

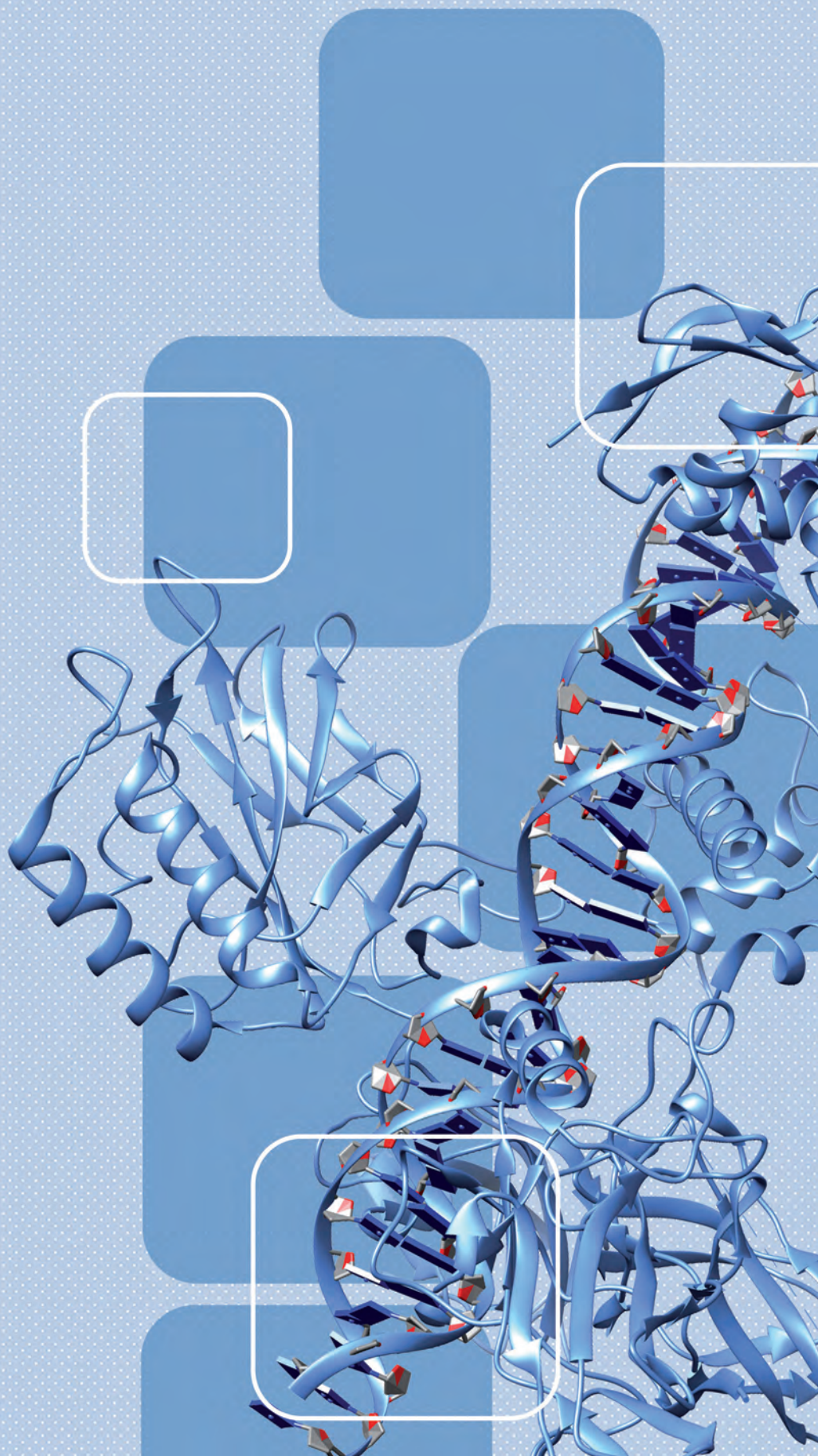
# Bio

Ročník 34 • Číslo 3-4/2024

# prospect

**BULLETIN  
BIOTECHNOLOGICKÉ  
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena  
Českého svazu  
vědeckotechnických  
společností (ČSVTS)  
a  
člena „European  
Federation  
of Biotechnology“  
(EFB)





# Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.  
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: [danka.pokorna@vscht.cz](mailto:danka.pokorna@vscht.cz), IČO 00570397,  
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

---

## **BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY**

**founding member of the Czech Association of Scientific  
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and**

**member of European Federation of Biotechnology  
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

**For more information contacts the editorial board or directly:**

Assoc. Prof. Dana Pokorna, PhD  
UCT Prague  
+420 220 443 151

# ÚVODEM

Vážení přátelé,

vítáme Vás v letošním posledním dvojčísle našeho Bioprospectu. Jak jsme Vás již informovali v prvním čísle došlo v návalu práce k rozpadu redakční rady a především k nedostatku vhodných příspěvků vzhledem ke zvýšenému pracovnímu vytížení zájemců o biotechnologie. Apelujeme proto na všechny zájemce o biotechnologie, aby si našli čas na krátké příspěvky a umožnili pravidelné vycházení 4 čísel v příštím, již 35 ročníku Bioprospectu.

Podnětů pro zajímavé články je jistě hodně a zejména v oblasti proteinů. Královská švédská akademie věd udělila Nobelovu cenu za rok 2024 z jedné poloviny Davidu Bakerovi za „počítačový návrh proteinů“ a z druhé poloviny Demisi Hassabisovi a Johnu M. Jumperovi za „predikci struktury proteinů“. Ti na to využili umělou inteligenci. Tyto objevy otevírají ohromnou perspektivu v léčbě nejrůznějších nemocí a vytváření nových materiálů. Hassabis a Jumper objevili „model umělé inteligence nazvaný AlphaFold2 pomocí nějž předpověděli

strukturu 200 milionů proteinů, které byly dosud identifikovány. Tento model mohou používat vědci ve svých výzkumech zcela zdarma.

Žádáme všechny zájemce o biotechnologie, aby nám pomohli opět obnovit pravidelné vycházení našeho Bioprospectu a podíleli se na vytvoření nové aktivní redakční rady.

I v letošním roce zůstávají členské příspěvky nezměněné a činí 300 Kč, respektive 150 Kč pro studenty a důchodce. Příslušnou částku, prosím, poukažte na bankovní účet společnosti 19534-061/0100 pod VS, kterým je Vaše členské číslo. To je součást adresy nebo jej můžete zjistit na adrese [Danka.Pokorna@vscht.cz](mailto:Danka.Pokorna@vscht.cz).

V závěru mého krátkého úvodu letošního posledního čísla Bioprospectu bych rád Vám všem popřál pevné zdraví a úspěšné zvládnutí všech Vašich osobních a profesionálních aktivit.

Jan Káš  
a všichni aktivní členové  
Biotechnologické společnosti





# NOBELOVA CENA PRO BAKERA, HASSABISE A JUMPERA NENÍ VELKÉ PŘEKVAPENÍ

Michal H. Kolář, Jakub Dražanský

Ústav fyzikální chemie VŠCHT Praha; Oddělení komunikace VŠCHT Praha

Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

michal1.kolar@vscht.cz

Situaci ohledně udělení Nobelovy ceny za chemii 2024 ze svého pohledu vysvětluje a popisuje docent Michal H. Kolář z Ústavu fyzikální chemie VŠCHT Praha. Vysvětluje, v čem jsou objevy tří oceněných výjimečné a proč není udělením ceny vědecká komunita zaskočena. Dodává k tématu poctivou dávku vhledů a souvislostí.

Nobelovy ceny za chemii 2024 byly uděleny za dva objevy, které spolu souvisí, ale probíhaly v rozdílných kontextech. David Baker z University of Washington, USA ji dostal za racionální design a syntézu proteinů. Snahy jeho týmu trvaly přes dvacet let, během nichž se tým snažil vymyslet nové typy proteinů. Druhá část Nobelovy ceny, kterou dostal Demis Hassabis a John M. Jumper ze společnosti DeepMind, byla udělena za výpočetní nástroj AlphaFold, který nejenže usnadnil samotný design proteinů, ale také zásadně změnil způsob, jakým dnešní vědci o struktuře proteinů přemýšlejí.

Proteiny jsou biopolymery, tedy v přírodě se vyskytující molekuly složené z univerzálních stavebních kamenů, tzv. monomerů. Buňky běžně využívají 20–22 typů monomerních jednotek. Proteiny jsou lineární, tedy nevětvené řetězky, složené typicky z 300 monomerů. Už od 70. let 20. století je známo, že pořadí monomerů definuje jednu konkrétní trojrozměrnou strukturu proteinu. K nevyřešeným otázkám patřilo, jak ze známého pořadí monomerů určit trojrozměrnou strukturu. 3D struktura proteinů zároveň určuje jeho funkci. A svou funkci může plnit pouze tehdy, pokud je protein sbalený správně.

Přírodní proteiny lze klasifikovat do několika stovek tříd. Davida Bakera zajímalo, jak v laboratoři vytvořit protein libovolného tvaru mimo známé třídy a jak mít kontrolu nad některými jeho vlastnostmi. Kromě 3D tvaru chtěl např. ovládat elektrický náboj na povrchu proteinu. Nejedná se o snadný úkol, neboť ke sbalení nedochází náhodně, nýbrž na základě složité sítě fyzikálních interakcí mezi monomery. Tým Davida Bakera navrhl několik výpočetních metod, které se snoubily v balíku Rosetta, a to mnohem dříve, než v DeepMind navrhli AlphaFold.

Kromě výpočetního designu proteinů Baker proteiny také syntetizoval a ukázal, že mohou mít uplatnění jako biosenzory nebo pokročilé nanomateriály.

O generaci mladší Hassabis se proteiny nezabýval. Formální vzdělání má v počítačových vědách a pracoval jako softwarový inženýr, který se soustředil na hluboké neuronové sítě. Za ty byla mj. udělena letošní Nobelova cena za fyziku J. Hopfieldovi a G. Hintonovi. Hassabis pracoval v londýnském startupu DeepMind, který později přešel pod křídla společnosti Alphabet (vlastní

mj. i vyhledávač Google). DeepMind se proslavil algoritmem AlphaGo, který hraje deskovou hru Go pomocí principů strojového učení, přičemž se ukázalo, že podobnou strategii lze použít pro řešení problému trojrozměrné struktury proteinů.

V predikování 3D struktury proteinů probíhá pravidelně soutěž CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction). V soutěži jsou vyhlášeny sekvence několika proteinů. Organizátoři zároveň určí 3D struktury experimentálně, ale při vyhlášení soutěže je nezveřejní. Laboratoře po celém světě se pak mohou do soutěže přihlásit a ze známých sekvencí predikovat 3D struktury. Po uzavření přihlášek se predikce porovnají s experimentálními strukturami a určí se pořadí. První verze AlphaFold z dílny DeepMind nedopadla ve 13. kole soutěže v roce 2018 vůbec špatně. Při dalším kole v roce 2020 už druhá verze, AlphaFold2, vyhrála takřka jako parník. Celá komunita byla z výsledků u vytržení a prakticky okamžitě pochopila, že se jedná o vyřešení asi 50 let starého problému. Se zveřejněním jejich algoritmu autoři zveřejnili predikce trojrozměrných struktur pro všechny lidské proteiny, a později i databázi predikcí pro asi 200 milionů známých proteinových sekvencí. AlphaFold2 (a jeho třetí verze) jsou navíc volně dostupné na internetu a může je proto použít každý. Revoluce v úvahách o proteinech byla dokonána a odrazila se napříč přírodovědnými obory od molekulární biologie po medicínskou chemii.

Třetím oceněným je J. M. Jumper, hlavní autor publikace o algoritmu AlphaFold2. Práce nese i českou stopu – mezi spoluautory publikace i algoritmu figuruje Čech Augustin Žídek. Jumper Nobelovu cenu získal jen několik let po doktorátu (dokončil je v roce 2017), navíc za práci, jejíž stěžejní část byla publikována v roce 2021. Není to časté, aby nobelovský výbor ocenil takto čerstvé objevy. Pro srovnání, letošní Nobelovu cenu za fyziologii nebo medicínu získali vědci za objev mikroRNA publikovaný poprvé v roce 1993.

Dopad algoritmu AlphaFold je masivní, proto se i na VŠCHT Praha snažíme seznámit studenty a studentky s jeho fungováním. Součástí základního kurikula několika bakalářských programů je předmět Počítačová chemie, který právě letos prochází revizí. Cílem je zprostředkovat studentstvu osobní zkušenost s algoritmy strojového učení jako je AlphaFold. Nobelovský výbor nám jde udělením letošních cen za chemii na ruku. Motivovat studenty a studentky bude myslím o mnoho snazší.

*původně publikováno na [www.vscht.cz](http://www.vscht.cz)*

# TECHNOLOGIE PŘÍPRAVY „ZELENÉHO“ ČPAVKU JAKO ZDROJE ENERGIE

Václav Švorčík

Ústav inženýrství pevných látek, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice  
vaclav.svorcik@vscht.cz

Profesor Václav Švorčík vede projekt **NH<sub>3</sub> Plazmon** – Vývoj pokročilých fotokatalytických technologií pro nízkooenergetickou akumulaci a zpětnou konverzi energie ze „zeleného vodíku“ prostřednictvím amoniaku. v rámci programu Théta 2 od TAČR, Výsledkem řešení projektu by měla být metoda výroby amoniaku z mořské vody a vzduchu za využití slunečního záření. Tento projekt navazuje na běžící projekt H<sub>2</sub> Plazmon, v rámci programu Théta 1. Finance ve výši 43 mil. Kč získané na řešení projektu jsou výsledkem společného úsilí VŠCHT Praha, Elektrotechnické fakulty Západočeské univerzity v Plzni, Přírodovědecké fakulty Univerzity Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, a firmy LISS, a. s., Rožnov pod Radhoštěm.

Jaká nás čeká budoucnost v energetice a jak k ní můžeme přispět? Lze získávat energii ze snadno dostupných zdrojů? Lidé to obecně svojí činností naší planetě moc neusnadňují. Vezměme si jako příklad tepelnou elektrárnu Počeradý, která vyrábí 7 – 8 % „české“ elektrické energie. Každých 20 minut se tam do kotlů vypaří 240 t uhlí, to znamená 700 t uhlí za hodinu.

Ropa a uhlí nám, jako lidstvu, chťe nechtě jednou dojde. Výzvou je, abychom připravili „nějakou chemikálii“, která by se dala použít jako palivo a aby zdroje pro přípravu nebo výrobu této chemikálie byly naprosto dostupné. Například k výrobě vodíku elektrolýzou je potřeba čistá voda. Nám se podařilo připravit struktury aktivované sluncem, které katalyzují štěpení i mořské vody. Motivací tedy je připravit ze vzduchu a běžně dostupné vody po ozáření sluncem amoniak pro výrobu hnojiv a paliva.

