

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agrochemie a výživy rostlin

**Předúprava rozložitelných biologických materiálů
a účinnost anaerobní digesce**

Diplomová práce

Vedoucí práce : Prof. Ing. Pavel Tlustoš CSc.

Konzultant práce: Ing. František Jelínek

Autor práce : Bc. Tereza Ondráčková

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Předúprava rozložitelných biologických materiálů a účinnost anaerobní digesce“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne 11.4. 2012

Tereza Ondráčková

Poděkování

Tímto, bych chtěla poděkovat panu Prof. Ing. Pavlu Tlustošovi CSc. a panu Ing. Františku Jelínkovi za jejich pomoc, vedení a cenné připomínky při tvorbě mé práce. Můj dík patří Bc. Pavlu Míchalovi a Bc. Lence Špulákové za spolupráci v laboratoři.

Abstrakt

Předúprava rozložitelných odpadů zásadně ovlivňuje proces anaerobní digesce. Předúprava biologických materiálů spočívá ve zlepšení přístupnosti vstupního substrátu anaerobním mikroorganismům. Účelem předúpravy je urychlení procesu anaerobní fermentace a zároveň zvýšení výtěžnosti metanu. Předúprava může být mechanická, biologická, fyzikální, chemická nebo různě kombinovaná. Tato diplomová práce je zaměřena na srovnání kumulativní produkce bioplynu ze dvou různých substrátů biomasy (směs listů vrb a topolů) pocházejících z oblasti Příbramska, a to konkrétně z lokalit Trhové Dušnice a Podlesí. Tyto lokality se liší stupněm kontaminace. Substrát z každé lokality byl upraven dvojím způsobem - jednak mechanicky a jednak termotlakou hydrolýzou.

Pro zjištění kumulativní produkce bioplynu byly použity jednorázové batch testy. Měření probíhalo v pravidelných intervalech, zpočátku 2 - 3x denně, později 1x denně po dobu 26 dní. V průběhu pokusu byly analyzován obsah veškerých látek, obsah veškerých rozpuštěných látek, obsah organických látek a obsah rozpuštěných organických látek. Dále bylo stanoveno CHSK, obsah N-amon a pH.

Největší kumulativní produkce bioplynu byla zaznamenána u mechanicky upraveného vzorku z lokality Podlesí. Tento nehydrolyzovaný substrát vyprodukoval dvakrát vyšší množství bioplynu, než hydrolyzovaný substrát z téže lokality. Příčinou inhibice anaerobního rozkladu hydrolyzovaného substrátu je zřejmě mobilizace těžkých kovů, ke které došlo po předúpravě termotlakou hydrolýzou. Mezi jednotlivými lokalitami byly rovněž zaznamenány rozdíly kvantitativních produkcí bioplynu. Oba substráty z lokality Trhové Dušnice vykazovaly nižší produkci bioplynu. Z analýzy obsahů těžkých kovů a z výsledků kumulativní produkce bioplynu je zřetelné, že lokalita Podlesí je více kontaminovaná, ale těžké kovy, které se v této lokalitě nacházejí, mají nízkou mobilitu. Další příčinou inhibice procesu je pravděpodobně vyšší obsah hemicelulóz v substrátu. Hemicelulózy se za působení termotlaké hydrolýzy štěpí na deriváty furanů, které mají inhibiční účinky.

Poměr polysacharidů (celulózy, hemicelulózy a ligninu), proteinů a lipidů významně ovlivňuje proces anaerobní digesce a efektivitu předúpravy. Termotlaká hydrolýza biomasy obsahující velké množství a vysoké obsahy rizikových kovů o vysoké mobilitě negativně ovlivňuje proces anaerobní digesce. Některé způsoby předúpravy mohou mobilitu těžkých

kovů zvyšovat a tím proces inhibovat. Znalosti procesu a důsledků předúpravy jsou v praxi zcela zásadní.

Klíčová slova : Termotlaká hydrolýza, anaerobní digesce, bioplyn, kontaminovaná biomasa, rizikové prvky

Abstract

Pre-treatment of biodegradable waste significantly affects the process of anaerobic digestion. This pre-treatment of biological materials lies in improving of the accessibility of the input substrate to anaerobic microorganisms. As a result of the pre-treatment is accelerating of the process of anaerobic fermentation and increasing of the yield of methane. Pre-treatment may be mechanical, biological, physical, chemical, or anyhow combined. This thesis is focused on the comparison of cumulative production of biogas produced by biomass coming from two different substrates (a mixture of poplar and willow leaves) originating from the area of Příbram and specific locations of Trhové Dušníky and Podlesí. These sites differ in the grade of contamination. Substrate from each site was modified in two ways, mechanically and also by thermal-pressure hydrolysis.

To determine the cumulative production of biogas simple batch tests were applied. Measurements were carried out at regular intervals, initially from 2 to 3 times a day, then ones a day for 26 days. In the course of the experiment were analyzed for all substances, total dissolved solids content, organic content and the content of dissolved organic matter. In a course of the experiment, the total dissolved solids content, organic content and the content of dissolved organic matter were analyzed for all substances. COD, ammonium-N content and pH were also determined.

The largest cumulative biogas production was observed in mechanically treated sample from the site of Podlesí. The non-hydrolyzed substrate produced twice the amount of biogas than hydrolyzed substrate from the same locality. Mobilization of heavy metals is probably the cause of inhibition of anaerobic degradation of hydrolyzed substrate. The mobilization occurred after pre-treatment by thermal-pressure hydrolysis. Among the sites were also observed differences in the quantitative production of biogas. Both substrates from the site Trhové Dušníky showed lower biogas production. From the analysis of heavy metals and the results of the cumulative production of biogas is evident that the site Podlesí is more contaminated. But heavy metals, which are located in this area, have low mobility. Another cause of the inhibition process is likely to be higher hemicelluloses content in the substrate. Under the influence of the thermal - pressure hydrolysis hemicellulose cleaves the furan derivatives that have inhibitory effects.

The ratio of polysaccharides (cellulose, hemicellulose and lignin), protein and lipid significantly affects the process of anaerobic digestion and efficiency of pretreatment. Thermal – pressure hydrolysis of biomass, containing large amount and high level of hazardous metals which have high mobility, negatively affects the anaerobic digestion. Some methods of the preparation can increase the mobility of heavy metals and thus negatively affect the process. Knowledge of process and the consequences of pre-treatment is crucial in practice.

Keywords: Thermal – pressure hydrolysis, anaerobic digestion, biogas, contaminated biomass, hazardous elements

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Hypotézy a cíle	3
3	Literární přehled.....	5
3.1	Anaerobní digesce	5
3.1.1	Hydrolyza	5
3.1.2	Acidogeneze	6
3.1.3	Acetogeneze	6
3.1.4	Metanogeneze	7
3.2	Faktory limitující anaerobní procesy a jejich technologický význam.....	8
3.2.1	Vlivy teploty.....	8
3.2.2	Vlivy tlaku.....	9
3.2.3	Vlivy pH.....	9
3.2.4	Vlhkost prostředí	10
3.2.5	Vliv desintegrace.....	10
3.2.6	Požadavky na živiny a substrát	10
3.2.7	Vliv těžkých kovů	10
3.2.8	Požadavky na dusík.....	11
3.2.9	Požadavky na síru.....	12
3.2.10	Požadavky na fosfor	12
3.2.11	Ostatní požadavky	13
3.2.12	Přítomnost toxických a inhibujících látek	13
3.2.13	Zatížení vyhnívacího prostoru.....	13
3.3	Bioplyn	13
3.4	Možnosti intenzifikace procesu biometanizace	14
3.4.1	Biologická rozložitelnost.....	14
3.4.2	Vstupní suroviny	15
3.4.3	Poměr C:N.....	18
3.5	Zlepšení biologické rozložitelnosti organických látek	19
3.5.1	Biochemické aspekty.....	19
3.5.2	Fyzikálně chemické aspekty.....	20
3.5.3	Mechanické metody	20
3.5.4	Chemické metody.....	21

3.5.5	Termická předúprava.....	23
3.5.6	Biologická předúprava	24
3.5.7	Technologické aspekty biologické rozložitelnosti a výtěžnosti metanu	25
4	Materiál a metody	26
4.1	Vstupní materiál	26
4.2	Založení testu.....	27
4.3	Popis aparatury a princip měření	28
4.4	Analytická stanovení	29
4.4.1	Stanovení koncentrace veškerých rozpuštěných a veškerých látek, stanovení organických látek	29
4.4.2	Chemická spotřeba kyslíku	30
4.4.3	Stanovení koncentrace amoniakálního dusíku	31
4.4.4	Hodnota pH	31
5	Výsledky	32
5.1	Laboratorní měření	32
5.1.1	Kumulativní produkce bioplynu.....	32
5.1.2	Průběh produkce bioplynu	34
5.1.3	Hodnocení změn hodnoty pH.....	36
5.1.4	Účinnost odstranění veškerých látek.....	37
5.1.5	Účinnost odstranění rozpuštěných látek.....	38
5.1.6	Stanovení amoniakálního dusíku	39
5.1.7	Gravimetrické stanovení veškerých látek	40
5.1.8	Gravimetrické stanovení rozpuštěných látek	41
5.1.9	Gravimetrické stanovení organických látek.....	42
5.1.10	Gravimetrické stanovení rozpuštěných organických látek.....	42
6	Diskuse.....	43
7	Závěr	47
8	Literatura.....	48
9	Samostatné přílohy.....	53

Seznam příloh

Příloha č. 1. Fotodokumentace

Obrázek č. 1. Testovací lahvičky v průběhu měření

Obrázek č. 2. Průběh měření produkce bioplynu

Obrázek č. 3. Termokomora v pokusné stáji FAPPZ

Příloha č. 2. Záznam měření – Nehydrolyzovaný substrát z lokality Trhové Dušníky

Příloha č. 3. Záznam měření – Nehydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí

Příloha č. 4. Záznam měření – Hydrolyzovaný substrát z lokality Trhové Dušníky

Příloha č. 5. Záznam měření – Hydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí

Příloha č. 6. Záznam měření – Inokulum z bioplynové stanice Krásná Hora

1 Úvod

V současné době je snaha měnit vývoj odpadového hospodářství k trvale udržitelné podobě a omezovat produkci skleníkových plynů. Součástí této problematiky je i nakládání s biologicky rozložitelnými komunálními odpady (BRKO). Česká i evropská legislativa svým důrazem na řešení této problematiky předbíhá technické a technologické možnosti u subjektů, kde tyto odpady vznikají. Je snaha separovat tyto odpady odděleně od tuhých komunálních odpadů a dále je pak zpracovat. Fyzikální i chemické vlastnosti BRO jsou vysoce variabilní a právě tato variabilita vytváří těžké podmínky pro technická i technologická řešení.

V anaerobních podmínkách se při rozkladu organické hmoty mikroorganismy uvolňuje bioplyn, který uniká do atmosféry a přispívá k prohloubení skleníkového efektu. K tomuto jevu dochází nejen přirozeně v přírodě (pod povrchem země, v bažiništích, zaživačích traktech živočichů, zejména přežvýkavců), ale i například na skládkách komunálních odpadů. V současnosti je snaha tomuto jevu předcházet. Bioplyn vzniklý na skládkách komunálních odpadů je zachycován a odváděn.

Jednou z možností řešení problému spočívá ve využití tohoto procesu přeměny biologických odpadů v bioplyn v náš prospěch. K tomu dochází řízeně v reaktorech bioplynových stanic. Takto vzniklý bioplyn je dále zpracováván a skladován. Bioplyn je možno dále energeticky využít v kogeneračních jednotkách k produkci tepelné a elektrické energie a komprimovaný bioplyn může být použit jako palivo pro dopravní prostředky. Při spalování bioplynu na rozdíl od přímého spalování biomasy nebo fosilních paliv nevznikají škodlivé emise ani těžké kovy.

Zásoby fosilních paliv se ztenčují a tlak na objevování nových zdrojů energie se neustále zvětšuje. Hledají se nové cesty a lidé se snaží zlepšit a rozvíjet dosud známé alternativní technologie pro výrobu energie, mezi něž patří i anaerobní digesce. Řízený proces anaerobní digesce v bioplynovém reaktoru je zdrojem energie na jedné straně a na straně druhé je to řešení pro odstranění zemědělských (zvířecí fekálie a rostlinný bioodpad) a komunálních bioodpadů.

A nyní se nabízí otázka: „Jak zlepšit tento proces a dosáhnout co nejlepších výsledků?“. Současný provoz zemědělských bioplynových stanic je založen, vedle odpadů z velkochovů hospodářských zvířat, především na zpracování cíleně pěstované fytomasy jako

hlavního substrátu. Určité množství fytomasy (ligno-celulozových materiálů) je obsaženo také v substrátech pro BPS zpracovávající komunální odpady nebo čistírenské kaly. Vzhledem k malé biologické rozložitelnosti celulózy a jejich derivátů a také přítomnosti ligninu ve fytomase, pouze část přítomného organického uhlíku je při anaerobní fermentaci transformovaná na bioplyn a značná část zůstává nevyužita (Dohányos, 2009a). Z tohoto důvodu se provozovatelé snaží lépe využít zpracováváný substrát, zvýšit jeho biologickou rozložitelnost a zajistit optimální podmínky pro proces anaerobní fermentace v BPS.

2 Hypotézy a cíle

Zvýšení výtěžnosti metanu a optimalizace procesu anaerobní digesce lze dosáhnout zlepšením biologické rozložitelnosti substrátu. Biologická rozložitelnost závisí na množství a aktivitě anaerobní kultury mikroorganismů a na rychlosti rozkladu. Dohányos (2009a) uvádí, že je důležité udržovat koncentraci biomasy mikroorganismů co nejvyšší. Koncentrace biomasy mikroorganismů v reaktoru závisí přímo úměrně na koeficientu produkce biomasy, množství odstraněného substrátu a době zdržení biomasy mikroorganismů a nepřímo závisí na hydraulické době zdržení.

Efektivita procesu anaerobní fermentace je závislá na chemickém složení substrátu. Chemické složení udává poměr sacharidů, proteinů a tuků a také podíl celulózy, hemicelulózy a ligninu a dalších inertních látek. Důležitým faktorem je poměr C:N. Je-li poměr úzký, dochází k nadměrné produkci dusíku, který má toxický účinek pro anaerobní mikroorganismy. Při širokém poměru C:N dochází k deficitu dusíku.

Další možností, jak zlepšit rozložitelnost zpracovávaného substrátu, zvýšit rychlost produkce a výtěžnost metanu, je zpřístupnění složek materiálu enzymovému rozkladu. Toho lze dosáhnout vhodnou předúpravou biomasy. Princip všech metod přeúpravy je založen na zmenšení velikosti částic a zvětšení aktivního povrchu pro anaerobní mikroorganismy. Rozlišujeme čtyři základní metody předúpravy – mechanickou, chemickou, fyzikální a biologickou nebo jejich kombinace. U některých typů předúprav dochází působením hydrolitických mikroorganismů k hydrolýze makromolekulárních látek. Při hydrolýze je substrát převeden do kapalné fáze, která je již snadno fermentovatelná. Teoreticky je kvantitativní výtěžnost bioplynu ze substrátu upraveného termotlakou hydrolýzou vyšší než výtěžnost z neupraveného substrátu.

Dalším významným faktorem je obsah rizikových prvků. Složení a kombinace jednotlivých těžkých kovů vyskytujících se v biomase ovlivňují proces anaerobní digesce a výtěžnost bioplynu. Některé prvky mohou proces inhibovat, jiné ho naopak stimulovat. Vyšší stupeň kontaminace rizikovými prvky brzdí proces anaerobní fermentace a snižuje jeho efektivitu.

Cílem diplomové práce je vyhodnocení vlivu předúpravy biologického materiálu termotlakou hydrolýzou na jejich chování v podmínkách anaerobní digesce. Účinnost

anaerobní digesce je hodnocena z hlediska kvantitativní produkce bioplynu jednotlivých substrátů. Rozdílnost substrátů spočívá nejen ve stupni předúpravy, ale i kontaminaci rizikovými prvky.

3 Literární přehled

3.1 Anaerobní digesce

Anaerobní fermentace je rozklad organických látek v bezkyslíkatém prostředí. Je to soubor na sebe navazujících biologických procesů, probíhajících v ustálených podmínkách současně, na kterých se podílí několik skupin anaerobních mikroorganismů. Rozklad organických látek až na konečné produkty metan a oxid uhličitý vyžaduje jejich koordinovanou metabolickou součinnost (Andrt, 2001).

Proces anaerobního vyhnívání probíhá ve vyhřívaných (obvykle teplem z kogeneračního spalování bioplynu) hermeticky uzavíratelných nádržích (fermentorech neboli digestorech) za účelem omezení přístupu vzduchu, které poskytují optimální podmínky pro anaerobní mikroorganismy. Tyto nádrže mohou být betonové či ocelové různé provenience a jsou vybaveny míchacím a čerpacím zařízením, neboť další důležitou podmínkou je promíchávání zrajícího substrátu. V procesu anaerobního vyhnívání se 30 až 60 % sušiny organického substrátu přemění na bioplyn, který je snadno využitelný pro obnovitelnou produkci tepla a elektřiny. Bioplyn před použitím je jímán do plynojemů (Ust'ak, Váňa a kol, 2006).

Anaerobní rozklad organické hmoty probíhá ve čtyřech frakcích: hydrolýza, okyselení (acidogeneze), tvorba kyseliny octové (acetogeneze) a tvorba metanu (metanogeneze). V prvních fázích dochází k rozkladu použitelných materiálů, vlastní přeměna na metan nastává v posledních dvou fázích (Dohányos, 2004).

Jednotlivé fáze se liší nejen podílejícími se mikroorganismy a vznikajícími produkty, ale i zřetelně se lišícími životními podmínkami pro bakterie (Ust'ak, Váňa a kol., 2006).

3.1.1 Hydrolýza

Hydrolýza biomasy začíná v době, kdy prostředí obsahuje vzdušný kyslík. Předpokladem pro její nastartování je mimo jiné dostatečný obsah vlhkosti (obsah vody nad 50 % hmotnostního podílu). Hydrolytické mikroorganismy ještě nevyžadují striktně bezkyslíkaté prostředí (Kára, 2007).

V prvním stadiu rozkladu – hydrolýze jsou rozkládány makromolekulární látky rozpuštěné i nerozpuštěné organické látky (polysacharidy, lipidy, proteiny) na nízkomolekulární látky rozpustné ve vodě pomocí extracelulárních hydrolytických enzymů, produkovaných hlavně fermentačními bakteriemi. Vznikající nízkomolekulární látky jsou na rozdíl od vysokomolekulárních schopny transportu dovnitř buňky (Dohányos a kol., 1996)

Hydrolýza vysokomolekulárních látek z hlavních skupin lipidů, proteinů a polysacharidů se uskutečňuje pomocí mimobuněčné působících hydrolytických enzymů. Vedle hydrolýzy probíhá obyčejně i acidogeneze (Straka a kol., 2003).

3.1.2 Acidogeneze

Zpracovávaný materiál může obsahovat ještě zbytky vzdušného kyslíku, v této fázi však dojde definitivně k vytvoření anaerobního (bezokyslíkatého) prostředí. Zajistí to četné kmeny fakultativních anaerobních mikroorganismů, které se aktivují v obou prostředích (Kára, 2007).

