

## **Disertační práce**

# **Vývoj a aplikace kompozitního nanovláknenného nosiče biomasy pro environmentální biotechnologie**

*Studijní program:*

P3942 Nanotechnologie

*Studijní obor:*

3942V001 Nanotechnologie

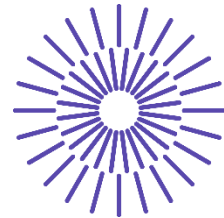
*Autor práce:*

**Ing. Karel Havlíček**

*Vedoucí práce:*

Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

Liberec 2022



## **Doctoral thesis**

# **The development and application of composite nanofiber biomass carrier for environmental biotechnologies**

*Study program:*

P3942 Nanotechnology

*Field of study:*

3942V001 Nanotechnology

*Author:*

**Ing. Karel Havlíček**

*Supervisor:*

Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

Liberec 2022

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

## Poděkování

Primárně bych rád poděkoval vedoucímu práce (Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.) za cenné rady a konzultace, vedoucímu OTŽP (Ing. Mgr. Lukáš Dvořák, Ph.D.) za poskytnutí skvělého prostředí pro práci na své disertaci a celé své rodině za podporu.

Dále bych rád poděkoval všem spolupracovníkům a přátelům, kteří mi jakýmkoliv způsobem pomohli v mém studiu. A na závěr bych velmi rád poděkoval *in memoriam* panu Ing. Grégrovi, který mi poskytl mnoho rad a informací a po celou dobu studia (od bakaláře až po doktorát) mě inspiroval.



Tato práce byla podpořena Studentskou grantovou soutěží Technické univerzity v Liberci v rámci projektu č. SGS-2019-3023.

## **Anotace**

Tato práce vznikla s cílem vytvořit nový typ nosiče biomasy pro podporu post-treatment procesů na čistírnách odpadních vod. Byly vyvinuty a otestovány dva typy nosičů biomasy – 3D mikrovlnákový sendvičové struktury a nanovlnákový v podobě core/shell struktury. Nejprve probíhala selekce a testování vhodných materiálů a struktur. Následně byly postupným vývojem vytvářeny a testovány různé formy nosičů do té doby, dokud nedošlo k vytvoření nosiče požadovaných parametrů a účinnosti pro zvolený biologický proces. Porovnáním nosičů bylo dosaženo závěru, že nanovlnákové jsou nejlépe osidlovány specifickými nitrifikačními bakterie a tvořený biofilm je velmi pevně přichycen k povrchu. Do 3D mikrovlnákových nosičů je velmi rychle zachytávána prvotní biomasa a je zde velký prostor pro růst biofilmu s aktivními bakteriemi. Oba vyvinuté nosiče mají oproti komerčně dostupným mnohem lepší vlastnosti pro adhezi bakterií a následný růst biofilmu a jsou využitelné pro různé procesy. V rámci práce vznikla řada výstupů a poznatků přispívajících oboru čistírenství a biofilmovým procesům především z hlediska hodnocení biofilmu a struktur nosiče.

## **Klíčová slova**

biofilm; čištění odpadních vod; mikrovlnáka; nanovlnáka; nitrifikace; nitrifikační bakterie; nosič biomasy; post-treatment

## **Annotation**

This work aimed to create a new biomass carrier to support post-treatment processes at wastewater treatment plants. Two types of biomass carriers were developed and tested – 3D microfibrinous sandwich structures and nanofibrous ones in the form of a core/shell structure. First, the selection and testing of suitable materials and designs took place. Subsequently, various forms of carriers were created and gradually tested until a carrier with the required parameters and efficiency for the selected biological process was completed. By comparing the carriers, the conclusion was reached that specific nitrifying bacteria best adhered to nanofibrous ones, and the formed biofilm is firmly attached to the surface. Primary biomass is captured very quickly in the 3D microfiber carriers, and there is ample space for the growth of a biofilm with active bacteria. Both developed carriers have much better properties for bacterial adhesion and subsequent biofilm growth than commercially available ones and can be used for various processes. As part of the work, several outputs and findings contributing to sewage treatment and biofilm processes were created, especially by evaluating biofilm and carrier structures.

## **Keywords**

biofilm; biomass carrier; microfibers; nanofibers; nitrification; nitrifying bacteria; post-treatment; sewage treatment

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>9</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY .....</b>	<b>12</b>
2.1. NANOMATERIÁLY V BIOTECHNOLOGIÍCH .....	13
2.2. NOSIČE BIOMASY .....	16
2.3. MBBR SYSTÉMY .....	17
2.4. NITRIFIKACE .....	19
2.5. METODY ANALÝZY BIOFILMU .....	20
2.5.1. <i>Respirometrie</i> .....	21
2.5.2. <i>Kinetické testy</i> .....	21
2.5.3. <i>Molekulárně genetické metody</i> .....	22
2.5.4. <i>Metody stanovení aktivity biofilmu</i> .....	23
<b>3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>24</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>25</b>
4.1. MATERIÁLY POUŽITÉ PRO PŘÍPRAVU NOSIČŮ .....	25
4.2. LABORATORNÍ REAKTOR POST-NITRIFIKACE .....	26
4.3. PILOTNÍ REAKTOR V MENŠÍM OBJEMU .....	27
4.4. PILOTNÍ REAKTOR VE VĚTŠÍM OBJEMU .....	28
4.5. POUŽITÉ METODY ELEKTROSTATICKÉHO ZVLÁKŇOVÁNÍ .....	29
4.6. POUŽITÁ PLETAŘSKÁ TECHNOLOGIE .....	33
4.7. PARAMETRY RESPIROMETRICKÝCH MĚŘENÍ .....	34
4.8. METODIKA MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝCH METOD.....	35
4.9. STANOVENÍ CHEMISMU LABORATORNÍCH BIOREAKTORŮ.....	38
4.10. MIKROSKOPIE.....	38
<b>5. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>40</b>
5.1. VÝVOJ MIKROVLÁKENNÝCH STRUKTUR .....	40
5.1.1. <i>Parametry vyvíjených nosičů</i> .....	40
5.1.2. <i>Chemismus reaktorů, účinnost nitrifikace</i> .....	41
5.1.3. <i>Analýza respirometrie</i> .....	45
5.1.4. <i>Výsledky qPCR a NGS analýzy</i> .....	50
5.2. VÝVOJ NANOVLÁKENNÝCH STRUKTUR .....	59
5.2.1. <i>Příprava a charakterizace nanovláken PVB a PUR</i> .....	60
5.2.2. <i>Testování plošných nanovlákných struktur PVB</i> .....	65
5.2.3. <i>Modifikace plošné nanovlákné struktury</i> .....	68

5.3.	POROVNÁNÍ NOSIČŮ BIOMASY .....	70
5.3.1.	<i>Popis porovnávaných nosičů biomasy</i> .....	70
5.3.2.	<i>Vyhodnocení chemismu reaktorů</i> .....	71
5.3.3.	<i>Výsledky respirometrie</i> .....	73
5.3.4.	<i>Výsledky molekulárně genetických metod</i> .....	75
5.4.	PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ FINÁLNÍHO 3D MIKROVLÁKENNÉHO NOSIČE.....	81
5.4.1.	<i>Vyhodnocení zátěžového pilotního testu v menším objemu</i> .....	81
5.4.2.	<i>Modifikace nosiče S</i> .....	85
5.4.3.	<i>Vyhodnocení pilotního testu ve větším objemu</i> .....	85
5.5.	PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ FINÁLNÍHO 3D NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE.....	90
5.5.1.	<i>Vývoj, návrh a testování NBB nosiče</i> .....	90
<b>6.</b>	<b>SUMARIZACE .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>POPIS UPLATNĚNÍ VÝSLEDKŮ A PŘÍNOS PRÁCE.....</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>103</b>
	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....</b>	<b>104</b>
	<b>REFERENCE .....</b>	<b>105</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>115</b>



## Seznam použitých zkratek a symbolů

AC – střídavý proud

AOA – amoniak oxidující archea

AOB – bakterie oxidující amoniak

BSK – biochemická spotřeba kyslíku

CE – sběrná elektroda

CO<sub>2</sub> – oxid uhličitý

ČOV – čistírna odpadních vod

DC – stejnosměrný proud

DNA – deoxyribonukleová kyselina

Et-OH – etanol

EPS – extracelulární polymerní látky

FDA – americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv

Fe – železo

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – oxid železitý

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – oxid železnato-železitý

FISH – fluorescenční in-situ hybridizace

H – vlhkost

HRT – hydraulický retenční čas

CHSK – chemická spotřeba kyslíku

KF – konfokální mikroskopie

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – dihydrogenfosforečnan draselný

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – hydrogenfosforečnan draselný

KTJ – kolonie tvořící jednotky

MBR – membránový bioreaktor

MBBR – moving bed biofilm reactor

MO – mikroorganismy

N<sub>2</sub> – dusík

NaCl – chlorid sodný

NaHCO<sub>3</sub> – hydrogenuhličitan sodný

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – hydrogenfosforečnan sodný dihydrát

NaOH – hydroxid sodný

NGS – sekvenování nové generace

NH<sub>4</sub>Cl – chlorid amonný  
NH<sub>4</sub>-N – amoniakální dusík  
NOB – bakterie oxidující dusitany  
NO<sub>2</sub>-N – dusitanový dusík  
NO<sub>3</sub>-N – dusičnanový dusík  
O<sub>2</sub> – kyslík  
PBS – fosfátový pufr  
PES – polyester  
PET – polyethylentereftalát  
PMA-qPCR – propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction  
POP – polypropylen  
PO<sub>4</sub>-P – fosforečnanový fosfor  
PUR – polyuretan  
PVB – polyvinylbutyral  
PVDF – polyvinylidenfluorid  
qPCR – kvantitativní polymerázová řetězová reakce  
QS – quorum sensing  
RNA – ribonukleová kyselina  
SE – zvlákňovací elektroda  
SEM – skenovací elektronové mikroskopie  
T – teplota  
TN – celkový dusík  
TP – celkový fosfor  
TTC – triphenyl tetrazolium chloride  
XTT – (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)

## 1. ÚVOD

Techniky výroby mikro- a nanovlákných materiálů se společně s jejich aplikacemi v biotechnologiích dynamicky rozvíjí. Možností využití poznatků z této oblasti je vývoj a testování nosičů biomasy, resp. materiálů podporující rychlou imobilizaci mikroorganismů (MO) na jejich povrch následovanou tvorbou biofilmu. Protože fyzikálně-mechanické vlastnosti mikro- a nanovlákného nosiče mají významný vliv na rychlost mikrobiální kolonizace a funkčnost biofilmu, variabilita parametrů při přípravě nanovláken (materiál, modifikace, struktura a morfologie povrchu, smáčivost apod.) umožňuje vytvořit specifické prostředí pro dané bakterie (Liu et al. 2017). Imobilizace MO na povrch (biofilm) má mnoho výhod ve srovnání s bakteriemi žijícími volně jako planktonické buňky nebo ve formě buněčných agregátů a vloček. Cíleně připravené nosiče biomasy mohou přesně odrážet potřeby určitého biotechnologického procesu, resp. daných MO a tím zlepšit jejich účinnost v dané aplikaci. Potencionálně využitelných materiálů pro přípravu nosičů biomasy aplikovatelných v oblasti čištění odpadních vod (ČOV) existuje celá řada, avšak jen některé z nich splňují všechna potřebná kritéria (biologická a mechanická stabilita, vhodná morfologie povrchu, netoxické účinky na okolní prostředí a proudění v daném médiu). Vývoj mikro- a nanovlákných nosičů pro čistírenské účely je poměrně nové téma, důležitá je detailní charakterizace připravených materiálů, laboratorní a poloprovozní biologické testování s vybranými bakteriálními druhy a orientace na finální stupně čištění odpadních vod, tzv. post-treatment. S rozšiřujícími se legislativními požadavky na snižování objemu odpadních vod a koncentrací sloučenin dusíku v nich obsažené je nutné vyvinout účinnější technologie odstraňování těchto sloučenin, které lze snadno aplikovat na stávající čistírny odpadních vod. Důležité je snižování produkce odpadních vod na ekvivalent obyvatel, což znamená vyšší koncentrace znečišťujících látek na jedné straně a uváděný legislativní tlak na nižší koncentrace a celkové množství kontaminantů v odtoku z ČOV na straně druhé. Týká se to zejména komerčních a citlivých oblastí se zvláštní ochranou, kde je nutné snížit koncentrace dusíku v odpadních vodách na minimum.

Cílem této práce bylo vyvinout a otestovat nový typ nosiče biomasy pro environmentální biotechnologie, primárně pro nitrifikační MBBR systémy čištění odpadních vod. V rámci práce vznikla řada prototypů nosičů, které jsou aplikovatelné do praxe a velkým přínosem bylo získání nových znalostí v oblasti biofilmových procesů.

## 2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU PROBLEMATIKY

Environmentální biotechnologie je rychle se rozvíjející obor. Do tohoto odvětví lze zařadit i čištění vod, kdy rozvoj společnosti a jejích nároků klade stále více požadavků na metody, které slouží k udržování kvality vod. Tento rozvoj zároveň vede ke zvyšování koncentrací polutantů v životním prostředí. V této práci je řešen vývoj a aplikace nového typu nosiče biomasy a jeho použití v ČOV systémech za účelem udržet kvalitu vypouštěných odpadních vod na co nejvyšší úrovni.

Nejčastější metodou odstraňování dusíkatých i dalších látek z odpadních vod je konvenční proces s aktivovaným kalem. Je ekonomicky efektivní a šetrný k životnímu prostředí, ale má značné nároky na prostor (velké biologické reaktory a usazovací nádrže), zejména v případě vyšších požadavků na kvalitu odpadních vod a neustálé nutnosti recyklovat veškerou biomasu ve vícestupňových systémech (Leyva-Díaz et al. 2017). MO v biofilmu mají oproti jejich přítomnosti v suspendovaném kalu několik výhod: udržení pomalu rostoucích bakterií v systému, vyšší odolnost vůči zátěži prostředí (pH, toxické sloučeniny), vynikající stabilita ve vodním prostředí, rychlejší komunikace mezi buňkami a větší kontaktní plocha mezi bakteriemi a polutanty (Dzionek et al. 2016; Shao et al. 2017). Navíc lze v případě biofilmového procesu v post-treatmentu odstranit i nízké koncentrace sloučenin dusíku pomocí specifických nosičů biomasy bez nutnosti složité separace a odstraňování kalu (Forrest et al. 2016; Xiao et al. 2016). V současné době probíhá několik laboratorních a pilotních studií s nosiči biomasy, které se používají k zefektivnění odstraňování TN, TP a  $\text{NH}_4\text{-N}$  z odpadních vod (Ashkanani et al. 2019; Chaali et al. 2018; Forrest et al. 2016; Leyva-Díaz et al. 2017; Masłoń a Tomaszek 2015; Shao et al. 2017; Sonwani et al. 2019; Svobodová et al. 2021; Xiao et al. 2016; Zhang et al. 2019). Většina studií však využívá známé a komerčně dostupné nosiče a nezaměřují se na jejich vývoj. Návrh a testování nových nosičů biomasy může podpořit stávající systémy ČOV a přispět tak k eliminaci nízkých koncentrací obtížně odstranitelných znečišťujících látek. Několik studií potvrdilo účinnost nosičů v nitrifikačních a denitrifikačních systémech (Iannaccone et al. 2020; Lima et al. 2021; Wang et al. 2020a; Zhang et al. 2021), která obecně závisí na velikosti povrchu nosiče, morfologii, porositě materiálu, procentuálním objemu plnění, hustotě materiálu, organickém zatížení a na intenzitě aerace (Ahmad et al. 2017a; Chaali et al. 2018; Massoompour et al. 2020).

Množství dostupných materiálů a způsobů jejich zpracování (modifikací) a rozvíjející se poznatky o čistírenských procesech poskytují široké možnosti pro vývoj účinných, levných a ekologicky šetrných nosičů biomasy, zejména pro post-treatment. Struktura povrchu nosiče je nezbytná pro růst biofilmu. Síla biofilmu určuje účinnost sledovaných procesů, kdy v tomto případě velmi záleží na konkrétním procesu; v MBBR systémech se v současnosti cílí na tenký a účinný biofilm, kde přestup substrátu a akceptoru elektronů je velmi rychlý. Porozita materiálu je zásadní pro vytvoření požadovaného aerobního nebo anoxického prostředí (Liu et al. 2020b) a případné modifikace/funkcionalizace mohou vytvořit konkrétní podmínky pro specifické MO (Zhao et al. 2019). Tvar, hmotnost a mechanické vlastnosti jsou zásadní pro stabilitu nosičů biomasy v namáhaných systémech (např. provzdušňované nitrifikační nádrže).

Pochopení mikrobiologických procesů při čištění odpadních vod je rozhodující pro zavádění nových technologií, stejně jako v případě krátkodobého monitorování zavedených systémů ČOV (Gómez et al. 2012; Zhang a Jiang 2019). Molekulárně genetické metody (FISH – *fluorescenční in-situ hybridizace*; qPCR – *kvantitativní polymerázová řetězová reakce*; NGS – *sekvenování nové generace*) jsou nezbytné pro hodnocení aplikací nosičů biomasy v biologických procesech spolu s metodou respirometrie, která je rovněž nezbytná pro celkové hodnocení jejich účinnosti. Primární úlohou používaných metod molekulární genetiky na ČOV obecně, a zejména v systémech MBBR určených pro odstraňování dusíku, je ověřit přítomnost nitrifikačních bakterií AOB (bakterie oxidující amoniak) a NOB (bakterie oxidující dusitany) a následně je kvantifikovat nebo identifikovat (Felföldi et al. 2015; Reboleiro-Rivas et al. 2015).

## 2.1. Nanomateriály v biotechnologiích

S rostoucí industrializací a urbanizací se životní prostředí stále více znečišťuje. Konvenční techniky, jako je filtrace, odstředování a biologické čištění jsou mnohdy omezeně efektivní pro dosažení nižších koncentrací specifických znečišťujících látek, zejména u koncentrovaných odpadních vod. Proto existuje potřeba vývoje nových a pokročilých technik pro monitorování a udržování životního prostředí. Nanotechnologie mohou být řešením výše uvedených problémů, jelikož jejich vlastnosti jsou vhodné pro separace nebo transformace širokého spektra antropogenních polutantů. Pro řadu různých odvětví jsou vyvíjeny nanočástice a produkty tvořené nanoelementy – membrány, filtry, katalyzátory aj. Ty se charakterizují alespoň jedním nanometrovým

rozměrem a vyšším poměrem plochy povrchu k celkovému objemu. Díky těmto vlastnostem poskytují větší reakční povrch, což má za následek zvýšenou účinnost a selektivitu (Kumar et al. 2017). Nanomateriály používané v biotechnologiích jsou vymezeny na takové, které splňují několik základních požadavků – nulová toxicita, dostupná metoda přípravy, kompatibilita s biologickými systémy, definovaná struktura a známé chování (transformační procesy) v životním prostředí. Formy nanomateriálů mohou být různé, ale především se jedná o nanočástice nebo nanovlákna (Sahu et al. 2019).

Mezi nejrozšířenější metody přípravy nanovláken patří elektrostatické zvlákňování a to především kvůli schopnosti vyrábět nanostruktury s jedinečnými vlastnostmi, jako je velký specifický povrch, nastavitelná porozita a mnohé další (Haider et al. 2018). Výhody/nevýhody elektrostatického zvlákňování, principy a další specifika jsou popsány v publikaci (Havlíček et al. 2020), která vznikla v rámci této disertační práce. Je známo mnoho způsobů přípravy nanovláken, kterými lze vyrobit materiály o různých strukturách a vlastnostech. Pro biologické aplikace je zásadní morfologie povrchu a vnitřní struktura připravených nanovláken, které mohou být ovlivněny různými parametry – typ polymeru nebo rozpouštědla, koncentrace polymeru (a s tím související viskozita roztoku), použitá zvlákňovací elektroda a její vzdálenost od kolektoru, rychlost odpařování kapaliny, povrchový náboj, vlhkost prostředí a další (Vaz et al. 2017; Haider et al. 2018; Ding et al. 2019). Široké spektrum využitelných polymerů dává možnost pro manipulaci a kontrolu povrchových vlastností, průměru vláken, pórovitosti, hustoty a hmotnosti nanovláknenné vrstvy a případně dalších parametrů (Širc et al. 2012). Existuje mnoho biotechnologických oborů využívajících benefity nanomateriálů, avšak v následujících odstavcích budou uvedeny ty oblasti, které jsou významné pro tuto vědeckou práci.

Využití nanotechnologií při čištění vod a sanaci životního prostředí má značný potenciál, jak prokázalo několik studií i již provedených reálných aplikací. Tradiční technologie čištění nenabízejí vždy nejehospodárnější řešení pro odstranění směsi několika běžných znečišťujících látek a nemusí být ekonomicky efektivní pro odstraňování specifických polutantů (těžké kovy, různé organické a anorganické sloučeniny, případně nebezpečné MO) přítomných v nízkých koncentracích. Navíc mnohé z těchto technologií již dosáhly svých limitů a nemusí být schopny plnit stále přísnější normy týkající se kvality vod. Také se ukázalo, že mnoho technologických úprav na bázi nanotechnologií funguje velmi dobře i jako doplněk technologií běžně používaných (Adeleye et al. 2016;

Werkneh a Rene 2019). Pro úpravu i čištění vod jsou v posledních letech intenzivně vyvíjeny a aplikovány nanovlákněné membrány připravené elektrostatickým zvlákněním, které mají vysokou porozitu, vysoký specifický povrch a unikátní vnitřní strukturu umožňující filtraci i velmi malých částic se současným zachováním požadovaného průtoku (Cui et al. 2020). Navíc je lze snadno funkcionalizovat, případně vytvářet kompozitní struktury pro dosažení maximální efektivity. Znečištění membrán, resp. biofouling je nevyhnutelným problémem při všech filtracích využívající membránové technologie. Přidání funkčních látek do struktur membrán, jako jsou nanočástice a jiná aditiva, může tento jev výrazně zmírnit (Chen et al. 2020). Nanomateriály mohou být i výborné sorbenty, které váží specifické polutanty z vod. Efektivními a neustále zlepšovanými jsou především karbonové nanotrubičky, materiály na bázi grafenu a nano-kovové oxidy (Santhosh et al. 2016).

Magnetické nanočástice (především „zero-valent“ Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) jsou dalším významným materiálem pro biotechnologie. Mohou být aplikovány ve své původní formě, funkcionalizované nebo přidané do větších matic. Mají různé fyzikálně-chemické vlastnosti vyplývající z rozdílu v jejich oxidačních stavech. Schopnost odstraňovat polutanty z vod je dána na základě oxidačně-redukčních mechanismů (Mohammed et al. 2017). Vzhledem k tomu, že magnetické nanočástice jsou již nějakou dobu zavedeny v lékařských aplikacích a jsou schváleny americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) jako kontrastní činidlo pro magnetickou rezonanci, byly již provedeny komplexní studie toxicity in vitro/in vivo. Je tak poskytnuta rozsáhlá databáze toxicity magnetických nanočástic, která pomáhá vyvíjet a aplikovat magnetické nanočástice s minimální toxicitou pro procesy ve vodách (včetně vod odpadních). Další výhodou magnetických nanočástic z hlediska jejich odstraňování a osudu ve vodním prostředí je skutečnost, že je lze jednoduše získat zpět aplikací magnetického pole (Gehrke et al. 2015). Navíc, magnetické nanočástice mohou být inkorporovány do nanovlákněných vrstev, čímž vzniká materiál kombinující výhody těchto dvou nanostruktur.

Obecně tedy využití nanotechnologií v oblastech sanace vody a čištění/úpravy vod přispívá k odstranění znečišťujících látek, patogenů a dalších škodlivých látek z nejpodstatnější složky našeho životního prostředí. Nanotechnologie poskytují alternativu ke stávajícím technologiím a nabízejí moderní a pokročilá řešení, jak zajistit dostatek kvalitní vody (Singh et al. 2022). Současný výzkum v této oblasti jde velmi rychle dopředu a každou chvíli se objevují nové metody či produkty, které přinášejí možnosti pro zajištění udržitelnosti vodstva na lokální i globální úrovni.

## 2.2. Nosiče biomasy

Obecně jsou nosiče biomasy z materiálů (dřevo, sklo, polymery aj.), které umožňují imobilizaci MO (tvorbu biofilmu) na jejich povrchu. S různým materiálovým složením, rozdílnými strukturami a povrchovými modifikacemi se mohou MO na daném povrchu chovat odlišně. Vlastnosti nosiče (struktura povrchu, smáčivost, náboj a další) mají významný dopad na míru mikrobiální kolonizace a funkčnosti biofilmu (Liu et al. 2017). MO se mohou přizpůsobit různým podmínkám podle typu svého metabolismu (výživy), a tedy i vhodně připravený, popř. modifikovaný materiál může podporovat růst, resp. reprodukci bakterií (včetně bakterií používaných při čištění odpadních vod).

Charakteristické vlastnosti nosiče biomasy v aplikacích čištění odpadních vod jsou následující: plocha, morfologie, resp. drsnost povrchu, typ polymeru, tvar, vnitřní struktura, pórovitost, biokompatibilita, mechanická, chemická a oxidační stabilita. V neposlední řadě musí být nosič ekonomicky výhodný a snadno získatelný (dostupné a snadno zpracovatelné materiály) (Felföldi et al. 2015; Jurecska et al. 2013; Zhao et al. 2019). V některých případech může být vyžadována synergie mezi aerobními a anoxickými podmínkami a toho lze docílit zvolenými parametry nosiče. Vhodná velikost (včetně velikostí vnitřních pórů) umožňující růst kvalitního biofilmu (s více druhy MO) zajistí účinné odstraňování polutantů z odpadních vod (Ahmad et al. 2017a). V současné době je použití nosičů biomasy jedna z možností, jak zvyšovat účinnosti stávajících ČOV bez nutnosti finančně náročných stavebních úprav objektů.

Dnes je známo několik typů nosičů biomasy využívaných pro různé procesy na ČOV. Přehled komerčně dostupných nosičů biomasy je uveden v publikacích (Morgan-Sagastume 2018; Al-Amshawee et al. 2020; di Biase et al. 2019). Jejich výroba je primárně řešena vytlačováním nebo lisováním plastů. Dále se pro přípravu využívají techniky jako jsou: 3D tisk, povrchová úprava čistě přírodních organických materiálů, metody výroby nanovláken (elektrospinning, melt-blown), fyzikálně-chemické úpravy stálých materiálů, případně další metody (di Biase et al. 2019; Nechanická et al. 2021). Komerční nosiče biomasy se vyznačují jednoduchostí jejich výroby, ale nemají dostatečně fragmentovanou povrchovou a vnitřní strukturu pro rychlou adhezi MO. Jednotlivé vrstvy nebo specifický povrch nano- a mikrovláknenných nosičů vyvíjených v rámci této práce poskytují vhodné prostředí pro zachycení vloček kalu během inokulační fáze. Potom následně dochází k přenosu a zachycení specifických bakterií do struktury nosiče a vytváří se biofilm. Vznik biofilmu je doprovázen



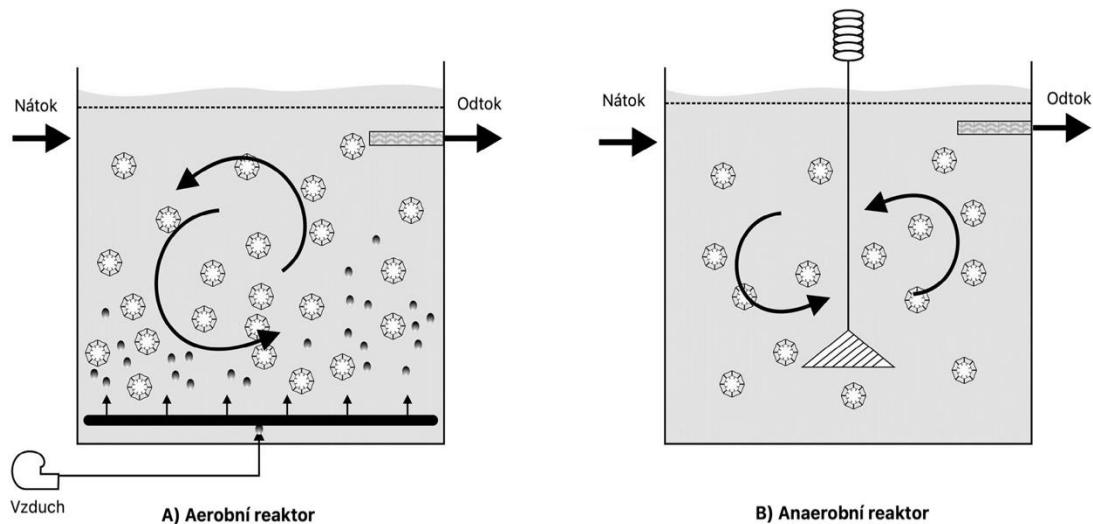
následujícími kroky: (1) počáteční připojení planktonických MO vystavením povrchu nosiče vodnému médiu; (2) ireverzibilní adheze po produkci EPS (extracelulární polymerní látky) zprostředkované MO, polyhydroxylové skupiny v EPS kolonizují bakterie k povrchu prostřednictvím vodíkových vazeb; (3) tvorba jednovrstvých mikrokolonií na pevném povrchu v důsledku replikace prvotních kolonizátorů; (4) zrání biofilmu do trojrozměrného uspořádání připojením elementů a nových planktonických bakterií z okolního prostředí; (5) disperze nebo expanze aktivními a pasivními procesy, při kterých se přisedlé buňky biofilmu obalené maticí přeměňují na volně plavající planktonické bakterie prostřednictvím quorum sensing (QS) nebo mezibuněčného signalizačního mechanismu (Sehar a Naz 2016).

### **2.3. MBBR systémy**

Biofilmový reaktor s pohyblivým ložem se poprvé objevil koncem roku 1980, kdy původní biofilmové procesy nestačily k efektivnímu odstraňování dusíku z odpadních vod. Bioreaktor s pohyblivým ložem (MBBR) je pokročilá technologie pro čištění komunálních i průmyslových odpadních vod. Důležitá součást tohoto systému je právě nosič biomasy, na kterém biofilm roste nepřetržitě po celém jeho povrchu za dynamických podmínek (Goswami a Mazumder 2019; Santos et al. 2020). Nástup MBBR a membránového bioreaktoru (MBR) v druhé polovině 20. století způsobil revoluci ve výzkumu v oblasti čištění odpadních vod. Výzkum dosáhl v posledním desetiletí významné dynamiky, což vedlo k různým vylepšením těchto systémů od jejich původních prototypů. Procesy MBBR se ukázaly jako významné pro oběhové hospodářství díky jejich vysokému potenciálu odstraňování polutantů ve vodách (Saidulu et al. 2021). Tato technologie je použitelná pro širokou škálu průtoků odpadních vod od 10 000 do 150 000 m<sup>3</sup> za den (Barwal a Chaudhary 2014).

V ideálním případě jsou MBBR systémy zcela promíchány bez mrtvého prostoru a používají se k modernizaci biologických systémů ČOV, skrápěných filtrů nebo jiných procesů. Pracují v nepřetržitém provozu a nejsou ovlivňovány problémem zanášení, který může vyžadovat zpětné proplachování nebo častou údržbu. Ve srovnání s nepohyblivým biofilmovým systémem má MBBR mnohem větší celkový specifický povrch pro růst biofilmu. Když jsou suspendované porézní nosiče biofilmu kontinuálně míchány v provozované provzdušňovací nádrži, jak je znázorněno na obrázku 1 A, aktivní biomasa je tvořena na povrchu těchto nosičů. V tomto případě mají nosiče o něco menší hustotu

než voda, což způsobuje jejich vznášení ve vodě a snadné promíchávání pomocí vzduchových bublin. Zde dochází k efektivnímu transportu kyslíku a polutantů k bakteriím v biofilmu (Lariyah et al. 2016). Dle nastavení hustoty nosičů a způsobu míchání lze MBBR využít pro aerobní i anaerobní procesy (Obrázek 1B). Při vývoji, modifikacích a zjišťování různých parametrů MBBR jsou zásadní matematické modely, na základě kterých lze predikovat chování jednotlivých částí tohoto systému (Xie et al. 2020).



**Obr. 1** Ukázka schéma MBBR v aerobním a anaerobním režimu (Barwal a Chaudhary 2014)

Proces MBBR lze použít jako:

1. Samostatný proces biologického čištění pro odstraňování BSK, nitrifikaci a/nebo denitrifikaci.
2. Jako předřazený proces před systémem aktivovaného kalu pro odstranění organické složky z čištěné odpadní vody, např. i jako selektor.
3. Jako post-treatment pro eliminaci zbytkových koncentrací dusíkatých látek a dalších specifických polutantů (Qiqi et al. 2012; Gzar et al. 2021).

Výhody MBBR jsou následující: systémy složené z menších kompaktních jednotek, zvýšená kapacita a efektivita, možnost kompletního odstranění polutantů, snížená produkce a hromadění kalu, zvýšená stabilita procesu, nízká ztráta energie, bez použití dalších filtrů a bez potřeby pravidelného zpětného proplachování.

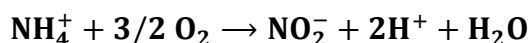
V této práci je pro ověřování funkčnosti nosičů biomasy využíván post-nitrifikační MBBR. Nitrifikace je v těchto systémech velice funkční i za podmínek limitujících

klasický nitrifikační proces (např. nízké teploty), což potvrzuje řada výzkumů i pilotních studií (Zhang et al. 2019; Abzazou et al. 2016; Young et al. 2017; Ashkanani et al. 2019; Ahmed et al. 2019), a navíc lze eliminovat i více polutantů najednou (Cimbritz et al. 2019). MBBR jsou velmi vhodné pro post-treatment na ČOV, tedy pro dočišťování odpadní vody (eliminaci nízkých koncentrací polutantů), která již prošla standardními čistírenskými procesy, a která zároveň obsahuje nízké koncentrace velkého množství (mikro)polutantů znečišťujících životní prostředí (Leonhard et al. 2022).

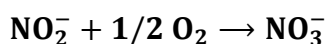
## 2.4. Nitrifikace

Proces biologického odstraňování amoniakálního dusíku (nitrifikace) je nejběžnější metodou pro eliminaci tohoto polutantu z komunálních odpadních vod. Nitrifikace je dvoustupňová reakce.

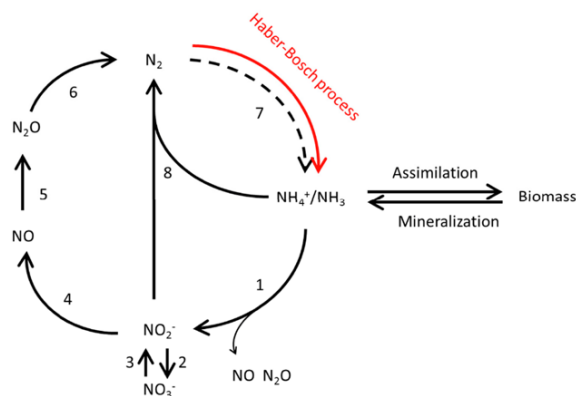
(1) Amoniak je oxidován na dusitan – nitritace:



(2) Dusitan je oxidován na dusičnany – nitratace:



Nitrifikace (Obrázek 2) je součástí druhého kroku mineralizace organické hmoty, kterým se z organického dusíku v půdě stává minerální (anorganický). Je prováděna několika různými skupinami MO, převážně bakteriemi oxidujícími amoniak (AOB), amoniak oxidujícími archei (AOA) a bakteriemi oxidujícími dusitany (NOB). Všechny tyto MO jsou aerobní (při procesu je potřeba udržovat hladinu kyslíku na určité úrovni) a převážně autotrofní. Dále jsou známy bakterie anammox, které provádí přímou anaerobní oxidaci amoniaku na plynný dusík, avšak jsou velmi náročné na okolní podmínky (převážně teplotu). Konvenční nitrifikace probíhá v půdách, sedimentech a vodě a je spojena s denitrifikací v prostředí s nízkým obsahem kyslíku. Rychlost nitrifikace je určena především faktory prostředí, jako je teplota, koncentrace kyslíku, pH a obsah solí (Ward 2008; Mishra et al. 2022). Nitritace i nitratace jsou inhibovány svými vlastními substráty – amonným a dusitanovým iontem (Carrera et al. 2004). Rychlost spotřeby substrátu ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) a míra koncentrace dusitanů v systému jsou zásadní pro vyhodnocení účinnosti nosičů biomasy v procesu nitrifikace.



**Obr. 2** Schéma kompletního cyklu dusíku při čištění odpadních vod: (1) aerobní oxidace amoniakálního dusíku, (2) aerobní oxidace dusitanů, (3) redukce dusičnanů na dusitany, (4) redukce dusitanů na oxid dusnatý, (5) redukce oxidu dusnatého na oxid dusný, (6) redukce oxidu dusného na plynný dusík, (7) fixace dusíku (pouze některé ČOV), (8) ANAMMOX proces. **Kompletní nitrifikace zahrnuje kroky 1 a 2** (van der Hoek et al. 2018)

V mnoha aerobních systémech (včetně nitrifikace) je rychlost přenosu kyslíku do buněk zásadním a limitujícím faktorem, který určuje rychlost biologického procesu. Dostupnost kyslíku pro MO závisí na jeho rozpustnosti, transferu hmoty a také na rychlosti, jakou je rozpuštěný kyslík využíván. U nitrifikace je kritický poměr mezi koncentracemi  $O_2$  a  $NH_4^+$  mezi 0,3 a 0,4. To činí z kyslíku ve většině případech limitující substrát. Například koncentrace 2 mg/l  $O_2$  v kapalně fázi reaktoru bude limitní pro koncentraci amoniaku 0,6 mg/l. V případě současné oxidace organické hmoty a nitrifikace určuje strukturu kompartmentu aerobního biofilmu konkurence mezi heterotrofními a autotrofními (nitrifikačními) bakteriemi. Když je poměr  $O_2/CHSK$  velmi malý, aerobní kompartment je zcela ovládan heterotrofními bakteriemi a nitrifikace v biofilmu neprobíhá (Sperling 2007).

## 2.5. Metody analýzy biofilmu

Dynamika biofilmu a jeho komplexní architektura vytváří výzvy pro měření týkající se počtu životaschopných buněk, akumulace hmoty, morfologie biofilmu a dalších kritických vlastností. Tyto výzvy nespočívají v samotných měřeních, ale v nedostatku standardizovaných protokolů pro vyhodnocování. Například měření akumulace biofilmu se může zaměřit na celkovou sušinu, celkový organický uhlík, počet živých buněk nebo celkový počet buněk (živých a mrtvých) (Wilson et al. 2017).

Existuje řada technik pro detekci a analýzu biofilmu, z nichž dostáváme pohled do jeho struktury, představu o aktivitě a kvalitativní, resp. kvantitativní informace o jednotlivých MO. Problémem může být snaha o porovnání výsledků z jednotlivých metod, které se liší principem stanovení. Na druhé straně je zapotřebí provedení více analýz současně, abychom výsledky takto citlivých stanovení mohli ověřit.

### **2.5.1. Respirometrie**

Respirometrické testy jsou široce používanou metodou v oblasti čištění odpadních vod k charakterizaci různých částí ČOV, posouzení toxických/inhibičních účinků a ke kalibraci matematických modelů. Respirometrie může poskytnout informace související s kinetikou a stechiometrií biologických procesů. Pomocí respirometrie je průběh aerobního biologického rozkladu látek sledován na základě změn složení plynné nebo kapalné (volumetrie) fáze probíhající v důsledku mikrobiálních pochodů v uzavřeném nebo otevřeném testovacím systému (Mainardis et al. 2021). Standardní postupy stanovení základních ukazatelů biodegradace jsou v závislosti na typu prostředí předepsány českými i mezinárodními normami.

V této práci je využívána respirometrie v uzavřeném systému, kdy je v přístroji Micro-Oxymax měřena změna složení plynné fáze (obsah CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub>, případně jiné plyny). Principem je proudění vzduchu z lahví se vzorky v uzavřené smyčce skrze detektory. V průběhu procesu se detekují koncentrační změny a ty jsou systémem převáděny na spotřebu O<sub>2</sub> a produkci CO<sub>2</sub> při standardních podmínkách. Při hodnocení účinnosti nosičů biomasy je tato metoda velmi přesná a lze s její pomocí přesně charakterizovat vývoj biofilmu v pravidelných časových intervalech (Dřimal et al. 2008).

### **2.5.2. Kinetické testy**

Reakční kinetika se zabývá rychlostí konkrétních reakcí, včetně reakcí v biologickém systému. V případě nitrifikace je měřena rychlost a účinnost přeměny amoniakálního dusíku na dusičnanový. Pro ověření kompletnosti nitrifikace je analyzován dusík dusitanový. Různé kinetické parametry musí být měřeny pro stanovení nitrifikační kapacity reaktoru. Vývoj kinetiky je nezbytnou znalostí pro pochopení a kvantitativní analýzu procesů usnadňujících optimalizaci biologického reaktoru. Kromě toho kinetické modely popisují dynamiku biologického procesu, vliv koncentrace substrátu a parametrů prostředí jako je pH, teplota, přítomnost inhibičních sloučenin atd.

To vše je třeba posoudit pro stanovení vztahu mezi rychlostí degradace substrátu a rychlostí růstu specifických bakterií (Bhattacharya a Mazumder 2021).

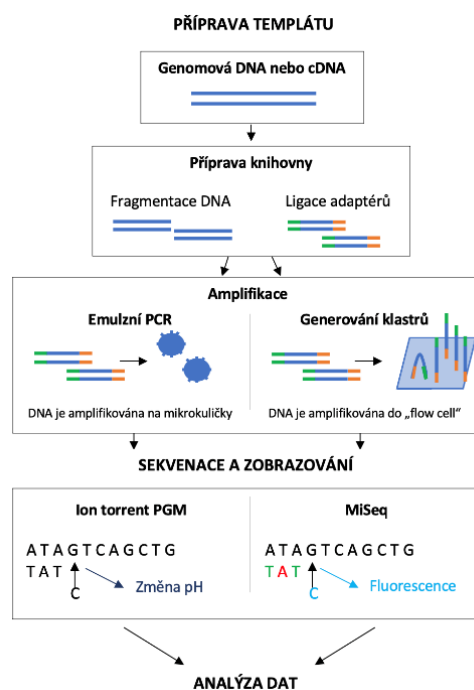
### 2.5.3. Molekulárně genetické metody

Součástí analýz účinnosti biofilmu na nosičích jsou metody, které mohou určit typ a koncentraci bakterií nacházejících se v daném systému. DNA lze definovanými fyzikálně-chemickými procesy izolovat od ostatních látek a analyzovat tak specifické rody MO.

Nukleotidová sekvence či celá buňka může být pod fluorescenčním mikroskopem vizualizována pomocí fluorescenčních sond komplementárních k úseku DNA v buňce. Podstatou metody FISH (fluorescenční in-situ hybridizace) je navázání specifického řetězce DNA s fluorescenčním barvivem (sonda) komplementárně k vyšetřovanému úseku DNA. Při zvýšené teplotě (až 75 °C) dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA vyšetřovaného vzorku i sondy (denaturace). Při následném ochlazení (37 °C) se sonda specificky váže do vyšetřovaného místa (hybridizace) a následně lze pod mikroskopem pozorovat fluorescenci, která značí přítomnost specifických bakterií (Volpi a Bridger 2008). V procesu nitrifikace se jedná o amoniak oxidující bakterie (ammonia-oxidizing bacteria – AOB) a dusitan oxidující bakterie (nitrite-oxidizing bacteria – NOB). Hodnocení je založené na obrazové (softwarové) analýze mikroskopických snímků z fluorescenčního mikroskopu. Existuje celá řada způsobů od prostého hodnocení intenzity barev přes propracované komerční programy hodnotící několik parametrů (intenzita a odstín barev, tvar objektů, 3D prostor aj.) současně až po pokročilé metody využívající neuronové sítě.

Kvantitativní PCR (polymerázová řetězová reakce) v reálném čase neboli real-time qPCR je standardní metoda pro detekci a kvantifikaci specifické cílové sekvence genu ve vzorku. V real-time qPCR je do PCR reakce začleněno fluorescenční barvivo, které interkaluje do amplifikované (namnožené) dvouřetězcové DNA. Po interkalaci se zvýší intenzita fluorescence barviva, tedy fluorescenční signál se zvyšuje amplifikací DNA. Prostřednictvím matematického vyhodnocení fluorescenčního signálu je stanoveno množství cílové DNA ve vzorku. Principem metody PCR, resp. real-time qPCR je cyklické opakování tří kroků s rozdílnými teplotami: (1) denaturace – rozvolnění DNA, (2) hybridizace primerů – nasednutí primerů na specifické úseky v DNA, (3) elongace – syntéza DNA (Biassoni a Raso 2016).