Proto se v posledních několika letech naše pracovní skupina zabývá studiem několika problematik, které jsou šetrné k životnímu prostředí a reagují na změnu klimatu. Vycházíme z toho, že na Zemi je snadno dostupná voda, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> a sluneční záření. Studujeme např. „umělou fotosyntézu“ (světlem stimulovaná interakce vody a CO<sub>2</sub>), kterou lze připravit methanol jako alternativu fosilních paliv a palivo do palivových článků). Dále sledujeme možnosti zachycení CO<sub>2</sub> pro konverzi epoxidů na karbonáty i při velmi nízkých teplotách. Končící projekt H<sub>2</sub> Plazmon popsal přípravu vodíku (a taky další vodíkové technologie) z dostupných surovin a za dostupných běžných podmínek. Vody je obecně na planetě dost a slunečního záření také. Jako modelový zdroj světla používáme lampu o výkonu 300 W/m<sup>2</sup>, která odpovídá intenzitě slunečního světla v ČR v zimě v pravé poledne. Voda, ze které získáváme vodík, přichází do kontaktu se speciální tenkou pokovenou podložkou, na kterou dopadá sluneční záření. V poslední tenké struktuře kovů (např. zlata) se půso-

bením slunečního záření vybudí elektrony. Excitované elektrony v kovu se dostanou do vedlejší vrstvy redox-aktivní látky/materiálu, katalyzují reakci a štěpí vodu na vodík a kyslík.

Základní myšlenka pro navazující projekt NH<sub>3</sub> Plazmon je obdobná. Využívá katalýzu, která je aktivovaná slunečním zářením a globálně dostupných surovin (tj. voda, kterou umíme štěpit na H<sub>2</sub>) a N<sub>2</sub>, kterého je v atmosféře 78 %). Naše první experimenty ukázaly, že ze vzdušného N<sub>2</sub> a H<sub>2</sub> z vody, katalyzované slunečním zářením za běžných pokojových teplot, lze připravit NH<sub>3</sub>. Tímto postupem připravujeme cca 25 ml NH<sub>3</sub> za 1 hod. Haberova-Boschova syntéza, která přeměňuje atmosférický N<sub>2</sub> na NH<sub>3</sub> reakcí s H<sub>2</sub> za vysokého tlaku a teploty a za přítomnosti kovového katalyzátoru. Ročně se vyrobí na světě ca 230 mil. tun NH<sub>3</sub>, který se z 80 % využívá na výrobu dusíkatých hnojiv (450 mil. t za rok). Výroba NH<sub>3</sub> spotřebovává cca 2 % celkové světové energie, což je ohromné množství. Uvádí se, že i díky této reakci, narostl počet obyvatel na Zemi oproti roku 1900 více než 4x. Haber v laboratoři v roce 1910 syntetizoval 125 ml NH<sub>3</sub> za 1 hod, takže naše úvodní srovnání vychází „rozumně“. V roce 1913 Bosh vyráběl ve firmě BASF již 20 t NH<sub>3</sub> za den.

Výhodou amoniaku, oproti vodíku, je že snadno dopravuje a skladuje (obdobně jako LPG) a využívá se zejména na výrobu hnojiv (asi 80 %), močoviny, kyseliny dusičné, polymerů a výbušnin. Vzhledem k rostoucí populaci a ubývající rozloze zemědělské půdy pro pěstování plodin jsou a budou hnojiva v podstatě nepostradatelnou součástí zemědělství na celém světě. Možnost vyrábět amoniak ekologičtější, energeticky šetrnější metodou za úplně běžných podmínek je to, co by měl projekt „světu přinést“.

Ideálním výsledkem projektu by tedy měla být zvládnutá technologie pro přípravu „zeleného“ čpavku na laboratorní úrovni za použití vzdušného dusíku, vody a slunečního světla. Naším hlavním úkolem je příprava katalyzátoru, který by syntézu umožňoval.

Čpavek, jako zdroj energie, se v palivovém článku „spálit“ nedá, tudíž musí být zase zpět rozložen na N<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>, který už je přímým zdrojem energie. Proto bychom chtěli dále připravit struktury, které by pomohly připravit „čistý“ dusík (aby se mohl vrátit do atmosféry) rozkladem čpavku. V současnosti se již vyrábějí palivové články pro lodě a nákladní tahače, které rozštěpí NH<sub>3</sub> na dusík a H<sub>2</sub>. H<sub>2</sub> se spaluje v palivovém článku, ale „vzniklý dusík“ není pouze N<sub>2</sub>.

Řešením tohoto projektu bychom chtěli přispět v oblasti energetiky k situaci, ve které se z pohledu omezených zdrojů energie v současnosti nacházíme.

# ANAEROBNÍ HOUBY U PŘEŽVÝKAVCŮ

Jan Kopečný

Laboratoř anaerobní mikrobiologie, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Praze; kopecnjy@iapg.cas.cz

## Úvod

Positivní a negativní interakce živých organismů mezi sebou jsou rozšířenou strategií pro přežití. Přežvýkavci jsou vrcholným příkladem holobiontů, kteří zahrnují organismy složené z více typů živočichů nebo rostlin, které díky svým unikátním vlastnostem žijí ve vzájemné symbióze. Mikrobiom přítomný v jejich předžaludcích je takovým příkladem koexistence hostitele a anaerobních prokaryotických a eukaryotických mikroorganismů, v našem případě bakterie, archaea, prvoků a anaerobních hub. Jednotlivé složky tohoto společenství jsou zaměřeny na rozklad rozdílných typů rostlinných pletiv, což jim umožňuje dokonale využívat rostlinnou potravu, a to v podstatně větší míře, než je to u většiny ostatních živočichů.

Většina výše uvedených skupin mikroorganismů mikrobiomu přežvýkavců se specializuje buď na rozklad jednotlivých pletiv rostlin, nebo jednotlivých polysacharidů, proteinů, lipidů či využití nízkomolekulárních metabolitů. Podíl jednotlivých skupin mikroorganismů na rozklad vlákniny rostlin se výrazně liší. Fibrolytické enzymy (celulázy nebo hemicelulázy) totiž vyššími obratlovci nesou vůbec syntetizovány. Proto mikroby, které vlákninu štěpí a metabolizují, jsou klíčem k využití sluneční energie uložené v rostlinné biomase.

## Vývoj post-gastrického trávení vlákniny

Složení potravy má vliv na strukturu a funkce trávicího ústrojí (Lu et al., 2011). Přijímání živin u jednoduchých mikrobů zpočátku probíhalo pasivním transportem nízkomolekulárních iontových látek otevřeným hydrofilním kanálovým proteinem a působením koncentračního gradientu. Ten se pak transformoval na aktivní transport pomocí transportních membránových proteinů pro přenos specifických látek, který ale potřebuje volnou energii získanou z ATP. Transportní proteiny jsou pro mnohé látky velmi specifické (Nikaido, 2003).

Trávicí trakt většiny obratlovců se vyvinul z jednoduché trubice, která se postupně přizpůsobovala požadavkům na efektivní trávení: rozžvýkání hrubé potravy, její promíchání se slinami s ptyalinem ( $\alpha$  amyláza) umožňující snadné polykání a následné trávení **škrobů**. Hydrolýza neutrálních jednoduchých **lipidů** s řetězci až střední délky dochází již v ústní dutině pomocí tzv. linguální (jazykové) lipázy, produkované Ebnerovými žlázami v zadní části jazyka. V žaludku je potrava následně okyselena HCl a proteiny hydrolyzovány **pepsinem** včetně kolagenu, který je vůči většině proteáz rezistentní. Hydrolýza **lipidů** pokračuje žaludeční lipázou, což je nejdůležitější preduodenální lipáza v lidském těle. Mastné kyseliny kratších řetězců, které se uvolňují, jsou vstřebávány sliznicí žaludku a vstupují do jaterního (portálního) oběhu zprostředkovaného vrátnicovou žílou. Slinivka produkuje enzymy **hydrolyzující sacharidy** na glukany a maltózu, (pankreatická amyláza), střevní stěna produkuje **další enzymy hydrolyzující poly- a oligosacharidy**. Zbylé **lipidy** jsou rozkládány

především pankreatickou lipázou a částečně enterickými lipázami střevní stěny. Slinivka produkuje rovněž proteázy trypsin, chymotrypsin, karboxypeptidázu a elastázu. Nukleové kyseliny jsou hydrolyzovány pankreatickými DNAsami a RNAsami.

Za pylorem ústí do duodena vývod slinivky břišní a žlučníku produkujícího žlučové kyseliny. Soli žlučových kyselin mají emulgační účinek na lipidy tráveniny a urychlují jejich hydrolýzu. Vedle toho jsou v duodenu produkovány fosfatázy, fosfolipázy, aminopeptidázy a dipeptidázy.

První vačnatci se svým post gastrickým trávením se vyvinuli ze savců kladoucí vejce (nyní jen ptakopysk, a ježury) již před 120 miliony lety. Toto uspořádání umožňuje trávení dobře stravitelných potravin, ale stabilita jejich střevního mikrobiomu není vysoká.

## Vznik a výhody pregastrického trávení

Vývoj přežvýkavců probíhal okolo 50 milionů let a některé druhy byly během posledních 10 tisíc let domestikovány (Hackmann et Spain, 2010). Evolučně nejstarší v současnosti žijící přežvýkavci patří k čeledi Kančílů – malí jelinci (max. 12 kg), kterých je v současnosti 9 druhů, vesměs z Afriky a východní Asie. Předžaludky jsou složené z evolučně nejstaršího **slezu**, u přežvýkavců následovalo oddělení **bachoru** spojeným s čepcem zajišťující intenzivní fermentaci polysacharidů a přispívající k promíchávání bachorového obsahu. Trávenina byla pasážována do **knihy**, sloužící k resorpci metabolitů, elektrolytů, minerálních látek a vody. K významným přežvýkavcům patří i velryby, srnci, jeleni, buvoli, turoviti, žirafy a okapi, kabary a vidlorozi, kozy a ovce.

Výhody pregastrického trávení se prokázaly během evoluce a v současnosti je popsáno 220 druhů sudokopytníků včetně – přežvýkavců, hrochů a velryb. Mnohé vývojové stupně během minulých 40 mil. let vyhynuly. Velikost a uspořádání jejich trávicího traktu je často závislé na jejich potravních preferencích k různým druhům rostlinného krmiva a jeho způsobu jeho nabytí (Ditchkoff, 2000). Přežvýkavci tak hrají významnou roli při přenosu sluneční energie fixované rostlinami na masožravé druhy a následně ostatní biosféru (Li et al. 2020)

Člověk se postupně začal zabývat intenzivním chovem přežvýkavců a v současnosti chová okolo 1,4 miliardy jedinců skotu, jak dojníc, tak i ostatních turů a jelenů.

## Vývoj pre-gastrického trávení vlákniny

První přežvýkavci se vyvinuli z malých (<5 kg) lesních všežravců před 50 miliony lety (Hackmann & Spain, 2010). Dnes existuje téměř 200 druhů rozdělených do 6 čeledí. Mnohé vývojové stupně během minulých 40 mil. let vyhynuly. Velikost a uspořádání jejich trávicího traktu je často závislé na jejich potravních preferencích ke koncentrátům, vláknitému krmivu nebo jejich směsi (Ditchkoff, 2000).



## Složení mikrobioty

**Bakterie** – nejpočetnější jsou anaerobní bachorové bakterie, které metabolizují monosacharidy a oligosacharidy, škroby, hemicelulózy, lipidy, celulózu, částečně i lignin, alkaloidy a rostlinné proteiny. Určité druhy uvolňují amoniak, methan a produkují vitamíny. Většina metabolických aktivit je produkována anaerobními bakteriemi. Odhaduje se, že z bachoru bylo izolováno 2500 bakterií v počtech přes  $10^{10}$  buněk/ml (Perez et al., 2024). Bakterie patří k nejstarším organismům nalézáných ve formě fosilií. Populaci bakterií provází široké spektrum bakteriofágů.

**Archaea** – bakteriím blízké jsou bachorová Archaea, což jsou organismy anaerobní, mezofilní či termofilní; reprezentované v bachoru pouze anaerobními methanogeny (Janssen and Kirs, 2008). Ty využívají bachorový  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ , které vznikají rozkladem hexos k produkci methanu (Pereira et al., 2022). Udržují tak nízký parciální tlak vodíku v prostředí a slouží tak jako redukční sink vodíku (odtok), který udržuje vysoký gradient vodíku a tím i rychlost degradace sacharidů. Bez nich by se glykolýza podstatně zpomalila, nebo zastavila. Vodík je klíčovým metabolitem v anaerobním prostředí.

**Prvoci** – okem viditelnou složkou bachorové mikrofauny jsou anaerobní prvoci. Jejich počty je možné stanovit pod mikroskopem v počítací komůrce. Velikostí se pohybují v intervalu 5 – 250  $\mu\text{m}$  (Hobson and Stewart, 1997). Jedná se především o cele obrvená *Holotricha* a částečně obrvená *Spirotricha* (dříve *Oligotricha*). Podílejí se na trávení rozpustných polysacharidů a proteinů krmiva a jsou náročnější na živiny. Využívají především rozpustné polysacharidy a proteiny rostlin (Church 1970).

## Literatura

Chen L. et al.: Large-scale ruminant genome sequencing provides insight into evolution and distinct traits. *Science*, 364, doi 10.1126/science.aav6202, (2019).

Church DC.: *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants*. (1,2), Corvallis, (1970).

Ditchkoff, SS.: *Oecologia*, 125: 82- 84 doi:10.1007/PL0000889, (2000).

Faichney GJ. et al.: Rumen physiology: the key to understanding the conversion of plants into animal products. *Aust. J. Agri. Res.*, 47(2): 163-174, doi.org/10.1071/AR9960163, (1996).

Gallaher TJ.: Grasses through space and time: An overview of the biogeographical and macroevolutionary history of Poaceae *J. Syst. & Evol.*, 60(3), 522 – 569, (2022).

Hackmann TJ, Spain JN. et al: *J. Dairy Sci.*, 93, 1320-1334, doi:10.3168/jds.2009-2071, (2010).

Hobson PN and Stewart CS: The Rumen Microbial Ecosystem. *Blackie Academic & Professional*. An Imprint of Chapman & Hall London – Weinheim. New York – Tokyo – Melbourne – Madras, (1997).

Hsiang T and Baillie DL: Comparison of the Yeast Proteome to Other Fungal Genomes to Find Core Fungal Gene, *J. Mol. Evol.*, 60:475–483, (2005).

**Anaerobní houby** – vyskytují se v trávicím traktu většiny býložravců a jsou poslední skupinou bachorových anaerobních mikroorganismů, které byly poprvé popsány před více než 50 lety, a to v bachoru ovcí (Orpin, 1970). Jejich role a význam nebyly dlouho doceněny. V bachorové tekutině jsou obtížně identifikovatelné, a proto jim nebyla věnována výraznější pozornost (Orpin, 1975). Popsání prvního druhu *Neocallimastix frontalis* bylo umožněno eliminací bakterií a Archaea antibiotiky (Joblin, 1981; Orpin, 1976). V té době již byly zvládnuty kultivace jak bachorových prvoků, tak i bakterií (Orpin, 1977).