Produkty hydrolýzy jsou uvnitř buňky během druhé fáze rozkládány dále na jednodušší organické látky (kyseliny, alkoholy, CO_2 , H_2) (Dohányos a kol., 1996).

Podle Dohányose (2008) fermentací hydrolýzních produktů se tvoří řada konečných redukováných produktů, které jsou závislé na charakteru původního substrátu a podmínkách prostředí. Při nízkém parciálním tlaku vodíku jsou produkovány především kyselina octová, CO_2 a H_2 , při vyšším jsou tvořeny vyšší organické kyseliny, kyselina mléčná nebo alkoholy.

Hydrolýzu a acidogenezi zajišťují velmi pestré a početné kultury příslušející k čeledím *Streptococcaceae* a *Enterobacteriaceae* a k rodům *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* a dalším (Straka a kol., 2003).

3.1.3 Acetogeneze

V dalším stadiu rozkladu probíhá oxidace těchto látek na H_2 , CO_2 a kyselinu octovou. *Syntrofní acetogenní mikroorganismy produkující vodík* jsou zde velmi důležitou mikrobiální skupinou, protože rozkládají organické kyseliny vyšší než octovou (hlavně propionovou kyselinu), alkoholy a některé aromatické sloučeniny (Dohányos a kol., 1996).

Na druhou stranu, vysoký obsah vodíku brzdí tvorbu kyseliny octové. Protože zde žijí bakterie tvořící kyselinu octovou v symbióze s bakteriemi metanogenními, starají se tyto o nízký obsah vodíku, který zabudovávají do CH₄. Acetogenní mikroorganismy přitom dodávají poloprodukty pro tvorbu metanu. Jsou zde zastoupeny i minoritní skupiny organismů (sulfátreduktanty, nitrátreduktanty) produkující vedle kyseliny octové a vodíku také sulfan a dusík (Ust'ak, Váňa a kol., 2006).

Syntrophobacter wollinii rozkládá kyselinu propionovou na kyselinu octovou, vodík a CO₂. *Syntrophomonas wolfei* štěpí delší alifatické kyseliny se sudým počtem uhlíků na kyselinu octovou a vodík, lichouhlíkaté řetězce jsou štěpeny na kyselinu propionovou a octovou a vodík. Syntrofní mikroorganismy pracují v nejtěsnějších společenstvech s metanogeny. *Syntrophus buswelii* se nachází ve společenstvech jak s metanogeny, tak i se sulfát-reduktanty (Straka a kol., 2003).

3.1.4 Metanogeneze

V posledním stadiu metanogenní mikroorganismy rozkládají pro ně přijatelné substráty, což jsou některé jednouhlíkaté látky (metanol, kyselina mravenčí, methylaminy, CO₂, CO, H₂) a z víceuhlíkatých pouze kyselina octová. Produkty rozkladu jsou metan a oxid uhličitý. Metanogenní substráty mohou v tomto stadiu konkurenčně zpracovávat také denitrifikační a desulfatační bakterie, pokud jsou přítomny jejich konečné elektronové akceptory (Dohányos a kol., 1996).

Metanogeneze – tvorba metanu – metanotvorné bakterie náleží k druhu archaických bakterií (archaebakterie) a jsou jedním z nejstarších projevů života na světě. Jsou striktně anaerobní – při působení kyslíku jsou rychle usmrcovány. Jako specializované mohou metanotvorné bakterie měnit mimo vodíku a oxidu uhličitého jen velmi málo substrátů. Málo z nich dokáže změnit metanol přímo na metan. Jsou nejdůležitější trofickou skupinou procesu anaerobní digesce, mají specifické požadavky na substrát i životní podmínky a vedle acetogenů zpracovávajících kyselinu propionovou se často stávají limitujícím faktorem celého procesu. Podle specifiky substrátu je lze rozdělit na pouze hydrogenotrofní, pouze acetotrofní a obojetné (Ust'ak, Váňa a kol., 2006).

Acetotrofní metanogenní bakterie mají v procesu velmi důležitou úlohu, protože jejich působením vzniká více jak 2/3 metanu v bioplynu, ale ve srovnání s hydrogenotrofními bakteriemi rostou pomaleji (generační doba několik dnů). Hydrogenotrofní metanogenní

bakterie produkují metan z vodíku a oxidu uhličitého. Rostou poměrně rychle, jejich generační doba je cca 6 hodin. V anaerobním procesu tyto vodíkové metanogeny působí jako samoregulátor. Odstraňují ze systému téměř všechny vodík. Koncentrace vodíku v kapalně fázi při dobré činnosti hydrogenotrofních metanogenních bakterií by měla být minimální, akumulace vodíku v plynu je způsobena buď přetížením anaerobního reaktoru, nebo inhibicí těchto metanogenů.

Pro stabilitu procesu anaerobní fermentace organických materiálů je velmi důležitá optimální rovnováha v kinetice jednotlivých fází, probíhajících s odlišnou kinetickou rychlostí. Metanogenní fáze probíhá přibližně pětikrát pomaleji než zbylé tři fáze. Zjednodušený popis procesů probíhajících během metanogeneze :

- glukóza $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CH_4 + 3 CO_2$
- kyselina octová $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$
- metanol $4 CH_3OH \rightarrow 3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2O$ (Pastorek a kol., 2004).

3.2 Faktory limitující anaerobní procesy a jejich technologický význam

Anaerobní rozklad organických látek je ovlivňován řadou faktorů, které buď přímo nebo nepřímo mění životní prostředí anaerobních mikroorganismů, což je teplota, pH, charakter substrátu, nutrienty, toxické látky apod. (Dohányos a kol., 1996).

3.2.1 Vlivy teploty

Teplota ovlivňuje anaerobní procesy podobně jako ostatní biochemické reakce, s rostoucí teplotou vzrůstá rychlost všech procesů probíhajících při metanizaci. Teplota podstatně ovlivňuje hlavně interakce mezi jednotlivými druhy mikroorganismů. Mikrobiální tvorba metanu probíhá v širokém teplotním rozmezí od 4°C do 97°C. U čistých kultur je optimální teplota pro tvorbu metanu dána druhem organismu (Dohányos a kol., 1996).

Pastorek a kol. (2004) rozdělují teplotní pásma, při kterých probíhá metanogenní proces na tři oblasti - psychofilní (15 až 20°C), mezofilní (35 – 40°C) a termofilní (teploty okolo 55°C). Ust'ak, Váňa a kol. (2006) určují mezofilní oblast jako teploty, probíhající při 30 – 40 °C, a termofilní oblast jako teploty v rozmezí 45 – 60 °C. Obecně můžeme říct, že čím je teplota vyšší, tím jsou bakterie citlivější na teplotní výkyvy, zejména jsou-li výkyvy krátkodobé a teplota klesne. Zatímco v mezofilní oblasti bakterie výkyvy teplot 2 – 3 °C ještě

zvládnou, tak v termofilní oblasti by výkyvy neměly být větší než 1 °C. Při přechodu na jinou teplotu je nutná dlouhodobá adaptace biomasy (Ust'ak, Váňa a kol., 2006).

Obecně lze konstatovat, že pro udržení stability procesu je nutné zabezpečit konstantní teplotu. Změny teploty jsou tím nebezpečnější, čím je proces zatíženější, tj. čím je kratší doba zdržení a nižší koncentrace biomasy v reaktoru (Dohányos, 2008).

3.2.2 Vlivy tlaku

Vlivy tlaku na procesy biometanizace nebyly předmětem rozsáhlých výzkumů. Aplikační výzkum však ověřil vysokou tolerantnost metanogenů vůči tlakovým podmínkám (Straka a kol., 2003). Výsledky tohoto výzkumu a vývoje jsou potvrzovány i nálezy aktivních kultur v horkých anoxických prostředích hluboko na oceánských dnech, dobře prosperujících za velmi vysokých tlaků (Straka a kol., 2003).

3.2.3 Vlivy pH

Hodnota pH je závažný limitující faktor procesu, který je důležitý pro růst metanogenních bakterií. Většinou je nutné udržovat hodnotu pH v neutrální oblasti mezi 6,5 – 7,5, pod 6 a nad 8 je činnost mikroorganismů silně inhibována (Ust'ak, Váňa a kol., 2006). Hobbs a kol. (2008) udávají ideální rozmezí pro anaerobní digesci jako pH 6,8 – 7,2. Tempo růstu metanogenů se snižuje při pH 6,6. Ačkoli optimální pH pro metanogenezi je 7,0, pro hydrolyzu a acidogenezi je to hodnota mezi 5,5 a 6,5.

Nejčastější příčinou výkyvu pH je pokles vlivem přetížení reaktoru, kdy je produkce kyselin rychlejšími mikroorganismy vyšší než jejich spotřeba a dochází k jejich akumulaci v systému. Proto je nutné řídit zatížení podle množství a složení mastných kyselin v médiu, aby nedošlo ke zhroucení procesu nebo udržovat dostatečnou neutralizační kapacitu přidáním alkalizačních činidel (Ust'ak a Váňa, 2006). Podle Straky a kol. (2003) je pokles pH pod 6,0 doprovázen inhibicí díky vzniku neionizovaných kyselin a nárůst nad pH = 7,6 může procesy inhibovat nárůstem volného amoniaku.

Koncentrace vodíkových iontů (přesněji oxoniových kationtů H_3O^+) ovlivňuje biochemické procesy jednak přímo a jednak nepřímo acidobasickými rovnováhami anorganických i organických iontů, které se ve sledovaném vodném prostředí vyskytují. Pro procesy biometanizace jsou zvláště významné rovnováhy CO_2 , H_2S , NH_3 a kyselin octové a propionové (Straka a kol., 2003)

3.2.4 Vlhkost prostředí

Metanogenní bakterie mohou pracovat a množit se jen tehdy, když je substrát dostatečně zvodnělý (alespoň 50 %) (Schulz, Eder, 2004, Mužik a Kára, 2009). Na rozdíl od aerobních bakterií, kvasinek a hub nemohou žít v pevném substrátu (Schulz, Eder, 2004).

3.2.5 Vliv desintegrace

Podle Váňi (1997) stupeň desintegrace do značné míry ovlivňuje kontaktní plochu a přístupnost fermentovaného substrátu pro anaerobní mikroorganismy. Čím dokonalejší je rozmělnění substrátu, tím dostupnější je tento substrát pro mikroorganismy. Existuje množství různých způsobů desintegrace, které lze označit jako mechanické, chemické, fyzikální, biologické nebo kombinované metody.

3.2.6 Požadavky na živiny a substrát

Pro zapracování a provoz reaktorů je nutný správný poměr N a P k organickým látkám. Z bilance produkce biomasy se udává potřebný poměr živin jako CHSK : N : P v rozmezí od 300 : 6,7 : 1 až 500 : 6,7 : 1. Vedle dusíku a fosforu je žádoucí přítomnost řady mikronutrientů - Na, K, Ca, Fe, S, Mg, Se, důležitá je také přítomnost řady růstových faktorů. Většinou u substrátů přirozeného původu, je množství živin postačující. Naopak, při anaerobní fermentaci kejdy nebo jiných živočišných produktů, bývá vysoký přebytek amoniaku, který za zvýšeného pH může působit inhibičně až toxicky (Dohányos, 2008).

Podle Dohányose a kol. (1996) přítomnost některých stopových prvků (Ni, Co, Mo) zvyšuje metanogenní aktivitu, zvyšuje růst anaerobní biomasy a stimuluje její agregaci. Nepříznivě působí vyšší koncentrace těžkých kovů (Cu, Pb, Cr, Zn aj.), dále jsou také škodlivé oxidanty (molekulární kyslík, H₂O₂ apod.). Z organických látek negativně působí např. pesticidy, rozpouštědla a další specifické látky.

3.2.7 Vliv těžkých kovů

Straka a kol. (2003) uvádí že četné těžké kovy mají na procesy anaerobní fermentace principiálně odlišné vlivy. Podle Lina (1993) toxicita těžkých kovů na anaerobní digesti závisí na chemické formě kovu. Jain a kol. (1991) uvádějí, že některé těžké kovy absorbované ze znečištěného prostředí mohou nepříznivě ovlivnit metabolickou aktivitu mikroorganismů podílejících se na rozkladu biomasy. Tyto efekty se mohou lišit v míře zpomalení

biodegradace, tím, že vzrůstá doba potřebná pro biologické odbourání. Podle Lina (1993) je acidogeneze více citlivá na aktivitu chromu, zinku, niklu a mědi než metanogeneze. Inhibiční účinky na acidogenezi se projevují s klesajícím efektem v řadě $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Cd} > \text{Ni} > \text{Pb}$, zatímco inhibiční účinky na metanogenezi jsou vyjádřeny řadou $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{Zn} > \text{Pb} > \text{Ni}$.

Jain a kol. (1991) se ve výzkumu zaměřili na účinek toxických kovů v mezofilní anaerobní fermentaci. Železo a mangan neměli žádný toxický účinek, zatímco měď, kobalt, olovo a zinek ukázali toxicitu. Přítomnost mědi nebo kobaltu v nízkých koncentracích v biomase lehce snížila množství vyprodukovaného bioplynu, ale se zvyšující se koncentrací mědi nebo kobaltu nebyla zjištěna významná změna v procesu anaerobní digesce a v podílu metanu v bioplynu. Podle Lina (1993) patří měď mezi nejvíce toxické těžké kovy. Jain a kol. (1991) zjistili, že přítomnost železa spolu s mědí v kontaminované biomase snížila toxický efekt mědi. Ačkoli mangan zvýšil toxický efekt kobaltu na produkci bioplynu, přítomnost manganu s kobaltem nezměnila podíl metanu v bioplynu. Olovo nebo zinek obsažené v biomase vedly ke snížení produkce bioplynu a tento toxický efekt se zvýšil se zvýšením koncentrace kovů. V nízkých koncentracích nezaznamenali rozdíl na podílu metanu v bioplynu v porovnání s nekontaminovanou biomasou. Podle Lina (1993) je olovo těžký kov s nejnižší toxicitou. Podle něj nižší koncentrace niklu $\text{Ni} < 300 \text{ mg/l}$ podporují acidogenní mikroorganismy. Jain a kol. (1991) ve svém výzkumu dále uvádějí, že nízké koncentrace kadmia a niklu prokázaly příznivý efekt na produkci bioplynu a jeho podílu metanu. Ale se vzrůstajícími koncentracemi těchto prvků, produkce bioplynu klesala. Ačkoli produkce bioplynu klesla, podíl metanu byly stále vyšší než v bioplynu produkovaném z nekontaminované biomasy. Totální produkce bioplynu produkovaného z niklem a kadmiiem kontaminované biomasy byla srovnatelná s totální produkcí nekontaminovaného materiálu. Tito autoři zjistili, že železo nebo mangan nemají žádný toxický efekt na fermentaci, ale měď, kobalt, olovo a zinek prokazují toxicitu. Zajímavé je, že kadmium a nikl v nízkých koncentracích prokazují příznivý efekt na rychlost produkce a podíl produkovaného metanu. Se zvyšující se koncentrací se obojí, rychlost produkce a podíl metanu v bioplynu, snižují.

3.2.8 Požadavky na dusík

Marchaim (1992) uvádí, že dusík ve vstupní surovině představuje dvě výhody: (a) poskytuje základní prvek pro syntézu aminokyselin, bílkovin a nukleových kyselin, a (b) je přeměňován na amoniak, který neutralizuje těkavé kyseliny vyprodukované kvasnými

bakteriemi, a tím pomáhá udržovat neutrální pH nezbytné pro růst buněk. Nadbytek dusíku v substrátu může vést k nadměrné tvorbě amoniaku, což má za následek toxické účinky. Proto je důležité správné množství dusíku ve vstupní surovině, aby se zabránilo každému omezení živin (příliš málo dusíku) nebo toxicitě amoniaku (příliš mnoho dusíku). Složení organické látky přidané do vyhnívacího systému má důležitý vliv na tempo růstu anaerobních bakterií a produkci bioplynu.

Metanogeny mohou využít amonný ion NH_4^+ . Jako zdroj dusíku pro metanogeny ovšem mohou posloužit i aminokyseliny. Metanogeny jsou však při nedostatku dusíku schopné i fixovat dusík molekulární. To bylo potvrzeno pro *Metanosarcina barkeri* a *Metanococcus thermolithotrophicus*, kdy růst byl sice 3x pomalejší než v přítomnosti amonných iontů, nicméně probíhal za výlučné dodávky elementárního dusíku. (Straka a kol., 2003).

Vzhledem k tomu, že ne všechny uhlík a dusík ze vstupní suroviny, který má být použit pro vyhnívání, je k dispozici, je skutečný dostupný poměr C/N funkcí vlastností surovin a vyhnívacích provozních parametrů. Celkové C/N hodnoty se mohou skutečně značně lišit od méně než 10 až přes 90 a výsledkem stále bude efektivní trávení (Marchaim, 1992).

3.2.9 Požadavky na síru

Metanogenní bakterie potřebují samozřejmě i síru pro svůj růst. Ta může být odebírána z nejrůznějších zdrojů jako síra elementární, siřičitany, thiosírany, sírany anebo síru obsahující aminokyseliny. I když produkty sulfát – redukujících bakterií (SRB) mohou inhibovat metanogenezi, platí to pouze při jejich velkých přebytcích. Nízké koncentrace sulfidů jsou naopak pro metanogeny žádaným optimem. Koncentrace rozpustných ionizovaných sulfidů v reagující suspenzi je též funkcí koncentrací kovových kationů a pH (Straka a kol., 2003).

3.2.10 Požadavky na fosfor

Potřebný poměr uhlíku ku fosforu v substrátu pro methanogeny je přibližně C/P = 100 až 150 ve hmotnostních údajích. Tedy potřeba cca 1- 1,5 kg P na každých 100 kg uhlíku v substrátu (Straka a kol., 2003).

3.2.11 Ostatní požadavky

Podobně jako jiné živé organismy potřebují metanogeny i četné stopové prvky. Ustavování rovnovážných stavů mezi kovovými ionty a sulfidy může být velmi významným faktorem ovlivňujícím průběh metanogeneze, neboť velká část stopových kovů, které metanogeny potřebují, poskytuje v daných rozmezích pH se sulfidy nerozpustné formy. Ovlivnění dodávek stopových prvků koncentracemi sulfidů se netýká Na, K, Mg a prakticky též nejsou ovlivněny přísuny Mo, W a Se. Naproti tomu dodávky Ni, Co, Cu a Fe jsou silně závislé na hodnotách pH a koncentracích sulfidu (Straka a kol., 2003).

3.2.12 Přítomnost toxických a inhibujících látek

Za toxické nebo inhibující považujeme látky, které nepříznivě ovlivňují biologický proces. Nejčastěji se setkáváme s inhibičními účinky amoniaku a nižších mastných kyselin, jejichž tvorba je závislá na pH procesu (Ust'ak, Váňa a kol, 2006).

Při nízkém pH mohou inhibičně působit mastné kyseliny, při vysokém amoniak (Dohányos, 2008).