Platformy NGS provádějí masivně paralelní sekvenování milionů fragmentů DNA z jednoho vzorku. Tato technologie provádí výkonné mapování vzorků, které umožňuje sekvenovat celý genom za méně než jeden den. V posledním desetiletí bylo vyvinuto několik platform NGS, které jsou poměrně levné a zároveň vysoce výkonné. Dvě platformy, které jsou dnes nejčastěji používané ve výzkumu a klinických laboratořích jsou Life Technologies Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) a Illumina MiSeq. Základní pracovní kroky obou technologií jsou znázorněny na obrázku 3 (Grada a Weinbrecht 2013).



**Obr. 3** Schéma základních kroků sekvenování nové generace (pro platformy Ion Torrent PGM a MiSeq) (Grada a Weinbrecht 2013)

#### 2.5.4. Metody stanovení aktivity biofilmu

Důležitým parametrem v technologii čištění vod je aktivita biomasy z hlediska schopnosti odstraňování substrátu (polutantů). Pro stanovení viability buněk se používají metody KTJ (kolonie tvořící jednotky), PMA-qPCR (Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction), průtoková cytometrie a fosfolipidová analýza. Ke sledování metabolických aktivit je využíváno barvení – jedná se například o barvy XTT, TTC, resarizum alamar blue (Azeredo et al. 2017). Tyto metody jsou založeny na specifickém měření přítomnosti biofilmu (nebo jeho částí) či aktivity buněk připojených k povrchu po jejich opakovaném promývání. Obtížnější je přímá kvantifikace počtu buněk tvořících biofilm kvůli složitým strukturám vytvořeným během jeho růstu (Corte et al. 2019).

### 3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cíle této práce byly v počátku stanoveny obecně, jelikož využití nanomateriálů v biotechnologii vod je poměrně nové a vyvíjející se téma. S postupem v experimentální části a vývojem nových vědeckých poznatků byly cíle konkretizovány. Především bylo zjištěno, že vývoj nanovláknenného nosiče biomasy se neobejde bez současného vývoje nosiče mikrovláknenného, na kterém lze ve „větším měřítku“ pozorovat jednotlivé charakteristiky a je možné porovnat jednotlivé struktury mezi sebou. Vývoj mikrovláknenného nosiče probíhal ve spolupráci s Katedrou technologií a struktur (FM, TUL).

**Cíle této práce byly zformovány do následujících bodů:**

1. Vývoj, příprava a testování mikro- a nanomateriálů (mikro- a nanovláknenných struktur) různými metodami za účelem jejich využití pro nosiče biomasy a jejich detailní charakterizace za účelem ověření možností biologických interakcí.
2. Laboratorní testování účinnosti připravených nosičů biomasy – porovnání komerčních a připravených nosičů, výběr vhodného materiálu a tvar nosiče pro uplatnění ve finálních stupních čištění odpadních vod (post-treatment).
3. Analýza biofilmu a souhrn vhodných metod pro jeho hodnocení.
4. Vývoj a příprava finálního nosiče biomasy přesně definovaného tvaru, hmotnosti, popř. dalších fyzikálně-mechanických parametrů z vybrané mikro- nebo nanovláknenné vrstvy a jeho laboratorní testování.
5. Pilotní testování připravených nosičů na reálné ČOV.
6. Příprava minimálně 3 odborných publikací shrnujících dílčí práce na vývoji nosiče biomasy.



## 4. MATERIÁLY A METODY

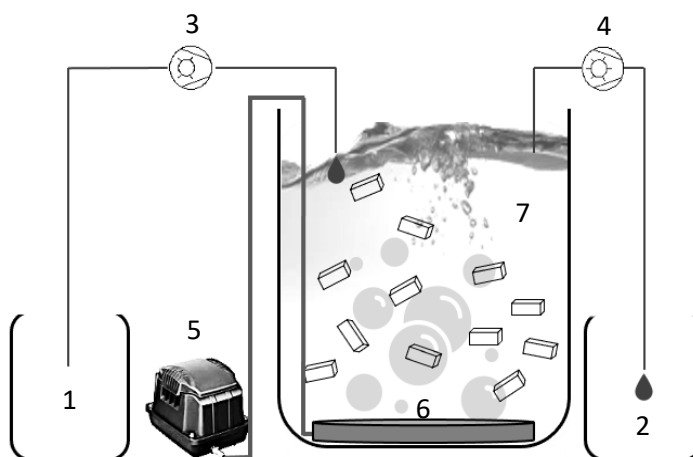
### 4.1. Materiály použité pro přípravu nosičů

Polyvinylbutyral (PVB) je netoxický polymer bez zápachu a šetrný k životnímu prostředí a je vhodnou složkou pro výrobu organicko-anorganických hybridních kompozitů (Chen et al. 2009). PVB vykazuje dobré mechanické vlastnosti, ideální přilnavost, vynikající dielektrické vlastnosti a je odolný proti vlhkosti, díky čemuž je stabilní ve vodném prostředí (Akinay et al. 2019). Polyuretany (PUR) jsou tvořeny takovými chemickými strukturami, které umožňují jeho snadnou vnitřní i povrchovou modifikaci. Vyznačují se dobrými mechanickými vlastnostmi (vynikající pevnost v tahu, vysoká elasticita atd.); PUR je biologicky stabilní a kompatibilní s krví. Polypropylen (POP) je lineární adiční polymer propylenu; má nejnižší hustotu z komoditních plastů: 0,89–0,91 g/cm<sup>3</sup>. Způsob jeho výroby může ovlivnit jeho fyzikální vlastnosti. POP má dobrou odolnost vůči chemikáliím, účinně zadržuje vodní páru a je odolnější a průhlednější než polyethylen. Díky vysokému bodu tání je vhodný pro aplikace se zvýšenou teplotou (Tajeddin et al. 2018). Polyestery (PES) vznikají kondenzačními reakcemi a ve svém základním řetězci mají charakteristickou esterovou vazbu - (RC=OOR')-. PES mají typicky vysokou teplotu tání (250–265 °C) a vysokou krystalinitu (Pruitt 2017). Typickým zástupcem skupiny polyesterů je polyethylentereftalát (PET).

V této práci byly použity dva základní polymery pro přípravu nanovlákných vrstev, PVB a PUR. 10% hmotnostní roztok PVB (Mowitals B 60 H, Kuraray America Inc., USA; průměrná molekulová hmotnost 60 000 amu) byl připraven v ethanolu (9 : 1 Et-OH : PVB; w/w). 18% hmotnostní roztok PUR (průměrná molekulová hmotnost 2 000 amu) byl připraven v DMF (41 : 9 DMF : PUR; w/w). Finálnímu výběru předcházelo důkladné testování, protože musel splňovat parametry pro všech 5 způsobů elektrostatického zvlákňování. Tyto polymery byly vybrány, protože jsou široce využívány v mnoha průmyslových odvětvích a výrazně se liší ve své struktuře a materiálových vlastnostech. Pro přípravu mikrovlákného nosiče byly postupně vyselektovány materiály POP a PET, které byly dodány od renomovaných firem ve formě přízí. Konečný výběr právě těchto materiálů byl zvolen na základě jejich nejvhodnějších vlastností pro zvolené účely.

## 4.2. Laboratorní reaktor post-nitrifikace

Model biologického reaktoru (systém MBBR) se skládá z otevřené silnostěnné skleněné nádoby o objemu 5 l (pracovní objem 4 l). Na dně nádoby jsou instalovány provzdušňovací prvky po stranách napojené na dmychadlo (AirMac, DB40, 48 l/min), které zajišťuje homogenní provzdušňování a promíchávání systému (hrubé bubliny). Schéma a fotografie bioreaktoru jsou zobrazeny na obrázcích 4 a 5. Před zahájením provozu jsou bioreaktory naočkovány aktivovaným kalem z nitrifikační nádrže městské ČOV. Syntetická odpadní voda použitá v bioreaktoru obsahuje danou koncentraci  $\text{NH}_4\text{Cl}$  jako zdroj dusíku (pro post-nitrifikaci typicky do 10 mg/l), fosfátový pufr (přibližně 8 mg/l) a  $\text{NaHCO}_3$  pro stabilizaci pH. Ve většině případech model funguje jako chemostat, tedy průtočný reaktor (objem nátoky = objem odtoku) s bakteriemi udržovanými na nosičích biomasy. Nepřetržitý provoz zajišťují peristaltická čerpadla (Watson Marlow Sci-Q323). Hydraulický retenční čas (HRT) byl během testů nastaven na 0,5–1 den (v závislosti na experimentu). Reaktory obsahovaly různé množství testovaných nosičů biomasy, tj. nosiče X 20 ks (efektivní povrchová plocha (EPP) jedno nosiče 5000 mm<sup>2</sup>); nosiče S (EPP 1500 mm<sup>2</sup>), M (1300 mm<sup>2</sup>), XL (2000 mm<sup>2</sup>) 20 ks; nosiče AnoxKaldnes (EPP 3500 mm<sup>2</sup>) K3 150 ks a nanovláknenné nosiče (EPP 2500 mm<sup>2</sup>) 50 ks.



**Obr. 4** Schéma biologického reaktoru post-nitrifikace; (1) nádoba s nátokem, (2) nádoba pro zachytávání odtoku, (3) čerpadlo nátoky, (4) čerpadlo odtoku, (5) aerátor, (6) vzdušnický kámen, (7) vlastní reaktor s médiem a testovanými nosiči biomasy



**Obr. 5** Fotografie bioreaktoru; reaktor o provozním objemu 4 L po ukončení inokulace

### **4.3. Pilotní reaktor v menším objemu**

Koncepce pilotního testu v menším objemu (15 l) je vyobrazena na obrázku 6. Na pilotní ČOV pro komerční zónu Dobrovíz (ČOV Amazon) byla realizována příprava pro provoz pilotního MBBR modelu pro 1. fázi ověření vyvinutého nosiče. Pilotní reaktor modeluje stupeň post-nitrifikace, tedy situaci, kdy je většina rozložitelných organických látek odstraněna, a také koncentrace  $\text{NH}_4\text{-N}$  se pohybuje v úrovni jednotek mg/l.

Na počátku byla kolona inokulována 100 mg/l kalu z nitrifikační nádrže a provozována několik dní bez přídavku  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Následně byl spuštěn ostrý provoz a testování. Jako nátok do kolony byla použita vyčištěná a přefiltrovaná odpadní voda s uměle přidávaným amoniakálním dusíkem. Nosiče zaujímaly 20 % objemu reaktoru. Na konci roku 2020 byl reaktor zapracován při době zdržení 1 den a rychlost nitrifikace se pohybovala okolo 5 mg/l. V roce 2021 bylo postupně zvyšováno zatížení reaktoru snižováním doby zdržení s cílem verifikovat provoz při době zdržení do 4 hodin. Během testování byla také ověřena nitrifikační schopnost bakterií v biofilmu za nízkých teplot a pravidelným měřením aktivity nitrifikačních bakterií bylo možné sledovat a vyhodnotit data určující vývoj biofilmu.



**Obr. 6** Poloprovozní systém post-nitrifikace s kolonou (na ČOV Amazon) pro testování vyvinutých nosičů S: 1. filtrační jednotka s keramickým membránovým modulem; 2. barel s kalem z nitrifikační nádrže; 3. barel na jímání permeátu z filtrační jednotky; 4. kolona s nosiči; 5. peristaltické čerpadlo; 6. vzduchové dmychadlo

#### 4.4. Pilotní reaktor ve větším objemu

Kolona (Obrázek 7) je tvořena silnostěnným sklem a má objem 250 l. Horní část je otevřená s mřížkováným víkem. Ve spodní části jsou umístěny dva vývody, které slouží pro zavedení vzduchu. Celá kolona je strategicky umístěna na ČOV Amazon tak, aby bylo možné připojit jednotlivé vstupy. Jako nátok surové vody do kolony byl použit odtok z ČOV Amazon (po filtraci) o běžném složení –  $\text{NO}_2\text{-N} < 0,015 \text{ mg/l}$ ;  $\text{NO}_3\text{-N} 4\text{-}10 \text{ mg/l}$ ;  $\text{NH}_4\text{-N} < 0,2$ ;  $\text{PO}_4\text{-P} 0,1\text{-}2 \text{ mg/l}$ ;  $\text{CHSK}_{\text{Cr}} 20\text{-}40 \text{ mg/l}$  a pH se pohybuje okolo hodnoty 7. Surová voda byla čerpána výkonným čerpadlem Easy Invert 1000 (od Easy pump). Průtok čerpadla byl nastaven dle požadované doby zdržení. Jako polutant byl do systému přidáván vodný roztok chloridu amonného ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) čerpáním pomocí čerpadla Watson Marlow Sci-Q323 na výslednou koncentraci cca  $5 \text{ mg/l NH}_4\text{-N}$  v médiu. Dosažení této koncentrace bylo řízeno nastavením koncentrace zásobního roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a jeho průtokem. Na počátku experimentu byla doba zdržení nastavena na 6 hodin a postupně snižována. Odtok byl řešen prostým přepadem a celá kolona tedy byla řízena jako

chemostat (kontinuální provoz); jedná se o systém MBBR. Nosiče zaujímaly celkem 20 % objemu kolony (20% plnění), což bylo zvoleno na základě předchozích zkušeností a z teoretických výpočtů. Kontinuální provzdušňování systému bylo zajištěno napojením kolony na rozvod tlakového vzduchu čistírny, kdy intenzita je řízena pomocí dvou ventilů (jeden umístěn na výstupu z rozvodu vzduchu a druhý na vstupu do kolony).



**Obr. 7** Poloprovozní systém post-nitrifikace s velkoobjemovou kolonou (na ČOV Amazon) pro testování finálních nosičů S: 1. kolona (před naplněním nosiči); 2. kolona s nosiči S; 3. čerpání surové vody z odtoku ČOV; 4. přívod vzduchu; 5. odtok; 6. přívod koncentrovaného vodného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$

Na počátku byla kolona inokulována 100 mg/l kalu z nitrifikační nádrže a provozována 14 dní bez přídavku  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Ihned po ukončení této doby byl zpuštěn ostrý provoz s dobou zdržení 6 hodin a koncentrací  $\text{NH}_4\text{-N}$  v nátoky 5 mg/l. Pravidelně je v odtoku z kolony měřena koncentrace amonných a dusitanových iontů (kyvetové testy).

#### 4.5. Použité metody elektrostatického zvlákňování

Pro elektrostatické zvlákňování byly použity zdroje stejnosměrného i střídavého napětí, přičemž metody byly rozlišeny podle typu použité zvlákňovací elektrody (Obrázek 8). Úpravou parametrů zvlákňování bylo dosaženo srovnatelných podmínek pro každou z metod a použitý zvlákňovaný polymer (Tabulky 1 a 2). Na základě provedených

experimentů byly stanoveny výhody a nevýhody testovaných metod elektrostatického zvlákňování (Tabulka 3) z hlediska požadavků pro cílové aplikace. Tyto výhody a nevýhody nelze generalizovat, záleží na zvolených podmínkách a požadavcích na nanovlákněné vrstvy následně použité pro konkrétní účely; v tomto případě aplikace v biotechnologiích.

**Tab. 1** *Procesní parametry elektrostatického zvlákňování pro přípravu PVB*

Metoda zvlákňování	Vzdálenost elektrod [m]	Napětí na elektrodě / kolektoru [kV]	El. proud na elektrodě / kolektoru [mA]	T [°C]	H [%]
AC elektrospinning	–	35–37	max. 1,5	22–25	22–28
Tyčka (DC)	0,120	14–20	max. 0,8	22–25	22–28
Nanospider (DC)	0,142	37–41 / -16 – -18	0,21 – 0,22 / 0,2 – 0,27	22–25	15–21
Jehla (DC)	0,120	18–22	max. 0,5	22–25	22–28
Odstředivé (DC)	0,095	15	max. 0,5	22–25	23–29

**Tab. 2** *Procesní parametry elektrostatického zvlákňování pro přípravu PUR*

Metoda zvlákňování	Vzdálenost elektrod [m]	Napětí na elektrodě / kolektoru [kV]	El. proud na elektrodě / kolektoru [mA]	T [°C]	H [%]
AC elektrospinning	–	35–37	max. 1,5	22–25	22–28
Tyčka (DC)	0,120	17–23	max. 0,8	22–25	22–28
Nanospider (DC)	0,142	40–44 / -16 – -18	0,21 – 0,22 / 0,2 – 0,27	22–25	15–21
Jehla (DC)	0,120	20–24	max. 0,5	22–25	22–28
Odstředivé (DC)	0,095	15	max. 0,5	22–25	23–29

### Střídavé elektrostatické zvlákňování (AC)

Zařízení pro tento typ zvlákňování se skládá převážně z vysokonapěťového transformátoru s převodním poměrem 36 000 / 230 V, dávkovacího čerpadla a elektrody. Další komponenty zajišťují bezpečnost a umožňují konfiguraci zařízení. Na rozdíl od DC metod se zde nepoužívá klasický kolektor, ale nanovláknna jsou zachycována např. na rotující buben otáčející s definovanou rychlostí (Pokorny et al. 2014). Elektroda má tvar duté kovové tyče se zakončením do tvaru kužele. Polymer neustále proudí ze zásobníku přes vnitřní část elektrody až ke konickému konci odkud je zvlákňován.

## **DC elektrostatické zvlákňování z tyčky**

Základna zařízení, která je umístěna v uzemněném kovovém rámu, obsahuje tyčovou elektrodu a kolektor. Elektroda je kladně nabitá pomocí vysokonapěťového zdroje a vznikající nanovlákná jsou vedena do kolektoru, který je buď záporně nabitý, nebo jednoduše uzemněn. Další podrobnosti o fyzikálních parametrech ovlivňujících tento proces jsou popsány ve studii Valtera et al. (2015).

## **Technologie Nanospider™ (DC)**

K výrobě nanovláknenných struktur pomocí elektrostatického pole bylo také použito komerční zařízení Nanospider NS 1WS500U (Elmarco). Zvlákňovací elektroda (SE) a sběrná elektroda (CE) jsou připojeny ke zdroji vysokého napětí a polymer je zvlákňován z volného povrchu. Výsledná nanovlákná jsou zachycena na spunbondu (podkladová netkaná textilie), který se odvíjí konstantní rychlostí pod kolektorem.

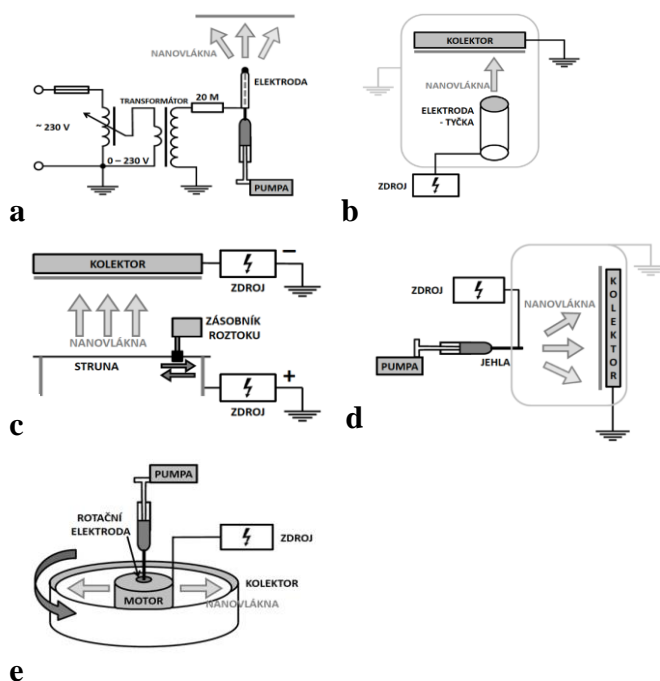
## **DC jehlové elektrostatické zvlákňování**

Princip stejnosměrného jehlového elektrostatického zvlákňování je sice podobný jako u stejnosměrného elektrostatického zvlákňování z tyčky, je však mnohem citlivější na jednotlivě nastavené parametry a působí zde řada jiných sil působících na vznikající a letící nanovlákná. Zařízení obsahuje zvlákňovací elektrodu ve formě duté jehly. Roztok polymeru prochází přes horizontální dávkovací zařízení až ke konci jehly, kde je na vytékající polymer aplikováno vysoké napětí (Yener a Jirsak 2012). Dávkovací zařízení je umístěno v definované vzdálenosti od středu kolektoru.

## **Odstředivé elektrostatické zvlákňování**

Odstředivé elektrostatické zvlákňování je kombinací klasického způsobu tvorby vláken pomocí odstředivé síly a elektrostatického zvlákňování, tedy jedná se zde o působení dvou základních sil současně. Podstata metody spočívá v rotaci ploché zvlákňovací trysky obsahující roztok polymeru. Odstředivé síly mají za následek vytahování vláken, která jsou zachycena na kolektoru v jednom směru. Přidáním zdroje stejnosměrného proudu lze dosáhnout stejné struktury vláken za použití nižších rychlostí (rotace) zvlákňovací trysky, a navíc se polymery stávají lépe zvlákňitelné. Mezi parametry, které mohou mít silný vliv na celý proces řadíme rychlost zvlákňovací trysky, zvolené napětí, vzdálenost zvlákňovací trysky a kolektoru, vlastnosti roztoku polymeru,

dávkování polymeru, reologické vlastnosti a okolní podmínky, jako je teplota, vlhkost a proudění vzduchu (Sarkar et al. 2010; Chang et al. 2014).



**Obr. 8** Schematické znázornění zařízení pro (a) AC elektrostatičké zvlákňování (Pokorný et al. 2014), (b) DC elektrostatičké zvlákňování z tyčky, (c) Nanospider<sup>TM</sup>, (d) DC jehlové elektrostatičké zvlákňování a (e) DC odstředivé elektrostatičké zvlákňování

**Tab. 3** Stanovené výhody a nevýhody použitých metod elektrostatičkého zvlákňování

Metoda	Výhody / Nevýhody
AC elektrosinning	+ Vyšší produktivita, široká škála možných úprav zařízení. - Bezpečnost (při práci), větší rozptyl průměru vláken.
Tyčka (DC)	+ Vhodné pro základní testování, jednoduché nastavení, malý průměr nanovláken. - Nízká produktivita, dávkování polymeru.
Nanospider (DC)	+ Vysoká (průmyslová) produktivita, možnost volby a nastavení řady parametrů, regulace okolních podmínek (teplota, vlhkost atd.). - Cena.
Jehla (DC)	+ Vhodné pro základní testování, jednoduché nastavení, malý průměr nanovláken, možnost přípravy koaxiálních nanovláken. - Nižší produktivita, značná závislost na nastavených parametrech (dávkování, napětí, okolní podmínky atd.).
Odstředivé (DC)	+ Možnost přípravy speciálních nanovláčkových struktur, jednoduché nastavení. - Velké průměry vláken, vrstvy často nehomogenní, defekty vláken, velká závislost na podmínkách prostředí.

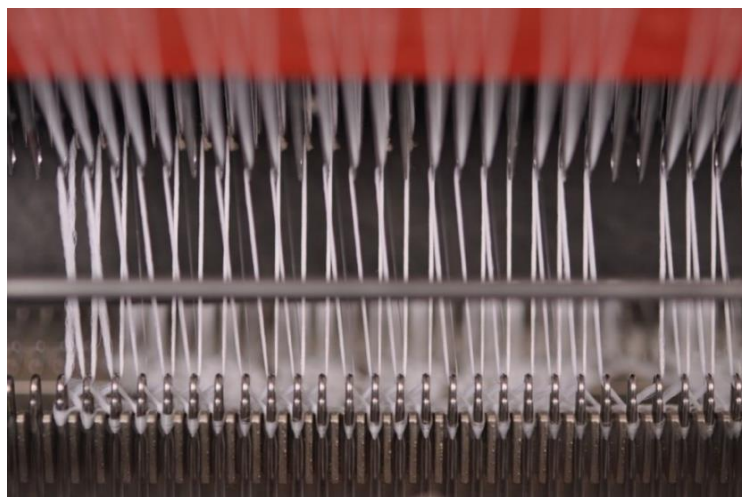


## 4.6. Použitá pletařská technologie

Technologie pletení byla využita při přípravě 3D mikrovláknenného nosiče. V tomto případě byla navázána účinná spolupráce s Katedrou technologií a struktur (KTT, Fakulta textilní, TUL), kde měli za úkol provést pre-screening (typ materiálu, dostupné způsoby zpracování příze apod.) a výrobu 3D nosiče (včetně ověření materiálových charakteristik). Modifikace vyráběných nosičů probíhala na základě mnou stanovených požadavků tak, aby byly splněny požadované charakteristiky zásadní pro využití nosiče v daném procesu. Na základě výsledků prováděných testů s jednotlivými vývojovými prototypy byla poskytována zpětná vazba na KTT, kde docházelo k postupným úpravám nosiče až do jeho finální podoby.

Distanční tkaniny (3D osnovní pleteniny) patří do skupiny osnovních oboustranných úpletů a je pro ně typický třetí rozměr (tloušťka), který je několikanásobně vyšší než standardní tloušťka osnovních úpletů. Distanční úplet se skládá ze dvou jedolícnicích úpletů, které jsou převráceny, uvnitř distanční tkaniny obvykle vyráběné s multifilamentem v jednom kroku. Rozměr stroje a lineární hustota multifilamentu závisí na účelu pleteniny. Konečná aplikace těchto struktur také určuje lapování na obou stranách tkaniny; struktura může být stejná nebo se mohou navzájem lišit. Konstrukce distanční tkaniny se řídí standardními pravidly lapování. Jedolícnicí úplety spojují distanční nitě a jsou složeny z monofilamentů. Technické požadavky charakterizují distanční tkaninu; parametry pletacího stroje a lineární hustota multifilamentu pro přední/zadní stranu určují významný parametr – průměr monofilamentu.

Pro pochopení vzhledu, konstrukce a vlastností osnovních pletenin s dvojitým lůžkem je nutné navrhnout lapovací pohyby všech vodících tyčí spolu s navlékáním příze, díky čemuž je 3D konstrukce pleteniny jedinečná a vhodná pro specifické účely. Použití vhodné kombinace materiálů umožňuje regulovat další vlastnosti, jako je transport vlhkosti, absorpce vody, splývavost a tepelná vodivost (Spencer 2001). Na základě nezbytných požadavků, které musí splňovat nosič biomasy, byl vyvinut 3D mikrovláknenný nosič jako 3D porézní struktura pomocí dvou-jehlových tyčových rašlových strojů. Obrázek 9 ukazuje detail použitého stroje Rius MINI-TRONIC 806 pro pletení distanční struktury. U tohoto stroje je vzdálenost mezi jehelními tyčemi kritickým parametrem, který určuje (spolu s lapováním) délku kusů spojovacích přízí a tím i tloušťku tkanin (Kyosev 2019).



**Obr. 9** Fotografie detailu hlavního pracovního mechanismu dvou-jehlového tyčového rašlového stroje Rius MINI-TRONIC 806

#### **4.7. Parametry respirometrických měření**

Respirometrická metoda je vhodná pro stanovení aktivity/kinetiky suspendovaného kalu, ale stejně tak pro testování biofilmových systémů. Je vysoce žádoucí testovat intaktní biofilm, tj. narostlý na nosičích, než se pokoušet o jeho separaci (např. setřením nebo vytřepáním), což by mohlo zásadním způsobem ovlivnit výsledky respirací (Lu et al. 2020).

U všech respirometrických měření byl dodržován obdobný postup. Jako médium byl použit odtok z ČOV, který byl samostatně měřen jako blank. Odtok (200 ml) byl přelit do 450ml respirometrické lahve a dále bylo přidáno cca 10 mg/l substrátu  $\text{NH}_4\text{-N}$  (ze zásobní lahve o koncentraci 1,9 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) a 2 až 5 ml fosfátového pufru (8,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 21,75 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 33,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  na 1 l destilované vody), který sloužil pro udržování pH. Do takto připraveného média byly vloženy testované nosiče biomasy vždy tak, aby zaujímaly přibližně stejný povrch (s ohledem na velikost nosiče kvůli jeho míchání v médiu během experimentu). Nosič X po 1 ks; nosiče S, M, XL po dvou kusech; nanovláknenné nosiče různě dle jejich velikosti a AnoxKaldnes K3 po dvou kusech. Pokud v rámci experimentu byla použita odlišná efektivní plocha porovnávaných nosičů, tak výsledná respirometrická data byla přepočítána na jednotkovou plochu. Stanovení respiračních aktivit probíhalo na zařízení Micro-Oxymax (Obrázek 10) od Columbus Instruments (USA). Změny koncentrace kyslíku jsou v přístroji měřeny pomocí paramagnetického senzoru a oxid uhličitý je detekován infračervenou spektroskopií. Měření probíhalo do ukončení aktivity mikroorganismů a vždy na jeho

konci byla ověřena kompletnost nitrifikace v médiu analýzou přítomných forem dusíku. Vyhodnocení surových dat probíhalo v programu Matlab a hlavním výstupem byly grafy zobrazující spotřeby kyslíku v čase, kde je možné vyčíst rychlost nitrifikace (pozn.: kompletní nitrifikace 1 mg/l NH<sub>4</sub>-N představuje spotřebu přibližně 4,6 mg/l kyslíku). Především doba potřebná k degradaci veškerého NH<sub>4</sub>-N je klíčová pro určení aktivity biofilmu.



**Obr. 10** Fotografie respirometru používaného k měření aktivit biofilmu na testovaných nosičích biomasy; zařízení umístěné v klimatizované místnosti temperované na 20 °C

#### **4.8. Metodika molekulárně genetických metod**

Metodika molekulárně genetických metod vychází z ověřených postupů uvedených v odborné literatuře. Testování a vyhodnocování těchto metod probíhalo ve spolupráci s Ing. Magdou Nechanickou (CXI, TUL).

##### **Metoda FISH**

Pro získání biofilmu byly nosiče (stejný počet jako pro respirometrická měření) umístěny do přibližně 100 ml destilované vody a vloženy do laboratorního ultrazvuku (ultrazvukový přístroj DT 510 H, Sonorex Digitec) po dobu 5 minut při pokojové teplotě. U nanovláknenných nosičů byl ultrazvuk nedostatečný (silná adheze biofilmu), proto byl biofilm z nosičů setřen do destilované vody. Suspenze biofilmu z každého nosiče byla odstředována (Hermle Z 206A, Verkon) při 5000 ot/min po dobu 10 minut. Získané peletky biofilmu byly poté použity pro další zpracování.

0,5 ml suspenze se získanou biomasou bylo vloženo do 1,5 ml zkumavky Eppendorf a bylo přidáno 0,5 ml 4% paraformaldehydu (PentaChemicals s.r.o.). Vzorky

byly inkubovány po dobu 3 hodin při 4 °C v chladničce (Liebherr CT 2441). Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 5000 ot/min (MiniSpin® plus Eppendorf). Peletky byly resuspendovány v 0,5 ml roztoku ledově studeného fyziologického pufru (PBS; 130 mM NaCl, 5 % (v/v) fosfátový pufr, pH 7,2–7,4) a 0,5 ml absolutního etanolu. Vzorky byly následně opět odstředovány po dobu 5 minut při 5000 ot/min a byl z nich odstraněn supernatant. Resuspenze a centrifugace biomasy byly provedeny celkem dvakrát. Poté bylo k fixované biomase přidáno 200 µl PBS a 200 µl etanolu a vzorky byly do dalšího zpracování uchovávány v mrazáku při -20 °C. Analýza FISH byla provedena přesně podle stanoveného protokolu a byly použity sondy shrnuté v tabulce 4 (Nielsen et al. 2009).

**Tab. 4** Přehled použitých FISH sond pro detekci AOB a NOB (Nielsen et al. 2009)

Název sondy	Sekvence (5'-3')	Specifikace
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Většina bakterií; vlákna i jednotlivé buňky (Amann et al. 1990)
EUB338II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	Planctomycetales (Daims et al. 1999)
EUB338III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Verrucomicrobiales (Daims et al. 1999)
Nso190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	Betaproteobacteriální AOB (Mobarry et al. 1996)
Nso1225	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	Betaproteobakteriální AOB (Mobarry et al. 1996)
Ntspa712	CGC CTT CGC CAC CGG CCT TCC	Phylum Nitrospirae (Daims et al. 2001)
Ntspa662	GGA ATT CCG CGC TCC TCT	Genus <i>Nitrospira</i> (Daims et al. 2001)

### Metody qPCR a NGS

Mikrobiální biomasa ze suspenze reaktoru (500 ml) byla získána filtrací přes membránový filtr Durapore PVDF 0,22 µm (Merck Millipore, Německo). Mikrobiální biomasa ze vzorků nosiče (stejný počet jako u respirometrických měření a FISH) byla získána s využitím stejného postupu jako v případě FISH metody. Podle protokolu výrobce byla DNA extrahována ze vzorků suspenze a nosiče pomocí NucleoSpin Soil (Macherey-Nagel, Německo). Koncentrace DNA ve vzorcích byla měřena pomocí soupravy Qubit™ dsDNA BR Assay Kit a fluorometru Qubit® 2.0 (Life Technologies, USA) podle protokolu výrobce.

Přítomnost nitrifikačních bakterií byla stanovena pomocí qPCR v reálném čase. Všechny reakce qPCR byly provedeny v duplikátech na přístroji LightCycler® 480

(Roche, Švýcarsko), jak je popsáno ve studii Dolinová et al. (2016) s teplotami specifickými pro každý marker uvedenými v tabulce 5. Hodnoty prahového cyklu (Ct) byly získány pomocí metody druhé derivace maxima dostupné v softwaru LightCycler 480.

Relativní množství celkové bakteriální biomasy bylo stanoveno amplifikací genu 16S rRNA pomocí markeru označeného jako U16SRT. První krok nitrifikace byl sledován funkčním genem kódujícím klíčový enzym pro oxidaci amoniaku na dusitan (*amoA*) specifický pro bakteriální rod *Nitrosomonas*. Pro druhý nitrifikační krok byla ve vzorcích detekována NOB *Nitrospira* amplifikací beta subjednotky dusitan oxidoreduktázy (*nxB*) specifické pro *Nitrospira* a amplifikací 16S rRNA genu *Nitrospira* pomocí NSR markeru. Přítomnost NOB *Nitrobacter* byla stanovena amplifikací beta subjednotky dusitan oxidoreduktázy (*NxB1*) specifické pro *Nitrobacter* a amplifikací 16S rRNA genu *Nitrobacter* pomocí Nitrob markeru nebo amplifikací alfa subjednotky dusitan oxidoreduktázy (*nxA*) specifické pro *Nitrobacter*.

**Tab. 5** Přehled testovaných markerů

Cílová skupina	Marker	Gen	Sekvence (5'-3')	Teplota	Zdroj
bakterie	U16SRT	16S rRNA gen	F:ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT R:TATTACCGCGGCTGCTGGC	60 °C	(Clifford et al. 2012)
AOB	<i>amoA</i>	<i>amoniak monoxygenáza, Nitrosomonas sp.</i>	F:GGGGTTTCTACTGGTGGT R:CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	58 °C	(Rotthauwe et al. 1997)
NOB	NSR	16S rRNA gen, <i>Nitrospira sp.</i>	F:CCTGCTTTCAGTTGCTACCG R:GTTTGCAGCGCTTTGTACCG	66 °C	(Dionisi et al. 2002)
NOB	<i>nxB</i>	<i>nitrit oxidoreduktáza</i> β subjednotka, <i>Nitrospira sp.</i>	F:TACATGTGGTGGAACA R:CGTTCGTGTCRATCA	58 °C	(Pester et al. 2014)
NOB	Nitrob.	16S rRNA gen <i>Nitrobacter sp.</i>	F:ACCCCTAGCAAATCTCAAAAAACCG R:CTTCACCCAGTCGCTGACC	60 °C	(Graham et al. 2007)
NOB	<i>NxB1</i>	<i>nitrit oxidoreduktáza</i> β subjednotka, <i>Nitrobacter sp.</i>	F: ACGTGGAGACCAAGCCGGG R: CCGTGTGTTGAYCTCGTTGA	66 °C	(Geets et al. 2007)
NOB	<i>nxA</i>	<i>nitrit oxidoreduktáza</i> α subjednotka, <i>Nitrobacter sp.</i>	F: CAGACCGACGTGTGCGAAAG R: TCYACAAGGAACGGAAGGTC	60 °C	(Poly et al. 2008)

Mikrobiální složení vzorků bylo stanoveno pomocí NGS ampliconů genu 16S rRNA. Dvě po sobě jdoucí PCR reakce na vzorku byly provedeny podle studie Němečka et al. (2017) s cílem amplifikovat hypervariabilní oblast V4 genu 16S rRNA pomocí standardních fúzních primerů a čárových kódů. K cílení oblasti V4 genu 16S rRNA byl použit primerový pár 515F (5'-TGCCAGCMGCNGCGG-3'; (Dowd et al. 2008)) a 802R (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'; (Claesson et al. 2010)). Sekvenování ampliconů

bylo provedeno na systému Ion PGM™ (Life Technologies, USA), podle pokynů výrobce.

Sekvenační data byla zpracována pomocí programu SEED 2 (verze 2.1.05), v němž byly vygenerované sekvence V4 oblasti 16S rRNA demultiplexovány, filtrovány a trimovány (Větrovský et al. 2018). Sekvence genu 16S rRNA byly klasifikovány pomocí algoritmu BLAST a databázi SILVA SSU 138 (Quast et al. 2013).

#### **4.9. Stanovení chemismu laboratorních bioreaktorů**

Koncentrace dusíkatých sloučenin, fosforu a CHSK v bioreaktorech byly měřeny pomocí komerční sady kyvetových testů (Hach). Součástí těchto analýz je měření absorbance na spektrofotometru HACH DR 6000 UV-VIS (Hach-Lange, USA) a ohřev kyvet pomocí digitálního termo-reaktoru (model SBH200DC, Verkon). Kontrolní měření pH a rozpuštěného kyslíku byly prováděny jednou týdně nebo dle potřeby pomocí multimetru WTW Multi 9430, s digitální optickou IDS sondou a pH elektrodou SenTix® 940 (WTW, Německo). Pro filtraci vzorků byla použita laboratorní filtrační aparatura s vyměnitelným membránovým filtrem VWR o velikosti pórů 0,45 µm. Pomocí pravidelné kontroly chemismu reaktoru byla sledována účinnost eliminace dusíkatých polutantů a na základě rozdílu koncentrací filtrované a nefiltrované CHSK<sub>Cr</sub> byly průběžně zjišťovány informace o přítomnosti suspendované biomasy v médiu reaktoru.

#### **4.10. Mikroskopie**

Snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byly získány pomocí UHR FE-SEM mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus (Carl Zeiss, Německo) při 12 – 1 000 000 x zvětšení v SE módu a 0,02 – 30 kV urychlovacím napětí. Na vzorky byla nanášena zlatá vrstva pomocí jednotky Quorum Q150R ES (Quorum Technologies, UK), aby byla zajištěna dostatečná vodivost pro všechny vzorky stejným způsobem.

Konfokální mikroskopie byla provedena na výkonném 3D optickém mikroskopu S neox (Sensofar metrology, Španělsko) s objektivem EPI 20X v35, který umožňuje bezkontaktní optické 3D profilování. Neox využívá senzor s vysokým rozlišením (0,69 µm/pixel) s rozlišením až 1360 × 1024 pixelů (pozorovaná plocha 850,08 × 709,32 µm). Na vzorky byla nanášena zlatá vrstva pomocí stejné jednotky jako v případě SEM, aby se snížila transparentnost nanovláken. Vzorek byl připevněn na podložní sklíčko tak, aby se zabránilo sebemenšímu pohybu během snímání.

V některých případech byl pro kontrolu materiálu nebo rostoucího biofilmu použit optický mikroskop Olympus BX51M s digitální zrcadlovkou Olympus E-510 a softwarem QuickPHOTO MICRO 2.3.

Snímky z FISH metody byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2 s kamerou AxioCamICc1 a světelným zdrojem Colibri.2. Nastavení bylo přizpůsobené filtru 43 HE (vlnové délky 550/25, FT 570 (HE), 605/70, pro-Cy3 Fluorescent Dyes) a filtru 44 (vlnové délky 475/40, FT 500, 530/50, pro Alexa 488 Fluorescent). K vyhodnocení specifických bakterií snímků s AOB, NOB a EUB byl použit automatizovaný programový kód zkompileovaný v programu Matlab (The MathWorks, Inc.). Poměr červeně obarvených buněčných oblastí (AOB nebo NOB, hodnoceno samostatně) k zeleně obarveným buněčným oblastem (EUB) byl hodnocen z fluorescenčních snímků. Informace o ploše (buňce) byly vyhodnoceny samostatně v každé červené nebo zelené vrstvě v barevných obrázcích RGB. Nakonec bylo vypočteno procentuální zastoupení buněk AOB/NOB/EUB. Data byla uvedena jako průměr  $\pm$  standardní odchylka. Byla použita jednocestná ANOVA a význam byl akceptován, když p-hodnota byla  $<0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1. Vývoj mikrovláknenných struktur

Na základě předchozích výsledků experimentů s nitěmi různých materiálů (viz publikace Svobodová et al. (2021)) byl sestaven návrh na přípravu mikrovláknenných 3D nosičů z hlediska jejich tvaru, hmotnosti a vnitřní struktury. Na Fakultě textilní TUL byly připraveny navržené nosiče pro MBBR systémy pomocí technologie distančního pletení, která se ukázala jako nejvýhodnější. Obecně bylo cílem vytvořit vzájemně uspořádané plochy sendvičové struktury poskytující možnost výroby nosiče typu biochip, pro intenzifikaci procesů odstraňování dusíku v post-treatment procesu na ČOV. Při vývoji byly neustále zohledňovány charakteristické vlastnosti nosiče biomasy v aplikacích čištění odpadních vod. V některých případech (především rozdílné podmínky pro nitrifikační a denitrifikační procesy) může být vyžadována synergie mezi aerobními a anoxickými podmínkami, a toho lze docílit zvolenými rozměry nosiče.

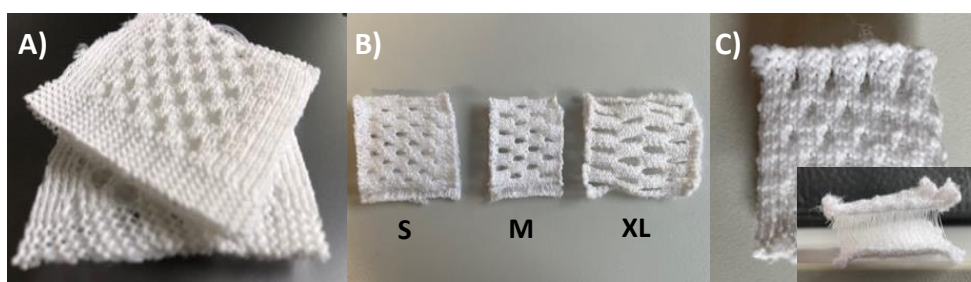
V roce 2020 proběhla příprava dvou souborů textilních nosičů, které byly testovány v laboratorních reaktorech post-nitrifikace a podrobně navržené metody analýz (respirometrie a metody molekulární biologie) zajistily výsledky vedoucí k výběru finálního nosiče. Tento nosič byl primárně zvolen pro systémy post-nitrifikace, ale jeho modifikací lze dosáhnout nosiče aplikovatelného taktéž v systému post-denitrifikace. Byly definovány parametry, které je nutné u textilních nosičů zajistit, aby jejich použití v post-denitrifikaci bylo maximálně efektivní.

#### 5.1.1. Parametry vyvíjených nosičů

Z testovaných souborů vzorků byly vybrány materiály polyester (PES), následovaný polypropylenem (POP) jako nejvhodnější pro přípravu 3D mikrovláknenných nosičů. Hmotnost a tvar byly zvoleny tak, aby bylo v testovaném systému post-nitrifikace zajištěno: snadné míchání nosičů, jejich separovatelnost a udržování ve vznosu. V první fázi byl připraven 3D textilní nosič z PES (Obrázek 11A) s pevně spojenou strukturou okrajů (značíme jako nosič X). V druhé fázi byl připraven soubor tří typů 3D nosičů biomasy sendvičové struktury (Obrázek 11B), kdy byla pro přípravu použita kombinace materiálů POP a PES tak, aby výsledná hustota byla cca  $1 \text{ kg/dm}^3$ , s ohledem na minimalizaci intenzity hydropneumatického míchání v post-nitrifikaci. Naopak pro post-denitrifikaci je vhodnější nastavit vyšší hustotu nosiče s ohledem na předpokládané použití hyperboloidních míchadel, které míchají ve směru ode dna a středu nádrže



k hladině a do stran. Různé nosiče připravené pro post-nitrifikaci se lišily velikostí pórů a celkovou plochou; značeny S, M a XL dle velikosti otvorů. Zde byly zvoleny okraje bez úpravy (bez zakončení), aby se eliminoval značný ekonomický náklad na výrobu nosičů. PES byl použit jako mechanická opora nosiče sloužící k zajištění distance sendvičové struktury. Ukázalo se, že zakončení okrajů nosičů není zásadní pro jejich funkčnost. Na základě výsledků testování byl z finálního souboru mikrovlákných 3D nosičů vybrán nejlepší pro jeho aplikaci v post-nitrifikaci, a to nosič S (Obrázek 11C). Technické specifikace jednotlivých nosičů jsou popsány v tabulce 6.