Jejich evoluce je přímo spjata s expanzí trav v Paleogénu (Wang et al., 2019). Postupně se ukázalo, že tato skupina anaerobů hraje klíčovou roli při trávení rostlinné potravy přežvýkavců a umožňuje jim využít rostlinné složky krmiva. Evolučně se od ostatních hub oddělily před 635 – 541 miliony let a výrazně se diverzifikovaly v miocénu před 20 – 30 miliony let (Wang et al., 2019; Cheng et al., 2019). Pro tuto periodu je charakteristické globální oteplení a bouřlivý rozmach trav (Gallaher et al., 2022) a následně i diverzifikaci přežvýkavců (Toljagič et al., 2018). To je patrné i na jejich genomech. Genomy běžných hub mají velikost od 10 do 40 Mbp, oproti anaerobním houbám s maximou přes 100 Mbp (Hsiang et al., 2005). Rozdíl jde vesměs na vrub enzymům rozkládající rostlinné sacharidy (Wang et al., 2019). Jejich metabolom zaměřený na využívání širokého spektra rostlinných tkání tak výrazně přispěl k vzniku, prosazení a rozšíření přežvýkavců (Faichney, 1996). Následně díky jejich následné domestikaci došlo i k rozvoji zemědělství a následně i k rozvoji celé lidské kultury (Leroy et al., 2020).

Chapman and Hall: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Softcover reprint of the hardcover 2nd edition, doi:10.1007/978-94-009-1453-7, (1997).

Janssen, PH, Kirs M.: Structure of the Archaeal Community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(12), 3619–3625, doi: 10.1128/AEM.02812-07, (2008).

Joblin KN: Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(6), 1119-1122, doi: 10.1128/AEM.42. 6. 1119-1122.1981, (1981).

Leroy F, Hite AH, Gregorini P: Livestock in Evolving Foodscapes and Thoughtscapes. *Front. Sustain. Food Syst.*, 4, 105, doi:10.3389/fsufs.2020.00105, (2020).

Li Ch, Huang R, et al.: Organization of the *Addax major* histocompatibility complex provides insights into ruminant evolution. *Front. Immunol Feb.* 5:11:260, doi: 10.3389/fimmu.2020.00260, (2020).

Lu J, Wang ZY et al.: Effect of rice husk diluted dietary switching on body weight, carcass yield and digestive tract of adult ganders. *Arch. für Geflügelkunde*, 75(2):120-124, (2011).

Nikaido H.: Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656, (2003).

Orpin CG: Cultivation of ovals from ovine rumen. *J. gen. Microbiol.* 63, R12+, (1970).

Orpin CG: Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. gen. Microbiol.*, 91, 249 – 262, doi: 10.1099/00221287-91-2-249, (1975).

Orpin CG: Invasion of selected plant-tissues by rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. gen. Microb.* 98(2), 423-430, doi: 10.1099/00221287-98-2-423, (1976).

Orpin CG: The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life-history and invasion of Plant material in the rumen. *J. gen. Microb.*, 99 (1), 107-117, doi: 10.1099/00221287-99-1-107, (1977).

Perez HG, Stevenson CK, et al.: Understanding Rumen Microbiology: An Overview, *Encyclopedia 2024*, 4(1), 148-157; doi.org/10.3390/encyclopedia4010013, (2024).

Toljagic O, et al.: Millions of Millions of Years Behind: Slow Adaptation of Ruminants to Grasslands. *Syst Biol.* 67(1), 145 – 157, (2018).

Wang Y, et al.: Molecular Dating of the Emergence of Anaerobic Rumen Fungi and the Impact of Laterally Acquired Genes. *mSystems*, 4(4), e00247-19, (2019).

## Souhrn

Anaerobní houby reprezentují jednu z nejstarších skupin hub, kdy společný předek anaerobních hub se od hlavního vývojového stromu Říše Houby oddělil před asi 66 miliony let. Evoluce anaerobních hub je spojená s evolucí trav díky globálnímu oteplení v pozdní křídě. Jejich předkové se odděleně vyvíjeli v anaerobním prostředí v mořských sedimentech, což je prostředí s minimálními zdroji energie. Zde u anaerobních hub vznikly geny s širokou škálou substrátů, které jim umožnily i s těmito zdroji přežít.

Jejich genomy jsou dodnes (až 40-200 Mb) vesměs větší než u hub aerobních. Jedná se o nejrozsáhlejší genomy zaměřené především na degradaci rostlinné biomasy. Tyto vlastnosti anaerobní houby využily při kolonizaci trávicího traktu přežvýkavců, kterým pomohly k jejich prosazením v přírodě. Anaerobní houby v přírodě výrazně přispívají k uvolňování sluneční energie konzervované v rostlinné biomase pro ostatní živé organismy, což v dnešní době má globální význam. Vedle toho představují bohatý rezervoár genů pro manipulaci s rostlinnými tkáněmi.

**Klíčová slova:** anaerobní houby, sluneční energie, přežvýkavci, metan

## Summary

Anaerobic fungi represent one of the oldest groups of fungi. Their common ancestor split from the main evolutionary tree of the Fungi Kingdom about 66 million years ago. The evolution of anaerobic fungi is linked to the evolution of grasses due to global warming in the late Cretaceous. Their ancestors evolved separately in anaerobic environments in deep sea sediments, an environment with minimal energy resources. Here, anaerobic fungi produced genes for a wide variety of substrates that allowed them to survive, even with these resources.

Even today, their genomes (up to 40-200 Mb) are generally larger than those of aerobic fungi. These are the most extensive genomes focused primarily on the degradation of plant biomass. Anaerobic fungi used these properties when colonizing the digestive tract of ruminants, which they helped to establish in nature. Anaerobic fungi in nature significantly contribute to the release of solar energy conserved in plant biomass for other living organisms, which is of global importance today. In addition, they represent a rich reservoir of genes for plant tissue manipulation.

**Keywords:** anaerobic fungi, solar energy, ruminants, methane

# ANAEROBNÍ KOFERMENTACE BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÝCH ODPADŮ JAKO CESTA PRO ZVÝŠENÍ PRODUKCE BIOPLYNU

**Dominik Stránský<sup>1,2</sup>, Zuzana Sýkorová<sup>2</sup>, Martin Srb<sup>2</sup>, Pavel Jeníček<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice

<sup>2</sup>Pražské vodovody a kanalizace, Ke Kablu 971, 102 00 Praha 10  
stranskd@vscht.cz

## Úvod

S ohledem na novelu směrnice o čištění městských odpadních vod (91/271/EHS) se kladou nové požadavky na obor čištění odpadních vod, které by mělo do roku 2045 dosáhnout plné energetické soběstačnosti. Další povinností bude průběžné monitorování a zveřejňování údajů o jejich uhlíkové stopě. Tyto legislativní změny staví energetickou soběstačnost (čištění odpadních vod) ČOV do popředí odborných debat. Pro splnění těchto náročných cílů je nutné hledat řešení, která jsou jak ekonomicky výhodná, tak šetrná k životnímu prostředí.

Mezi diskutovanými přístupy k optimalizaci energetické bilance ČOV patří například využití odpadního tepla z přiváděné odpadní vody, instalace solárních panelů v areálech ČOV nebo navýšení produkce bi-

oplynu. Bioplyn je považován za klíčový prvek při snaze o dosažení energetické soběstačnosti ČOV, přičemž jeho produkci lze zvýšit prostřednictvím intenzifikace a optimalizace kalového hospodářství. Jednou z efektivních a dlouhodobě udržitelných přístupů je přidavek biologicky rozložitelného odpadu (BRO) do procesu anaerobní stabilizace čistírenských kalů (SS, anglicky *sewage sludge*). Tento článek se zabývá vlivem vybraných kosubstrátů a jejich organického zatížení na anaerobní kofermentaci s SS.

## Anaerobní kofermentace

Bioplyn představuje klíčový prvek energetického hospodářství ČOV a je produkován v průběhu anaerobní stabilizace SS. Jeho produkce na ČOV s dostatečnou kapacitou (pro implementaci anaerobního zpracování



SS) může zásadně ovlivnit energetickou bilanci (Mehariya, et al., 2018). Výzkumy potvrzují, že pokud jsou procesní parametry a technologické konfigurace optimálně nastaveny, může kalové hospodářství přispět k dosažení úplné energetické soběstačnosti městských ČOV (Wett, et al., 2007). Hlavní překážkou tohoto cíle je však složení SS, které obsahují velký podíl hůře biologicky rozložitelných organických látek (Mehariya, et al., 2018, Nghiem, et al., 2017). Přesto existuje několik způsobů, jak zvýšit produkci bioplynu a tím i zlepšit energetickou bilanci ČOV. Patří mezi ně například předúprava substrátů, optimalizace procesních parametrů nebo změna technologického uspořádání kalového hospodářství (Borja and Rincón, 2017, Nabaterega, et al., 2021, Wang, et al., 2023). Jedním ze slibných technologických opatření je také přidavek biologicky rozložitelného odpadu (BRO), jako jsou například potravinářské odpady (FW, anglicky *food waste*), do procesu anaerobní stabilizace. BRO obsahuje vysoký podíl snadno rozložitelných organických látek, které jsou snadno přeměněny na bioplyn a umožňují využít dosud nevyužitý energetický potenciál odpadu (Nghiem, et al., 2017). Tento přístup, označovaný jako anaerobní kofermentace (AcoD, anglicky *anaerobic co-digestion*), umožňuje společné zpracování dvou a více substrátů a představuje ekologicky i ekonomicky šetrnou variantu likvidace dalších odpadů. Její využití může významně přispět k dosažení energetické soběstačnosti ČOV, což odpovídá současným i budoucím požadavkům na efektivní a udržitelný provoz čistírenských zařízení (Iacovidou, et al., 2012).

FW představují jeden z nejvíce diskutovaných typů BRO. Podle aktuálních odhadů se očekává, že jejich celosvětová produkce bude nadále narůstat a do roku 2025 dosáhne přibližně 2,2 miliard tun ročně. S rostoucím objemem FW však narůstají i obavy z nesprávného nakládání s tímto druhem odpadu. V současnosti se FW nejčastěji ukládají na skládky nebo zpracovávají prostřednictvím termochemických metod, jako je spalování či hydrotermální procesy, nebo biologickými procesy. Skládkování FW představuje environmentální hrozbu, zejména kvůli emisím skládkových plynů, které přispívají ke kontaminaci ovzduší, a riziku znečištění podzemních vod, což může mít negativní dopad na lidské zdraví. Navíc je v současné legislativě skládkování BRO zakázáno. Termochemické metody sice umožňují likvidaci odpadu, ale jsou energeticky náročné a vedou ke ztrátě organického uhlíku, který by mohl být navrácen zpět na zemědělskou půdu. Naopak biologické procesy, jako je anaerobní fermentace nebo kompostování, se jeví jako efektivní a udržitelný způsob zpracování FW (Azarmanesh, et al., 2020). Pro společné zpracování FW a SS v rámci anaerobní stabilizace jsou FW vhodné zejména díky vysokému obsahu organických látek. FW obsahují převážně sacharidy, bílkoviny a lipidy, jejichž zastoupení se pohybuje v rozmezí 55,0 – 78,2 % u sacharidů, 14,4 – 21,3 % u bílkovin a 13,0 – 22,0 % u lipidů (vztaženo k sušině) (Azarmanesh, et al., 2023). Tato vysoká koncentrace organických látek přispívá k efektivní produkci bioplynu a podporuje využití FW jako cenného kosubstrátu.

Společné zpracování SS a externích organických odpadů je stále častěji vnímáno jako klíčová strategie pro dosažení energetické neutrality ČOV. AcoD přináší řadu výhod, jako je zvýšení organického zatížení fermentorů, zlepšení hloubky rozkladu hůře biologicky rozložitelných organických látek v SS nebo zředění toxických a inhibičních látek (Azarmanesh, et al., 2023, Iacovidou, et al., 2012, Mehariya, et al., 2018). Tyto faktory podporují vyšší produkci bioplynu a zlepšují stabilitu procesu. Nicméně AcoD čelí i významným implementačním a procesním výzvám. Jednou z hlavních překážek je přítomnost inertních materiálů v FW, jako jsou plasty, sklo nebo keramika, které mohou působit mechanickou abrazi technické periferie anaerobních fermentorů (potrubí, míchadla a čerpadla). Tyto inertní materiály se dále mohou akumulovat v bioreaktoru, což může negativně ovlivnit provoz fermentorů a kvalitu stabilizovaného kalu. Proto je nezbytné vybudovat separační technologii pro jejich účinné odstranění, která ovšem zvyšuje investiční náročnost implementace AcoD. Dalším kritickým faktorem je skladování a dávkování FW. Vybudování skladovacích prostorů a technické zajištění pro dávkování FW vyžaduje další počáteční finanční investice. Se skladováním externího substrátu je úzce svázána i strategie dávkování. Příliš pomalé dávkování může způsobit dlouhé skladování FW, které pak může vést k degradaci organických látek, což snižuje potenciál FW pro biologickou konverzi na bioplyn. Naopak příliš rychlé dávkování může přetížit anaerobní systém a zapříčinit akumulaci nižších mastných kyselin (NMK), která pak může vést k poklesu hodnoty pH. Pokles hodnoty pH do kyselé oblasti může způsobit inhibici až kolapsu celého procesu. V literatuře je uváděna jako optimální hodnota pro anaerobní fermentaci neutrální oblast hodnot pH (Mehariya, et al., 2018, Nghiem, et al., 2017). Pro minimalizaci rizik akumulace NMK lze zvážit provoz fermentorů za termofilních podmínek, které mohou zajistit rychlejší degradaci organických látek a jejich hlubší rozklad (Nabaterega, et al., 2021). Dále je nutné zohlednit produkci amoniakálního dusíku ( $N_{\text{amon}}$ ), která je spojená s vysokým obsahem bílkovin v FW, konkrétně u produktů obsahující maso a mléčné produkty. Přeměna organického dusíku na  $N_{\text{amon}}$  může způsobit růst jeho koncentrace, což může rovněž vést k inhibici nebo kolapsu celého procesu (Ariunbaatar, et al., 2015). Současně však  $N_{\text{amon}}$  přispívá k neutralizační kapacitě systému a slouží jako esenciální nutrient pro mikroorganismy (Mehariya, et al., 2018).

## Materiály a metody

Pro jednorázové anaerobní testy byly vybrány tři substráty. Prvním a hlavním substrátem byl směsný surový kal (SSK), který byl odebrán na Ústřední čistírně odpadních vod v Praze (ÚČOV), druhým byl slazený nápoj (SN) a posledním byl použitý kuchyňský olej (PO). Dva substráty z portfolia FW byly vybrány na základě předchozího zhodnocení jednorázových anaerobních vsádkových testů. Jako inokulum byl odebrán anaerobně stabilizovaný kal z prvního termofilního stupně anaerobní stabilizace na ÚČOV. Jejich kvalitativní charakteristika je uvedena v Tab. 1.