3.2.13 Zatížení vyhnívacího prostoru

Takzvané zatížení vyhnívacího prostoru udává, jaké maximální množství organické sušiny na m^3 a den může být dodáno do fermentoru, aniž dojde k překrmení bakterií a zastavení anaerobního procesu. Zatížení vyhnívacího prostoru závisí především na úrovni teploty, obsahu sušiny a době kontaktu. Obvyklé zatížení při teplotě 35°C leží mezi 0,5 a 1,5 kg OS/m^3 a den (OS = organická sušina), to znamená, že na 1 m^3 obsahu fermentoru je denně dodáno a zpracováno 0,5 až 1,5 kg organické sušiny. Zatížení vyhnívacího prostoru lze zvýšit na 3 kg OS/m^3 a den, absolutní horní hranice je dosaženo při 5 kg os/m^3 a den (Schulz, Eder, 2004).

3.3 Bioplyn

Podle Straky a kol. (2003) je názvem „bioplyn“ obecně míněna plynná směs methanu a oxidu uhličitého. V plynném produktu dobře prosperujících methanogenních mikroorganismů představuje suma CH_4 a CO_2 hodnoty velmi blízké 100 % obj., vždy s výraznou převahou obsahu methanu. Protože se však v technické praxi nemusíme vždy potkat s takovýmto „ideálním“ bioplynem, je zde celá škála dalších plynů, které může bioplyn

obsahovat. Mohou to být zbytky vzdušných plynů (N₂, O₂, Ar), neúplně spotřebované produkty acidogeneze (H₂, přebytek CO₂) anebo další minoritní a stopové příměsi z předcházejících anebo simultánních reakcí organické hmoty (H₂S, N₂O, HCN, uhlovodíky a jejich většinou kyslíkaté, ale i sirné deriváty).

Bioplyn je svým chemickým složením jednoduchým i komplikovaným systémem současně. Jednoduché je vždy majoritní složení bioplynu, tedy zastoupení složek v jednotkách objemových procent. Reaktorové bioplyny jsou prakticky tvořeny pouze binární směsí metanu a oxidu uhličitého v různých poměrech podle podmínek biometanizace a podle kvality substrátu. Velmi komplikované je ale složení stopových příměsí v bioplynech (Straka a kol., 2003)

Rozkládající se plyn je směs blízká hustotě vzduchu, a tato směs je potenciálně explozivní (McLaughlin, Peterson, 2006).

3.4 Možnosti intenzifikace procesu biometanizace

Intenzifikace metanizačních procesů musí vycházet ze základních vlastností procesu. Mikroorganismy, které se zúčastňují metanizačních procesů, se vyznačují nízkými růstovými rychlostmi a nízkou rychlostí odstraňování substrátu. Mezi nejpomalejší reakce patří obvykle hydrolýza, tj. převedení nerozpustného znečištění na rozpustné, zejména při rozkladu znečištění, jakým jsou kaly a tuhé odpady. Na tyto procesy musí být především zaměřeno úsilí intenzifikace (Dohányos, 2009a).

3.4.1 Biologická rozložitelnost

Anaerobní rozklad čistých organických látek je z hlediska převodu hmoty a energie ze substrátu do produktů dobře znám a definován; v praxi se však málokdy setkáváme se substrátem s přesně definovaným složením, většinou je nutné anaerobně zpracovávat komplexní substrát, navíc s proměnlivým počtem i poměrem jeho složek. Rychlost a hloubka biologického rozkladu závisí, kromě druhu zpracovávaného materiálu, jeho chemické a fyzikální struktury, také na přítomnosti vhodného druhu mikrobiálních společenstev a enzymových systémů (Dohányos, 2009b).

Biologická rozložitelnost, a tím i výtěžnost bioplynu, závisí na chemickém složení substrátu, na obsahu uhlohydrátů, tuků, proteinů a na obsahu celulózy, hemicelulózy a ligninu

a na poměru jednotlivých komponent. Vzhledem k tomu, že poměr těchto komponent v různých druzích suroviny je různý, odlišná je i jejich rozložitelnost a výtěžnost metanu (Dohányos, 2009a).

3.4.2 Vstupní suroviny

V bioplynových stanicích je možné efektivně zpracovat širokou škálu bioodpadů a různých materiálů, včetně takových, které jsou jinak obtížně zpracovatelné :

- bioodpady z údržby veřejné zeleně (tráva, listí, ale nikoliv dřevo)
- bioodpady z domácností a ze zahrad
- prošlé potraviny a bioodpady ze supermarketů
- zbytky z jídelen, restaurací a hotelů
- bioodpady z podnikatelských provozů (pekárny, lihovary, pivovary, cukrovary, masokombináty)
- výstupy z chovu hospodářských zvířat (kejda, hnůj, atd.)
- cíleně pěstovaná fytomasa (kukuřice, řepa, senáž, atd.) (CZ Biom, 2007).

3.4.2.1 Problémy biologické rozložitelnosti hlavních substrátových skupin suroviny

Hlavní zdroje poskytující v biologicky rozložitelných podílech odpadů či biomasy metan jsou polysacharidy, proteiny a lipidy (Straka a kol., 2003).

3.4.2.2 Polysacharidy a rostlinná biomasa

Vlastní biomasa rostlin včetně dřevin je tvořena zesílenými stěnami buněk. Buněčná struktura je kompozitní povahy, kde dlouhé řetězce celulózy vytvářejí jakousi „buněčnou armaturu“ vytvořenou z vláken – celulózových fibril. Tato vlákna mají relativně jednoduchou strukturu a sestávají z D-anhydroglukopyranózových jednotek spojených (1-4)- β -D-glykosidovou vazbou. Celulózová vlákna jsou obtáčena rozvětvenými řetězci hemicelulóz a struktura je jako celek zpevněna zesíťovanou výplní ligninu (Straka kol., 2003).

Z polysacharidů je nejlépe rozložitelný škrob, poměrně snadno se hydrolyzuje amylolytickými enzymy na jednoduché sacharidy. Škrobová zrna rostlin obsahují 10-20 % polysacharidů rozpustných ve vodě s molekulovou hmotností 10000-50000 (amylóza) a 80-90 % polysacharidu nerozpustného ve vodě s molekulovou hmotností 50000-1000000 (amylopektin) (Straka a kol., 2003).

Celulóza je schopna vytvářet krystalické formy a její řetězce jsou různě prostorově orientovány (spirální i lineární struktury). Základní cukernou složkou celulózy je D-glukóza. V průměrném řetězci celulózy je vázáno za sebou okolo 1000 molekul glukózy (Straka a kol., 2003). V biotechnologickém procesu je relativně málo rozložitelná. Pro její hydrolýzu je nutná přítomnost celulólytických enzymů, které jsou přítomny v zažívacím traktu přežvýkavců. Další skupinou polysacharidů jsou heteropolysacharidy - hemicelulózy, které tvoří rozvětvené řetězce s prostorovou strukturou (Dohányos, 2009a).

Hemicelulózy jsou oproti celulóze mnohem složitější heteropolysacharidy, jsou většinou amorfni a obsahují rozvětvené řetězce. Je-li celulóza buněčnou armaturou, pak hemicelulóza s afinitou k celulóze a se svými rozvětvenými řetězci je podpůrnou, resp. prostorovou armaturou celého systému. (Straka a kol., 2003). Hemicelulózy podléhají snáze a rychleji enzymatické hydrolýze než celulóza (Straka a kol., 2003; Dohányos, 2009a).

Hemicelulózy a celulózy nejsou jedinými polysacharidy v rostlinných hmotách. Hemicelulózy se řadí mezi tzv. necelulózoové polysacharidy, s nimiž společně vytváří vlákninu (Straka a kol., 2003). Tento autor ještě dodává, že škrob je taky významným polysacharidem. Škrob slouží jako rostlinná energetická rezerva, je velmi snadno rozložitelný a též poskytuje D-glukózu jako koncový produkt depolymerace sacharidového řetězce.

Podle Calvarheio a kol. (2008) mohou být hemicelulózy během přeúpravy, v závislosti na postupu a podmínkách, rozštěpeny na slabé kyseliny, deriváty furanů a fenoly. Tyto složky mohou později inhibovat proces fermentace a vést k nižším produkcím bioplynu.

Vedle biologicky rozložitelných sacharidů a polysacharidů obsahuje rostlinná biomasa i látky, jejichž biologická rozložitelnost je velmi nízká až nulová. Mezi tyto látky patří především lignin a též lignany a terpeny (Straka a kol., 2003).

Lignin je aromatický prostorový heteropolymér fenolického typu. Fenolická polymerní struktura způsobuje jeho rezistenci vůči biologickému rozkladu. Lignany lze považovat za prekurzory tvorby ligninu a spolu s terpeny patří mezi obtížně biologicky rozložitelné látky (Straka a kol., 2003). Podle tohoto autora je lignin organickou součástí nejenom každé rostlinné biomasy, ale materiálů z ní pocházejících, jakou jsou například různé druhy kejdů nebo hnoje a je hlavní součástí biologicky nerozložitelné frakce organických látek v stabilizovaném zbytku po anaerobní stabilizaci.

Ve vzájemně propletených strukturních celulózech, hemicelulózech a ligninu tkví též příčiny různých biologických rozložitelností dřevních biomas. Hemicelulózy jsou obecně nejsnadněji hydrolyzovány na své cukerné složky. Obalení celulóзовých struktur ligninem velmi zpomaluje jejich rozklad, vždy tím způsobem, že je omezen přístup pro hydrolyzující enzymy. Toto platí více i pro rozklad celulózech, které jsou vůči hydrolyze odolnější než rozklad hemicelulózech (Straka a kol., 2003). Podle Kovacs a kol. (2009) je složení a podíl hemicelulózy a ligninu velmi závislé na povaze materiálu. V měkkých dřevech (např. smrk) je více ligninu než v tvrdých dřevech (např. vrba) nebo zemědělských zbytků (např. pšeničná sláma).

3.4.2.3 Lipidy

Tato skupina látek je někdy ztotožňována s termínem „tuky“, čímž jsou míněny triglyceridy vyšších mastných kyselin. Do skupiny lipidů však patří všechny estery vyšších mastných kyselin, které se nacházejí v rostlinných nebo živočišných tkáních. Je skutečností, že v těchto látkách je opravdu nejvíce zastoupen glycerin jako polyalkohol a též to, že nejvíce zastoupeny jsou právě triglyceridy (Straka a kol., 2003).

Společnou charakteristikou lipidů je přítomnost mastných kyselin s dlouhým alifatickým řetězcem a malým počtem atomů kyslíku v jejich molekulách. To je důvod, že tuky mají nejvyšší výtěžnost metanu ze všech skupin substrátů. Podléhají relativně snadno enzymové hydrolyze. Problémem může být technické zvládnutí rozkladu tuků, které díky své hydrofobicitě mohou mít tendenci vyplouvat k hladině, oddělovat se z vodní fáze nebo zvyšovat tvorbu pěny (Dohányos, 2009a).

3.4.2.4 Proteiny

Proteiny neboli bílkoviny vykazují vysokou výtěžnost metanu. Proteiny jako jediné s výše uvedených substrátových skupin obsahují ve svých molekulách heteroatomy. Kromě uhlíku, vodíku a kyslíku obsahují také síru a hlavně dusík (Dohányos, 2009a). Proteiny jsou vysokomolekulární polymery α – aminokyselin, v nichž jsou jednotlivé aminokyseliny vzájemně řetězeny „peptidickými“ vazbami (Straka a kol., 2003).

Tento autor dále uvádí, že celkově se dělí bílkoviny na jednoduché a složené. Jednoduché bílkoviny jsou tvořeny pouze α – aminokyselinami, zatímco bílkoviny složené obsahují jednu i více sloučenin povahy odlišné. Bílkoviny se ve tkáních organismů a rostlin

vyskytují buď samostatně nebo jako nukleoproteidy v kombinaci s nukleovými kyselinami, jako mukoproteidy v kombinaci s cukry či jako lipoproteidy v komplexech s lipidy.

3.4.2.5 Chemická složení substrátů pro biometanizaci

V technologické praxi se většinou setkáváme s komplexním složením suroviny pro anaerobní stabilizaci, v níž jsou zastoupeny v různém poměru (podle původu a zpracování suroviny) všechny výše uvedené skupiny substrátů. Jak již bylo uvedeno, ne všechny organické látky přítomné v surovině se v průběhu anaerobní stabilizace rozloží, část jich zůstává jako tzv. nerozložitelný zbytek ve stabilizovaném materiálu. Jaký podíl organických látek zůstane nerozložený závisí na druhu přítomných organických látek (celulóza, hemicelulózy, lignin) a na technologických podmínkách procesu (teplota, doba zdržení, předúprava) (Straka a kol., 2003).

Specifická produkce bioplynu na 1 kg rozložitelné látky je nejvyšší u tuků (1,12 – 1,51 m³ s obsahem metanu 62 – 67 %). Z 1 kg rozložených sacharidů vzniká 0,79 – 0,88 m³ bioplynu s podílem 50 % metanu. Rozkladem 1 kg bílkovin vzniká 0,56 – 0,75 m³ bioplynu s podílem 71 – 84 % metanu. Bioplyn z dobře pracujících reaktorů se skládá ze 65 – 75 % z metanu, z 25 – 35 % z oxidu uhličitého a z menšího množství vodíku, dusíku, sirovodíku a amoniaku (Ušťak a Váňa , 2006).

3.4.3 Poměr C:N

Poměr C:N je důležitý pro dobrý průběh anaerobního procesu. Jestli je tento poměr vysoký, dochází k deficitu dusíku. Při nízkém poměru dochází k vysoké produkci amoniaku, který je při vyšších koncentracích toxický pro anaerobní bakterie, zejména metanogeny. Toxicky působí nedisociovaná forma amoniaku, jejíž koncentrace závisí především na pH, s vyšším pH silně vzrůstá. Optimální poměr C:N pro anaerobní fermentaci organické frakce tuhého odpadu se pohybuje okolo 25 až 30, vztaženo na biologicky rozložitelný uhlík, pro anaerobní fermentaci exkrementů hospodářských zvířat nebo jatečních a kafilerních odpadů se za optimální poměr C:N považuje 16 až 19. Za kritický se považuje poměr C:N = 12 (Dohányos, 2009a).

3.5 Zlepšení biologické rozložitelnosti organických látek

Rozeznáním materiálu určeného k fermentaci se dosáhne podstatného zvětšení povrchu částic, což zlepšuje jeho přístupnost enzymovému rozkladu. Gerndtová a Andert (2009) uvádí, že dezintegrace zahrnuje procesy rozbití fyzikální nebo chemické struktury zpracovávaného materiálu. Při mechanickém rozbití rostlinných buněk dochází k uvolnění jejich obsahu do roztoku, kde urychluje biologický rozklad. V anaerobních procesech lze tímto zvýšit produkci bioplynu. Hobbs a kol. (2008) dodávají, že předúprava surovin může zvýšit nejen produkci bioplynu, ale vede také k redukci těkavých látek.

Ke zvýšení biologické rozložitelnosti různých druhů surovin pro anaerobní fermentaci se začínají stále více uplatňovat různé metody předúpravy zpracovávaného materiálu. Cílem předúpravy je:

- prohloubení biologického rozkladu a tím zvýšení produkce metanu (bioplynu)
- hygienizace fermentovaného materiálu, kde to požaduje legislativa
- minimalizace množství výstupního stabilizovaného materiálu (u čistírenských kalů) (Dohányos, 2009a).

3.5.1 Biochemické aspekty

Z biochemického hlediska jsou zajímavé nové poznatky o rozkladu látek s nízkou úrovní dostupné volné energie, látek nespasitelných a toxických. Anaerobní mikroorganismy jsou schopny využívat takové látky ke svému růstu, čím ovšem nižší energetický zisk, tím pomalejší růst. Možnost akumulace biomasy v anaerobních reaktorech a její extrémně dlouhé doby zdržení pomáhají pomnožení a udržení těchto organismů. Anaerobní mikroorganismy mají některé metabolické dráhy, které nemohou probíhat za aerobních podmínek, a proto mohou rozkládat některé látky, jenž jsou aerobně těžko rozložitelné nebo nerozložitelné (Straka a kol., 2003).

Takovým procesem je třeba reduktivní dehalogenace a deaminace při štěpení různých derivátů cyklických a aromatických látek. Organismy schopné těchto reakcí jsou v přírodě vyhledávány a jsou studovány jejich vlastnosti a možnosti jejich využití. Zjišťují se podmínky jejich růstu a množení. Získávají se z kontaminovaného prostředí a používají se jako inokulum nebo přídavek inokula ve specifických případech technologického procesu při čištění odpadních vod se stejným charakterem znečišťujících látek (Straka a kol., 2003).

3.5.2 Fyzikálně chemické aspekty

Straka a kol. (2003) uvádí, že zvýšení biologické rozložitelnosti substrátu je založeno na zpřístupnění substrátu enzymovému rozkladu. Toho lze dosáhnout několika způsoby, a to metodami mechanickými, chemickými, fyzikálními nebo enzymovou a mikrobiální předúpravou.

3.5.3 Mechanické metody

Cílem mechanické předúpravy je zmenšení velikosti částic a homogenizace suroviny. Účinnost dezintegrace závisí na použitém zařízení a vložené energii. K tomuto účelu se používají různé drtiče, macerátory, mlýny apod. Desintegrace čistírenských kalů lze také dosáhnout pomocí lýzovacích centrifug nebo ultrazvukem.

Podle Gerndtové a Andrta (2009) je mechanická desintegrace doporučována jako levná a účinná předúprava materiálu. Židek (2005) dodává, že během rozmělnění dochází ke zvětšení reakčního povrchu pro bakterie a dále by měly být uvolněny organické látky rozpustné ve vodném prostředí. Dále Gerndtová a Andart (2009) uvádí, že charakteristickým rysem probíhající metanogeneze je nárůst pH. Rozvoj metanogenů bakterií přináší vzestup na pH 7 a výše. Pro metanotvorné bakterie je optimální teplota 35°C až 37°C (mezofilní bakterie).

Podle Mshandete a kol. (2006) má velikost částic vliv na rychlost anaerobní digesce a dostupnost substrátu pro hydrolyzujících enzymy. To platí zejména u rostlinných vláken. Zmenšíme-li velikost vláken ze 100mm na 2 mm, urychlíme degradaci a zvýší se výnos metanu. Angelidaki a Ahring (2000) zjistili, že zmenšením velikosti vláken na 2 mm, zvýšilo potenciál produkce bioplynu až o 16%. Dále zjistili, že 20% zvýšení produkce metanu bylo dosaženo mechanickou úpravou na 0,35 mm. Žádný významný rozdíl nebyl zjištěn u velikosti částic 5-20 mm.

3.5.3.1 Desintegrace ultrazvukem

Elliott a Mahmood (2007) uvádí, že k destrukci kalu dochází po vystavení vysokofrekvenční zvukové vlny. Roztržení buněčných stěn nastane, když místní tlak ve vodné fázi je snížen pod odpařovací tlak, což má za následek vznik plynových bublin. Rychlé zhroucení a rozšíření mikrobublin zapříčiní lokální vysoká teplota a vysoký tlak gradientů v kapalně fázi, které přetrhají buněčné membrány. Použití ultrazvuku vytváří mechanické

smyskové síly prostřednictvím kavitace. Běžně se užívají vysokofrekvenční zařízení mezi 20 a 40 kHz. Stupeň kavitace vzniklé po působení ultrazvuku ovlivňují faktory, jako jsou viskozita, tlak, pevné látky a koncentrace rozpuštěného plynu (De Silva, 2005; Roxburgh a kol., 2005).