**Obr. 11** Fotografie (A) 3D textilního nosiče X se zakončenými okraji, (B) souboru 3 typů 3D textilních POP-PES nosičů a (C) zvláště vybraný (finální) nosič S

**Tab. 6** Charakteristika vyvíjených 3D mikrovlákných nosičů biomasy

Mikrovlákný 3D nosič biomasy	Materiál	Technické specifikace nosičů
X	100% PES	Vrchní a spodní vrstvy z multifilu: 2x167 dtex (2x36 fibril), filetová vazba, (3,5x3,5 mm otvory) Distance (střední vrstva) připravena kombinací 2 materiálů (multifil, monofil): 0,1 mm monofil PES, v poměru 1:1 s multifilem 2x167 dtex (2x36 fibril), distance 6 mm
S – finální	POP, PES	3x110 dtex POP (3x33 fibril), skaný, zákrut 100 m <sup>-1</sup> Distance: 0,1 mm monofil PES, distance 6 mm 3,5x3,5 mm otvory
M	POP, PES	3x110 dtex POP (3x33 fibril), skaný, zákrut 100 m <sup>-1</sup> Distance: 0,1 mm monofil PES, distance 6 mm 4,5x4,5 mm otvory
XL	POP, PES	3x110 dtex POP (3x33 fibril), skaný, zákrut 100 m <sup>-1</sup> Distance: 0,1 mm monofil PES, distance 6 mm 6,5x6,5 mm otvory

### 5.1.2. Chemismus reaktorů, účinnost nitrifikace

V obou fázích testování (nosiče X a AnoxKaldnes K3 (*experiment 1*) a série nosičů S, M a XL (*experiment 2*)) byla pravidelně v připravené modelové vodě a v odtocích z reaktorů měřena koncentrace amoniakálního dusíku. Koncentrace NH<sub>4</sub>-N v modelové vodě (nátok) kolísala vždy mezi 8 a 16 mg/l. Koncentrace NH<sub>4</sub>-N v odtoku z reaktoru po

stabilizaci byla typicky menší než 0,5 mg/l, což ukazuje na více než 95% účinnost nitrifikace pro všechny testované nosiče v obou experimentech. Kompletní nitrifikace byla prokázána zanedbatelnou koncentrací NO<sub>2</sub> iontů v reaktoru (< 0,2 mg/l). V určitých fázích experimentu (období stabilizace reaktoru) se hodnoty sledovaných koncentrací sloučenin dusíku pohybovaly nad/pod limitními hodnotami, což se neprojevovalo negativně na výsledcích experimentů. Rozdíl hodnot filtrované a nefiltrované CHSK poskytoval informace o množství (úbytku) oxidovatelných suspendovaných látek v médiu reaktoru (suspendovaná biomasa). Jednotlivé hodnoty analýz chemismu reaktorů jsou uvedeny v tabulkách 7-11 níže:

**Tab. 7** Chemické parametry modelové odpadní vody v experimentu 1 (nosič X, AnoxKaldnes K3)

Datum	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P [mg/l]	NaHCO <sub>3</sub> [mg/l]
04.05.2020	10,8	7,8	40
11.05.2020	7,6	15,8	50
15.05.2020	11,4	13,0	-
19.05.2020	12,2	15,5	30
22.05.2020	11,2	22,1	8
25.05.2020	10,9	7,1	-
27.05.2020	13,2	18,8	8
01.06.2020	9,8	8,0	-
03.06.2020	12,3	14,9	-
08.06.2020	11,7	14,0	8
11.06.2020	12,5	16,6	-
15.06.2020	11,3	13,2	16
22.06.2020	12,1	11,5	40
02.07.2020	12,3	11,9	40
07.07.2020	14,3	11,4	40
10.07.2020	15,3	13,5	40
16.07.2020	12,0	11,4	40
22.07.2020	11,5	11,3	40
27.07.2020	15,4	10,2	-

**Tab. 8** Chemické parametry odtoku v experimentu 1 – nosiče X

Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3 den	109	29,0	0,22	11,2	0,22	7,20
7 den	92,3	25,1	0,02	32,7	0,06	7,55
14 den	61,4	15,7	0,16	12,1	0,56	6,31 → 7,5
21 den	21,4	21,1	0,01	14,9	0,06	6,89
28 den	22,2	16,2	0,19	12,4	0,29	7,63
35 den	74,0	20,5	0,32	12,7	1,20	6,05 → 7,5
42 den	16,9	9,4	0,16	14,7	0,76	5,9 → 7,6
49 den	17,9	10,3	0,09	12,2	0,05	7,37
56 den	6,31	6,3	0,06	13,5	1,81	5,8 → 7,6
64 den	6,4	6,2	0,03	11,2	0,02	7,9
71 den	10,0	9,9	0,07	18,0	0,21	5,7 → 7,6
85 den	17,7	15,5	0,14	11,5	0,06	7,4
92 den	17,1	15,6	0,18	14,1	0,03	-

**Tab. 9** Chemické parametry odtoku v experimentu 1 – nosiče AnoxKaldnes K3

Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3 den	176,0	20,0	0,33	11,5	0,12	7,20
7 den	62,2	13,7	0,01	11,1	0,02	7,71
14 den	25,0	10,1	1,28	8,5	1,53	6,88 → 7,5
21 den	23,5	18,6	0,01	12,1	0,06	7,01
28 den	18,7	8,2	0,18	11,9	0,13	7,67
35 den	31,4	13,0	0,24	11,7	0,19	6,50 → 7,5
42 den	48,7	9,1	0,02	16,1	0,10	6,7 → 7,6
49 den	15,8	15,5	0,07	12,0	0,03	7,49
56 den	14,1	11,1	0,04	14,7	0,18	6,1 → 7,6
64 den	13,9	10,8	0,03	10,7	0,01	7,9
71 den	12,6	12,5	0,05	16,2	0,21	5,9 → 7,6
85 den	15,3	15,0	0,25	11,3	0,07	7,5
92 den	14,9	14,8	0,04	14,4	0,02	-

**Tab. 10** Chemické parametry modelové odpadní vody v exp. 2 (nosiče S, M a XL)

Datum	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P [mg/l]	NaHCO <sub>3</sub> [mg/l]
22.9.2020	14,9	11,6	40
25.9.2020	8,8	8,5	20
2.10.2020	12,0	9,3	-
9.10.2020	13,5	9,5	-
14.10.2020	11,5	8,3	-
21.10.2020	22,4	19,1	-
26.10.2020	8,4	8,0	25
30.10.2020	10,2	8,1	25
5.11.2020	12,6	13,9	25
9.11.2020	12,6	11,8	-
13.11.2020	12,4	12,3	40
19.11.2020	12,3	8,3	40
26.11.2020	9,0	6,4	40
30.11.2020	13,8	7,7	40

**Tab. 11** Chemické parametry odtoku v exp. 2 – nosiče S, M a XL

Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3 den	-	-	3,26	2,5	8,41	8,2 → 7,3
7 den	14,4	12,6	4,36	5,6	1,15	7,8 → 7,5
11 den	-	9,9	1,70	7,9	0,40	7,6
14 den	6,5	6,0	1,40	9,2	2,08	6,5 → 7,4
21 den	23,3	11,2	0,06	4,0	9,30	7,8
28 den	16,5	10,0	0,09	5,6	5,00	6,8 → 7,5
35 den	15,5	6,8	0,91	8,6	11,60	6,9 → 7,5
42 den	8,2	8,1	0,85	10,0	0,34	7,5
49 den	6,5	6,4	0,28	13,5	0,42	6,4 → 7,5
56 den	8,2	8,2	0,39	13,2	0,31	7,11 → 7,6
64 den	8,7	8,7	1,97	13,4	0,35	7,3
71 den	9,0	8,8	0,42	11,8	0,96	7,3
78 den	6,0	5,5	0,33	15,0	1,19	6,3

**Pozn.:** → pH upraveno přidáním kapek roztoku NaOH (20 g/l)

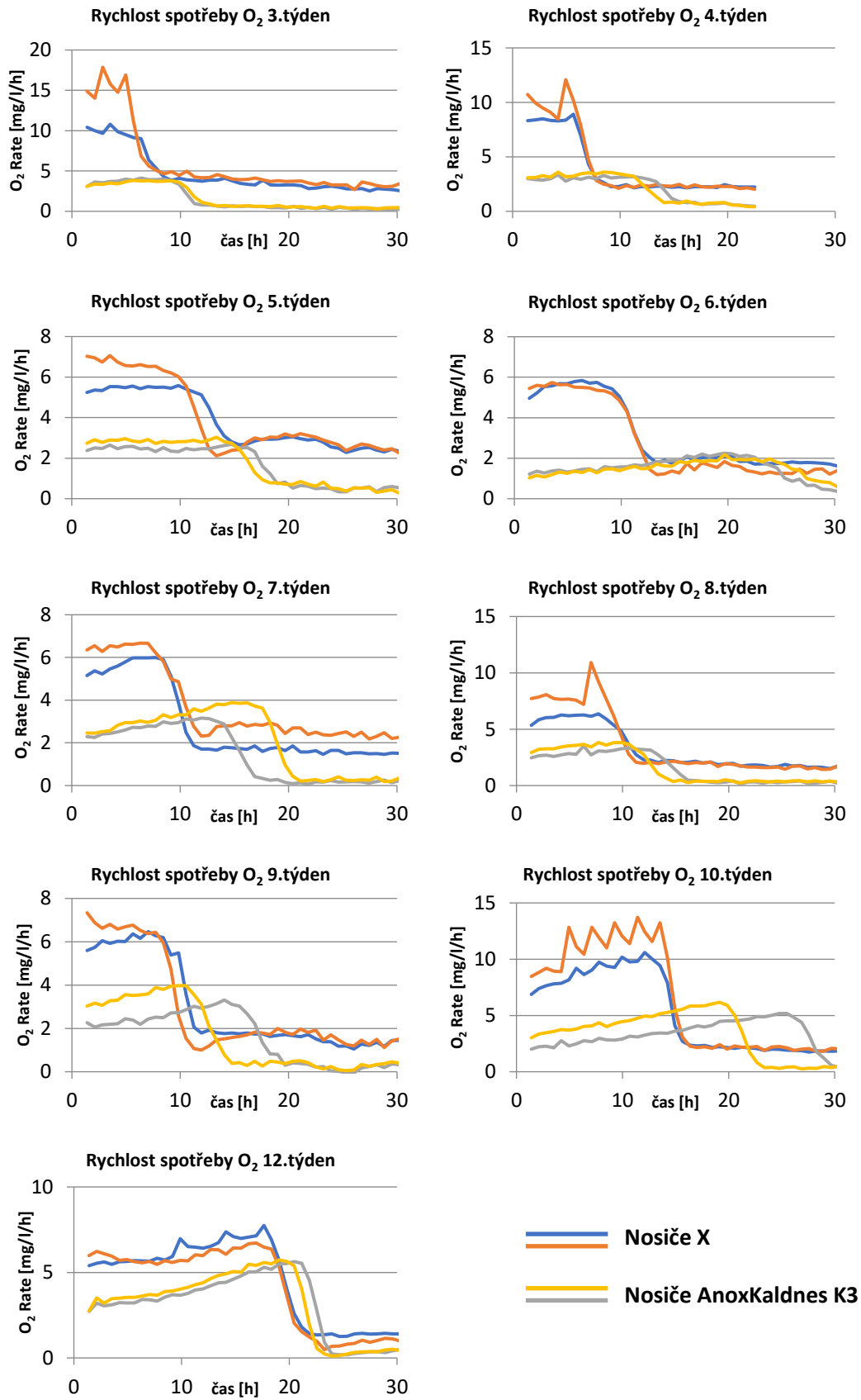
V obou případech bylo cílem podpořit růst nitrifikačních bakterií, tedy biofilmu, který bude co nejúčinnější pro eliminaci amoniakálního dusíku ve sledovaném prostředí. Na základě výsledků chemismu reaktoru nemůžeme posoudit nic o složení bakterií v biofilmu (k tomu slouží metody molekulární biologie), ale lze sledovat celkovou aktivitu biofilmu na nosičích (efektivita nitrifikačního procesu). V prvním experimentu bylo odstraňování  $\text{NH}_4\text{-N}$  velmi účinné pro nosiče X i AnoxKaldnes K3 po celou dobu provozu bioreaktorů. Ve druhém experimentu trvala delší dobu stabilizace systému, kdy muselo dojít k dodatečné inokulaci 14. a 28. den (2-denní inokulace za stejných podmínek jako při spuštění experimentu). Inokulace byla zajištěna pouze polovinou koncentrace aktivovaného kalu oproti prvnímu experimentu 1, což prodloužilo stabilizaci celého procesu. Na druhou stranu bylo zajištěno minimální zachycení suspendovaného kalu do nosičů během inokulace, což je i dle předchozích zkušeností velmi důležité pro další fáze experimentu. Prvotní zachycení kalu na nosičích může negativně ovlivnit pozdější výsledné složení biofilmové biomasy, a také může docházet k ucpávání pórů nosiče balastní biomasou, což má za následek zmenšování prostředí pro adhezi nitrifikačních bakterií (tvorba kvalitního nitrifikujícího biofilmu).

### **5.1.3. Analýza respirometrie**

Téměř týdenní testování poskytlo řadu údajů (Obrázek 12 a 13) pro srovnání jednotlivých nosičů. Zásadním předpokladem pro správné vyhodnocení experimentu 2 (a výběr finálního nosiče) byl přepočtení respirometrických dat na jednotnou plochu nosičů S, M a XL, jelikož každý typ nosiče se vyznačuje rozdílnou efektivní plochou. Kromě testování nosičů v bioreaktorech v 1. a 2. experimentu byl navíc pomocí respirometrie studován záchyt biomasy kalu na nosičích S, M a XL během prvních hodin inokulace, tedy byl sledován vliv jednak koncentrace kalu a jednak vliv samotných parametrů nosiče na prvotní záchyt kalu na nosičích.

#### **Respirometrická data z experimentu 1**

Obdobně jako v případě vnitřního prostředí reaktoru, i u samotného biofilmu na nosičích dochází k jeho stabilizaci, což je patrné z respirometrických dat. Nejprve můžeme vidět vyšší aktivitu, což je zapříčiněno zachycením aktivovaného kalu na nosičích z fáze inokulační. Postupně dochází k vymizení těchto reziduí kalu, a tedy k mírnému snižování aktivity. Následný růst pravého biofilmu opětovně značí nárůst aktivit (tentokrát už pouze biofilmu, nikoliv zachyceného kalu).

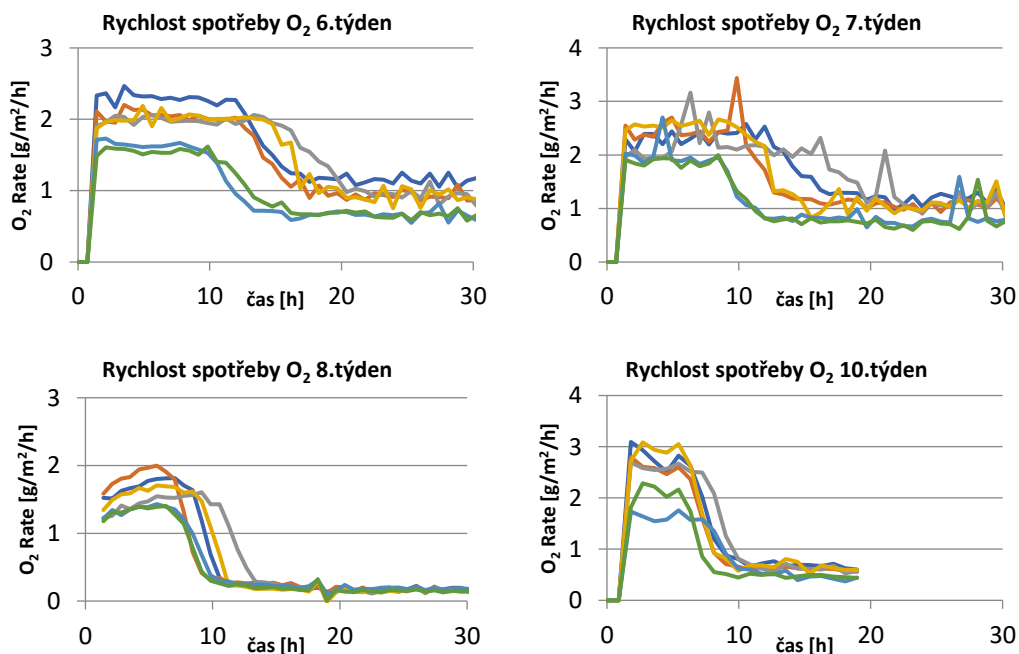


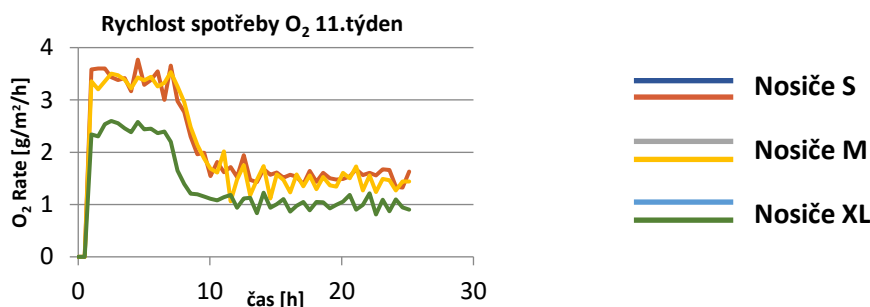
**Obr. 12** Přehled respirometrických dat – testování nosičů X a AnoxKaldnes K3

Z dat (Obrázek 12) je patrné, že mikrovláknenné nosiče X jsou schopné rychleji zachycovat mikroorganismy a tvořit biofilm, jelikož jejich struktura je oproti nosičům AnoxKaldnes K3 poréznější a obsahuje více specifických prostor (chráněného povrchu) pro primární adhezi bakterií. U komerčních nosičů AnoxKaldnes K3 trvá tvorba biofilmu na povrchu podstatně delší dobu a pro urychlení procesu by pravděpodobně bylo zapotřebí inokulovat bioreaktor mnohem vyšší koncentrací kalu. Pokud se však použití nosičů cílí na post-treatment (post-nitrifikace), potom vysoká koncentrace kalu neodpovídá reálným podmínkám.

## Respirometrická data z experimentu 2

Ve druhém experimentu započalo respirometrické měření až po celkové stabilizaci systému, tj. byly vynechány první týdny měření, které jsou pravděpodobně ovlivňovány residui zachyceného kalu z inokulace bioreaktoru. Na grafech z respirometrických dat (Obrázek 13) lze vidět pomalé zvyšování aktivit biofilmu, které je různé pro jednotlivé typy nosičů. Jak již bylo zmíněno výše, předpokladem pro správné vyhodnocení nejlepšího/nejúčinnějšího nosiče byl proveden přepočítání respirometrických dat na jednotnou plochu nosičů. Z níže uvedených dat vyplývá, že nosič S je z hlediska aktivity biofilmu na nejvyšší úrovni.





**Obř. 13** Přehled respirometrických dat – testování nosičů

### Testování záchytu biomasy při inokulaci

Pro otestování vlivu koncentrace kalu při inokulaci a parametrů nosiče na záchyt suspendované biomasy v prvních 24 hodinách kontaktu s nosiči byl aplikován následující test. Do 2-litrové vysoké kádinky bylo nalito 1000 ml odstáté kohoutkové vody a bylo přidáno dané množství aktivovaného kalu – 50, 250 a 500 mg/l. Dále bylo přidáno 5 ml fosfátového pufru a 10 mg/l NH<sub>4</sub>-N. Do kádinky byla vložena hadička napojená na dmychadlo zajišťující nepřetržité provzdušňování. Do takto připraveného systému byly vloženy testované nosiče biomasy a ponechány zde 24 hodin (simulace jednorázové inokulace nosiče).

Inokulované nosiče poté byly testovány na respirometru následovně: do 300ml lahve bylo nalito 100 ml odtoku z reálné ČOV, dále bylo přidáno 2 ml fosfátového pufru, 10 mg/l NH<sub>4</sub>-N a 1 kus testovaného nosiče (S, M nebo XL přímo odebraný z kádinky s kalem po inokulaci). Po ukončení respirometrie byla stanovena CHSK<sub>Cr</sub> (nefiltrovaných vzorků), na základě které lze soudit míru uvolnění kalu z nosičů do média.

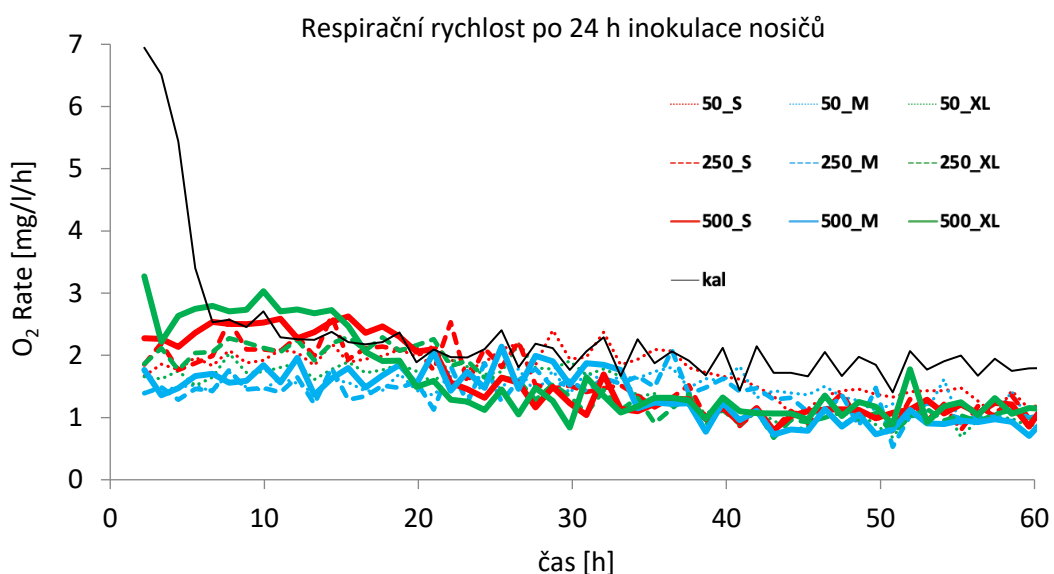
**Tab. 12** Hodnoty CHSK<sub>Cr</sub> nefiltrovaného média po ukončení respirometrie

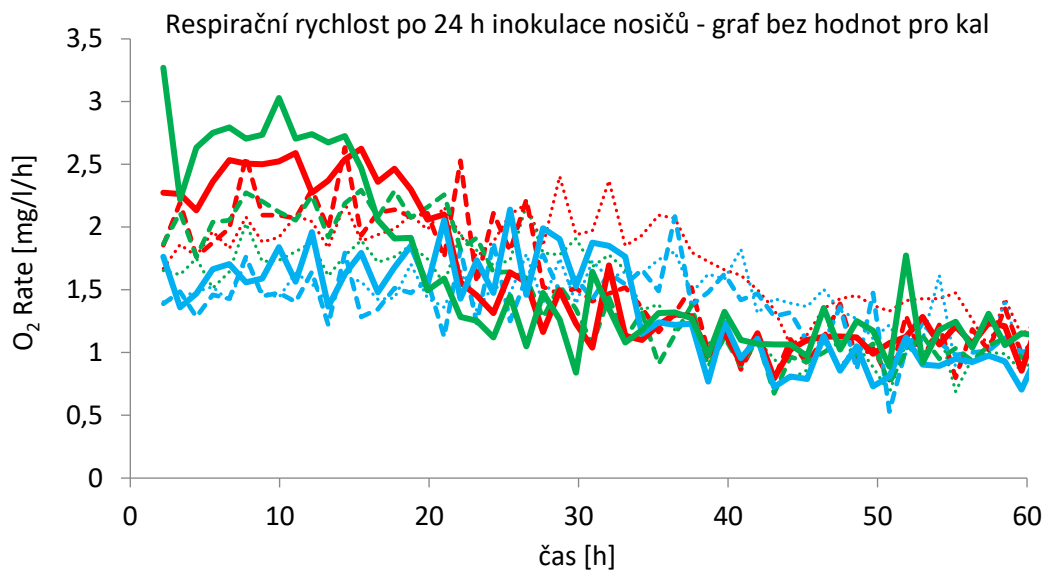
	Vzorek	CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l] (nefiltrované)
1.	50 mg/l kal – nosič S	48,1
2.	50 mg/l kal – nosič M	44,4
3.	50 mg/l kal – nosič XL	39,4
4.	250 mg/l kal – nosič S	70,5
5.	250 mg/l kal – nosič M	58,6
6.	250 mg/l kal – nosič XL	43,2
7.	500 mg/l kal – nosič S	71,6
8.	500 mg/l kal – nosič M	63,4
9.	500 mg/l kal – nosič XL	51,1



Z hodnot  $CHSK_{Cr}$  je patrné, že čím větší koncentrace kalu byla použita při inokulaci, tím logicky více dochází k jeho následnému uvolňování z nosiče do média. Na druhé straně není závislost mezi koncentrací kalu při inokulaci a následně uvolňovaným množstvím lineární, tedy dochází k podobné míře primárního zachytu aktivovaného kalu v nosičích. Z hlediska vlivu struktury nosiče dochází k největšímu uvolňování kalu do média u nosiče S (nejmenší otvory). Nosiče S se dle respirometrie vyznačovaly nejvyšší nitrifikační aktivitou celkové biomasy (zachycené v nosiči a uvolněné do média); tedy nosič S efektivně zachytává srovnatelné množství nitrifikujícího kalu.

Na základě respirometrických dat (Obrázek 14) lze říci, že u nosiče S pro všechny koncentrace kalu dochází k jeho značnému primárnímu zachytu při inokulaci. Menší velikost pórů nosiče tedy pravděpodobně způsobuje větší nahromadění kalu a jeho určité setrvání (během inokulace) ve struktuře nosiče. Podobně jsou na tom nosiče s nadměrnými póry (nosič XL), kde ale při nižších koncentracích kalu je jeho zachycené množství menší. Nezávisle na koncentraci, nosiče M (se středními póry) zachytávají kal nejméně. Celkově z těchto dat vyplývá, že pro inokulaci systému plně dostačuje nejnižší koncentrace kalu (50 mg/L), která zajistí dostatečný průnik mikroorganismů do celého systému nosiče. V případě nosičů S se značná část kalu dostane po inokulaci z nosiče ven, což je velmi žádoucí s ohledem na vyplavení majoritní heterotrofní populace aktivovaného kalu a následnou možnost vytváření nitrifikujícího biofilmu (substrátová podpora v post-nitrifikačním reaktoru).





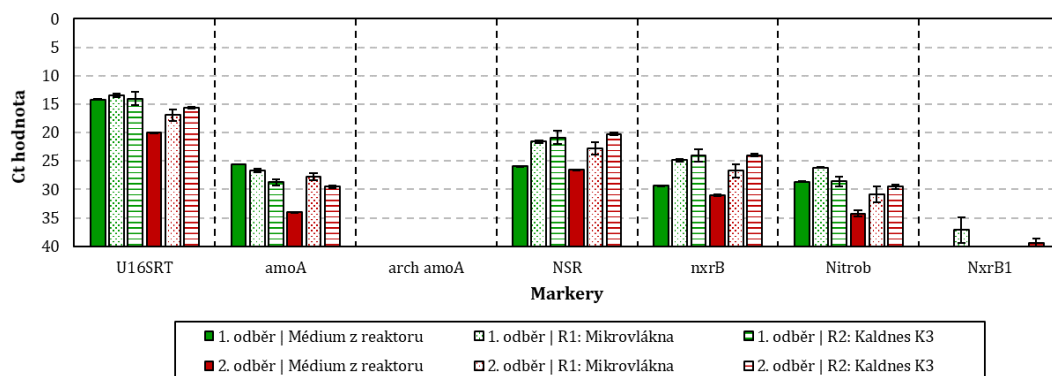
**Obr. 14** Přehled respirometrických dat – testování záchytu kalu na nosičích při 24-hodinové inokulaci

#### 5.1.4. Výsledky qPCR a NGS analýzy

##### Nosiče X a AnoxKaldnes K3

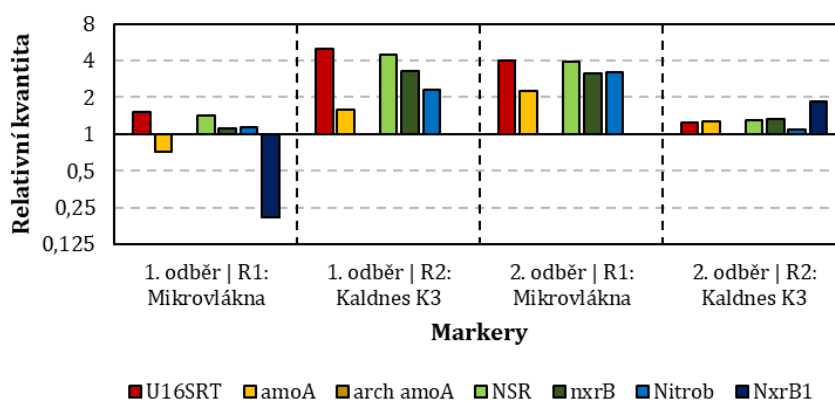
Výsledky qPCR analýzy (tzv. Ct hodnoty) jsou interpretovány ve formě grafu průměrných Ct hodnot (Obrázek 15) a relativní kvantifikace (Obrázek 16, 17). V následujícím textu je vždy pod pojmem „Ct hodnota“ míněn průměr z duplikátu Ct hodnot, v případě duplikátu vzorků je míněn průměr ze 4 naměřených Ct hodnot. Interpretace výsledků qPCR analýz je založena na nepřímé úměře, tudíž čím nižší je Ct hodnota, tím větší je množství cílové DNA ve vzorku a naopak. Konkrétně tedy v případě qPCR analýzy pomocí markeru U16SRT, čím nižší byla Ct hodnota, tím větší bylo celkové bakteriální oživení (množství bakteriální biomasy) ve vzorku. Maximální možná Ct hodnota je 40 a odpovídá nulové detekci.

Ve všech vzorcích z prvního odběru (tj. po jednom měsíci provozu reaktoru) bylo celkové bakteriální oživení na vysoké úrovni, zatímco v 2. odběru (tj. po třech měsících provozu reaktoru) bylo u nosičů z mikrovláken (nosič X) a média pozorováno nižší celkové bakteriální oživení (viz Obrázek 15), což koresponduje s naměřenou koncentrací DNA. U všech vzorků byly detekovány všechny testované markery specifické pro nitrifikaci kromě dvou markerů detekujících funkční geny archeální *amoA* a nitrit oxidoreduktázy *NxrB1* specifické pro NOB *Nitrobacter*, přestože marker 16S rDNA genu *Nitrobacter* (Nitrob.) byl detekován ve všech vzorcích.



**Obr. 15** Průměrné Ct hodnoty testovaných biologických markerů u jednotlivých vzorků

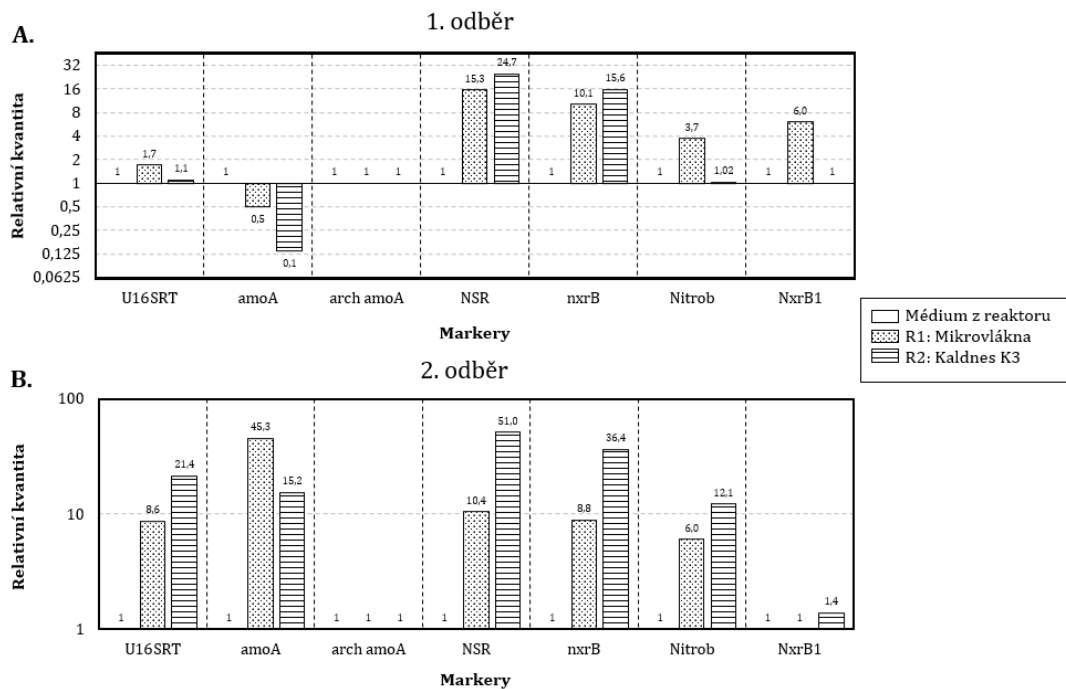
Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými vzorky nosičů biomasy z duplikátu je vyjádřen pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 16), jež popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčnímu vzorku, kterým je v tomto případě jeden ze vzorků z duplikátu (I). Hodnota relativní kvantifikace referenčního vzorku je 1. Pokud je hodnota relativní kvantifikace vzorku 2, znamená to, že v tomto vzorku je dvakrát více cílové DNA než v referenčním vzorku. Když bylo celkové bakteriální oživení (U16SRT) vyšší v jednom ze vzorků duplikátu (II) v porovnání s druhým vzorkem (I) duplikátu, bylo možné pozorovat, že byla v tomto vzorku také vyšší abundance specifické bakteriální biomasy. Například u mikrovlákných nosičů z 2. odběru bylo pravděpodobně možné sledovat stejný poměr NOB (kromě *NxrB1*) vůči celkové bakteriální biomase v obou vzorcích duplikátu, přestože jeden ze vzorků duplikátu vykazoval 4-krát vyšší bakteriální oživení než druhý. V případě markeru *NxrB1* je abundance tohoto markeru ve vzorcích buď nulová, nebo tak nízká, že je detekována pouze na mezi detekce.



**Obr. 16** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na jednom ze vzorků duplikátu nosičů biomasy vůči druhému vzorku duplikátu

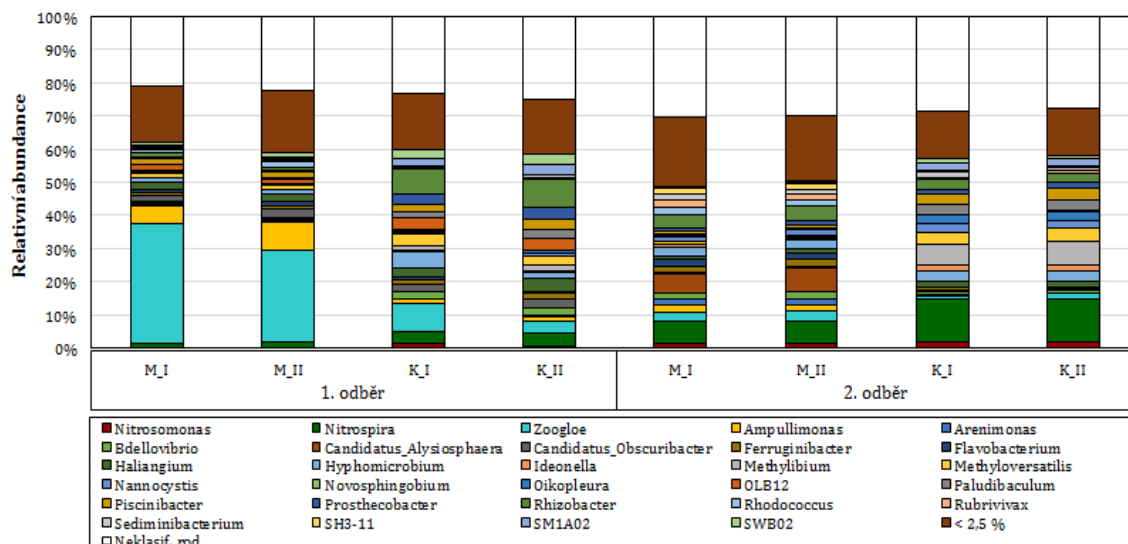
Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými nosiči biomasy a médiem z reaktoru, v rámci odběru, bylo taktéž vyjádřeno pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 17). Ta popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčnímu vzorku, kterým je v tomto případě médium z reaktoru odebrané v 1. odběru (Obrázek 17A) či v 2. odběru (Obrázek 17B). V 1. odběru bylo celkové bakteriální oživení na všech nosičích biomasy na stejné úrovni jako ve 500 ml média z reaktoru. V 1. odběru byla na všech nosičích biomasy vyšší abundance NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*) než v médiu z reaktoru. Množství funkčního genu AOB *Nitrosomonas* bylo na nosičích biomasy nižší než v médiu v 1. odběru. Abundance NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*) byla v 1. odběru mírně vyšší na nosičích typu AnoxKaldnes K3 než na nosičích z mikrovláken, zatímco množství AOB *Nitrosomonas* a NOB *Nitrobacter* bylo vyšší na nosičích z mikrovláken.

V 2. odběru (Obrázek 17B) po 3 měsících provozu lze pozorovat výrazně vyšší rozdíly v množství celkové a specifické bakteriální biomasy mezi médiem z reaktoru a nosiči biomasy. Abundance celkové bakteriální biomasy společně s AOB a NOB, kromě *arch amoA* a *NxrB1*, byla významně vyšší na nosičích biomasy než ve 500 ml média z reaktoru. Podobně jako v 1. odběru byla na nosičích typu AnoxKaldnes K3 ve 2. odběru nižší abundance AOB *Nitrosomonas* a vyšší abundance NOB *Nitrospira* v porovnání s nosiči mikrovlákennými.

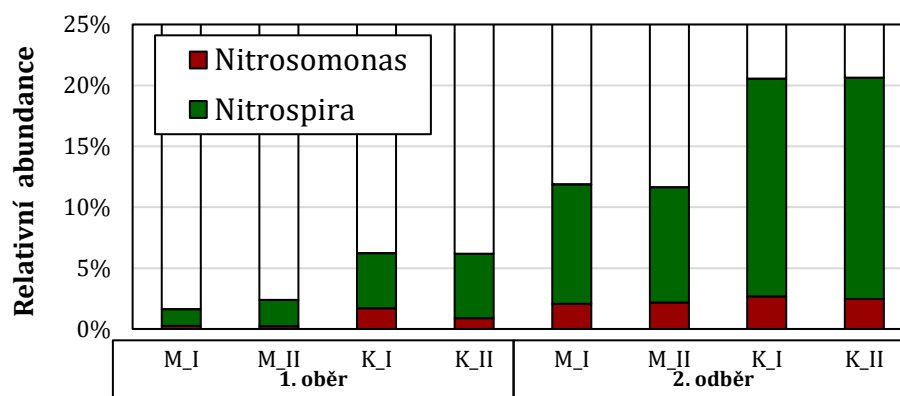


**Obr. 17** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na nosičích biomasy vůči médiu z reaktoru v 1. odběru (A) a v 2. odběru (B)

Složení bakteriálního konsorcia (Obrázek 18) bylo určeno pomocí NGS. Zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů je poměrně různorodé a jednoznačně zde vystupují běžné rody bakterií, které se účastní procesů na ČOV. Na obrázku 18 lze detailně vidět pouze zastoupení bakterií nitrifikačních.



**Obr. 18** Relativní zastoupení mikroorganismů ve vzorcích – znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí > 1 %



**Obr. 19** Relativní zastoupení bakteriálních rodů *Nitrosomonas* a *Nitrospira* ve vzorcích

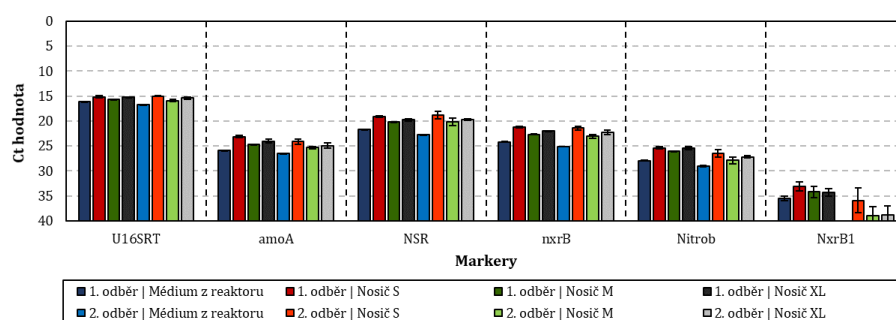
V grafu na obrázku 19 vidíme nižší množství AOB oproti NOB, což je běžný jev, který se vyskytuje i na ČOV. Poměr AOB/NOB hraje zásadní roli v optimalizaci nitrifikačního procesu. V případě rychlejšího růstu AOB oproti NOB bude docházet k akumulaci dusitanů v systému, což může vést k inhibici vlastního procesu. Avšak bylo prokázáno, že NOB mají dominantní zastoupení v nitrifikačním procesu AOB (Yao

a Peng 2017; Seuntjens et al. 2018). V celkovém zastoupení je v prvním odběru u mikrovlákných nosičů poměrně dominantní bakterie rodu *Zoogloea*, která dokazuje přítomnost aktivovaného kalu v nosičích z fáze inokulace. U AnoxKaldnes K3 toto není pozorováno, jelikož aktivovaný kal zde nesetrvává. V druhém odběru je už koncentrace *Zoogloea* minimální, jelikož na nosičích převládá pravý biofilm, kde tato bakterie nemá důvod se vyskytovat.

### Nosiče S, M a XL

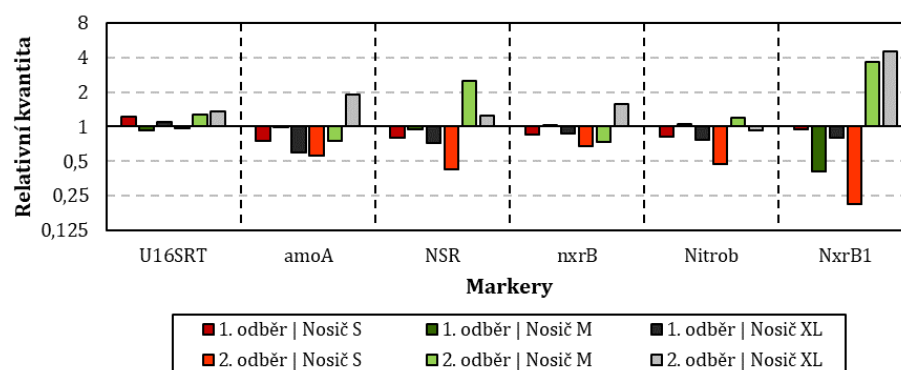
Výsledky qPCR analýzy (Ct hodnoty) jsou interpretovány ve formě grafu průměrných Ct hodnot (Obrázek 20) a relativní kvantifikace (Obrázek 21 a 22).

Ve všech vzorcích, jak nosičů, tak média, bylo celkové bakteriální oživení na vysoké úrovni (viz Obrázek 20). U všech vzorků byly detekovány všechny testované markery specifické pro nitrifikaci kromě markeru funkčního genu archeální *amoA*, který nebyl detekován v žádném ze vzorků (Ct hodnoty 40) a markeru nitrit oxidoreduktázy *NxrB1* specifické pro NOB *Nitrobacter*.