**Tab. 1:** Parametry inokula a substrátů použitých v jednorázových vsádkových anaerobních testech.

substrát/ inokulum	CHSK <sub>Cr</sub>	VL	VL <sub>zž</sub>	RL	RL <sub>zž</sub>	NL	NL <sub>zž</sub>	pH
	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[g·l <sup>-1</sup> ]	[-]
INOKOLUM1	25,2	25,5	15,3	2,7	1,8	22,8	13,5	8,2
INOKOLUM2	28,2	29,4	17,0	2,6	1,7	26,8	15,4	7,9
SSK1	63,3	49,4	35,3	3,2	1,9	46,2	33,4	6,0
SSK2	67,9	49,3	34,4	3,2	2,0	46,0	32,4	6,1
SN-NZ	125	95,7	81,5	-	-	-	-	2,4
PO-NZ	2436	876,2	876,0	-	-	-	-	4,5
SN-VZ	133	97,2	82,3	-	-	-	-	2,0
PO-VZ	2391	888,8	888,1	-	-	-	-	4,6

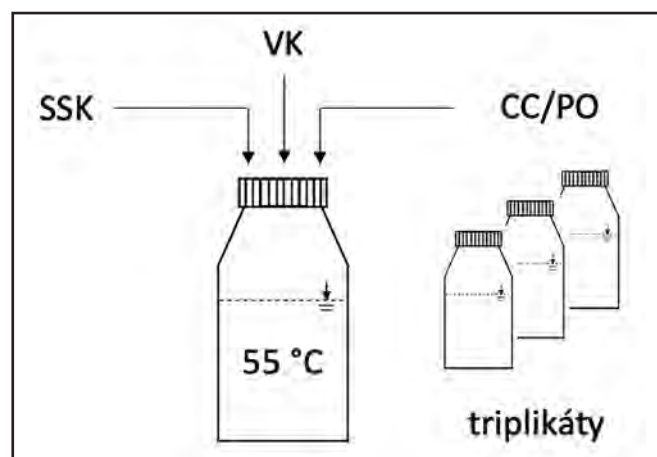
Pozn.: Zkratkou NZ jsou označeny substráty využívané pro testování nižšího zatížení a zkratkou VZ jsou označeny substráty pro testování vyššího zatížení

**Tab. 2:** Charakteristika nasazených jednorázových anaerobních testů

Substrát	Zatížení	Poměr (SSK:kosubstrát)	Počáteční pH
	[g·g <sup>-1</sup> ](CHSK <sub>Cr</sub> ; NL <sub>zž</sub> )	[-]	[-]
SSK1	0,5	-	8,0
SSK2	0,5	-	7,7
SN-NZ	0,5	-	8,0
PO-NZ	0,5	-	7,7
SN-VZ	0,8	-	7,7
PO-VZ	0,8	-	8,0
SSK1+SN-NZ	0,5	1:1	8,0
SSK2+PO-NZ	0,5	1:1	7,7
SSK2+SN-VZ	0,7	1:2	7,6
SSK1+PO-VZ	0,7	1:2	8,0

Pozn.: Zkratkou NZ jsou označeny substráty využívané pro testování nižšího zatížení a zkratkou VZ jsou označeny substráty pro testování vyššího zatížení

Celkem byly nasazeny dva laboratorní testy anaerobní rozložitelnosti. První test byl proveden s obvyklým zatížením 0,5 g·g<sup>-1</sup> (CHSK<sub>Cr</sub>; NL<sub>zž</sub>) a v druhém testu byly

**Obr. 1:** Schématické znázornění nasazení anaerobních jednorázových vsádkových testů.

nasazeny sady s vyšším zatížením (viz Tab. 2). Zvýšení zatížení bylo provedeno s větším poměrem substrátů vyjádřený v CHSK<sub>Cr</sub>. Teplota inkubace byla udržována pomocí termostatu při 55 °C. Každá sada byla nasazena v triplicátech pro dosažení reprezentativnosti a relevantnosti výsledků. V Tab. 2 je uvedena i dosažená hodnota pH v kofermentačních směsích. Schématické zobrazení nasazených anaerobních jednorázových vsádkových testů je zobrazeno na Obr. 1.

## Výsledky

Výsledky byly vyhodnoceny z hlediska specifické rychlosti produkce bioplynu při různých zatíženích organickými látkami, které jsou uvedeny v Obr. 2 a Obr. 3. V obou případech, lze pozorovat, že sady pouze se SN v obou zatíženích dosahovaly nejvyšších specifických rychlostí produkce bioplynu z důvodu vysokého obsahu sacharidů, které jsou snadno biologicky rozložitelným substrátem. V sadě se SN-NZ bylo dosaženo hodnoty 0,24 l·g<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (bioplyn; NL<sub>zž</sub>) a v sadě se SN-VZ



bylo dosaženo hodnoty  $0,30 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{NL}_{\text{z}}$ ). Dosažená hodnota v SN-VZ byla o 26 % vyšší oproti dosažené v SN-NZ. Ovšem zajímavým poznatkem bylo to, že byl pozorován menší rozdíl specifické rychlosti produkce bioplynu v systému pouze se SN-VZ (Obr. 2) a systému s SSK2+SN-VZ než v systémech se SN-NZ a SSK1+SN-NZ (Obr. 3). V případě vyšších zatížení (SN-VZ vs. SSK2+SN-VZ) se jednalo pouze o 26 % zvýšení hodnoty specifické rychlosti produkce bioplynu a v případě nižších zatížení (SN-NZ vs. SSK1+SN-NZ) se jednalo o 45 % zvýšení hodnoty hodnoceného ukazatele. Z toho plyne, že při aplikaci vyššího zatížení v procesu anaerobní kofermentace SSK a SN jsme schopni se přiblížit maximu, který zde reprezentují sady pouze se SN (nejvyšší hodnoty specifické rychlosti produkce bioplynu). V případě systému s PO-NZ bylo dosaženo v Obr. 2 maximální hodnoty specifické rychlosti produkce bioplynu téměř ve stejný okamžik jako v systému SSK2+PO-NZ. Naproti tomu na Obr. 3 lze pozorovat, že při aplikaci vyššího zatížení systému přítomný SSK pravděpodobně stimuloval anaerobní rozklad hůře rozložitelného PO a došlo tak k dosažení maximální

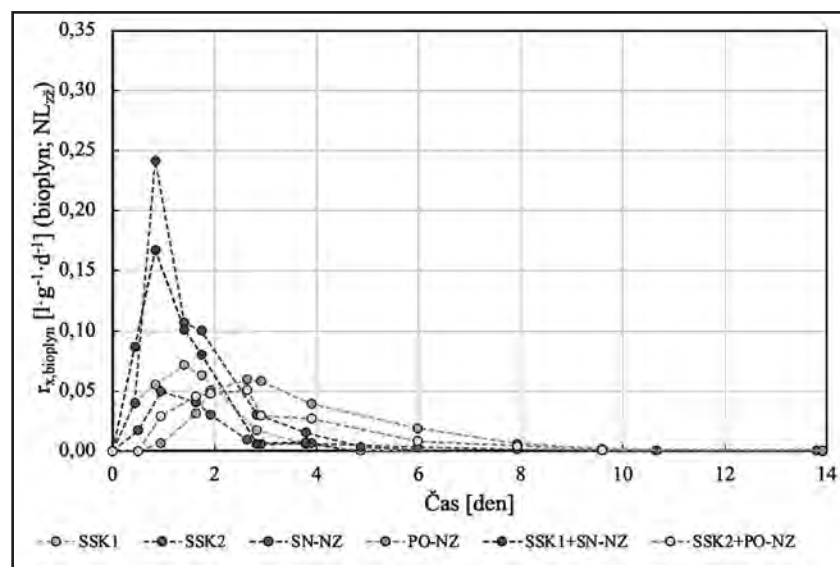
specifické rychlosti produkce bioplynu v kratším čase. Pomalejší rozklad organických látek v systémech pouze s PO byl pravděpodobně způsoben obsahem vyšších mastných kyselin, které jsou obecně pro oleje typické a mohly způsobit počáteční inhibici rozkladu (Shi, et al., 2024, Tvrzicka, et al., 2011). V obou případech (Obr. 2 a Obr. 3) bylo dosaženo nižší hodnoty specifické rychlosti produkce bioplynu v kofermentačních testech oproti systému se samotným PO.

Pro shrnutí naměřených maximálních hodnot specifické rychlosti produkce bioplynu v kofermentačních sadách bylo dosaženo hodnot  $0,17 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{NL}_{\text{z}}$ ),  $0,05 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{NL}_{\text{z}}$ ),  $0,24 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{NL}_{\text{z}}$ ) a  $0,07 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{NL}_{\text{z}}$ ) v sadách SSK1+SN-NZ, SSK2+PO-NZ, SSK2+SN-VZ a SSK1+PO-VZ. Z dosažených výsledků specifických rychlostí produkce bioplynu lze potvrdit, že vhodnějším kosubstrátem pro AcoD s SSK se jevil SN z důvodu vyšších rychlostí rozkladu obsažených organických látek v substrátu.

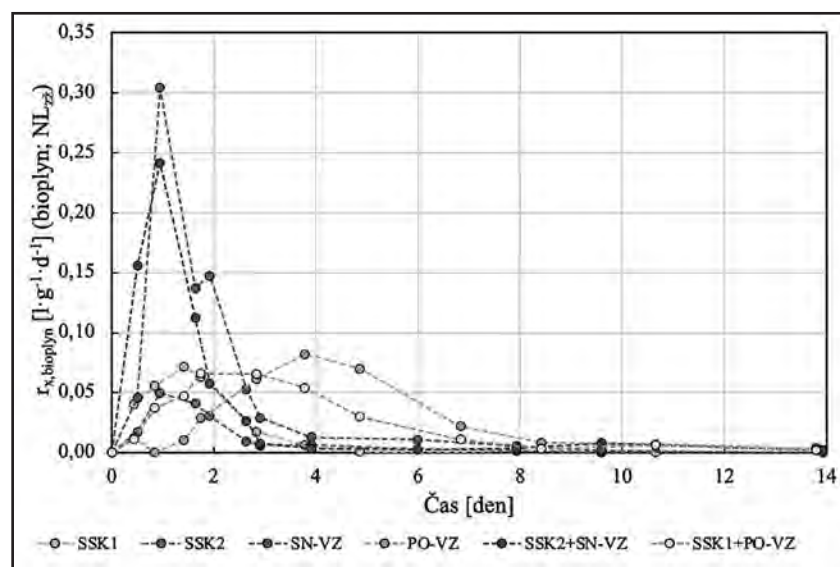
Dalším parametrem, podle kterého byl hodnocen efekt jednotlivých kosubstrátů byla specifická produkce bioplynu. Výsledky dosažené v jednotlivých testovaných sadách jsou graficky znázorněny na Obr. 4. U sad SSK1 a SSK2 byly zaznamenány hodnoty  $0,459 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ) a  $0,393 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ). V sadách s nižším zatížením SN-NZ, PO-NZ, SSK1+SN-NZ a SSK2-PO bylo dosaženo následujících hodnot specifické produkce bioplynu:  $0,784 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ),  $1,213 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ),  $0,665 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ) a  $0,787 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ). V sadách při vyšším zatížení SN-VZ, PO-VZ, SSK2+SN a SSK1+PO bylo dosaženo  $0,723 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ),  $1,168 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ),  $0,770 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ) a  $0,787 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}$  (bioplyn;  $\text{VL}_{\text{z}}$ ) specifické produkce bioplynu. Uvedené výsledky potvrzují, že přidávkou kosubstrátů lze zvýšit nejen absolutní množství vyrobeného bioplynu, ale i jeho specifickou produkci vztahovanou na jednotkovou hmotnost zpracovaného substrátu.

Zvláště zajímavým zjištěním bylo, že v sadě SSK2+SN-VZ při vyšším zatížení byla specifická produkce bioplynu dokonce o 6,6 % vyšší než v sadě pouze se SN-VZ. Tento jev naznačuje, že přítomnost snadno biologicky rozložitelného substrátu může stimulovat rozklad hůře biologicky rozložitelných organických látek, což vede ke zvýšení efektivity procesu anaerobní fermentace. Synergický efekt při kombinaci různých substrátů může být klíčovým faktorem zlepšujícím celkovou výtěžnost bioplynu a bude ověřován dalšími experimenty.

Dalším klíčovým hodnoceným parametrem byl vliv přidávky externího kosubstrátu na odvodnitelnost stabilizovaného kalu, což je faktor s přímým dopadem na provozní náklady ČOV. Náklady jsou ovliv-

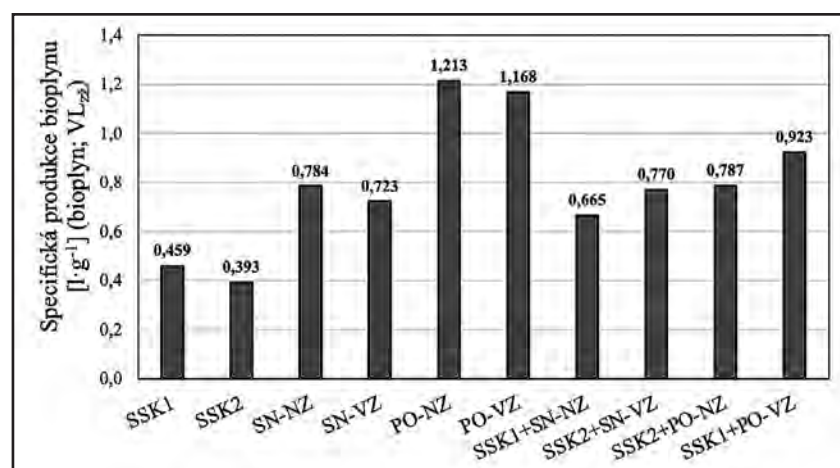


**Obr. 2:** Specifická rychlost produkce bioplynu při nižším zatížení.

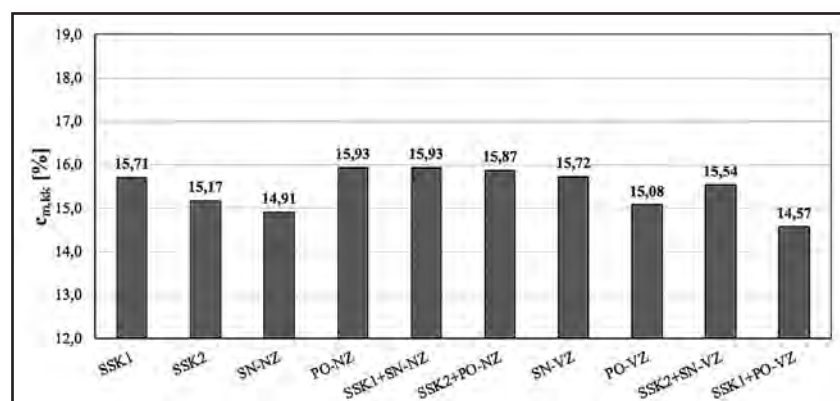


**Obr. 3:** Specifická rychlost produkce bioplynu při vyšším zatížení.

něny zejména přepravou do míst dalšího zpracování čistírenských kalů, kde u lépe odvodnitelného kalu je předpoklad, že po jeho odvodnění bude snížen objem a jeho hmotnost (Azarmanesh, et al., 2020). Zlepšení odvodnitelnosti stabilizovaného kalu může tedy významně přispět k celkové ekonomické efektivitě provozu, protože menší objem a hmotnost stabilizovaného kalu znamená nižší náklady na transport a další zpracování. Odvodnitelnost stabilizovaného kalu byla testována centrifugační metodou, která se ukázala být jako vhodnější pro zhodnocení charakteristiky odvodňování než dříve často využívaná metoda času kapilárního sání (CST). Metoda CST sice umožňuje relativně rychlé stanovení odvodnitelnosti, avšak její výsledky mohou být méně relevantní, a ne vždy dobře korelují s reálnými provozními podmínkami. Centrifugační metodou se více přibližujeme podmínkám odvodňování v praxi, čímž poskytuje přesnější obraz o skutečné odvodnitelnosti stabilizovaného kalu. Na Obr. 5 jsou graficky znázorněny výsledky dosažené při stanovení odvodnitelnosti u kalů z jednorázových anaerobních testů. Na vertikální ose je uvedena sušina kalového koláče ( $cm, k_c$ ) v procentech, které bylo dosaženo po odstředění za specifických podmínek ( $13\,000\text{ min}^{-1}$ , po dobu 10 minut). Tato data ukazují rozdíly mezi jednotlivými sadami a umožňují hodnotit vliv přidavku různých kosubstrátů na odvodnitelnost stabilizovaného kalu.