Čuba a kol. (2003) i Elliot a Mahmood (2007) se shodují, že při anaerobní fermentaci takto upraveného kalu bylo dosaženo snížení obsahu organických látek a došlo ke zlepšení výkonu anaerobního reaktoru. Kim a kol. (2003) zjistili, produkce metanu po úpravě čistírenských kalů ultrazvukem se zvýšila až o 34% ve srovnání od neupraveného kalu.

3.5.3.2 Kavítace

Podle Elliotta a Mahmooda (2007) existuje řada technologií, které zahrnují působení vysokotlakých gradientů na stěny buněk, aby došlo k prasknutí. Ve výsledku dojde k lepší produkci metanu. Hlavním přínosem je, že proces mezofilní anaerobní digesce může být urychlen o 13 – 6 dnů.

3.5.4 Chemické metody

Chemická předúprava zahrnuje alkalickou nebo kyselou hydrolýzu a použití oxidačních činidel a to samostatně nebo ve vzájemné kombinaci anebo v kombinaci s vyšší teplotou. Rozklad kyselinami a louhy - hydrolýzu lze realizovat v podstatě v celém rozsahu pH. V kyselém prostředí kyseliny chlorovodíkové při pH 6 proběhne hydrolýza během 6 až 12 hodin. V zásadité oblasti pH 11,5 - 12,5 dochází k hydrolýze během 20 až 30 minut. Tuto metodu lze aplikovat zejména na materiály obsahující celulózu, ale byla aplikována i na čistírenské kaly (Straka a kol., 2003).

Kombinace chemické předúpravy s tepelnou zlepšila solubilizace a produkci bioplynu. Nicméně přidání chemikálií dělá tuto předúpravu méně ekonomicky atraktivní (Toreci a kol., 2009).

3.5.4.1 Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza může být zvláště výhodná při užití rostlinného materiálu v anaerobní digesti. Gunaseelan (1994) přidal Parthenium, invazní plevel s vysokým obsahem ligninu, do procesu anaerobní digesce a zjistil, že produkce metanu byla výrazně vyšší za přítomnosti

alkalických činidel. Rychlost degradace papírovového odpadu s přidáním NaOH byla o 10% vyšší (Clarkson a Xiao, 2000).

Avšak alkalická úprava neprobíhá bez problémů. Přidáváním alkalicky ošetřených vzorků do kontinuálního reaktoru (jejichž počáteční koncentrace sodíku nebo draslíku činila 0,21 mol l⁻¹), zapříčinila pokles degradace acetátu a glukózy o 5% až 50%, Toto bylo zapříčiněno toxickými látkami vznikajícími při reakci (Mouneimne a kol., 2003).

3.5.4.2 Oxidační předúprava kalů

Podle Appels a kol. (2008) byla oxidační předúprava odpadních kalů poprvé v aerobním procesu Zimpro původně navrženém jako mokrá oxidační metoda v USA (1954). Tento proces probíhá za přítomnosti kyslíku nebo vzduchu při vysokých teplotách (260 °C) a tlaku (10MPa). Bylo dosaženo efektivní solubilizace velké části kalu. Avšak problémy se zápachem, korozi a vysokými energetickými náklady omezily praktické využití tohoto procesu. Moderní metody užívající mokrou oxidaci dosahují 20% solubilizace a celkově 75% oxidace. Nejčastější studie oxidačních metod jsou ozonizace a peroxidace. Tyto metody patří do pokročilých oxidačních procesů a jsou založeny na vytváření hydroxylových radikálů, které jsou extrémně silné oxidanty.

Ozón vyvolá současně částečnou oxidaci a hydrolýzu organické hmoty. Buněčné stěny mikroorganismů jsou rozrušeny a cytoplasma je rozpuštěna. Látky nerozpustné ve vodě s vysokou molekulovou hmotností jsou rozštěpeny na menší, ve vodě rozpustné a rozložitelné fragmenty. Při ozonizaci také dochází ke snížení počtu patogenních mikroorganismů (Dohányos, 2009b).

3.5.4.3 Aplikace kovů

Hobbs a kol. (2008) uvádí, že přidání některých kovů do substrátů zvýšilo produkci anaerobní digesce. Bylo prokázáno, že efektivní odstranění propionátu na vysoké úrovni těkavých mastných kyselin vyžaduje doplnění Ca, Fe, Ni a Co do termofilního reaktoru.

3.5.5 Termická předúprava

Termická předúprava je jednou z prvních metod předúpravy, která byla realizována (Toreci a kol., 2009). Appels a kol. (2008) uvádí, že tepelné zpracování odpadu-aktivovaného kalu bylo poprvé představeno v roce 1970 jako efektivní předúprava pro anaerobní digesci. Termickou předúpravu zahrnuje proces hydrolýzy. Hydrolýza je rozkladná reakce, při které se spotřebovává voda (při každém kroku jedna molekula); např. celulóza se při hydrolýze štěpí na kratší řetězce - až na monomery. Vystavení obtížně rozložitelného bioodpadu vysokým teplotám a s nimi spojených vysokým tlakům se ukázalo být účinnou metodou pro dosažení desintegrace a zároveň snížení času potřebného k hydrolýze (Elliott a Mahmood 2007).

Termická hydrolýza je technologický proces, při kterém se biologicky rozložitelný odpad rozmělní – mikronizuje a homogenizuje a přesně dávkuje do hydrolyzéry (Straka kol., 2003). Principem metody je, že zpracovávaná surovina se za vysokého tlaku zahřeje na vysokou teplotu (130 – 180 °C) po určitou dobu (1 až 30 min.) poté se tlak uvolní čímž dojde k další destrukci kavitací . Termickou úpravou suroviny dochází k hydrolýze tuhých buněčných komponent. Vysoká teplota naruší buňky a způsobí hydrolýzu proteinů, uhlovodíků, tuků a dalších makromolekul vylučovaných z buňky. Působením termické úpravy se však mohou rozpouštět, popř. mohou vznikat sloučeniny, které nejsou biologicky rozložitelné. Termická předúprava rozbije buněčné stěny a zpřístupní proteiny biologickému rozkladu. (Dohányos, 2009b). Reakcí stabilizovaný substrát (BRO) se následně upravuje a dopravuje k dalšímu využití. Takto upravený BRO je biologicky stabilní. Lze ho nejen skladovat , ale i později využít v technologických procesech likvidace nebo zušlechtění BRO - prosté spalování ve formě pelet nebo jako hnojivý substrát. Takto upravený BRO vydá až o 30 % více bioplynu v kratším časovém úseku a 100 %. Termickou hydrolýzu lze tak s úspěchem použít i na jiné druhy vstupních surovin se stejným efektem tvorby bioplynu (Straka a kol., 2003).

Mladenovska a kol. (2006) v pokusech zjistili, že zahřátí pevné frakce hnoje a kejdy na 100 - 140 °C před samotným procesem anaerobní digesce zvýší produkce metanu a sníží produkci těkavých látek v termofilním kontinuálním reaktoru. Dřívější studie termické hydrolýzy prokázaly, že tepelně předupravená prasečí kejda, která byla zahřáta na 80 ° C vykazuje vyšší produkci metanu než kejda zahřátá na 60 ° C (Bonmati a kol., 2001).

3.5.5.1 Termotlaká hydrolýza

Termotlaká hydrolýza je technologický proces, při kterém zahřejeme a stlačíme substrát až na teplotu 180°C a tlak 1,2 MPa. Po dosažení této teploty a navrženém zdržení materiálu následuje šoková expanze na atmosférický tlak. Termotlaká hydrolýza je dále doplněna tryskovou expanzí. To je další fyzikální děj, při kterém se přehřátá směs substrátů (180 °C) vypouští do expanzní nádoby, ve které je normální tlak i teplota. Při tom materiál expanduje, prudce se odpařuje část vody substrátu uvnitř materiálu i uvnitř buněk a dochází k lýzi buněčných těl, což dále zvyšuje rozložitelnost substrátů. 99 % substrátů je díky této předúpravě ztraveno mikroorganismy z 90 % během prvních 15–20 dnů setrvání ve fermentoru. Tato skutečnost vede k výrazně menší potřebě fermentačního objemu. Dále je nutno uvést, že průměrný obsah metanu v bioplynu se pohybuje v rozmezí 65–70 % a průměrná výtěžnost vzrostla o 15–30 % (Habart, 2008).

3.5.6 Biologická předúprava

K uvolnění obsahu buněk následkem rozrušení buněčných stěn (buněčný lyzát) dochází jednak přirozenou cestou (autolýzou) u všech odumřelých buněk, a dále pomocí hydrolytických enzymů uvolňovaných do roztoku fermentačními bakteriemi nebo fyzikálními metodami destrukce bakterií. Buněčný lyzát působí stimulačně na činnost a růst mikroorganismů. Působí stimulačně buď přímo nebo nepřímo tím, že enzymy v něm obsažené způsobují lyzi dalších mikrobiálních buněk. Dále obsahuje některé enzymy nebo části enzymů potřebné k rozkladu organických látek. Přídavek již malého množství buněčného lyzátu (0,5-10 %) k rozkládanému materiálu zrychluje rozklad rozpuštěných, dobře rozložitelných organických substrátů a zrychluje a prohlubuje mikrobiální rozklad nesnadno rozložitelných a nerozpuštěných organických substrátů (Straka a kol., 2003).

Urychlení probíhajících biodegradačních reakcí má za následek zkrácení doby zdržení pro stejný efekt, což umožní zmenšení potřebného objemu reaktoru, nebo prohloubení biologického rozkladu, tj. podstatně více organických látek je rozloženo a tím se sníží množství zbývajících nerozloženého materiálu (Dohányos a kol., 2008).

Za biologickou předúpravu můžeme považovat i silážování rostlinné biomasy. Například v průběhu silážování travní hmoty dochází k výrazným ztrátám organických látek (30 % za 6 měs.), specifická produkce metanu klesla z 0,23 na 0,14 m³/kg vztaženo na původní organickou sušinu. Při silážování těže suroviny s přídavkem kyseliny mravenčí bylo dosaženo zvýšení produkce metanu o 13-22 % vztaženo na původní organickou sušinu

oproti produkce z čerstvého materiálu, a o 47-86 % oproti produkce materiálu silážovanému po stejnou dobu ale bez aditiva (Dohányos, 2009b).

3.5.6.1 Lyzátovací centrifuga

Buněčný lyzát lze využít k urychlení hydrolýzy krmných surovin. Aktivita intracelulárních enzymů a stimulační látky uvolněné z buněk mohou zvýšit produkci metanu o cca 60% v surovém kalu (Dohányos a kol., 1997).

Straka a kol. (2003) a Dohányos a kol. (2008) popsali vhodnou konstrukční úpravu zahušťovací centrifugy pro zvětšení množství rozrušených buněk aktivovaného kalu. Konstrukční úprava centrifugy spočívá v namontování lyzovacího (dezintegračního) zařízení do té části odstředivky, kde zahuštěný kal již opustil zahušťovací prostor, čímž lze dosáhnout destrukci podstatně většího množství buněk a tím i vytvořit potřebné množství lyzátu a to vše bez zvýšení elektrického příkonu centrifugy. Množství rozbitých buněk závisí na parametrech centrifugy (počet otáček, průměr bubnu a pod.), na druhu dezintegračního zařízení a na druhu a kvalitě zpracovávané biomasy. Tuto úpravu lze s výhodou provést u zahušťovací centrifugy pro zahušťování přebytečného aktivovaného kalu

3.5.7 Technologické aspekty biologické rozložitelnosti a výtěžnosti metanu

Podle Dohányose (2009a) jsou hlavními technologickými parametry každé suroviny důležitými pro anaerobní stabilizaci:

- koncentrace celkové sušiny,
- obsah organických látek v sušině,
- obsah celkového dusíku,
- CHSK homogenizovaného vzorku,
- obsah organického uhlíku,
- výtěžnost metanu nebo bioplynu

První tři parametry jsou nezbytné pro použití dané suroviny, další jsou pomocné a umožňují stanovit teoretickou i skutečnou výtěžnost metanu nebo bioplynu. CHSK umožňuje dále provádět bilanci anaerobní stabilizace – tvorby metanu respektive bioplynu.

4 Materiál a metody

Pro zjištění kvantitativní produkce bioplynu byly odebrány vzorky z oblasti Příbramska a to konkrétně z lokalit Trhové Dušníky a Podlesí.. Tyto lokality se liší úrovní kontaminace znečišťujícími polutanty. Způsob odběru byl proveden tak, aby se dosáhlo reprezentativního vzorku a to odběrem z několika míst v každé jednotlivé lokalitě. Pokus se uskutečnil v areálu České zemědělské univerzity v Praze v pokusné stáji FAPPZ. Pokus trval celkem 26 dní, byl založen 18. ledna 2012 a poslední měření proběhlo 12. února 2012. U vzorků byly v laboratoři měřeny následující parametry: kvantitativní produkce bioplynu, dále veškeré látky, veškeré organické látky, pH, obsah N-amonného a CHSK (chemická spotřeba kyslíku).

4.1 Vstupní materiál

Jako substrát byla použita reprezentativní směs listů topolů a vrb z lokalit Trhové Dušníky a Podlesí na Příbramsku. Tyto lokality se liší mírou kontaminace jednotlivých prvků (viz tabulka č.2). Každá směs byla v pokusu aplikována ve dvojím provedení, která se lišila stupněm předúpravy. V prvním případě se jedná o mechanickou předúpravu, která spočívala v rozdrčení směsi rukou a zmenšení velikosti listů na velikost částic cca 2 – 4 mm. Druhý způsob předúpravy spočíval v působení termotlaké hydrolýzy na daný substrát. Termotlaká hydrolýza byla uskutečněna ve VÚRV Chomutov. Princip této předúpravy byl založen v zahřátí na teplotu 165°C při dosažení tlaku 10 – 12 MPa a době zdržení 15 min.

Tabulka č. 2. Obsah rizikových prvků v surových substrátech v mg/kg

vzorek	Al [mg/kg]	Cd [mg/kg]	Cr [mg/kg]	Cu [mg/kg]	Fe [mg/kg]
Podlesí	38,938	40,539	0,084	6,781	55,054
Trhové Dušníky	36,331	21,597	0,083	7,183	48,543

vzorek	Mn [mg/kg]	Ni [mg/kg]	P [mg/kg]	Pb [mg/kg]	Zn [mg/kg]
Podlesí	134,562	3,774	2623,272	30,458	723,509
Trhové Dušníky	54,866	0,744	2677,137	4,346	1114,499

Vstupní substrát se lišil nejen v obsahu těžkých kovů, ale také v obsahu veškerých látek a veškerých organických látek (viz Tabulka č. 3). Podle obsahů veškerých látek byla vypočtena navážka jednotlivých substrátů.

Tabulka č. 3. Obsah veškerých látek, veškerých organických látek a navážka substrátů

	VL [%]	VL _{org} [%]	VL _{org} čerstvé hmoty [%]	Navážka [g]
Trhové Dušníky nehydrol.	84,80	66,47	56,37	0,979
Podlesí nehydrol.	42,30	67,29	28,48	1,962
Trhové Dušníky hydrol.	11,87	56,32	6,71	6,991
Podlesí hydrol.	13,86	61,64	8,54	5,990

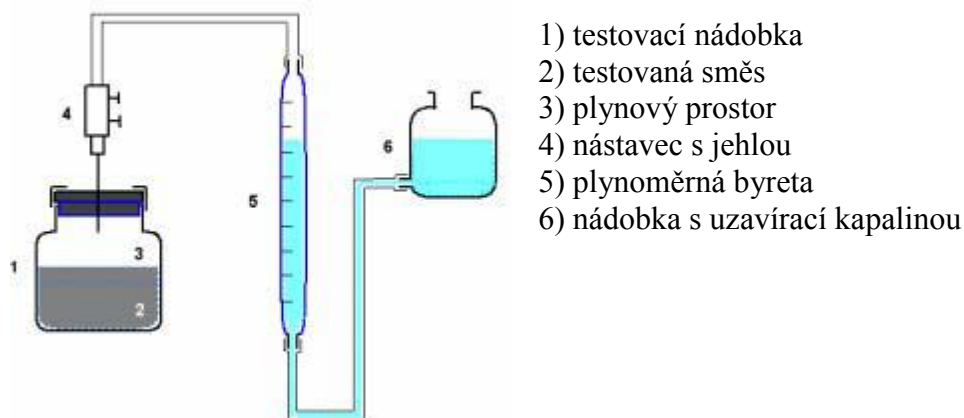
4.2 Založení testu

Test byl založen dle metodiky Rosenberga (2003). Pro průběh anaerobní digesce bylo použito inokulum z bioplynové stanice Krásná Hora. Znamé množství inokula bylo spolu se substrátem nadávkováno do testovacích sériových lahvíček SIMAX o objemu 120 ml a dolito destilovanou vodou na objem cca. 80 ml. Lahvičky byly hermeticky uzavřeny. Pokus pro kontrolu a porovnání probíhal v pěti sériích a každá série po deseti opakováních. V první sérii byl nadávkován surový substrát (rozdrcená sušená směs listů) z lokality Trhové Dušníky, v druhé surový substrát z lokality Podlesí. Do třetí série byl nadávkován hydrolyzovaný vzorek z Trhových Dušníků a do čtvrté hydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí. V páté sérii byl nasazen slepý test - samotné inokulum. Lahvičky byly kultivovány při stálé teplotě $40 \pm 1^\circ\text{C}$, v našem případě v dřevěné termokomoře, která byla umístěna v pokusné stáji FAPPZ v areálu ČZU. V termokomoře se nacházel prostor jednak pro kultivaci vzorků, prostor pro aparaturu měření bioplynu, což zpřesňuje její fungování, a samotný prostor pro manipulaci se vzorky a měření. V průběhu pokusu nebyly zaznamenány problémy se změnou teploty.

4.3 Popis aparatury a princip měření

Nejčastěji používanou metodou je objemové měření produkce plynu, které je založeno na principu měření objemu kapaliny plynem vytlačené. Testované materiály jsou inkubovány v plynotěsných skleněných sériových lahvích opatřených gumovým septem zajištěným převlečnou hliníkovou maticí. Plyn, hromadící se v plynovém prostoru baňky, je v určitých časových intervalech (zpočátku testu 1 - 2x denně, ke konci pokusu, kdy je vývin plynu již pomalejší, 2 - 3x týdně) přepuštěn do plynoměrné byrety. K přepuštění dojde díky přetlaku v lahvičce jejím spojením s byretou pomocí silikonové hadičky opatřené nástavcem s jehlou, která je zavedena skrz gumové těsnění uzávěru (septum). Uvolněný plyn vytlačí z byrety uzavírací kapalinu, kterou je nasycený roztok NaCl okyselený HCl na pH 4,5 zabraňující rozpouštění CO₂, do nádoby otevřené do atmosféry. Po vyrovnání hladiny kapaliny v nádobce s hladinou v byretě je možno odečíst objem expandovaného plynu (obr. 1) (Šmejkalová, 2005).