**Obr. 20** Průměrné Ct hodnoty testovaných biologických markerů u jednotlivých vzorků

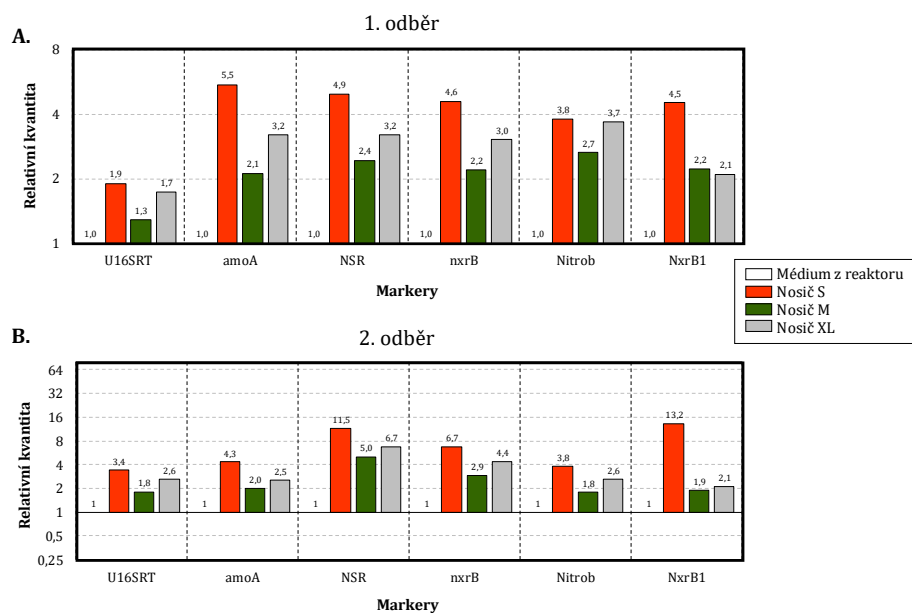
Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými vzorky nosičů biomasy z duplikátu je vyjádřen pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 21). Rozdíly mezi duplikáty byly u všech markerů kromě *NxrB1* zanedbatelné. U *NxrB1* byla abundance ve vzorcích velmi nízká až nulová, což způsobuje fluktuaci Ct hodnot mezi duplikáty.



**Obr. 21** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na jednom ze vzorků duplikátu nosičů biomasy vůči druhému vzorku duplikátu

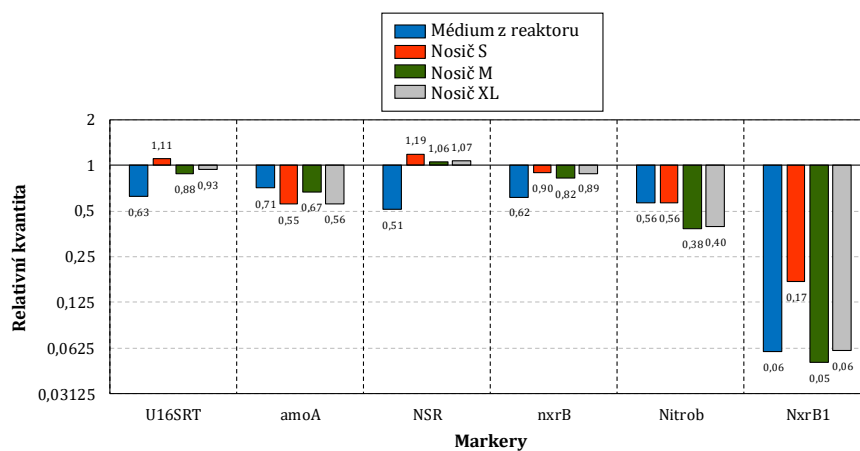
Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými nosiči biomasy a médiem z reaktoru v rámci odběru bylo vyjádřeno pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 22), jenž popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčnímu vzorku, kterým je v tomto případě médium z reaktoru odebraném v 1. odběru (Obrázek 22A) či v 2. odběru (Obrázek 22B). V 1. odběru bylo celkové bakteriální oživení na všech nosičích biomasy na téměř stejné úrovni jako v 500 ml média z reaktoru. Na všech nosičích biomasy byla v 1. odběru vyšší abundance všech testovaných markerů AOB (*amoA*) a NOB (NSR, *nxrB*, Nitro, *NxrB1*) než v médiu z reaktoru. Abundance všech testovaných specifických markerů byla v 1. odběru mírně vyšší na nosičích S než na nosičích M a XL.

V 2. odběru (Obrázek 22B) po 2,5 měsících provozu lze pozorovat výrazně větší rozdíly v množství celkové a specifické bakteriální biomasy mezi médiem z reaktoru a nosiči biomasy, zejména nosiči S. Abundance celkové bakteriální biomasy společně s AOB a NOB byla vyšší na nosičích biomasy než v 500 ml média z reaktoru. Podobně jako v 1. odběru bylo na nosičích S ve 2. odběru vyšší množství všech testovaných specifických markerů v porovnání s dalšími nosiči z reaktoru. Porovnáme-li nosiče S, resp. nosiče XL s nosiči M (nejnižší bakteriální oživení), je celkové bakteriální oživení i abundance specifických markerů AOB i NOB (kromě *NxrB1*) cca 2-krát vyšší na nosičích S, resp. cca 1,4-krát vyšší na nosičích XL než na nosičích M, tedy je pravděpodobně poměr AOB a NOB vůči celkové bakteriální biomase na téměř stejné úrovni u všech nosičů.



**Obr. 22** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na nosičích S, M a XL vůči médiu z reaktoru v 1. odběru (A) a v 2. odběru (B)

Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy na vzorcích mezi odběry bylo vyjádřeno pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 23), jenž popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčním vzorkům, což jsou v tomto případě jednotlivé vzorky z 1. odběru. Ve všech vzorcích nebyla po 1 měsíci mezi odběry pozorována téměř žádná změna v abundanci testovaných markerů kromě markerů NOB *Nitrobacter*, jejichž množství se mezi odběry snížilo. Tento trend indikuje, že již po 1,5 měsíci provozu reaktoru byl na všech nosičích stabilní biofilm, jehož složení se během dalšího 1 měsíce provozu významně nezměnilo.



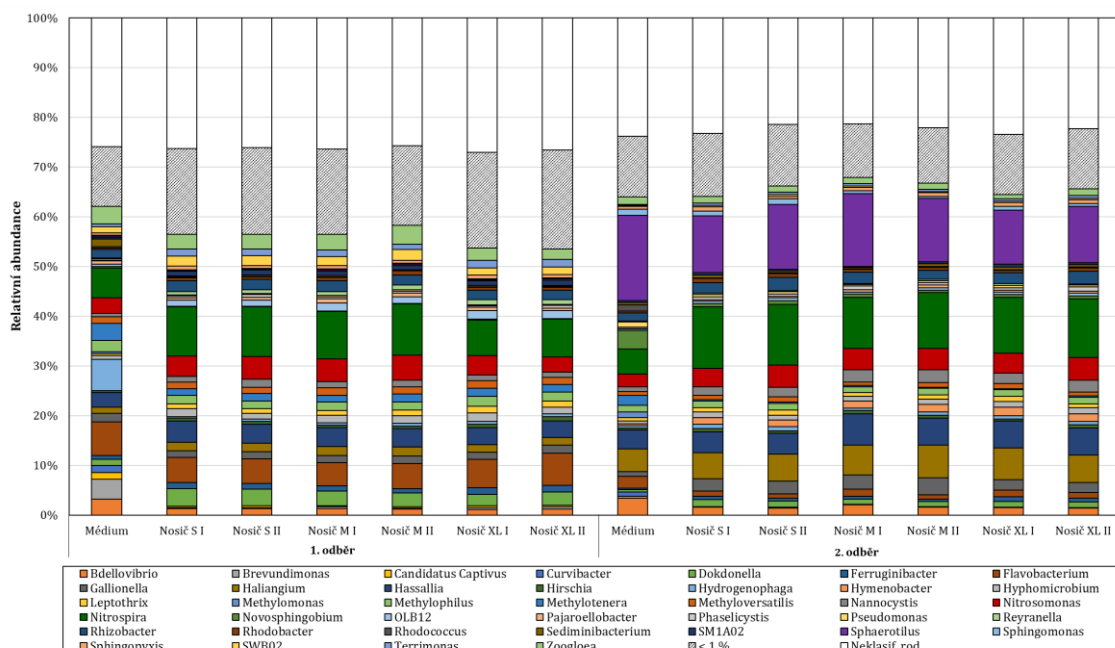
**Obr. 23** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy ve vzorcích z 2. odběru vůči vzorkům z 1. odběru



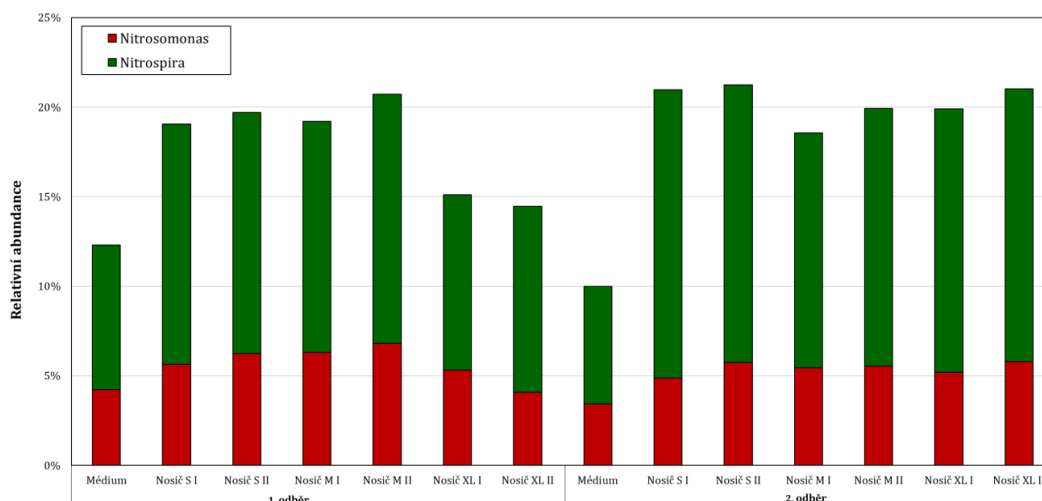
Výsledky NGS analýzy jsou zobrazeny na grafech (Obrázek 24 a 25). Mezi nosiči biomasy v jednotlivých odběrech nebyly pozorovány významné rozdíly v zastoupení. Zastoupení nitrifikačních bakterií, konkrétně AOB *Nitrosomonas* a NOB *Nitrospira*, bylo výrazně vyšší na nosičích biomasy než v médiu z reaktoru v obou odběrech. Zatímco v 1. odběru byl podíl NOB *Nitrospira* vyšší na nosičích S a M v porovnání s nosiči XL, v 2. odběru byly již rozdíly v zastoupení AOB i NOB mezi nosiči S, M a XL zanedbatelné (viz Obrázek 25). Mezi odběry byl zaznamenán pouze nárůst podílu NOB *Nitrospira* na nosičích XL.

Kromě nitrifikačních bakterií byly na nosičích biomasy abundantní bakteriální rody *Dokdonella*, *Flavobacterium*, *Haliangium*, *Sphaerotilus* a *Zoogloea*, u kterých byla prokázána schopnost denitrifikace, v případě bakteriálního rodu *Sphaerotilus*, přítomného ve velkém množství v 2. odběru, dokonce i schopnost autotrofní denitrifikace (Pishgar et al. 2019; Deng et al. 2016).

Ve všech vzorcích z 2 experimentu (s nosiči S, M a XL) byly detekovány biologické markery nitrifikačních bakterií podílejících se na obou krocích nitrifikace, oxidace amoniaku (AOB *Nitrosomonas*) a dusitanu (NOB *Nitrospira* a NOB *Nitrobacter*). Po 2,5 měsících provozu byla specifická bakteriální biomasa podílející se na nitrifikaci vyšší na nosičích než v médiu z reaktoru. Nutné však podotknout (pro všechny výsledky molekulární genetiky), že s ohledem na dobu zdržení v reaktoru přítomná biomasa v reaktoru jistě pochází z nosičů (uvolnění starého biofilmu); nitrifikační bakterie se v chemostatu nemohou udržet. Pro analýzu byla koncentrace biomasy v suspenzi zanedbatelná (tedy nevýznamná). Nosiče S vykazovaly ze všech testovaných typů nosičů biomasy nejvyšší abundanci nitrifikačních bakterií. Přesto byly rozdíly v zastoupení nitrifikačních bakterií mezi nosiči S, M a XL spíše zanedbatelné po 2,5 měsících provozu reaktoru. Jako v případě testování nosičů X a AnoxKaldnes K3 se podíl AOB/NOB vyskytoval na úrovni 1/4–1/5.



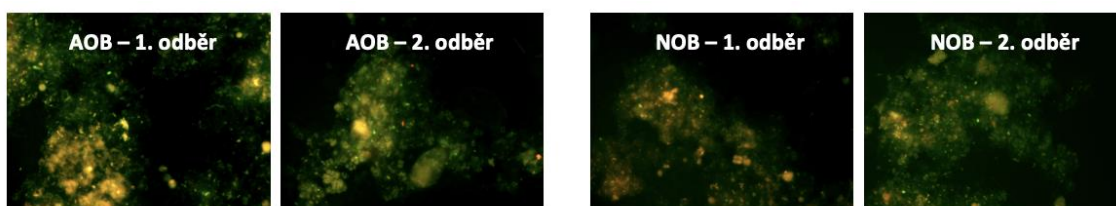
**Obr. 24** Relativní zastoupení mikroorganismů ve vzorcích – znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí > 1 %



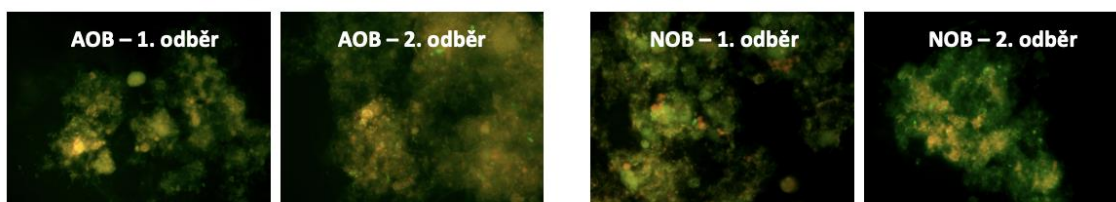
**Obr. 25** Relativní zastoupení rodů *Nitrosomonas* a *Nitrospira* ve vzorcích

## Snímky FISH

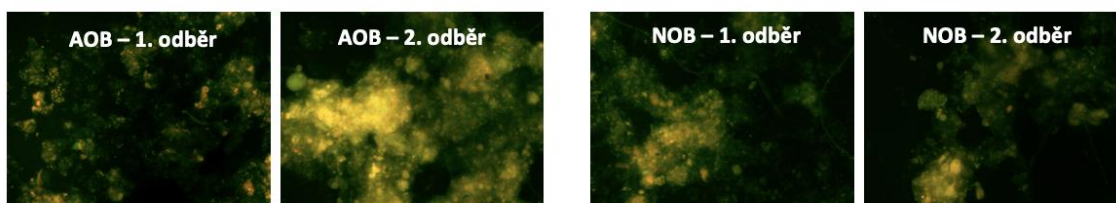
Snímky AOB a NOB získané metodou FISH (Obrázky 26 až 30) slouží k potvrzení přítomnosti těchto bakterií ve vzorcích biofilmu odebraných z nosičů. Z níže zobrazených snímků lze s jistotou potvrdit přítomnost AOB i NOB ve vzorcích, kdy metodami qPCR a NGS byly nitrifikační bakterie prokázány. Červené objekty jsou důkazem obarvení specifických genů daných bakterií a lze hodnotit, že přítomnost sledovaných AOB i NOB je nesporná a může odpovídat jejich procentuálnímu zastoupení v bakteriálním konsorciu biofilmu.



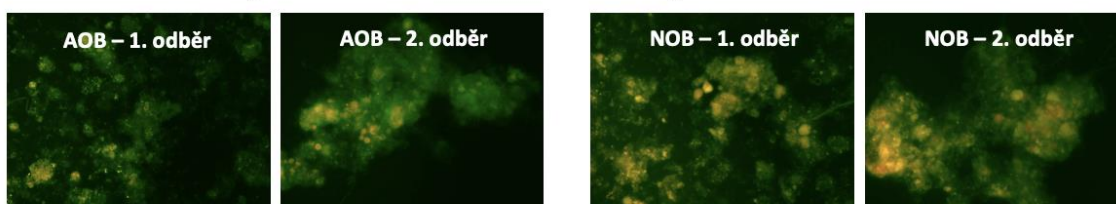
**Obr. 26** FISH analýza – zobrazení AOB a NOB v biofilmu z nosičů X



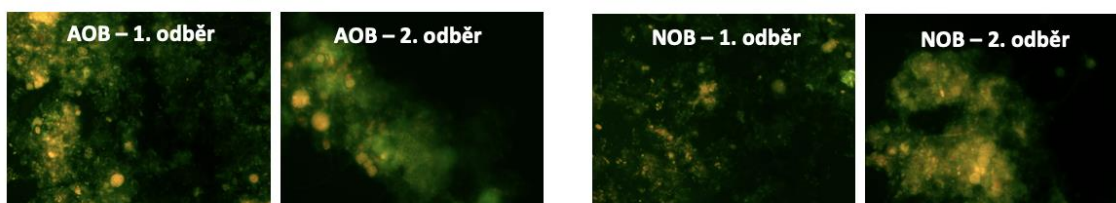
**Obr. 27** FISH analýza – zobrazení AOB a NOB v biofilmu z nosičů AnoxKaldnes K3



**Obr. 28** FISH analýza – zobrazení AOB a NOB v biofilmu z nosičů S



**Obr. 29** FISH analýza – zobrazení AOB a NOB v biofilmu z nosičů M



**Obr. 30** FISH analýza – zobrazení AOB a NOB v biofilmu z nosičů XL

## 5.2. Vývoj nanovlákněných struktur

V první řadě proběhla příprava PVB a PUR nanovlákněných vrstev pomocí pěti odlišných metod elektrostatického zvlákňování. Polymery PVB a PUR byly vybrány na základě dlouhodobých zkušeností a odborné literatury (Chen et al. 2009; Wang a Wang 2012). Připravené nanovlákněné vrstvy byly důkladně analyzovány pomocí několika moderních metod a tím byl vytvořen určitý postup pro analýzu nanovlákněných povrchů

s cílem získat informace o vhodnosti použití daného materiálu pro biologické aplikace. Na základě podrobných charakterizací připravených nanovlákných vrstev byl vybrán jeden polymer jako výchozí pro přípravu další prototypů nosičů biomasy. V další fázi práce už byly připravovány a testovány jednotlivé struktury (prototypy) nosičů biomasy.

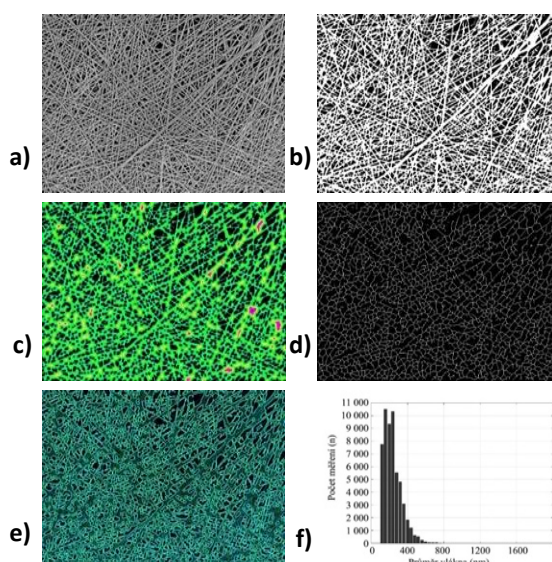
### **5.2.1. Příprava a charakterizace nanovláken PVB a PUR**

Prvním cílem bylo připravit 2 různé typy polymerních nanovláken (PUR a PVB) na různých zařízeních za stejných (nebo maximálně podobných) podmínek. Ke zvlákňování předem připravených polymerních roztoků PVB a PUR bylo použito 5 metod tj. “AC elektrospinning, DC elektrospinning z jehly, DC elektrospinning z tyčky, technologie Nanospider<sup>TM</sup> a elektro-odstředivé zvlákňování”. Tímto procesem vzniklo 10 polymerních vrstev, které byly podrobeny důkladné charakterizaci, tj. skenovací elektronové mikroskopii (SEM), konfokální mikroskopii (KF), fyzikálně-chemickým metodám charakterizace a biodegradaci. Detailní obrazová analýza byla aplikována na snímky ze SEM a KF. Pro obrazovou analýzu SEM snímků nanovláken a vyhodnocování vlastností materiálů byl vytvořen vlastní software v programu Matlab. K tomuto základnímu a velmi podrobnému kroku bylo přistoupeno na základě rešerší, kde nebyly nalezeny detailní popisy souvislostí mezi vlastnostmi běžných polymerů, jejich analýzou a hodnocením ve vztahu k biologickým vlastnostem daného materiálu. Jelikož vlastnosti povrchu materiálu silně souvisí s chováním mikroorganismů v jeho blízkosti, je jeho důkladná charakterizace nezbytná. Tento proces byl zpracován formou odborného článku Havlíček et al. (2020), který obsahuje veškeré informace a shrnutí výše popsaných skutečností.

### **Analýza SEM obrazu**

Analýza obrazu SEM byla provedena v programu Matlab a zahrnovala celkem šest dílčích kroků: (1) Úprava nasnímaných vláken a převedení obrazu na binární formu (Obrázek 31a). (2) Vady obrazu (např. vadné pixely, lokální znečištění, šum apod.) byly eliminovány morfologickými operacemi (Obrázek 31b). Porozita byla vypočtena jako součet pixelů s hodnotou 0 (pozadí) ve vztahu k celému obrazu (tj. pozadí plus vlákna). Velikost pórů byla stanovena jako ekvivalentní průměr kruhu. (3) Byla vypočtena vzdálenost transformace z binárního obrazu (Obrázek 31c). (4) Binární obraz byl následně převeden na linie o šířce jednoho pixelu pomocí skeleton algoritmu (Obrázek 31d). (5) Byla získána pouze maximální hodnota vzdálenosti transformace (kde

leží centrální pixel skeletonu). Stupeň neuspořádanosti (linearita/zakřivení) byl definován jako poměr délky vlákna překlenující dva vybrané body k nejkratší vzdálenosti mezi těmito dvěma body, vypočtený jako minimální Feretův průměr. (6) Jako poslední krok byl každý definovaný parametr na výsledném obrazu (Obrázek 31e) podroben statistické analýze a byly vyneseny histogramy distribuce parametrů vláken (příklad hodnocení průměru vláken je na Obrázku 31f).

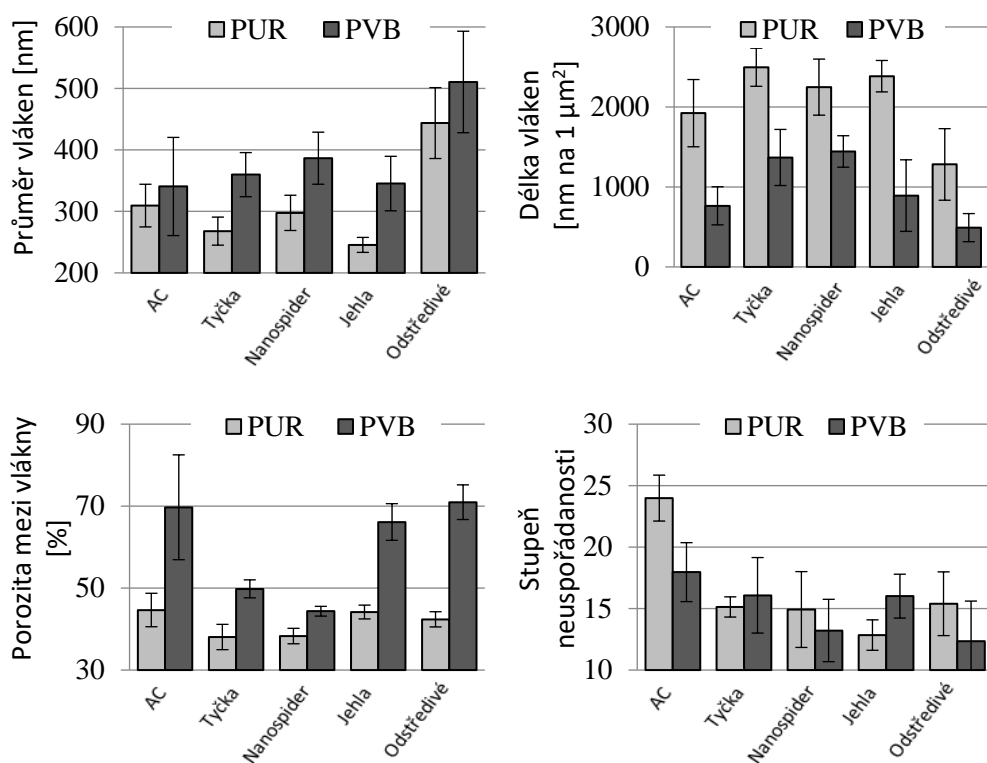


**Obr. 31** Postup analýzy obrazu snímků ze SEM dle textu výše

Výsledky analýzy SEM snímků u jednotlivých zvlákňovacích metod jsou graficky znázorněny na obrázku 32. Průměr vláken ovlivňuje strukturu celé nanovlákněné vrstvy. Nejtenčí vlákna byla získána použitím jehlové elektrody – polymer prochází úzkým prostorem na výstupu ze zvlákňovací elektrody a tím dochází k tvorbě jemných polymerních proudů. Jakékoli snížení vnitřního průměru jehly zvyšuje povrchové napětí roztoku a má za následek tvorbu menší kapičky, což způsobuje snížení zrychlení trysky. Vlákna s maximálním průměrem byla připravena odstředivým elektrostatickým zvlákňováním, které je obecně považováno za nejméně „kontrolovatelnou“ metodu, protože rotační pohyb zvlákňovací trysky ovlivňuje počáteční tvorbu vláken a způsob jejich shromažďování na kolektoru. Jiné způsoby zvlákňování nevykazovaly výraznou změnu průměru nanovláken.

Výsledky (Obrázek 32) ukázaly, že snížený průměr vlákna odpovídal vyšší celkové délce nanovláken na dané ploše. Nejvyšší celková délka nanovláken (na  $1 \mu\text{m}^2$ ) byla získána pomocí odstředivého elektrostatického zvlákňování, což odpovídá nejvyššímu průměru vlákna vytvořenému touto metodou. Výsledky analýzy obrazu indikují, že

příčina tohoto jevu byla vysoká rychlost „stříhu“ vláken během jejich ukládání na kolektor. Ostatní metody produkují mnohem vyšší celkové délky nanovláken na jednotku plochy.



**Obr. 32** Výsledky analýzy mikroskopického obrazu SEM pro (a) průměr vláken (v nanometrech), (b) délka vláken (v nanometrech na 1  $\mu\text{m}^2$ ), (c) pórovitost vláken (v procentech), (d) stupeň neuspořádanosti (bez jednotek); všechna data jsou zobrazena jako průměrné hodnoty se standardní odchylkou

Velikost pórů, distribuce pórů, objem pórů, propojení pórů a tvar pórů jsou rozhodující pro mnoho aplikací, především v biologických oblastech. Vysoká pórovitost a velká specifická plocha v nanovláknenných vrstvách jsou velmi atraktivní pro imobilizaci biomolekul a MO. V důsledku toho jsou vhodně připravená nanovláknna vhodná pro různé biologické aplikace (Kenry a Lim 2017). Kombinace vysoké porozity a malých pórů umožňuje propustnost pro kyslík a vodu a adsorpci tekutin. Velikost pórů a porozita byly mírně vyšší při použití střídavého proudu a odstředivého elektrostatického zvláknování (Obrázek 32), další metody vedly k velikosti pórů od 550 do 1250 nm a porozitě 45–65 %. Vyšší porozita u AC elektrosponingu je dána principem vzniku nanovláknenné vlečky, která se utváří odlišným způsobem než u DC metod. Vlákna jsou z této metody více jemná a volný prostor mezi vlákny je patrný na první pohled. Podobně

je tomu u odstředivého zvlákňování, kde způsob ukládání nanovláken taktéž poskytuje vrstvy s větším mezivlákněným prostorem.

Vyhodnocení stupně neuspořádanosti (resp. křivosti) ukázalo značný vliv zvolené metody. Nejnižší stupeň neuspořádanosti (tj. nejvyšší linearita vlákna) byla dosažena odstředivým elektrostatickým zvlákňováním, zatímco nejvyšší stupeň neuspořádanosti (tj. nejnižší linearita vlákna) byla dosažena metodou AC elektrospinningu. Tento výsledek nám poskytuje určité potvrzení korektnosti obrazové analýzy. Z logiky věci totiž vyplývá, že metoda odstředivého zvlákňování bude poskytovat nanovlákná s vysokou linearitou, jelikož jsou vznikající nanovlákná ukládána v jednom směru (rotační pohyb). U ostatních metod se retence vláken ukázala jako velmi náhodná a byla ovlivněna podmínkami prostředí a nastavením parametrů metod.

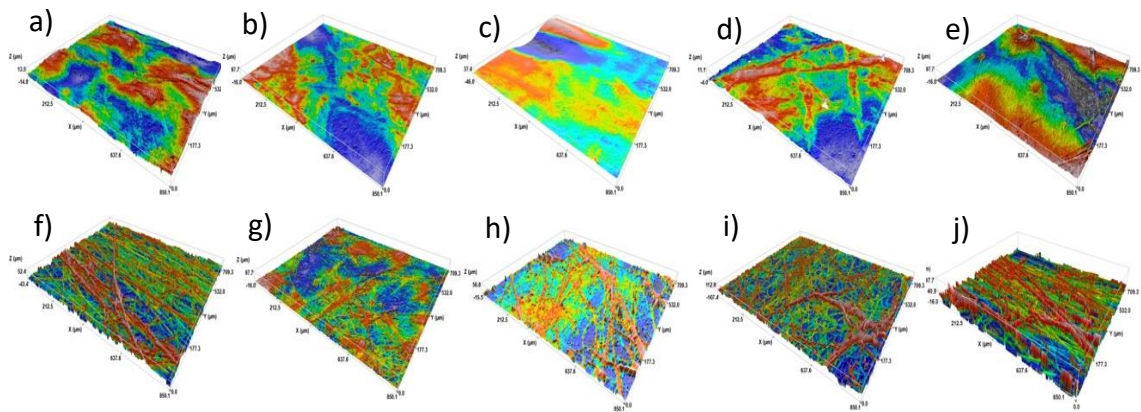
Významný vliv na strukturu připravené vrstvy má způsob ukládání vznikajících nanovláken na kolektor (tj. druh pohybu vláken) a rychlost pohybu vláken, tj. při pomalejším letu (viz. metoda AC) jsou vlákna s větší pravděpodobností kroucena a nerovnoměrně (chaoticky) rozmístěna. Tento jev je ovlivňován především fyzikálním principem metody, zvoleným napětím a případně průtokem polymeru elektrodou.

### **Konfokální mikroskopie**

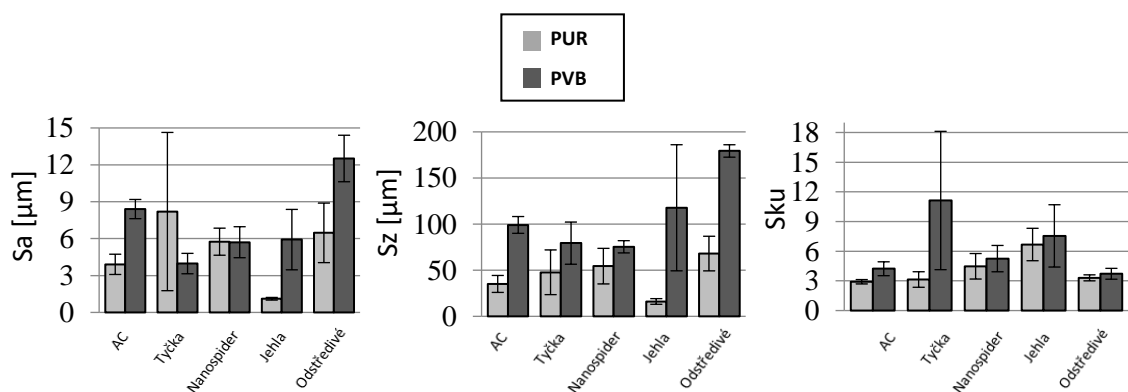
Chování buněk na polymerních materiálech (např. adsorpce a proliferace) závisí do značné míry na povrchových vlastnostech materiálu, včetně smáčivosti, hydrofility/hydrofobicity, chemickém složení, distribuci povrchového náboje, tuhosti a zejména drsnosti povrchu. V této práci byly pomocí konfokální mikroskopie stanoveny tři parametry drsnosti povrchu, konkrétně průměrná drsnost povrchu, maximální výška a koeficient špičatosti vláken (na základě ISO 25178). Průměrná drsnost povrchu („Sa“, v  $\mu\text{m}$ ) je rozptylový parametr definovaný jako průměr absolutních hodnot pro povrch nad a pod střední rovinou v oblasti vzorkování. Maximální výška („Sz“, v  $\mu\text{m}$ ) je průměr výškových rozdílů mezi pěti nejvyššími vrcholy a pěti nejnižšími propadlinami. Průměr špičatosti („Sku“, bezrozměrná veličina) je měřítkem ostrosti distribuce výšky povrchu. Tento parametr charakterizuje rozložení výšky povrchu.

Hlavní rozdíl mezi nanovlákněnými strukturami PUR a PVB z různých zvlákňovacích metod byl v drsnosti povrchu (Obrázek 33 a 34). Ve většině případů měl PUR hladší povrch (méně vhodné pro růst MO), což může být dáno jeho specifickými vlastnostmi (viskoelastický a vykazuje slabší intramolekulární síly). Naproti tomu PVB je amorfni termoplastický polymer, jehož nanovlákněná vrstva vykazovala drsnější

povrch, tj. nanovlákna vyčnívala více na povrch a vytvořila hladkou rovnoměrnou vrstvu. To bylo pravděpodobně způsobeno vyšší přítomností deformovaných nanovláken ve vrstvě PVB v kombinaci s jejich chaotickým uspořádáním. Nejedná se tedy pouze o plošnou nerovnoměrnost povrchu, ale o bodové výstupy („nano“ a „mikro“ drsnost povrchu), které jsou důležité právě pro adhezi mikroorganismů k substrátu (Hsu et al. 2013). Konfokální mikroskopie i analýza SEM ukázaly, že z DC metod mají vrstvy kompaktnější a jemnější povrchy než z metody AC a odstředivého elektrostatického zvlákňování.



**Obr. 33** Snímky z konfokální mikroskopie povrchu nanovláknenných nosičů PUR (a - e) a PVB (f - j) z metod (a, f) AC elektrospinning, (b, g) tyčka (DC), (c, h) Nanospider<sup>TM</sup> (DC), (d, i) jehla (DC) a (e, j) elektro-odstředivé zvlákňování (DC); horní vrstvy nanovláken jsou zobrazeny červeně, zatímco spodní vrstvy nanovláken jsou modré



**Obr. 34** Výsledky analýzy obrazu konfokální mikroskopie ukazující (a) průměrnou drsnost povrchu (Sa), (b) maximální výšku (Sz) a (c) špičatost (Sku); jsou zobrazeny jako střední hodnoty se standardní odchylkou



## **Biodegradace PVB a PUR nanovláken**

Biologická rozložitelnost nanovláken byla stanovena pomocí respirometrie (Micro-Oxymax; Columbus Instruments Int.) na základě měření biologické spotřeby kyslíku (BSK) v přítomnosti aerobních mikroorganismů ve vodném prostředí, podle EN ISO 1485. Bakteriální inokulum bylo připraveno odsazením aktivovaného kalu odebraného z čistírny odpadních vod (Liberec). Vzorky byly měřeny v duplikátu po dobu 28 dnů.

Biodegradace obou polymerů byla obecně velmi nízká a nezávislá na typu použité zvlákňovací metody. Byla prokázána stabilita obou polymerů v inokulovaném vodném prostředí a na základě výsledků lze jako jediný, avšak nepatrný, rozdíl zmínit zanedbatelně vyšší stálost PUR oproti PVB (v jednotkách tisícin procent). Biodegradace všech připravených nosičů byla z makro-hlediska zanedbatelná, a tedy tyto nosiče se jeví jako vhodné pro používání ve vodném prostředí.

## **Sumarizace**

Na základě výše popsané charakterizace nanovláken PVB a PUR byla pro přípravu nosiče vybrána PVB nanovlákná připravená metodou Nanospider™ jako nejvhodnější materiál z hlediska predikované proliferace buněk, náročnosti přípravy a ekonomických parametrů. Výrobní cena vrstvy PVB nanovláken vyrobené tímto způsobem se pohybuje v řádech korun za 1 m<sup>2</sup>. Navíc, nanovlákná PVB připravená tímto typem zvlákňování mají vhodné strukturální vlastnosti a příprava zvlákňovacího roztoku je velmi snadná (prosté rozpuštění polymeru PVB v etanolu v daném poměru). Porozita na úrovni 45 % u PVB je přijatelná pro osídlování bakteriemi a zároveň není příliš velká, aby se mikroorganismy dostávaly hluboko do vnitřní struktury, kde se značně snižuje kontakt s polutanty a akceptory elektronů a dochází k nahromadění neaktivního biofilmu (balastu).

### **5.2.2. Testování plošných nanovláknenných struktur PVB**

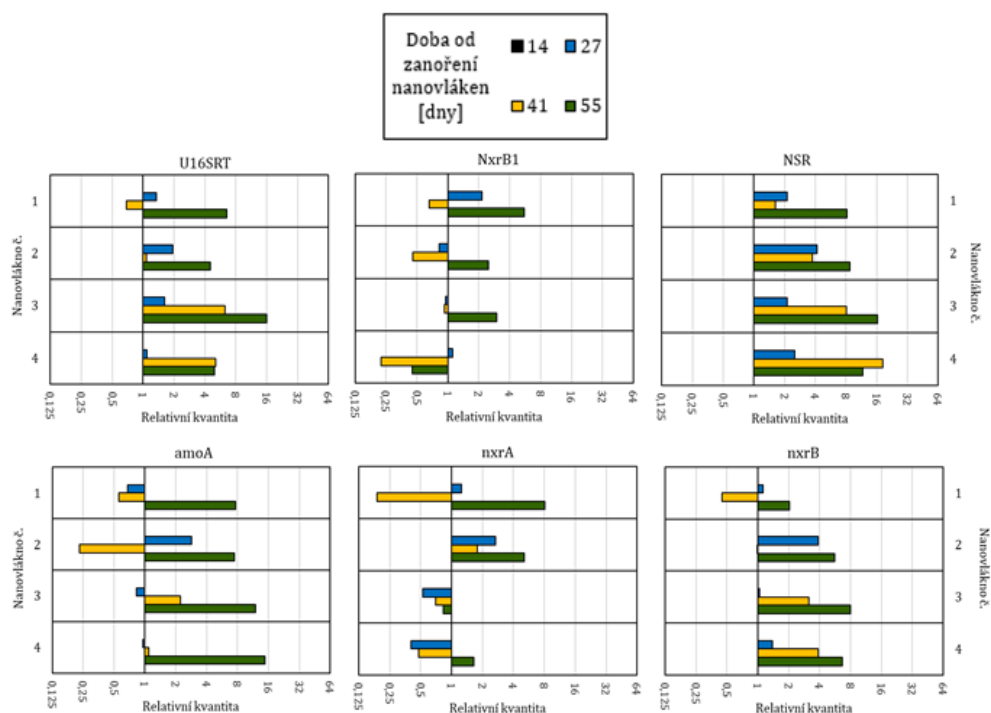
V tomto experimentu byly testovány jako nosiče biomasy nanovláknenné vrstvy PVB (vybrané na základě předchozího testování) umístěné v nerezových rámečcích (byla použita 5000 mm<sup>2</sup> efektivní plocha na 1 L média reaktoru). Bioreaktor s vybranými PVB nosiči (Obrázek 35) byl v provozu 2 měsíce, během něhož byl sledován nárůst biofilmu na nosičích, resp. aktivita mikroorganismů, odebraných v kvadruplikátu v každém

odběru. V tomto případě se nejednalo o MBBR reaktor, jelikož nosiče byly po celou dobu experimentu stacionární. Účinnost nitrifikace byla v tomto případě vyšší než 95 % (opět sledováno na základě průběžných chemických analýz) a utvořená biomasa byla silně přisedlá na nanovlákném povrchu.



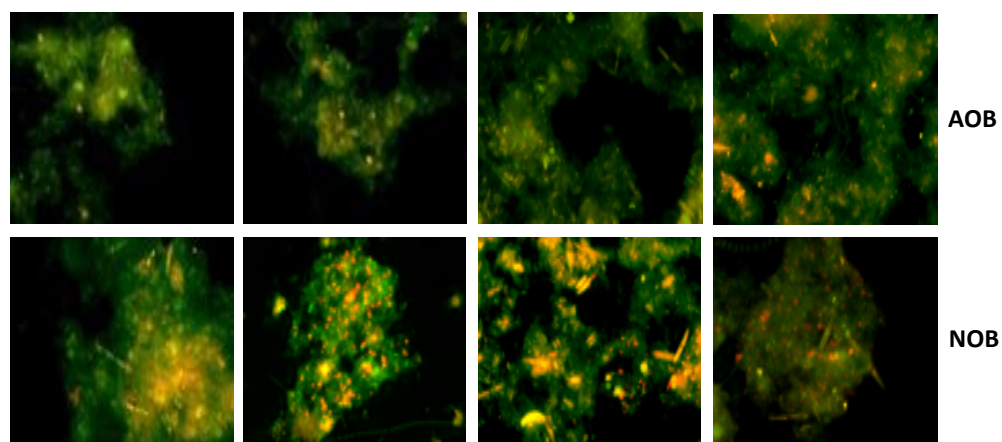
**Obr. 35** Fotografie experimentálních nanovlákných nosičů biomasy; před umístěním do reaktoru

Na všech vzorcích PVB nanovláken odebraných z bioreaktoru bylo celkové bakteriální oživení na vysoké úrovni. V průběhu experimentu byl na všech nanovlákních detekován v nízkém množství funkční gen kódující klíčový enzym oxidace amoniaku (*amoA*) specifický pro AOB *Nitrosomonas*. Nápodobně bylo množství funkčních genů specifických pro NOB *Nitrobacter* (*NxrB1*, *nxA*) na všech nanovlákních v průběhu experimentu velmi nízké až na mezi detekce. Markery specifické pro NOB *Nitrospira* (*nxB*, NSR) byly, na rozdíl od NOB *Nitrobacter*, detekovány již ve velkém množství na všech nanovlákních od prvního odběru. Nárůst celkové a testované specifické bakteriální biomasy na jednotlivých nanovlákních v průběhu experimentu byl vyjádřen pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 36), kde referenčním vzorkem byla nanovláknina z 1. odběru, tj. 14 dní od zanoření nanovláken. V případě specifického funkčního genu *amoA* (AOB *Nitrosomonas*) byl pozorován postupný nárůst v průběhu experimentu u všech nanovláken, stejně tak v případě NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*). V průběhu experimentu se testovaná bakteriální biomasa výrazně neměnila, což indikuje, že v 1. odběru byl na povrchu nanovláken již stabilní biofilm. Množství testovaných markerů se výrazně nelišilo mezi jednotlivými kvadruplicáty.



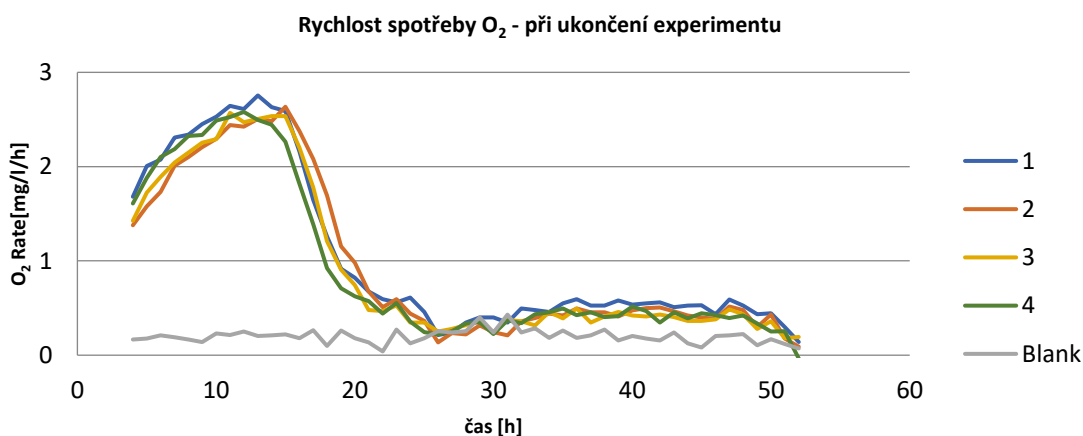
**Obr. 36** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na jednotlivých kvadruplicatech v průběhu experimentu

Výsledky FISH analýzy posledního odběru potvrzují závěry z qPCR analýzy. Ze snímků (Obrázek 37) je patrné nízké celkové množství AOB ve vzorcích. Naopak značné zastoupení červené barvy k zelené (EUB) ve snímcích je pro NOB, kdy jednotlivé kvadruplicate se příliš neliší. V tomto experimentu bylo prokázáno, že NOB měly dominantní zastoupení v nitrifikačním procesu a reálná situace neodpovídala teoretickým předpokladům, podle kterých by měly v systému převažovat AOB (Yao a Peng 2017; Seuntjens et al. 2018).



