

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Štěpánka Stránská

Využití analýzy fosfolipidových mastných kyselin při studiu biosušení

Utilization of phospholipid fatty acids analysis for biodrying study

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Tomáš Cajthaml, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž řádně odkazuji. Rovněž prohlašuji, že předložená tištěná verze diplomové práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

Děkuji mému školiteli prof. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za velkou ochotu, čas a cenné rady při vedení mé diplomové práce. Velké poděkování patří Ing. Aleně Filipové a Mgr. Jaroslavu Kuklovi za pomoc při zpracování PLFA a Mgr. Aleně Černíkové, Ph.D. za rady při statistickém zpracování dat. Dále děkuji zaměstnancům společnosti DEKONTA a.s. za poskytnutá data a odběr vzorků a Mgr. Vojtěchu Pilnáčkovi za odborné rady týkající se procesu biosušení. Na závěr děkuji mé rodině a přítelovi za velikou trpělivost a psychickou i finanční podporu během celého studia a mým spolužákům z bakalářského, a hlavně magisterského studia, bez kterých bych své studium nedotáhla až do konce.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract.....	7
Seznam zkratk.....	8
1. Úvod	10
2. Cíle práce a hypotézy	13
3. Teoretická část.....	14
3.1. Biosušení.....	14
3.1.1. Teplota	14
3.1.2. Vlhkost	16
3.1.3. Vylehčující materiály	18
3.1.4. Provzdušňování	19
3.1.5. Promíchávání substrátu	21
3.1.6. Degradace organických látek	22
3.1.7. Mikroorganismy při biosušení.....	28
3.2. Analýza PLFA	31
3.2.1. PLFA	32
3.2.1.1 PLFA jako biomarker.....	35
3.2.2. Metody pro stanovení PLFA	38
4. Experimentální část	42
4.1. Použité chemikálie a materiál	42
4.2. Přístrojové vybavení	42
4.3. Proces biosušení.....	43
4.4. Stanovení PLFA.....	46
4.4.1. Odběr a příprava vzorků.....	46
4.4.2. Extrakce lipidů.....	46

4.4.3.	Frakcionace lipidů	47
4.4.4.	Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace).....	47
4.4.5.	GC/MS analýza	48
4.4.6.	Vyhodnocení.....	48
4.5.	Statistické zpracování dat	49
4.5.1.	Celková mikrobiální biomasa.....	49
4.5.2.	Poměr H/B	49
4.5.3.	Biomasa aktinobakterií	49
4.5.4.	Poměr G+/G-.....	50
4.5.5.	PCA	50
5.	Výsledky a diskuze.....	51
5.1.	Vývoj skupin mikroorganismů	51
5.1.1.	Celková mikrobiální biomasa.....	51
5.1.2.	Poměr H/B	55
5.1.3.	Biomasa aktinobakterií	59
5.1.4.	Poměr G+/G-.....	64
5.2.	PCA.....	68
6.	Závěr.....	81
	Literatura	84
	Přílohy	104

Abstrakt

Cílem této diplomové práce je využití analýzy fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) pro stanovení skupin mikroorganismů v průběhu biosušení čistírenských kalů a jejich popis vzhledem k teplotnímu režimu biosušení.

Byly sledovány 4 experimentální cykly A, B, C, D, přičemž cykly A, B a C, D se vzájemně lišily čistírenským kalem odebíraným ze dvou čistíren odpadních vod. Každý cyklus A, B, C, D probíhal ve 2 reaktorech s různými režimy provzdušňování pro porovnání mezofilního (max. teploty ± 50 °C) a termofilního (max. teploty ± 70 °C) režimu biosušení. Pro stanovení mikrobiálních skupin byla použita analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA). Koncentrace jednotlivých PLFA byly podrobeny analýze hlavních komponent (PCA).

Celková koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase klesala v průběhu obou teplotních režimů cyklů B, C a D, oproti tomu ke konci obou teplotních režimů cyklu A byl zaznamenán nárůst celkové koncentrace PLFA. Výsledné celkové koncentrace PLFA dosahovaly statisticky vyšších hodnot na konci mezofilních režimů cyklů B, C a D. Vývoj poměru hub a bakterií ukázal, že houby se více uplatňovaly s postupem obou teplotních režimů cyklů A, B a termofilního režimu cyklu C. Na základě vývoje koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie bylo patrné, že nedošlo k nárůstu biomasy aktinobakterií ke konci termofilních režimů cyklů A, B a mezofilního režimu cyklu D. Vývoj poměru gram-pozitivních (G+) a gram-negativních (G-) bakterií ukázal, že ve fázi vysokých teplot u cyklů B, C a D se G+ bakterie více uplatňovaly při termofilním režimu. Kromě toho koncentrace PLFA charakteristické pro G- bakterie klesly v průběhu obou teplotních režimů cyklů A, B, C, D, což vypovídá o poklesu jejich biomasy v průběhu biosušení. PCA ukázala korelaci mezi PLFA i16:0, i17:0, a17:0 a vzorky odebranými ve fázi vyšších teplot. Kromě toho se vzorky odebranými na konci procesu korelovaly nejčastěji methyl-substituované PLFA a cyklopropylové PLFA, nicméně tyto výsledky se lišily jak mezi cykly, tak mezi teplotními režimy. Na základě výsledků analýzy PLFA je patrné, že vývoj skupin mikroorganismů byl různorodý a ukázalo se, že analýza PLFA poskytuje účinné hodnocení vývoje skupin mikroorganismů při biosušení čistírenských kalů.

Klíčová slova: biosušení, čistírenský kal, PLFA, mikrobiální společenstva

Abstract

The aim of this thesis is the utilization of phospholipid fatty acids (PLFA) analysis to determine groups of microorganisms present during the biodrying of sewage sludge and their description in relation to the temperature regime of the biodrying.

Four experimental cycles A, B, C, D were followed. Cycles A, B and C, D differed from each other in the sewage sludge collected from two waste water treatment plants. The cycles A, B, C and D were each performed in two reactors with different aeration regimes to compare the mesophilic (max. temperature ± 50 °C) and thermophilic (max. temperature ± 70 °C) regimes of biodrying. PLFA analysis was used to determine the microbial groups. Concentrations of individual PLFA were subjected to principal component analysis (PCA).

The total PLFA concentration corresponding to total microbial biomass was decreasing during both temperature regimes of cycles B, C, D, while the total PLFA concentration increased towards the end of both temperature regimes of cycle A. The total PLFA concentration reached statistically higher values at the end of the mesophilic regime of cycles B, C and D. The development of fungi to bacteria ratio showed that fungi applied more with the progression of both temperature regimes of cycles A, B and the thermophilic regime of cycle C. Based on the development of PLFA concentrations which are characteristic of actinobacteria, it was evident that their biomass did not increase towards the end of the thermophilic regimes of cycles A, B and the mesophilic regime of cycle D. The development of gram-positive (G+) and gram-negative (G-) bacterial ratio showed that in the high temperature phase of cycles B, C and D the G+ bacteria were more abundant in the thermophilic regime. Moreover, the concentrations of PLFA which are characteristic of G- bacteria decreased during both temperature regimes of cycles A, B, C, D, indicating a decrease in their biomass during biodrying. PCA showed a correlation between PLFA i16:0, i17:0, and a17:0 and samples taken at the higher temperature stage. In addition, samples taken at the end of the process correlated most frequently with methyl-substituted PLFA and cyclopropyl PLFA, however, these results differed between cycles and between temperature regimes. Based on the results of the PLFA analysis it was evident that the development of microbial groups was diverse and it was showed that the PLFA analysis provides an effective assessment of the development of microbial groups during the biodrying of sewage sludge.

Keywords: biodrying, sewage sludge, PLFA, microbial communities

Seznam zkratek

AOX (Adsorbable Organohalogens) – adsorbovatelné halogenované organické látky

BRANC (Branched Chain Fatty Acids) – mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem

ČOV – čistírna odpadních vod

DNA (Deoxyribonucleic Acid) – deoxyribonukleová kyselina

DOC (Dissolved Organic Carbon) – rozpuštěný organický uhlík

DOM (Dissolved Organic Matter) – rozpuštěné organické látky

DON (Dissolved Organic Nitrogen) – rozpuštěný organický dusík

EEM (Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy) – excitačně-emisní fluorescenční spektroskopie matrice

EL-PLFA (Ester-linked Phospholipid Fatty Acids) – esterifikované fosfolipidové mastné kyseliny

HYFA (Hydroxy Substituted Fatty Acids) – hydroxysubstituované mastné kyseliny

MUFA (Monounsaturated Fatty Acids) – mononenasyčené mastné kyseliny

PUFA (Polyunsaturated Fatty Acids) – polynenasycené mastné kyseliny

SATFA (Saturated Fatty Acids) – nasycené mastné kyseliny

UNFA (Unsubstituted Fatty Acids) – nesubstituované mastné kyseliny

e.o. – ekvivaletní obyvatel

FA (Fulvic Acid) – fulvokyselina

FAME (Fatty Acids Methyl Esters) – methylestery mastných kyselin

GC/MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

GPL (Glycerophospholipids) – glycerfosfolipidy

HA (Humic Acid) – huminová kyselina

KTJ – kolonie tvořící jednotku

NEL-PLFA (Non-ester Linked Phospholipid Fatty Acids) – neesterifikované fosfolipidové mastné kyseliny

PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) – polycyklické aromatické uhlovodíky

PC1 (Principal Component) – první hlavní komponenta

PC2 (Principal Component) – druhá hlavní komponenta

PCA (Principal Component Analysis) – analýza hlavních komponent

PCB (Polychlorinated Biphenyls) – polychlorované bifenyly

PLFA (Phospholipid Fatty Acids) – fosfolipidové mastné kyseliny

PL-FAME (Phospholipid Fatty Acids Methyl Esters) – methylestery fosfolipidových mastných kyselin

PPCP (Pharmaceutical and Personal Care Products) – produkty osobní péče

SPE (Solid Phase Extraction) – extrakce na pevné fázi

STRA (Straight Chain Fatty Acids) – mastné kyseliny s rovným řetězcem

1. Úvod

Čistírenské kaly jsou nevyhnutelným vedlejším produktem při čištění odpadních vod, přičemž v mnoha zemích představují klíčový problém kvůli jejich narůstající produkci a dopadům spojených s jejich likvidací (Chen a kol., 2002; Lamastra a kol., 2018). Čistírenské kaly obsahují řadu rizikových látek jako jsou těžké kovy, polycyklické aromatické uhlovodíky (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – PAH), polychlorované bifenyly (Polychlorinated Biphenyls – PCB), adsorbovatelné halogenované organické látky (Adsorbable Organohalogen – AOX) a pesticidy (Abad a kol., 2005; Kapanen a kol., 2013; Lamastra a kol., 2018; Müller, 2003). Také přítomnost patogenních organismů představuje riziko pro zdraví lidí, zvířat i rostlin (Machnicka, 2014; Winkler a kol., 2013). Další významný problém představují také produkty osobní péče (Pharmaceutical and Personal Care Products – PPCP) zahrnující endokrinní disruptory či residua antibiotik (Díaz-Cruz a kol., 2009; Ezzariai a kol., 2018; Stasinakis, 2012; Wu a kol., 2017). Na druhou stranu čistírenské kaly mají i vysoký obsah živin, díky kterému mohou být považovány za cenné hnojivo (Kacprzak a kol., 2017; Kchaou a kol., 2018; Usman a kol., 2012).

Za rok 2017 bylo na území České republiky vyprodukováno 178 077 tun sušiny čistírenských kalů, přičemž jejich převažující způsob zneškodnění byla přímá aplikace na půdu a využití při rekultivacích (42 %). Další způsoby zneškodnění zahrnovaly kompostování (34 %), skládkování (7 %), spalování (3 %). Jiné způsoby zneškodnění představovaly 14 % (ČSÚ). Aby se zabránilo kontaminaci půdy a podzemních vod rizikovými látkami obsaženými v čistírenských kálech, na zemědělskou půdu může být aplikován pouze čistírenský kal, jenž byl upraven takovým způsobem, že legislativou stanovené ukazatele (tj. obsah těžkých kovů, AOX, PCB, PAH a mikrobiologická kritéria) splňují předepsané limity (Vyhláška č. 437/2016 Sb.). Vyhláška č. 437/2016 Sb. také předepisuje, že rozdíl mezi kontaminací kalu pro mikroorganismy *Escherichia coli* a enterokoky před a po úpravě kalu musí být minimálně 10^5 KTJ·g⁻¹ (kolonie tvořící jednotku – KTJ) kalu. V případě že kal obsahuje před úpravou méně než 10^5 KTJ·g⁻¹ těchto mikroorganismů, příslušná technologie je dostatečně účinná pouze v případě, že kal po úpravě vykazuje negativní nálezy pro výše zmíněné mikroorganismy. Pro látky označované jako PPCP v současné době neexistují předepsané limity, nicméně mohou představovat vážné riziko pro životní prostředí (Pamplona-Silva a kol., 2018; Stasinakis, 2012; Sumpter a Johnson, 2005), a proto by jim měla být věnována větší pozornost.

Jednu z možností pro předúpravu či zpracování čistírenských kalů by mohlo představovat biosušení. Jedná se o proces, při kterém je metabolické teplo generované při aerobním rozkladu organických látek efektivně využito pro vysušení příslušného substrátu (Navaee-Ardeh a kol., 2010). Proces biosušení je velmi podobný kompostování, nicméně hlavní rozdíl je v samotném cíli procesů. Účelem kompostování je maximální degradace a mineralizace přítomných organických látek, čímž vzniká stabilní (zralý), na humusové látky bohatý materiál – kompost (Adani a kol., 2002). Oproti tomu cílem biosušení je snížení vlhkosti odpadu s minimální degradací organických látek, aby výsledný materiál měl co nejvyšší energetickou hodnotu (Velis a kol., 2009). Literatura uvádí, že výhřevnost konečného produktu se pohybuje mezi 14-18 MJ·kg⁻¹ (Garg a kol., 2007; Sugni a kol., 2005; Tambone a kol., 2011; Velis a kol., 2012; Yang a kol., 2014). Proto produkt biosušení může být vhodnou alternativou pro fosilní paliva, jako je například hnědé uhlí (Navaee-Ardeh a kol., 2006; Winkler a kol., 2013), jehož výhřevnost se pohybuje mezi 10-17 MJ·kg⁻¹ (TZB-info).

Biosušení tak může být považováno za metodu získávání obnovitelného zdroje energie. Ve srovnání s konvekčním tepelným sušením, kdy za cenu neobnovitelného zdroje energie je odpad vysušen při relativně vysokých teplotách, je biosušení nákladově efektivní a šetrné k životnímu prostředí (Zhao a kol., 2010). Kromě toho biosušení je vhodnou metodou pro předúpravu odpadů, během které dochází k snížení hmotnosti i objemu odpadu a která pak činí výstupný materiál vhodnější pro jeho následné zpracování (Bilgin a Tulun., 2015; Ma a kol., 2016; Zhao a kol., 2010; Zhao a kol., 2011). Navíc díky vysokým teplotám udržovaným při procesu, může biosušení zajistit nezbytné snížení patogenních organismů (Cai a kol., 2016a; Park a kol., 2018; Zhang a kol., 2018b).

Je známo, že při procesu kompostování může být dosaženo poklesu obsahu patogenních organismů, biodegradace organických polutantů i endokrinních disruptorů (Ezzariai a kol., 2018; Kapanen a kol., 2013; Long a kol., 2015; Poulsen a Bester, 2010; Shi a kol., 2016; Verlicchi a Zambello, 2015) a jakožto biosušení představuje proces odvozený od kompostování (Frei a kol., 2004; Winkler a kol., 2013), je možné, že by mohlo poskytovat podobné výsledky. Stejně jako u kompostování při biosušení hrají velmi důležitou roli mikroorganismy. Díky jejich aktivitě dochází jednak k zahřívání příslušného substrátu, které je potřeba pro jeho vysušení a hygienizaci, tak degradaci rizikových látek (Amir a kol., 2008; Antizar-Ladislao a kol., 2008; Cai a kol., 2016a; Navaee-Ardeh a kol., 2010). Pro pochopení

jednotlivých zákonitostí a následnou optimalizaci procesu je nutné znát vývoj mikrobiálních společenstev při biosušení.