**Obr. 4:** Naměřená specifická produkce bioplynu závislá na volbě substrátu nebo jejich kombinaci a organickém zatížení.



**Obr. 5:** Sušina kalového koláče v procentech po centrifugaci stabilizovaného kalu v závislosti na volbě substrátu nebo jejich kombinaci a organickém zatížení.

Při prvním pohledu na grafické znázornění odvodnitelnosti anaerobně stabilizovaného kalu lze upozorovat, že s rostoucím zatížením organickými látkami odvodnitelnost kalu klesá. Výjimkou byla pouze sada SN-NZ. V této sadě došlo k snížení míry odvodnitelnosti výsledného produktu ve srovnání se sadami pouze s SSK, tak i se sadami s vyšším zatížením. Další zajímavý výsledek byl dosažen v kofermentační sadě SSK2+SN-VZ, kde bylo dosaženo obdobné  $cm, k_c$  jako u testů pouze s SSK, které byly méně zatížené. Z toho vyplývá, že při implementaci AcoD SSK se sacharidickým kosubstrátem je možné zvýšit zatížení fermentorů, s čímž je spojená i vyšší rychlost produkce bioplynu při zachování vlastností stabilizovaného kalu z hlediska odvodnitelnosti. Ovšem pro potvrzení této teze je nutno otestovat více typů substrátů s vysokým obsahem sacharidů. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že odvodnitelnost kalů záleží zejména na zvoleném kosubstrátu a také na zatížení systému. Publikací ověřujících vliv těchto parametrů na odvodnitelnost stabilizovaných kalů není mnoho, a proto je nutno věnovat této problematice více pozornosti. Například Autoři Silvestre et al. se ve své publikaci zaměřili na AcoD SS a tuků a zjistili, že při termofilních podmínkách došlo ke zhoršení odvodnitelnosti stabilizovaného kalu ve srovnání s kaly z anaerobní fermentace samotného SS. Pravděpodobnou příčinou tohoto zhoršení byl nadměrný obsah vyšších mastných kyselin,

které jsou charakteristické pro tuky a oleje, jak již bylo zmíněno výše. Tato zjištění z publikace Silvestre et al. korespondují s výsledky dosaženými v rámci tohoto experimentu, zejména v kofermentačních testech s přidavkem PO při vyšším organickém zatížení za termofilních podmínek (Silvestre, et al., 2014).

## Závěr

Výsledky jednorázových anaerobních testů ověřujících vliv přidavku externích substrátů na anaerobní stabilizaci SSK byly hodnoceny na základě tří parametrů: maximální rychlosti produkce bioplynu, specifické produkce bioplynu a odvodnitelnosti stabilizovaného kalu. Nejlépe se na základě získaných výsledků specifické rychlosti produkce bioplynu a specifické produkce bioplynu jevil systém SSK2+SN-VZ. Hodnoty specifické produkce bioplynu a specifické produkce bioplynu dosahovaly  $0,24\text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (bioplyn; NL<sub>zž</sub>) a  $0,770\text{ l} \cdot \text{g}^{-1}$  (bioplyn; VL<sub>zž</sub>), což představovalo zvýšení oproti samotnému SSK o 385 % a 96 %. Třetím hodnoceným parametrem byla odvodnitelnost stabilizovaného kalu, která má zásadní vliv na provozní náklady zpracování kalů. Přestože vyšší organické zatížení obecně vedlo ke zhoršení odvodnitelnosti, výsledky kofermentačních testů se SN byly i při vyšším zatížení (SSK2+SN-VZ) srovnatelné se sadami obsahujícími pouze



SSK. Výjimkou byl systém SSK+PO-VZ, kde byla odvodnitelnost výrazně ovlivněna vlastnostmi samotného substrátu, což vedlo ke snížení účinnosti odvodnění. Na základě získaných výsledků se SN jeví jako příklad vhodného kosubstrátu pro další testování v kontinuálním provozu, a to i při vyšších zatíženích. Použití tohoto kosubstrátu nejen zvyšuje rychlost produkce a specifickou produkci bioplynu, ale také zachovává stejné vlastnosti stabilizovaného kalu z hlediska odvodnění i při vyšším organickém zatížení ve srovnání s odvodnitelností stabilizovaného kalu získaného z anaerobní fermentace pouze se SSK. Implementace sacharidického substrátu má tedy potenciál snížit provozní ná-

klady ČOV a přispět k jejich energetické soběstačnosti. Pro potvrzení těchto závěrů budou provedeny experimenty i s jinými druhy sacharidických substrátů a vybrané substráty otestovány v poloprovozním měřítku.

## Literatura

Ariunbaatar, J.; Scotto Di Pert, E.; Panico, A.; Frunzo, L.; Esposito, G.; Lens, P. N. L.; Pirozzi, F., Effect of ammoniacal nitrogen on one-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste. *Waste Manage.* 38, 388-398, (2015).

Azarmanesh, R.; Zarghami Qaretapeh, M.; Hasani Zonoozi, M.; Ghiasinejad, H.; Zhang, Y., Anaerobic co-digestion of sewage sludge with other organic wastes: A comprehensive review focusing on selection criteria, operational conditions, and microbiology. *Chemical Engineering J. Adv.*, 14, 100453.(2023).

Azarmanesh, R.; Zonoozi, M. H.; Ghiasinejad, H., Characterization of food waste and sewage sludge mesophilic anaerobic co-digestion under different mixing ratios of primary sludge, secondary sludge and food waste. *Biomass and Bioenergy.* 139, 105610, (2020).

Borja, R.; Rincón, B., Biogas Productions. In *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier: 785-798, (2017).

Iacovidou, E.; Ohandja, D.-G.; Voulvoulis, N., Food waste co-digestion with sewage sludge – Realising its potential in the UK. *J. Environ. Manage.* 112, 267-274, (2012).

Mehariya, S.; Patel, A. K.; Obulisamy, P. K.; Punniyakotti, E.; Wong, J. W. C., Co-digestion of food waste and sewage sludge for methane production: Current status and perspective. *Bioresour. Technol.* 265, 519-531, (2018).

Nabaterega, R.; Kumar, V.; Khoei, S.; Eskicioglu, C., A review on two-stage anaerobic digestion options for optimizing municipal wastewater sludge treatment process. *J. Environ.Chem.Eng.* 9 (4), 105502, (2021).

## Souhrn

V nynější době je stále více diskutována energetická soběstačnost čistíren odpadních vod a uhlíková neutralita. Pro dosažení nebo alespoň přiblížení se k těmto ideálům je nutno hledat a následně implementovat taková technologická řešení, která jsou šetrná k životnímu prostředí a udržitelná z provozního a ekonomického hlediska. Klíčovým procesem pro energetickou soběstačnost je výroba bioplynu z kalů, která ale jen výjimečně dokáže zabezpečit dostatečnou produkci elektrické energie. Proto se intenzivně hledají cesty, jak produkci bioplynu na čistírnách zvýšit. Jednou z možností je společné zpracovávání čistírenských kalů a vhodných biologicky rozložitelných odpadů prostřednictvím anaerobní kofermentace. Mezi hojně diskutované biologicky rozložitelné odpady patří zejména potravinářské odpady. Jejich společné zpracování anaerobní cestou má řadu výhod. Například zkrácení dojezdových vzdáleností při jejich dopravě na čistírnu odpadních vod oproti dojezdovým vzdálenostem do lokalit jejich obvyklé likvidace (spalovny, skládky, bioplynové stanice), které vede ke snížení uhlíkové stopy. Neposledním stěžejním benefitem je zvýšení účinnosti anaerobního rozkladu kalů přidávkem snadno

## Poděkování

Tento příspěvek vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2\_FT0P\_2024\_002 a zároveň je tento projekt financován se státní podporou Technologické agentury ČR a Ministerstva životního prostředí v rámci Programu Prostedí pro život (SS07020254).

Nghiem, L. D.; Koch, K.; Bolzonella, D.; Drewes, J. E., Full scale co-digestion of wastewater sludge and food waste: Bottlenecks and possibilities. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 72, 354-362, (2017).

Shi, E.; Zou, Y.; Zheng, Y.; Zhang, M.; Liu, S.; Zhang, S.; Zhang, X., Kinetic study on anaerobic digestion of long-chain fatty acid enhanced by activated carbon adsorption and direct interspecies electron transfer. *Bioresour. Technol.* 403, 130902, (2024).

Silvestre, G.; Illa, J.; Fernández, B.; Bonmatí, A., Thermophilic anaerobic co-digestion of sewage sludge with grease waste: Effect of long chain fatty acids in the methane yield and its dewatering properties. *Appl Energy.* 117, 87-94, (2014).

Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.-S.; Stankova, B.; Zak, A., Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomedical papers.* 155 (2), 117-130, (2011).

Wang, X.; Jiang, C.; Wang, H.; Xu, S.; Zhuang, X., Strategies for energy conversion from sludge to methane through pretreatment coupled anaerobic digestion: Potential energy loss or gain. *J.Environ. Manage.* 330, 117033, (2023).

Wett, B.; Buchauer, K.; Fimml, C., Energy self-sufficiency as a feasible concept for wastewater treatment systems. *IWA Leading Edge Technology Conference.* (2007).

rozložitelných organických látek, která může stimulovat hlubší rozklad hůře rozložitelných látek obsažených v čistírenském kalu. Dalšími výhodami jsou zředění toxických a inhibujících složek, využití plné kapacity stabilizačních nádrží, což vše napomáhá ke zvýšení produkce bioplynu. Anaerobní kofermentace čistírenského kalu a potravinářského odpadu má však i technologická rizika, která je nutno brát v úvahu při její implementaci. Potravinářské odpady mohou obsahovat inertní materiál jako je porcelán, sklo nebo plastové obaly. Tyto nežádoucí předměty musí být alespoň z části odstraněny, aby jejich abrazivní působení na mechanické části bylo sníženo na minimum. Na čistírnách odpadních vod bude nutno vybudovat potřebné technické vybavení pro dávkování, skladování nebo i hygienizaci potravinářských odpadů. Pro vyřešení těchto problémů budou provozovatelé čistíren odpadních vod nuceni do investičních akcí v podobě skladovacích nádrží, technologií pro separaci inertního materiálu, homogenizaci potravinářských odpadů a jeho dávkování. Dále dávkování potravinářských odpadů do anaerobních stabilizačních nádrží může ovlivnit stabilitu procesu anaerobní fermentace. Potravinářské odpady mohou obsahovat vyšší množství organického dusíku, který je v anaerobním prostředí přeměněn na amoniakální formu, jenž je známým inhibičním faktorem anaerobní fermentace. Dalším procesním problémem je vysoký obsah snadno rozložitelných organických látek, tudíž může dojít k snadnému přetížení procesu organickými látkami, které se projeví acidifikací systému. Oba procesní problémy mohou způsobit inhibiční až kolaps celého procesu. Poslední dvě zmíněné překážky lze zmírnit nebo odstranit vhodným technologickým uspořádáním, výběrem vhodného potravinářského odpadu a jeho poměru k čistírenskému kalu. Publikace se zabývá hodnocením anaerobní biologické rozložitelnosti potenciálních kosubstrátů reprezentujících různé druhy potravinářských odpadů pomocí jednorázových anaerobních testů v termofilních podmínkách.

**Klíčová slova:** anaerobní kofermentace, bioplyn, potravinářské odpady, čistírenský kal

## Summary

In recent years, the energy self-sufficiency of wastewater treatment plants (WWTPs) and carbon neutrality have become increasingly prominent topics. Achieving or even approaching these ideals requires the exploration and subsequent implementation of technological solutions that are environmentally friendly and operationally and economically sustainable. A key process for energy self-sufficiency is biogas production from sewage sludge, however, this process rarely generates sufficient electricity. Therefore, strategies to enhance biogas production at WWTPs are being actively explored. One promising approach is the co-processing of sewage sludge with suitable biodegradable waste through anaerobic co-digestion. Among the widely discussed biodegradable waste types are food industry residues. Anaerobic co-processing of these residues offers numerous advantages, such as shorter transport distances to WWTPs compared to traditional disposal locations (e.g., incinerators, landfills, or biogas plants), thus reducing the carbon footprint. Another significant benefit is the enhancement of anaerobic sludge degradation through the addition of easily degradable organic compounds, which can stimulate the breakdown of more recalcitrant substances in the sludge. Additional advantages include the dilution of toxic or inhibitory substances and the optimal utilization of stabilization tank capacities, all of which contribute to increased biogas production. Nevertheless, anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste presents technological challenges that must be addressed during its implementation. Food waste can contain inert materials such as porcelain, glass, or plastic packaging, which must be partially removed to minimize abrasive damage to mechanical components. Furthermore, WWTPs will require specialized equipment for dosing, storing, or even sanitizing food waste. Addressing these issues will necessitate capital investments by WWTP operators in facilities such as storage tanks, technologies for inert material separation, homogenization of food waste, and its controlled dosing. The dosing of food waste into anaerobic stabilization tanks can also impact the stability of the anaerobic fermentation process. Food waste often contains elevated levels of organic nitrogen, which can be converted into ammonia in anaerobic conditions a known inhibitor of the fermentation process. Additionally, the high content of easily degradable organic matter in food waste can lead to overloading the system, resulting in acidification. Both issues can cause inhibition or even collapse of the entire process. These challenges can be mitigated or resolved through appropriate technological setups, careful selection of food waste types, and optimal ratios of food waste to sewage sludge. This publication evaluates the anaerobic biodegradability of potential co-substrates representing various types of food waste using single-stage anaerobic batch tests under thermophilic conditions.