**Obr. 37** Ukázka snímků z FISH analýzy posledního odběru, z každé sady snímků byl vybrán jeden od každého z kvadruplicate pro AOB (nahore) a NOB (dole)

Biofilm spolu s nosiči byly podrobeny respirometrickému měření (po dvouměsíčním testování v biologickém reaktoru). Výsledky rychlosti spotřeby  $O_2$  (Obrázek 38) ukazovaly dobrou aktivitu nitrifikačních bakterií oproti blanku (pouze médium bez inokula). S ohledem na slabou vrstvu biofilmu, celkovou plochu ( $25\ 000\ \text{mm}^2/\text{l}$ ) a stacionární povahu nosičů byla účinnost tohoto systému značná, což bylo potvrzeno stanovenou koncentrací  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ve vzorcích po ukončení respirometrie, která byla nižší než  $1\ \text{mg/l}$  (na začátku testu bylo dávkováno  $10\ \text{mg/l}\ \text{NH}_4^+\text{-N}$ ). Nanovláknenné nosiče nevykazovaly po ukončování experimentu viditelné poškození, tj. struktura se z makro-pohledu nezměnila oproti původnímu stavu.



**Obr. 38** Rychlost spotřeby kyslíku při závěrečném testování PVB nosičů na respirometru v kvadruplikátu

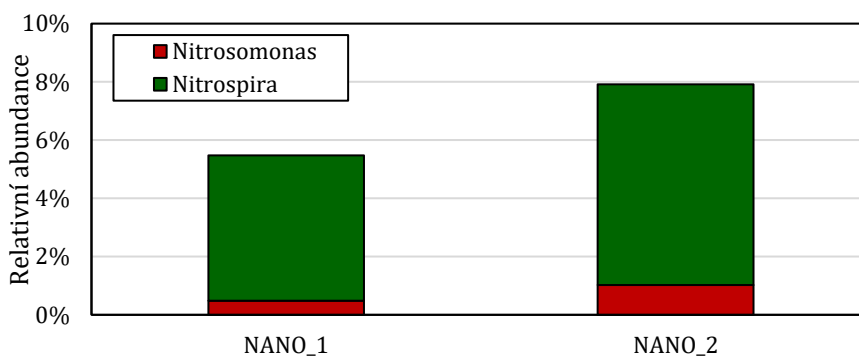
### 5.2.3. Modifikace plošné nanovláknenné struktury

Vývoj prototypu nanovláknenného nosiče biomasy probíhal na základě výsledků a diskuzí všech předchozích experimentů. Pozornost byla zaměřena na vývoj nanovláknenného nosiče biomasy pro post-treatment systémy čištění odpadních vod. Takový nosič musí splňovat následující požadavky – mechanicky stabilní, ekonomicky nenáročný na výrobu, co nejvíce usnadňují adhezi nitrifikačních bakterií na povrch nosiče a setrvání biomasy na nosiči v průběhu procesu. Kvůli mechanické stabilizaci, což je zásadní otázka v případě použití nanovláknenných struktur pro namáhané biotechnologické procesy, byla nanovláknenná PVB vrstva vyztužena silikonovou mřížkou (Obrázek 39). Aplikace mřížky byla oboustranná a byla použita metoda tepelné laminace.



**Obr. 39** Nově vyvinutý nanovláknový nosič biomasy mechanicky stabilizovaný silikonovou mřížkou před a po biologickém testování

Nosič byl testován v biologickém reaktoru za stejných podmínek jako nosiče v předchozím experimentu. Výsledky respirometrie ukázaly na lepší aktivitu biofilmu nanovláknových nosičů, než byla u komerčně dostupných AnoxKaldnes K3. Zásadní jsou však výsledky molekulárně genetických testů, konkrétně NGS analýzy (Obrázek 40), které stanovily hojnost nitrifikačních bakterií na dobré úrovni, avšak na nižší než u nosičů nestabilizovaných. Biofilm na mechanicky stabilizovaných nosičích tedy vykazoval značnou aktivitu a byl hojně osídlen nitrifikačními bakterie, avšak méně než u plošných struktur bez stabilizace. Metoda tepelné laminace mění strukturu povrchu a to tak, že dojde ke zmenšení pórů a zároveň ke snížení drsnosti povrchu, což je nežádoucí. Využití tohoto prototypu nosiče je tedy vhodnější spíše pro jiné, speciálnější biotechnologické aplikace. Již jsou testovány tyto nosiče v rámci projektů zaměřených na práci s mikroorganismy různých druhů a předpokládá se jejich další rozvoj. Pro další vývoj nanovláknových nosičů přinesl experiment s tímto typem nosiče řadu důležitých poznatků a to především, že nanovláknová vrstva musí v ideálním případě zůstat ve své původní formě, aby byl plně využit její potenciál. Řada modifikací nanovláknových struktur může vylepšit jejich mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti, ale nemusí být vhodná právě pro adhezi mikroorganismů.



**Obr. 40** Relativní zastoupení rodů *Nitrosomonas* a *Nitrospira* v biofilmu na mechanicky stabilizovaných nosičích po dvou měsících v bioreaktoru

### 5.3. Porovnání nosičů biomasy

Jednotlivé struktury nosičů byly porovnány z hlediska jejich účinnosti v post-nitrifikační MBBR reaktoru a růstu především nitrifikačních bakterií na nich. V reaktorech bylo testováno 50 ks nanovlákných nosičů, 20 ks mikrovlákných nosičů a 150 ks AnoxKaldnes K3. Byla použita pětinašobná plocha nosičů u AnoxKaldnes K3 než v případě mikro- a nanovlákných nosičů (přepočít celkové účinné plochy nosičů v reaktoru podle jejich množství), protože absence pórů a hladká povrchová struktura AnoxKaldnes K3 vytváří nevýhodu pro kolonizaci mikroorganismy, a tím také pro stabilizaci procesu nitrifikace. Výsledky experimentu byly porovnány za účelem vytvoření přehledu o účinnosti každého z nosičů a porovnání nosičů navzájem. Pro mikrovlákný nosič X a AnoxKaldnes K3 byla vzata data z dříve popsaného experimentu (popsáno v kapitole 5.1) s tím, že nanovlákné nosiče byly testovány za stejných podmínek.

#### 5.3.1. Popis porovnávaných nosičů biomasy

Byly testovány tři různé nosiče biomasy (Obrázek 41) – vrstva nanovláken, 3D mikrovlákná struktura a komerčně dostupný nosič AnoxKaldnes K3. Podrobnou charakteristiku AnoxKaldnes K3 lze nalézt v článku Barwal a Chaudhary (2014). Nanovlákné nosiče byly připraveny elektrostatickým zvlákněním 10% roztoku polyvinylbutyralu (Mowital B 60 H, Kuraray) v etanolu pomocí technologie Nanospider™. Při přesně definovaných parametrech procesu ( $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vlhkost = 15 %) byla zvlákněna vrstva o plošné hmotnosti cca  $20\text{ g/m}^2$ . Průměr nanovláken byl 387 nm a průměrná porozita mezi vlákny byla přibližně 45 %. Vrstva byla nařezána na části o rozměrech  $3,5 \times 3,5\text{ cm}$ , které byly použity jako nosiče biomasy. Nanovlákný nosič lze stabilizovat různými metodami, jako je fixace v nerezových rámech nebo laminace unikátní silikonovou mřížkou. Pro tento experiment byla však použita nestabilizovaná nanovlákná vrstva. Zástupcem mikrovlákné struktury byl nosič X (popis viz. kapitola 5.1.1.), který byl jedním z vývojových prototypů mikrovlákných nosičů.



**Obr. 41** Fotografie nosičů biomasy (zleva): mikrovláknenný nosič X, AnoxKaldnes K3 a nanovláknenný nosič

**Tab. 13** Parametry testovaných nosičů biomasy

Nosič	Efektivní povrchová plocha [mm <sup>2</sup> ]	Hustota [kg/m <sup>3</sup> ]	Efektivní specifická plocha [m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup> ]	Velikost pórů [mm]
Nanovláknenný	2450	1150	12 000	0,000697
Mikrovláknenný	5000	1350	500	3,5
AnoxKaldnes K3	3500	980	500	-

### 5.3.2. Vyhodnocení chemismu reaktorů

Naměřené koncentrace CHSK a sloučenin dusíku společně s hodnotami pH v jednotlivých bioreaktorech jsou uvedeny v tabulce 14. Koncentrace NH<sub>4</sub>-N v modelové vodě (společná pro všechny reaktory) se pohybovala mezi 8 a 16 mg/l a v odtoku z každého reaktoru byla typicky menší než 0,5 mg/l, což ukazuje na více než 95% účinnost nitrifikace.

**Tab. 14** Hodnoty analýz odtoků z reaktorů

Den	Reaktor s nanovláknennými nosiči					
	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3	175,0	23,3	0,24	10,5	0,12	6,5 → 7,5*
7	130,0	23,1	0,01	13,0	0,06	7,4
14	23,4	6,8	0,28	11,0	0,60	7,6
21	23,3	14,5	0,01	12,1	0,05	6,3 → 7,5*
28	28,8	6,8	0,12	10,7	0,33	6,9
35	28,9	13,8	0,07	11,3	0,51	7,7
42	21,2	11,5	0,09	13,1	0,57	6,1 → 7,5*
49	20,9	8,5	0,06	11,6	0,06	6,0 → 7,6*
56	9,7	7,1	0,06	13,0	1,40	7,4
64	9,6	7,0	0,06	10,7	0,02	5,7 → 7,6*
71	9,9	9,9	0,10	16,8	0,66	7,8
85	12,8	11,5	0,03	11,1	0,05	5,8 → 7,6*
92	12,0	11,3	0,08	13,2	0,03	7,5

Reaktor s mikrovláknými nosiči						
Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3	109,0	29,0	0,22	11,2	0,22	7,2
7	92,3	25,1	0,02	32,7	0,06	7,6
14	61,4	15,7	0,16	12,1	0,56	6,3 → 7,5*
21	21,4	21,1	0,01	14,9	0,06	6,9
28	22,2	16,2	0,19	12,4	0,29	7,6
35	74,0	20,5	0,32	12,7	1,19	6,1 → 7,5*
42	16,9	9,4	0,16	14,7	0,76	5,9 → 7,6*
49	17,9	10,3	0,09	12,2	0,05	7,4
56	6,3	6,3	0,06	13,5	1,81	5,8 → 7,6*
64	6,4	6,2	0,03	11,2	0,02	7,9
71	10,0	9,9	0,07	18,0	0,21	5,7 → 7,6*
85	17,7	15,5	0,14	11,5	0,06	7,4
92	17,1	15,6	0,18	14,1	0,03	7,5

Reaktor s AnoxKaldnes K3 nosiči						
Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	pH
3	176,0	20,0	0,33	11,5	0,12	7,2
7	62,2	13,7	0,01	11,1	0,02	7,7
14	25,0	10,1	1,28	8,5	1,53	6,9 → 7,5*
21	23,5	18,6	0,01	12,1	0,06	7,0
28	18,7	8,2	0,18	11,9	0,13	7,7
35	31,4	13,0	0,24	11,7	0,19	6,5 → 7,5*
42	48,7	9,1	0,02	16,1	0,10	6,7 → 7,6*
49	15,8	15,5	0,07	12,0	0,03	7,5
56	14,1	11,1	0,04	14,7	0,18	6,1 → 7,6*
64	13,9	10,8	0,03	10,7	0,01	7,9
71	12,6	12,5	0,05	16,2	0,21	5,9 → 7,6*
85	15,3	15,0	0,25	11,3	0,07	7,5
92	14,9	14,8	0,04	14,4	0,02	7,6

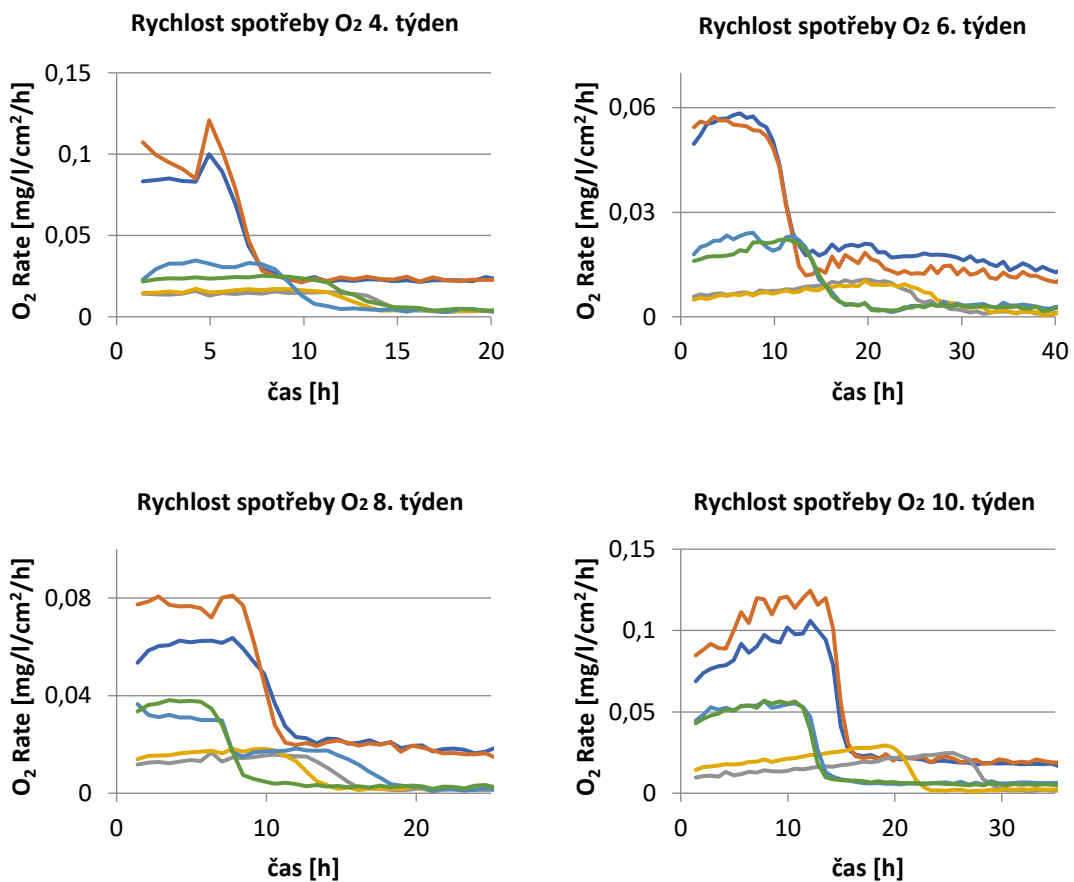
\* pH upraveno přidáním NaOH

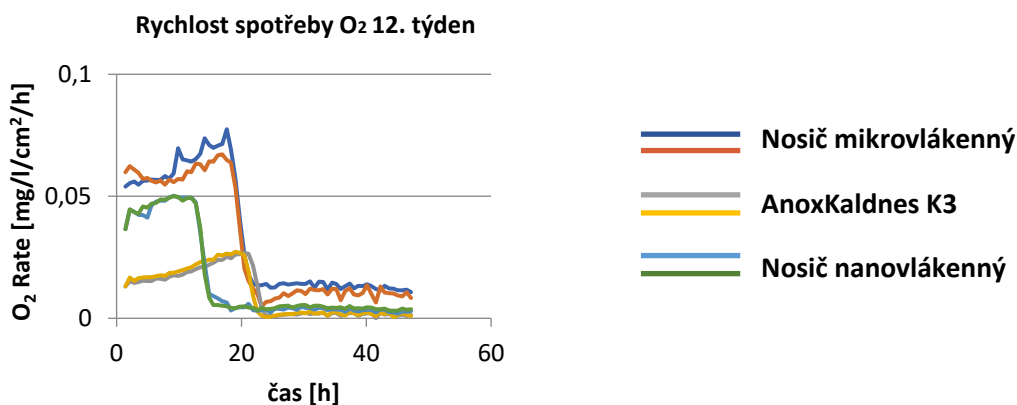
Ustálený stav každého z reaktorů byl charakterizován kombinací několika faktorů: (1) hodnoty NH<sub>4</sub>-N v odtoku byly nižší než 0,5 mg/l poté, co byla hodnota nefiltrované CHSK<sub>Cr</sub> v reaktoru nižší než 25 mg/l; (2) byl viditelný nárůst biofilmu na nosičích; (3) při respirometrickém měření byla aktivita bakterií v biofilmu již měřitelná. Tento stav nastal mezi 14 a 21 dny po spuštění bioreaktorů. V určitých fázích experimentu byly hodnoty sledovaných koncentrací dusíkatých sloučenin nad nebo pod limitními hodnotami, což negativně neovlivnilo výsledky experimentu. Jednotlivé hodnoty chemických analýz reaktorů jsou uvedeny níže a na jejich základě lze usoudit, že podmínky dosažené při testování nosičů byly u všech reaktorů velmi blízké. Nitrifikace tedy probíhala bez zaznamenaných problémů, a proto můžeme výsledky analýz biofilmu (Tabulka 14) považovat za relevantní pro vyhodnocení účinnosti testovaných nosičů biomasy.



### 5.3.3. Výsledky respirometrie

Na konci respirometrických testů byla naměřená koncentrace amoniakálního dusíku v lahvích vždy nižší než 0,5 mg/l, tj. nitrifikace u všech nosičů probíhala s vysokou účinností již od prvních testů. Nejúčinnějšími nosiči z hlediska metabolické aktivity biofilmu na jejich povrchu (viz. Obrázek 42) byla mikrovlákna, kde velký vnitřní prostor nosičů umožňuje vysokorychlostní zachycení biomasy ve struktuře nosiče a tím se zvyšuje rychlost tvorby a stabilizace přirozeného biofilmu. Jednotlivé fáze vývoje biofilmu jsou podrobně popsány v článku di Biase et al. (2019) a jsou patrné z vývoje naměřených dat, tj. počáteční rychlý nástup aktivity biofilmu následovaný poklesem a dalším nárůstem během několika týdnů. U mikrovláknenných nosičů však byly výsledky respirometrie při prvních měřeních pozitivně ovlivněny přítomností zachycené suspendované biomasy z fáze inokulace. Značná velikost vnitřního meziprostoru způsobuje počáteční vysokorychlostní zachycení suspendovaného kalu, což vede k rychlému nárůstu počáteční biomasy a ne zcela srovnatelným výsledkům (s jinými nosiči) před dosažením ustáleného stavu (Ahmad et al. 2017b).





**Obr. 42** Přehled vybraných respirometrických dat ukazujících vývoj aktivit biofilmu na jednotlivých nosičích biomasy

Nanovláknenné nosiče vykazují významnou účinnost i při relativně nízkém plnění a menším vnitřním prostoru. Jejich jedinou nevýhodou je mechanická nestabilita v provzdušňovaném systému a delší doba stabilizace biofilmu na povrchu. Pomaleji se tvořící biofilm je však k povrchu nosiče přichycen mnohem pevněji než u nosiče z mikrovláken nebo AnoxKaldnes K3. Stabilita biofilmu je tak na nanovláknenném nosiči po určité době velmi vysoká (biofilm je pevně fixován na povrchu nosiče). U dat z respirometrie (Obrázek 42) lze pozorovat pomalý nárůst aktivity biofilmu u nanovláknenných nosičů, a naopak rychlý nástup aktivity u mikrovláknenných nosičů. Je však obtížné odhadnout (v případě mikrovláknenných nosičů), kdy se jedná pouze o aktivitu způsobenou čistým biofilmem (nikoliv suspendovanou biomasou zachycenou na nosiči). Lze sledovat postupnou konvergenci hodnot aktivit mikro- a nanovláknenných nosičů.

Již bylo prokázáno, že nosiče AnoxKaldnes K3 fungují, ale jsou méně účinné než mikro- a nanovláknenné struktury kvůli delší době kolonizace bakterií (nosiče nemají příliš porézní strukturu). Zachycení mikroorganismů a vývoj biofilmu tak trvá podstatně déle. Tato nevýhoda je zásadní v post-treatment procesech na ČOV (zejména u post-nitrifikace) a podporuje tvrzení, že nosiče s vysokou drsností povrchu a definovanou pórovitostí jsou pro tyto procesy mnohem výhodnější (Ahmad et al. 2017b; Al-Amshawee et al. 2021).

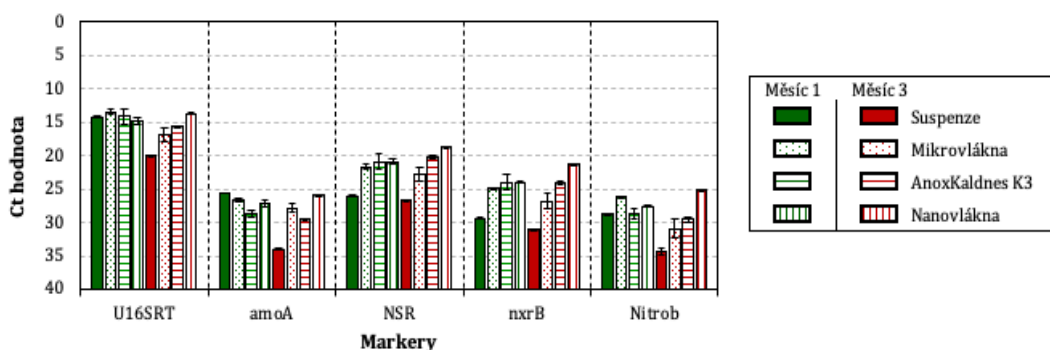
### 5.3.4. Výsledky molekulárně genetických metod

Metodami molekulární genetiky bylo interpretováno zastoupení sledovaných bakteriálních kmenů ve vzorcích. Tato reprezentace koreluje s různými parametry, včetně provozní fáze reaktoru, růstu biofilmu, prostředí, vlastnostmi nosiče a schopností detekce. Metoda qPCR byla použita především pro vzájemné porovnání vzorků nosičů biomasy a NGS k určení bakteriálního konsorcia ve vzorcích. K ověření přítomnosti sledovaných nitrifikačních bakterií se použila metoda FISH.

#### qPCR analýza

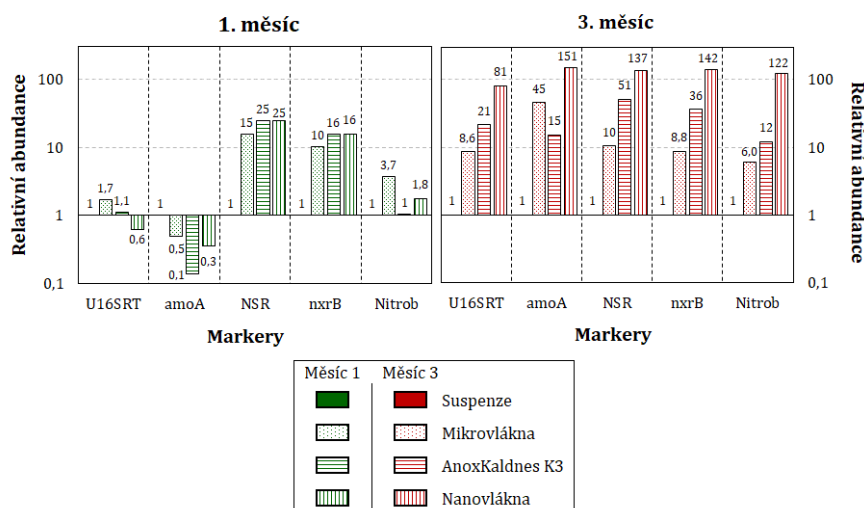
Výsledky analýzy qPCR jsou interpretovány ve formě grafu průměrných hodnot Ct (Obrázek 43) a relativní kvantifikace (Obrázek 44) pomocí metody delta Ct (Schmittgen a Livak 2008). V následujícím textu výraz "hodnota Ct" znamená průměr duplikátu hodnot Ct; v případě duplikátu vzorků, tedy nosičů biomasy, se rozumí průměr čtyř naměřených hodnot Ct. Interpretace výsledků analýzy qPCR je založena na inverzní proporcii. Například nižší hodnoty Ct získané pomocí markeru U16SRT odráží větší koncentraci bakteriální biomasy ve vzorku. Maximální možná hodnota Ct je 40 a odpovídá nulové detekci.

U všech vzorků z prvního a druhého odběru byla celková bakteriální výtěžnost vysoká. Ve druhém odběru došlo k mírnému poklesu u mikrovláknenných nosičů a v médiu, což je způsobeno eliminací suspendovaného kalu během vývoje biofilmu na nosičích. U nanovláken a nosičů AnoxKaldnes K3 byla adheze suspendovaného kalu od začátku procesu minimální, proto se celkové hodnoty bakteriálního zastoupení po delší dobu nezměnily. Všechny testované markery specifické pro nitrifikaci byly detekovány ve všech vzorcích.



**Obr. 43** Průměrné Ct hodnoty testovaných biologických markerů pro jednotlivé vzorky

Porovnání množství celkové a specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými vzorky nosičů biomasy z duplikátu je vyjádřeno relativní kvantifikací (Obrázek 44), která popisuje relativní změnu množství daného markeru vzhledem k referenčnímu vzorku, což je v tomto případě médium z reaktoru (suspenze byla získána filtrací 500 ml média z reaktoru). Relativní kvantifikace referenčního vzorku je rovna 1. Při prvním odběru vzorků (Obrázek 44, měsíc 1) byla četnost NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*) vyšší na všech nosičích biomasy než v médiu z reaktoru. Naopak množství funkčního genu AOB *Nitrosomonas* bylo na nosičích biomasy nižší než v médiu. Množství NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*) bylo o něco vyšší na AnoxKaldnes K3 a nanovlákných nosičích než na mikrovlákných nosičích v prvním vzorkování. Množství AOB *Nitrosomonas* a NOB *Nitrobacter* bylo vyšší na mikrovlákných nosičích v porovnání s nosiči AnoxKaldnes K3. Při druhém odběru vzorků (Obrázek 44, měsíc 3) lze po třech měsících provozu pozorovat výrazně větší rozdíly v množství celkové a specifické bakteriální biomasy mezi médiem z reaktoru a nosiči biomasy, zejména nosiči z nanovláken. Tento jev je způsoben nižším odlučováním biomasy z nosičů v pokročilé fázi provozu bioreaktoru – stabilizace biofilmu. Množství celkové bakteriální biomasy a AOB a NOB bylo významně vyšší na nosičích než ve 500 ml média; nejvyšší bylo na nanovlákných nosičích. Stejně jako v prvním vzorkování měly nosiče AnoxKaldnes K3 nižší výskyt AOB *Nitrosomonas* a vyšší výskyt NOB *Nitrospira* než mikrovlákné nosiče ve druhém vzorkování. Celkové bakteriální oživení bylo třikrát vyšší na nanovlákných nosičích než na AnoxKaldnes K3. Současně bylo množství NOB *Nitrospira* 2,5-krát vyšší na nanovlákných nosičích; tj. poměr NOB *Nitrospira* k celkové bakteriální biomase je pravděpodobně vyšší u nosičů AnoxKaldnes K3 než u nosičů z nanovláken.



**Obr. 44** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na nosičích vzhledem k médiu reaktoru v prvním (1. měsíc) a druhém (3. měsíc) odběru

Porovnání aktivit biofilmu získaných z respirometrických měření (viz Obrázek 42) a počtu jednotlivých nitrifikantů ve vzorcích ukazuje, že pro růst bakterií jsou důležité parametry nosiče jako je povrchová morfologie, typ materiálu, porozita a další specifické vlastnosti (Al-Amshawee et al. 2021; Bhattacharya a Mazumder 2021). Jak je z výsledků patrné, vyšší aktivita, tedy i vyšší množství biofilmu na mikrovlákných nosičích neznamená vyšší počet nitrifikačních bakterií v biofilmu. U mikrovlákných nosičů může být celková aktivita (spotřeba  $O_2$ ) zvýšena vlivem endogenní respirace, která vyplývá z vyššího množství biomasy ve struktuře nosiče. Přesto však vycházejí mikrovlákné nosiče na základě výsledků respirometrie jako nejlepší z hlediska množství narostlého nitrifikujícího biofilmu. Porovnání mezi vzorky jasně ukazuje, že nejvíce je patrný růst nitrifikačních bakterií na nanovlákných nosičích způsobený velmi vhodným prostředím ("nano" drsnost povrchu s vhodnou porozitou, morfologie vnitřní struktury, povrchový náboj atd.), které tyto materiály poskytují bakteriím. V tomto ohledu lze uvažovat i o afinitě, kdy morfologie nanovlákné struktury je podobná mezibuněčné hmotě, jež je tvořena mikroorganismy a tvoří součást biofilmu (Rasouli et al. 2019). Výsledky jednoznačně ukazují, že mikro- a nanovlákného nosiče budou vhodné pro odlišné aplikace (viz kapitole 6).

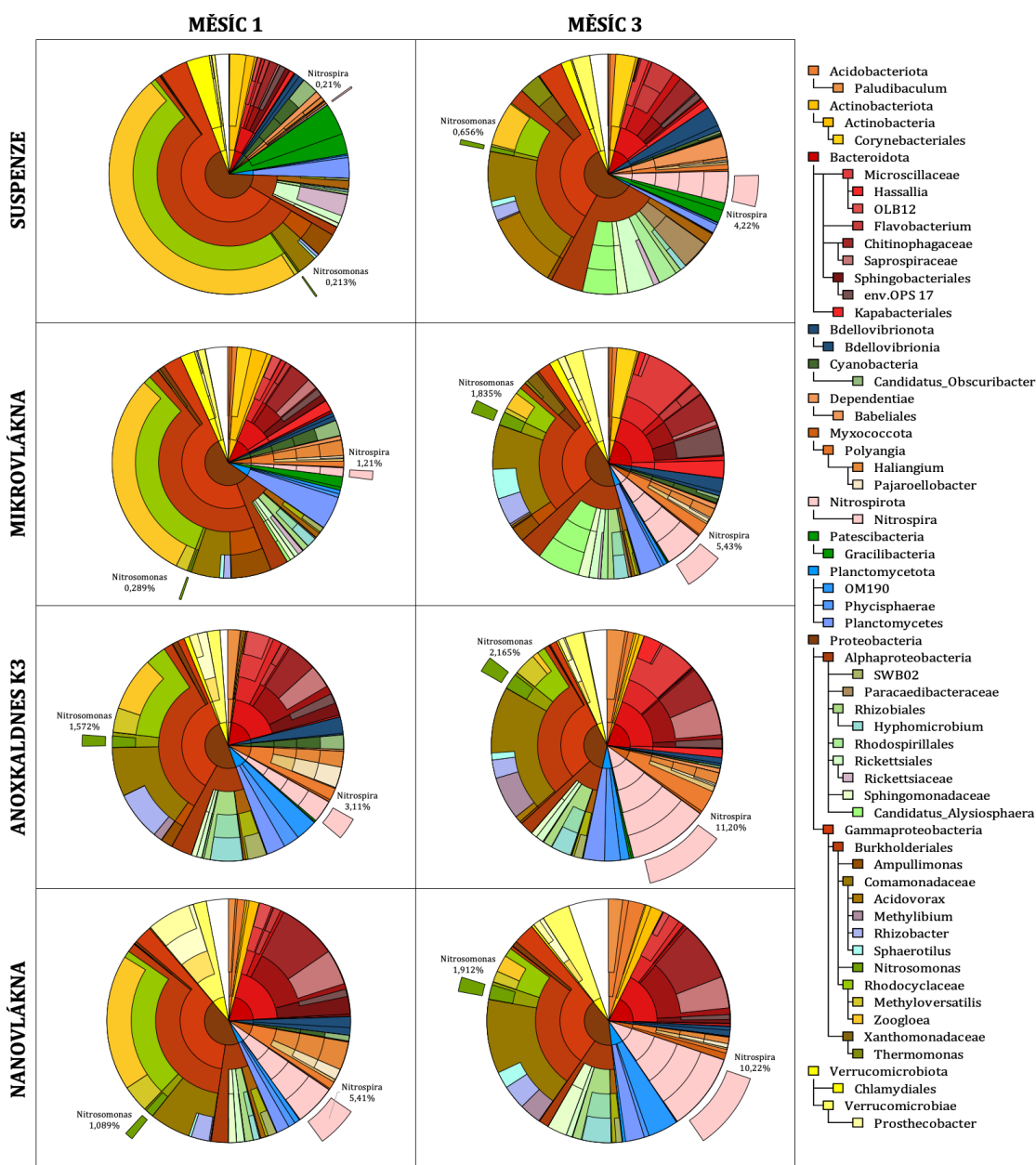
## NGS analýza

Na základě složení bakteriálního konsorcia (Obrázek 45) analyzovaného metodou NGS byl získán přehled o konkrétních nitrifikačních bakteriích a dalších bakteriálních

kmenech, které mohou ovlivnit funkčnost a stabilitu biofilmu. Mnoho studií prezentuje taxonomická data na úrovni kmene nebo třídy, ale tato klasifikace není dostatečná pro správné posouzení funkčnosti jednotlivých bakteriálních zástupců (Sanz a Köchling 2019). V této práci jsou bakterie definovány na úrovni rodu, kde můžeme bezpečně hodnotit funkci jednotlivých zástupců bakteriálního konsorcia v biofilmu.

Obrázek 43 ukazuje výsledky NGS analýzy pro oba odběry ve formě tzv. Krona grafů. Nalezené mikroorganismy se běžně vyskytují v biofilmových systémech ČOV, což ukazuje na vhodně zvolené podmínky během inokulace a při provozu laboratorních modelů. Vývoj AOB a NOB je patrný z grafů u všech typů nosičů biomasy. Rozdíl ve struktuře nosiče však hraje významnou roli v mikrobiálním složení (Chen et al. 2021). *Nitrosomonas* vykázaly znatelnější vývoj mezi 1 a 3 měsícem na nosičích z mikrovláken a *Nitrospira* na nosičích z nanovláken a AnoxKaldnes K3. To naznačuje různé environmentální požadavky bakterií. Zástupci AOB (*Nitrosomonas*) pravděpodobně preferují prostředí s hutnou biomasou a velkou aktivní oblastí. Na druhou stranu zástupcům NOB (*Nitrospira*) se lépe daří v pomalu se tvořícím biofilmu, kde tyto bakterie zaujímají značné procento v celém bakteriálním konsorciu. Na základě těchto poznatků lze i nastavit podmínky pro částečnou nitrifikaci.

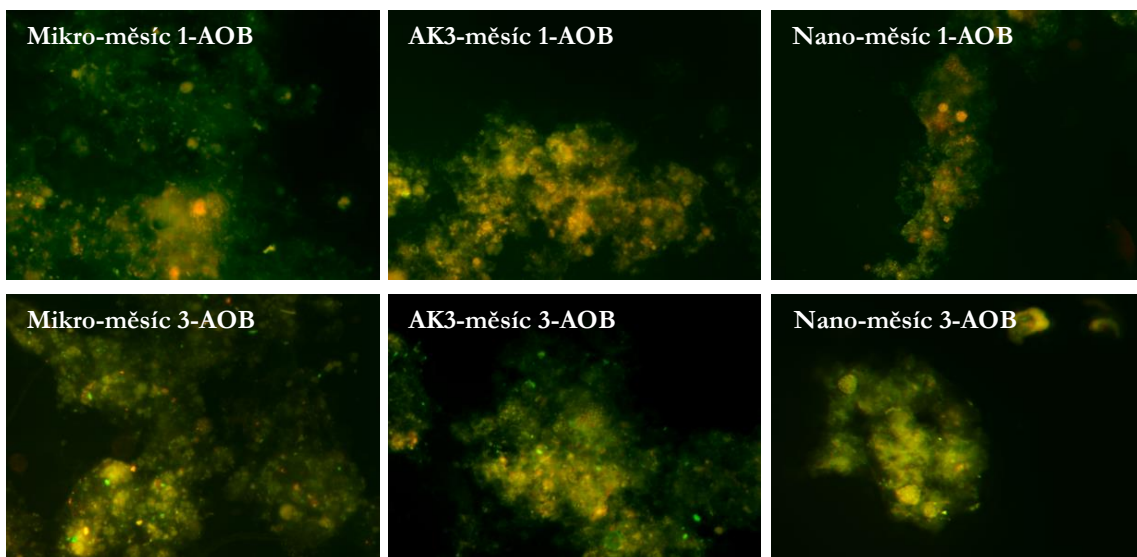
V celkovém zastoupení byly v prvním odběru poměrně dominantní bakterie rodu *Zoogloea*. Tyto bakterie mohou způsobit ojedinělé zoogléální bobtnání kalu (při vyšších koncentracích) a napomáhat enzymatickému rozkladu složitějších látek, které se v reaktoru objevují v prvních týdnech (An et al. 2016). *Zoogloea* může vylučovat extracelulární polymerní látky a hlavními složkami jejího povrchu jsou bakteriální lipopolysacharidy. Díky tomu může snadno vytvářet velký shluk buněk a přichycovat se k povrchu nosičů biomasy (Guo et al. 2019). Na základě množství bakterie *Zoogloea* ve vzorcích můžeme usuzovat na přítomnosti suspendovaného kalu na nosičích a jeho postupnou eliminaci přirozeným biofilmem, kde *Zoogloea* již nemá důvod se vyskytovat (v nitrifikačním reaktoru nemá substrát) (Wang et al. 2019; Guo et al. 2019). Jak ukazují data NGS analýzy, nejvyšší zastoupení této bakterie je v případě prvního odběru vzorků na mikrovlákných nosičích a nejméně na nosičích AnoxKaldnes K3 (obdobu nanovlákných nosičů). To plně odpovídá předpokladům týkajících se vývoje skutečného biofilmu. Po třech měsících od spuštění reaktoru byla přítomnost *Zoogloea* oproti původnímu stavu minimální, včetně její přítomnosti v samotném reaktorovém médiu, což dokazuje funkčnost nosičů i systému MBBR jako celku.



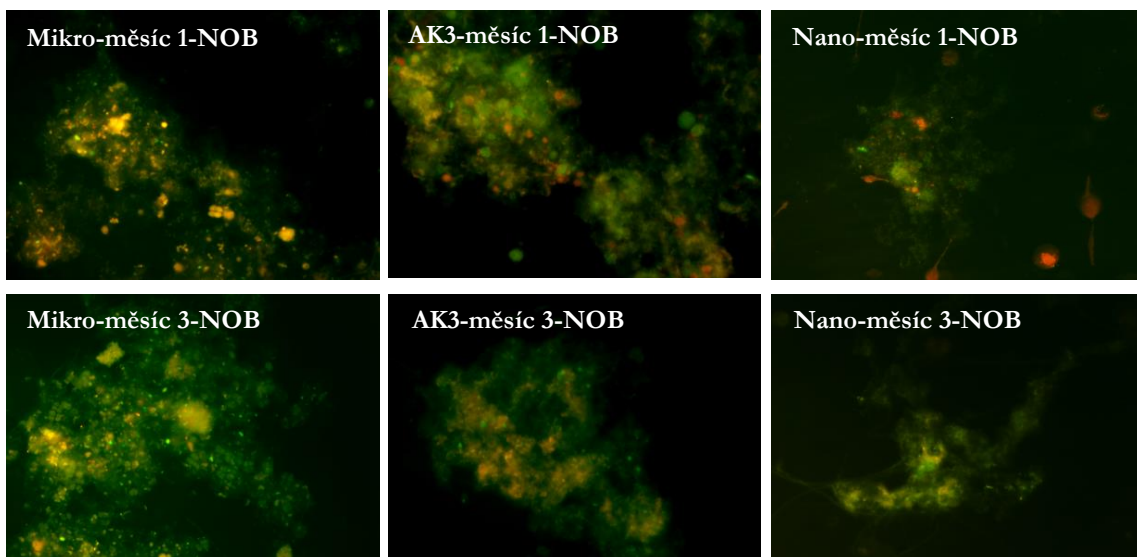
**Obr. 45** Výsledky NGS analýzy – složení bakteriálního konsorcia v biofilmu na testovaných nosičích a v médiu reaktoru (suspenze)

### Metoda FISH

FISH snímky AOB a NOB se používají k potvrzení přítomnosti bakterií ve vzorcích biofilmu odebraných z nosičů. Ze snímků na obrázcích 46 a 47 lze s jistotou potvrdit přítomnost AOB i NOB (oranžové objekty) ve vzorcích, kde byly detekovány nitrifikační bakterie metodami qPCR a NGS. Lze zhodnotit, že přítomnost sledovaných AOB a NOB je nesporná a může odpovídat jejich procentuálnímu zastoupení v bakteriálním konsorciu biofilmu.



**Obr. 46** Snímky z FISH – zobrazení AOB pro individuální vzorky v jednotlivých odběrech



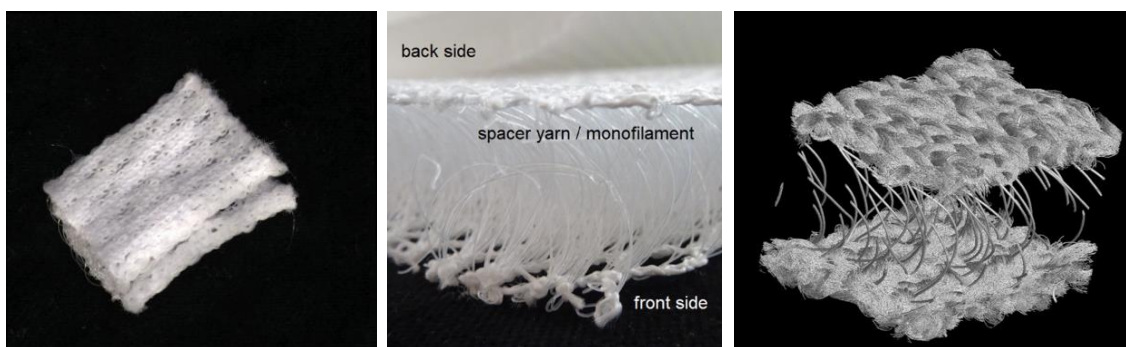
**Obr. 47** Snímky z FISH – zobrazení NOB pro individuální vzorky v jednotlivých odběrech

Izolace biofilmu z nanovlákných nosičů byla velmi komplikovaná, protože, jak již bylo zmíněno dříve, biofilm se pevně přichytí k nosičům a nelze jej běžnými metodami oddělit. V metodách qPCR a NGS lze biofilm analyzovat společně s nosičem, tj. není nutné separovat biomasu od nosiče pro izolaci DNA. Naproti tomu pro analýzu FISH lze použít pouze separovaný biofilm, protože nanovlákný materiál při skenování fluorescenčním mikroskopem emituje záření, čímž interferuje s obrazovou analýzou přítomnosti fluorescenčních sond v biofilmu na povrchu nosiče. Z tohoto důvodu byla metoda FISH použita pouze jako ověřovací metoda; tj. snímky nebyly dále vyhodnocovány obrazovou analýzou.



## 5.4. Příprava a testování finálního 3D mikrovláknenného nosiče

Finální podoba mikrovláknenného nosiče biomasy byla převzata z předešlého testování, kdy nosič S (efektivní plocha 1500 mm<sup>2</sup>) vykazoval nejlepší výsledky. Tento nosič byl modifikován za účelem snadnější (efektivnější výroby) bez současné změny struktury či vlastností. Jakožto finální produkt vývoje byl tento nosič testován v poloprovozu (pilotní test). Poloprovozní testování bylo provedeno celkem dvakrát za obdobných podmínek s tím, že první test byl proveden v menším objemu MBBR kolony. Shrnutí parametrů a vlastností nosiče S je uvedeno v následujících větách. Nosič S (Obrázek 48) je charakteristický sendvičovou strukturou, kdy vrchní a spodní vrstva je z polypropylenu (POP; 3x110 dtex; skaný; zákrut 100 m<sup>-1</sup>) a distance (prostřední vrstva) je tvořena polyesterem (PES; 0,1 mm monofil; distance 6 mm). Otvory v nosiči mají velikost 3,5 x 3,5 mm. Celková hustota nosiče S je mírně nižší než hustota vody, tedy plove na hladině. Mechanická stabilita je ve vodném prostředí velmi dobrá, nedochází k rozvolňování struktury ani po delší době (několik měsíců) zanoření v namáhaném aerovaném prostředí biologického reaktoru. Růst biofilmu je umožněn v rámci celého nosiče s tím, že v „hustší“ struktuře spodní a vrchní vrstvy se biofilm tvoří rychleji. Distance umožňuje proudění média skrz nosič, také poskytuje prostor pro tvorbu kvalitního biofilmu a jejím zahuštěním můžeme měnit celkovou hustotu nosiče.