Identifikaci mikrobiálních společenstev při biosušení čistírenských kalů bylo věnováno několik studií, ve kterých byly výsledky získávány převážně pomocí metod založených na sekvenování deoxyribonukleové kyseliny (Deoxyribonucleic Acid – DNA) (Cai a kol., 2017; Hao a kol., 2018; Li a kol., 2015b; Park a kol., 2018; Wu a kol., 2018; Zhang a kol., 2018b; Zhang a kol., 2015). Nicméně většina výše uvedených studií se soustředila pouze na bakteriální komunity, ale ostatním mikroorganismům zahrnující houby a konkrétněji např. aktinobakterie bylo zatím věnováno málo pozornosti, či nebyly vůbec analyzovány. Vzhledem k předpokladu, že všechny tyto mikroorganismy se podílejí na degradaci organických látek, jsou zapotřebí komplexní studie o mikrobiálních společenstvech obsahující všechny mikroorganismy (Liu a kol., 2019; Yang a kol., 2017).

Pro charakterizaci mikrobiálních skupin může být využita analýza fosfolipidových mastných kyselin (Phospholipid Fatty Acids – PLFA). Tato analýza představuje citlivou reprodukovatelnou metodu pro relativní stanovení biomasy mikrobiálních společenstev bez jejich kultivace, která poskytuje informace nejen o kvantitě mikrobiálního společenstva ale zároveň částečně i o jeho složení (Kaur a kol., 2005; Mrozik a kol., 2014; Willers a kol., 2015).

2. Cíle práce a hypotézy

Cíle

1. Využití analýzy PLFA pro stanovení skupin mikroorganismů v průběhu biosušení čistírenských kalů.
2. Popis mikrobiálních skupin ve vztahu k teplotnímu režimu biosušení.

Hypotézy

1. Celková mikrobiální biomasa bude klesat v průběhu biosušení.
2. Výsledná mikrobiální biomasa bude vyšší na konci mezofilního režimu biosušení.
3. Houby se budou oproti bakteriím více uplatňovat s postupem biosušení, zatímco ke konci biosušení nebude pozorován nárůst biomasy aktinobakterií.
4. Při termofilním režimu biosušení se budou více uplatňovat gram-pozitivní bakterie, oproti gram-negativním bakteriím, u kterých nedojde ke konci biosušení k rekolonizaci substrátu.

3. Teoretická část

3.1. Biosušení

Biosušení je proces, při kterém je metabolické teplo efektivně využito k vysušení organického materiálu na takovou úroveň, že energetická bilance při jeho spalování je kladná (Winkler a kol., 2013). Během procesu mikroorganismy rozkládají organické látky, přičemž produkují oxid uhličitý a teplo, díky kterému dochází k zahřátí materiálu a následnému odpařování vody, která je pak odváděna pomocí vhněného vzduchu (Frei a kol., 2004; Navaee-Ardeh a kol., 2006; Velis a kol., 2009), jenž navíc zajišťuje aerobní podmínky pro rozklad organických látek (Navaee-Ardeh a kol., 2010). Konvekce vzduchu a molekulární difúze jsou tak primárním přístupem k odstraňování vody z biosušeného materiálu (Frei a kol., 2004).

Biosušení je dynamický proces, při kterém hrají důležitou roli mikroorganismy (Cai a kol., 2016a). Jejich aktivita tedy i kvalita výsledného materiálu je ovlivněna především teplotou, fyzicko-chemickými charakteristikami odpadu a počátečním obsahem vlhkosti odpadu, typem a množstvím vylehčujícího materiálu, mírou provzdušňování, teplotou a relativní vlhkostí vhněného vzduchu a také frekvencí promíchávání substrátu (Colomer-Mendoza a kol., 2013; Velis a kol., 2009; Yang a kol., 2017; Zhao a kol., 2012).

3.1.1. Teplota

Mikroorganismy lze na základě jejich teplotních tolerancí rozdělit do čtyř skupin: psychofilní (aktivní při 0-20 °C), mezofilní (aktivní při 8-48 °C), termofilní (aktivní při 42-68 °C) a hypertermofilní (aktivní při 70-110 °C) (Madigan a kol., 2006). Někteří autoři uvádějí, že pro biosušení je typický teplotní rozsah 15-55 °C (Frei a kol., 2004), i když v závislosti na zvolených provozních parametrech mohou být pozorovány teploty i nad 70 °C (Cai a kol., 2016a; Wu a kol., 2018; Zhang a kol., 2015). Z tohoto důvodu jsou v procesu biosušení důležité převážně mezofilní a termofilní mikroorganismy (Navaee-Ardeh a kol., 2010).

Díky produkovanému metabolickému teplu a provzdušňování substrátu dochází během biosušení ke změnám teploty, což způsobuje změny ve složení mikrobiálních skupin (Su a kol., 2015). Narůstající teplota na začátku procesu postupně omezuje růst mezofilních mikroorganismů a umožňuje rozvoj termofilních mikroorganismů (Navaee-Ardeh a kol.,

2010) a proces tak přechází z mezofilní fáze do termofilní fáze (Cai a kol., 2013). Po termofilní fázi, kdy teploty dosahují svého maxima, dochází k ochlazení, nicméně teploty mohou opětovně narůst a může být pozorovaná druhá termofilní fáze (Cai a kol., 2012; Li a kol., 2015b; Liu a kol., 2018a). Tento pokles a opětovný nárůst teplot může být vysvětlen například pomalou degradací hůře rozložitelných látek po spotřebě snadno rozložitelných látek během první termofilní fáze (Zhao a kol., 2010) nebo obnovením termofilní mikrobiální populace díky zlepšení aerobních podmínek v důsledku promíchání substrátu (Petric a kol., 2009). Nicméně po těchto fázích proces přechází do fáze ochlazení, kdy teploty pozvolna klesají (Cai a kol., 2013) a umožňují růst opět mezofilních organismů (Zhang a kol., 2015). Změny ve složení mikrobiálních skupin ovlivňují degradaci organických látek a produkci bioproduktů, což má ve výsledku vliv na odpařování vody (Cai a kol., 2015).

Velký význam při biosušení má termofilní fáze, kdy vysoké teploty jsou důsledkem degradace snadno rozložitelných a lignocelulóзовých látek (Cai a kol., 2016a; Zhang a kol., 2018b). Díky vysokým teplotám ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$) dochází k účinnému odpařování vody (Velis a kol., 2009; Zhao a kol., 2011), přičemž vysoký teplotní profil spolu s vhodnou mírou provzdušňování pak může urychlit odstraňování vody (Adani a kol., 2002; Sugni a kol., 2005). Nicméně příliš vysoké teploty ($>60\text{ }^{\circ}\text{C}$) výrazně zpomalují či dokonce zastavují degradaci organických látek (Liang a kol., 2003; Velis a kol., 2009). Proto je vhodné udržovat mírně vysoké teploty ($50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$), které by podporovaly odpařování vody, ale zároveň stimulovaly mikrobiální degradaci (Ma a kol., 2018).

Pozitivní význam mírných teplot pro proces biosušení potvrdili Adani a kol. (2002), kteří sledovali vliv teploty na procesy kompostování a biosušení komunálních odpadů. Byly provedeny tři pokusy A, B, C, které díky regulaci míry provzdušňování probíhaly při různých teplotách ($A = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $B = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $C = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Došli k závěru, že pokus A zvýhodňoval proces kompostování zatímco pokus C proces biosušení. Produkt pokusu A byl charakterizován nejvyšší mírou degradace ($166\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního obsahu tuhých látek), nejnižší ztrátou vody ($409\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního obsahu vody) a nejnižší energetickou hodnotou ($10,35\text{ KJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ mokré váhy). Oproti tomu pokus C se vyznačoval nejnižší mírou degradace ($18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního obsahu tuhých látek) a nejvyšší ztrátou vody ($667\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního obsahu vody), přičemž jeho produkt měl nejvyšší energetickou hodnotou ($14,06\text{ KJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ mokré váhy).

Na druhou stranu vyšší teploty udržované při biosušení mohou vést k eliminaci patogenů a parazitů, jak uvádějí Cai a kol. (2016a), kteří na začátku biosušení čistírenského kalu zjistili přítomnost patogenních bakterií *Arcobacter* a *Prevotella*. Po 20denním biosušení, během kterého teploty dosahovaly téměř 70 °C, nebyly tyto bakterie detekovány. Také další autoři uvádějí, že právě vysoké teploty (>55 °C) a sušící účinek vedly k inaktivaci vajíček *Ascaris Suum* při biosušení směsi živočišného odpadu a podestýlkového materiálu (Collick a kol., 2007).

3.1.2. Vlhkost

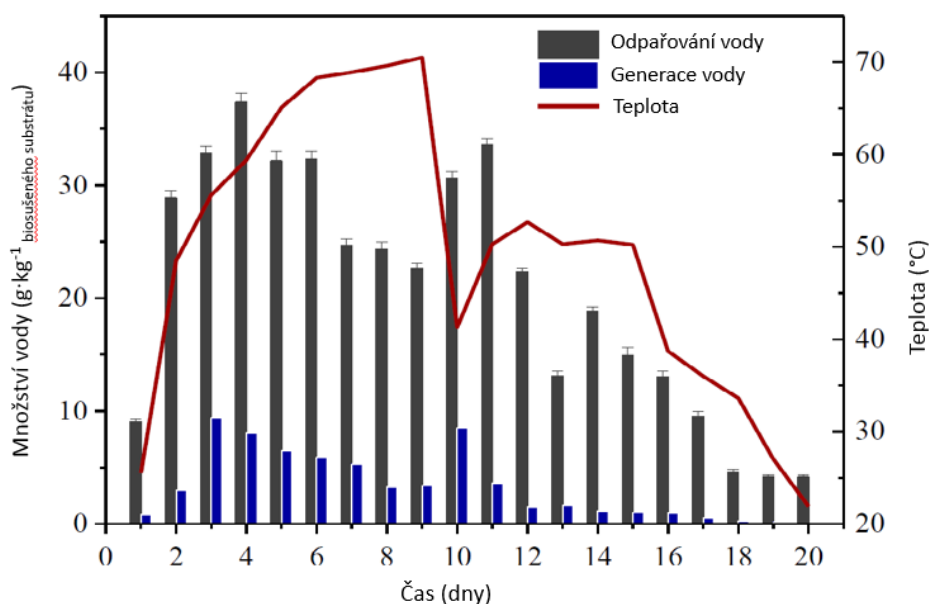
Vysoká vlhkost v organických odpadech, jako jsou i čistírenské kaly, vede ke vzniku nebezpečných výluhů, nepřímo způsobuje problémy se zápachem (Yang a kol., 2014) a navíc snižuje výslednou výhřevnost (Hamidian a kol., 2017; Tom a kol., 2016; Yuan a kol., 2017). Spalování těchto odpadů bez předchozí redukce vlhkosti vyžaduje často použití pomocného paliva ve formě fosilního paliva (Frei a kol., 2004), což vede k vysokým výdajům a nepřímým emisím skleníkových plynů (Liu a kol., 2017a). Z těchto důvodů je pro konečné odstranění či opětovné využití čistírenských kalů snížení vlhkosti podstatné (Yang a kol., 2014).

Přestože čistírenské kaly jsou obvykle mechanicky odvodněny, obsah vlhkosti mají stále okolo 80 hm. %, nebo i vyšší (Cai a kol., 2016b, 2015; Huang a kol., 2015). V důsledku vysoké vlhkosti jsou mezery mezi částicemi odpadu naplněny vodou, což zamezuje přístupu kyslíku, čímž je během biosušení inhibován aerobní rozklad organických látek (Frei a kol., 2004; Luo a kol., 2008; Yang a kol., 2014). Na druhou stranu pokud během biosušení dojde k snížení vlhkosti pod koncentraci nutnou pro mikrobiální aktivitu, dochází opět k inhibici rozkladu organických látek a tím k následnému poklesu teploty materiálu (Adani a kol., 2002; Frei a kol., 2004).

To můžeme pozorovat v pozdních fázích konvenčního biosušení, kdy poměrně nízký obsah vlhkosti (<50 %) v substrátu zpomaluje mikrobiální aktivitu. Vyčerpání snadno rozložitelných látek navíc limituje mikrobiální degradaci (Yang a kol., 2014), čímž dochází ke vzniku nízkých teplot, které nejsou dostatečné pro účinné odstraňování vody, a proto byl v předchozích studiích výsledný obsah vlhkosti i při prodloužení procesu na více jak 15 dní okolo 45 % (Hao a kol., 2018; Zhao a kol., 2010).

Čistírenské kaly obsahují tzv. volnou a vázanou vodu. Voda, která může být odstraněna mechanickým odvodňováním, je nazývána volnou vodou, zatímco vázaná voda je definována jako část vlhkosti, kterou nelze mechanicky odstranit (Chen a kol., 2002). Odstraňování vody během biosušení je dosahováno převážně odpařováním volné vody (Velis a kol., 2009). Vzhledem k tomu, že čistírenské kaly po mechanickém odvodnění obsahují převážně vázanou vodu, její obsah tak představuje klíčový faktor ovlivňující odstraňování vody při biosušení kalů (Song a kol., 2014). Nicméně Cai a kol. (2016b) sledovali pomocí měření dielektrické konstanty množství volné vody v průběhu biosušení čistírenských kalů s pilinami a biovysušeným kalem. Na základě výsledků zjistili, že při překročení teploty 40 °C začalo docházet k většímu uvolňování volné vody, přičemž nejvyšší míra uvolnění a zároveň pokles obsahu vázané vody byl pozorován při zvýšení teploty z 50 °C na 60 °C, kdy byl pozorován nárůst dielektrické konstanty z 11,42 na 15,28 a pokles obsahu vázané vody z 9,8 % na 5,9 %.

Vodní hmotností bilance ukazuje, že změny v objemové vlhkosti jsou spojeny se vstupem a ztrátou vody (Velis a kol., 2009). Vstupy vody zahrnují tvorbu vody v důsledku mikrobiálního metabolismu (Sole-Mauri a kol., 2007; Zhang a kol., 2010) a vlhkost přiváděnou proudem vzduchu (Cai a kol., 2012). Ztráty vody jsou tvořeny dominantně odparem vody (Velis a kol., 2009). Z literatury pak vyplývá, že k největší míře odpařování i generaci vody dochází v první a druhé termofilní fázi (Cai a kol., 2012; Liu a kol., 2018b; Zhang a kol., 2018a), což poukazuje na maximální aktivitu mikroorganismů v těchto fázích. Tento vývoj zamenali i Cai a kol. (2016a) při biosušení čistírenských kalů s pilinami a biovysušeným kalem (Obr. 1). Celý proces trval 20 dní, přičemž materiál byl během této doby čtyřikrát mechanicky promíchán (dny 9, 12, 15, 18). Na základě jejich výsledků je také patrné, že odpařování vody výrazně převažuje v průběhu celého procesu nad její generací, s čímž souhlasí i jiní autoři (Liu a kol., 2018b).



Obrázek 1: Vývoj odpařování vody, generace vody a teploty v průběhu biosušení čistírenských kalů (podle Cai a kol., 2016a)

Díky těmto skutečnostem se odpařování vody a vlhkost daného materiálu neustále mění, a proto nelze udržovat optimální vlhkost během celého procesu (Yang a kol., 2017). Z tohoto důvodu se autoři zaměřili na nalezení optimální počáteční vlhkosti organických odpadů pro jejich biosušení. Z literatury vyplývá, že tato optimální počáteční vlhkost se pohybuje mezi 50-70 hm. % na základě použitého organického odpadu (Adani a kol., 2002; Frei a kol., 2004; Ma a kol., 2016; Tambone a kol., 2011). S tímto tvrzením souhlasí i Yang a kol. (2014), kteří při biosušení čistírenského kalu s počáteční vlhkostí 50-70 hm. % dosáhli během 10 dnů 33,7-47,1% odstranění počátečního obsahu vody. Podobně Huiliñir a Villegas (2015) došli k závěru, že optimální počáteční vlhkost pro biosušení čistírenských kalů je 68 hm. %. Při této počáteční vlhkosti a při míře provzdušňování $3 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}_{\text{sušiny}}^{-1}$ bylo odstraněno 26,4 % vody, ve srovnání s počátečními vlhkostmi 59 hm. % a 78 hm. %, při kterých se stejnou mírou provzdušňování bylo odstraněno pouze 15,8 % a 12,2 %.