**Key words:** anaerobic co-digestion, biogas, food waste, sewage sludge

# INHIBICE BIOLOGICKÉ DENITRIFIKACE OXIDEM DUSNATÝM, JEJÍ VČASNÁ DETEKCE A PREVENCE NEGATIVNÍHO VLIVU NA DENITRIFIKACI PRŮMYSLOVÝCH ODPADNÍCH VOD

Radim Stanek<sup>1</sup>, Jana Zabranska<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Královéhradecká provozní, a. s., Hradec Králové, (e-mail: radim.stanek@khp.cz)

<sup>2</sup>Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice (e-mail: jana.zabranska@vscht.cz)

## ÚVOD

### Inhibice denitrifikace průmyslových odpadních vod

Biologická denitrifikace je široce používanou technologií pro odstraňování oxidovaných forem dusíku v čistírnách odpadních vod, ale její potenciál lze rozší-

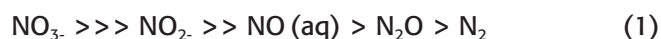
řit i na silně znečištěné průmyslové odpadní vody (Park et al. 2009). Průmyslové odpadní vody však často představují pro denitrifikační mikroorganismy náročné podmínky, jako jsou vysoké koncentrace dusičnanů, různé doprovodné složky, jako jsou sírany, kovy, soli, a často neoptimální hodnoty pH (Lefebvre et al. 2006, Luo et al. 2021). Jak heterotrofní, tak autotrofní



denitrifikace byly studovány pro různé průmyslové aplikace, např. pro odpadní vody z důlního průmyslu (Di Capua et al. 2017), průmyslu nerezové oceli (Manipura et al. 2005), rybářství Mariáňgel et al. 2008) a další. Byly zjištěny úspěšné podmínky pro denitrifikaci, a to i pro extrémně vysoké koncentrace dusičnanu uranu z jaderného průmyslu nebo z průmyslu hnojiv (Biradar et al. 2008, Dhamole et al. 2007). Potenciál heterotrofní i autotrofní denitrifikace pro čištění průmyslových odpadních vod zatížených vysokými koncentracemi dusičnanů a síranů v kombinaci s vysokou salinitou studoval (D'Aquino et al. 2023) se zaměřením na inhibici anorganickými ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  a  $\text{K}^+$ ). Heterotrofní denitrifikace byla zcela inhibována při 20 g/l  $\text{Na}^+$  (jako NaCl), 30 g/l  $\text{Na}^+$  (jako  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a 30 g/l  $\text{Cl}^-$  (jako KCl), zatímco autotrofní při 8 g/l  $\text{Na}^+$  (jako NaCl), 10 g/l  $\text{Na}^+$  (jako  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a 15 g/l  $\text{Cl}^-$  (jako KCl). Redukce dusitanů byla studovanými ionty inhibována méně než redukce dusičnanů a klíčovou roli v celkové inhibici denitrifikace zasolením hrál jak osmotický tlak, tak toxicita jednotlivých iontů. Feng a spol. využili adaptace denitrifikantů tolerantních k solím pro čištění odpadních vod s vysokým obsahem dusičnanů a vysokou salinitou (Feng et al. 2023).

### Inhibice oxidu dusnatého

I když denitrifikovaná odpadní voda neobsahuje žádné další inhibiční látky, jsou bezprostřední podmínky koncentrace dusičnanů, dusitanů a organického substrátu rozhodující pro určení, zda jsou jednotlivé kroky denitrifikace v rovnováze. Denitrifikační reakce se ve skutečnosti skládá ze čtyř kroků:



Je známo, že nejrychlejší je první krok, tj. redukce dusičnanů na dusitany, a za určitých podmínek může být redukce dusitanů rychlejší než redukce oxidu dusnatého, což vede k jeho hromadění. Řada autorů popisuje akumulaci dusitanů během denitrifikace (Kampschreur et al. 2009, Zhang et al. 2022). Akumulace dusitanů může být důsledkem zpoždění syntézy nitritreduktázy nebo inhibice nitrátů v reduktáze oxidu dusnatého (Betlach et al. 1981). O inhibičním účinku meziprojektu NO na spotřebu CHSK je zmínováno také v jiné literatuře (Casey et al. 1992, Schulthess et al. ve svých pracích popsali akumulaci NO v důsledku nárazového zvýšení koncentrace dusitanů a následné inhibice dalších kroků denitrifikačního procesu (Schulthess et al. 1995). Lu et al. uvedli, že oxid dusnatý inhibuje téměř všechny N-reduktázy a v bakteriálních buňkách je běžně detekován ve velmi nízkých koncentracích (Lu et al. 2014). Oxid dusnatý, vznikající působením nitritreduktázy, inhiboval oxidázovou aktivitu *Paracoccus denitrificans* (Carr et al. 1990).

Studie (Schulthess et al. 1995) zkoumala produkci těkavých meziprojektů denitrifikace jak za normálních podmínek, tak za vysokých koncentrací dusitanů. Mikrobiální odpověď na vysoký nitritový puls je ovlivněna fyziologickým stavem biomasy, u denitrifikačních organismů nasycených dusičnanem a substrátem dochází k výrazné akumulaci NO a  $\text{N}_2\text{O}$  spolu se silnou a dlou-

hodobou inhibicí nebo destrukcí jejich denitrifikačního metabolismu. Výzkumníci navrhli, že vysoká čistá produkce NO po nitritovém pulzu je způsobena lagovou fází v aktivitě NO reduktázy. Naznačili, že přímá inhibice reduktázy oxidu dusnatého dusitany by mohla vysvětlit počáteční nečinnost tohoto enzymu.

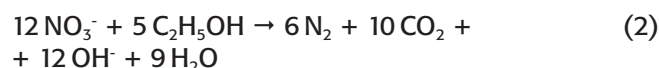
Denitrifikace, která se uplatňuje jako plnohodnotná technologie čištění průmyslových odpadních vod, musí řešit nejen požadavky denitrifikačního procesu, kdy je třeba vyvážit všechny fáze složitěho mikrobiálního procesu, ale také problémy vyplývající z povahy výroby a složení odpadních vod. V reálném provozu dochází k nevyhnutelnému kolísání koncentrací dusičnanů a dalších doprovodných sloučenin v odpadní vodě. Navíc měřicí a kontrolní přístroje běžně používané ve výzkumu nejsou v praktických aplikacích vždy k dispozici (Iverson et al. 2018, Privett et al. 2010) a v případě narušení rovnováhy procesu může docházet k uvolňování NO a inhibici denitrifikace.

Tento článek popisuje snahu o prevenci problémů s inhibicí NO v průmyslovém měřítku s využitím zdrojů, které jsou za těchto podmínek k dispozici. Zásahy a optimalizace biologického čištění odpadních vod v tak velkém měřítku mohou přinést nejen finanční výhody z nepřerušovaného provozu výroby, která se musí zastavit, pokud čistírna nefunguje tak, jak je požadováno, ale také významný příspěvek k ochraně životního prostředí.

## Materiály a metody

### Popis čistírny odpadních vod

Biologická denitrifikace se uplatňuje při čištění průmyslových odpadních vod z výroby nitrocelulózy s vysokou koncentrací kyselin dusičné a sírové a pH kolem 1,5. Při čištění odpadních vod z výroby nitrocelulózy se používá denitrifikační systém. Objem produkovaných odpadních vod je přibližně 2 miliony  $\text{m}^3$  ročně. Koncentrace dusičnanového dusíku v surové odpadní vodě se pohybuje od 100 do 400 mg/l, síranů od 1 do 2 g/l a teplota od 15 °C do 35 °C (Stanek et al. 2012). Průměrný průtok odpadních vod 4786  $\text{m}^3$ /den. Čistírna odpadních vod (ČOV) má dva hlavní technologické stupně, neutralizaci a denitrifikaci. Přefiltrovaná odpadní voda je čerpána z filtrační stanice přes směšovač do neutralizačního reaktoru. Do směšovače se dávkuje 50 % NaOH. V neutralizačním reaktoru je instalována pH sonda InPro 4260i/SG/225 (METTLER TOLEDO) a dusičnanová iontově selektivní elektroda N-ISE sc (HACH). Ve výtoku z neutralizačního reaktoru by voda měla mít hodnotu pH 2,2 – 2,5. Následné zvýšení pH na požadovanou hodnotu 7 zajišťují hydroxidové ionty vznikající při denitrifikaci podle rovnice 2.



Ethanol jako organický substrát, 5 % NaOH pro konečnou přesnou úpravu pH a kyselina fosforečná jako zdroj základní živiny se dávkuje do směsného denitrifikačního reaktoru, který je vybaven sondou Nitratax (UV absorpční měření sumy dusitanů a dusičnanového dusíku – HACH), sondou LDO – luminiscenční měření rozpuštěného kyslíku (HACH) a sondou pH:

InPro 4260i/SG/225 (METTLER TOLEDO). Upravená voda se odděluje od kalové biomasy v sedimentační nádrži, část se vrací do denitrifikačního reaktoru jako vratný kal. Zbytek přebytečného kalu je mechanicky zahuštěn a předán k likvidaci.

### Průběh a monitorování denitrifikačního procesu

Koncentrace dusičnanů a přitékající odpadní vody se během dne mění, někdy i výrazně, a výkyvy vzhledem k charakteru výroby nelze ovlivnit. Koncentrace dusičnanů v přítoku do denitrifikačního reaktoru se měří sondou ISE jako základ pro výpočet skutečné míry zatížení dusičnany spolu s přítokem odpadní vody. Povaha signálu z iontově selektivní elektrody neumožňuje její použití jako kontrolní sondy pro dávkování ethanolu, takže provoz je odkázán na kontrolu založenou na sondě Nitratex. Sonda Nitratex měří aktuální koncentraci obou oxidovaných forem dusíku (dusičnanů s dusitany dohromady) v denitrifikačním reaktoru a automaticky řídí dávkování ethanolu jako substrátu pro denitrifikaci podle vlastního signálu a hmotnostního zatížení dusičnanovým dusíkem.

Dávka ethanolu se určuje vynásobením hmotnostního zatížení dusičnanovým dusíkem koeficientem záměrně nastaveným vyšším, než je stechiometrická spotřeba ethanolu. Regulátor má dvě omezení:

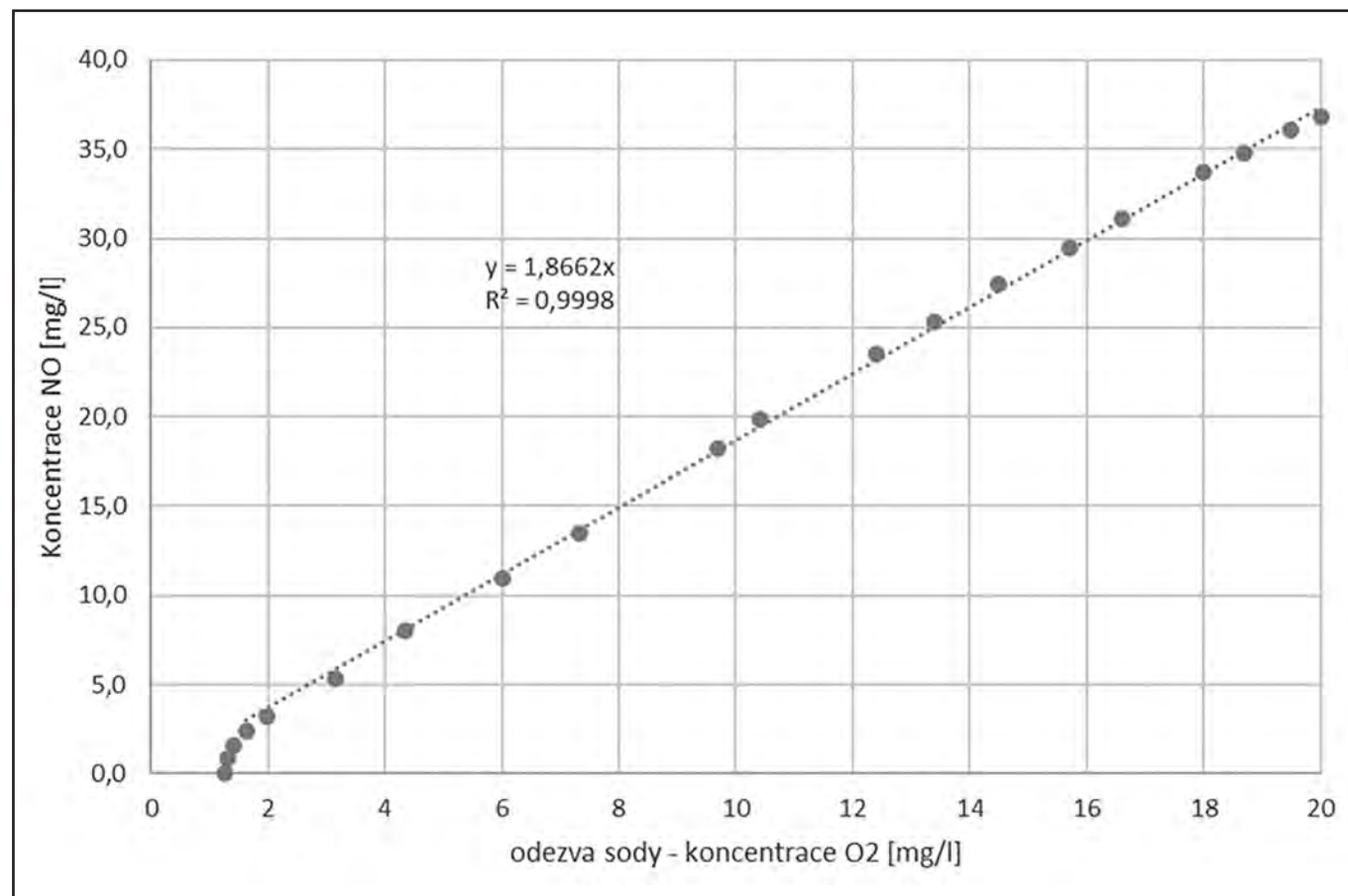
- maximální průtok ethanolu je omezen na 400 l/h
- dávkování ethanolu se zastaví, když signál sondy Nitratex klesne pod 10 mg/l, a obnoví se, když signál opět stoupne na 10 mg/l. Výsledkem je, že dávkování ethanolu je velmi nerovnoměrné, ale umožňuje udržet

relativně stabilní účinnost denitrifikace, i když čelí výrazným výkyvům v množství a kvalitě přitékající odpadní vody.

Optická luminiscenční kyslíková sonda (LDO) monitoruje rozpuštěný kyslík (Mitchell et al. 2006) a je ponořena v denitrifikačním reaktoru. Kyslíková sonda byla speciálně umístěna pro kontrolu anoxických podmínek v horní části reaktoru, kde by mohlo docházet k difúzi atmosférického kyslíku. Během inhibičních událostí dosahovala kyslíková luminiscenční sonda v denitrifikačním reaktoru extrémně vysokých úrovní signálu, které přesahovaly možné koncentrace rozpuštěného kyslíku (Klaus et al. 2017). Vysvětlením byla interferenční reakce sondy na vysokou koncentraci NO. Podobné zjištění, že optická sonda měřící kyslík v laboratorním denitrifikačním testu zaznamenala vysokou úroveň, přestože do reaktoru nebyl přiváděn žádný kyslík, publikovali (Klaus et al. 2017a).