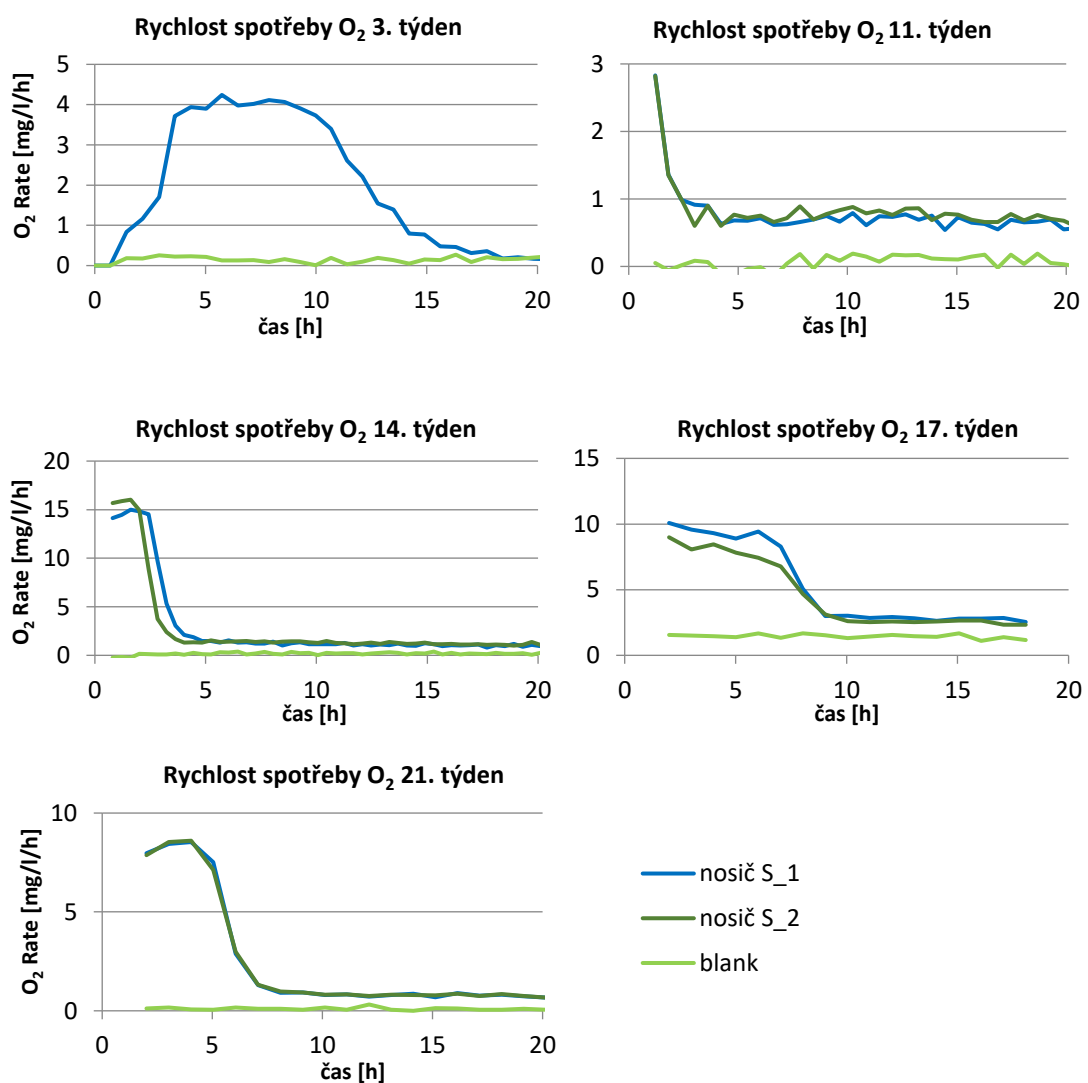
**Obr. 48** Fotografie zobrazující strukturu finální podoby mikrovláknenného nosiče

### 5.4.1. Vyhodnocení zátěžového pilotního testu v menším objemu

Během pilotního experimentu s nosiči S byla testována a sledována řada parametrů, které mají vliv na proces nitrifikace. Dlouhodobý test v reálném prostředí poskytl řadu informací ohledně aplikace nosičů biomasy pro post-treatment procesy.

Respirometrické testy byly provedeny obdobně jako v předchozích experimentech a pro měření byly použity taktéž 2 ks nosičů (15 000 mm<sup>2</sup>/l). Na základě respirometrických dat (Obrázek 49) lze usoudit, že biofilm na nosičích se stabilizoval již

po 3 týdnech od zanoření do pilotního reaktoru. To bylo zároveň potvrzeno analýzou chemismu reaktoru, který ukazoval na téměř 98% odstraňování amoniakální dusíku ze systému. Jako relevantní výsledky z respirometrie lze považovat takové, které jsou změřeny až právě po ustálení biofilmu neboli až pravý biofilm převládá nad pouze usazenou biomasou, která měření výrazně ovlivňuje. Rychlost odstraňování  $\text{NH}_4\text{-N}$  se s postupem experimentu zvyšovala, avšak docházelo i k výkyvům, které korelují s markantní změnou teplotních podmínek (viz diskuze níže), se změnou doby zdržení a vyšším zatížením. Koncentrace amonných iontů v médiu po ukončení respirometrie byla vždy menší než 0,01 mg/l.



**Obr. 49** Grafy zobrazující data z respirometrických měření aktivit biofilmu na nosičích biomasy pro dané týdny (pilotní testování)

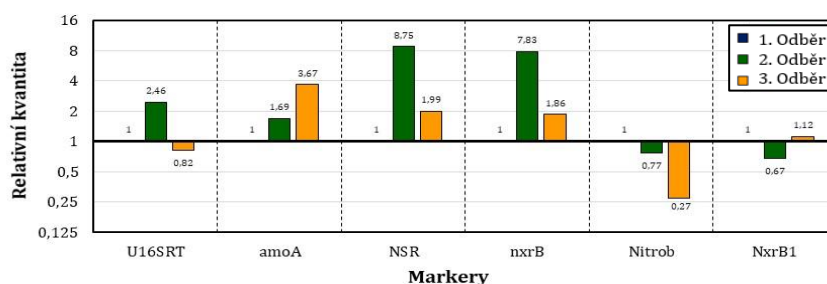
V rámci pilotního experimentu byla testována účinnost nitrifikace za velmi nízkých teplot, resp. schopnost nitrifikačních bakterií v biofilmu metabolizovat i za podmínek, které jsou pod standardním limitem. Do reaktoru bylo jednorázově nadávkováno 10 mg/l NH<sub>4</sub>-N a byla sledována rychlost jeho degradace. Výsledky testů (Tabulka 15), které byly získány stanovením kinetiky procesu v rozmezí teplot 11-13 °C ukazují, že nitrifikační bakterie v biofilmu jsou mnohem více odolnější vůči nízkým teplotám než bakterie v běžném aktivovaném kalu. Teplota pod 13 °C způsobuje v běžném procesu nitrifikace (na ČOV) výrazné snížení účinnosti až plnou inhibici procesu, zatímco bakterie v biofilmu jsou schopné i za těchto teplot eliminovat odpadní dusík s pouze mírnou inhibicí (Gnida et al. 2016). Pomalejší pokles amoniakálního dusíku (pokud odhlédneme od vlivu teploty) může být zapříčiněn substrátovou inhibicí, kterou způsobí jednorázový přírůstek NH<sub>4</sub>-N do bioreaktoru.

**Tab. 15** Výsledky kinetického testu – sledování účinnosti nitrifikace za nízkých teplot

Čas	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	O <sub>2</sub> [mg/l]	Teplota [°C]
0	8,90	-	10,5	11,2
60 min	8,45	-	10,5	11,2
120 min	8,40	-	10,5	11,2
180 min	8,05	0,28	10,5	11,3
12 h	1,33	1,10	10,2	12,8
24 h	<0,01	0,02	9,9	13,8

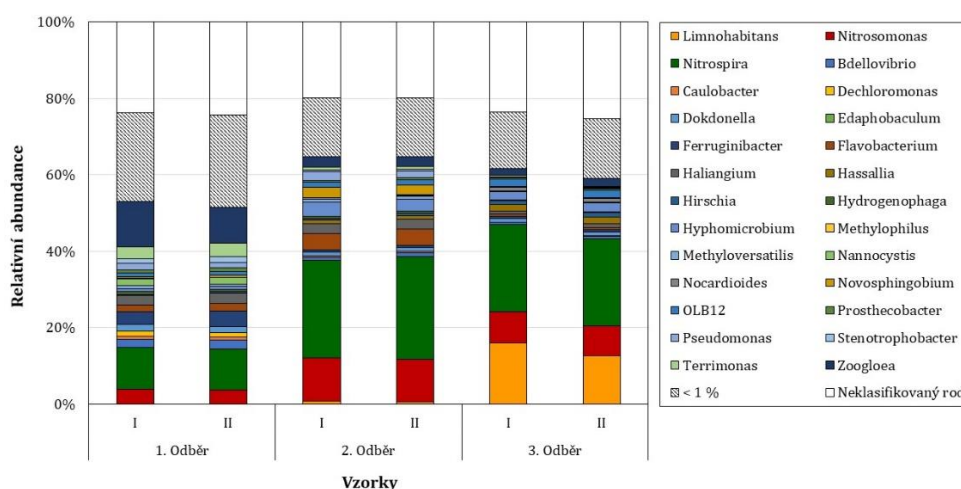
Již po 18 dnech provozu pilotního reaktoru na ČOV byly na nosičích detekovány markery specifické pro nitrifikaci, AOB (*amoA*) a NOB (NSR, *nxB*, Nitrob, *nxB1*). U všech vzorků byly detekovány všechny testované markery specifické pro nitrifikaci kromě markeru funkčního genu archeální *amoA*, který byl detekován pouze na nosičích z 3. odběru, a to jen na mezi detekce. Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy na nosičích v průběhu experimentu bylo vyjádřeno pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 50), jenž popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčnímu vzorku, kterým jsou v tomto případě nosiče biomasy z 1. odběru. Po 51 dnech mezi 1. a 2. odběrem se na nosičích z pilotního experimentu mírně zvýšilo množství celkové bakteriální biomasy společně s AOB *Nitrosomonas* (*amoA*) a NOB *Nitrospira* (NSR, *nxB*). V období mezi 2. a 3. odběrem se na nosičích znovu zvýšila abundance AOB *Nitrosomonas*, zatímco množství celkové bakteriální biomasy a NOB

*Nitrospira* se snížilo. Množství NOB *Nitrobacter* (Nitrob, *NxrB1*) se v průběhu experimentu výrazně nezměnilo.



**Obr. 50** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na mikrovlákných nosičích *S* v průběhu pilotního experimentu vůči nosičům z 1. odběru

V průběhu provozu pilotního MBBR systému byl na základě výsledků NGS analýzy pozorován výrazný nárůst podílu nitrifikačních bakterií, konkrétně AOB *Nitrosomonas* a NOB *Nitrospira*, na nosičích zejména mezi 1. a 2. odběrem (Obrázek 51). Zastoupení zmíněných nitrifikačních bakterií se po 2. odběru mírně snížilo. Ve 3. odběru byl na nosičích pozorován vysoký podíl bakteriálního rodu *Limnohabitans*, který je schopen prvního kroku nitrifikace, oxidace amoniaku. Dále byl ve vzorcích nosičů z 3. odběru zaznamenán při velmi nízké abundanci archeální rod *Candidatus Nitrosotenuis*, amoniak-oxidující archea (AOA), který nebyl detekován v ostatních vzorcích, což koresponduje s výsledky qPCR analýzy archeálního funkčního genu amoniak monooxygenázy (arch *amoA*). Kromě nitrifikačních bakterií byly na nosičích biomasy abundantní bakteriální rody *Dokdonella*, *Flavobacterium*, *Haliangium*, *Sphaerotilus* a *Zoogloea*.



**Obr. 51** Zastoupení mikroorganismů ve vzorcích biomasy z mikrovlákných nosičů *S* v pilotním testu – znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí >1 %

Chemická analýza, která probíhala průběžně (každý den) ukazuje na vysokou účinnost eliminace dávkovaného amoniakálního dusíku. Hodnoty jsou zaznamenány v tabulce a uvedeny v Příloze 1. K výkyvům (nižší účinnost) docházelo především při změně zatížení a teploty. Doba zdržení byla posupně snižována až na 1,2 h, což je velmi pozitivní pro účinnost post-treatment procesů.

#### **5.4.2. Modifikace nosiče S**

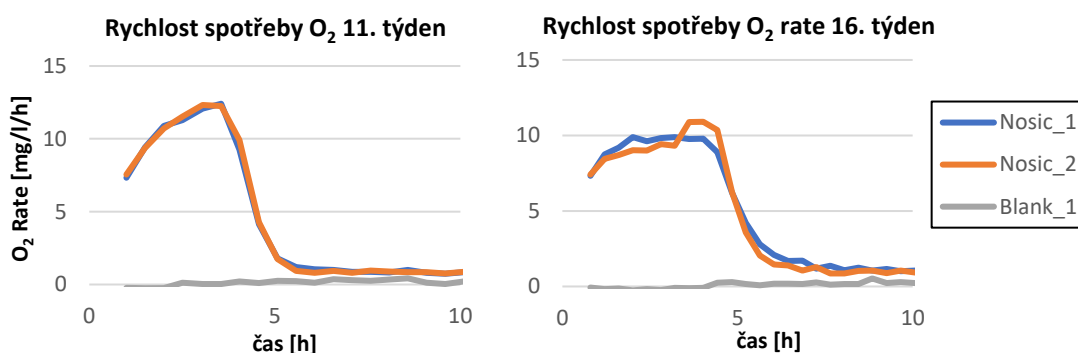
V rámci zefektivnění výroby nosiče a tím i snížení jeho výsledné ceny byl proces pletení modifikován tak, aby výsledná struktura byla naprosto totožná s původní a zároveň se pletařský proces podstatně zjednodušil. Z hlediska mechanických vlastností se nosič S připravený modifikovanou metodou nezměnil, struktura byla shodná s původní a pro ověření byl proveden laboratorní test, kde bylo sledováno osidlování nosiče bakteriemi a tvorba biofilmu. Výsledky tohoto testu zde nejsou uvedeny (z důvodu získání téměř totožných výsledků s předchozím testem, což bylo cílem), avšak veškerá data jsou dostupná u autora této práce. Test byl proveden za stejných podmínek, které byly u testů s původními nosiči S. Výsledky testů byly porovnány a bylo vydáno stanovisko, že změna pletařské technologie neměla žádný vliv na finální strukturu nosiče, a tedy ani na její osidlování biofilmem se specifickými bakteriemi. Takto vyrobená struktura definovaná pletařskou technologií je považována za finálně vyvinutý mikrovlákněný nosič, který byl následně testován ve velkoobjemové poloprovozní koloně na ČOV Amazon (popsáno níže).

#### **5.4.3. Vyhodnocení pilotního testu ve větším objemu**

Bylo připraveno cca 4500 ks finálních mikrovlákněných nosičů, které byly promyty ve vodě a připraveny pro poloprovozní test. Na ČOV Amazon byly ověřeny parametry biologického systému a byla připravena kolona o objemu 250 l pro dlouhodobé testování nosičů. Test byl spuštěn dne 19.10.2021 a je stále provozován.

Do současné doby probíhá měření chemismu reaktoru v pravidelných časových intervalech, kdy výsledky jsou uvedeny v tabulce v Příloze 2. Z dat lze odhadnout, že ke stabilizaci biofilmu na nosičích došlo přibližně týden po začátku dávkování  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Většinou se koncentrace  $\text{NH}_4\text{-N}$  na odtoku pohybuje pod 0,5 mg/l, výjimečné zvýšení koncentrace na 1 mg/l je způsobeno poruchou dávkování nebo krátkodobou změnou složení odpadní vody na ČOV Amazon. Kyslík je konstantním provzdušňováním udržován nad hodnotou 8 mg/l. Byly vyzkoušeny i nižší koncentrace kyslíku, které

neměly vliv na proces nitrifikace. Lze tedy použít slabší aeraci reaktoru, což může snížit náklady na provoz. Jelikož byla hodnota koncentrace  $\text{NH}_4\text{-N}$  na stabilní nízké úrovni po dlouhou dobu, byla postupně snižována doba zdržení až na 1 hodinu. Respirometrické hodnocení zde sloužilo pouze pro ověření aktivity biofilmu na nosičích a bylo provedeno celkem dvakrát (Obrázek 52). Výsledky jsou srovnatelné s prvním poloprovozním testem s tím, že zde je rychlost odstraňování amoniakálního dusíku ve stejném týdnu ještě vyšší. Aktivita biofilmu je tedy značná a koreluje s výsledky chemismu reaktoru, kde se ukázalo, že biofilmový systém s bakteriemi je schopný nitrifikovat s vysokou účinností. Podstatný je fakt, že lze tímto systémem odstranit z odpadní vody amoniakální dusík téměř na nulové koncentrace při nízké době zdržení (viz Příloha 2).

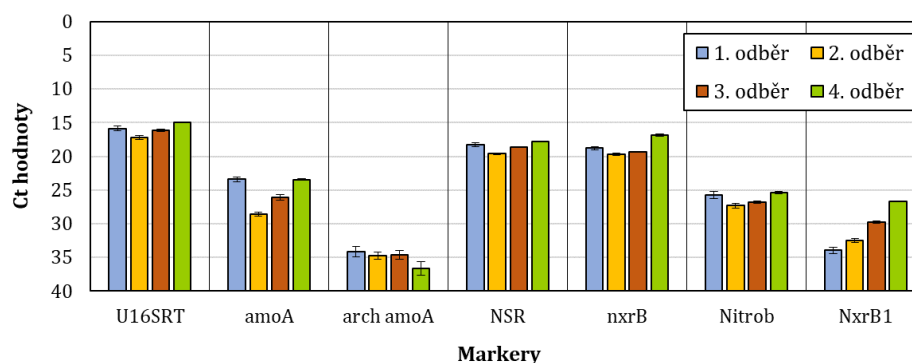


**Obr. 52** Grafy zobrazující data z respirometrických měření aktivit biofilmu na nosičích biomasy pro 11. a 16. týden provozu velkoobjemového pilotního experimentu

Na výsledcích molekulární genetiky (qPCR a NGS) můžeme vidět vývoj specifických nitrifikačních bakterií, které zvyšují své procentuální zastoupení v celém bakteriálním konsorciu v průběhu experimentu. Tento fakt jasně naznačuje, že vyvinuté mikrovláknenné nosiče podporují růst těchto bakterií a tím zvyšují účinnost post-nitrifikace.

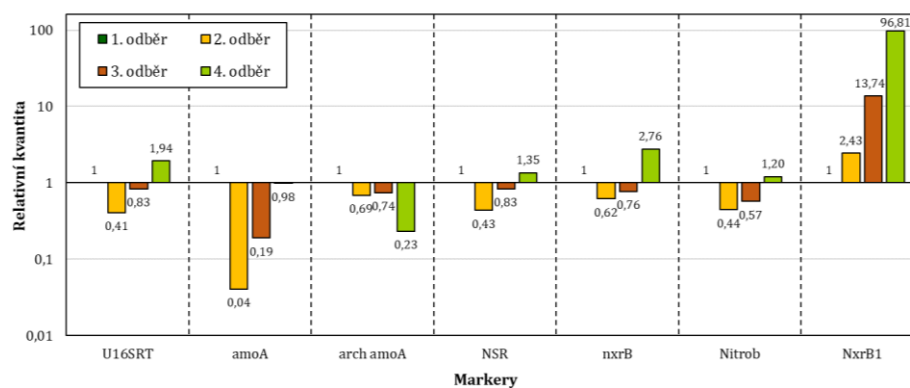
Výsledky qPCR analýzy (tzv. Ct hodnoty) jsou interpretovány ve formě grafu průměrných Ct hodnot (Obrázek 53) a relativní kvantifikace (Obrázek 54). V následujícím textu je pod pojmem „Ct hodnota“ míněn průměr z duplikátu Ct hodnot, v případě duplikátu vzorků je míněn průměr ze 4 naměřených Ct hodnot. Interpretace výsledků qPCR analýz je založena na nepřímé úměře, tudíž čím nižší je Ct hodnota, tím větší je množství cílové DNA ve vzorku a naopak. Konkrétně tedy v případě qPCR analýzy pomocí markeru U16SRT, čím nižší byla Ct hodnota, tím větší bylo celkové bakteriální oživení (množství bakteriální biomasy) ve vzorku. Maximální možná Ct hodnota je 40 a odpovídá nulové detekci.

Ve všech vzorcích sendvičových mikrovlákných nosičů typu S bylo celkové bakteriální oživení na vysoké úrovni (viz Obrázek 53). Již po 55 dnech provozu reaktoru na ČOV Amazon byly na nosičích detekovány všechny markery specifické pro nitrifikaci, AOB (*amoA*) a NOB (NSR, *nxrB*, Nitrob, *nxrB1*). Na mezi detekce byl na nosičích dále zaznamenán marker funkčního genu archeální *amoA* (*arch amoA*).



**Obr. 53** Průměrné Ct hodnoty testovaných biologických markerů u vzorků mikrovlákných nosičů během provozu systému pilotního velkoobjemového MBBR

Porovnání množství celkové a testované specifické bakteriální biomasy na nosičích biomasy v průběhu experimentu bylo vyjádřeno pomocí relativní kvantifikace (Obrázek 54), jenž popisuje relativní změnu množství daného markeru vůči referenčnímu vzorku, kterým jsou v tomto případě nosiče biomasy z 1. odběru. Po 40 dnech mezi 1. a 2. odběrem se na nosičích z pilotního experimentu výrazně snížila abundance AOB *Nitrosomonas* (*amoA*), ale mezi 2.–4. odběrem se abundance AOB *Nitrosomonas* postupně zvýšila znovu na úroveň, která byla zaznamenána v 1. odběru. Množství celkové bakteriální biomasy společně s NOB *Nitrospira* (NSR, *nxrB*) a NOB *Nitrobacter* (NSR) se na nosičích mírně snížilo po 1. odběru, ale v 3. a 4. odběru bylo znovu téměř na stejné úrovni jako v 1. odběru či v případě markeru *nxrB* i mírně vyšší. Abundance markeru *arch amoA* byla v průběhu experimentu na stejné úrovni jako v 1. odběru, až v posledním odběru se mírně snížila. Množství markeru *NxrB1* se v průběhu pilotního experimentu výrazně zvýšilo, což nekoresponduje s druhým markerem specifickým pro NOB *Nitrobacter*, NSR. Tento trend byl pravděpodobně způsoben přítomností funkčního genu nitrit oxidoreduktázy specifického pro NOB *Nitrobacter* v odlišném bakteriálním rodu v biofilmu na nosičích.

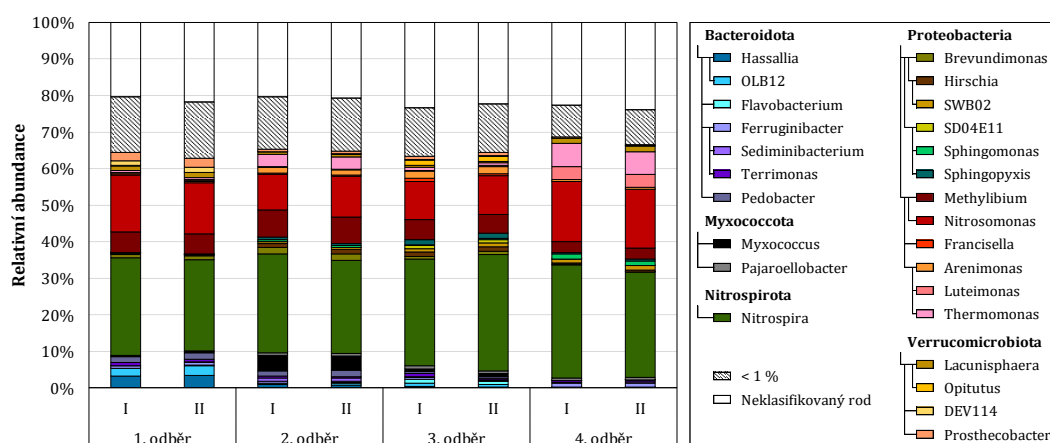


**Obr. 54** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy na mikrovláknenných nosičích v průběhu experimentu vůči nosičům z 1. odběru

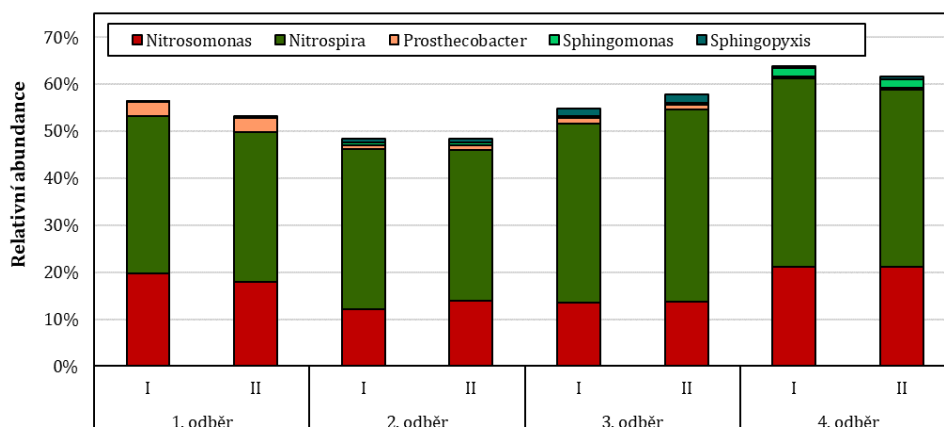
Výsledky NGS analýzy jsou zobrazeny pomocí OTU grafů (Obrázek 55-56). Po 55 dnech provozu systému MBBR byl na nosičích pozorován velmi vysoký podíl nitrifikačních bakterií (přibližně 50 % ze všech klasifikovaných bakteriálních rodů), konkrétně AOB *Nitrosomonas* (1. odběr | I: 19,76 %; 1. odběr | II: 17,93 %) a NOB *Nitrospira* (1. odběr | I: 33,55 %; 1. odběr | II: 31,83 %) – viz Obrázek 56. V menším podílu byl ve vzorcích detekován AOB *Prostheco bacter* (1. odběr | I: 2,98 %; 1. odběr | II: 3,13 %), u jehož zástupců byla včetně schopnosti nitrítace pozorována i denitrifikace (Gu et al. 2020). Dále byl ve vzorcích nosičů zaznamenán při velmi nízké abundanci archeální rod *Candidatus Nitrosotenuis*, amoniak-oxidující archea (AOA), což koresponduje s detekcí archeálního funkčního genu amoniak monooxygenázy (*arch amoA*) v biofilmu na nosičích pomocí qPCR analýzy (Sauder et al. 2018). V průběhu pilotního experimentu se postupně mírně zvýšil podíl NOB *Nitrospira* na ~40 % (4. odběr | I: 40,13 %; 4. odběr | II: 37,82 %). V případě AOB *Nitrosomonas* byl v 2. a 3. odběru zaznamenán pokles abundance na ~13 %, ale v posledním odběru byl již podíl AOB *Nitrosomonas* na stejné úrovni jako v 1. odběru (4. odběr | I: 21,19 %; 4. odběr | II: 21,07 %), což koresponduje s detekcí funkčního genu amoniak monooxygenázy (*amoA*) v biofilmu na nosičích pomocí qPCR analýzy (Obrázek 54). Po 134 dnech provozu systému MBBR byl na nosičích identifikován navíc nitrifikační a zároveň denitrifikační bakteriální rod *Sphingopyxis* (3. odběr | I: 1,66 %; 3. odběr | II: 1,76 %), u něhož byl detekovány markery pro nitrítaci a redukci dusitanů na N<sub>2</sub> (Chen et al. 2022). V posledním odběru po 190 dnech provozu systému MBBR byl na nosičích detekován kromě výše zmíněných nitrifikačních bakterií také AOB *Sphingomonas* (4. odběr | I: 1,79 %; 4. odběr | II: 1,70 %).



Kromě nitrifikačních bakterií (Obrázek 55) byly na nosičích biomasy abundantní bakteriální rody *Flavobacterium*, *Terrimonas*, *Myxococcus*, *Brevundimonas*, *SWB02*, *Methylibium*, *Arenimonas*, *Luteimonas*, *Thermomonas*, *Opitutus* a *Prosthecoacter*, u jejichž zástupců byla prokázána schopnost denitrifikace (Liu et al. 2020a; Gao et al. 2021; Yu et al. 2021; Sarvajith et al. 2020; Pishgar et al. 2019; Tanikawa et al. 2018; Ma et al. 2021; Wang et al. 2020b; Zhou et al. 2021; Xing et al. 2018; Cheng et al. 2022). Bakteriální rody *OLB12* a *Pedobacter* detekované v biofilmu na nosičích již byly identifikovány v nitrifikačních konsorciích, ale jejich úloha není zatím známa (Li et al. 2021; Vanparys et al. 2005). Poslední dominantní bakteriální rod, který byl mohl hrát roli v N cyklu odpadní vody, je *Lacunisphaera* – bakterie, u které byl objeven gen *nrfA* kódující cytochrom c nitrit reduktázu, což je klíčový enzym pro redukci dusitanů na amoniak, tzv. respirační amonifikaci (Pang et al. 2022).



**Obr. 55** Relativní zastoupení mikroorganismů v biofilmu ve vzorcích mikrovláknenných nosičů v průběhu pilotního velkoobjemového experimentu – znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí > 1 %



**Obr. 56** Relativní zastoupení nitrifikačních bakterií ve vzorcích biofilmu v mikrovláknenných nosičů v průběhu pilotního velkoobjemového experimentu

## 5.5. Příprava a testování finálního 3D nanovláčenného nosiče

Na základě předchozích návrhů nosičů, jejich testování a analýz výsledků byl navržen nosič biomasy v podobě core/shell systému (pracovní název „NBB nosič“), který se vyznačuje mnoha výhodami – vlastní prostředí nosiče (mikro-reaktor), ochrana nanovláčenných materiálů před vlivy namáhaných biologických systémů a nastavitelné parametry pro různé typy procesů (za/bez přístupu vzduchu). Nanovláčenné materiály pro adhezi mikroorganismů byly vybrány na základě předchozích zkušeností. Celkem byly testovány 2 různé prototypy NBB nosiče, kdy první prototyp s komerčně dostupným obalem nevyhovoval z důvodů malého vnitřního objemu a struktury obalu – tomuto prototypu nebude nadále věnována pozornost.

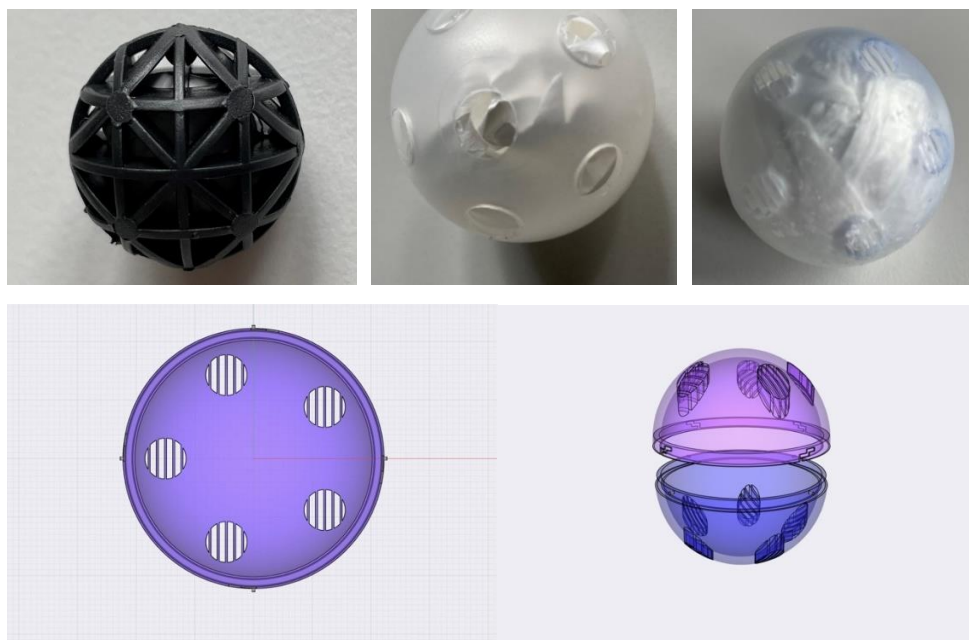
Jako druhý prototyp byl vyvinut a otestován nosič biomasy, kde obal (shell) tvoří polypropylenová (PP) koule s definovanými otvory a funkční složka (core) jsou nanovláčena PVB připravená metodou Nanospider<sup>TM</sup>. Nosič s pracovním názvem NBB byl navržen pro MBBR systém, primárně na čistírny odpadních vod (konkrétně post-treatment procesy).

Nanovláčenná složka je vhodná pro navázání bakterií a jejich další vývoj. Navíc, vnitřní prostředí nosiče funguje jako vlastní reaktor, kde mohou probíhat procesy za jiných podmínek než v celém objemu reaktoru. Míra adheze bakterií, vývoj a setrvání biofilmu je dáno materiálem a jeho strukturou, v našem případě PVB nanovláčny, které mají vhodný povrch, porozitu i poměr povrch/objem. Otvory PP obalu jsou navrženy tak, aby docházelo k dostatečnému proudění média dovnitř nosiče (tedy do prostoru s nanovláčennou složkou) a byly zde zachytávány a udržovány mikro-bublínky vzduchu.

### 5.5.1. Vývoj, návrh a testování NBB nosiče

Z předchozích výsledků byl jako vhodný polymer pro funkční náplň nosiče vybrán polyvinylbutyral (PVB, 20 g/m<sup>2</sup>). Polymer byl ve formě plošné vrstvy nastříhané na požadovanou velikost. Obal byl navrhován tak, aby zabezpečil následující: ochranu nanovláčenné vrstvy, snadný průtok média vnitřním prostorem nosiče s nanovláčennou vrstvou, záchyt mikro-bublín z provzdušňovaného systému, plování v kapalném médiu a zároveň snadné míchání nosičů pomocí aerace. Finální tvorba obalu proběhla pomocí 3D tisku na specializovaném pracovišti (University of Cambridge). Celý návrh nosiče (Obrázek 57) je zcela unikátní a podobný systém nebyl doposud nikde ve světě publikován. První test proběhl s menšími nosiči, jejichž obal byl komerčně dostupný,

druhý test potom s mnou navrženým obalem (komerčně dostupný nevyhovoval požadavkům, jak bylo zmíněno výše).



**Obr. 57** Fotografie navržených a vyrobených nosičů; (vlevo) menší a komerčně dostupný obal, (uprostřed) mnou navržený prototyp obalu, (vpravo) finální nosič vytvořený pomocí 3D tisku na University of Cambridge, (dole) 3D návrh finálního obalu nosiče

Nosič byl testován v laboratorní biologickém reaktoru o stejných parametrech, jaké byly typické pro předchozí experimenty. Do reaktoru s odpadní vodou a nosiči bylo kontinuálně přiváděno médium, které obsahovalo odstátou kohoutkovou vodu, amonné ionty ( $\text{NH}_4\text{-N}$  10 až 20 mg/l) a fosfátový pufr ( $\text{PO}_4^{3\text{-}}\text{-P}$  cca 5 až 20 mg/l). Plnění reaktoru nosiči bylo 20 %. Naměřená data v reaktoru jsou shrnuta v tabulkách 16-18.

### Měřená a sledovaná data

**Tab. 16** Složení uměle připravené odpadní vody pro reaktor s NBB nosiči

Den	$\text{NH}_4\text{-N}$ [mg/l]	$\text{PO}_4^{3\text{-}}\text{-P}$ [mg/l]	$\text{NaHCO}_3$ [mg/l]
7	12,1	9,3	40
14	15,2	11,9	40
21	9,8	16,4	40
28	11,4	10,7	40
35	11,6	8,1	40
42	8,4	3,6	40
49	13,5	9,9	40
56	14,2	13,5	40
63	13,0	8,3	50
70	18,0	17,0	80

**Tab. 17** Hodnoty analýz odtoku z reaktoru s NBB nosiči

Den	Nefiltrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	Filtrovaná CHSK <sub>Cr</sub> [mg/l]	NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	NO <sub>3</sub> -N [mg/l]	NH <sub>4</sub> -N [mg/l]
7	8,3	8,1	0,72	11,8	0,66
14	8,1	7,2	0,44	11,8	0,23
21	6,1	6,0	0,35	13,8	0,70
28	5,0	4,3	0,19	13,2	0,33
35	6,3	4,6	0,20	10,5	0,02
42	5,3	5,3	0,34	15,9	1,52
49	17,5	10,2	<0,01	13,4	0,24
56	4,7	4,3	0,38	15,3	0,43
63	5,1	4,9	0,27	13,5	0,20
70	5,2	4,8	0,47	21,0	0,35

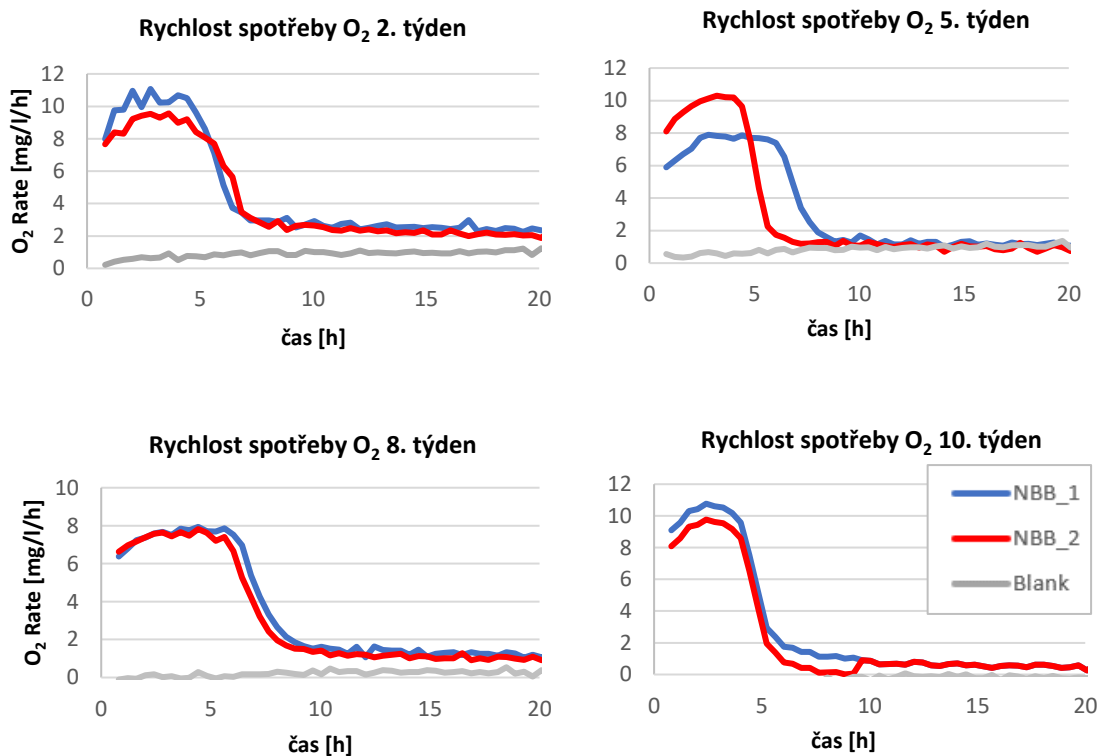
**Tab. 18** Parametry reaktoru pro jednotlivé týdny

Den	pH	Další
0	7,1→7,6*	HRT = 1
7	7,2→7,8*	HRT = 0,5
14	7,3→7,5*	HRT = 0,5; respirometrie 1
21	6,8→7,8*	HRT = 0,5
28	6,5→7,9*	HRT = 0,5
35	7,5	HRT = 0,5; respirometrie 2; MO1
42	6,4→7,6*	HRT = 0,5
49	6,7→8,1*	HRT = 0,5
56	6,6→7,2*	HRT = 0,5; respirometrie 3
63	6,6→7,9*	HRT = 0,5
70	6,8	HRT = 0,5; respirometrie 4; MO2

\* pH upraveno přidáním NaOH

### Výsledky respirometrie

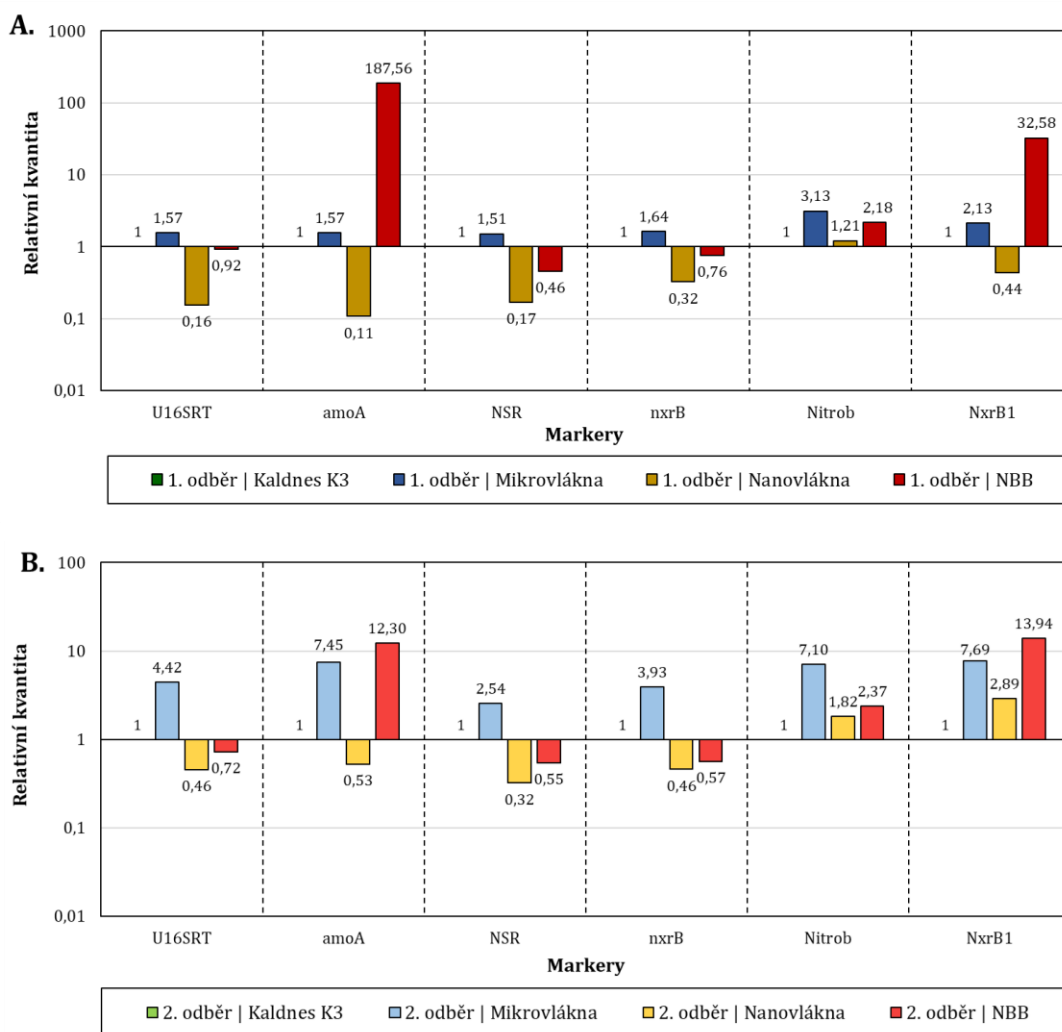
Pro respirometrický test byl použit jeden nosič, kdy nanovlákná vrstva uvnitř měla efektivní plochu 16 000 mm<sup>2</sup>/l. Výsledky respirometrických testů (Obrázek 58) potvrzují značnou účinnost NBB nosičů při odstraňování amoniakálního dusíku z odpadní vody. Byl pozorován rychlý nástup aktivity při eliminaci NH<sub>4</sub>-N a rychlá stabilizace biofilmu. Mírný pokles byl zaznamenán v 56 dni (nepatrná změna) a následně nastal opětovný nárůst aktivity na původní hodnoty. Již od prvního respirometrického měření se aktivita nitrifikačních bakterií v biofilmu udržovala na velmi vysoké úrovni bez výrazných výkyvů, což ukazuje na velmi rychlou tvorbu a stabilizaci pravého biofilmu. Rychlosti eliminace NH<sub>4</sub>-N byla oproti původně testovaným nosičům v laboratorním reaktoru podstatně vyšší. Tedy byla potvrzena vysoká účinnost NBB nosičů při srovnatelně stejných parametrech s jinými nosiči.