3.1.3. Vylehčující materiály

Pro dosažení optimální počáteční vlhkosti se používají vylehčující materiály, které se s příslušným organickým odpadem namíchají před začátkem biosušení (Liu a kol., 2018b; Yang a kol., 2014; Yuan a kol., 2017). Tyto vylehčující materiály do sebe absorbují část vody obsažené v odpadu a navíc zvýší jeho pórovitost, čímž umožní lepší proudění vzduchu a usnadní tak aerobní rozklad organických látek (Colomer-Mendoza a kol., 2013; Ma a kol.,

2016; Song a kol., 2017). Kromě toho u organických odpadů s nízkým poměrem C/N mohou vylehčující materiály představovat externí zdroj uhlíku pro mikroorganismy a tím usnadňovat proces biosušení (Ma a kol., 2016; Yang a kol., 2014). Sláma, piliny, dřevěné štěpky, drcený kaučuk či produkty biosušení jsou často doporučovány jako vylehčující materiály (Gea a kol., 2007; Li a kol., 2015b; Yang a kol., 2014, 2013; Yuan a kol., 2017; Zhao a kol., 2012, 2011).

Yang a kol. (2014) sledovali vliv různých vylehčujících materiálů (kal vysušený vzduchem, biovysušený kal, piliny, drcený kaučuk) při biosušení čistírenského kalu. Zjistili, že použití kalu vysušeného vzduchem a biovysušeného kalu způsobilo vyšší ztrátu hmotnosti a větší odstranění vody než při použití drceného kaučuku či pilin. Nejvyšší účinnosti biosušení bylo pak dosaženo při použití kalu vysušeného vzduchem, kdy bylo odstraněno okolo 55,1 % počátečního obsahu vody se spotřebou 23,8 % počátečního obsahu těkavých organických látek. Oproti tomu použití biovysušeného kalu poskytlo odstranění pouze 38,3 % počátečního obsahu vody se spotřebou 14,0 % počátečního obsahu těkavých organických látek. Tento rozdíl je přisuzován skutečnosti, že kal vysušený vzduchem obsahuje více snadno biologicky rozložitelných organických látek a v důsledku toho dochází k vyšší produkci metabolického tepla. Nicméně i přes vyšší účinnost poskytovanou kalem vysušeným vzduchem je použití biovysušeného kalu považováno za více praktické a to z důvodu jeho produkce přímo na místě, kdy může být použit jako vylehčující materiál při dalších cyklech biosušení.

Kromě toho produkt biosušení může navíc sloužit i jako inokulum (Zhang a kol., 2009, 2008), které představuje zdroj mikroorganismů i živin (Song a kol., 2017) a může zvýšit účinnost biosušení. (Zhang a kol., 2008) uvedli, že přidání produktu biosušení jako inokula při biosušení komunálního odpadu celkově urychlilo biodegradaci, zvýšilo rychlost degradace lignocelulóz o 10,4 % a snížilo konečný obsah vody o 7 %.

3.1.4. Provzdušňování

Míra provzdušňování je hlavní provozní parametr, který má vliv na účinnost biosušení a měl by být řádně kontrolován během celého procesu (Cai a kol., 2013; Velis a kol., 2009; Zhang a kol., 2015). Vzduch procházející substrátem zajišťuje odnos vznikající vodní páry, kyslík pro mikroorganismy, ale také odvod tepla (Navae-Ardeh a kol., 2010; Zhang a kol., 2015).

Proto je velmi důležité zvolit vhodnou míru provzdušňování pro efektivní biosušení (Villegas a Huiliñir, 2014).

Z literatury vyplývá, že pokud míra provzdušňování je příliš nízká, biodegradace organických látek může být inhibována nedostatkem kyslíku, čímž nedochází k dostatečnému zahřátí substrátu a v důsledku toho je odpařování vody nedostatečné (Navaee-Ardeh a kol., 2006; Zhang a kol., 2015). Naopak pokud je míra provzdušňování příliš vysoká, dochází tak k ochlazení substrátu, což má negativní vliv na činnost mikroorganismů a na celý proces biosušení (Frei a kol., 2004; Zawadzka a kol., 2010). Například nízké teploty vyvolané uvedeným způsobem mohou vést k prodloužení lagové fáze mikroorganismů (Navaee-Ardeh a kol., 2010) a tím k opoždění termofilní fáze, čímž dochází k omezení odstraňování vody (Cai a kol., 2013).

Tyto skutečnosti potvrzují Yang a Jahng (2015), kteří sledovali vliv různých rychlostí provzdušňování na biosušení směsi potravinářského odpadu a biovysušeného čistírenského kalu. Experimentální rychlosti provzdušňování byly 0,04, 0,09, 0,14 $\text{m}^3 \cdot \text{kg}_{(\text{sušiny})}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, přičemž maximální dosažené teploty během procesu byly 67,9, 60,7 a 49,6 °C. Výsledky ukázaly, že optimální míra provzdušňování byla 0,09 $\text{m}^3 \cdot \text{kg}_{(\text{sušiny})}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, kdy došlo k nejvyššímu odpařování vody (126 %). Při rychlosti 0,04 $\text{m}^3 \cdot \text{kg}_{(\text{sušiny})}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ sice bylo dosaženo nejvyšší teploty, nicméně míra provzdušňování byla příliš nízká pro dostatečný odnos vodní páry. Oproti tomu rychlost 0,14 $\text{m}^3 \cdot \text{kg}_{(\text{sušiny})}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ byla příliš vysoká a došlo k ochlazení substrátu.

Hodnotíme-li jednotlivé fáze procesu, zjistíme, že během počáteční fáze zvyšování teploty odvodněný kal obsahuje převážně vázanou vodu a naopak málo volné vody, která může být odpařena proudem vzduchu (Vesilind, 1994). Ve fázi ochlazení, když konvekce vzduchu dosáhne hydroskopického limitu, má velký objem přiváděného vzduchu malý vliv na odstraňování vody (Velis a kol., 2009). Proto při biosušení čistírenských kalů se poptávka po provzdušňování v jednotlivých fázích liší (Cai a kol., 2013; Zhao a kol., 2010).

Wu a kol. (2018) sledovali vliv různých režimů provzdušňování na biosušení čistírenských kalů s pilinami a biovysušeným kalem. Ve zkoušce V se míra provzdušňování měnila podle jednotlivých teplotních fází, kdy během mezofilní fáze byla nastavena nižší míra provzdušňování, přibližně 20-40 $\text{m}^3 \cdot \text{t}^{-1}$ substrátu a během termofilní fáze naopak vyšší, přibližně 55 $\text{m}^3 \cdot \text{t}^{-1}$ substrátu. Zatímco ve zkoušce C byla nastavena konstantní míra provzdušňování okolo 46 $\text{m}^3 \cdot \text{t}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$. Došli k závěru, že proměnlivý režim provzdušňování

poskytuje vyšší účinnost biosušení. Po 20 dnech biosušení byl obsah vlhkosti snížen z počátečních 66,3 % na 50,4 % pro zkoušku V a na 54,1 % pro zkoušku C.

Důležitým aspektem provzdušňování je také relativní vlhkost a teplota vstupujícího vzduchu (Velis a kol., 2009; Zhao a kol., 2012). Teplý vzduch má větší sušící schopnost a nízká vlhkost může urychlit odpařování (Colomer-Mendoza a kol., 2013; Dominczyk a kol., 2014; Winkler a kol., 2013). Proto v průběhu biosušení, kdy se postupně zvyšuje teplota, zvyšuje se i kapacita vzduchu pro odnos vlhkosti a je tak odstraňováno více vody (Frei a kol., 2004). Tento nárůst zaznamenali při biosušení čistírenských kalů ve své studii Winkler a kol. (2013), kde kapacity vzduchu pro odnos vlhkosti při teplotě 35, 55, 60, 70 °C činily 36, 100, 130, 270 g_{vody}·m⁻³ vzduchu.

Je-li vzduch vháněn do reaktoru pouze jedním směrem, proud vzduchu procházející substrátem se postupně ohřívá a navyšuje se jeho relativní vlhkost až do bodu saturace, kdy se stává nasyceným a není schopen absorbovat další molekuly vody (Sugni a kol., 2005; Zhang a kol., 2015). V důsledku toho substrát není vysoušen zcela rovnoměrně a ve vertikálním profilu vznikají gradienty jednotlivých procesních proměnných (Sugni a kol., 2005; Zhao a kol., 2010). Vzniku gradientů se dá pak předcházet promícháváním substrátu (Zhang a kol., 2015; Zhao a kol., 2010).

3.1.5. Promíchávání substrátu

Promíchávání substrátu je stejně jako provzdušňování důležitá operace, která má pozitivní i negativní účinky na biosušení (Zhao a kol., 2010). Promíchání zvyšuje poréznost substrátu, čímž obnovuje volné mezery pro proudění vzduchu, usnadňuje kontakty mezi kyslíkem a biologicky rozložitelnými látkami a tím podporuje aerobní degradaci organických látek. Navíc během promíchání jsou vystavovány čerstvé materiály pro mikrobiální kolonizaci a ve výsledku je tak podporováno homogenní vysoušení substrátu (Kalamdhad a Kazmi, 2009; Stanford a kol., 2009).

Promíchání však i způsobuje pokles teploty v substrátu (Zhao a kol., 2010), což ovlivňuje jak proces samozahřívání, tak i zachování tepla uvnitř reaktoru (Cai a kol., 2015). Protože teplota substrátu souvisí s odpařováním vody (Frei a kol., 2006, 2004), frekvence promíchávání tak ovlivňuje rychlost odstraňování vody (Shao a kol., 2015). Ztráty tepla způsobené promícháním však významně ovlivňují proces biosušení, a proto je důležité, aby během procesu byl vytvořen vhodný režim promíchávání (Cai a kol., 2015).

Cai a kol. (2015) sledovali vliv různých režimů mechanického otáčení na biosušení čistírenských kalů s pilinami a biovysušeným substrátem a uvedli, že otočení jednou v pozdní fázi první termofilní fáze (den 9) a dvakrát po první termofilní fázi vedlo k nejvyšší produkci metabolického tepla ($1,641 \text{ MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního substrátu), nejvyšší míře odpařování ($0,379 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$ počátečního substrátu), přičemž obsah vlhkosti byl snížen z 65,6 % na 50,3 %. Oproti tomu při otočení na začátku procesu biosušení, kdy teplota materiálu postupně rostla, vedlo k velkým ztrátám tepla. V důsledku toho byla zkrácena termofilní fáze, což vedlo k omezené biodegradaci organických látek a ve výsledku nízké produkci tepla. Obsah vlhkosti byl snížen pouze na 60,4 %.

3.1.6. Degradace organických látek

Pro vyjádření obsahu organických látek je měřen obsah těkavých organických látek, které představují část organických látek rozkládajících se při zvýšení teploty odpadu (Velis a kol., 2009). V důsledku degradace organických látek mikroorganismy dochází v průběhu biosušení k poklesu obsahu těkavých organických látek, přičemž k nejvyšší míře degradace dochází v termofilní fázi (Cai a kol., 2016a; Li a kol., 2015b; Liu a kol., 2019; Zhang a kol., 2018b).

Vzhledem k tomu, že cílem biosušení je maximální snížení obsahu vlhkosti s co nejnižší mírou degradace organických látek, výkon procesu může být označen jako množství odstraněné vody na kilogram spotřebovaných organických látek (Zhang a kol., 2008). Pro hodnocení účinnosti biosušení může být použit index biosušení (Biodrying index – I) definovaný jako poměr odstraněné vody a spotřeby těkavých organických látek. Jeho výpočet uvádí rovnice (1):

$$I_t = \frac{WL_t}{OL_t} \quad (1)$$

kde I_t je index biosušení v čase t ; OL_t jsou ztráty organických těkavých látek (kg) v čase t ; WL_t jsou ztráty vody (kg) v čase t (Zhang a kol., 2008).

Index biosušení může být ovlivněn mírou provzdušňování, počátečním obsahem vlhkosti, typem vylehčujícího materiálu a typem substrátu (Huiliñir a Villegas, 2015; Yang a kol., 2017; Yuan a kol., 2017) a na základě toho se indexy biosušení v rámci jednotlivých studií liší, nicméně jeho hodnoty se pohybují mezi 3-6 (Hao a kol., 2018; Li a kol., 2015b; Villegas a Huiliñir, 2014; Winkler a kol., 2013; Yang a kol., 2014; Zhao a kol., 2011, 2010). Nicméně

někteří autoři dosáhli při biosušení čistírenského kalu s biovysušeným kalem hodnoty 8,32 (Yang a kol., 2014). Podobně Huiliñir a Villegas (2015) uvádějí, že dosáhli při biosušení čistírenských kalů s dřevěnými hoblinami hodnot 5-8,4 a dokonce i hodnoty okolo 18. Hlavním důvodem nízké ztráty organických látek v této studii byla zřejmě extrémě vysoká míra provzdušňování ($0,18 \text{ m}^3 \cdot \text{kg}_{(\text{sušiny})}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), přičemž časté promíchávání (jednou za den) také vedlo k vyšším ztrátám vody (Hao a kol., 2018).

Přestože v průběhu biosušení dochází k poklesu obsahu organických látek, degradace jejich jednotlivých složek neprobíhá stejnou měrou a jejich složení se mění (Cai a kol., 2016a, 2016b; Liu a kol., 2018a).

Rozpuštěné organické látky (Dissolved Organic Matter – DOM) představují látky, které jsou snadno degradovány mikroorganismy a změny v jejich složení mohou ovlivňovat aktivitu mikrobiální komunity (Li a kol., 2015a; Zhang a kol., 2015). DOM obsahuje rozpustné produkty degradace, látky produkované mikrobiálním metabolismem a repolymerované makromolekuly, které jsou přímými zdroji živin pro mikroorganismy. Nerozpustné látky musí být před jejich biologickým využitím hydrolyzovány na DOM (Wang a kol., 2014). DOM zahrnuje rozpuštěný organický uhlík (Dissolved organic Carbon – DOC) a rozpuštěný organický dusík (Dissolved Organic Nitrogen – DON), což jsou látky silně náchylné na mikrobiální přeměnu. Poměr DOC/DON odráží stabilitu odpadů s ohledem na celkovou koncentraci organického uhlíku a dusíku (He a kol., 2011). V případě, že tento poměr klesá pod určitou hodnotu, mikrobiální aktivita je omezena kvůli nevhodnému podílu živin (Li a kol., 2015a), a proto tento poměr určuje mikrobiální schopnost odbourávat organické látky, stejně jako zralost vzniklého materiálu (Liu a kol., 2018a).

Například Liu a kol. (2018a) sledovali vývoj koncentrací DOC a DON při biosušení kalu ze skládky s kalem vznikajícím při výrobě piva. DOC vykazoval během prvních 6 dní rychlý pokles z $60,35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $31,23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ v důsledku využití snadno rozložitelných organických látek mikroorganismy, zejména sacharidů, amino cukrů, nízkomolekulárních organických kyselin (Shao a kol., 2009). Během termofilní fáze koncentrace DOC se mírně zvýšila, protože růst a reprodukce mikroorganismů byly inhibovány vysokými teplotami. Po 9 dni se koncentrace DOC snížila a zůstala ustálená okolo $23,45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Oproti tomu koncentrace DON se na začátku biosušení zvýšila z $14,92 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $23,02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ a poté byl pozorován pokles, který lze vysvětlit spotřebou aminokyselin a proteiny mikroorganismy

(Said-Pullicino a kol., 2007). Poměr DOC/DON se snížil z 4,04 na 2,07, z čehož vyplývá, že biosušení vedlo ke zvýšení zralosti.