Obrázek č. 1. Schéma aparatury pro testy rozložitelnosti s diskontinuálním objemovým měřením produkce plynu



Výsledkem měření je křivka produkce bioplynu. Tato křivka je průměrem všech opakování (v našem případě se jedná o 10 opakování). Z této křivky můžeme zhodnotit průběh rozkladu, celkovou produkci bioplynu nebo maximální rychlost produkce.

4.4 Analytická stanovení

Na začátku a v průběhu pokusu jsme analyticky stanovovali koncentraci veškerých látek, veškerých organických látek a CHSK (chemická spotřeba kyslíku) odstředěných i neodstředěných vzorků, dále pH a obsah amoniakálního dusíku. Vzorky pro analýzy byly vybrány náhodně. První stanovení proběhlo těsně před založením pokusu, další analýzy byly stanoveny po 320 a 460 hodinách od založení pokusu. Poslední měření proběhlo po 600 hodinách a poté jsme provedli poslední laboratorní stanovení.

Pokus byl založen v pěti sériích a každá série obsahovala 10 pokusných lahviček. V průběhu pokusu byly pro každá analytická stanovení odebrány dva náhodné vzorky z každé série. To znamená, že po 320 hodinách od založení pokusu byly odebrány dvě lahvičky z každé série a produkce bioplynu byla zaznamenávána z 8 zůstávajících lahviček v každé sérii. Po odebrání dalších 2 náhodných vzorků z každé série po 460 hodinách od založení pokusu bylo stanovováno množství vyprodukovaného bioplynu ze 6 lahviček.

4.4.1 Stanovení koncentrace veškerých rozpuštěných a veškerých látek, stanovení organických látek

Veškeré látky jsou v podstatě součtem látek rozpuštěných a nerozpuštěných. Jejich stanovení patří mezi základní ukazatele chemických vlastností materiálů. Jedná se o základní sledovaný parametr i z hlediska bioplynové technologie a produkce bioplynu. Ke stanovení veškerých, rozpuštěných a nerozpuštěných látek se používá gravimetrické uzanční skupinové stanovení (Horáková a kol., 2003).

4.4.1.1 Koncentrace veškerých látek

Nejprve byla zvážena miska, do které bylo následně odpipetováno známé množství vzorku z testovací lahvičky. Bohužel jsme se potýkali s nedostatkem vzorku pro tato analytická měření, proto se nám často nepodařilo navázat potřebných 10 g. Důkladně homogenizovaný vzorek se nechal odpařit ve vodní lázni a poté byl vložen do sušárny, kde se sušil 2 hodiny při 105°C do konstantní hmotnosti. Po vychlazení byl zvážen.

4.4.1.2 Stanovení rozpuštěných látek

Stanovení rozpuštěných látek probíhalo obdobně jako stanovení veškerých látek. Rozdíl spočíval v tom, že byly odstraněny pevné částice. Nerozpuštěné látky byly po dobu 12 minut a otáčkách 9500 odstředovány v odstředivce.

4.4.1.3 Stanovení nerozpuštěných látek

Koncentrace nerozpuštěných látek je dána rozdílem koncentrací látek veškerých a látek rozpuštěných (Horáková a kol., 2003).

4.4.1.4 Stanovení ztráty žiháním

Pro toto stanovení se dala zvážená miska po procesu sušení ze stanovení veškerých a rozpuštěných látek do pece na dobu jedné hodiny při teplotě 550°C. Pak byla vyjmuta miska z pece a opět zvážena. Ztráta žiháním byla určena jako rozdíl této hmotnosti a hmotnosti po vysušení. Ztráta žiháním homogenizovaného vzorku odpovídá dle uzance koncentraci veškerých organických látek. Ztráta žiháním odstředěného vzorku pak udává koncentraci rozpuštěných organických látek. Rozdíl ztrát žihání homogenizovaného a odstředěného vzorku pak odpovídá koncentraci nerozpuštěných organických látek. Koncentraci anorganických látek odpovídá zbytek po žihání. Zbytek po žihání odstředěného vzorku odpovídá koncentraci rozpuštěných anorganických solí (Horáková a kol., 2003).

4.4.2 Chemická spotřeba kyslíku

Metoda je založena na oxidaci organických látek obsažených ve vzorku dichromanem draselným v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu při teplotě 150°C. Oxidace organických látek je katalyzována ionty Ag^+ a probíhá v nadbytku dichromanu. Pro maskování chloridů, které by byly za podmínek stanovení oxidovány na Cl_2 a způsobovaly by tak při stanovení CHSK_{Cr} pozitivní chybu, se přidává síran rtuťnatý. Při oxidaci oxidovatelných látek přítomných ve vzorku se dichromanové ionty redukují na ionty chromité. Koncentrace chromitého iontu vzniklého redukcí dichromanu draselného, která je úměrná obsahu organických látek ve vzorku, se stanoví metodou absorpční spektrofotometrie (Horáková a kol., 2003).

4.4.3 Stanovení koncentrace amoniakálního dusíku

Koncentrace amoniakálního dusíku se stanovovala přímo po naředění odstředěného vzorku fotometrickou metodou. Stanovení je založeno na reakci amoniaku, chlornanu a salicylanu, tato reakce zbarví roztok zeleně.

4.4.4 Hodnota pH

Stanovení pH se určovalo pomocí digitálního pH-metru. pH-metr se nejprve řádně zkalibroval použitím kalibrovacích roztoků a poté byl připraven na vlastní měření, které probíhalo vnořením pH-metru do lahvičky se vzorkem.

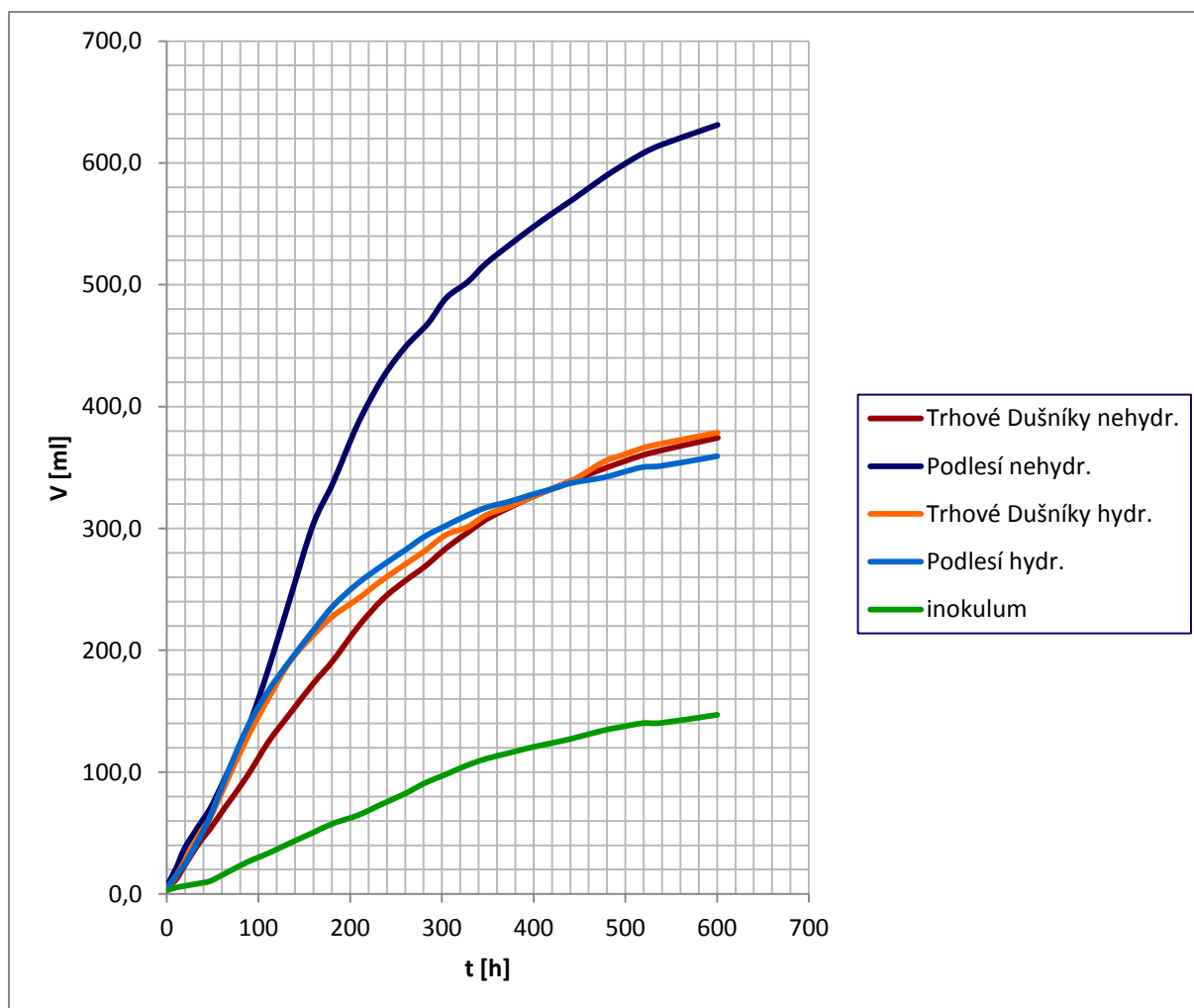
5 Výsledky

5.1 Laboratorní měření

Produkce bioplynu byla měřena v termokomoře v mezofilních podmínkách při teplotě $40\pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 600,2 hodin. Měření produkce bioplynu probíhalo v pravidelných časových intervalech, v prvních dnech vysoké produkce 2x denně, později 1x denně. Proto můžeme sledovat nejen kumulativní produkci bioplynu, ale také průběh produkce bioplynu. Tento typ testu nám bohužel neumožňuje určit jeho složení.

5.1.1 Kumulativní produkce bioplynu

Graf č. 1. Kumulativní produkce bioplynu.



Tabulka č.4. Kumulativní produkce bioplynu.

	Kumulativní produkce bioplynu	Produkce bioplynu po odečtení produkce inokula
vzorek	[ml]	[ml]
Trhové Dušníky nehydrol.	374,3 ± 9,733	227,3 ± 21,733
Podlesí nehydrol.	631,2 ± 10,383	484,2 ± 22,383
Trhové Dušníky hydrol.	378,6 ± 25,683	231,6 ± 37,683
Podlesí hydrol.	359,3 ± 16,833	212,3 ± 28,833

Z grafu kumulativní produkce bioplynu je patrné, že nejvíce bioplynu za měřenou dobu vyprodukoval nehydrolyzovaný vzorek z lokality Podlesí a to $631,2 \pm 10,383$ ml. Po odečtení hodnoty inokula, které vyprodukovalo $147 \pm 12,000$ ml bioplynu, dává hodnotu $484,2 \pm 22,383$ ml. Druhým největším producentem byl hydrolyzovaný vzorek z lokality Trhové Dušníky, který po odečtení hodnoty produkce inokula uvolnil $231,6 \pm 37,683$ ml bioplynu. Za ním následuje nehydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí se $227,3 \pm 21,733$ ml po odečtení produkce inokula. Nejnižší produkci bioplynu jsme zaznamenali u hydrolyzovaného substrátu z Podlesí ($212,3 \pm 28,833$ ml po odečtení hodnoty inokula).

V prvních 100 hodinách pokusu jsme zaznamenali podobnou kvantitativní produkci bioplynu u obou substrátů z Podlesí a u hydrolyzovaného substrátu z Trhových Dušníků. Produkce nehydrolyzovaného substrátu Trhové Dušníky byla nižší. Po 120. hodině od založení pokusu začal nehydrolyzovaný substrát Podlesí produkovat výrazně vyšší množství bioplynu než ostatní substráty. Hydrolyzované substráty Trhové Dušníky a Podlesí se v produkci nijak výrazně nelišili.

Po přibližně 430 hodinách od začátku založení pokusu se kumulativní produkce nehydrolyzovaného a hydrolyzovaného vzorku Trhové Dušníky vyrovnala hydrolyzovanému vzorku z Podlesí, poté se jejich produkce opět rozešla. Ačkoli měl hydrolyzovaný vzorek z Podlesí na začátku vyšší produkci než nehydrolyzovaný vzorek z Podlesí a hydrolyzovaný vzorek z Trhových Dušníků, jeho produkce se ve srovnání s těmito vzorky snížila.

Po 500. hodině došlo k poklesu produkce u všech měřených substrátů a po 600,2 hodinách byl pokus ukončen.

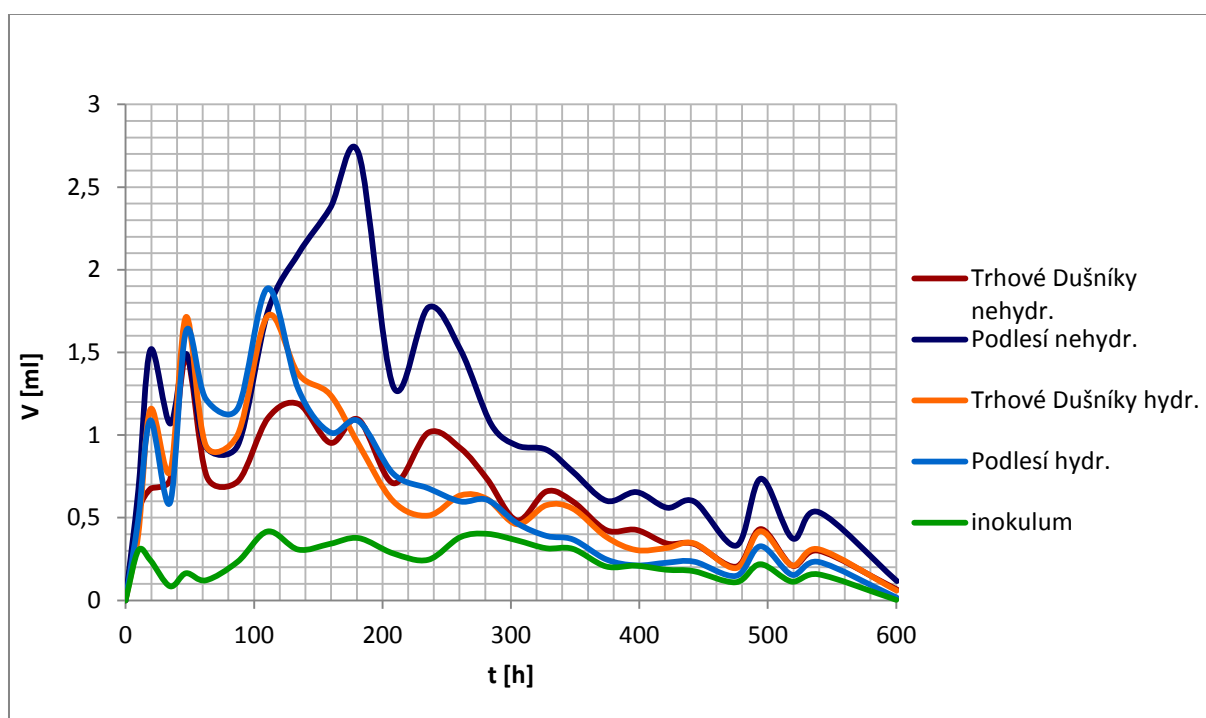
Tabulka č.5. Produkce bioplynu z čerstvé organické sušiny

	Produkce bioplynu z čerstvé organické sušiny
vzorek	[m ³ /kg]
Trhové Dušníky nehydrol.	0,412
Podlesí nehydrol.	0,867
Trhové Dušníky hydrol.	0,494
Podlesí hydrol.	0,415

Produkce bioplynu z čerstvé organické hmoty byla nejvyšší u nehydrolyzovaného vzorku Podlesí s produkcí 0,867 m³/kg. Nejnižší produkci ze sledovaných substrátů měl nehydrolyzovaný vzorek Trhové Dušníky. Jeho produkce dosahovala 0,412 m³/kg.

5.1.2 Průběh produkce bioplynu

Graf č.2. Průběh produkce bioplynu.



Tabulka č. 6. Průměrná produkce bioplynu v čase.

Čas [h]	Trhové Dušníky nehydrol. [ml/h]	Podlesí nehydrol. [ml/h]	Trhové Dušníky hydrol. [ml/h]	Podlesí hydrol. [ml/h]
0 – 34,8	0,630 ± 0,008	1,100 ± 0,267	0,800 ± 0,267	0,730 ± 0,244
34,8 – 87,6	0,967 ± 0,356	1,100 ± 0,267	1,200 ± 0,333	1,333 ± 0,178
87,6 – 159,5	1,100 ± 0,067	2,067 ± 0,733	1,433 ± 0,533	1,400 ± 0,333
159,5 – 235,9	0,933 ± 0,467	1,933 ± 0,511	0,667 ± 0,489	0,867 ± 0,156
235,9 – 327,8	0,700 ± 0,100	1,100 ± 0,200	0,575 ± 0,144	0,525 ± 0,075
327,8 – 443,0	0,400 ± 0,080	0,660 ± 0,144	0,380 ± 0,096	0,240 ± 0,064
443,0 – 519,3	0,267 ± 0,089	0,467 ± 0,156	0,267 ± 0,089	0,200 ± 0,067
519,3 – 600,2	0,200 ± 0,120	0,300 ± 0,200	0,200 ± 0,108	0,100 ± 0,104

Graf průběhu produkce bioplynu jasně poukazuje na rychlý nástup produkce u všech substrátů. Produkce bioplynu v čase kolísala, jsou znatelné špičky. K první výrazné produkci došlo asi po 20 hodinách od založení pokusu, k další asi po 45 hodinách. Poté produkce substrátů klesla. Po sté hodině od začátku založení pokusu došlo k další špičce. Po dosažení špičky začala produkce všech substrátů, vyjma nehydrolyzovaného vzorku Podlesí, klesat. Nehydrolyzovaný vzorek Podlesí pokračoval v tempu růstu a ve 180. hodině dosáhl své nejvyšší průměrné produkce. Po 200 hodinách produkce obou nehydrolyzovaných substrátů klesla a ve 240. hodině opět stoupla a posléze klesla. Poté produkce substrátů individuálně lehce kolísala, ale všeobecný trend produkce byl sestupný. 17. den (400 hodin od začátku založení pokusu) se trend produkce u všech substrátů sjednotil a i když každý substrát produkoval jiné množství, křivka produkce zůstávala podobná. K poslednímu výkyvu produkce bioplynu došlo před 500. hodinou od začátku založení pokusu, kdy se produkce lehce zvýšila a potom snížila.