**Obr. 58** Grafy zobrazující aktivitu nitrifikačních bakterií v biofilmu na NBB nosičích v daných týdnech

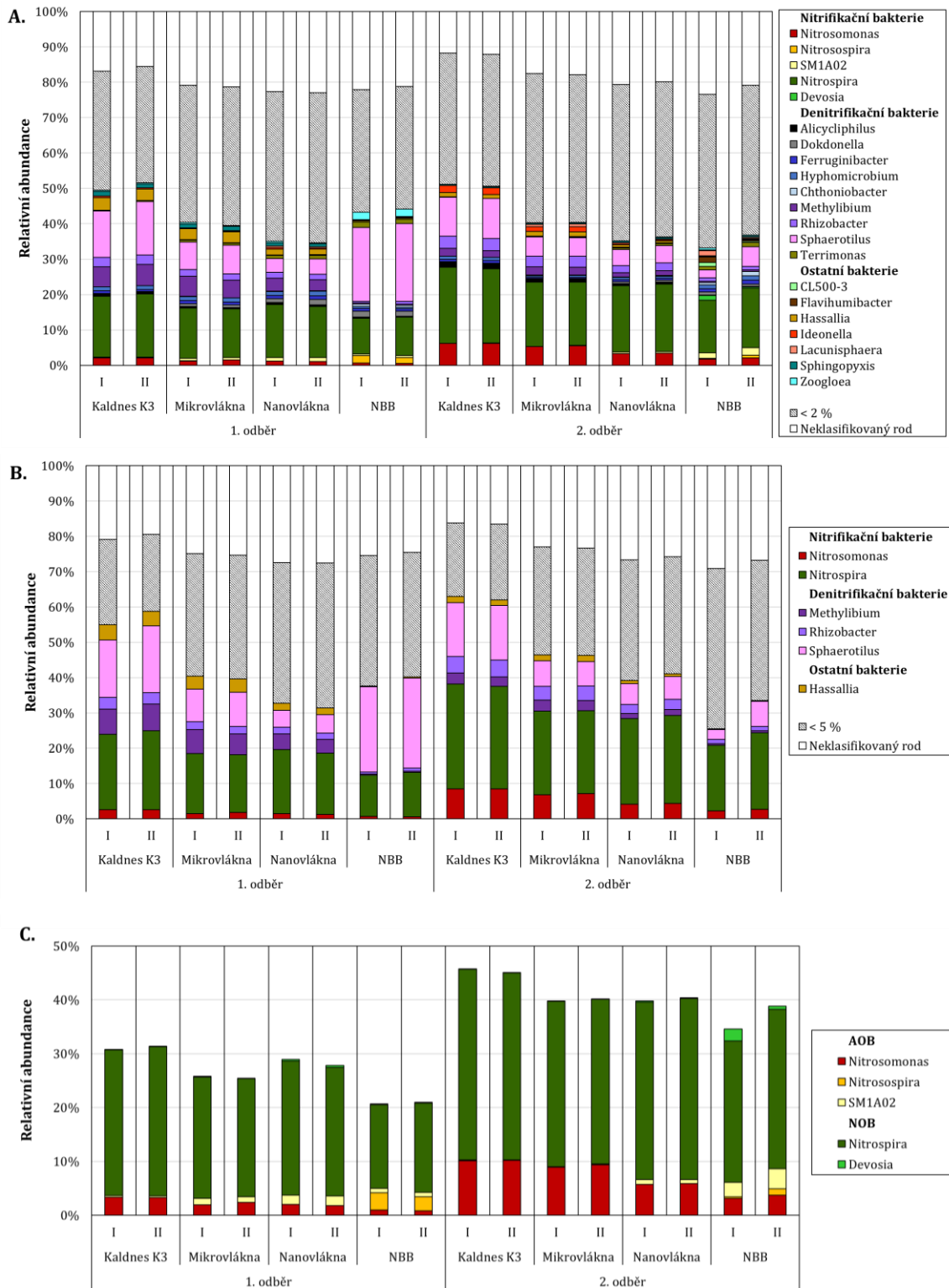
### Výsledky qPCR a NGS

Výsledky molekulárně genetických testů vycházejí pro NBB nosiče (2., tedy finální prototyp nosiče) velmi pozitivně. Pro srovnání druhého prototypu NBB nosiče s prvně testovanými nosiči (tedy komerčně dostupnými AnoxKaldnes K3, mikrovláknými a prvním prototypem NBB – budeme ve výsledcích nazývat jako nanovlákná) jsou v následujících grafech zobrazeny hodnoty pro všechny tyto nosiče. Z grafu relativní kvantifikace (Obrázek 59), u níž byly nosiče AnoxKaldnes K3 referenčními vzorky, vidíme značný nárůst specifických markerů právě pro NBB nosiče. Nižší hodnota celkové biomasy není v tomto případě negativním výsledkem, jelikož nám ukazuje, že na NBB nosičích rostou spíše vybrané mikroorganismy.



**Obr. 59** Relativní kvantifikace celkové a specifické bakteriální biomasy mezi jednotlivými typy nosičů v 1. odběru (A) a 2. odběru (B)

Analýza NGS (Obrázek 60) především ukazuje, že pouze na NBB nosičích je zastoupení AOB a NOB organismů rozmanitější, tedy rostou zde i velmi specifické nitrifikační bakterie. Dále vidíme, že u NBB nosičů došlo mezi 1. a 2. odběrem k nejvyššímu nárůstu nitrifikačních bakterií, což je zásadní z hlediska určení účinnosti těchto nosičů pro nitrifikační proces. Obecně je zastoupení AOB a NOB na všech nosičích podobné, což je běžný výsledek, který dokazuje schopnost AOB i NOB osidlovat různé povrchy s přibližně stejným zastoupením – to však nic nevyovídá o rychlosti růstu a jejich absolutním množství na nosičích.



**Obr. 60** Relativní zastoupení mikroorganismů ve vzorcích biofilmu z testovaných nosičů – znázorněny mikroorganismy na úrovni rodu s abundancí  $> 2\%$  (A.);  $> 5\%$  (B.); a nitrifikační bakterie (C.)

## Zhodnocení

Výsledky respirometrie i molekulárně genetických metod jasně potvrzují, že finální prototyp NBB nosičů je vhodný pro osidlování čistírenskými (konkrétně nitrifikačními) bakterie. Aktivita biofilmu je na vysoké úrovni, eliminace amoniakálního dusíku se pohybovala okolo 98 % a metoda qPCR potvrdila hojnost nitrifikačních bakterií ve vzorcích biofilmu. V porovnání s ostatními nanovláknými nosiči, které byly testovány za stejných podmínek, vykazují nosiče NBB nejlepší výsledky jak z pohledu stability, tak z pohledu adheze bakterií na povrch. NGS metoda navíc potvrdila přítomnost i velmi specifických nitrifikačních bakterií. Nosič NBB jako celek je velmi pokročilý a díky jeho komplexní struktuře bude vhodný pro aplikace i do dalších biotechnologických procesů.

Pilotní test je připraven – čeká se na ukončení pilotního testování mikrovlákných nosičů. Avšak na základě získaných laboratorních výsledků a předpokladům vztahujícím se k souvislosti mezi mikro a nanovláknými nosiči lze tvrdit, že využití NBB v praxi bude mít značný přínos pro post-treatment systémy, které by měly zajistit eliminaci dusíkatých a případně dalších polutantů na minimální (nulové) koncentrace.



## 6. SUMARIZACE

Vývoj mikrovlákných struktur pro vytvoření 3D nosiče biomasy, který probíhal ve spolupráci s Katedrou technologií a struktur (FT TUL), poskytl jednak finální produkt nosiče biomasy připraveného pro reálné aplikace a jednak znalostní bázi pro vývoj a testování pokročilých nanovlákných nosičů biomasy s potenciálem komerčního využití. Jak ukázaly prvotní testy, zásadní parametry v případě mikrovlákných nosičů ovlivňující adhezi mikroorganismů, následnou tvorbu biofilmu a jeho stabilitu jsou velikost vnitřního prostoru, struktura nosiče (hustota), porozita povrchu a jeho schopnost proudit v dynamickém systému. Na základě těchto požadavků byl vytvořen 3D mikrovlákný nosič biomasy sendvičové struktury, který poskytuje cílovým mikroorganismům vhodné prostředí pro jejich růst.

Bylo zjištěno, že velmi důležitým procesem je způsob inokulace biologického systému s nosiči, a s tím souvisí množství kalu, který se v prvních dnech zachytí na nosičích, což je velmi ovlivněno právě strukturou samotného nosiče. Čím větší koncentrace kalu použitá při inokulaci (rozsah 50-500 mg/l), tím více dochází k jeho uvolňování z nosiče do média a výsledný záchyt suspenzní biomasy je obdobný. Z hlediska parametrů nosičů docházelo k největšímu následnému uvolňování kalu právě u nosiče S (nejmenší povrchové otvory), tedy nosič S zachytával nejvíce kalu, který se z něj následně dobře vyplavoval. U nosiče S pro všechny koncentrace kalu docházelo k jeho značnému záchytu při inokulaci. Menší velikost pórů nosiče tedy pravděpodobně způsobuje větší nahromadění kalu a jeho určité setrvání (během inokulace) ve struktuře nosiče. Celkově z naměřených dat vyplynulo, že pro inokulaci systému plně dostačuje nejnižší koncentrace kalu (50 mg/l), která zajistí dostatečný průnik mikroorganismů do celého systému nosiče. Podstatné je, že nosiče by měly mít takovou strukturu, která umožní jednat kvalitní průtok odpadní vody skrze ně (kontakt bakterií s polutanty), ale také umožní snadné vyplavování kalu či odumřelých částí biofilmu, které by při setrvání ve struktuře nosiče v nepřístupných makropórech zahnívaly a znehodnocovaly výkon nosiče.

Pilotní testování finálních nosičů S v post-nitrifikačním procesu ukázalo, že růst pravého biofilmu s hojným počtem nitrifikačních bakterií je podpořen právě specifickou strukturou nosičů. Pilotní testy prokázaly značnou účinnost odstraňování amoniakálního dusíku z odpadních vod, a to i při velmi nízkých teplotách. Stabilita biofilmu a samotných nosičů byla velmi dobrá i v namáhaných prostředích aerovaného reaktoru a je tedy

potvrzena dlouhodobější stabilita vyvinutých nosičů. Zásadní výhodou nosiče je jeho rychlé osidlování bakteriemi a následná tvorba kvalitního (pravého) biofilmu.

Klíčovými prvky pro výběr vhodného materiálu k přípravě nanovláknenných nosičů biomasy je několik. Průměr vláken rozhoduje o specifickém povrchu a mechanických vlastnostech vrstev, což jsou důležité parametry jak pro primární adhezi bakterií, tak pro životnost samotného nosiče. Charakteristiky povrchu jsou zásadní pro bakteriální adhezi, prostupnost bakterií a jejich extracelulární matrix těsně pod povrch (zabudování biofilmu do povrchu). S tímto souvisí i porozita nanovláknenného nosiče, která musí umožnit bakteriím vstup do vnitřní struktury nosiče, ale pouze do určité hloubky. V případě příliš velkých pórů dochází směrem dovnitř k zahušťování biofilmu a ve vzdálenějších vrstvách již nedochází ke kontaktu s polutanty ve vodě a v případě oxických systémů k dostatečné saturaci kyslíkem, což vede k úbytku aktivní bakteriální populace. V této fázi může docházet ke zvyšování hmotnosti nosiče inertem, což je nežádoucí. Na základě vyjmenovaných parametrů a s ohledem na ekonomickou náročnost byl jako ideální nosič vybrán materiál z PVB nanovláken připravený technologií Nanospider. Průměr nanovláken (cca 400 nm) v tomto případě zajišťuje dobrou mechanickou stabilitu vrstvy a zároveň vlákna tvoří dostatečně jemnou vnitřní strukturu, což je pro bakterie výhodné. Porozita této vrstvy je v rozmezí, kdy bakterie a jejich produkty nepronikají příliš hluboko do struktury nosiče, ale zároveň v blízkosti povrchu jim vytváří vhodné prostředí.

Postupný vývoj nanovláknenných nosičů ukázal požadavky na tento typ nosiče z hlediska jejich dlouhodobé stability v namáhaném prostředí a růstu preferenčních mikroorganismů. Primární je vytvoření nanovláken se specifickým povrchem, který je z hlediska drsnosti povrchu blízký povrchu mikroorganismů (Rasouli 2019) a obsahuje dostatečné množství hlubšího prostoru (včetně pórů). Na těchto materiálech dochází k rychlé adhezi specifických bakterií, které rychle tvoří biofilm. Jak ukázaly výsledky, biofilm na nanovláknenných nosičích se nejen rychle vytváří a obsahuje značné množství specifických bakterií, ale také je velmi dobře přichycen k povrchu; oproti komerčně dostupným i mikrovláknenným nosičům je těžko oddělitelný i při působení ultrazvuku. To poskytuje značnou výhodu především pro procesy, kde vzniká značné mechanické namáhání (jako například aerované biologické systémy). Z hlediska mechanické stability je potřeba pro nanovláknena vytvořit ochranu, která zajistí jejich dlouhodobou životnost. Na základě teoretických předpokladů a laboratorního testování byla vytvořena 3D struktura, která zajišťuje nanovláknům ochranu a zároveň je uvnitř těchto struktur

vytvořeno vlastní prostředí, které znásobuje účinnost biologických procesů probíhajících při styku biofilmu a látek v médiu.

Cílem jedné části doktorské práce bylo otestovat nově navržené a připravené nosiče biomasy v laboratorním nitrifikačním reaktoru a porovnat je s komerčně dostupným nosičem. Z testovaných typů nosičů biomasy vykazovaly největší relativní zastoupení nitrifikačních bakterií nosiče nanovláknenné. Nanovláknenné nosiče výrazně předčily ostatní nosiče ve schopnosti velmi pevně vázat výsledný biofilm. Jejich nevýhodou může být dlouhodobá stabilita v provzdušňovaném systému, ale tomu se může přizpůsobit mechanická podpora (ochrana) těchto nosičů. Mikrovláknenné nosiče mají vysoce fragmentovanou vnitřní strukturu, která může způsobit akumulaci biomasy. Velká velikost vnitřního meziprostoru způsobuje počáteční vysokorychlostní zachycení suspendovaného kalu, což vede k rychlému nárůstu počáteční biomasy, a ne zcela srovnatelným výsledkům s jinými nosiči v první fázi osidlování (tj. před dosažením ustáleného stavu) (Ahmad et al. 2017). Pro systémy, kde dochází k úniku biomasy z hlavní části technologické linky do následného post-treatmentu, představuje mikrovláknenný nosič výhodu suspendovaného zachycování biomasy a jejího efektivního využití pro celkovou efektivitu. Na druhou stranu je nanovláknenný nosič výhodný pro aplikace s praktickým a specifickým odstraňováním polutantů díky velmi stabilnímu biofilmu s nízkou koncentrací odloučené (suspendované) biomasy. Komerčně dostupné nosiče AnoxKaldnes K3 již prokazatelně fungují, ale jsou méně účinné než mikro- a nanovláknenné struktury kvůli delší době kolonizace bakterií (nosiče nemají příliš porézní strukturu). Nízká drsnost povrchu nosičů AnoxKaldnes K3 dále způsobuje menší stabilitu vytvořeného biofilmu na jejich povrchu. Tato nevýhoda je zásadní v procesu post-treatmentu (především post-nitrifikace a odstraňování mikropolutantů) na ČOV a předurčuje pro tuto aplikaci nosiče s vysokou drsností povrchu a definovanou pórovitostí (Ahmad et al. 2017; Al-Amshawee et al. 2021).

Důležité pro hodnocení testovaných biologických systémů byly metody molekulární genetiky, které jsou založeny na odlišných principech a výsledky analýz je často obtížné porovnávat. Metody FISH, qPCR v reálném čase a NGS se však mohou vzájemně doplňovat. V NGS analýze lze ve vzorcích sledovat poměr jednotlivých bakteriálních rodů. Naproti tomu při qPCR lze mezi vzorky porovnávat abundanci sledovaných bakterií nebo jejich funkčních genů. Metoda FISH poskytuje kvantitativní výsledky pro běžné bakterie, jejichž geny jsou specificky obarveny. Samotné hodnocení však neumožňuje nahlédnout do vnitřních vrstev analyzovaného biofilmu. Analýza qPCR

probíhá na úrovni DNA, na rozdíl od FISH, kde jsou vzorky hodnoceny na buněčné úrovni. Metoda qPCR je tedy výrazně citlivější a umožňuje detekci bakterií při nízkých koncentracích. Výsledky qPCR nám tedy ukazují rozdíl v počtu specifických cílových genů mezi vzorky. Naproti tomu NGS analýza ukazuje podíl konkrétních taxonů v jednotlivých vzorcích. Například, pokud existují tři vzorky se známým množstvím *Nitrospira* (NSR): vzorek A (20 NSR ve 40 bakterií), vzorek B (40 NSR v 80 bakterií) a vzorek C (20 NSR ve 30 bakterií). Výsledky NGS by identifikovaly stejné podíly NSR ve vzorcích A a B a vyšší podíl NSR ve vzorku C. Výsledky analýzy qPCR by detekovaly nejvyšší množství NSR ve vzorku B a stejné množství NSR ve vzorcích A a C.

Metoda respirometrie je velmi vhodná pro hodnocení biofilmu z „makro“ perspektivy. Respirometrie na rozdíl od molekulárně genetických metod neposkytuje informace o typu a počtu bakterií přítomných v biofilmu. Naopak podává přehled o aktuální metabolické aktivitě mikroorganismů a jejich schopnosti a rychlosti metabolizovat polutanty ve sledovaném médiu. Porovnání aktivit biofilmu z respirometrických dat a počtu jednotlivých nitrifikačních bakterií ve vzorcích ukazuje, že pro abundanci bakterií jsou důležité parametry nosiče, jako je povrchová morfologie a další specifické vlastnosti materiálu (nejen velikost prostoru pro růst biofilmu) (Al-Amshawee et al. 2021; Bhattacharya a Mazumder 2021). Spojením poznatků o vývoji aktivit biofilmu pro jednotlivé nosiče (respirometrie) a složení bakteriálního konsorcia (molekulárně genetické metody) lze výstižně vyhodnotit vhodnost testovaných nosičů biomasy ve sledovaných biotechnologických aplikacích.

## 7. POPIS UPLATNĚNÍ VÝSLEDKŮ A PŘÍNOS PRÁCE

V rámci této doktorské práce vznikla řada výstupů, jež nacházejí uplatnění přímo v praxi (v oblasti čištění odpadních vod – nosiče biomasy) a také přispívají znalostem v oboru čistírenství.

Za hlavní praktické výstupy lze považovat (1) 3D mikrovlákněný nosič biomasy sendvičové struktury, který vznikl ve spolupráci s Katedrou technologií a struktur (FT, TUL) a nachází praktické uplatnění v post-nitrifikaci na ČOV pro eliminaci zbytkových koncentrací amoniakálního dusíku. (2) Jako druhý praktický výstup je nanovlákněný nosič biomasy (systém core/shell), který je využitelný pro specifické účely dočišťování odpadních vod – především pro eliminace dusíkatých a dalších látek na odtoku z ČOV, kde se vyžaduje vysoká čistota tohoto odtoku (chráněné nebo evropsky významné lokality). Oba nosiče biomasy lze uplatnit především v kompaktních MBBR systémech post-nitrifikace, kde lze v principu dočišťovat z odpadních vod zbytková znečištění. Pro další post-treatment procesy (např. odstraňování mikropolutantů) bude potřeba využití těchto nosičů ověřit. Zásadní výhodou je, že s pomocí nově vyvinutých nosičů biomasy lze dosáhnout téměř nulových koncentrací dusíkatých látek na odtocích z ČOV bez zásadního navýšení ekonomických nároků. Nosiče mohou být i poměrně jednoduše modifikovány pro uzpůsobení podmínek vyžadujících odlišné biotechnologické procesy. Na základě dosažených výsledků a získaných praktických zkušeností (TRL 7) lze předpokládat, že vyvinuté nosiče biomasy v budoucnu vstoupí na trh.

Vymezení se oproti komerčním produktům je zcela jasně definovatelné: komerčně dostupné nosiče biomasy jsou především různě tvarované plastové produkty, které postrádají oproti mikro- nebo nanovlákněným nosičům řadu výhod, jako jsou velikost specifického povrchu, struktura (drsnost) povrchu, meziprostor a porozita, funkcionalizovatelnost a schopnost velmi pevně vázat bakterie a fixovat biofilm. Vymezení se k předešlým pracím původem z TUL, které se zabývají vývojem nosičů biomasy je taktéž jednoznačně dané: dříve vyvinuté nosiče biomasy byly zcela jiného typu (struktury) a nebyla zde provedena detailní analýza bakteriálních konsorcií v biofilmu na nosičích během experimentů, což, jak se ukázalo je velmi podstatné.

Jako konkrétní výstupy vznikly 2 funkční vzorky různých typů nanovlákněných nosičů biomasy a pro finální podoby mikro- i nanovlákněných nosičů je připravována ochrana duševního vlastností v podobě patentů. Tyto výstupy slouží pro další výzkum a vývoj založený na spolupráci s jinými institucemi a pro možné uvedení produktů na trh.

Velký přínos je především očekáván v oblasti možného využití finálních nanovláknenných nosičů biomasy pro MBBR post-treatment procesy sloužící k eliminaci zbytkových koncentrací dusíku, CHSK a dalších látek z odpadních vod. Na toto téma je již vypracován rozsáhlý projekt.

Výsledky práce byly publikovány v několika prestižních odborných publikacích a prezentovány na národních i mezinárodních konferencích. Především získané znalosti v oblasti složení bakteriálního konsorcia na specifických površích nosičů biomasy a porovnání různých typů nosičů biomasy přinesly odborné veřejnosti a oblasti biofilmových procesů obecně nové poznatky využitelné pro laboratorní i provozní experimenty (včetně reálných aplikací). Značným přínosem jsou získané znalosti z oblasti testování biofilmu pomocí různých metod a porovnání těchto metod poskytuje návod pro konkrétní potřeby testování biofilmových systémů. Dále pak byly získány znalosti v oblasti nanovláknenných materiálů a jejich přípravy za účelem konkrétních biotechnologických aplikací.

Tato disertační práce přispěla i řadě projektům, které řeší nebo řešili post-treatment procesy nebo obecně dočišťování odpadních vod. V rámci výzkumu a konferencí byly navázány kontakty s různými českými i zahraničními pracovišti a odborníky, což je využíváno pro přípravu nových projektů a vývoj nových technologií. Pro nový typ nanovláknenných (core/shell) nosičů biomasy byl vytvořen ve spolupráci FA (TUL) exponát, jež umělecky vyjadřuje proces a nutnost čištění odpadních vod. Tento exponát již byl součástí několika prestižních odborných akcí a dále bude využíván pro potřeby propagace.

## 8. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout nový typ nosiče biomasy a otestovat ho v laboratorním a poloprovozním reaktoru post-nitrifikace. Vývoj nosiče probíhal od základů s tím, že prvně byla vytvořena série nosičů mikrovlákných, kdy jejich testováním bylo dosaženo znalostí pro vytvoření nosiče nanovlákného. Všechny typy nosičů, včetně komerčně dostupného AnoxKaldnes K3, byly důkladně testovány v biologickém systému post-nitrifikace a vzájemně porovnány. V poslední fázi této práce bylo dosaženo finální podoby nosičů biomasy – 3D mikrovlákného sendvičové struktury a nanovlákného se speciální core/shell formou.

Biologické testování různých typů nosičů biomasy v bioreaktoru post-nitrifikace, včetně testování za limitních podmínek, a následné hodnocení biofilmu ukázalo, že velmi specifický povrch PVB nanovláken umožňuje velmi kvalitní adhezi čistírenských bakterií, které jsou v takovém biofilmu aktivní a jsou částečně chráněny před nepříznivými vlivy. 3D mikrovlákné nosiče mají výborné předpoklady pro kvalitní osidlování mikroorganismy v určitých procesech. V biofilmu na nanovlákných nosičích bylo ve většině experimentech nalezeno největší množství nitrifikačních bakterií v porovnání s jinými nosiči. Nosiče z nanovláken výrazně překonaly ostatní ve schopnosti velmi pevně vázat biofilm, který je dle respirometrických výsledků velmi aktivní. Jejich nevýhodou může být dlouhodobá stabilita v provzdušňovaném systému, ale pro tento případ byl vyvinut nosič, kde jsou nanovlákná chráněně (core/shell forma nosiče). Včetně vyvinutí dvou typů nosičů uplatnitelných na různých čistírenských provozech byly na základě dlouhodobého testování různých struktur získány výsledky, které jsou přínosem pro oblast biofilmových procesů a jejich hodnocení pomocí molekulárně genetických metod. Jedná se o zjištění souvislosti mezi přítomností bakterie *Zoogloea* v biofilmu a jeho vývojem a dále se jedná o zhodnocení a porovnání jednotlivých metod vhodných pro analýzu biofilmu v závislosti na různých parametrech.

Další pokrok v této práci je spatřován v dlouhodobém a velkoobjemovém poloprovozním testování nanovlákných nosičů biomasy na reálné čistírně, kde by docházelo k eliminaci dusíkatých polutantů, CHSK a případně rozkladných produktů mikropolutantů. Usilovná práce ve zdokonalování vyvinutých nosičů biomasy, jejich modifikaci a zavedení do praxe (uvedení na trh) bude nadále pokračovat.

## Seznam publikací autora

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ, Tomáš LEDERER a Brigita KOLČAVOVÁ SIRKOVÁ, 2021. Analysis of nitrifying bacteria growth on two new types of biomass carrier using respirometry and molecular genetic methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 225. ISSN 10902414. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112795

HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ, Totka BAKALOVA a Tomáš LEDERER, 2020. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. *Materials and Design* [online]. 194. ISSN 18734197. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2020.108898

HAVLÍČEK, Karel, Magda NECHANICKÁ, Lucie SVOBODOVÁ, 2020. Příprava a hodnocení nanovlákných materiálů pro aplikace v oblasti čištění odpadních vod. *Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. 62, 16-24. ISSN 0322-8916

HAVLÍČEK, Karel, Lucie SVOBODOVÁ, Totka BAKALOVA, 2020. Pokročilá obrazová analýza mikroskopických snímků nanovlákných vrstev. *Jemná mechanika a optika*. 65, 243-248. ISSN 0447-6441

TIMMINS, Renee L., Anil KUMAR, Maximilian RÖHRL, Karel HAVLÍČEK, Seema AGARWAL a Josef BREU, 2022. High Barrier Nanocomposite Film with Accelerated Biodegradation by Clay Swelling Induced Fragmentation. *Macromolecular Materials and Engineering* [online]. 307(6), 2100727. ISSN 1439-2054. Dostupné z: doi:10.1002/MAME.202100727

RAMAKRISHNAN, Rohith K., Daniele SILVESTRI, Nechikkottil S. SUMITHA, Nhung H. A. NGUYEN, Karel HAVLÍČEK, Dariusz ŁUKOWIEC, Stanisław WACŁAWEK, Miroslav ČERNÍK, Diwakar TIWARI, Vinod V. T. PADIL a Rajender S. VARMA, 2022. Gum Hydrocolloids Reinforced Silver Nanoparticle Sponge for Catalytic Degradation of Water Pollutants. *Polymers* 2022 [online]. 14, 3120. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/POLYM14153120

SVOBODOVÁ, Lucie, Karel HAVLÍČEK, Magda NECHANICKÁ, Roman ŠPÁNEK, Brigita Kolčavová SIRKOVÁ, Irena LENFELDOVÁ, Ondřej LOUDA, Eva MOUČKOVÁ a Tomáš LEDERER, 2021. Microfiber structure for enhanced immobilization of nitrifying bacteria in a post-nitrification reactor. *Environmental Technology and Innovation* [online]. 21, 101373. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2021.101373

VENKATESHAIAH, Abhilash, Karel HAVLÍČEK, Renee L. TIMMINS, Maximilian RÖHRL, Stanisław WACŁAWEK, Nhung H.A. NGUYEN, Miroslav ČERNÍK, Vinod V.T. PADIL a Seema AGARWAL, 2021. Alkenyl succinic anhydride modified tree-gum kondagogu: A bio-based material with potential for food packaging. *Carbohydrate Polymers* [online]. 266. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2021.118126

IBRAHIM, Mayza, Michal KREJČÍK, Karel HAVLÍČEK, Stanislav PETRÍK a Mohamed ELDESSOUKI, 2020. Evaluation of Chemical and Physical Properties of Biodegradable Gum Arabic/PVA/Ag Nanofibrous Membranes as a Potential Wrapping Material. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*. 16. ISSN: 1558-9250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1558925020946451>

KOLČAVOVÁ SIRKOVÁ, Brigita, Irena LENFELDOVÁ, Karel HAVLÍČEK, Martina RYVOLOVÁ, Monika VYSANSKA, Tomáš LEDERER a Petra JIRASKOVA, 2022. Three-dimensional knitted spacer microfiber biomass carrier for wastewater treatment. *Journal of Industrial Textiles*. V recenzním řízení.



## Reference

- ABZAZOU, Tarik, Rosa M. ARAUJO, María AUSET a Humbert SALVADÓ, 2016. Tracking and quantification of nitrifying bacteria in biofilm and mixed liquor of a partial nitrification MBBR pilot plant using fluorescence in situ hybridization. *Science of the Total Environment* [online]. 541, 1115–1123. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.007
- ADELEYE, Adeyemi S., Jon R. CONWAY, Kendra GARNER, Yuxiong HUANG, Yiming SU a Arturo A. KELLER, 2016. Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: Costs, benefits, and applicability. *Chemical Engineering Journal* [online]. 286, 640–662. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2015.10.105
- AHMAD, Muhammad, Sitong LIU, Nasir MAHMOOD, Asif MAHMOOD, Muhammad ALI, Maosheng ZHENG a Jinren NI, 2017a. Effects of porous carrier size on biofilm development, microbial distribution and nitrogen removal in microaerobic bioreactors. *Bioresource Technology* [online]. 234, 360–369. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.03.076
- AHMAD, Muhammad, Sitong LIU, Nasir MAHMOOD, Asif MAHMOOD, Muhammad ALI, Maosheng ZHENG a Jinren NI, 2017b. Effects of porous carrier size on biofilm development, microbial distribution and nitrogen removal in microaerobic bioreactors. *Bioresource Technology* [online]. 234, 360–369. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.03.076
- AHMED, Warsama, Xin TIAN a Robert DELATOLLA, 2019. Nitrifying moving bed biofilm reactor: Performance at low temperatures and response to cold-shock. *Chemosphere* [online]. 229, 295–302. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2019.04.176
- AKINAY, Yuksel, Fatih HAYAT a Bektaş ÇOLAK, 2019. Absorbing properties and structural design of PVB/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite. *Materials Chemistry and Physics* [online]. 229, 460–466. ISSN 02540584. Dostupné z: doi:10.1016/j.matchemphys.2019.03.039
- AL-AMSHAWEE, S. K., M. Y. YUNUS a A. A. AZODDEIN, 2020. A Novel Microbial Biofilm Carrier for Wastewater Remediation. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* [online]. 736, 072006. ISSN 1757899X. Dostupné z: doi:10.1088/1757-899X/736/7/072006
- AL-AMSHAWEE, Sajjad, Mohd Yusri Bin Mohd YUNUS, Joan G. LYNAM, Woo Hyoung LEE, Fei DAI a Ihsan Habib DAKHIL, 2021. Roughness and wettability of biofilm carriers: A systematic review. *Environmental Technology and Innovation* [online]. 21, 101233. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2020.101233
- AMANN, R. I., B. J. BINDER, R. J. OLSON, S. W. CHISHOLM, R. DEVEREUX a D. A. STAHL, 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 56(6), 1919–1925. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/56/6/1919.abstract>
- AN, Weixing, Feng GUO, Yulong SONG, Na GAO, Shijie BAI, Jingcheng DAI, Hehong WEI, Liping ZHANG, Dianzhen YU, Ming XIA, Ying YU, Ming QI, Chunyuan TIAN, Haofeng CHEN, Zhenbin WU, Tong ZHANG a Dongru QIU, 2016. Comparative genomics analyses on EPS biosynthesis genes required for floc formation of *Zoogloea resiniphila* and other activated sludge bacteria. *Water Research* [online]. 102, 494–504. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.06.058
- ASHKANANI, Amal, F. ALMOMANI, Majeda KHRAISHEH, R. BHOSALE, Muhammad TAWALBEH a Khaled ALJAML, 2019. Bio-carrier and operating temperature effect on ammonia removal from secondary wastewater effluents using moving bed biofilm reactor (MBBR). *Science of the Total Environment* [online]. 693, 133425. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.07.231
- AZEREDO, Joana, Nuno F. AZEVEDO, Romain BRIANDET, Nuno CERCA, Tom COENYE, Ana Rita COSTA, Mickaël DESVAUX, Giovanni DI BONAVENTURA, Michel HÉBRAUD, Zoran JAGLIC, Miroslava KAČÁNIOVÁ, Susanne KNØCHEL, Anália LOURENÇO, Filipe Mergulhão, Rikke Louise MEYER, George NYCHAS, Manuel SIMÕES, Odile TRESSE a Claus STERNBERG, 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 43(3), 313–351. ISSN 15497828. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2016.1208146
- BARWAL, Anjali a Rubina CHAUDHARY, 2014. To study the performance of biocarriers in moving bed biofilm reactor (MBBR) technology and kinetics of biofilm for retrofitting the existing aerobic treatment systems: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* [online]. 13(3), 285–299. ISSN 15691705. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-014-9333-7

- BHATTACHARYA, Roumi a Debabrata MAZUMDER, 2021. Evaluation of nitrification kinetics for treating ammonium nitrogen enriched wastewater in moving bed hybrid bioreactor. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 9(1). ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2020.104589
- BHATTACHARYA, Roumi a Debabrata MAZUMDER, 2021. Simultaneous nitrification and denitrification in moving bed bioreactor and other biological systems. *Bioprocess and Biosystems Engineering* [online]. 44(4), 635–652. ISSN 16157605. Dostupné z: doi:10.1007/s00449-020-02475-6
- BIASSONI, Roberto a Alessandro RASO, 2016. *Quantitative real-time PCR*. B.m.: Springer. ISBN 149394665X.
- CARRERA, Julián, Irene JUBANY, Lorena CARVALLO, Rolando CHAMY a Javier LAFUENTE, 2004. Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process Biochemistry* [online]. 39(9), 1159–1165. ISSN 00329592. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-9592(03)00214-0
- CHAALI, Mona, Mitra NAGHDI, Satinder K. BRAR a Antonio AVALOS-RAMIREZ, 2018. A review on the advances in nitrifying biofilm reactors and their removal rates in wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* [online]. 93(11), 3113–3124. ISSN 10974660. Dostupné z: doi:10.1002/jctb.5692
- CHANG, Wei Min, Cheng Chien WANG a Chuh Yung CHEN, 2014. The combination of electrospinning and forcespinning: Effects on a viscoelastic jet and a single nanofiber. *Chemical Engineering Journal* [online]. 244(1), 540–551. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.02.001
- CHEN, Haisheng, Manhong HUANG, Yanbiao LIU, Lijun MENG a Mengdie MA, 2020. Functionalized electrospun nanofiber membranes for water treatment: A review. *Science of the Total Environment* [online]. 739, 139944. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139944
- CHEN, Lin Jer, Jiunn Der LIAO, Shih Jen LIN, Yu Ju CHUANG a Yaw Shyan FU, 2009. Synthesis and characterization of PVB/silica nanofibers by electrospinning process. *Polymer* [online]. 50(15), 3516–3521. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2009.05.063
- CHEN, Peipei, Fupan ZHANG, Lijie ZHANG, Hao LIU, Qian ZHANG, Zhilin XING a Tiantao ZHAO, 2022. Characterization of a novel salt-tolerant strain *Sphingopyxis* sp. CY-10 capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Bioresource Technology* [online]. 358, 127353. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIORTECH.2022.127353
- CHEN, Xue, Qian ZHANG, Yunan ZHU a Tiantao ZHAO, 2021. Response of wastewater treatment performance, microbial composition and functional genes to different C/N ratios and carrier types in MBBR inoculated with heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacteria. *Bioresource Technology* [online]. 336, 125339. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2021.125339
- CHENG, Yu, Jiao Yang LI, Xianghao REN, Ying LI, Ying Ying KOU, Kangmin CHON, Moon Hyun HWANG a Myung Han KO, 2022. High efficiency of simultaneous nitrification, denitrification, and organics removal in the real-scale treatment of high C/N ratio food-processing wastewater using micro-aerobic reactors. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 177, 108218. ISSN 1369-703X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BEJ.2021.108218
- CIMBRITZ, Michael, Ellen EDEFELL, Elias THÖRNQVIST, Haitam EL-TALIAWY, Maria EKENBERG, Cecilia BURZIO, Oskar MODIN, Frank PERSSON, Britt Marie WILÉN, Kai BESTER a Per FALÅS, 2019. PAC dosing to an MBBR – Effects on adsorption of micropollutants, nitrification and microbial community. *Science of the Total Environment* [online]. 677, 571–579. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.04.261
- CLAESSON, Marcus J., Qiong WANG, Orla O’SULLIVAN, Rachel GREENE-DINIZ, James R. COLE, R. Paul ROSS a Paul W. O’TOOLE, 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* [online]. 38(22). ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkq873
- CLIFFORD, Robert J., Michael MILILLO, Jackson PRESTWOOD, Reyes QUINTERO, Daniel V. ZURAWSKI, Yoon I. KWAK, Paige E. WATERMAN, Emil P. LESHO a Patrick MC GANN, 2012. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. *PLoS one* [online]. 7(11), 7–12. ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0048558

- CORTE, Laura, Debora Casagrande PIERANTONI, Carlo TASCINI, Luca ROSCINI a Gianluigi CARDINALI, 2019. Biofilm specific activity: A measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms* [online]. 7(3), 1–14. ISSN 20762607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms7030073
- CUI, Jiaxin, Fanghua LI, Yulin WANG, Qilu ZHANG, Wenjing MA a Chaobo HUANG, 2020. Electrospun nanofiber membranes for wastewater treatment applications. *Separation and Purification Technology* [online]. 250, 117116. ISSN 18733794. Dostupné z: doi:10.1016/j.seppur.2020.117116
- DAIMS, Holger, Andreas BRÜHL, Rudolf AMANN, Karl Heinz SCHLEIFER a Michael WAGNER, 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 22(3), 434–444. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8
- DAIMS, Holger, Jeppe L. NIELSEN, Per H. NIELSEN, Karl Heinz SCHLEIFER a Michael WAGNER, 2001. In Situ Characterization of Nitrospira-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 67(3–12), 5273–5284. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.67.11.5273-5284.2001
- DENG, Shihai, Desheng LI, Xue YANG, Wei XING, Jinlong LI a Qi ZHANG, 2016. Biological denitrification process based on the Fe(0)–carbon micro-electrolysis for simultaneous ammonia and nitrate removal from low organic carbon water under a microaerobic condition. *Bioresource Technology* [online]. 219, 677–686. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2016.08.014
- DI BIASE, Alessandro, Maciej S. KOWALSKI, Tanner R. DEVLIN a Jan A. OLESZKIEWICZ, 2019. Moving bed biofilm reactor technology in municipal wastewater treatment: A review. *Journal of Environmental Management* [online]. 247, 849–866. ISSN 10958630. Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2019.06.053
- DING, Jianxun, Jin ZHANG, Jiannan LI, Di LI, Chunsheng XIAO, Haihua XIAO, Huanghao YANG, Xiuli ZHUANG a Xuesi CHEN, 2019. Electrospun polymer biomaterials. *Progress in Polymer Science* [online]. 90, 1–34. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2019.01.002
- DIONISI, H. M., A. C. LAYTON, G. HARMS, I. R. GREGORY, K. G. ROBINSON a G. S. SAYLER, 2002. Quantification of Nitrosomonas oligotropha-like ammonia-oxidizing bacteria and nitrospira spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 68(1), 245–253. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.1.245-253.2002
- DOLINOVÁ, Iva, Marie CZINNEROVÁ, Lukáš DVOŘÁK, Vojtěch STEJSKAL, Alena ŠEVČŮ a Miroslav ČERNÍK, 2016. Dynamics of organohalide-respiring bacteria and their genes following in-situ chemical oxidation of chlorinated ethenes and biostimulation. *Chemosphere* [online]. 157, 276–285. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.030
- DOWD, Scot E., Todd R. CALLAWAY, Randall D. WOLCOTT, Yan SUN, Trevor MCKEEHAN, Robert G. HAGEVOORT a Thomas S. EDRINGTON, 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* [online]. 8. ISSN 14712180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-8-125
- DŘÍMAL, Pavel a Jaromír Hoffmann, 2008. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy* [online]. 102, 139–147.
- DZIOŃEK, Anna, Danuta WOJCIESZYŃSKA a Urszula GUZIK, 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 23, 28–36. ISSN 07173458. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejbt.2016.07.003
- FELFÖLDI, Tamás, Laura JURECSKA, Balázs VAJNA, Katalin BARKÁCS, Judit MAKK, Gábor CEBE, Attila SZABÓ, Gyula ZÁRAY a Károly MÁRIALIGETI, 2015. Texture and type of polymer fiber carrier determine bacterial colonization and biofilm properties in wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* [online]. 264, 824–834. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.12.008
- FORREST, Daina, Robert DELATOLLA a Kevin KENNEDY, 2016. Carrier effects on tertiary nitrifying moving bed biofilm reactor: An examination of performance, biofilm and biologically produced solids. *Environmental Technology* [online]. 37(6), 662–671. ISSN 1479487X. Dostupné z: doi:10.1080/09593330.2015.1077272

- GAO, Yu Xi, Xing LI, Jun Ru ZHAO, Zhong Xing ZHANG a Xiao Yan FAN, 2021. Response of microbial communities based on full-scale classification and antibiotic resistance genes to azithromycin and copper combined pollution in activated sludge nitrification laboratory mesocosms at low temperature. *Bioresource technology* [online]. 341. ISSN 1873-2976. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIORTECH.2021.125859
- GEETS, Joke, Michaël DE COOMAN, Lieven WITTEBOLLE, Kim HEYLEN, Bram VANPARYS, Paul DE VOS, Willy VERSTRAETE a Nico BOON, 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 75(1), 211–221. ISSN 01757598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-006-0805-8
- GEHRKE, Ilka, Andreas GEISER a Annette SOMBORN-SCHULZ, 2015. Innovations in nanotechnology for water treatment. *Nanotechnology, Science and Applications* [online]. 8, 1–17. ISSN 11778903. Dostupné z: doi:10.2147/NSA.S43773
- GNIDA, Anna, Jarosław WISZNIOWSKI, Ewa FELIS, Jan SIKORA, Joanna SURMACZ-GÓRSKA a Korneliusz MIKSCH, 2016. The effect of temperature on the efficiency of industrial wastewater nitrification and its (geno)toxicity. *Archives of Environmental Protection* [online]. 42(1), 27–34. ISSN 20834810. Dostupné z: doi:10.1515/aep-2016-0003
- GÓMEZ, Marcel, Lukáš DVOŘÁK, Iveta RŮŽIČKOVÁ, Marek HOLBA a Jiří WANNER, 2012. Operational experience with a seasonally operated full-scale membrane bioreactor plant. *Bioresource Technology* [online]. 121, 241–247. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2012.06.095
- GOSWAMI, Supriyo a Debabrata MAZUMDER, 2019. Modelling and process design of Moving Bed Bioreactor (MBBR) for wastewater treatment-A Review. *Journal of the Indian Chemical Society* 96, 215–229.
- GRADA, Ayman a Kate WEINBRECHT, 2013. Next-generation sequencing: Methodology and application. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 133(8), 11-4. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.248
- GRAHAM, David W., Charles W. KNAPP, Erik S. VAN VLECK, Katie BLOOR, Teresa B. LANE a Christopher E. GRAHAM, 2007. Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification. *ISME Journal* [online]. 1(5), 385–393. ISSN 17517362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2007.45
- GU, Li, Jian yi WU, Zu lin HUA a Ke jian CHU, 2020. The response of nitrogen cycling and bacterial communities to E. coli invasion in aquatic environments with submerged vegetation. *Journal of Environmental Management* [online]. 261, 110204. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/J.JENVMAN.2020.110204
- GUO, Xuechao, Bing LI, Renxin ZHAO, Jiayu ZHANG, Lin LIN, Guijuan ZHANG, Ruo hong LI, Jie LIU, Pu LI, Yingyu LI a Xiao yan LI, 2019. Performance and bacterial community of moving bed biofilm reactors with various biocarriers treating primary wastewater effluent with a low organic strength and low C/N ratio. *Bioresource Technology* [online]. 287. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.121424
- GZAR, Hatem A., Wisam S. AL-REKABI a Zahraa K. SHUHAIEB, 2021. Application of Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) for Treatment of Industrial Wastewater: A mini Review. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 1973(1). ISSN 17426596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1973/1/012024
- HAIDER, Adnan, Sajjad HAIDER a Inn Kyu KANG, 2018. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 11(8), 1165–1188. ISSN 18785352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015
- HAVLÍČEK, K., L. SVOBODOVÁ, T. BAKALOVA a T. LEDERER, 2020. Influence of electrospinning methods on characteristics of polyvinyl butyral and polyurethane nanofibres essential for biological applications. *Materials and Design* [online]. 194. ISSN 18734197. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2020.108898
- HSU, Lillian C., Jean FANG, Diana A. BORCA-TASCIUC, Randy W. WOROBO a Carmen I. MORARU, 2013. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 79(8), 2703–2712. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.03436-12