Cai a kol. (2016b) použili pro detailnější charakterizaci organických látek EEM (Excitation-Emission Matrix) fluorescenční spektroskopii a na základě píků EEM a změn v intenzitě fluorescence popsal změny ve složení organických látek během biosušení čistírenského kalu s pilinami a biovysušeným kalem. Podle Chen a kol. (2003) byla EEM spektra rozdělena do 5 oblastí v závislosti na vlnových délkách příslušných organických látek. Na začátku procesu byly viditelné 4 píky A, B, C, D, které se nacházely v oblastech odpovídajících jednoduchým aromatickým proteinům (A,B), rozpustným mikrobiálním metabolitům (C) a látkám podobným huminové kyselině (Humic Acid - HA) a fulvokyselině (Fulvic Acid – FA) (D). Během prvních 4 dnů došlo k významnému poklesu ve středové intenzitě fluorescence píku A (33,4-21,8), píku B (31,8-17,9) a píku D (18,9-9,0). Naopak středová intenzita fluorescence píku C vykazovala pouze mírný pokles (21,9-19,0). Po první termofilní fázi pak bylo patrné, že došlo k degradaci jednoduchých aromatických látek a rozpustných mikrobiálních metabolitů (pokles středové intenzity píků A, B, C na 8,1; 7,6; 6,1). Naopak došlo k tvorbě látkám podobným HA a FA (nárůst středové intenzity píku D na 41,9), které však byly následně po druhé termofilní fázi degradovány (pokles středové intenzity píku D na 28,7). Naopak středové intenzity fluorescence píků A, B a C vykazovaly po druhé termofilní fázi nárůst na 21,3; 21,4; 18,0, který je vysvětlován promícháním materiálu v důsledku mechanického otočení po první termofilní fázi, které umožnilo degradaci nedotatečně fermentovaných látek. Během fáze ochlazování však došlo k jejich následné degradaci, přičemž středové intenzity fluorescence píků A (7,7), B (7,9) a C (6,6) na konci procesu naznačují, že během biosušení kalu dochází k významné degradaci těchto látek. Látky podobné HA a FA po nárůstu v první termofilní fázi byly v průběhu fáze ochlazování mírně degradovány, přičemž středová intenzita píku D na konci procesu byla rovna 20,1. Nicméně středová intenzita píku D na začátku procesu byla 18,9, což naznačuje, že během biosušení kalu naopak dochází k nárůstu huminových látek, tedy k zvýšení stability materiálu. Podobný vývoj organických látek byl pomocí stejné metody zaznamenán i v dalších studiích (Liu a kol., 2018a; Zhang a kol., 2015).

Nejvyšší míru degradace při biosušení kalů vykazují převážně snadno rozložitelné organické látky, oproti tomu lignocelulóza zahrnující lignin, celulózu a hemicelulózu představuje substráty odolnější vůči mikrobiálnímu rozkladu, jež mohou být částečně degradovány

a pomalu transformovány (Cai a kol., 2016a). Cai a kol. (2016a) sledovali vývoj degradace hydrolyzovatelných sloučenin, lipidů, ligninu, celulózy, hemicelulózy a huminových kyselin při biosušení čistírenských kalů s pilinami a biovysušným kalem. Hydrolyzovatelné látky, které představovaly spolu s lipidy snadno rozložitelné látky, měly nevyšší míru degradace $77,1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrátu, což představovalo 32,3 % celkové degradace. Míry degradace pro lipidy, hemicelulózu, celulózu a lignin byly $28,2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrátu, $6,5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrátu, $18,4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrátu, $29,4 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ substrátu, což odpovídalo 54,7 %, 28,6 %, 30,5 % a 22,6 % celkové degradace. Obsah všech těchto látek v průběhu procesu klesl, přičemž maximální denní rychlost degradace byla pro hydrolyzovatelné látky, lipidy a hemicelulózu pozorována v počátečním a středním stadiu první termofilní fáze. V druhé termofilní fázi pak došlo k obnovení jejich denních rychlostí degradace a maximální denní rychlosti degradace celulózy a ligninu. Naopak obsah huminových kyselin se průběhu procesu zvýšil o 38,2 %.

Podíl jednotlivých organických látek na celkové ztrátě těkavých organických látek se však může měnit v závislosti na složení substrátu, jak uvádějí (Zhang a kol., 2018a), kteří sledovali spolubiosušení čistírenského kalu a organické frakce komunálního odpadu. Ve zkouškách, kde převažoval podíl čistírenského kalu se na celkové ztrátě těkavých organických látek podílely degradace proteinů (15,0-24,8 %), celulózy (21,8-28,0 %) a hemicelulózy (18,2-21,7 %). Naopak narůstající podíl organické frakce komunálního odpadu zvýšil obsah lipidů a v důsledku toho ve zkouškách s převažujícím podílem organické frakce komunálního odpadu se na celkové ztrátě těkavých organických látek podílely degradace lipidů (13,2-16,0 %), celulózy (26,5-27,4 %) a hemicelulózy (14,3-18,7 %).

Degradace organických látek je důležitá při posuzování biosušícího účinku (Cai a kol., 2018a). Pro degradaci lignocelulózy i sacharidů jsou nutné různé mikroorganismy a enzymy (Cai a kol., 2018a; Feng a kol., 2011; Wang a kol., 2016), jejichž aktivita odpovídá podmínkám biodegradaci a dostupnosti substrátů (Zhang a kol., 2008). Zhang a kol. (2018b) sledovali vývoj aktivit enzymů lignin peroxidázy, karboxymethylcelulózy a xylnázy v průběhu biosušení čistírenského kalu s pilinami a biovysušným kalem. Aktivita lignin peroxidázy narostla v průběhu biosušení z $0,255 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ na $0,552 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ se značným nárůstem po 5 dni (termofilní fáze), což souhlasí se zaznamenanou maximální mírou degradace ligninu mezi 5-10 dnem. Naopak aktivita karboxymethylcelulózy klesla z $0,754 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ na $0,536 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, přičemž nejvyšší aktivitu vykazovala během první termofilní fáze, čímž je

vysvětlována nejvyšší zaznamenaná míra degradace celulózy. Oproti tomu aktivita xylanázy v průběhu první termofilní fáze dosáhla svého minima $0,266 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ a svého maxima pak dosáhla v druhé termofilní fázi, kdy také byla zaznamenána maximální míra degradace hemicelulózy. Výsledky tak naznačují, že teploty nad $60 \text{ }^\circ\text{C}$ upřednostňují aktivitu karboxymethylcelulózy, zatímco teploty pod $60 \text{ }^\circ\text{C}$ aktivity lignin peroxidázy a xylanázy.

Citlivost některých enzymů vůči extrémně vysokým teplotám zanechal při biosušení čistírenského kalu s dřevěnými hoblinami a biovysušeným kalem i Cai a kol. (2018a), kde aktivity enzymů polyfenol oxidázy, β -glukosidázy, α -L-arabinofuranóza byly v první termofilní fázi významně nižší než v ostatních fázích ($p < 0,05$) procesu. Oproti výše zmiňované studii aktivita xylanázy vrcholila na začátku biosušení a poté kontinuálně klesala. Kromě toho významnou degradaci ligninu pozorovali během druhé termofilní fáze, která je přisuzována maximální aktivitě polyfenol oxidázy ($67,11 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) v této fázi. Oproti tomu aktivity ostatních ligninolytických enzymů jako je lakáza, manganová peroxidáza a lignin peroxidáza vrcholili začátkem první termofilní fáze (3 den). Významná degradace celulózy a hemicelulózy probíhala naopak v každé fázi ($p < 0,05$), přičemž jejich degradace byla robustnější před druhou termofilní fází ($p < 0,01$). Tato skutečnost je vysvětlována vyšší aktivitou enzymů exo- β -1,4-glukanové celobiohydrolázy pro degradaci celulózy a β -xylosidáza a xylanázy pro degradaci hemicelulózy v první termofilní fázi než v druhé.

Z literatury vyplývá, že obsah organických látek jako lignocelulóza, proteiny, snadno rozložitelné sacharidy, lipidy v průběhu biosušení klesá, zatímco dochází k nárůstu obsahu huminových látek (Cai a kol., 2016a, 2016b; Liu a kol., 2018a). S tím souhlasí i další autoři, kteří uvedli, že během 18 denního biosušení kalu ze skládky se slámou se obsah huminových látek zvýšil o 49 % (Liu a kol., 2018c). Nicméně Zhang a kol. (2018b) uvádějí, že biosušení zvyšuje podíl HA a naopak snižuje podíl FA. Po 20 denním biosušení čistírenského kalu pozorovali nárůst poměru HA/FA z hodnoty 0,08 na 0,48, což demonstruje proces humifikace, který je obvykle pozorován u kompostování kalů (Xiong a kol., 2010). Tato skutečnost pak zvyšuje význam pro použití produktu biosušení jako přípravku pro zlepšení vlastností půdy například při rekultivacích (Winkler a kol., 2013) a to z důvodu, že makromolekulární humus je důležitým zdrojem organické hmoty (Pietikäinen a kol., 2005), ale také je schopen adsorbovat a fixovat těžké kovy, čímž snižuje jejich mobilitu a biologickou dostupnost adsorpční reakcí (Garcia-Mina, 2006; Liu a kol., 2018c).

Nicméně obsahu těžkých kovů je nutné věnovat pozornost již v biosušeném substrátu a to z důvodu, že v průběhu biosušení může docházet k obohacování těžkými kovy (Yang a kol., 2017). Ty jsou navázané na pevnou složku odpadu, přičemž v důsledku odstraňování vody a organických látek dochází k snižování celkové hmotnosti odpadu, čímž dochází k zvyšování koncentrace těžkých kovů (Shao a kol., 2010; Yang a kol., 2017). Například Shao a kol. (2010) zaznamenali nárůst koncentrace těžkých kovů o 60 % při biosušení komunálního odpadu. Dále zjistili, že 93 % těžkých kovů s výjimkou zinku (86 %) zůstalo v biovysušeném odpadu a méně než 7 % těžkých kovů kromě zinku (14 %) bylo převedeno do výluhu. Po biosušení byl materiál rozdělen do jednotlivých frakcí podle velikosti částic, přičemž koncentrace chromu, olova, mědi, niklu, zinku a rtuti byly nejvyšší u frakce s nejmenší velikostí částic (0,25 mm), které poskytovaly velkou plochu s vysokou adsorpční kapacitou (Al-Chalabi a Hawker, 1997; Al-Khashman, 2004).

Jiní autoři také sledovali vývoj těžkých kovů při biosušení komunálního odpadu a poznamenali, že vzhledem k obohacovacím účinkům se množství těžkých kovů přenášených z jednotkové hmotnosti biovysušeného komunálního odpadu do spalovacích plynů zvyšuje s dobou biosušení (Zhang a kol., 2011). Z tohoto důvodu je nutné sledovat koncentrace těžkých kovů při biosušení, protože při spalování produktu biosušení může být popílek a kouřové plyny kontaminovány zvýšenou úrovní těžkých kovů (Yang a kol., 2017).

V případě, že čistírenský kal obsahuje vyšší koncentrace těžkých kovů, není tak biosušení vhodná předúprava před aplikací kalů na zemědělskou půdu, protože neumožňuje eliminaci těchto kontaminantů (Pilnáček a kol., 2019).

Další riziko pro životní prostředí představují také látky jako jsou například PAH, PCB, či látky patřící do PPCP, nicméně informace o odbourávání těchto látek při biosušení jsou nedostatečné. Na studium degradace vybraných PPCP při biosušení čistírenských kalů se zaměřili Pilnáček a kol. (2019). V této studii sledovali vliv dvou teplotních režimů (mezofilní – teploty mezi 40-50 °C, termofilní – maximální teploty okolo 70 °C) na degradaci bisfenolu-A a irgasanu a došli k závěru, že mezofilní režim vedl k vyšší eliminaci těchto látek, kdy bylo zaznamenáno 88,3% odstranění bisfenolu-A a 47,7% odstranění irgasanu. Oproti tomu při termofilním režimu došlo pouze k 60,1% odstranění bisfenolu-A, u koncentrací irgasanu dokonce nebyl zaznamenán významný pokles.

3.1.7. Mikroorganismy při biosušení

Jak již bylo uvedeno výše, substráty a podmínky procesu určují hustotu a složení mikrobiálních společenstev, přičemž teplota je hlavním faktorem ovlivňujícím metabolickou aktivitu (Ryckeboer a kol., 2003). Na základě přechozích studií je známo, že při kompostování se mikrobiální komunity neustále mění, aby se přizpůsobily nově se vyvíjejícímu prostředí (Amir a kol., 2008; Herrmann a Shann, 1997; Nakasaki a kol., 1985; Ryckeboer a kol., 2003). Stejně tak při biosušení se během mezofilní a termofilní fáze mění zastoupení jednotlivých mikroorganismů tak, jak se mění teplota, vlhkost a koncentrace růstových substrátů během procesu (Cai a kol., 2017; Frei a kol., 2004; Liu a kol., 2018a).

Bakteriální společenstva

Z literatury vyplývá, že během biosušení dochází k změně druhové bohatosti a diverzity bakteriálních společenstev. Druhové bohatství vykazuje nárůst v mezofilní fázi biosušení a postupně klesá ve fázi ochlazování. Diverzita je nejvyšší na začátku biosušení, po nárůstu teplot se snižuje a na konci biosušení opět narůstá, nicméně oproti začátku procesu obvykle dosahuje nižších hodnot (Cai a kol., 2016a; Hao a kol., 2018; Li a kol., 2015b; Liu a kol., 2018a; Wu a kol., 2018). Pokles druhové bohatosti a diverzity zamenali Liu a kol. (2018a), kteří se zabývali studiem biosušení kalu ze skládky smíchaným s kalem vznikajícím při výrobě piva. Pro měření druhové bohatosti použili indexy Chao 1, ACE, Shannon index a inverzní Simpson index. Tyto indexy popisují míru alfa diverzity, přičemž hodnoty indexů Chao 1, ACE a Shannon indexu rostou se zvyšující se diverzitou, zatímco Simpson index nabývá hodnot od 0 do 1 a se zvyšující se diverzitou jeho hodnoty klesají. Na začátku procesu byly indexy Chao 1 a ACE rovny 3370,67 a 3593,92 a indexy Shannon a Simpson 6,11 a 0,01. Na konci biosušení pak byly hodnoty Chao 1, ACE, Shannon a Simpson indexů rovny 1413,73 a 1526,29 a 4,28 a 0,04.

Na základě výsledků studií, které se zabývaly charakterizací mikrobiálních společenstev při biosušení, byly jako dominantní bakteriální kmeny identifikovány *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Chloroflexi* (Cai a kol., 2018a, 2016a; Hao a kol., 2018; Li a kol., 2015b; Liu a kol., 2018a; Zhang a kol., 2015). Další autoři uvádějí, že během celého procesu biosušení tyto kmeny zaujímaly 78-99 % celkové abundance, kdy *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* představovaly dominantní kmeny mezofilní fáze a fáze ochlazování a *Firmicutes* byl dominantním kmenem v termofilní fázi (Liu a kol., 2018a).

Dominance kmene *Firmicutes* v termofilní fázi byla potvrzena i dalšími studiemi (Cai a kol., 2018a, 2017; Hao a kol., 2018; Li a kol., 2015b).

Liu a kol. (2018a) také zjistili, že na začátku mezofilní fáze byly dominantní neklasifikované bakterie. V pozdějším stadiu mezofilní fáze se pak dominantním rodem stal *Pseudomonas* (23,6 %, kmen *Proteobacteria*), který během termofilní fáze téměř zmizel (0,1-0,2 %), nicméně na konci procesu se jeho abundance opět zvýšila. V termofilní fázi se staly dominantními rody *Ureibacillus* a *Bacillus* patřící do kmene *Firmicutes*, přičemž rod *Ureibacillus* během této fáze dosáhl maxima své abundance (42,1 %). Během fáze ochlazování došlo k nárůstu abundancí některých rodů, přičemž rod *Falsochromobacterium* (12,7 %, kmen *Proteobacteria*) se stal dominantním rodem na konci procesu, následovaný rody *Pusillimonas* (9,0 %, kmen *Proteobacteria*), *Aequorivita* (8,3 %, kmen *Bacteroidetes*), *Sphingobacterium* (7,1 %, kmen *Bacteroidetes*) a *Pseudomonas* (5,7 %, kmen *Proteobacteria*).