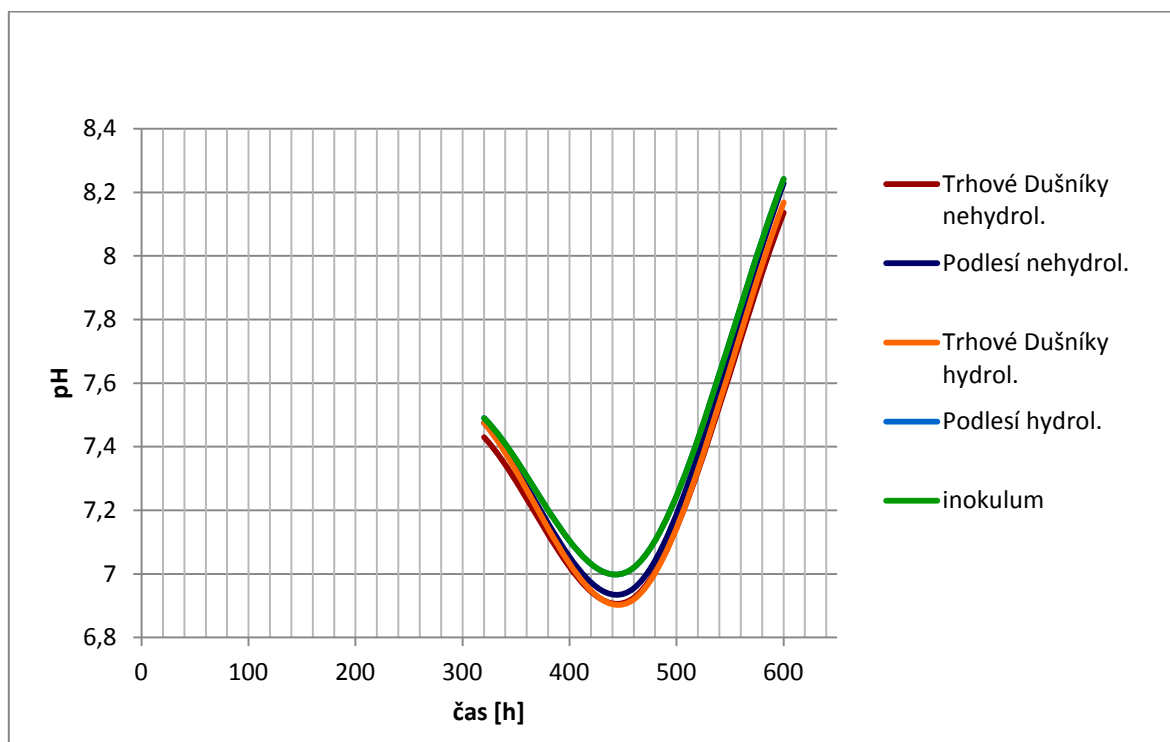
Každý substrát dosáhl své nejvyšší produkce v jiném čase. Nejvyšší produkce byla zaznamenána u nehydrolyzovaného substrátu z Podlesí po asi 180 hodinách od založení pokusu s průměrnou produkcí $2,7 \pm 0,122$ ml/hod. Druhou nejvyšší průměrnou produkci měl hydrolyzovaný substrát z Podlesí. Té dosáhl po 110. hodině trvání pokusu s průměrnou produkcí $1,9 \pm 0,084$ ml/hod. Hydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky měl podobnou křivku jako předchozí substrát, ačkoli produkce kolísala. Tento substrát dosáhl svého maxima hned

dvakrát a to po 47. a 110. hodině od založení pokusu s průměrnou produkcí $1,7 \pm 0,098$ ml/hod. Nehydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky dosáhl svého maxima po 47 hodinách průměrnou produkcí $1,5 \pm 0,755$ ml/hod. Inokulum mělo nejnižší produkci a jeho produkce v čase kolísala nejméně. Všechny křivky produkce kolísaly v závislosti na fázi anaerobní digesce a nástupu mikrobiální biomasy.

Křivky nehydrolyzované biomasy stoupaly a klesaly takřka ve stejném čase. To stejné se dělo s křivkami hydrolyzované biomasy. Hydrolyzované substráty dosáhly vrcholů produkce dříve než substráty nehydrolyzované.

5.1.3 Hodnocení změn hodnoty pH

Graf č. 3. Stanovení hodnot pH.



První měření hodnot pH dvou náhodně vybraných vzorků, které se uskutečnilo čtrnáctý den pokusu (po 320 hodinách), vykazovalo hodnoty pH v rozmezí $7,43 \pm 0,01$ a $7,58 \pm 0,01$. Nejnižší pH bylo naměřeno u nehydrolyzovaného vzorku z Trhových Dušníků a nejvyšší u inokula. Druhé měření ukazuje, že došlo k poklesu pH. Nejméně pokleslo inokulum na $pH = 7,04 \pm 0,02$. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u hydrolyzovaného vzorku z Trhových Dušníků na $pH = 6,92 \pm 0,11$. Třetí měření po skončení pokusu ukázalo, že došlo k opětovnému nárůstu pH. Hodnoty dosahovaly zásaditého pH v rozmezí $8,14 \pm 0,04 - 8,27 \pm$

0,10. Nejnižší hodnoty dosahoval opět nehydrolyzovaný substrát z Trhových Dušníků a nejvyšší inokulum.

Neutrální pH v rozmezí 6,5 až 7,5 má příznivý efekt na průběh anaerobní digesce. Při pH pod 6 nebo nad 8 je činnost mikroorganismů silně inhibována (Ust'ak, Váňa kol., 2006). Za podmínek zatížení procesu dochází k hromadění organických kyselin a hodnota pH klesá. Tento jev je příčinou poklesu pH při druhém měření. Posléze došlo k odbourávání organických kyselin a hodnota pH stoupala, až přesáhla hraniční inhibiční hodnotu. V období mezi druhým a třetím měřením došlo k výraznému snížení produkce bioplynu. Poslední dny měření denní produkce bioplynu rapidně klesla. U některých vzorků jsme zaznamenali téměř nulovou produkci bioplynu.

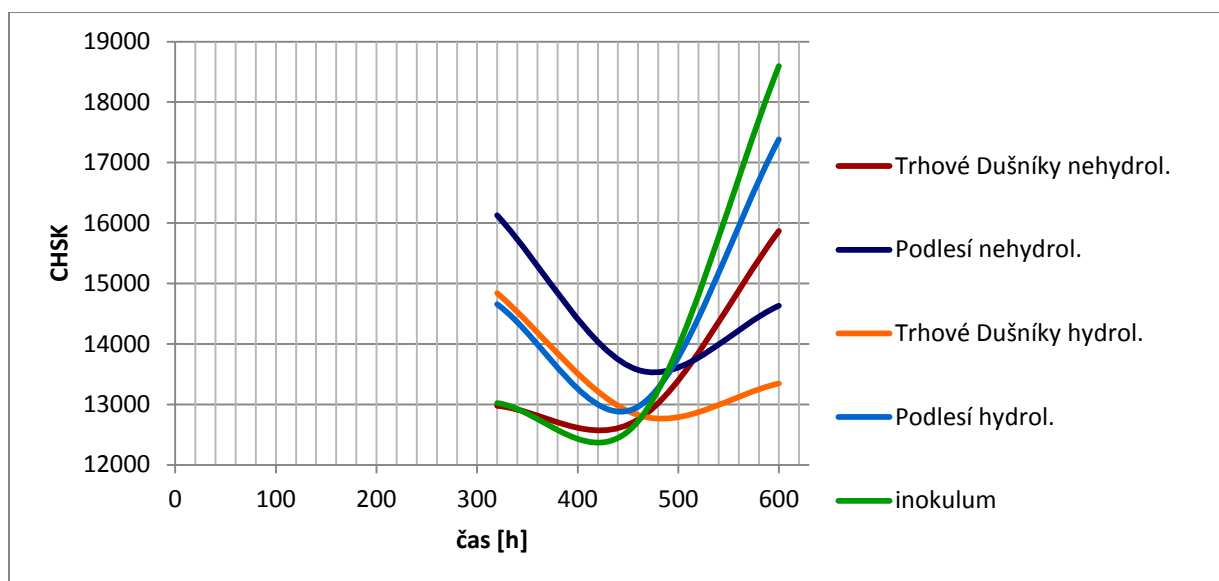
5.1.4 Účinnost odstranění veškerých látek

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je důležitým parametrem laboratorně stanovovaným pro určení účinnosti odstranění látek v testovacích nádobkách. CHSK udává spotřebu kyslíku potřebnou k oxidaci všech látek.

Tabulka č.7. Hodnota CHSK_{Cr} veškerých látek

	320 h	460 h	600 h
vzorek	mg/l	mg/l	mg/l
Trhové Dušníky nehydrol.	12977,5	12750,0	15870,0
Podlesí nehydrol.	16130,0	13570,0	14632,5
Trhové Dušníky hydrol.	14842,5	12822,5	13345,0
Podlesí hydrol.	14657,5	12960,0	17385,0
inokulum	13022,5	12720,0	18592,5

Graf č. 4. Hodnota $CHSK_{Cr}$ veškerých látek.



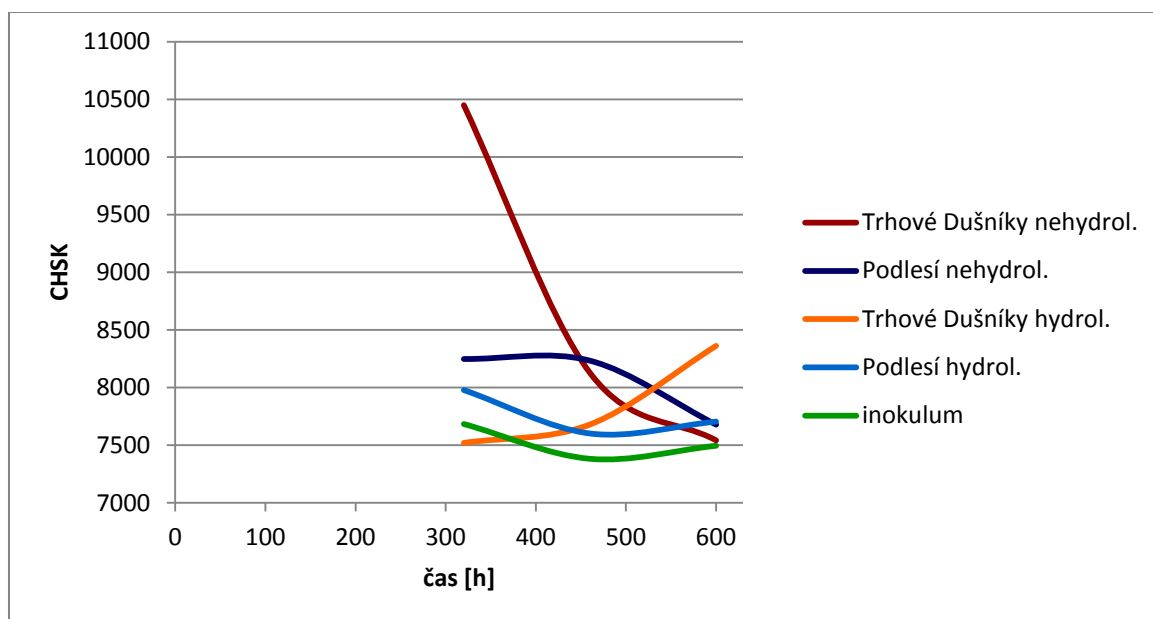
Pro stanovení $CHSK_{Cr}$ veškerých látek byly použity neodstředěné vzorky. $CHSK_{Cr}$ veškerých látek určuje účinnost odstranění veškerých látek, rozpuštěných i nerozpuštěných. Z grafu je patrné, že hodnota účinnosti odstranění veškerých látek v průběhu pokusu od prvního měření do druhého měření klesla. Na konci pokusu byla hodnota $CHSK_{Cr}$ vyšší. Na konci testu mělo nejvyšší $CHSK_{Cr}$ inokulum, poté hydrolyzovaný substrát Podlesí. Nejnižší $CHSK_{Cr}$ bylo zaznamenáno u hydrolyzovaného substrátu Trhové Dušníky.

5.1.5 Účinnost odstranění rozpuštěných látek

Tabulka č.8. Hodnota $CHSK_{Cr}$ rozpuštěných látek

	320 h	460 h	600 h
vzorek	mg/l	mg/l	mg/l
Trhové Dušníky nehydrol.	10450,0	8127,5	7542,5
Podlesí nehydrol.	8247,5	8232,5	8232,5
Trhové Dušníky hydrol.	7520,0	7680,0	8362,5
Podlesí hydrol.	7977,5	7602,5	7705,0
inokulum	7682,5	7382,5	7495,0

Graf č.5. Hodnota $CHSK_{Cr}$ rozpuštěných látek.



Před stanovením $CHSK_{Cr}$ rozpuštěných látek, byly vzorky se substrátem odstředěny, aby došlo k odstranění pevných částic. $CHSK_{Cr}$ rozpuštěných látek se v průběhu měření nijak výrazně neměnilo. Jediný znatelný pokles byl zaznamenán u nehydrolyzovaného substrátu z Trhových Dušníků. Podle grafu $CHSK_{Cr}$ klesla u nehydrolyzovaných vzorků, inokulum a hydrolyzované vzorky zaznamenaly pokles a mírný vzestup.

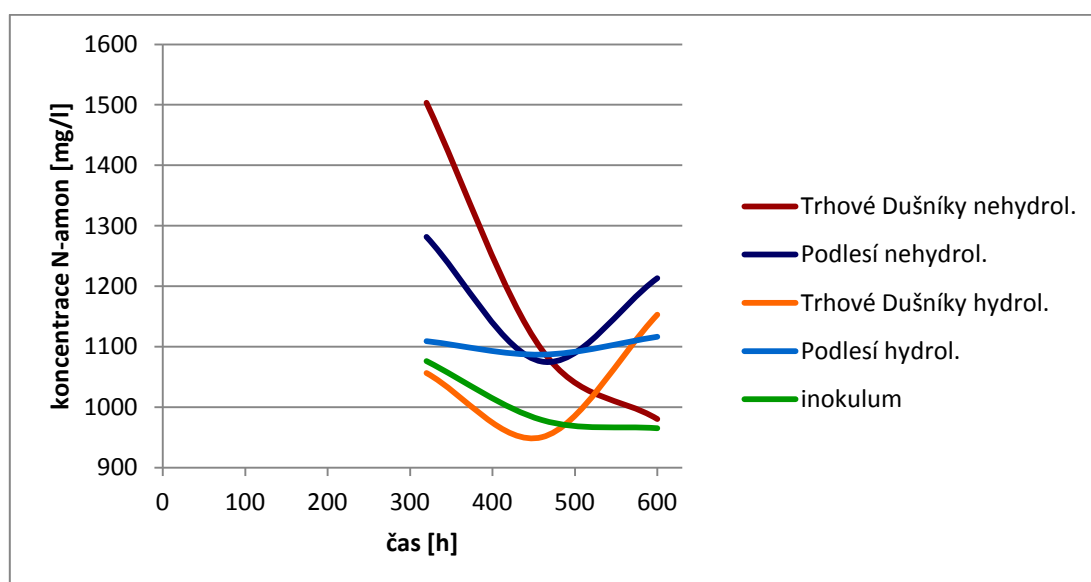
5.1.6 Stanovení amoniakálního dusíku

Dalším sledovaným parametrem je stanovení koncentrace amoniakálního dusíku. Amoniakální dusík se vyskytuje jako disociovaný ion NH_4^+ a nedisociovaný NH_3 . V průběhu anaerobního procesu se uvolňuje při štěpení proteinů. Tato forma dusíku se v redukčním prostředí se v závislosti na hodnotě pH mění na amoniak, který působí inhibičně.

Tabulka č.9. Stanovení obsahu amoniakálního dusíku.

	320 h	460 h	600 h
vzorek	mg/l	mg/l	mg/l
Trhové Dušníky nehydrol.	1503,38	1094,63	980,25
Podlesí nehydrol.	1281,63	1075,25	1213,25
Trhové Dušníky hydrol.	1056,38	950,38	1152,75
Podlesí hydrol.	1109,00	1086,88	1116,25
inokulum	1076,13	978,75	965,13

Graf č. 6. Koncentrace amoniakálního dusíku [mg/l]



Koncentrace amoniakálního dusíku nehydrolyzovaného vzorku z Trhových Dušníků a u inokula klesla. Koncentrace amonných iontů byla u hydrolyzovaného vzorku Podlesí po celou dobu téměř stejná. Nehydrolyzovaný vzorek z Podlesí a hydrolyzovaný vzorek Trhové Dušníky vykázal mírný pokles a poté mírný vzestup.

5.1.7 Gravimetrické stanovení veškerých látek

Stanovení veškerých látek, veškerých rozpuštěných látek, organických látek a organických rozpuštěných látek od začátku doprovázely problémy s nedostatkem pokusného materiálu. Tento nedostatek byl způsoben tím, že ke stanovení všech výše uvedených koncentrací byly použity lahvičky s 80 ml směsí, které obsahovaly různé množství

navážených substrátů. Další nesrovnalosti zřejmě způsobil náhodný odběr vzorků (pro analýzy byly vždy odebrány 2 vzorky z jedné série).

Tabulka č.10. Stanovení koncentrace veškerých látek.

	320 h	460 h	600 h
vzorek	[%]	[%]	[%]
Trhové Dušníky nehydrol.	1,69	5,62	3,79
Podlesí nehydrol.	2,62	6,83	5,47
Trhové Dušníky hydrol.	1,73	4,75	5,89
Podlesí hydrol.	2,02	5,37	5,12
inokulum	1,80	2,28	2,69

Zvýšení koncentrace veškerých látek mezi 1. a 2. měřením je zřejmě způsobeno chybou laboratorního stanovování. Pro každou analýzu byly odebrány dva jiné vzorky ze série. Podle předpokladu byla koncentrace veškerých látek nejnižší u slepého testu. Koncentrace veškerých látek se po posledním měření pohybovala v rozmezí 3,79 a 5,89 %.

5.1.8 Gravimetrické stanovení rozpuštěných látek

Tabulka č.11. Stanovení koncentrace rozpuštěných látek

	320 h	460 h	600 h
vzorek	[%]	[%]	[%]
Trhové Dušníky nehydrol.	0,91	0,96	0,81
Podlesí nehydrol.	1,02	0,98	0,98
Trhové Dušníky hydrol.	0,94	0,83	0,89
Podlesí hydrol.	0,92	0,93	0,82
inokulum	0,83	0,78	0,76

Stanovení rozpuštěných látek bylo také zatíženo problémy s nedostatkem materiálu. Z tabulky lze vyčíst, že od prvního do třetího měření došlo k mírnému poklesu koncentrace rozpuštěných látek.

5.1.9 Gravimetrické stanovení organických látek

Tabulka č.12. Stanovení koncentrace organických látek.

	320 h	460 h	600 h
vzorek	[%]	[%]	[%]
Trhové Dušníky nehydrol.	1,068	3,187	2,003
Podlesí nehydrol.	1,947	4,005	3,165
Trhové Dušníky hydrol.	0,937	2,719	3,207
Podlesí hydrol.	1,218	3,035	2,688
inokulum	1,221	1,191	1,370

Příčinou velkého rozdílu hodnot koncentrací mezi první a druhou analýzou je zřejmě opět zatíženo chybou rozdílnosti lahvíček. Koncentrace organických látek ve většině případů klesla, v případě inokula a hydrolyzovaného substrátu Trhové Dušníky se jedná o vzestup.

5.1.10 Gravimetrické stanovení rozpuštěných organických látek

Tabulka č.13. Stanovení koncentrace rozpuštěných organických látek

	320 h	460 h	600 h
vzorek	[%]	[%]	[%]
Trhové Dušníky nehydrol.	0,39	0,39	0,33
Podlesí nehydrol.	0,41	0,38	0,44
Trhové Dušníky hydrol.	0,35	0,39	0,39
Podlesí hydrol.	0,34	0,37	0,36
inokulum	0,38	0,34	0,34

Stanovení koncentrace rozpuštěných organických látek je opět zatíženo chybou spojenou s nedostatkem materiálu. Koncentrace rozpuštěných organických látek se pohybovala mezi koncentracemi 0,33 a 0,44 %.

