens. *Biotechnology and Bioengineering*. 30. 661-667.
- Yu, H. Q., Fang, H. H. P. 2001. Inhibition by chromium and cadmium of anaerobic digestion. *Water Science and Technology*. 43 (11). 267-274.
- Zákon č. 156/1998 Sb., o hnojivech. In: *Sbírka zákonů*. 12. 6. 1998. ISSN: 1211-1244.
- Zákon č. 185/2001 Sb., o odpadech. In: *Sbírka zákonů*. 15. 5. 2001. ISSN: 1211-1244.
- Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách. In: *Sbírka zákonů*. 28. 6. 2001. ISSN: 1211-1244.
- Zákon č. 201/2012 Sb., o ochraně ovzduší. In: *Sbírka zákonů*. 2. 5. 2012. ISSN: 1211-1244.
- Zayed, G., Winter, J. 2000. Inhibition of methane production from whey by heavy metals – protective effect of sulfide. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53 (6). 726-731.
- Zhang, Y., Banks, C. J., Heaven, S. 2012. Anaerobic digestion of two biodegradable municipal waste streams. *Journal of Environmental Management*. 104. 166-174.
- Zheng, X., Zhou, W., Wan, R., Luo, J., Su, Y., Huang, H., Chen, Y. 2018. Increasing municipal wastewater BNR by using the preferred carbon source derived from kitchen wastewater to

- enhance phosphorus uptake and short-cut nitrification-denitrification. *Chemical Engineering Journal*. 344. 556-564.
- Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., Li, Y. 2014. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Progress in Energy and Combustion Science*. 42. 35-53.
- Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Sun, S., Qiao, W., Xiao, M. 2011. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresource Technology*. 102. 11177-11182.
- Zygmunt, D., Banel, A. 2009. Formation, occurrence and determination of volatile fatty acids in environmental and related samples. In: *Proceedings of the 3rd WSEAS International conference on waste management, water pollution, air pollution, indoor climate*. WSEAS Press. Tenerife. pp. 476-481. ISBN: 978-960-474-093-2.
- Židek, M. 2003. Alternativní využití bioplynu. In: *Energie z biomasy*. VUT v Brně. Brno. s. 133-136. ISBN: 80-214-2543-1.