Oproti tomu Cai a kol. (2016a) identifikovali v počátečním stadiu mezofilní fáze 4 dominantní rody: *Ferribacterium* (6,8 %, kmen *Proteobacteria*), *Arcobacter* (5,7 %, kmen *Proteobacteria*), *Flavobacterium* (4,5 %, kmen *Bacteroidetes*) a nekultivovatelné rody *Chitinophagaceae* (1,6 %, kmen *Bacteroidetes*). Rod *Ferribacterium* zahrnuje železo-redukující bakterie (Cummins a kol., 1999), zatímco zástupci rodu *Flavobacterium* jsou schopni degradovat lignin, proteiny a pentachlorfenol (Aarathi a kol., 2004; Topp a Hanson, 1990). Nekultivovatelné rody *Chitinophagaceae* mohou degradovat celulózu (Eichorst a kol., 2013). *Arcobacter*, který byl identifikován jako patogenní rod (Merga a kol., 2014), byl inaktivován během termofilní fáze a na konci procesu nebyl vůbec detekován. V pozdějším stadiu mezofilní fáze identifikovali jako dominantní rody *Acinetobacter* (47,2 %, kmen *Proteobacteria*), *Tepidimicrobium* (7,4 %, kmen *Firmicutes*) a *Comamonas* (5,5 %, kmen *Proteobacteria*), který je schopen degradovat lignin a jiné komplexní organické sloučeniny (Chen a kol., 2012). V první termofilní fázi byl jako dominantní rod identifikován *Acinetobacter* (42,3 %, kmen *Proteobacteria*) následovaný rodem *Bacillus* (5,8 %, kmen *Firmicutes*), který se naopak stal dominantním rodem v druhé termofilní fázi s abundancí 51,6 %. Jedním z dominantních rodů v této fázi byl také *Pseudomonas* (kmen *Proteobacteria*), který může degradovat lignin, lipidy a také celulózu (Pathak a Singh, 2016; Prabhakaran a kol., 2015; Shon a kol., 2002). Na konci biosušení dominoval rod *Sphingobacterium* (23,8 %, kmen *Bacteroidetes*), který může degradovat mastné kyseliny

a některé další složité organické sloučeniny (Kuo a kol., 1999), následovaný rodem *Flavobacterium* (10,9 %, kmen *Bacteroidetes*). Dominanci těchto bakteriálních rodů zaznamenali na konci biosušení čistírenského kalu i další autoři (Wu a kol., 2018).

Jak již bylo uvedeno výše, k nejvyšší míře degradace organických látek a odstraňování vody dochází během termofilní fáze (Cai a kol., 2016a). Z pohledu rodů byly během termofilní fáze identifikovány jako dominantní *Bacillus*, *Ureibacillus* (kmen *Firmicutes*) (Cai a kol., 2018a, 2017; Hao a kol., 2018; Liu a kol., 2018a; Zhang a kol., 2015) a *Acinetobacter* (kmen *Proteobacteria*) (Cai a kol., 2016a; Wu a kol., 2018). *Ureibacillus* byl často identifikován v průběhu kompostování či biosušení a vykazuje aktivitu při teplotách blízkých 50-60 °C (Jang a kol., 2014; Liu a kol., 2010; Nakasaki a kol., 2009; Zhang a kol., 2015). Tento mikroorganismus je schopen produkovat termoaktivní hydrolitické extracelulární enzymy (například proteázu, lipázu a celulázu) a rychle rozkládat rozpustné a snadno rozložitelné zdroje uhlíku (Liu a kol., 2010). Členové rodu *Bacillus* jsou známí jako kompetentní degradátoři komplexních polymerů a jsou schopni degradovat proteiny a škroby (Puspasari a kol., 2013), přičemž jsou schopni kolonizovat substráty při nízké dostupnosti živin (Martins a kol., 2013). Cai a kol. (2018b) uvádějí, že *Bacillus thermoamylovorans* je schopen degradovat jak rekalcitrantní tak i snadno rozložitelné látky při biosušení čistírenských kalů, zatímco vylučuje amylázy, celulázy, hemicelulázy a další enzymy degradující oligosacharidy a monosacharidy. Rod *Acinetobacter* je také schopen degradovat široké spektrum uhlovodíků (Karadag a kol., 2013). Může degradovat lignin, naftu a také redukovat dusičnan na amoniak (Mara a kol., 2012; Trois a kol., 2010).

Společenstva hub

Druhová bohatost a diverzita společenstev hub vykazovala ve studii Liu a kol. (2019) podobný trend jako je pozorován u bakteriálních společenstev. Stejně tak Cai a kol. (2017), kteří sledovali druhovou bohatost a diverzitu společenstev hub při biosušení čistírenských kalů, pozorovali pokles druhové bohatosti hub v průběhu biosušení. Zaznamenali významný pokles indexu ACE z hodnoty 126 na začátku biosušení na hodnotu 49 na konci procesu. Oproti tomu diverzita vykazovala jiný trend, kdy Shannon index klesl během první termofilní fáze z hodnoty 2,67 na 1,90, ale během druhé termofilní fáze dosáhl maxima 2,92. Během fáze ochlazování klesl až na hodnotu 0,52. To může být vysvětleno tím, že teploty nad 60 °C během první termofilní fáze omezily růst hub, zatímco teploty 50-55 °C během druhé termofilní fáze umožnily aktivaci termofilních hub (Huang a kol., 2010).

Houby jsou rozhodující pro rozklad polymerních sloučenin (López-González a kol., 2015), nicméně například Cai a kol. (2017) pomocí taxonomické analýzy odhalili, že houby představovaly pouze 0,05 % všech mikroorganismů při biosušení kalů. Jako dominantní kmeny se objevují *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Ichthyosporea* a *Zygomycota*, přičemž kmen *Ascomycota* dominuje během celého procesu biosušení kalů (Cai a kol., 2017; Liu a kol., 2019; Zhang a kol., 2018b). Například Liu a kol. (2019) pozorovali nárůst podílu kmene *Ascomycota* z 58,5 % na začátku biosušení kalu na 94,8 % v termofilní fázi. Poté klesl a na konci biosušení dosáhl 52,2 %.

Podobně i jiní autoři zaznamenali v termofilní fázi při biosušení čistírenských kalů nárůst abundance kmene *Ascomycota* na 96,7 % a následný pokles ve fázi ochlazování, nicméně na konci procesu jejich relativní abundance opět narostla na 99,8 % (Cai a kol., 2017). Kmeny *Ascomycota* a *Basidiomycota* jsou známé svou vynikající schopností degradovat lignocelulózu, díky produkci enzymu lignocelulázy (Jurado a kol., 2014). Avšak pouze kmen *Ascomycota* může tolerovat vysoké teploty nad 60 °C při termofilní fázi, a proto jeho dominance významně přispívá k degradaci lignocelulózy (Zhang a kol., 2018b).

Přestože kmen *Ascomycota* přetrvává během celého procesu biosušení, jeho složení se mění v závislosti na jeho fázi, jak ukázala studie Cai a kol. (2017), ve které v termofilní fázi dominovali zástupci patřící pravděpodobně do řádu *Saccharomycetales*, zatímco na konci procesu převažovali zástupci patřící pravděpodobně do řádu *Sordariales*. Také Liu a kol. (2019) na začátku biosušení kalu ze skládky s kalem vznikajícím při výrobě piva pozorovali dominanci rodů *Pichia*, *Cryptococcus* a *Hyphopichia* s relativními abundancemi 30,7 %, 20,2 %, 17,2 %. V termofilní fázi pak dominantními rody byly *Pichia* (69,5 %) a *Metschnikowiaceae* (11,7 %), ve fázi ochlazování pak dominovaly rody *Scopulariopsi*, *Microascaceae*, *Coprinopsis* a *Mortierella*.

3.2. Analýza PLFA

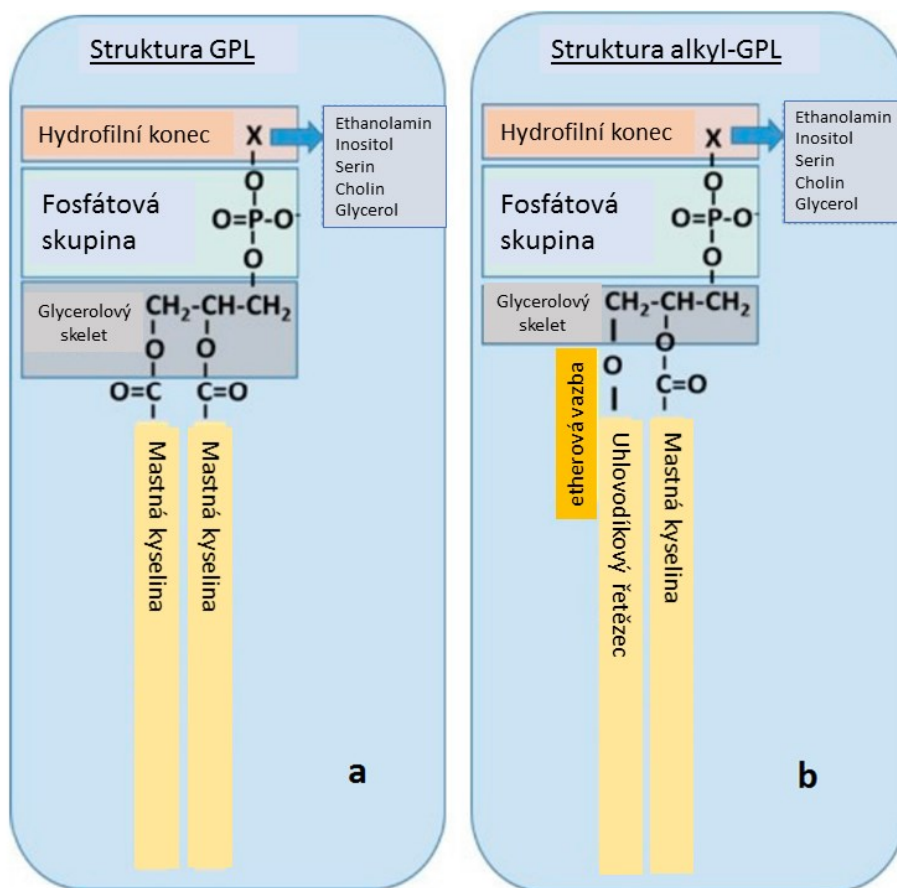
Metody používané pro charakterizaci mikrobiálních populací často zahrnují kultivační přístupy. Avšak méně než 1 % půdních mikroorganismů je možné kultivovat, což představuje nereprezentativní dílčí vzorek, který neumožňuje vyvozovat závěry o aktivní mikrobiální komunitě a v důsledku toho byl kladen důraz na vývoj metod nezávislých na kultivaci mikroorganismů (Watzinger, 2015).

Analýza složení mikrobiální komunity za použití metod nezávislých na kultivaci obecně zahrnuje extrakci markerových sloučenin skupin organismů. Tyto markery, tzv. biomarkery jsou sloučeniny, které mají biologickou specifičnost v tom smyslu, že jsou produkovány pouze omezenými skupinami organismů (Ruess a Chamberlain, 2010). Pro stanovení biomasy by měl být biomarker přítomen v relativně konstantních množstvích v organismech, které jsou předmětem zájmu. V případě že má být biomasa kvantifikována, biomarkery, které se vyskytují v zásobních produktech, by neměly být používány pro výpočty, protože jejich obsah se liší podle fyziologického stavu organismu. Kromě toho biomarkery by po smrti organismů měly vykazovat rychlý rozklad, aby poukazovaly pouze na živou biomasu (Boschker a Middelburg, 2002; Leckie, 2005). Jedním z takových markerů je DNA, či PLFA (Leckie, 2005).

Analýza PLFA je metoda používaná více než 35 let a je stále populární jako prostředek k charakterizaci mikrobiálních skupin v rozmanité škále environmentálních matric (Willers a kol., 2015). Tato metoda je založena na přímé extrakci mastných kyselin z matrice a stanovení izolovaných methylesterů mastných kyselin za použití plynové chromatografie (Piotrowska-Seget a Mroziak, 2003).

3.2.1. PLFA

PLFA jsou mastné kyseliny, které tvoří součást fosfolipidů. Fosfolipidy, neboli glycerfosfolipidy (Glycerophospholipids – GPL), se skládají z jedné molekuly glycerolu, která je na dvou hydroxy skupinách navázána na dva řetězce mastných kyselin (hydrofobní konec molekuly) a jednou hydroxy skupinou na fosfátovou skupinu, která s dalším substituentem (např. ethanolamin, inositol, serin či cholin) tvoří hydrofilní konec molekuly (Kaur a kol., 2005; Lordan a kol., 2017). PLFA jsou na glycerol navázány prostřednictvím esterové vazby (Obr. 2a) (Castro-Gómez a kol., 2015), nicméně existují i alkyl-GPL, neboli alkyl-ether-lipidy, kde je na glycerol navázán místo mastné kyseliny uhlovodíkový řetězec pomocí etherové vazby (Obr. 2b) (Pinault a kol., 2018).

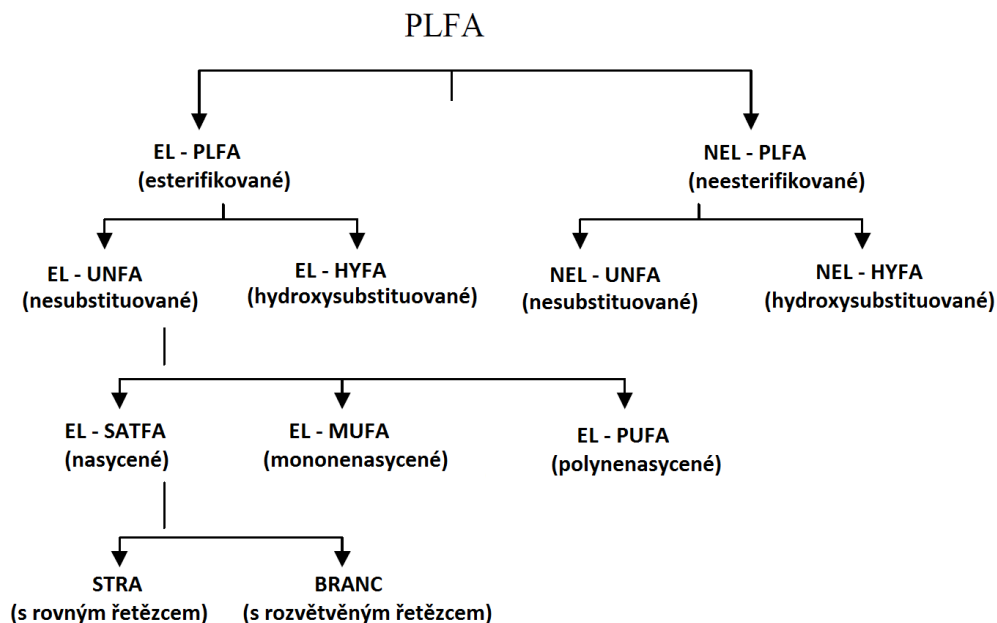


Obrázek 2: Struktura glycerfosfolipidů (GPL) (a) a alkyl-glycerfosfolipidů (alkyl-GPL) (b) (podle Lordan a kol., 2017)

Biologický význam fosfolipidů vyplývá z amfifilního charakteru jejich molekul, který mají díky přítomnosti jak hydrofobní tak i hydrofilní části. Tyto části vytvářejí lipidovou dvojvrstvu s hydrofobní částí otočenou dovnitř a hydrofilní částí vystavenou směrem ven. Lipidová dvojvrstva pak umožňuje sestavení buněčných a organelových membrán (Castro-Gómez a kol., 2015; Contarini a Povolito, 2013), které tvoří selektivně propustnou bariéru, jež je nezbytná pro účinné oddělení buňky či organely od okolí (Lordan a kol., 2017).

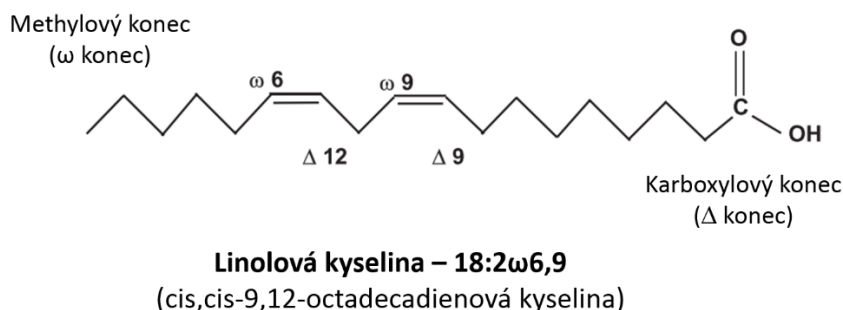
PLFA mohou být děleny na základě vazby mezi mastnou kyselinou a glycerolem na esterifikované (tvoří 60-90 % z mastných kyselin obsažených v buněčné membráně) a neesterifikované PLFA (tvoří pouze 10-40 %), přičemž obě skupiny podléhají dalšímu dělení (Obr. 3) (Zelles, 1999). Esterifikované PLFA jsou součástí převážně bakteriálních membrán, zatímco neesterifikované PLFA převládají v membránách *Archea* (Caforio a Driessen, 2017; Green a Scow, 2000). Struktura PLFA a podíl nasycených, nenasycených, rozvětvených a cyklopropanových mastných kyselin v jednotlivých fosfolipidech ovlivňují

tekutost (fluiditu) a propustnost bakteriálních membrán (Denich a kol., 2003; Li a kol., 2007).