6 Diskuse

Efektivnost anaerobní digesce lze hodnotit z hlediska kvantitativního, a to konkrétně množstvím vyprodukovaného bioplynu. Druhým, neméně významným aspektem, je složení bioplynu. Je důležité znát nejen množství, ale i zastoupení metanu ve vyprodukovaném bioplynu. Tento jednorázový batch test je zaměřen na kvantitativní produkci bioplynu, bohužel neumožňuje určit jeho přesné složení (podíl CH_4 , CO_2 , H_2 , N_2 , H_2S , vodní páry a dalších minoritních prvků). Z výsledků výzkumu je patrné (viz graf č.1), že nejvyšší produkci bioplynu dosáhl nehydrolyzovaný vzorek Podlesí.

Porovnáme-li hydrolyzované a nehydrolyzované substráty, zjistíme, že ačkoli se produkce z každé lokality liší, tak v lokalitě Podlesí dosáhl hydrolyzovaný substrát asi poloviční produkce bioplynu ($212,3 \pm 28,833$ ml) než substrát nehydrolyzovaný ($484,2 \pm 22,383$ ml). V lokalitě Trhové Dušníky byla produkce hydrolyzovaného substrátu o něco málo vyšší ($231,6 \pm 37,683$ ml), než produkce nehydrolyzovaného substrátu ($227,3 \pm 21,733$ ml). Jak už bylo uvedeno, neznáme složení bioplynu ani jeho kvalitativní vývoj.

Hydrolýzu, v našem případě termotlakou hydrolýzu, provádíme a aplikujeme na substrát za účelem zlepšení a urychlení procesu anaerobní digesce. Pro pokus jsme použili směsi listů vrb a topolů, které podle Kovacs a kol. (2009) obsahují velké množství hemicelulóz. Dalvarheio a kol. (2008) zjistili, že hemicelulózy jsou velmi citlivé molekuly, které se při hydrolýze snadno štěpí na slabé kyseliny, deriváty furanů a fenoly. Tito autoři uvádí, že právě deriváty furanů jsou nerozložitelné pro metanogenní bakterie a mohou působit inhibičním až toxickým efektem. Zřejmě právě inhibiční efekt derivátů furanů způsobil nižší produkci hydrolyzovaného substrátu Podlesí a jen nepatrně vyšší produkci hydrolyzovaného substrátu Trhové Dušníky v našem pokusu. Podle Dalvarheio a kol. (2008) obecně platí, že předúpravy, které jsou prováděny za nízkého pH mají tendenci štěpit hemicelulózy, naopak alkalické předúpravy štěpí lignin.

Další možností, proč mohlo dojít k inhibici anaerobního procesu, může být přítomnost kyselin. Podle Straky a kol. (2003) syntrofní acetogeny rozkládající kyselinu máselnou či propionovou jsou ve svých růstech pomalé. Při jejich reakcích je produkován vodík a v přítomnosti vodíku jsou tyto reakce silně bržděny. U reaktorového bioplynu signalizuje přítomnost vyšších koncentrací kyseliny propionové velkou zátěž. V lokalitě Podlesí může být nízká produkce bioplynu hydrolyzovaného substrátu rovněž způsobena inhibicí kyselinou

propionovou nebo octovou. Důvodem je to, že hydrolyzní bakterie nejsou na většinu stresorů tak citlivé jako acetogenní nebo metanogenní bakterie. V lokalitě Trhové Dušníky je naopak znatelná vyšší produkce hydrolyzovaného substrátu (rychlejší nástup ve srovnání s nehydrolyzovaným substrátem), proto lze počáteční inhibici vyšším množstvím kyselin vyloučit.

Lokalita Trhové Dušníky a Podlesí se od sebe liší zejména stupněm kontaminace rizikovými prvky. Obsah těžkých kovů je důležitým ukazatelem procesu anaerobní digesce. Charakteristickým rysem těžkých kovů je, že na rozdíl od mnoha jiných toxických látek, nejsou biologicky rozložitelné a mohou se hromadit v potenciálně toxickou koncentraci (Chen a kol, 2008). Těžké kovy mohou proces jak stimulovat, tak inhibovat. Záleží na množství jednotlivých těžkých kovů, ale i na kombinaci jejich výskytu. Podle Chen a kol. (2008) je toxicita těžkých kovů jednou z hlavních příčin selhání anaerobní digesce. Toxický účinek těžkých kovů je přisuzován narušení enzymatických funkcí a struktur. Příčinou je vázání kovů s thioley a dalšími skupinami bílkovinných molekul nebo výměna přirozeně se vyskytujících kovů v enzymatických vazbách.

Lokality Trhové Dušníky a Podlesí se v tomto ohledu liší. Lokalita Podlesí, obsahuje téměř dvakrát větší množství kadmia než lokalita Trhové Dušníky. Kadmium zde dosahuje hodnoty 40,539 mg/kg. Obsah manganu v lokalitě Podlesí dosahuje hodnoty 134,562 mg/kg (2,5 x více než u Trhových Dušníků). Obsahy niklu a olova jsou nesrovnatelně vyšší. U olova dosahuje hodnoty 30,458 mg/kg (7 x vyšší) a u niklu 3,774 mg/kg (5 x vyšší). Obsah zinku je vyšší v substrátu Trhové Dušníky, jeho hodnota je 1114,449 mg/kg a je 1,5 x vyšší než substrát Podlesí.

Mangan, zinek, olovo, nikl, měď a kadmium mají inhibiční účinky. Podle Jain a kol. (1991) mangan v přítomnosti železa nemá výrazný toxický účinek. Co se týče obsahu kadmia, podle Lina (1993), malé koncentrace kadmia (koncentrace nižší než 30 mg/l) nemají efekt na anaerobní digesci. Nikl v nižších dávkách než je 300 mg/l má velmi příznivý účinek na anaerobní digesci. Podle Chen a kol (2008) se nikl chová synergicky v kombinaci Ni–Cu, Ni–Mo–Co, a Ni–Hg. Antagonisticky se projevuje v kombinaci Ni–Cd, Ni–Zn. Bylo zjištěno, že Ni zvyšuje toxický efekt kadmia a mědi. Podle Lina (1993) je měď nejvíce a olovo nejméně toxickým těžkým kovem. Podle Jaina (1991) nízká koncentrace kadmia nebo niklu urychluje proces anaerobní digesce. Jain (1991) uvádí, že olovo a zinek snižují produkci bioplynu a tento toxický efekt se zvyšuje se zvyšující se koncentrací těžkých kovů. Podle Lina (1993) má zinek ve srovnání s olovem větší inhibiční účinky.

Podle Chen a kol. (2008) se stimulace nebo inhibice anaerobních mikroorganismů určuje podle celkové koncentrace kovů, chemické podoby kovů a s procesem souvisejícími faktory, jako jsou pH nebo redox potenciál. Těžké kovy se mohou podílet na řadě fyzikálně – chemických procesů, tvoří komplexy v roztoku sloučenin produktů a meziproductů během procesu anaerobní digesce. Z těchto kovových forem jsou pro mikroorganismy toxické pouze kovy v rozpustné, volné formě. Pro toxický účinek těžkých kovů má větší význam jejich mobilita než celková koncentrace těchto rizikových prvků.

Jak bylo uvedeno, lokalita Podlesí se od lokality Trhové Dušníky liší stupněm kontaminace. V obou lokalitách byly stanoveny jiné koncentrace těžkých kovů, které mohou v různých kombinacích stimulovat nebo inhibovat proces. Ačkoli nehydrolyzovaný substrát Podlesí obsahuje větší koncentrace rizikových prvků (vyjma Zn) než nehydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky, produkuje vyšší množství bioplynu. Důvodem je pravděpodobně nízká mobilita rizikových prvků.

Srovnáme – li kumulativní produkci hydrolyzovaného a nehydrolyzovaného substrátu z lokality Podlesí (graf č. 1.), na první pohled je patrné, že oba substráty se na začátku pokusu v produkci nijak výrazně nelišili. Asi po stejné hodině od založení pokusu je zřetelný výrazný nástup produkce u nehydrolyzovaného vzorku z této lokality. Ačkoli je koncentrace těžkých kovů stejná, jejich relativní toxicita je zřejmě jiná. Celková produkce bioplynu nehydrolyzovaného substrátu byla dvakrát vyšší. U vzorku, který byl předupraven termotlakou hydrolyzou došlo k výrazné inhibici. Tato inhibice je zřejmě způsobena změnou mobility prvků. V průběhu předúpravy za vysokého tlaku a teploty došlo k rozštěpení nemobilních kovových sloučenin na mobilní formu.

Změny koncentrace amoniakálního dusíku patří také mezi důležité ukazatele efektivity anaerobní digesce. Podle Marchaima (1992) představuje dusík ve vstupní surovině nejen základní prvek pro syntézu aminokyselin, bílkovin a nukleových kyselin, ale je přeměňován na amoniak, který neutralizuje těkavé kyseliny vyprodukované kvasnými bakteriemi, a tím pomáhá udržovat neutrální pH nezbytné pro růst buněk. Nadbytek dusíku v substrátu může vést k nadměrné tvorbě amoniaku, což má za následek toxické účinky. Graf č. 6 udává koncentraci amoniakálního dusíku (měření proběhlo po 320 a 460 hodinách od založení testu a po ukončení pokusu). Patnáctý den pokusu byla v každém substrátu určena jeho koncentrace. Nejnížší koncentrace amoniakálního dusíku byly stanoveny u inokula a v hydrolyzovaných substrátech. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u nehydrolyzovaných substrátů, zejména nehydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky vykázal nejvyšší obsah této inhibiční složky.

Srovnáme-li nehydrolyzované substráty, nehydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky byl v porovnání s nehydrolyzovaným substrátem Podlesí více inhibován amoniakálním dusíkem. Porovnání hydrolyzovaných substrátů ukazuje, že hydrolyzovaný substrát Trhové Dušníky byl ze začátku více inhibován než hydrolyzovaný substrát Podlesí. Při posledním měření je patrné, že se jejich role vyměnily a že koncentrace amoniakálního dusíku v hydrolyzovaném substrátu Podlesí byla vyšší. Tato inhibice je patrná Grafu kumulativní produkce bioplynu (grafu č. 1), srovnáváme-li kumulativní produkci bioplynu.

7 Závěr

Anaerobní digesce je proces, který je ovlivněn mnohými faktory, jako jsou například teplota, pH nebo obsah inhibičních látek. Zcela zásadní pro efektivitu anaerobní fermentace je přístupnost substrátu anaerobním mikroorganismům. Myšlenka zlepšení biologického rozkladu předúpravou substrátu není nová. Provozovatelé bioplynových stanic se snaží o co nejvyšší výtěžky bioplynu a investují do předúpravy materiálů.

V této diplomové práci jsou srovnávány substráty ze dvou různě kontaminovaných lokalit. Substráty z každé lokality byly předupraveny mechanicky a termotlakou hydrolyzou. Nejvyšší kumulativní produkce překvapivě dosáhl nehydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí ($484,2 \pm 22,383$ ml), která se na první pohled jeví jako více kontaminovaná. Stupeň kontaminace určuje nejen koncentrace, ale i složení a kombinace jednotlivých prvků. Ačkoli se v substrátu z této lokality nachází vyšší koncentrace těžkých kovů, jejich mobilita je nízká. Účinkem předúpravy termotlakou hydrolyzou došlo ke zvýšení mobility rizikových prvků a následně výrazné inhibici, která zapříčinila výrazně nižší kumulativní produkci bioplynu ($212,3 \pm 28,833$ ml).

Kumulativní produkce hydrolyzovaného substrátu z lokality Trhové Dušníky byla zpočátku výrazně vyšší, ale konečná kumulativní produkce se lišila nepatrně. Hydrolyzovaný substrát z této lokality vyprodukoval $231,6 \pm 37,683$ ml a nehydrolyzovaný $227,3 \pm 21,733$ ml. Produkce obou substrátů z této lokality je ve srovnání s nehydrolyzovaným substrátem z Podlesí dvakrát nižší. To poukazuje na vysokou mobilitu prvků nacházejících se v lokalitě.

Vyšší obsah hemicelulóz v substrátu může být rovněž problematický. Při aplikaci termotlaké hydrolyzy na substrát obsahující větší množství hemicelulóz může dojít ke štěpení těchto látek na deriváty furanů, které mají inhibiční účinky.

Pro efektivitu anaerobní fermentace jsou důležité hluboké znalosti hlavních reakcí a důsledků každé předúpravy. Složení a přítomnost inhibičních látek, jako jsou těžké kovy mohou zásadně ovlivnit účinnost procesu. V tomto směru není podstatná totální koncentrace, ale zejména mobilita těžkých prvků. Obsahuje-li vstupní surovina větší množství těžkých kovů nízké mobility, je předúprava termotlakou hydrolyzou při teplotě 165°C , tlaku 10 – 12 MPa a době zdržení 15 min nevhodná. Doporučuji vyzkoušet termotlakou hydrolyzu při nižší teplotě a době zdržení nebo aplikovat na kontaminovaný substrát jinou metodu předúpravy.

8 Literatura

Andrt M. 2001. Odpady ze živočišné výroby, jejich zpracování a využití In: Hospodaření a manipulace s odpady ze zemědělství a venkovských sídel. Praha. Agrospoj. 236 s.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. 2000. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. In: Hobbs, P.J., Holliman, P. J., Jones, D.L, Ward, A. J. November 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 99 (17). 7928–7940.

Appels, L., Baeyens, J., Degreè, J., Dewil, R. December 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*. 34 (6). 755-781.

Bonmati, A., Flotats, X., Mateu, L., Campos, E. 2001. Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Science and Technology* 44. 109–116.

Clarkson, W. W., Xiao, W. 2000. Bench-scale anaerobic bioconversion of newsprint and office paper. In: Hobbs, P.J., Holliman, P. J., Jones, D.L, Ward, A. J. November 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 99 (17). 7928–7940.

Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M., Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. [online]. November 2008. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 67. 849-864.

CZ Biom. 2007. Desatero bioplynových stanic. Praha. Ministerstvo zemědělství ČR. 24 s. ISBN: 978-80-7084-618-6.

Čuba, V., Pospíšil, M., Múčka V., Jeníček, P., Silber, R., Dohányos, M., Zábranská, J. June 2003. Impact of accelerated electrons on activating process and foaming potential of sludge Radiation. *Physics and Chemistry*. 67 (3-4). 545-548.

de Silva, V. 2005. Ultrasound technology to improve biosolids treatment. In: Elliott, A., Mahmood, T. November 2007. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Research*. 41 (19). 4273-4286.

Dohányos, M., Zabranska, J., Jenicek, P., 1997. Enhancement of sludge anaerobic digestion by using of a special thickening centrifuge. *Water Science and Technology*. 36. 145–153.

Dohányos, M. (a), Zvyšování efektivity fermentace - nejnovější poznatky ve výzkumu a praxi. *Biom.cz* [online]. 2009-02-25 [cit. 2011-11-02]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/zvysovani-efektivita-fermentace-nejnovejsipoznatky-ve-vyzkumu-a-praxi>>. ISSN: 1801-2655.

Dohányos, M. (b), Závislost výtěžku metanu na složení a předúpravě suroviny [online]. 2009-01-09 [cit. 2011-11-08]. Dostupné z WWW: <http://www.czba.cz/index.php?art=clanky&parent=-odborne-clanky&nid=zavislost-vytezku-metanu-na-slozeni-a-preduprave-surovi>>.

Dohányos, M. Anaerobní reaktor není černou skřínkou - teoretické základy anaerobní fermentace. *Biom.cz* [online]. 2008-11-17 [cit. 2011-11-05]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/anaerobni-reaktor-neni-cernou-skrinkou-teoreticke-zaklady-anaerobni-fermentace?sel_ids=1>. ISSN: 1801-2655.

Dohányos, M., Jeníček, P., Zábranská, J. 1996. Anaerobní technologie v ochraně životního prostředí. 1 vydání. Praha : Min. život. prostředí ČR MŽP ČR. 172 s. ISBN: 80-85368-90-0.

Dohányos, M., Kosová, B., Grau, P. 1982. Možnosti intenzifikace metanizačního procesu. In: Straka, F., Dohányos, M., Zábranská J., Dědeček J., Malijevský A., Novák J., Oldřich, J. 2003. Bioplyn. 1.vydání. Říčany : GAS. 517 s. ISBN: 80-7328-029-9.

Dohányos, M., Zábranská, J., Jeníček, P., Kutil, J., Todt, V. 2008. Vývoj kalového hospodářství na ÚČOV Praha za posledních 10 let. In Konferencia Kaly a odpady 2008. Bratislava. s 29-36.

Elliott, A., Mahmood, T. November 2007. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Research*. 41 (19). 4273-4286.

Gerndtová, I., Andert, D. Využití travních směsí při anaerobní digesci. *Biom.cz* [online]. 2009-11-18 [cit. 2010-08-03]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyuziti-travnich-smesi-pri-anaerobni-digesci>>. ISSN: 1801-2655.

Gunaseelan, V.N. 1994 in Hobbs, P.J., Holliman, P. J., Jones, D.L, Ward, A. J. November 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 99 (17). 7928–7940.

Habart, J. Termotlaká hydrolyza surovin pro bioplynovou stanici. *Biom.* [online]. 2008-01 [cit. 2012-01-12]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/biom/eBIOM-30-2008.pdf>>. ISSN: 1800-2655.

Hobbs, P.J., Holliman, P. J., Jones, D.L, Ward, A. J. November 2008. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*. 99 (17). 7928–7940.

Horáková, M. (eds.). 2003. Analytika vody. 2. vydání. VŠCHT. Praha. 335 s. ISBN: 80-7080-520-X.

Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. 2008. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 99. 4044 – 4064.

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.

Kajan, M., Lhotský, R., Možnosti zvýšení výroby bioplynu na stávajících zařízeních. Enki [online]. 2006-11 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z WWW: <<http://www.mpo-efekt.cz/dokument/30.pdf>>.

Kára, J. 2007. Výroba a využití bioplynu v zemědělství. 1.vydání. Praha : VÚZT. 120 s. ISBN: 978-80-86884-28-8.

Kim, J., Park, C., Kim, T. H., Lee, M., Kim,S., Kim, S. W., Lee, J. 2003. Effects of various pretreatments for enhanced anaerobic digestion with waste activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95. 271–275.