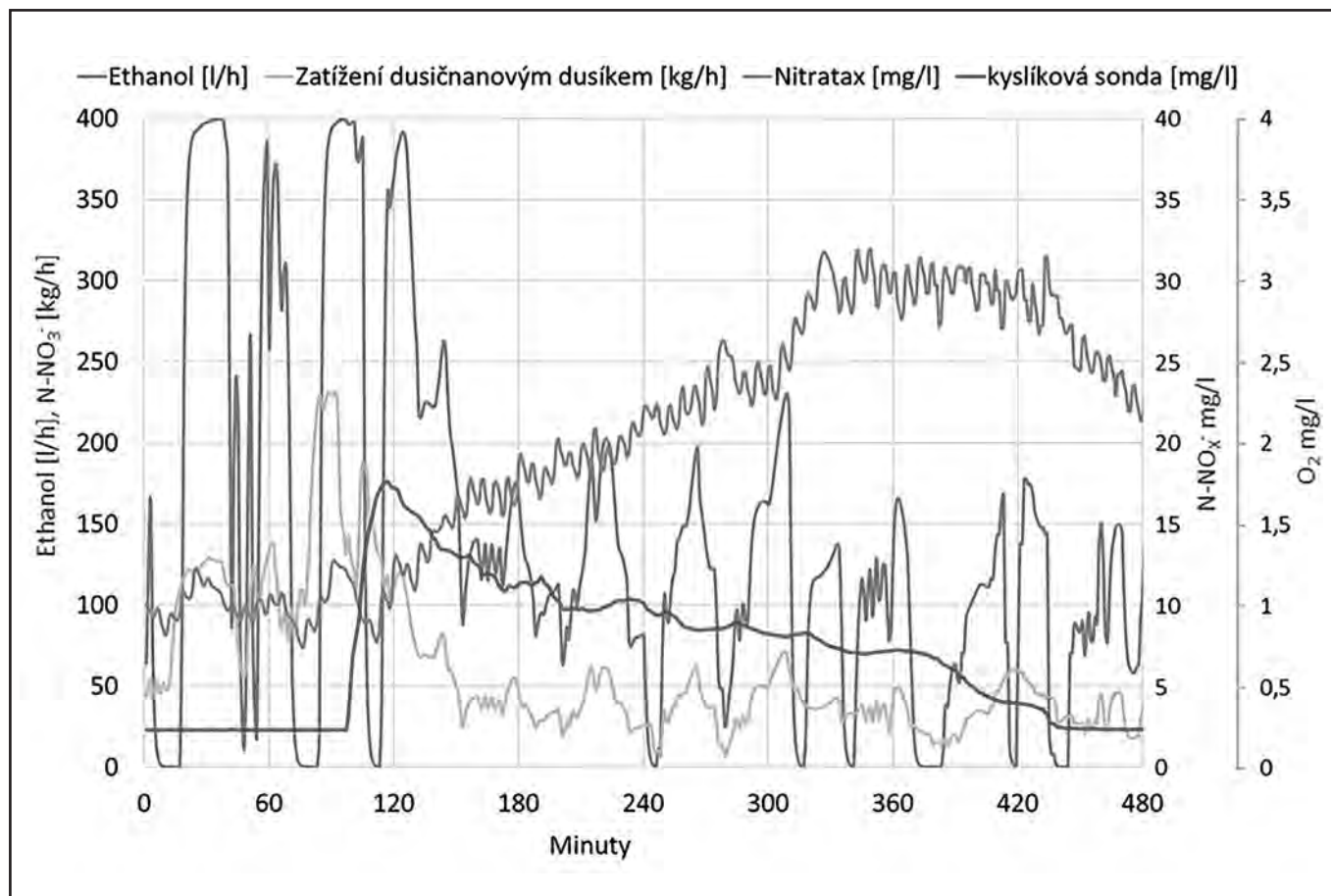
### Měření signálu LDO sondy v přítomnosti NO

Laboratorní pokus byl proveden s cílem prokázat, zda sonda skutečně reaguje na přítomnost oxidu dusnatého a zda je schopna rozlišit koncentraci rozpuštěného oxidu dusnatého s dostatečnou citlivostí. Experiment spočíval v proplyňování destilované vody oxidem dusnatým, který byl připraven redukcí dusitanů dvojmocným železem a dosažení nasyceného roztoku oxidu dusnatého za daných tlakových a teplotních podmínek. Většina zdrojů uvádí, že maximální rozpustnost NO ve vodě je 2 mmol/l při teplotě 20 °C a tlaku 1,013 kPa (Zacharia et al. 2005. Ignarro et al. 2000.



**Obř. 1:** Závislost signálu LDO sondy na koncentraci oxidu dusnatého.





**Obr. 2:** Sledování události inhibice NO včetně dávkování ethanolu (l/h), zatížení dusičnanovým dusíkem (kg/d), odezvy sondy Nitratax (NO<sup>3-</sup> + NO<sup>2-</sup> mg/l) a sondy LDO (O<sub>2</sub> mg/l) registrující vývoj NO.

## Výsledky a diskuse

### Signál kyslíkové sondy LDO a koncentrace NO

Interference sondy LDO s oxidem dusnatým byla potvrzena i jinými autory (Iverson et al. 2018, Klaus et al. 2017), ale závislost signálu sondy na koncentraci rozpuštěného NO nebyla dosud známa, aby bylo možné kvantifikovat její množství a navrhnout na jejím základě provozní opatření. Závislost signálu sondy LDO na koncentraci NO je prezentována na Obr. 1.

Citlivost sondy LDO na rozpuštěný oxid dusnatý je tedy téměř 2× vyšší než citlivost samotného rozpuštěného kyslíku. V nepřítomnosti kyslíku je odezva sondy lineární až do jejího maximálního rozsahu, který představuje 36,8 mg/l NO a je schopna detekovat i velmi nízkou koncentraci NO 2,4 mg/l. Možnost kontinuálního měření koncentrace NO je velmi užitečným nástrojem, který umožňuje okamžitou detekci jeho přítomnosti během denitrifikace a umožňuje včasné technologické zásahy, aby se předešlo problematickým situacím, které by mohly snížit účinnost procesu.

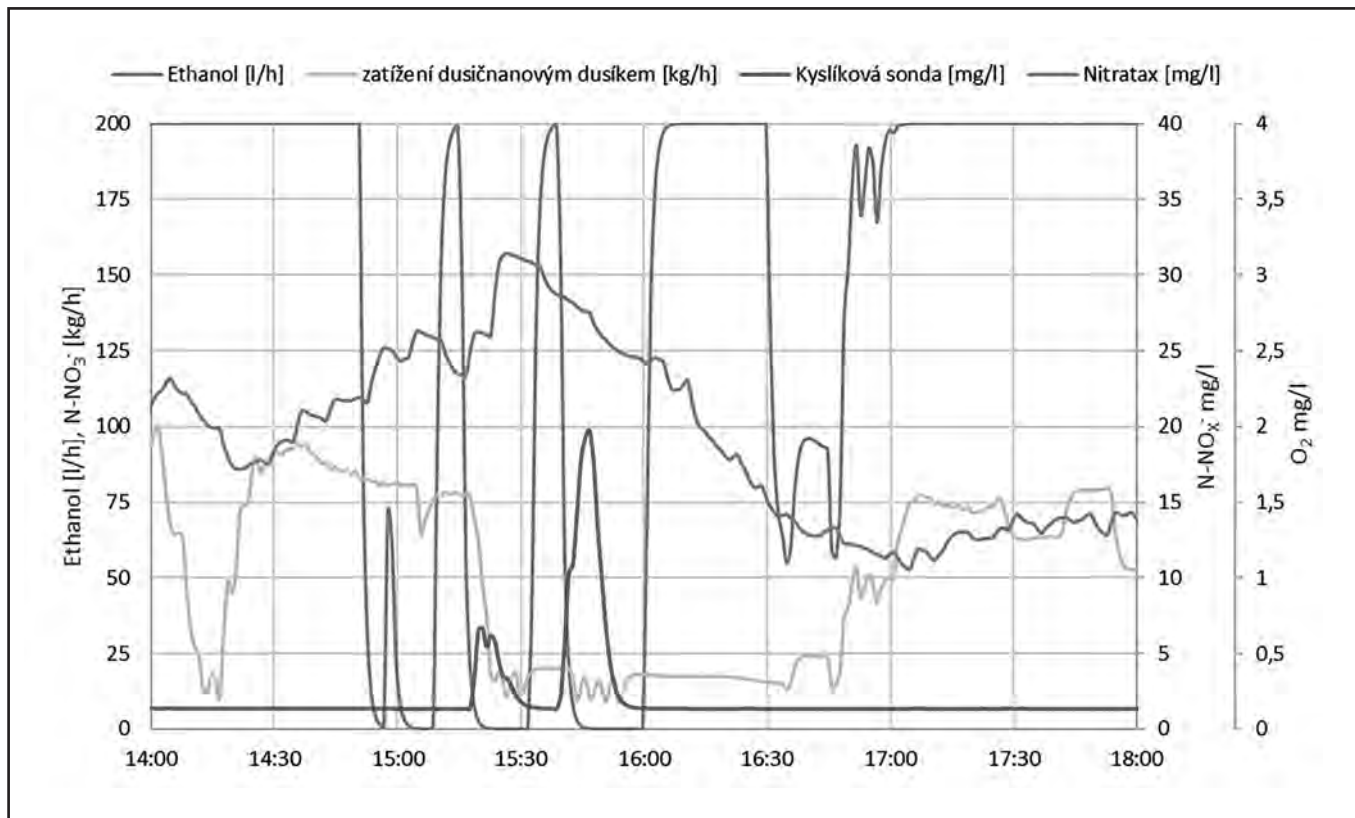
### Sledování výskytu inhibice NO

K inhibičnímu jevu docházelo vždy náhle a v některých případech byl doprovázen i přítomností dusíkatých plynů nad povrchem denitrifikačního reaktoru. Inhibice měla za následek úplné zastavení denitrifikace na několik hodin až dní, což způsobilo, že čistírna odpadních vod nebyla schopna zpracovávat odpadní vodu

a způsobilo značné problémy pro průmyslovou výrobu. Nástup inhibice byl vždy extrémně rychlý, bez varovných indikátorů. Za účelem zjištění souvislosti se zhoršením procesu byly podrobně prostudovány a porovnány všechny dostupné údaje z monitorování procesu.

Z Obr. 2 je patrné, že po prudkém a enormním nárůstu signálu kyslíkové sondy LDO došlo k nárůstu odezvy sondy Nitratax, přestože se přítok dusičnanů výrazně snížil. Jde o zřejmou reakci na hromadění dusitanů, které nebyly redukovány v důsledku inhibiční přítomnosti NO. K obnově denitrifikačního procesu došlo až po redukcí NO, kdy se odezva sondy LDO vrátila na úroveň jako před inhibicí. Je zřejmé, že zahájení dávkování ethanolu odpovídá zvýšení koncentrací dusitanů. V okamžiku jejich kulminace začíná stoupat odezva sondy LDO detekující oxid dusnatý, který začíná inhibovat denitrifikaci.

Když byly koncentrace NO a N<sub>2</sub>O měřeny specifickými online senzory spolu s kyslíkovou sondou, počáteční dávka dusitanů do reaktoru způsobila okamžitý nárůst koncentrace NO v kapalné fázi a následně pomalejší nárůst koncentrace N<sub>2</sub>O (Privett et al. 2010, Iverson et al. 2018). Nárůst koncentrace NO odpovídá nárůstu hodnot signálu DO sondy Hach LDO a test s injektovanou vodou z vodovodu s čistým oxidem dusným a oxidem dusičitým ukázal, že k interferenčnímu účinku na sondu LDO dochází při přidávku NO, nikoli N<sub>2</sub>O (Klaus et al. 2017a).



**Obr. 3:** Příklad průběhu včasného zásahu proti výskytu inhibice pomocí signálu LDO sondy. Nitrátová sonda ( $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ ), nitrátová ISE sonda ( $\text{NO}_3^-$ ) a LDO sonda ( $\text{NO}$ ).

### Potlačení inhibice na základě znalosti výskytu $\text{NO}$

Při studiu okolností, které inhibici předcházely, se ukázalo, že k ní obvykle dochází po náhlém zvýšení organického zatížení. Z Obr. 2 a Obr. 3 je patrné, že náhlé zvýšení zatížení dusičnany vyvolá zvýšenou dávku substrátu, která přetrvává, i když zatížení dusičnany klesá, přičemž se přeměňují, ale pouze na dusitany. To bylo patrné i z odkazů, že vysoká produkce  $\text{NO}$  následuje po akumulaci dusitanů (Zhang et al. 2022, Jones et al. 2008, Pan et al. 2013, Thakur et al. 2019). Snížení dávky substrátu nastává se zpožděním až při snížení účinnosti denitrifikace a zvýšení nezreagovaných dusičnanů.

Na základě nových poznatků lze uplatnit rychlé snižování dávky substrátu, protože dávku dusíku nelze příliš ovlivnit. Při zvýšení odezvy LDO sondy lze dávkování etanolu okamžitě vypnout. Trend signálu se velmi rychle obrátil a začal klesat, dokud nedosáhl zpět nulové úrovně koncentrace  $\text{NO}$ . Poté se dávkování substrátu obnoví a koncentrace dusičnanů v reaktoru začne klesat a denitrifikační aktivita se obnoví. Od doby, kdy bylo použito přerušení dávkování substrátu na základě signálu sondy LDO, nebyla pozorována žádná výraznější dlouhodobá inhibice. Obr. 3 dokumentuje průběh koncentrace oxidu dusnatého v denitrifikačním reaktoru měřený sondou LDO a přepočtený pomocí rovnice 3. Je vidět, že opakované snižování dávky etanolu vede k rychlé přeměně inhibičního  $\text{NO}$  a návratu k normálnímu průběhu denitrifikace. Nárůst odezvy sondy LDO vždy následuje po zvýšeném dávkování etanolu, ale po rychlém přerušení dávkování etanolu odezva sondy v rozmezí 30 min. rychle klesá, což svědčí o poklesu

koncentrace oxidu dusnatého. Pro srovnání doba trvání inhibice bez včasné úpravy dávkování substrátu dokumentovaná Obr. 2 dosahovala až 300 min.

Vliv množství substrátu potvrzují i výsledky studie (Pan et al. 2013), kde byla kvantitativně zkoumána distribuce elektronů mezi různé reduktázy oxidu dusnatého během denitrifikace. Výsledky ukázaly, že k elektronové konkurenci dochází nejen za podmínek omezování substrátu, ale i za podmínek jeho hojnosti.  $\text{N}_2\text{O}$  jako následný produkt redukce  $\text{NO}$  se hromadil, když byl tok elektronů směřující k redukci dusitanů vyšší než tok směřující k redukci  $\text{N}_2\text{O}$ . Snížení inhibice lze dosáhnout také přidáním některých vnějších činidel. Produkci  $\text{N}_2\text{O}$  z denitrifikačních bioreaktorů s fluidní vrstvou lze snížit pomocí dávkování vápníku ( $\text{Ca}^{2+}$ ), což však není příliš vhodné pro velké objemy a průtoky odpadních vod (Eldyasti et al. 2014).

### Vztah pH a teploty k inhibici

Všechny naměřené údaje byly vyhodnoceny ve vztahu k inhibičním stavům včetně údajů o pH a teplotě. Ukázalo se, že pět z osmi inhibic nastalo při pH nižším než 6,5, přičemž průměrné pH v reaktoru je  $7,6 \pm 0,2$ . Dva případy se vyskytly kolem pH 7 a v jednom případě dokonce pH 7,4 nezabránilo inhibici. Závěr není zcela jednoznačný, ale převažuje výskyt inhibice při nižším pH. Vliv nižšího pH pozorovali také Pan et al. a zjistili, že při nižším pH dochází k výraznější akumulaci meziproduktů denitrifikace (dusitanů a oxidu dusného). Důvodem zpomalení růstu koncentrace oxidu dusnatého může být i nižší teplota. Teplota v reaktoru se pohybuje od 16 °C do 35 °C v závislosti na ročním období a k in-



hibici docházelo prakticky v celém tomto rozmezí bez významnějšího vztahu k teplotě (Pan et al. 2012).