Obrázek 3: Klasifikace PLFA (podle Zelles, 1999)

Mastné kyseliny jsou obecně značeny jako X:Y ω Z, kde X představuje počet atomů uhlíku, Y počet dvojných vazeb a Z označuje polohu první dvojně vazby od alifatického (methylového, ω) konce molekuly (Obr. 4). Předpony „a“ a „i“ označují anteiso- a isovětvení. Cyklopropylové mastné kyseliny jsou určeny předponou „cy“. Předpona „Me“ či „OH“ pak značí přítomnost methylové skupiny či hydroxy skupiny, přičemž číslo umístěné před nimi označuje pozici příslušné skupiny. Přípony c a t pak označují cis a trans izomery, kdy c se obvykle neuvádí (Kaur a kol., 2005; Quideau a kol., 2016).



Obrázek 4: Značení mastných kyselin (příklad) (podle Ruess a Chamberlain, 2010)

3.2.1.1 PLFA jako biomarker

Složení mastných kyselin může být ovlivněno fyziologickým a nutričním stavem mikroorganismů, faktory prostředí a expozicí toxickým látkám (Mrozik a kol., 2014). Analýzu PLFA pak lze použít pro různé účely: stanovení celkové mikrobiální biomasy; jako biomarkery pro jednotlivé skupiny organismů; poskytnutí přehledu o funkčním stavu mikrobiální komunity (Green a Scow, 2000; Willers a kol., 2015).

Použití PLFA jako míry životaschopné mikrobiální biomasy zavedli Frostegård a kol. (1991), kteří pro její stanovení použili celkové množství PLFA zjištěných v půdním vzorku. Výsledky měřené jako celkové množství PLFA dobře korelují s výsledky jiných metod pro stanovení mikrobiální biomasy (Johansen a Olsson, 2005; Kunihiro a kol., 2014; Leckie a kol., 2004; Zelles a kol., 1992) a tento přístup je tak široce používán pro odhad mikrobiální biomasy v environmentálních studiích (Willers a kol., 2015).

Použití PLFA jako míry životaschopné mikrobiální biomasy bylo také široce akceptováno na základě studií, které uváděly rychlou degradaci PLFA po buněčné smrti (Drenovsky a kol., 2004; Janzen a kol., 1994; White a kol., 1979; Zelles a kol., 1992). Kromě toho lipidové složení biologických membrán se liší napříč taxonomickými říšemi a to jak ve struktuře mastných kyselin, tak ve výskytu esterových a etherových vazeb (Caforio a Driessen, 2017). Díky tomu jednotlivé PLFA mohou sloužit jako biomarkery pro stanovení jednotlivých skupin organismů (Frostegård a Bååth, 1996; Mrozik a kol., 2014; Zelles a kol., 1997).

Bakteriální fosfolipidy typicky obsahují nasycené a mononenasyčené mastné kyseliny. Biomarkery uznané pro gram-negativní bakterie zahrnují mononenasyčené mastné kyseliny (Zelles a kol., 1997), cyklopropylové mastné kyseliny (Högberg a kol., 2007) a hydroxy-substituované neesterifikované mastné kyseliny přítomné v lipopolysacharidech tvořících jejich buněčnou stěnu (Parker a kol., 1982). Používané biomarkery pro gram-pozitivní bakterie jsou terminálně rozvětvené nasycené mastné kyseliny s iso- a anteisovětvením, přičemž methyl-substituované mastné kyseliny jsou charakteristické pro aktinobakterie (Vestal a White, 1989). Biomarkery používané pro označení hub jsou často polynenasycené mastné kyseliny. Jedná se hlavně o mastnou kyselinu 18:2 ω 6,9. Jako biomarker pro houby slouží také mastná kyselina 18:1 ω 9, jejíž koncentrace obvykle dobře koreluje s koncentrací 18:2 ω 6,9 (Frostegård a kol., 2011;

Frostedgård a Bååth, 1996). Příklady konkrétních PLFA používaných jako biomarkery pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Příklady PLFA používaných jako biomarkery pro jednotlivé skupiny

PLFA biomarkery	označení	zdroj
Nasycené mastné kyseliny s přímým řetězcem: 14:0; 15:0; 16:0; 17:0; 18:0	obecné biomarkery pro bakterie	(Andrés a kol., 2019; Balasooriya a kol., 2014; Canarini a kol., 2016; Lange a kol., 2014);
Methyl-substituované mastné kyseliny: 10Me16:0; 10Me17:0; 10Me18:0	Aktinobakterie	(Fichtner a kol., 2014; Jiang a kol., 2018; Mechri a kol., 2014; Zhao a kol., 2018)
Mononenasycené mastné kyseliny: 14:1 ω 5c; 15:1; 15:1 ω 6c; 16:1 ω 7t; 16:1 ω 9c; 16:1 ω 11c; 17:1; 18:1 ω 5c; 18:1 ω 7; 19:1 ω 9c; 19:1 ω 12c; 20:1 ω 9c; 20:1 ω 9t; 22:1 ω 9c; 22:1 ω 9t 16:1 ω 5c;	Gram-negativní bakterie	(Buckeridge a kol., 2013; Lange a kol., 2014; Lupwayi a kol., 2017; Mechri a kol., 2014; Tavi a kol., 2013)
Hydroxy-substituované mastné kyseliny: 2OH 12:0; 3OH 12:0; 2OH 14:0; 3OH 14:0; 2OH 16:0; 2OH 18:0	Gram-negativní bakterie	(Buckeridge a kol., 2013; Canarini a kol., 2016; Fichtner a kol., 2014)
Cyklopropylové nasycené mastné kyseliny: cy17:0; cy19:0	Gram-negativní bakterie	(Andrés a kol., 2019; Breulmann a kol., 2014; Mechri a kol., 2014)
Terminálně rozvětvené mastné kyseliny: a13:0; i13:0; i14:0; i15:0; a15:0; i16:0; a17:0; i17:0; a18:0; i18:0	Gram-pozitivní bakterie	(Andrés a kol., 2019; Fichtner a kol., 2014; Lange a kol., 2014; Mechri a kol., 2014; Tavi a kol., 2013)
Polynenasycené mastné kyseliny: 18:3 ω 6,9,12; 18:3 ω 3,6,9; 18:2 ω 9,12; 18:2 ω 6,9	Houby	(Buckeridge a kol., 2013; García-Orenes a kol., 2015; Liu a kol., 2017b; Zhao a kol., 2018)

Mnoho studií uvádí konkrétní PLFA jako biomarkery pro konkrétní skupiny mikroorganismů, nicméně existuje několik případů, kdy stejné PLFA mohou označovat velmi odlišné skupiny (Kaur a kol., 2005; Quideau a kol., 2016; Ruess a Chamberlain, 2010). Například PLFA cy17:0 a cy19:0, které jsou známy jako biomarkery pro gram-negativní bakterie, jsou přítomny i v některých gram-pozitivních bakteriích (Schoug a kol., 2008). Kromě toho biomarkery 16:0 a 18:0 používané pro bakterie (Zelles a kol., 1997) se vyskytují ve všech půdních mikroorganismech zahrnujících prokaryota a eukaryota a v důsledku toho nemusí být citlivými ukazateli složení mikrobiální komunity v matrici (Quideau a kol., 2016). Stejně tak mononenasyčená mastná kyselina 16:1 ω 5, biomarker mykorhizních hub (Olsson, 1999), byla také nalezena u bakterií (Nichols a kol., 1986). Z tohoto důvodu se v současné době jako biomarker pro mykorhozní houby používá 16:1 ω 5 získaná z neutrálních lipidů (Birgander a kol., 2017; Cozzolino a kol., 2016; Karlowsky a kol., 2018).

Dalším příkladem jsou PLFA 18:2 ω 6,9 a 18:1 ω 9, které jsou používané jako biomarkery pro houby, a však tyto dvě PLFA jsou běžné u mnoha eukaryotických organismů, včetně rostlin (Frostegård a kol., 2011). Nicméně tyto PLFA mohou být dobrým ukazatelem pro houby v matricích, kde zastoupení rostlinné biomasy je nízké, či kde se rostlinné buňky nevyskytují vůbec (Zelles, 1999). Kromě toho někteří autoři zaznamenali korelaci mezi koncentracemi 18:2 ω 6,9 a ergostrolu, což ukazuje, že tato PLFA je dobrým indikátorem ektomykorhizních a saprofytických hub (Bååth a Anderson, 2003; Frostegård a Bååth, 1996).

Sledování složení PLFA může být také využito při hodnocení stresu v mikrobiální komunitě, kdy se předpokládá, že bakterie mění složení své buněčné membrány v reakci na podmínky prostředí (Frostegård a kol., 2011). Nárůst poměru nasycených a mononenasyčených mastných kyselin, poměru trans a cis izomerů mononenasyčených mastných kyselin a poměru cyklopropylových mastných kyselin a jejich mononenasyčených prekurzorů jsou používány jako známky stresu (Bååth a Anderson, 2003; Frostegård a kol., 1993; Guckert a kol., 1986; Heipieper a kol., 1996; Petersen a Klug, 1994; Pietikäinen a kol., 2000). Nicméně je třeba brát v úvahu, že změny v uvedených poměrech PLFA mohou být způsobeny rovněž změnou ve složení mikrobiálního společenstva a naopak (Frostegård a kol., 2011).

Kromě toho při interpretaci změn ve složení PLFA se předpokládá jejich rychlá degradace po smrti mikroorganismů, nicméně tyto dva procesy mohou být vzájemně nezávislé, přičemž podmínky prostředí jsou rozhodující pro míru obratu PLFA (Frostegård a kol., 2011);

Ranneklev a Bååth, 2003). Například toxická látka může usmrtit mikroorganismy, ale zároveň může inhibovat činnost enzymů degradující příslušné PLFA (Frosteřád a kol., 2011).

V důsledku výše uvedených skutečností nemusí být interpretace PLFA vždy přímočará a měla by být prováděna s opatrností (Frosteřád a kol., 2011; Mrozik a kol., 2014; Quideau a kol., 2016).

3.2.2. Metody pro stanovení PLFA

Klíčovým krokem přípravy vzorku pro analýzu PLFA je separace lipidových složek od ostatních ve vodě rozpustných složek jejich účinnou a selektivní extrakcí, která je prováděna za použití organických rozpouštědel (Quideau a kol., 2016). Metoda extrakce lipidů pomocí směsi organických rozpouštědel byla vyvinuta Bligh a Dyer (1959). Ve studii White a kol. (1979) byla tato metoda modifikována a použita pro stanovení mikrobiální komunity v sedimentech moře a oblastí brakických vod. Metoda pak byla dále rozvíjena a optimalizována pro aplikaci v půdní vědě (Frosteřád a kol., 1993, 1991; Zelles, 1999).

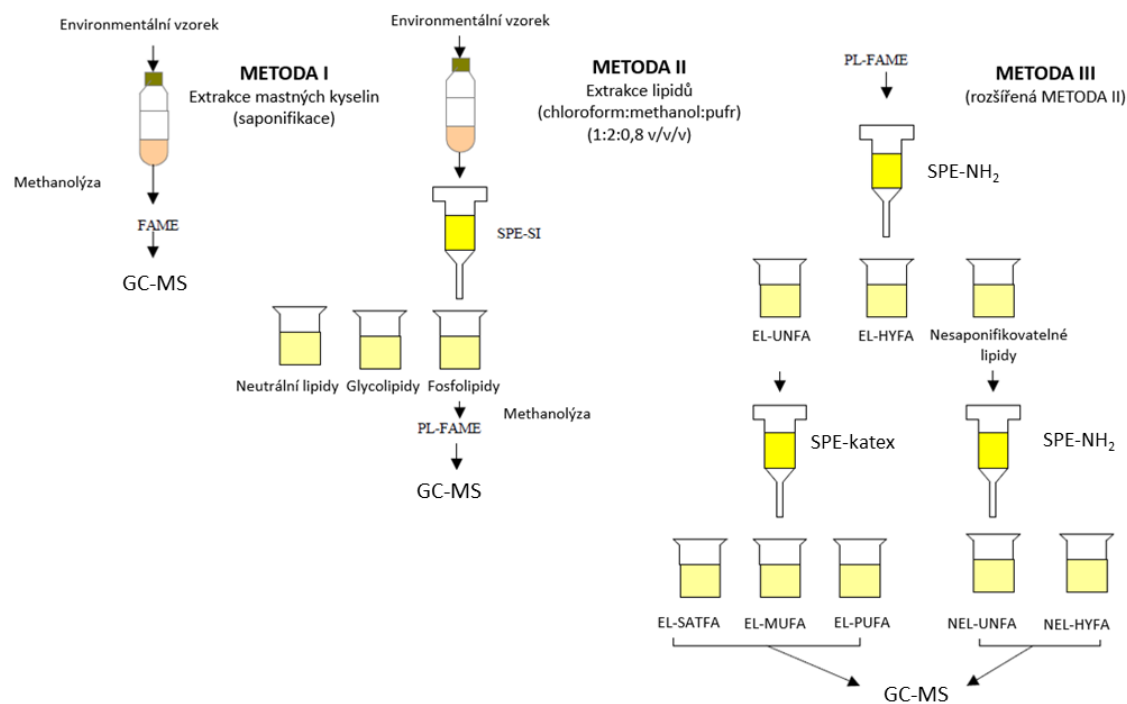
Pro extrakci lipidů ze vzorku se používá jednofázový roztok chloroform:methanol:pufř. Podmínky extrakce však vykazují v literatuře některé změny. Například byly testovány fosfátové, citrátové a acetátové pufřy pro dosažení lepšího roztoku PLFA v organické fázi (Frosteřád a kol., 1991; Nielsen a Petersen, 2000; White a kol., 1979). Namísto chloroformu byl použit dichlormetan (Nielsen a Petersen, 2000). Kromě toho poměr matrice k extrakčnímu činidlu, doba extrakce, cyklus a podmínky (jako například vortexování) byly pozměněny různými autory (Frosteřád a kol., 1991; Papadopoulou a kol., 2011; Wu a kol., 2009), přičemž na základě výsledků se ukázalo, že změny v postupu extrakce pak mění množství a složení extrahovaných lipidů (včetně PLFA), a proto by měl být postup udržován konstantní (Watzinger, 2015).

Po extrakci lipidů následuje extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction – SPE), díky čemuž jsou lipidy rozděleny na neutrální lipidy, glykolipidy a fosfolipidy. Pro separaci se používají kolonky na bázi silikagelu (SPE-SI) (Kaur a kol., 2005; Quideau a kol., 2016). SPE je rychlá technika pro frakcionaci lipidů, která navíc kombinuje procesy extrakce, čištění a obohacování analytů (Brondz, 2002). V dalším kroku jsou fosfolipidy transmethylovány za účelem získání methylesterů fosfolipidových mastných kyselin (Phospholipid fatty acids methyl esters – PL-FAME), přičemž je nutné zamezit přítomnosti

vody během celé methylace, aby se zamezilo vzniku vedlejších produktů ve formě volných mastných kyselin (Chowdhury a Dick, 2012). Posledním krokem je separace a kvantifikace jednotlivých PL-FAME pomocí plynové chromatografie (Obr. 5) (Kaur a kol., 2005; Quideau a kol., 2016). Detailní postup viz kapitola 4.4.

Kromě výše popsané jednoduché extrakční metody PLFA existují ještě další metody, které se mohou používat pro analýzu mikrobiálních lipidů extrahovaných přímo z environmentálního vzorku a to analýza methylesterů mastných kyselin (Fatty acid methyl esters – FAME) a rozšířená jednoduchá extrakční metoda PLFA (Kaur a kol., 2005) (Obr. 5). Celková analýza FAME zahrnuje saponifikaci půdy v methanolu, methylaci lipidů, extrakci lipidů methyl-terc-butyl-etherem a hexanem následovanou plynovou chromatografií (Cavigelli a kol., 1995). Nicméně je nutné zdůraznit, že tato analýza zahrnuje všechny přítomné lipidy ve vzorku, včetně PLFA, které mohou být methylovány. Nevýhodou této metody je pak skutečnost, že FAME pocházejí jak z živých tak mrtvých buněk a ze všech organismů přítomných v příslušné testované matici (Green a Scow, 2000; Mrozik a kol., 2014; Watzinger, 2015).