- IANNACONE, Francesca, Francesco DI CAPUA, Francesco GRANATA, Rudy GARGANO a Giovanni ESPOSITO, 2020. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a continuous-flow moving bed biofilm reactor alternating microaerobic and aerobic conditions. *Bioresource Technology* [online]. 310, 123453. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.123453
- JURECSKA, Laura, Katalin BARKÁCS, Éva KISS, Gergo GYULAI, Tamás FELFÖLDI, Balázs TÖRO, Róbert KOVÁCS a Gyula ZÁRAY, 2013. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. *Microchemical Journal* [online]. 107, 108–114. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.05.028
- KENRY a Chwee Teck LIM, 2017. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* [online]. 70, 1–17. ISSN 0079-6700. Dostupné z: doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2017.03.002
- KUMAR, Raman, Anil Kumar SHARMA a Sarabjeet Singh AHLUWALIA, 2017. *Advances in Environmental Biotechnology* [online]. ISBN 9789811040412. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-4041-2
- KYOSEV, Yordan, 2019. *Warp knitted fabrics construction* [online]. eISBN 9780429094699. Dostupné z: doi:10.1201/9780429094699/WARP-KNITTED-FABRICS-CONSTRUCTION-YORDAN-KYOSEV
- LARIYAH, M. S., H. A. MOHIYADEN, G. HAYDER, A. HUSSEIN, H. BASRI, A. F. SABRI a M. N. NOH, 2016. Application of Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) and Integrated Fixed Activated Sludge (IFAS) for Biological River Water Purification System: A Short Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [online]. 32(1). ISSN 17551315. Dostupné z: doi:10.1088/1755-1315/32/1/012005
- LAZAROVA, V. a J. MANEM, 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* [online]. 29(10), 2227–2245. ISSN 00431354. Dostupné z: doi:10.1016/0043-1354(95)00054-O
- LEONHARD, S., D. SCHREFF, K. THOMA, W. GANDER, M. WICHERN a R. HILLIGES, 2022. Single-stage MBBR as post-treatment step for upgrading large WWTPs – Experiences of one-year pilot plant operation. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 46, 102570. ISSN 22147144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2022.102570
- LEYVA-DÍAZ, J. C., J. MARTÍN-PASCUAL a J. M. POYATOS, 2017. Moving bed biofilm reactor to treat wastewater. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 14(4), 881–910. ISSN 17352630. Dostupné z: doi:10.1007/s13762-016-1169-y
- LI, Yu, Jing WANG, Bingyan LI, Mengdan GENG, Yan WANG, Jianguo ZHAO, Baodan JIN a Yanfei LI, 2021. Response of extracellular polymeric substances and microbial community structures on resistance genes expression in wastewater treatment containing copper oxide nanoparticles and humic acid. *Bioresource Technology* [online]. 340, 125741. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIORTECH.2021.125741
- LIMA, P. S., A. T. INACIO, Y. C. MOREIRA, D. E. CÉSAR, R. J.P. DIAS, M. DEZOTTI a J. P. BASSIN, 2021. Upgrade of a suspended biomass reactor with limited nitrification to a biofilm system: Addressing critical parameters and performance in different reactor configurations. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 170. ISSN 1873295X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2021.107987
- LIU, Tao, Guangyue JIA, Jiawei XU, Xiaolu HE a Xie QUAN, 2020a. Simultaneous nitrification and denitrification in continuous flow MBBR with novel surface-modified carriers. *Environmental Technology* [online]. 42, 3607–3617. ISSN 1479487X. Dostupné z: doi:10.1080/09593330.2020.1735526
- LIU, Xiaoguang, Mingu KIM, George NAKHLA, Mehran ANDALIB a Yuan FANG, 2020b. Partial nitrification-reactor configurations, and operational conditions: Performance analysis. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 8(4), 103984. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2020.103984
- LIU, Yongdi, Yingdong ZHU, Honghua JIA, Xiaoyu YONG, Lijuan ZHANG, Jun ZHOU, Zebin CAO, Andrea KRUSE a Ping WEI, 2017. Effects of different biofilm carriers on biogas production during anaerobic digestion of corn straw. *Bioresource Technology* [online]. 244, 445–451. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIORTECH.2017.07.171

- LU, Zichuan, Deyong LI, Lugao JIANG, Gaofeng CHEN, Kaibin LI a Guoqiang LIU, 2020. Characterizing the biofilm stoichiometry and kinetics on the media in situ based on pulse-flow respirometer coupling with a new breathing reactor. *Chemosphere* [online]. 252, 126378. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126378
- MA, Hang, Xinlei GAO, Yihua CHEN, Jiaxin ZHU a Tongzhou LIU, 2021. Fe(II) enhances simultaneous phosphorus removal and denitrification in heterotrophic denitrification by chemical precipitation and stimulating denitrifiers activity. *Environmental pollution* [online]. 287. ISSN 1873-6424. Dostupné z: doi:10.1016/J.ENVPOL.2021.117668
- MAINARDIS, Matia, Marco BUTTAZZONI, Mattia COTTES, Alessandro MORETTI a Daniele GOI, 2021. Respirometry tests in wastewater treatment: Why and how? A critical review. *Science of the Total Environment* [online]. 793, 148607. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148607
- MASŁOŃ, Adam a Janusz A. TOMASZEK, 2015. A study on the use of the BioBall® as a biofilm carrier in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* [online]. 196, 577–585. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2015.08.020
- MASSOOMPOUR, A. R., S. M. BORGHEI a Mohammad RAIE, 2020. Enhancement of biological nitrogen removal performance using novel carriers based on the recycling of waste materials. *Water Research* [online]. 170, 115340. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2019.115340
- MISHRA, Saurabh, Virender SINGH, Liu CHENG, Abid HUSSAIN a Banu ORMECI, 2022. Nitrogen removal from wastewater: a comprehensive review of biological nitrogen removal processes, critical operation parameters and bioreactor design. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 10(3), 107387. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2022.107387
- MOBARRY, Bruch K., Michael WAGNER, Vincent URBAIN, Bruce E. RITTMANN a David A. STAHL, 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 62(6), 2156–2162. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.62.6.2156-2162.1996
- MOHAMMED, Leena, Hassan G. GOMAA, Doaa RAGAB a Jesse ZHU, 2017. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. *Particuology* [online]. 30, 1–14. ISSN 16742001. Dostupné z: doi:10.1016/j.partic.2016.06.001
- MORGAN-SAGASTUME, Fernando, 2018. Biofilm development, activity and the modification of carrier material surface properties in moving-bed biofilm reactors (MBBRs) for wastewater treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 48(5), 439–470. ISSN 15476537. Dostupné z: doi:10.1080/10643389.2018.1465759
- NECHANICKÁ, Magda, Iva DOLINOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Denisa TOMEŠOVÁ a Lukáš DVOŘÁK, 2021. Application of nanofiber carriers for sampling of microbial biomass from contaminated groundwater. *Science of the Total Environment* [online]. 780. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146518
- NĚMEČEK, Jan, Iva DOLINOVÁ, Jiřina MACHÁČKOVÁ, Roman ŠPÁNEK, Alena ŠEVCŮ, Tomáš LEDERER a Miroslav ČERNÍK, 2017. Stratification of chlorinated ethenes natural attenuation in an alluvial aquifer assessed by hydrochemical and biomolecular tools. *Chemosphere* [online]. 184, 1157–1167. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.100
- NIELSEN, Per Halkjær, Holger DAIMS a Hilde LEMMER, 2009. *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and Quantification of Microorganisms in Activated Sludge and Biofilms* by FISH [online]. ISBN 9781843392316. Dostupné z: http://library.oapen.org/handle/20.500.12657/25915
- PANG, Qingqing, Wenwen XU, Fei HE, Fuquan PENG, Xiang ZHU, Bin XU, Jianghua YU, Zewei JIANG a Longmian WANG, 2022. Functional genera for efficient nitrogen removal under low C/N ratio influent at low temperatures in a two-stage tidal flow constructed wetland. *Science of The Total Environment* [online]. 804, 150142. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.150142
- PESTER, Michael, Frank MAIXNER, David BERRY, Thomas RATTEL, Hanna KOCH, Sebastian LÜCKER, Boris NOWKA, Andreas RICHTER, Eva SPIECK, Elena LEBEDEVA, Alexander LOY, Michael WAGNER a Holger DAIMS, 2014. NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing Nitrospira. *Environmental Microbiology* [online]. 16(10), 3055–3071. ISSN 14622920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.12300

- PISHGAR, Roya, John Albino DOMINIC, Zhiya SHENG a Joo Hwa TAY, 2019. Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures. *Bioresource Technology* [online]. 281, 72–83. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.061
- POKORNY, P., E. KOSTAKOVA, F. SANETRNÍK, P. MIKES, J. CHVOJKA, T. KALOUS, M. BILEK, K. PEJCHAR, J. VALTERA a D. LUKAS, 2014. Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 16(48), 26816–26822. ISSN 14639076. Dostupné z: doi:10.1039/c4cp04346d
- POLY, Franck, Sophie WERTZ, Elisabeth BROTHIER a Valérie DEGRANGE, 2008. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 63(1), 132–140. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/J.1574-6941.2007.00404.X
- PRUITT, L. A., 2017. 1.23 Load-Bearing Medical Polymers (Non-Degradable). *Comprehensive Biomaterials II* [online]. 507–515. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803581-8.10214-0
- QIQI, Yang, He QIANG a Husham T. IBRAHIM, 2012. Review on moving bed biofilm processes. *Pakistan Journal of Nutrition* [online]. 11(9), 706–713. ISSN 16805194. Dostupné z: doi:10.3923/pjn.2012.804.811
- QUAST, Christian, Elmar PRUESSE, Pelin YILMAZ, Jan GERKEN, Timmy SCHWEER, Pablo YARZA, Jörg PEPLIES a Frank Oliver GLÖCKNER, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* [online]. 41. ISSN 03051048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gks1219
- RASOULI, Rahimeh, Ahmed BARHOUM, Mikhael BECHELANY a Alain DUFRESNE, 2019. Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications. *Macromolecular Bioscience* [online]. 19(2), 1–27. ISSN 16165195. Dostupné z: doi:10.1002/mabi.201800256
- REBOLEIRO-RIVAS, P., J. MARTÍN-PASCUAL, B. JUÁREZ-JIMÉNEZ, J. M. POYATOS, R. VÍLCHEZ-VARGAS, S. E. VLAEMINCK, B. RODELAS a J. GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2015. Nitrogen removal in a moving bed membrane bioreactor for municipal sewage treatment: Community differentiation in attached biofilm and suspended biomass. *Chemical Engineering Journal* [online]. 277, 209–218. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2015.04.141
- ROTHAUWE, Jan Henrich, Karl Paul WITZEL a Werner LIESACK, 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 63(12), 4704–4712. ISSN 00992240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997
- WILSON C., R. LUKOWICZ, S. MERCHANT, H. VALQUIER-FLYNN, J. CABALLERO, J. SANDOVAL, M. OKUOM, C. HUBER, T. D. BROOKS, E. WILSON, B. CLEMENT C. D. WENTWORT, A. E. HOLMES, 2017. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Journal of Engineering and Technology*. 6(4). Dostupné z: <http://www.rroij.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>.
- SAHU, J. N., Rama Rao KARRI, Hossain M. ZABED, Shahriar SHAMS a Xianghui QI, 2019. Current Perspectives and Future Prospects of Nano-Biotechnology in Wastewater Treatment. *Separation & Purification Reviews* [online]. 50(2), 139–158. ISSN 15422127. Dostupné z: doi:10.1080/15422119.2019.1630430
- SAIDULU, Duduku, Abhradeep MAJUMDER a Ashok Kumar GUPTA, 2021. A systematic review of moving bed biofilm reactor, membrane bioreactor, and moving bed membrane bioreactor for wastewater treatment: Comparison of research trends, removal mechanisms, and performance. *Journal of Environmental Chemical Engineering* [online]. 9(5), 106112. ISSN 22133437. Dostupné z: doi:10.1016/j.jece.2021.106112
- SANTHOSH, Chella, Venugopal VELMURUGAN, George JACOB, Soon Kwan JEONG, Andrews Nirmala GRACE a Amit BHATNAGAR, 2016. Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chemical Engineering Journal* [online]. 306, 1116–1137. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2016.08.053
- SANTOS, Andreia D., Rui C. MARTINS, Rosa M. QUINTA-FERREIRA a Luis M. CASTRO, 2020. Moving bed biofilm reactor (MBBR) for dairy wastewater treatment. *Energy Reports* [online]. 6, 340–344. ISSN 23524847. Dostupné z: doi:10.1016/j.egyr.2020.11.158

- SANZ, Jose L. a Thorsten KÖCHLING, 2019. *Next-generation sequencing and waste/wastewater treatment: a comprehensive overview* [online]. ISBN 0123456789. Dostupné z: doi:10.1007/s11157-019-09513-0
- SARKAR, Kamal, Carlos GOMEZ, Steve ZAMBRANO, Michael RAMIREZ, Eugenio DE HOYOS, Horacio VASQUEZ a Karen LOZANO, 2010. Electrospinning to Forcespinning™. *Materials Today* [online]. 13(11), 12–14. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(10)70199-1
- SARVAJITH, M., G. KIRAN KUMAR REDDY a Y. V. NANCHARAI AH, 2020. Aerobic granular sludge for high-strength ammonium wastewater treatment: Effect of COD/N ratios, long-term stability and nitrogen removal pathways. *Bioresource Technology* [online]. 306, 123150. ISSN 0960-8524. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIORTECH.2020.123150
- SAUDER, Laura A., Katja ENGEL, Chien Chi LO, Patrick CHAIN a Josh D. NEUFELD, 2018. Candidatus Nitrosotenuis aquarius," an ammonia-oxidizing archaeon from a freshwater aquarium biofilter. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 84(19). ISSN 10985336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01430-18/SUPPL\_FILE/ZAM017188715S1.PDF
- SCHMITTGEN, Thomas D. a Kenneth J. LIVAK, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* [online]. 3(6), 1101–1108. ISSN 17542189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.73
- SEHAR, Shama a Iffat NAZ, 2016. Role of the Biofilms in Wastewater Treatment. *Microbial Biofilms* [online]. Dostupné z: doi:10.5772/63499
- SEUNTJENS, Dries, Mofei HAN, Frederiek Maarten KERCKHOF, Nico BOON, Ahmed AL-OMARI, Imre TAKACS, Francis MEERBURG, Chaïm DE MULDER, Bernhard WETT, Charles BOTT, Sudhir MURTHY, Jose Maria CARVAJAL ARROYO, Haydée DE CLIPPELEIR a Siegfried E. VLAEMINCK, 2018. Pinpointing wastewater and process parameters controlling the AOB to NOB activity ratio in sewage treatment plants. *Water Research* [online]. 138, 37–46. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2017.11.044
- SHAO, Yanxi, Yijing SHI, Abdul MOHAMMED a Yang LIU, 2017. Wastewater ammonia removal using an integrated fixed-film activated sludge-sequencing batch biofilm reactor (IFAS-SBR): Comparison of suspended flocs and attached biofilm. *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. 116, 38–47. ISSN 09648305. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibiod.2016.09.026
- SINGH, Keshav K, Akash SINGH a Sarita RAI, 2022. A study on nanomaterials for water purification. *Materials Today: Proceedings* [online]. 51, 1157–1163. ISSN 22147853. Dostupné z: doi:10.1016/j.matpr.2021.07.116
- ŠIRC, Jakub, Radka HOBZOVÁ, Nina KOSTINA, Marcela MUNZAROVÁ, Martina JUKLÍČKOVÁ, Miloslav LHOTKA, Šárka KUBINOVÁ, Alena ZAJÍCOVÁ a Jiří MICHÁLEK, 2012. Morphological characterization of nanofibers: Methods and application in practice. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2012. ISSN 16874110. Dostupné z: doi:10.1155/2012/327369
- SONWANI, Ravi Kumar, Ganesh SWAIN, Balendu Shekhar GIRI, Ram Sharan SINGH a Birendra Nath RAI, 2019. A novel comparative study of modified carriers in moving bed biofilm reactor for the treatment of wastewater: Process optimization and kinetic study. *Bioresource Technology* [online]. 281, 335–342. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.02.121
- SPENCER, David J., 2001. *Knitting technology: a comprehensive handbook and practical guide* [online]. Elsevier Science & Technology. ISBN 1855733331.
- SPERLING, Marcos von, 2007. *Activated sludge and aerobic biofilm reactors*. London. IWA Publishing. ISBN 9781843391654.
- SVOBODOVÁ, Lucie, Karel HAVLÍČEK, Magda NECHANICKÁ, Roman ŠPÁNEK, Brigita Kolčavová SIRKOVÁ, Irena LENFELDOVÁ, Ondřej LOUDA, Eva MOUČKOVÁ a Tomáš LEDERER, 2021. Microfiber structure for enhanced immobilization of nitrifying bacteria in a post-nitrification reactor. *Environmental Technology and Innovation* [online]. 21, 101373. ISSN 23521864. Dostupné z: doi:10.1016/j.eti.2021.101373
- TAJEDDIN, Behjat, Bahareh AHMADI, Farahnaz SOHRAB a Hossein Ahmadi CHENARBON, 2018. Polymers for Modified Atmosphere Packaging Applications. *Food Packaging and Preservation* [online]. 457–499. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-811516-9.00014-2



- TANIKAWA, Daisuke, Yuka NAKAMURA, Hiromi TOKUZAWA, Yuga HIRAKATA, Masashi HATAMOTO a Takashi YAMAGUCHI, 2018. Effluent treatment in an aquaponics-based closed aquaculture system with single-stage nitrification–denitrification using a down-flow hanging sponge reactor. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 132, 268–273. ISSN 0964-8305. Dostupné z: doi:10.1016/J.IBIOD.2018.04.016
- VALTERA, Jan, Lucie VYSLOUŽILOVÁ, Jiří KOMÁREK, Josef SKŘIVÁNEK, Petr ŽABKA, Jaroslav BERAN a David LUKÁŠ, 2015. Protrusion of the rod electrode in the electrospinning process. *Journal of Nanotechnology* [online]. 2015. ISSN 16879511. Dostupné z: doi:10.1155/2015/301636
- VAN DER HOEK, Jan Peter, Rogier DUIJFF a Otto REINSTRÁ, 2018. Nitrogen recovery from wastewater: Possibilities, competition with other resources, and adaptation pathways. *Sustainability (Switzerland)* [online]. 10(12). ISSN 20711050. Dostupné z: doi:10.3390/su10124605
- VANPARYS, Bram, Kim HEYLEN, Leisbeth LEBBE a Paul DE VOS, 2005. Pedobacter caeni sp. nov., a novel species isolated from a nitrifying inoculum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 55(3), 1315–1318. ISSN 14665026. Dostupné z: doi:10.1099/IJS.0.63635-0/CITE/REFWORKS
- VAZ, Bruna da Silva, Jorge Alberto Vieira COSTA a Michele Greque DE MORAIS, 2017. Production of polymeric nanofibers with different conditions of the electrospinning process. *Revista Materia* [online]. 22(2), 11–15. ISSN 15177076. Dostupné z: doi:10.1590/s1517-707620170002.0180
- VĚTROVSKÝ, Tomáš, Petr BALDRÍAN a Daniel MORAIS, 2018. SEED 2: A user-friendly platform for amplicon high-throughput sequencing data analyses. *Bioinformatics* [online]. 34(13), 2292–2294. ISSN 14602059. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bty071
- VOLPI, Emanuela V. a Joanna M. BRIDGER, 2008. FISH glossary: An overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* [online]. 45(4), 385–409. ISSN 07366205. Dostupné z: doi:10.2144/000112811
- WANG, Cong, Ying LIU, Wenzhou LV, Siqing XIA, Juncheng HAN, Ziyun WANG, Xinxian YU a Luhao CAI, 2019. Enhancement of nitrogen removal by supplementing fluidized-carriers into the aerobic tank in a full-scale A2/O system. *Science of the Total Environment* [online]. 660, 817–825. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.01.046
- WANG, Jiawei, Hong YANG, Fan ZHANG, Yang SU a Shaolun WANG, 2020a. Activated sludge under free ammonia treatment using gel immobilization technology for long-term partial nitrification with different initial biomass. *Process Biochemistry* [online]. 99, 282–289. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2020.07.025
- WANG, Jing, Xiaolin LIU, Xinbai JIANG, Libin ZHANG, Cheng HOU, Guanyong SU, Lianjun WANG, Yang MU a Jinyou SHEN, 2020b. Facilitated bio-mineralization of N,N-dimethylformamide in anoxic denitrification system: Long-term performance and biological mechanism. *Water Research* [online]. 186, 116306. ISSN 0043-1354. Dostupné z: doi:10.1016/J.WATRES.2020.116306
- WANG, Wenshou a Chun WANG, 2012. Polyurethane for biomedical applications: A review of recent developments. *The Design and Manufacture of Medical Devices* [online]. 115–151. Dostupné z: doi:10.1533/9781908818188.115
- WARD, B. B., 2008. Nitrification. *Encyclopedia of Ecology, Five-Volume Set* [online]. 2511–2518. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045405-4.00280-9
- WERKNEH, Adhena Ayaliew a Eldon R. RENE, 2019. Applications of Nanotechnology and Biotechnology for Sustainable Water and Wastewater Treatment. *Energy, Environment, and Sustainability* [online]. , 405–430. ISSN 25228374. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3259-3\_19
- XIAO, Keke, Lu ZHOU, Beiping HE, Liang QIAN, Shuo WAN a Liping QU, 2016. Nitrogen and phosphorus removal using fluidized-carriers in a full-scale A2O biofilm system. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 115, 47–55. ISSN 1873295X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bej.2016.08.004
- XIE, Yixuan, Ajun WAN a Yunpeng WU, 2020. Numerical simulation and experimental investigation on the effect of a new suspended carrier filler on mass transfer in MBBR. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* [online]. 156, 108104. ISSN 02552701. Dostupné z: doi:10.1016/j.cep.2020.108104

- XING, Wei, Jinlong LI, Peng LI, Chong WANG, Yanan CAO, Desheng LI, Yunfeng YANG, Jizhong ZHOU a Jiane ZUO, 2018. Effects of residual organics in municipal wastewater on hydrogenotrophic denitrifying microbial communities. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 65, 262–270. ISSN 1001-0742. Dostupné z: doi:10.1016/J.JES.2017.03.001
- YAO, Qian a Dang Cong PENG, 2017. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants. *AMB Express* [online]. 7(1). ISSN 21910855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-017-0328-y
- YENER, F. a O. JIRSAK, 2012. Comparison between the needle and roller electrospinning of polyvinylbutyral. *Journal of Nanomaterials* [online]. 2012. ISSN 16874110. Dostupné z: doi:10.1155/2012/839317
- YOUNG, Bradley, Robert DELATOLLA, Kevin KENNEDY, Edith LAFLAMME a Alain STINTZI, 2017. Low temperature MBBR nitrification: Microbiome analysis. *Water Research* [online]. 111, 224–233. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2016.12.050
- YU, Hui, Xin YE, Lijuan FENG, Jingyi YANG, Zeyu LAN, Chengzhe REN, Wenzhuo ZHU, Guangfeng YANG a Jiaheng ZHOU, 2021. Dynamics of denitrification performance and denitrifying community under high-dose acute oxytetracycline exposure and various biorecovery strategies in polycaprolactone-supported solid-phase denitrification. *Journal of Environmental Management* [online]. 279, 111763. ISSN 0301-4797. Dostupné z: doi:10.1016/J.JENVMAN.2020.111763
- ZHANG, Miao, Jing GAO, Yajun FAN, Quanlong LIU, Chenjie ZHU, Liying GE, Chengda HE a Jun WU, 2021. Comparisons of nitrite accumulation, microbial behavior and nitrification kinetic in continuous stirred tank (ST) and plug flow (PF) moving bed biofilm reactors. *Chemosphere* [online]. 278. ISSN 18791298. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.130410
- ZHANG, Miao, Meng YU, Yixin WANG, Chengda HE, Jingjin PANG a Jun WU, 2019. Operational optimization of a three-stage nitrification moving bed biofilm reactor (NMBBR) by obtaining enriched nitrifying bacteria: Nitrifying performance, microbial community, and kinetic parameters. *Science of the Total Environment* [online]. 697, 134101. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134101
- ZHANG, Wenxiang a Feng JIANG, 2019. Membrane fouling in aerobic granular sludge (AGS)-membrane bioreactor (MBR): Effect of AGS size. *Water Research* [online]. 157, 445–453. ISSN 18792448. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2018.07.069
- ZHAO, Yingxin, Duo LIU, Wenli HUANG, Ying YANG, Min JI, Long Duc NGHIEM, Quang Thang TRINH a Ngoc Han TRAN, 2019. *Insights into biofilm carriers for biological wastewater treatment processes: Current state-of-the-art, challenges, and opportunities* [online]. B.m.: Elsevier Ltd. ISSN 18732976. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2019.121619
- ZHOU, Sihan, Bing GENG, Mengjie LI, Zhanbiao LI, Xue LIU a Hui GUO, 2021. Comprehensive analysis of environmental factors mediated microbial community succession in nitrogen conversion and utilization of ex situ fermentation system. *Science of The Total Environment* [online]. 769, 145219. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/J.SCITOTENV.2021.145219

## Přílohy

**Příloha 1** Chemické parametry naměřené v nátoku, v odtoku z kolony a v reaktoru pro první pilotní test mikrovláknenných nosičů biomasy

Datum	Nátok NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	Odtok NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	Teplota [°C]	Odtok NO <sub>2</sub> -N [mg/l]	Průtok [l/Den]	Doba zdržení [h]	Kyslík [mg/l]
28.01.2021	4,6	0,44	-	-	20	18	-
29.01.2021	4,2	0,35	-	-	-	-	-
31.01.2021	6,0	2,80	-	-	19	19	-
01.02.2021	9,1	6,48	-	-	24	15	-
02.02.2021	3,8	1,62	14,2	-	25	14	-
03.02.2021	3,6	0,14	15,5	-	18	20	-
04.02.2021	3,0	0,27	15,2	-	20	18	-
05.02.2021	1,7	0,44	15,0	-	22	16	-
06.02.2021	4,2	0,07	14,6	-	24	15	-
07.02.2021	1,9	0,27	9,3	-	26	14	-
08.02.2021	3,7	0,40	9,2	-	-	-	-
09.02.2021	3,2	0,10	11,3	-	27	13	-
10.02.2021	2,3	0,08	11,4	-	9	40	-
11.02.2021	3,6	0,19	11,7	-	28	13	-
12.02.2021	3,2	0,13	12,1	-	34	11	-
13.02.2021	2,1	0,11	12,2	-	55	7	-
14.02.2021	3,5	0,84	11,8	-	57	6	-
15.02.2021	0,6	0,04	10,4	-	120	3	-
16.02.2021	2,1	0,11	11,1	-	60	6	-
17.02.2021	3,8	0,18	15,2	0,40	58	6	-
18.02.2021	4,5	0,15	14,9	0,27	55	7	-
19.02.2021	3,5	0,05	16,4	0,18	55	7	-
20.02.2021	4,3	0,05	16,8	0,11	35	10	-
21.02.2021	3,6	0,03	16,9	0,02	35	10	-
22.02.2021	0,5	0,02	16,9	0,02	35	10	-
23.02.2021	3,9	0,09	16,8	0,05	35	10	-
25.02.2021	3,7	0,05	17,0	0,02	43	8	-
26.02.2021	3,2	0,03	17,2	0,07	-	-	-
28.02.2021	2,6	0,03	14,6	0,06	50	7	-
01.03.2021	4,9	0,02	13,1	0,04	45	8	-
02.03.2021	4,3	0,04	11,5	0,03	48	8	-
03.03.2021	3,1	0,10	12,2	0,04	-	-	-
05.03.2021	2,8	0,03	11,9	0,02	-	-	-
06.03.2021	2,7	0,14	12,2	0,04	60	6	-
07.03.2021	1,1	0,05	12,7	0,03	58	6	-
08.03.2021	3,8	0,15	12,4	0,06	58	6	-
09.03.2021	3,9	0,20	9,6	0,05	65	6	-
10.03.2021	6,3	0,27	11,6	0,08	100	4	-
11.03.2021	4,2	0,33	13,9	0,16	85	4	-

12.03.2021	1,4	0,25	14,2	0,15	85	4	-
13.03.2021	9,0	1,41	13,6	0,16	90	4	-
14.03.2021	8,9	0,39	13,1	-	120	3	-
15.03.2021	5,2	0,16	13,8	0,12	85	4	-
17.03.2021	6,3	0,31	12,3	0,15	-	-	-
18.03.2021	7,0	0,29	-	0,14	90	4	-
20.03.2021	12,5	0,80	8,1	-	90	4	-
21.03.2021	8,2	0,10	10,5	-	90	4	-
22.03.2021	4,8	0,02	11,7	-	90	4	-
23.03.2021	12,4	0,13	13,0	-	100	4	9,7
24.03.2021	10,7	0,11	13,4	0,15	-	-	9,8
25.03.2021	9,7	0,13	14,6	-	120	3	9,5
26.03.2021	7,5	0,05	16,4	-	120	3	9,1
27.03.2021	9,6	0,13	17,0	-	150	2,4	8,8
28.03.2021	1,3	0,02	14,3	-	150	2,4	9,4
31.03.2021	4,4	0,10	18,0	0,10	150	2,4	-
02.04.2021	8,0	1,50	-	0,36	150	2,4	7,8
04.04.2021	8,2	0,44	-	0,21	150	2,4	-
06.04.2021	7,7	0,46	12,1	0,24	-	-	9,9
08.04.2021	8,8	0,31	12,8	0,29	150	2,4	9,9
10.04.2021	10,1	0,11	16,1	-	150	2,4	9,7
11.04.2021	9,1	0,12	14,9	-	150	2,4	9,7
14.04.2021	8,5	0,30	-	0,17	-	-	-
15.04.2021	8,4	0,65	12,8	0,22	150	2,4	9
17.04.2021	12,0	0,19	13,5	-	150	2,4	7,7
18.04.2021	8,1	0,20	15,5	-	150	2,4	8,9
22.04.2021	8,8	0,34	-	0,18	-	-	9,1
24.04.2021	19,6	0,12	15,3	-	-	-	9,4
25.04.2021	16,7	0,13	14,6	-	150	2,4	9,5
27.04.2021	10,5	1,50	13,2	-	180	2,0	9,35
28.04.2021	10,8	1,61	14,4	-	180	2,0	9,07
29.04.2021	12,5	0,78	17,3	-	190	1,9	8,33
30.04.2021	12,0	1,16	17,5	-	190	1,9	7,86
03.05.2021	10,7	0,21	16,8	-	190	1,9	9,48
04.05.2021	8,8	0,82	16,3	-	190	1,9	8,34
05.05.2021	11,2	1,91	17,4	-	300	1,2	8,52
06.05.2021	8,9	0,83	15,5	-	250	1,4	7,73
07.05.2021	9,3	0,93	16,8	-	250	1,4	8,14
08.05.2021	5,6	0,22	15,5	-	230	1,6	7,95
09.05.2021	19,6	0,31	16,3	-	250	1,4	8,05
10.05.2021	9,9	0,59	18,4	-	250	1,4	7,45
11.05.2021	12,9	1,43	20,5	-	250	1,4	6,59
12.05.2021	7,0	0,14	21,5	-	250	1,4	7,23
13.05.2021	8,6	0,64	-	-	-	-	8,5
14.05.2021	9,2	0,44	18,5	-	250	1,4	8,4
17.05.2021	11,5	2,76	19,9	-	250	1,4	7,84

18.05.2021	9,1	2,00	18,8	-	250	1,4	8,15
19.05.2021	6,7	1,02	19,0	-	250	1,4	8,26
20.05.2021	9,0	2,31	18,6	-	250	1,4	8,42
21.05.2021	9,0	1,07	18,9	-	250	1,4	8,16
22.05.2021	20,6	0,38	19,2	-	250	1,4	8,13
23.05.2021	3,0	0,75	19,1	-	250	1,4	8,32
24.05.2021	5,7	0,27	19,1	-	250	1,4	8,92
25.05.2021	9,2	1,13	20,4	-	250	1,4	8,13
26.05.2021	8,5	0,52	18,4	-	250	1,4	8,99
27.05.2021	9,8	0,59	18,2	-	-	-	8,45
28.05.2021	8,6	0,31	18,9	-	250	1,4	8,48
29.05.2021	3,6	0,16	18,3	-	250	1,4	8,84
30.05.2021	2,3	0,04	18,3	-	250	1,4	8,99
01.06.2021	2,0	0,04	20,2	-	250	1,4	8,67
02.06.2021	4,2	0,15	20,6	-	-	-	8,6
03.06.2021	2,6	0,05	20,2	-	250	1,4	8,68
04.06.2021	1,9	0,02	21,5	-	250	1,4	8,49
06.06.2021	13,3	0,09	22,9	-	-	-	8,46
07.06.2021	4,5	0,17	22,7	-	-	-	8,18
08.06.2021	7,6	2,14	23,2	-	-	-	8,01
09.06.2021	3,4	0,06	23,3	-	250	1,4	8,12
10.06.2021	2,4	0,04	23,5	-	-	-	8,19
11.06.2021	2,9	0,04	23,4	-	250	1,4	8,1
12.06.2021	3,7	0,04	24,0	-	-	-	8,11
13.06.2021	4,2	0,05	23,5	-	-	-	8,12
14.06.2021	2,9	0,08	23,2	-	-	-	8,19
15.06.2021	3,6	0,11	22,7	-	300	1,2	8,15
16.06.2021	1,7	0,02	24,1	-	300	1,2	8,04
17.06.2021	3,0	0,06	24,2	-	-	-	7,93
18.06.2021	3,0	0,05	25,0	-	300	1,2	7,8
19.06.2021	8,6	0,04	26,2	-	300	1,2	7,78
20.06.2021	8,5	0,04	26,4	-	300	1,2	7,65
21.06.2021	8,0	0,02	27,2	-	300	1,2	7,54
22.06.2021	4,8	0,02	25,3	-	300	1,2	7,86
23.06.2021	4,6	0,06	24,5	-	300	1,2	8,05
24.06.2021	5,7	0,05	24,8	-	300	1,2	8,21
25.06.2021	-	0,05	24,2	-	-	-	8,26
27.06.2021	-	0,03	24,1	-	300	1,2	8,28
28.06.2021	-	0,19	24,4	-	300	1,2	8,06
29.06.2021	-	0,11	24,2	-	-	-	8,14
30.06.2021	-	0,02	23,9	-	300	1,2	7,96
01.07.2021	-	0,18	23,5	-	300	1,2	8,36
02.07.2021	-	0,23	23,7	-	300	1,2	8,34
03.07.2021	-	0,50	23,6	-	300	1,2	8,33
04.07.2021	-	0,35	24,1	-	300	1,2	8,27
05.07.2021	-	0,50	24,2	-	300	1,2	8,28

06.07.2021	-	0,41	26,1	-	300	1,2	7,97
07.07.2021	-	0,05	24,8	-	-	-	8,05
08.07.2021	-	0,05	24,5	-	-	-	8,21
09.07.2021	-	0,03	24,1	-	-	-	8,26
10.07.2021	-	0,05	24,0	-	-	-	8,36

**Příloha 2** Chemické parametry naměřené během pilotního testování finálních mikrovlákných nosičů ve velkoobjemovém MBBR reaktoru

Datum	Nátok NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	Odtok NH <sub>4</sub> -N [mg/l]	Teplota [°C]	Průtok [l/h]	Doba zdržení [h]	Kyslík [mg/l]
04.11.2021	5	>3	-	42	6	-
09.11.2021	5	0,619	-	42	6	9,00
15.11.2021	5	0,055	19,4	42	6	9,04
22.11.2021	5	1,410	18,9	42	6	9,22
27.11.2021	5	0,518	20,1	42	6	8,62
29.11.2021	5	0,056	19,4	42	6	8,96
30.11.2021	5	0,132	19,2	42	6	9,06
02.12.2021	5	0,141	19,3	42	6	8,97
03.12.2021	5	0,807	19,4	42	6	9,14
07.12.2021	5	0,363	19,4	42	6	9,11
09.12.2021	5	0,658	19,4	42	6	8,98
10.12.2021	5	0,056	19,1	42	6	8,97
13.12.2021	5	0,456	19,7	42	6	9,38
14.12.2021	5	0,455	19,4	42	6	9,45
17.12.2021	5	0,009	19,9	42	6	9,08
18.12.2021	5	0,012	19,0	42	6	9,14
20.12.2021	5	0,038	19,4	42	6	9,13
22.12.2021	5	0,091	19,0	42	6	9,27
23.12.2021	5	0,634	18,2	42	6	9,47
28.12.2021	5	3,130	18,5	42	6	9,40
30.12.2021	5	0,616	19,4	42	6	9,04
31.12.2021	5	0,261	19,9	42	6	9,05
03.01.2022	5	0,364	19,1	42	6	9,21
04.01.2022	5	1,810	18,8	42	6	9,57
05.01.2022	5	1,020	19,2	42	6	8,95
06.01.2022	5	0,310	18,1	42	6	9,27
07.01.2022	5	0,326	17,7	42	6	9,43
10.01.2022	5	0,327	18,6	42	6	9,19
11.01.2022	5	0,223	18,6	42	6	9,31
12.01.2022	5	0,235	17,9	42	6	9,45
13.01.2022	5	0,234	17,3	96	2,6	9,62
14.01.2022	5	0,021	17,4	96	2,6	9,59
17.01.2022	5	0,022	17,4	96	2,6	9,46
19.01.2022	5	0,302	17,9	96	2,6	9,33
21.01.2022	5	0,056	17,4	96	2,6	9,46
24.01.2022	5	0,383	17,8	96	2,6	9,44
25.01.2022	5	0,168	18,3	96	2,6	9,22
26.01.2022	5	0,237	17,9	96	2,6	9,24
27.01.2022	5	0,238	17,4	96	2,6	9,22
28.01.2022	5	0,154	17,2	96	2,6	9,29
31.01.2022	5	0,247	17,6	96	2,6	9,10

02.02.2022	5	0,199	17,3	96	2,6	9,18
03.02.2022	5	0,195	17,5	96	2,6	9,20
04.02.2022	5	0,176	17,9	96	2,6	9,15
14.02.2022	5	0,127	17,7	96	2,6	9,26
15.02.2022	5	0,141	17,8	96	2,6	9,23
16.02.2022	5	0,141	17,7	96	2,6	9,25
17.02.2022	5	0,144	18,2	96	2,6	9,00
18.02.2022	5	0,194	18,3	96	2,6	9,25
21.02.2022	5	0,128	18,3	96	2,6	9,10
22.02.2022	5	0,145	18,5	96	2,6	9,32
23.02.2022	5	0,177	17,6	96	2,6	9,45
25.02.2022	5	0,166	17,4	96	2,6	9,20
28.02.2022	5	0,108	17,3	96	2,6	9,25
01.03.2022	5	0,052	17,9	96	2,6	9,40
02.03.2022	5	0,083	18,0	96	2,6	9,22
03.03.2022	5	0,254	17,5	96	2,6	9,05
04.03.2022	5	0,121	17,4	96	2,6	9,25
07.03.2022	5	0,180	17,6	120	2,1	9,17
08.03.2022	5	0,089	17,4	120	2,1	9,22
09.03.2022	5	0,061	17,4	120	2,1	9,08
10.03.2022	5	0,125	18,0	120	2,1	9,15
11.03.2022	5	0,072	17,4	120	2,1	9,29
14.03.2022	5	0,012	17,7	120	2,1	9,94
16.03.2022	5	0,923	17,8	120	2,1	9,10
17.03.2022	5	0,171	18,1	120	2,1	8,92
21.03.2022	5	1,090	17,9	200	1,3	9,70
22.03.2022	5	0,003	18,4	200	1,3	9,22
24.03.2022	5	1,320	19,2	200	1,3	6,72
28.03.2022	5	0,765	19,5	150	1,6	5,20
29.03.2022	5	3,170	19,2	150	1,6	6,25
30.03.2022	5	1,000	19,7	150	1,6	6,13
31.03.2022	5	0,054	19,5	150	1,6	6,10
01.04.2022	5	0,179	18,7	150	1,6	7,15
02.04.2022	5	0,490	18,5	150	1,6	6,75
04.04.2022	5	0,484	19,6	150	1,6	7,29
05.04.2022	5	0,372	17,3	150	1,6	6,60
07.04.2022	5	0,068	17,5	150	1,6	9,20
08.04.2022	5	3,500	17,7	150	1,6	8,77
11.04.2022	5	2,000	18,5	150	1,6	8,39
12.04.2022	5	0,024	18,7	150	1,6	7,71
13.04.2022	5	0,025	18,8	150	1,6	8,35
14.04.2022	5	0,014	18,9	150	1,6	9,27
17.04.2022	5	0,477	18,3	150	1,6	8,33
19.04.2022	5	0,105	18,5	150	1,6	7,67
20.04.2022	5	0,442	18,7	150	1,6	6,30
21.04.2022	5	0,169	19,0	150	1,6	6,05
22.04.2022	5	0,305	18,7	150	1,6	6,35



25.04.2022	5	0,179	19,2	150	1,6	6,24
26.04.2022	5	0,256	19,3	150	1,6	6,13
27.04.2022	5	0,343	19,7	150	1,6	6,00
28.04.2022	5	0,023	19,9	150	1,6	6,43
29.04.2022	5	0,027	20,0	150	1,6	6,83
05.05.2022	5	0,025	22,6	150	1,6	7,87
06.05.2022	5	0,027	22,7	150	1,6	6,31
09.05.2022	5	0,574	22,8	150	1,6	5,42
10.05.2022	5	0,314	22,4	150	1,6	6,90
12.05.2022	5	0,455	22,6	150	1,6	6,83
13.05.2022	5	0,602	22,7	150	1,6	6,63
16.05.2022	5	0,025	23,1	150	1,6	5,69
17.05.2022	5	0,324	23,1	150	1,6	5,84
19.05.2022	5	0,257	23,6	150	1,6	6,75
20.05.2022	5	0,258	23,8	150	1,6	6,66
25.05.2022	5	1,030	24,2	150	1,6	7,01
26.05.2022	5	0,024	24,1	150	1,6	6,77
27.05.2022	5	0,331	23,8	150	1,6	6,75
30.05.2022	5	0,276	23,1	150	1,6	7,15
31.05.2022	5	0,340	22,4	150	1,6	6,74
01.06.2022	5	0,357	23,8	150	1,6	6,79
02.06.2022	5	0,093	23,2	150	1,6	7,21
03.06.2022	5	0,121	23,1	150	1,6	7,41
06.06.2022	5	2,920	24,4	150	1,6	7,19
07.06.2022	5	0,248	24,8	150	1,6	7,07
08.06.2022	5	0,607	24,7	150	1,6	7,26
09.06.2022	5	0,121	24,6	150	1,6	7,49
10.06.2022	5	0,126	24,4	150	1,6	7,37
13.06.2022	5	0,481	24,7	150	1,6	6,77
14.06.2022	5	0,025	24,6	150	1,6	7,02
15.06.2022	5	0,457	24,1	150	1,6	6,99
16.06.2022	5	0,395	24,5	150	1,6	6,95
17.06.2022	5	0,622	24,4	150	1,6	3,76
20.06.2022	5	0,270	25,6	150	1,6	2,95
21.06.2022	5	0,189	24,8	150	1,6	4,60
24.06.2022	5	0,055	25,1	150	1,6	4,66
27.06.2022	5	0,512	25,8	150	1,6	4,86
28.06.2022	5	0,400	26,0	150	1,6	5,11
29.06.2022	5	0,122	25,8	150	1,6	5,20
30.06.2022	5	0,423	25,8	150	1,6	5,62
01.07.2022	5	0,173	25,6	150	1,6	5,66
04.07.2022	5	0,334	26,0	150	1,6	5,76
17.07.2022	5	0,003	25,3	150	1,6	7,29
18.07.2022	5	1,450	25,1	200	1,2	6,67
19.07.2022	5	0,817	25,5	200	1,2	5,86