## Závěry

Oxid dusnatý jako meziprodukt denitrifikace je vysoce toxický, a proto je zodpovědný za inhibici denitrifikace odpadních vod z výroby nitrocelulózy, a způsobuje tak vážné problémy. Při zkoumání příčin jeho vývinu a možnosti jeho monitorování byla zjištěna závislost signálu kyslíkové sondy na jeho koncentraci.

Kyslíková optická luminiscenční sonda byla kalibrována na měření NO v nepřítomnosti kyslíku. Závislost je lineární a lze ji vyjádřit jako  $\text{NO} [\text{mg/l}] = 1,866 \text{ O}_2 [\text{mg/l}]$ , v důsledku čehož lze měřit koncentraci oxidu dusnatého v odpadní vodě.

Sledováním zvýšeného signálu kyslíkové sondy způsobeného přítomností NO je možné zasáhnout dříve, než se inhibice rozvine na nebezpečnou úroveň. Prudké zvýšení signálu z kyslíkové sondy je spojeno s vysokým zatížením dusičnany, které v přítomnosti odpovídající

vysoké dávky ethanolu vede k hromadění dusitanů jako meziproduktu denitrifikace. Tato akumulace v kombinaci s nadměrnou dávkou substrátu vede k tvorbě NO.

Byla potvrzena souvislost mezi nadbytkem substrátu a výskytem NO. Okamžité krátkodobé zastavení dávkování substrátu po vzestupu signálu LDO zabrání hromadění oxidu dusnatého, a tím i inhibici denitrifikačního procesu. K inhibici docházelo častěji v rozmezí pH 6,1 – 6,3 v denitrifikačním reaktoru a tento jev se zdá být nezávislý na teplotě v rozmezí 16 °C – 35 °C.

## Zkratky

CHSK – chemická spotřeba kyslíku

ISE – iontově selektivní elektroda

LDO – luminiscenční kyslíková sonda

Nitrataxová sonda – měření oxidované formy

dusíku – dusičnanů a dusitanů

NO – oxid dusnatý

N<sub>2</sub>O – oxid dusný

ČOV – čistírna odpadních vod

## Literatura

Betlach MR, Tiedje JM: Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. *App. Environ. Microbiol.* 42(6):1074-1084, (1981).

Biradar PM, Dhamole PB, Nair RR, Roy SB, Satpati SK, D'Souza SF, Lele SS, Pandit AB: Long-term stability of biological denitrification process for high strength nitrate removal from wastewater of uranium industry. *Environ. Progress.* 27(3):365-372, (2008).

Carr GJ, Ferguson SJ: Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenergetics.* 1017(1):57-62, (1990).

Casey TG, Wentzel MC, Loewenthal RE, Ekama GA, Marais GvR: A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.* 26(6):867-869, (1992).

D'Aquino A, Kalinainen N, Auvinen H, Andreottola G, Puhakka J, Palmroth M: Effects of inorganic ions on autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans* and on heterotrophic denitrification by an enrichment culture. *Sci. Total Environ.* 901:165940, (2023).

Di Capua F, Milone I, Lakaniemi AM, Lens PNL, Esposito G: High-rate autotrophic denitrification in a fluidized-bed reactor at psychrophilic temperatures. *Chem. Eng. J.*, 313:591-598, (2017).

Dhamole PB, Nair RR, D'Souza SF, Lele SS: Denitrification of high strength nitrate waste. *Bioresour. Technol.* 98(2):247-252, (2007).

Eldyasti A, Nakhla G, Zhu J: Mitigation of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emissions from denitrifying fluidized bed bioreactors (DFBBRs) using calcium. *Bioresour. Technol.* 173, 272-283 (2014).

Feng L, Wu G, Zhang Z, Tian Z, Li B, Cheng J, Yang G: Improving denitrification performance of biofilm technology with salt-tolerant denitrifying bacteria agent for treating high-strength nitrate and sulfate wastewater from lab-scale to pilot-scale. *Bioresour. Technol.*, 387:129696 (2023).

Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE: Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17):8103-8107 (1993).

Ignarro LJ: *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology* Academic Press 2000.

Iverson NM, Hofferber EM, Stapleton JA: Nitric Oxide Sensors for Biological Applications. In *Chemosensors.* 6(1):8 (2018).

Jones CM, Stres B, Rosenquist M, Hallin S: Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification. *Molecul. Biol. Evol.*, 25(9):1955-1966, (2008).

Kampschreur MJ, Temmink H, Kleerebezem R, Jetten MSM, van Loosdrecht MCM: Nitrous oxide emission during wastewater treatment. *Water Research* 2009, 43(17):4093-4103.

- Klaus S, Sadowski M, Jimenez J, Wett B, Chandran K, Murthy S, Bott C: Nitric Oxide Production Interferes with Aqueous Dissolved Oxygen Sensors. *Environ. Eng. Sci.* 34 (2017).
- Klaus S, Sadowski M, Jimenez J, Wett B, Chandran K, Murthy S, Bott CB: Nitric Oxide Production Interferes with Aqueous Dissolved Oxygen Sensors. *Environ. Eng. Sci.* 34(9):687-691 (2017a).
- Lefebvre O, Moletta R: Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water Res.* 40(20):3671-3682 (2006).
- Lu H, Chandran K, Stensel D: Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res.* 64(0):237-254 (2014).
- Luo L, Zhou W, Yuan Y, Zhong H, Zhong C: Effects of salinity shock on simultaneous nitrification and denitrification by a membrane bioreactor: Performance, sludge activity, and functional microflora. *Sci. Total Environ.* 801:149748 (2021).
- Manipura A, Duncan JR, Roman HJ, Burgess JE: Potential Biological Processes Available for Removal of Nitrogenous Compounds from Metal Industry Wastewater. *Proc. Safety Environ. Protect.* 83(5):472-480, (2005).
- Mariáugel L, Aspé E, Martí CM, Roeckel M: The effect of sodium chloride on the denitrification of saline fishery wastewaters. *Environ. Technol.* 29(8):871-879, (2008).
- Mitchell TO: Luminescence Based Measurement of Dissolved Oxygen in Natural Waters. Hach Company, LDO White paper, (2006).
- Pan Y, Ye L, Ni BJ, Yuan Z: Effect of pH on N<sub>2</sub>O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Water Res.* 46(15):4832-4840, (2012).
- Pan Y, Ni BJ, Bond PL, Ye L, Yuan Z: Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment. *Water Res.* 47(10):3273-3281, (2013).
- Park JY, Yoo YJ: Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82(3):415-429, (2009).
- Privett BJ, Shin JH, Schoenfish MH: Electrochemical nitric oxide sensors for physiological measurements. *Chem. Soc. Rev.* 39(6):1925-1935, (2010).
- Schulthess Rv, Kühni M, Gujer W: Release of nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge. *Water Res.* 29(1):215-226, (1995).
- Stanek R, Vodicka, O., Zabranska, J., Bartacek, J.: Denitrification of wastewater from nitrocellulose production. *SOVAK*, 21(9):283-286, (2012).
- Thakur IS, Medhi K: Nitrification and denitrification processes for mitigation of nitrous oxide from waste water treatment plants for biovalorization: Challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 282:502-513, (2019).
- Zacharia IG, Deen WM: Diffusivity and Solubility of Nitric Oxide in Water and Saline. *Ann. Biomed. Eng.* 33(2):214-222, (2005).
- Zhang M, Tan Y, Fan Y, Gao J, Liu Y, Lv X, Ge L, Wu J: Nitrite accumulation, denitrification kinetic and microbial evolution in the partial denitrification process: The combined effects of carbon source and nitrate concentration. *Bioresour. Technol.* 361:127604, (2022).

## Souhrn

Biologická denitrifikace se používá k čištění průmyslových odpadních vod z výroby nitrocelulózy, které obsahují vysoké koncentrace dusičnanů a síranů. Občasný výskyt oxidu dusnatého (NO) však proces denitrifikace výrazně inhibuje, což snižuje účinnost čištění a způsobuje vážné problémy při výrobě nitrocelulózy. Během inhibičních událostí detekuje kyslíková luminiscenční sonda v denitrifikačním reaktoru mimořádně vysoké úrovně signálu. Byl potvrzen vztah mezi signálem sondy a přítomností NO a sonda byla kalibrována pro koncentrace NO v rozmezí 2,4 až 37 mg/l. Porovnání nadměrného signálu sondy, přítomnosti NO a technologických podmínek denitrifikačního procesu ukázalo, že tvorba NO je vyvolána nadměrným množstvím ethanolu jako organického substrátu při vysokém hmotnostním zatížení dusičnany. Toto předávkování je způsobeno především automatickou regulací dávkování ethanolu, která se opírá o signál ze sondy Nitratax. Sonda Nitratax reaguje na obě oxidované formy dusíku, dusičnany a dusitany. Když se rychlost redukce dusitanů zpomalí, dusitany se v systému hromadí. Sonda Nitratax však signalizuje dodatečné dávkování ethanolu na základě koncentrace dusitanů, i když to není nutné. Hromadění dusitanů narušuje další krok denitrifikace, redukci NO, což vede ke zvýšení koncentrace NO a inhibičnímu procesu. Signál kyslíkové sondy tak slouží jako systém včasného varování, který umožňuje včas zasáhnout a zabránit tak vzniku inhibičních stavů. Když signál kyslíkové sondy vzroste, krátká přestávka v dávkování ethanolu může zabránit akumulaci NO a zabránit inhibičnímu procesu. Kromě toho byla pozorována korelace mezi případy inhibice a nižšími hodnotami pH v denitrifikačním reaktoru, zejména v rozmezí 6,1 – 6,3. Nebyla však zjištěna žádná souvislost mezi vývojem NO a teplotou v rozmezí 16 – 35 °C.

**Klíčová slova:** denitrifikace; vysoké zatížení dusičnany; průmyslové odpadní vody; inhibice NO; reakce kyslíkové sondy na NO



## Summary

Biological denitrification is used to treat industrial wastewater from nitrocellulose production, which contains high concentrations of nitrates and sulfates. However, the occasional occurrence of nitric oxide (NO) significantly inhibits the denitrification process, reducing treatment efficiency and causing serious issues in nitrocellulose production.

During inhibition events, the oxygen luminescence probe in the denitrification reactor detects exceptionally high signal levels. The relationship between the probe signal and the presence of NO was confirmed, and the probe was calibrated for NO concentrations ranging from 2.4 to 37 mg/L.

A comparison of the probe's excessive signal, the presence of NO, and the technological conditions of the denitrification process revealed that NO formation is triggered by an overdose of ethanol as an organic substrate under high nitrate mass loading. This overdosing is primarily caused by the automatic ethanol dosage control, which relies on the signal from the Nitratax probe. The Nitratax probe responds to both oxidized nitrogen species—nitrates and nitrites. When the reduction rate of nitrites slows, nitrites accumulate in the system. However, the Nitratax probe signals for additional ethanol dosing based on nitrite concentrations, even when it is unnecessary. Nitrite accumulation disrupts the next step in denitrification, the reduction of NO, resulting in increased NO concentrations and process inhibition. The oxygen probe signal thus serves as an early warning system, enabling timely intervention to prevent inhibitory conditions. When the oxygen probe signal rises, a brief pause in ethanol dosing can prevent NO accumulation and avoid process inhibition.

Additionally, a correlation was observed between inhibition events and lower pH levels in the denitrification reactor, particularly within the range of 6.1 – 6.3. However, no connection was found between NO evolution and temperature within the range of 16 °C – 35 °C. This insight highlights the importance of monitoring and controlling operational parameters to optimize denitrification efficiency and minimize disruptions in industrial wastewater treatment.

**Keywords:** denitrification; high nitrate loading; industrial wastewater; NO inhibition; oxygen probe response to NO

## OBSAH

<b>Úvodem</b>	<b>45</b>
Kolář M. H., Dražanský J.: <b>Nobelova cena pro Bakera, Hassabise a Jumpera není velké překvapení</b>	<b>46</b>
Švorčík V.: <b>Technologie přípravy „zeleného“ čpavku jako zdroje energie</b>	<b>47</b>
Kopečný J.: <b>Anaerobní houby u přezvůvků</b>	<b>48</b>
Stránský D., Sýkorová Z., Srb M., Jeníček P.: <b>Anaerobní kofermentace biologicky rozložitelných odpadů jako cesta pro zvýšení produkce bioplynu</b>	<b>50</b>
Staněk R., Záborská J.: <b>Inhibice biologické denitrifikace oxidem dusnatým, její včasná detekce a prevence negativního vlivu na denitrifikaci průmyslových odpadních vod</b>	<b>56</b>

## CONTENT

<b>Editorial</b>	<b>45</b>
Kolář M. H., Dražanský J.: <b>Nobel Prize for Baker, Hassabis and Jumper is not big surprise</b>	<b>46</b>
Švorčík V.: <b>Technology for preparation of «green» ammonia as energy source</b>	<b>47</b>
Kopečný J.: <b>Anaerobní houby u přezvůvků</b>	<b>48</b>
Stránský D., Sýkorová Z., Srb M., Jeníček P.: <b>Anaerobic cofermentation of biodegradable waste as a way to increase biogas production</b>	<b>50</b>
Staněk R., Záborská J.: <b>Inhibition of biological denitrification by nitric oxide, its early detection and prevention of negative impact on denitrification of industrial wastewater</b>	<b>56</b>



## REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Dana Pokorná, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)  
doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)  
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)  
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)  
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6  
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1  
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertov 6, 128 43 Praha 2  
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno  
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6  
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4  
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice  
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov  
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

---

## POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu jsou uváděny ve formě Author-Date v příslušném místě textu, včetně tabulek a obrázků (McKnight et al. 2022). V seznamu literatury jsou potom uváděny v abecedním pořadí. Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují arabskými číslicemi (příklad formátu **Tab. 1:**). Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nevkládějte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na Danka.Pokorna@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References to the literature are referenced in Author-Date form at the appropriate point in the text, including tables and figures (McKnight et al. 2022). They are then listed in alphabetical order in the reference list. Journal abbreviations are used according to Chemical Abstract Service Source Index convention.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z.: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are identified by Arabic numerals (example format **Tab. 1:**). Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or Danka.Pokorna@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.



# **BIOPROSPECT**

Vydavatel:  
**BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST**  
Technická 3  
166 28 Praha 6  
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:  
**MK ČR E 19409**

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik  
vydávaných v ČR

Tiskne:  
VENICE Praha, s.r.o.  
Za Hanspaulkou 13/875  
160 00 Praha 6

**ISSN 1210-1737** (Print)  
**ISSN 2570-8910** (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)  
jsou archivovány Národní knihovnou ČR ([www.webarchiv.cz](http://www.webarchiv.cz)).