- Kovacs, K., Macrelli, S., Szakacs, G., Zacchi, G. 2009. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnology for Biofuels*. 2. 14.
- Laughlin, M., Peterson, E. 2006. Methane mitigation. *Waste*. s. 94-97, ISSN: 1476-1394.
- Lin, CH. 1993. Effects of heavy metals on acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*. 27 (1). 147 – 152.
- Marchaim, U. 1992. Biogas processes for sustainable development. FAO agricultural services bulletin. Rome : FAO. 232 s. ISBN: 92-5-103126-6.
- Mladenovska, Z., Hartmann, H., Kvist, T., Sales-Cruz, M., Gani, R., Ahring, B.K. 2006. Thermal pretreatment of the solid fraction of manure: impact on the biogas reactor performance and microbial community. *Water Science and Technology*. 53. 59–67.
- Mouneimne, A. H., Carrere, H., Bernet, N., Delgenes, J. P. 2003. Effect of saponification on the anaerobic digestion of solid fatty residues. *Bioresource Technology*. 90. 89–94.
- Mshandete, A., Bjornsson, L., Kivaisi, A. K., Rubindamayugi, M. S. T., Mattiasson, B. 2006. Effect of particle size on biogas yield from sisal fibre waste. *Renewable Energy*, 31. 2385–2392.
- Mužik, O., Kára, J., Možnosti výroby a využití bioplynu v ČR. *Biom.cz* [online]. 2009-03-04 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/moznost-vyroby-a-vyuziti-bioplynu-v-cr>>. ISSN: 1801-2655.
- Pastorek, Z. Bioplyn – užitečný zdroj energie nebo riskantní způsob podnikání. *Biom.cz* [online]. 2008-07-14 [cit. 2011-11-05]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/bioplyn-uzitecny-zdroj-energie-nebo-riskantni-zpusob-podnikani>>. ISSN: 1801-2655.
- Pastorek Z., Kára J., Jevič P. 2004. Biomasa : obnovitelný zdroj energie. 1.vydání. Praha. FCC Public. 288s. ISBN: 80-86534-06-5.

Rosenberg, T. 2010. Metodika – předpis pro provádění laboratorních jednorázových testů produkce bioplynu.

Roxburgh, R., Soroushian, F., Sieger, R., Burrows, P. 2005. Ultrasound for improved solids management - how, who, when and why. In: Elliott, A., Mahmood, T. November 2007. Pretreatment technologies for advancing anaerobic digestion of pulp and paper biotreatment residues. *Water Research*. 41(19). 4273-4286.

Schulz, H., Eder, B. 2004. Bioplyn v praxi. 1.vydání. Ostrava. HEL. 168s. ISBN: 80-86167-21-6.

Straka, F., Dohányos, M., Zábranská, J., Dědeček, J., Malijevský A., Novák J., Oldřich, J. 2003. Bioplyn. 1.vydání. Říčany : GAS. 517 s. ISBN: 80-7328-029-9.

Šmejkalová, P. 2005. Způsoby měření produkce bioplynu při testování anaerobní rozložitelnosti. In: Sborník 1. konference Hydroanalytika 2005. Hradec Králové 20 - 21.9.2005.

Toreci, I., Kennedy, K. J., Droste, R. L. 2009. Evaluation of continuous mesophilic anaerobic sludge digestion after high temperature microwave pretreatment. *Water Research*. 43 (5). 1273-1284.

Ust'ak, S., Váňa, J. 2006. Bioplynová fermentace biomasy a biologicky rozložitelných odpadů. 2.vydání. Praha : CZ Biom. 180 s. ISBN: 80-903777-0-X.

Váňa, J. 1997. Nakládání s odpady v zemědělství. In: Problematika úpravy, využití a zneškodňování zemědělských odpadů . Sborník referátů ze semináře. Praha : BIJO TC a.s. 94 s.

Žídek, M. 2005. Desintegrace jako součást anaerobní kofermentace. In *Energie z biomasy IV* – odborný seminář. Brno. 133-138.

9 Samostatné přílohy

Příloha č. 1. Fotodokumentace

Obrázek č. 1. Testovací lahvičky v průběhu měření



Obrázek č. 2. Průběh měření produkce bioplynu



Obrázek č. 3. Termokomora v pokusné stáji FAPPZ



Příloha č. 2. Záznam měření – Nehydrolyzovaný substrát z lokality Trhové Dušníky

Date, Time	Volume									
	KN1	KN2	KN3	KN4	KN5	KN6	KN7	KN8	KN9	KN10
18.1.12 20:20	5,6	5,8	5,8	5,6	6,4	5,6	6,8	6,0	0,4	6,2
19.1.12 6:25	4,6	3,0	6,4	8,6	9,2	10,8	7,2	5,2	1,6	6,4
19.1.12 15:45	14,1	14,0	8,9	14,0	11,0	8,2	7,8	13,0	10,8	11,2
20.1.12 7:10	20,8	19,2	15,4	15,4	16,8	20,2	18,4	29,0	16,0	11,8
20.1.12 19:35	15,0	16,2	13,8	13,4	9,2	10,8	9,0	10,0	14,4	8,8
21.1.12 11:45	16,6	18,7	13,8	11,4	18,0	20,1	20,8	20,6	15,4	18,8
22.1.12 11:55	29,0	16,6	15,8	21,6	20,0	37,8	24,0	35,2	33,2	24,0
23.1.12 11:15	26,4	23,0	25,0	25,0	34,8	30,6	32,0	30,8	24,2	31,2
24.1.12 11:05	23,8	21,8	21,4	18,0	25,8	23,6	25,0	25,2	19,0	32,2
25.1.12 11:50	19,4	23,2	21,8	27,6	24,0	25,0	24,6	20,8	27,0	27,0
26.1.12 9:50	13,6	19,0	17,2	19,6	20,4	14,2	24,0	19,4	27,8	17,2
27.1.12 13:00	27,8	27,2	27,6	27,6	21,6	28,2	30,0	28,4	32,6	25,6
28.1.12 16:15	21,2	19,0	23,6	24,0	34,2	21,0	21,8	17,8	29,0	17,6
29.1.12 17:10	14,6	16,0	18,4	18,0	18,6	9,4	13,0	14,0	18,6	11,2
30.1.12 13:50	11,8	12,8	13,8	14,2	15,2	7,8	12,4	7,0	12,6	5,4
31.1.12 13:10	13,6	14,4	15,2	15,2	15,0	15,2	17,2	15,8	15,6	14,4
1.2.12 12:10		9,6	13,4	12,2	11,2		13,4	13,0	13,8	12,4
2.2.12 8:55		10,0	11,4	11,2	10,4		10,8	11,2	12,0	10,8
3.2.12 10:45		10,0	9,2	9,2	10,2		9,8	9,9	11,2	10,4
4.2.12 10:10		8,6	8,8	5,6	8,6		8,4	7,6	9,4	8,6
5.2.12 10:00		6,4	6,2	8,0	7,4		8,6	8,2	6,6	6,8
6.2.12 7:20		6,6	6,0	6,6	6,8		7,2	6,0	7,2	7,2
7.2.12 16:00			8,2	8,0	8,4			8,2	8,6	7,8
8.2.12 11:00			5,6	4,6	5,4			4,8	5,4	5,2
9.2.12 11:35			6,2	6,0	6,6			6,4	6,8	5,4
10.2.12 8:20			4,8	3,8	3,6			4,0	4,0	3,8
12.2.12 21:00			9,4	9,4	10,6			11,0	10,6	10,0

Příloha č. 3. Záznam měření – Nehydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí

Date, Time	Volume									
	NN1	NN2	NN3	NN4	NN5	NN6	NN7	NN8	NN9	NN10
18.1.12 20:30	7,8	6,6	8,0	7,0	4,6	7,2	7,2	6,4	4,4	7,8
19.1.12 6:30	19,0	15,2	16,4	20,2	11,4	7,8	16,8	10,4	11,8	12,4
19.1.12 15:50	15,4	19,2	2,1	19,6	19,6	20,2	17,4	22,6	10,6	18,2
20.1.12 7:15	21,8	7,2	17,2	22,4	19,0	21,2	15,6	18,0	22,2	21,8
20.1.12 19:45	10,0	14,8	11,6	14,8	5,4	12,0	18,2	19,2	18,6	17,2
21.1.12 11:00	22,6	24,6	21,0	24,4	17,2	23,4	25,6	24,8	25,8	25,6
22.1.12 12:00	43,8	41,4	39,4	13,8	37,2	45,8	49,6	41,0	46,2	50,0
23.1.12 11:20	44,2	46,6	40,0	53,8	42,0	54,6	61,8	58,2	55,0	46,0
24.1.12 11:15	65,2	63,2	47,6	64,0	57,8	67,4	42,4	53,8	58,8	65,6
25.1.12 11:55	66,6	71,6	57,4	63,2	56,8	52,8	53,6	59,4	51,4	64,0
26.1.12 10:00	15,4	26,8	40,2	50,8	14,6	47,2	43,0	28,8	45,6	37,2
27.1.12 13:05	69,4	55,6	53,4	45,4	77,4	42,6	33,4	42,0	32,8	31,2
28.1.12 16:20	37,6	37,4	44,8	36,2	45,4	36,0	37,6	32,0	36,4	35,2
29.1.12 17:20	19,8	23,6	30,4	26,0	34,8	24,4	24,2	20,4	20,2	31,2
30.1.12 17:20	18,8	18,6	20,8	18,4	24,0	17,4	14,0	17,8	18,8	18,8
31.1.12 13:20	23,8	18,2	24,8	22,8	22,8	22,6	14,8	20,6	21,2	18,0
1.2.12 12:20		13,6	17,4	14,2	16,4		15,0	16,2	18,2	17,4
2.2.12 9:00		14,8	17,8	17,0	15,4		13,2	16,2	15,4	14,8
3.2.12 10:50		13,2	18,0	16,2	16,6		13,6	16,2	15,8	13,2
4.2.12 10:15		12,4	15,2	14,4	13,8		13,0	14,0	12,8	11,4
5.2.12 10:05		12,4	14,0	13,8	13,6		12,4	11,8	12,0	12,0
6.2.12 7:25		8,2	12,2	10,8	12,0		11,0	11,2	10,6	10,8
7.2.12 16:05			14,6	14,0	14,4			13,6	13,4	14,0
8.2.12 11:05			10,0	9,4	9,6			8,4	8,6	9,4
9.2.12 11:40			11,0	11,8	12,0			10,0	10,6	11,0
10.2.12 8:25			7,0	8,2	7,6			6,8	6,2	6,8
12.2.12 21:00			16,4	18,2	15,6			15,2	15,4	16,0

Příloha č. 4. Záznam měření - Hydrolyzovaný substrát z lokality Trhové Dušníky

Date, Time	Volume									
	KH1	KH2	KH3	KH4	KH5	KH6	KH7	KH8	KH9	KH10
18.1.12 20:40	3,4	6,6	2,8	7,2	4,4	0,6	5,0	5,8	3,6	1,0
19.1.12 6:40	15,2	12,4	16,4	14,2	1,3	9,2	7,6	16,2	13,6	1,8
19.1.12 16:00	12,4	16,6	17,6	17,6	10,2	7,8	11,2	17,2	7,8	1,8
20.1.12 7:25	25,4	12,8	27,2	27,0	23,0	26,4	20,0	22,2	14,4	14,6
20.1.12 19:50	16,0	19,2	14,8	15,2	8,6	18,6	5,6	21,6	17,4	6,8
21.1.12 11:10	27,6	27,2	27,6	28,2	23,0	25,8	10,0	29,0	27,8	24,0
22.1.12 12:05	37,8	44,0	42,0	38,4	39,4	39,8	43,8	45,0	39,2	32,6
23.1.12 11:25	38,8	36,4	37,2	35,0	29,8	40,0	25,0	24,2	35,8	25,2
24.1.12 11:20	31,8	25,0	31,0	31,8	27,8	32,2	29,0	29,4	34,2	35,0
25.1.12 12:00	23,8	18,4	20,0	19,6	25,8	21,8	18,4	22,4	22,6	16,6
26.1.12 10:10	14,4	19,4	18,0	19,0	12,8	18,8	9,4	16,4	18,6	15,2
27.1.12 13:10	19,4	12,8	14,0	18,4	18,2	20,4	10,2	12,0	5,2	9,8
28.1.12 16:30	11,0	14,4	14,4	15,2	15,8	17,4	17,8	17,0	17,2	18,2
29.1.12 17:25	11,4	9,0	11,2	14,0	13,2	14,8	12,4	13,4	14,6	13,4
30.1.12 14:10	11,8	10,2	10,6	12,4	11,0	12,0	5,8	11,4	10,8	11,6
31.1.12 13:30	11,8	14,8	15,0	14,6	12,4	14,2	9,8	13,2	13,4	13,0
1.2.12 12:25		11,8	13,0	12,0	11,2		11,4	11,6	11,0	9,8
2.2.12 9:05		10,0	11,2	10,4	8,4		9,2	10,2	10,4	9,8
3.2.12 10:55		7,6	10,0	1,0	7,9		6,4	8,0	8,9	7,2
4.2.12 10:15		6,8	6,8	7,4	7,6		7,6	8,4	8,2	7,8
5.2.12 10:05		6,8	7,2	7,6	7,4		8,0	6,6	8,0	7,6
6.2.12 7:30		5,6	6,4	6,4	6,4		6,8	6,4	6,6	6,6
7.2.12 16:10			7,6	8,0	8,2			7,6	8,0	8,4
8.2.12 11:10			4,4	9,0	4,2			4,0	4,8	4,8
9.2.12 11:40			5,8	7,2	6,6			5,8	6,4	6,8
10.2.12 8:25			3,4	3,8	4,2			3,2	3,4	3,8
12.2.12 21:05			8,6	9,6	8,6			8,2	8,8	9,6

Příloha č. 5. Záznam měření – Hydrolyzovaný substrát z lokality Podlesí

Date, Time	Volume									
	NH1	NH2	NH3	NH4	NH5	NH6	NH7	NH8	NH9	NH10
18.1.12 20:50	6,6	6,4	6,6	4,0	1,2	4,6	6,4	6,2	4,8	1,8
19.1.12 6:45	14,0	8,4	12,6	11,2	1,4	12,4	11,0	10,8	11,4	9,4
19.1.12 16:10	13,8	13,2	11,8	7,2	3,2	6,0	7,2	6,8	14,0	7,6
20.1.12 7:30	20,6	19,8	21,4	28,0	13,6	19,2	14,4	22,0	16,2	27,0
20.1.12 19:55	19,0	20,8	15,6	22,0	16,2	15,0	21,6	16,6	21,8	18,4
21.1.12 11:15	29,8	27,6	31,0	31,4	31,0	23,6	31,0	23,6	31,0	30,8
22.1.12 12:15	46,4	41,0	46,8	44,2	40,8	36,8	50,6	47,8	36,0	48,6
23.1.12 11:30	21,6	39,8	36,4	35,4	26,6	37,6	23,2	35,6	24,6	24,4
24.1.12 11:25	21,6	27,8	25,0	25,0	22,6	28,0	27,6	19,8	29,0	24,4
25.1.12 12:05	23,4	21,0	25,0	27,0	21,4	24,4	28,0	20,6	27,8	22,6
26.1.12 10:20	21,2	19,2	19,6	22,2	17,2	21,4	22,4	20,4	21,4	21,8
27.1.12 13:20	17,8	18,0	19,4	20,8	19,2	14,0	20,0	18,4	17,8	19,4
28.1.12 16:35	17,8	17,2	16,2	17,8	12,0	12,2	13,2	15,4	18,0	9,4
29.1.12 17:30	15,0	13,6	13,8	11,8	12,4	13,0	11,4	13,4	10,6	11,8
30.1.12 14:20	11,4	12,8	10,4	11,8	11,2	13,4	12,4	7,2	8,4	10,0
31.1.12 13:40	8,2	8,0	8,4	9,2	9,8	9,2	8,2	8,6	10,0	9,6
1.2.12 12:30		7,8	7,2	8,2	8,8		6,6	7,4	7,0	8,0
2.2.12 9:10		6,0	5,8	6,8	7,6		5,6	6,0	6,8	6,8
3.2.12 11:00		5,8	6,0	6,0	6,2		3,2	3,0	2,8	6,6
4.2.12 10:20		6,0	5,0	4,4	6,8		4,4	5,0	6,0	6,0
5.2.12 10:10		4,8	5,0	5,6	5,2		5,0	5,2	5,2	4,2
6.2.12 7:35		4,4	4,2	5,6	5,4		4,6	4,6	4,8	5,4
7.2.12 16:15			6,2	6,8	6,8			5,4	5,8	6,4
8.2.12 11:15			3,6	4,0	4,0			3,8	3,4	4,0
9.2.12 11:45			5,2	5,0	4,8			4,6	4,6	4,8
10.2.12 8:30			1,8	1,0	1,0			1,2	0,2	1,0
12.2.12 21:05			8,4	8,2	6,8			8,0	7,6	8,8

Příloha č. 6. Záznam měření – Inokulum z bioplynové stanice Krásná Hora

Date, Time	Volume									
	IT1	IT2	IT3	IT4	IT5	IT6	IT7	IT8	IT9	IT10
18.1.12 21:00	4,4	1,8	0,6	5,2	3,8	2,6	4,2	1,4	5,0	0,6
19.1.12 6:50	3,0	1,4	2,2	3,6	2,8	2,4	0,6	1,8	3,6	1,6
19.1.12 16:15	2,4	0,8	0,4	2,2	1,2	0,8	0,6	0,8	2,2	1,8
20.1.12 7:35	1,8	4,0	1,6	2,8	1,8	2,2	1,0	1,6	2,8	1,0
20.1.12 20:05	1,4	2,2	2,8	2,2	3,4	1,2	1,4	1,0	2,0	1,2
21.1.12 11:30	6,2	5,8	6,4	5,6	6,4	5,6	5,6	5,4	5,4	5,8
22.1.12 12:20	11,0	6,8	11,4	10,4	11,2	10,6	9,4	10,0	6,0	10,2
23.1.12 11:35	7,2	3,8	8,0	5,0	9,0	9,2	8,4	7,6	7,4	8,0
24.1.12 11:30	8,0	7,4	8,4	7,4	9,8	8,0	9,2	9,4	8,2	8,6
25.1.12 12:10	9,0	8,4	7,6	7,8	8,8	8,0	8,4	9,2	8,6	8,4
26.1.12 10:30	8,4	7,6	9,4	8,4	8,0	7,2	6,0	8,4	7,2	6,0
27.1.12 13:25	5,4	8,0	9,2	7,6	5,0	0,0	9,0	7,8	7,8	7,0
28.1.12 16:35	9,8	10,4	9,4	11,6	17,2	5,2	10,0	11,0	4,8	5,8
29.1.12 17:30	9,4	8,4	9,4	9,2	10,4	8,2	7,4	9,2	5,2	7,8
30.1.12 14:30	8,8	9,0	8,4	8,8	9,2	8,2	8,2	8,2	8,4	7,6
31.1.12 13:50	6,8	7,4	7,0	8,0	6,2	6,6	7,0	7,0	8,0	7,8
1.2.12 12:35		6,0	5,6	6,8	7,4		6,0	6,0	7,0	6,8
2.2.12 9:15		5,0	5,0	5,8	6,0		4,6	5,0	5,6	5,6
3.2.12 11:07		4,4	5,8	5,6	6,0		4,4	3,2	4,4	5,4
4.2.12 10:25		3,8	4,4	5,2	4,8		4,0	4,0	4,6	4,6
5.2.12 10:15		3,6	3,6	4,4	4,0		3,4	3,6	3,8	3,8
6.2.12 7:35		3,2	3,6	4,2	4,0		3,8	3,8	2,6	3,6
7.2.12 16:15			3,4	4,8	4,4			4,0	4,0	4,4
8.2.12 11:15			2,6	3,0	3,0			2,8	2,8	2,6
9.2.12 11:50			2,8	3,6	3,4			3,4	3,2	3,2
10.2.12 8:30			0,4	0,0	0,0			0,4	0,4	0,2
12.2.12 21:10			6,4	7,4	7,4			6,4	6,2	6,0