Na druhou stranu při rozšířené extrakční metodě PLFA, vyvinuté Zelles a kol. (1992), je extrakční postup následován další komplexní extrakční technikou pro frakcionaci mastných kyselin pomocí SPE do chemicky specifických skupin. Tato metoda poskytuje detekci více PLFA, protože zahrnuje jak EL-PLFA, tak NEL-PLFA a umožňuje určení nízké koncentrace neobvyklých mastných kyselin (Kaur a kol., 2005). Nicméně tento přístup byl zřejmě příliš náročný, aby byl přijat pro rutinní analýzu mikrobiálních lipidů. V důsledku toho se nejčastěji citované metody stále spoléhají na extrakci vyvinutou Frostegård a kol. (2011, 1993) a White a kol. (1979).



Obrázek 5: Metody pro analýzu mikrobiálních lipidů: celková analýza FAME (METODA I), jednoduchá extrakční metoda PLFA (METODA II), rozšířená jednoduchá extrakční metoda PLFA (METODA III) (podle Kaur a kol., 2005)

Množství a složení PLFA měřených ve vzorcích životního prostředí silně závisí na metodice. Pro dosažení srovnatelných výsledků musí být metoda extrakce, separace a methylace robustní a kvantitativní (Watzinger, 2015). Reprodukovatelnost optimalizované analýzy PLFA je velmi dobrá a to je pravděpodobně hlavním důvodem lepší citlivosti měření PLFA ke zjištění změn v půdních mikrobiálních skupinách ve srovnání s molekulárně biologickými technikami založenými na polymerázové řetězové reakci (Ramsey a kol., 2006). Problém analýzy tak není použitá metoda, ale spíše způsob, jakým jsou data interpretována (Willers a kol., 2015).

Existují dva přístupy zpracování dat získané analýzou PLFA. První je založen na analýze vybraných skupin mastných kyselin, které jsou považovány za biomarkery, jež detekují mikrobiální skupiny ve vzorcích a naznačuje změny v jejich biomase (Frostegård a kol., 2011). Nicméně, jak již bylo uvedeno výše, tento přístup má svá omezení, jak dokumentuje několik příkladů, kde jsou uvedeny stejné PLFA, které však označují velmi odlišné skupiny (Frostegård a kol., 2011; Mrozik a kol., 2014; Quideau a kol., 2016).

V druhém přístupu jsou data podrobena vícerozměrným statistickým metodám za účelem jejich zjednodušení. Nejčastěji používanou metodou je analýza hlavních komponent

(Principal Component Analysis – PCA), která vizualizuje detailní rozdíly ve složení mastných kyselin testovaných vzorků. Oproti prvnímu přístupu údaje získané těmito metodami mohou být použity k určení faktorů prostředí, které silně korelují se strukturou mikrobiální komunity (Bossio a kol., 1998; Green a Scow, 2000).

Hlavní nevýhodou analýzy PLFA je však její velmi nízká úroveň taxonomického rozlišení (Gabriel, 2010; Mrozik a kol., 2014; Watzinger, 2015). Pro tyto účely bývá z velké části nahrazována technikami založenými na extrakci a analýze nukleových kyselin (Frosteřád a kol., 2011; Orwin a kol., 2018). Na druhou stranu analýza PLFA je spolehlivou a levnou metodou zahrnující jednoduchý a rychlý analytický postup, který nevyžaduje žádné speciální vybavení (Mrozik a kol., 2014; Quideau a kol., 2016; Watzinger, 2015; Willers a kol., 2015). Oproti molekulárním metodám poskytuje rychlou odpověď o kvantitě (Quideau a kol., 2016) a složení mikrobiální komunity zahrnující houby i bakterie (Gabriel, 2010) a vykazuje vyšší citlivost vůči změnám v jejich složení (Ramsey a kol., 2006; Watzinger, 2015).

Analýza PLFA se stala oblíbenou metodou pro charakterizaci a kvantifikaci mikrobiálních komunit nacházejících se v širokém spektru prostředí, od lesa (McIntosh a kol., 2013; Swallow a Quideau, 2013) až po prairie (Card a Quideau, 2010; McKinley a kol., 2005) a zemědělská pole (Bossio a kol., 1998; Lagerlöf a kol., 2014). Úspěšně se uplatňuje při charakterizaci reakce půdy na změny hospodaření, zahrnující odstraňování lesních porostů (Hannam a kol., 2006), vápnění (Pettersson a Bååth, 2003), rekultivace (DeGrood a kol., 2005; Hahn a Quideau, 2013), stejně tak jako na disturbance jako je oheň (Swallow a kol., 2009), kontaminace kovy (Chodak a kol., 2013; Pennanen, 2001) a uhlovodíky (Margesin a kol., 2007; Markowicz a kol., 2016) a přemnožení hmyzu (Štursová a kol., 2014). Kromě toho je analýza PLFA úspěšně používána při studiu kompostování, kde nabízí sledování vývoje jednotlivých skupin mikroorganismů v průběhu procesu (Amir a kol., 2008; Boulter a kol., 2002; Jiang a kol., 2018; Liu a kol., 2017b).

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie a materiál

Aceton pro HPLC-G 99,9%	Chromservis, ČR
Fosfátový pufr p. a. (pufr 50 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4)	Merck, Německo
Hydroxid draselný, p. a.	Lach-Ner, ČR
Chloroform (trichloromethan) pro HPLC 99,8%	Chromservis, ČR
Dusík 99,99%	Linde, ČR
n-Hexan pro HPLC	Chromservis, ČR
Kyselina octová p. a. 99% (1M)	Penta, ČR
Methyl tridecanoate $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich, Německo
Methanol pro HPLC	Chromservis, ČR
Toluen pro HPLC-G 99,9%	Chromservis, ČR

4.2. Přístrojové vybavení

Analytická váha Extend	Sartorius, Německo
Centrifuga EBA 20	Hettich, Německo
Hmotnostní detektor 240-MS	Varian, USA
Kolona DB-5MS	Agilent, USA
Laboratorní váha KERN PLS 510-3	KERN, Německo
Lyofilizátor	Labio, ČR
Plynový chromatograf Varian 450-GC	Varian, USA
SPE kolonky Si LiChrolut® cat. NO 1020210001	Merck, Německo
Digitální přesná vodní lázeň WCB-6	Witeg, Německo
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Itálie

4.3. Proces biosušení

Byly sledovány 4 cykly biosušení pojmenované A, B, C, D. Odvodněné anaerobně stabilizované kaly pocházely z dvou různých čistíren odpadních vod (ČOV) umístěných ve Středních Čechách. Pro cykly A, B byl kal odebírán z ČOV o dimenzované kapacitě 60 000 ekvivalentních obyvatel (e.o.) a pro cykly C, D z ČOV o dimenzované kapacitě 70 000 e.o.

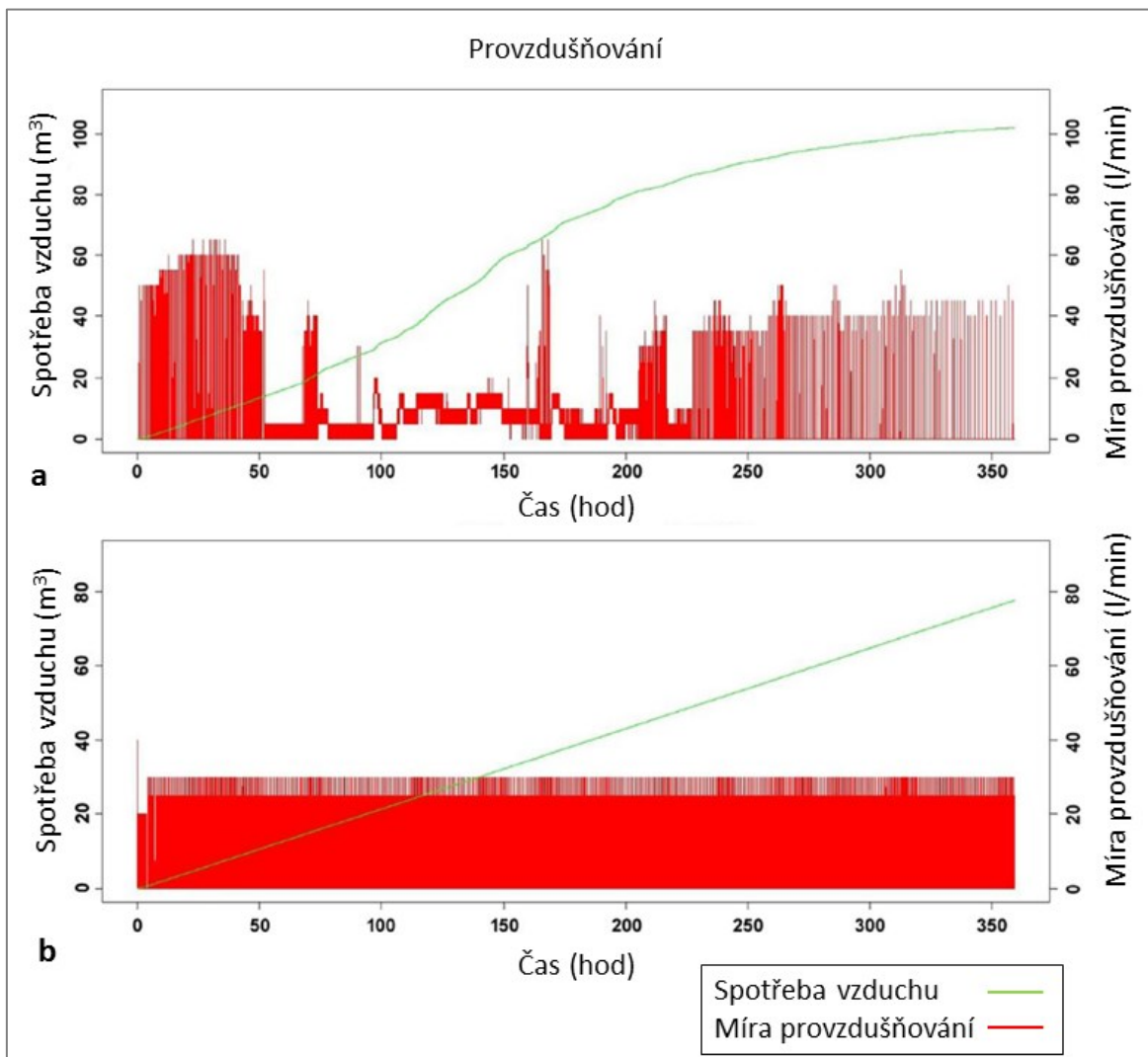
U všech cyklů byl před začátkem biosušení příslušný čistírenský kal smíchán s březovou štěpkou v hmotnostním poměru 5:2. Příslušné vstupní sušiny vzniklé směsi jsou uvedené v Tab. 2.

Každý cyklus probíhal ve dvou čtvrtprovozních reaktorech (Příloha 1), které byly naplněny 30 kg směsi kalu a štěpky. V rámci každého cyklu se reaktory lišily pouze typem provzdušňování. U prvního reaktoru (R1) bylo provzdušňování nejprve řízeno koncentrací kyslíku v odchozím vzduchu (udržování koncentrace kyslíku mezi 16-20 % pomocí aeračních pulzů) do doby, než teplota v reaktoru dosáhla 45 °C. Poté byla teplota ve střední vrstvě reaktoru udržována blízko této teploty pomocí snižování a zvyšování výkonu ventilátoru. Z tohoto důvodu, že v průběhu procesu byly udržovány teploty mezi 40-50 °C, proces probíhající v tomto reaktoru byl pracovní nazván jako mezofilní režim. V druhém reaktoru (R2) pak byly nastaveny konstantní intervaly provzdušňování, kdy docházelo k zapnutí ventilátoru na 42 sekund každých 15 minut. Z důvodu, že při tomto pravidelném provzdušňování došlo k výskytu i termofilní fáze, proces probíhající v tomto reaktoru byl pracovní nazván jako termofilní režim.

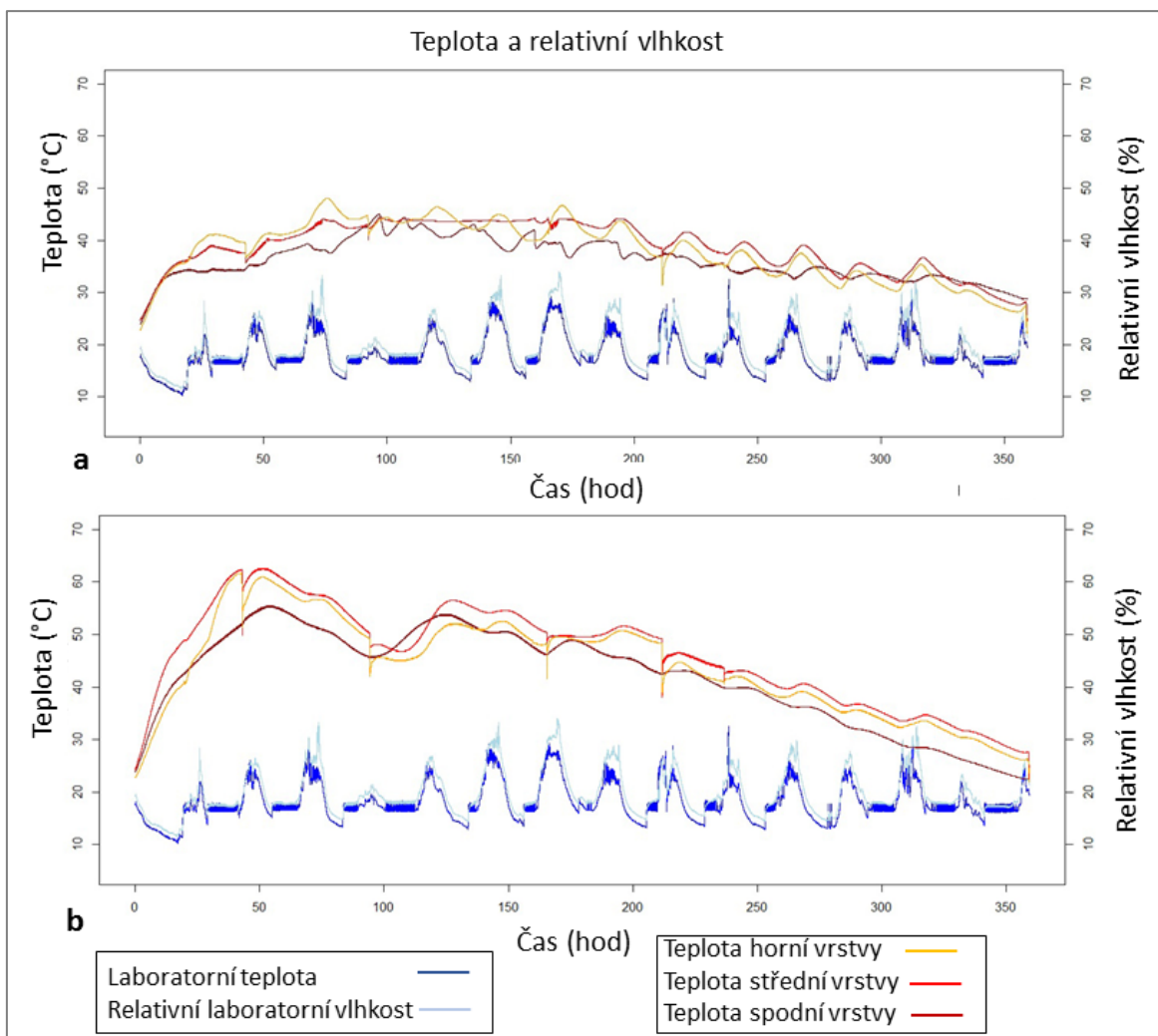
Proces biosušení u všech cyklů trval přibližně 2 týdny (A=15 dní, B=16 dní, C=16 dní, D=15 dní).

Pro ilustraci byla od pracovníků společnosti DEKONTA a.s. poskytnuta data získaná při cyklu B, která znázorňují typický záznam činnosti ventilátoru a objemu vzduchu prošlého skrz náplň reaktoru (tj. spotřeba vzduchu) (Obr. 6) a typický průběh teploty v průběhu mezofilního (R1) a termofilního režimu (R2) (Obr. 7). Kromě toho byly získány hodnoty výstupních sušin (Tab. 2), maximálních dosažených teplot (Tab. 3) a bodový průběh teploty ve střední vrstvě reaktoru (viz kap. 5.) pro mezofilní a termofilní režimy všech cyklů A, B, C, D. Podobně jako u cyklů A, B, D byly u cyklu C zaznamenány maximální teploty při mezofilním i termofilním režimu, nicméně ve fázi ochlazování došlo k výpadku čidel snímajících teplotu v reaktorech a byly změřeny teploty až ke konci procesu. Pro získání

průběhu teplot v tomto úseku byla proto provedena pracovníky DEKONTA a.s. interpolace dat.



Obrázek 6: Znázornění spotřeby vzduchu a míry provzdušňování při různých provzdušňovacích režimech – mezofilní režim (a) a termofilní režim (b)



Obrázek 7: Průběh laboratorní teploty a relativní vlhkosti a změny teplot ve třech vrstvách substrátu v reaktorech s různými provzdušňovacími režimy – mezofilní režim (a) a termofilní režim (b)

Tabulka 2: Sušina materiálu na vstupu a výstupu z procesu (průměrné hodnoty z 5-6 hodnot) pro mezofilní režim (R1), termofilní režim (R2)

Cyklus	Sušina - vstup (%)	Sušina - výstup v R1 (%)	Sušina - výstup v R2 (%)
A	50,69 ± 4,8	43,91 ± 10,18	51,26 ± 12,13
B	46,98 ± 2,0	52,67 ± 5,42	56,66 ± 4,45
C	33,9 ± 2,9	43,95 ± 1,7	40,05 ± 1,4
D	42,9 ± 2,2	55,2 ± 1,3	54,2 ± 1,7

Tabulka 3: Maximální dosažené teploty ve třech vrstvách (horní, střední a spodní) reaktoru při mezofilním (R1) a termofilním (R2) režimu při jednotlivých experimentálních cyklech

Cyklus	Spodní R1 (°C)	Střední R1 (°C)	Horní R1 (°C)	Spodní R2 (°C)	Střední R2 (°C)	Horní R2 (°C)
A	46,8	43,6	53,9	63,6	70,8	70,9
B	45,1	44,4	48,1	55,5	62,6	65
C	46,1	45	52,6	63,4	71	69,3
D	45,3	45,5	54,3	57,7	64	65,1

4.4. Stanovení PLFA

4.4.1. Odběr a příprava vzorků

Odběr vzorků prováděli pracovníci společnosti DEKONTA a.s.

Pomocí vzorkovací lopatky byl v příslušný den odebrán vzorek o přibližné hmotnosti 250 g z 6 míst v reaktoru (3 z horní části a 3 z dolní části). Po homogenizaci každého vzorku zvlášť byly kvartací vytvořeny podvzorky o hmotnosti 50 g, které byly dány do centrifugačních plastových zkumavek a ty pak byly přemístěny do mrazáku. Odběr vzorků probíhal přibližně obden.

Dále byly vzorky lyofilizovány a poté zhomogenizovány v třecí misce. Takto zpracované vzorky byly připraveny pro stanovení PLFA, které bylo provedeno podle metodiky (Šnajdr a kol., 2008).

4.4.2. Extrakce lipidů

Do čisté vypálené zkumavky bylo naváženo 0,2-0,5 g lyofilizovaného vzorku, ke kterému byla přidána jednofázová směs chloroform:methanol:fosfátový pufr (50 mM KH_2PO_4 , pH=7,4) v poměru 1:2:0,8 v/v/v. Poté byl vzorek míchán pomocí vortexu 30 sekund a staticky extrahován ve tmě při pokojové teplotě 1 hodinu. Po extrakci následovala centrifugace (3500 rpm, 5 minut). Vzniklý supernatant byl odebrán Pasteurovou pipetou do čisté vypálené zkumavky a ponechán ve tmě při pokojové teplotě. K sedimentu bylo přidáno 0,625 ml chloroformu a 1,25 ml methanolu, byl vortexován 30 sekund a ponechán extrahovat za stejných podmínek 1 hodinu. Po následné centrifugaci (3500 rpm, 5 minut) byl supernatant odebrán Pasteurovou pipetou a spojen s předchozím. Extrakce chloroformem a methanolem byla provedena za stejných podmínek ještě jednou.

Podle výše uvedeného postupu byl získán celkový supernatant, ke kterému bylo přidáno 1,9 ml fosfátového pufru a 1,9 ml chloroformu. Dále byla směs míchána pomocí vortexu 30 sekund a ponechána 1 hodinu v lednici (4 °C). Poté následovala centrifugace (3500 rpm, 5 minut), čímž došlo k oddělení spodní chloroformové části obsahující lipidy a horní vodné fáze. Chloroformová část byla Pasteurovou pipetou odebrána do čisté vypálené vialky (objem 3 ml), zatímco k vodné části bylo přidáno opět 1,9 ml chloroformu a směs byla vortexována 30 sekund. Po následné centrifugaci byla odebraná chloroformová část spojena s předchozí.

4.4.3. Frakcionace lipidů

Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku. Poté bylo ke vzorku přidáno 300 µl chloroformu a byl míchán pomocí vortexu 30 sekund. Kolonka Lichrolut Si 60 byla nejprve promyta 1,5 ml chloroformu a poté na ní byl aplikován vzorek. Vialka byla ještě jednou opláchnuta 150 µl chloroformu pomocí vortexu (15 sekund) a vzorek byl přenesen na kolonku. Pro odstranění frakce neutrálních lipidů byla kolonka promyta 2 ml chloroformu a pro odstranění frakce glykolipidů 6 ml acetonu. Poté byla kolonka promyta 2 ml methanolu, čímž došlo k uvolnění frakce fosfolipidů, která byla jímána do nové vypálené vialky.

4.4.4. Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace)

Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 ml toluenu a 0,5 ml methanolu. Směs byla vortexována 30 sekund a poté k ní byl přidán 1 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v bezvodém methanolu. Následovala inkubace ve vodní lázni při 37 °C 15 minut. Dále bylo přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml 1 M kyseliny octové a 2 ml čerstvě destilované vody a směs byla míchána pomocí vortexu 30 sekund. Poté následovala centrifugace (2500 rpm, 5 minut). Vzniklá horní fáze byla převedena Pasteurovou pipetou do nové vypálené vialky, zatímco ke vzorku bylo přidáno 1,6 ml hexanu a 0,4 ml chloroformu. Směs byla vortexována 30 sekund a centrifugována (2500 rpm, 5 minut). Horní fáze byla opět odebrána Pasteurovou pipetou a spojena s předchozí. Extrakce hexanem a chloroformem proběhla ještě jednou za stejných podmínek.

Vzorek tvořený třemi odebranými horními fázemi byl odpařen do sucha proudem dusíku. Poté bylo přidáno 950 µl hexanu, vzorek byl vortexován 30 sekund a celý objem byl přenesen do krimpovací vialky. Ke vzorku bylo přidáno 50 µl vnitřního standardu (C13:0 methyl tridekanoát v hexanu o konc. 200 ppm).

4.4.5. GC/MS analýza

Analýza vzorků probíhala na plynovém chromatografu Varian 450-GC s hmotnostním detektorem Variant 240-MS (GC/MS – Gas Chromatography-Mass Spectrometry). Pro separaci analytů byla použita kolona DB-5MS (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka stacionární fáze 0,25 μm). Pomocí autosampleru Combi Pal byl vstřikován vzorek o objemu 1 μl , teplota injektrovy byla 240 $^{\circ}\text{C}$. Jako nosný plyn sloužilo He s průtokem 1,0 ml/min. Teplotní program začal isotermálně při teplotě 60 $^{\circ}\text{C}$ při zavřeném děliči, který se po 1 minutě otevřel (split ratio 1:50). Teplota stoupala lineárně do 120 $^{\circ}\text{C}$ (25 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) a poté do teploty 240 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), která pak byla udržována po dobu 10 minut. K detekci byla použita elektronová ionizace (70 eV). Měření celkového iontového proudu probíhalo v rozsahu 50-400 m/z. Methylestery mastných kyselin byly identifikovány na základě porovnání retenčních časů s příslušnými standardy.

4.4.6. Vyhodnocení

Přítomné skupiny mikroorganismů byly charakterizovány jako součet koncentrací mastných kyselin příslušných pro jednotlivé skupiny (Šnajdr a kol., 2008; Stella a kol., 2015).

- Houby: 18:2 ω 6,9
- Gram-negativní bakterie (G⁻): 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, cy17:0, cy19:0, 18:1 ω 7
- Gram-pozitivní bakterie (G⁺): i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0
- Aktinobakterie: 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0
- Bakterie celkem: i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0
- Celková mikrobiální biomasa (PLFA_{total}): i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:0, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9
- Poměr hub a bakterií (H/B) byl vypočítán jako podíl součtu PLFA charakteristických pro houby a součtu PLFA charakteristických pro bakterie (zahrnující G⁺, G⁻ bakterie a aktinobakterie) podle rovnice (2).
- Poměr aktinobakterií a celkové mikrobiální biomasy (aktinobakterie/mikrob. biomasa) byl vypočítán jako podíl součtu PLFA charakteristických pro aktinobakterie a součtu PLFA_{total} podle rovnice (3).

- Poměr G+ a G- bakterií (G+/G-) byl vypočítán jako podíl součtu PLFA charakteristických pro G+ bakterie a součtu PLFA charakteristických pro G- bakterie podle rovnice (4).

$$H/B = \frac{\sum PLFA \text{ hub } [mg \cdot kg^{-1}]}{\sum PLFA \text{ bakterií celkem } [mg \cdot kg^{-1}]} \quad (2)$$

$$\text{aktinobakterie/mikrob. biomasa} = \frac{\sum PLFA \text{ aktinobakterií } [mg \cdot kg^{-1}]}{\sum PLFA_{total} [mg \cdot kg^{-1}]} \quad (3)$$

$$G+/G- = \frac{\sum PLFA \text{ G+ bakterií } [mg \cdot kg^{-1}]}{\sum PLFA \text{ G- bakterií } [mg \cdot kg^{-1}]} \quad (4)$$

4.5. Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl použit program Microsoft Office Excel 2016 a statistický program R verze 3.5.3.

4.5.1. Celková mikrobiální biomasa

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že celková koncentrace PLFA se významně nemění v průběhu mezofilního/termofilního režimu biosušení (kap. 5.1.1.), byla použita ANOVA. Pro párové porovnání byl použit Tukeyův test.

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že u celkových koncentracích PLFA není na konci procesu významný rozdíl mezi reaktory pracujícími při různých teplotních režimech (kap. 5.1.1.), byl použit dvouvýběrový t-test.

4.5.2. Poměr H/B

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že poměr H/B se významně nemění v průběhu mezofilního/termofilního režimu biosušení (kap. 5.1.2.), byla použita ANOVA. Pro párové porovnání byl použit Tukeyův test.

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že u hodnot poměru H/B není na konci procesu významný rozdíl mezi reaktory pracujícími při různých teplotních režimech (kap. 5.1.2.), byl použit dvouvýběrový t-test.

4.5.3. Biomasa aktinobakterií

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že koncentrace PLFA charakteristických pro aktinobakterie se významně nemění v průběhu mezofilního/termofilního režimu

biosušení (kap. 5.1.4.), byla použita ANOVA. Pro párové porovnání byl použit Tukeyho test.

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že u hodnot poměru aktinobakterie/celková mikrobiální biomasa není na konci procesu významný rozdíl mezi reaktory pracujícími při různých teplotních režimech (kap. 5.1.4.), byl použit dvouvýběrový t-test.

4.5.4. Poměr G+/G–

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že poměr G+/G– bakterií se významně nemění v průběhu mezofilního/termofilního režimu biosušení (kap. 5.1.3.), byla použita ANOVA. Pro párové porovnání byl použit Tukeyho test.

Pro testování nulové hypotézy, která předpokládá, že ve dnech maximálních hodnot poměru G+/G– bakterií není významný rozdíl mezi reaktory pracujícími při různých teplotních režimech (kap. 5.1.3.), byl použit dvouvýběrový t-test.

4.5.5. PCA

U obou teplotních režimů experimentálních cyklů A, B, C, D byly celkové koncentrace jednotlivých PLFA (vyjádřených jako $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) podrobeny PCA. Výsledky byly shrnuty pomocí biplotů, ve kterých směr a relativní délka indikují směr (kladný či záporný) a sílu (delší = silnější) korelace, zatímco úhel mezi vektory indikuje korelaci mezi proměnnými (malý úhel = vyšší korelace) (Guo a kol., 2018).

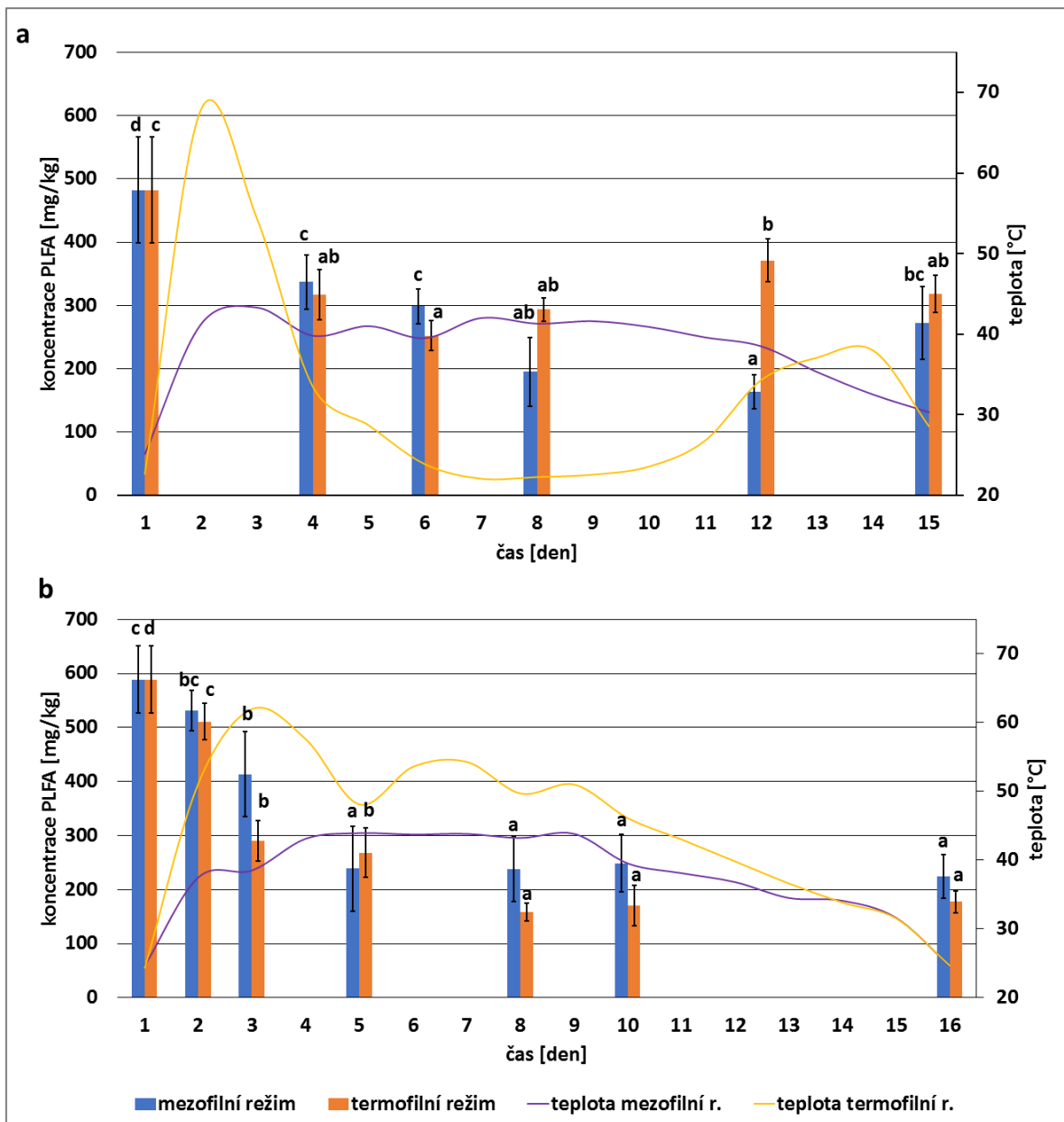
5. Výsledky a diskuze

5.1. Vývoj skupin mikroorganismů

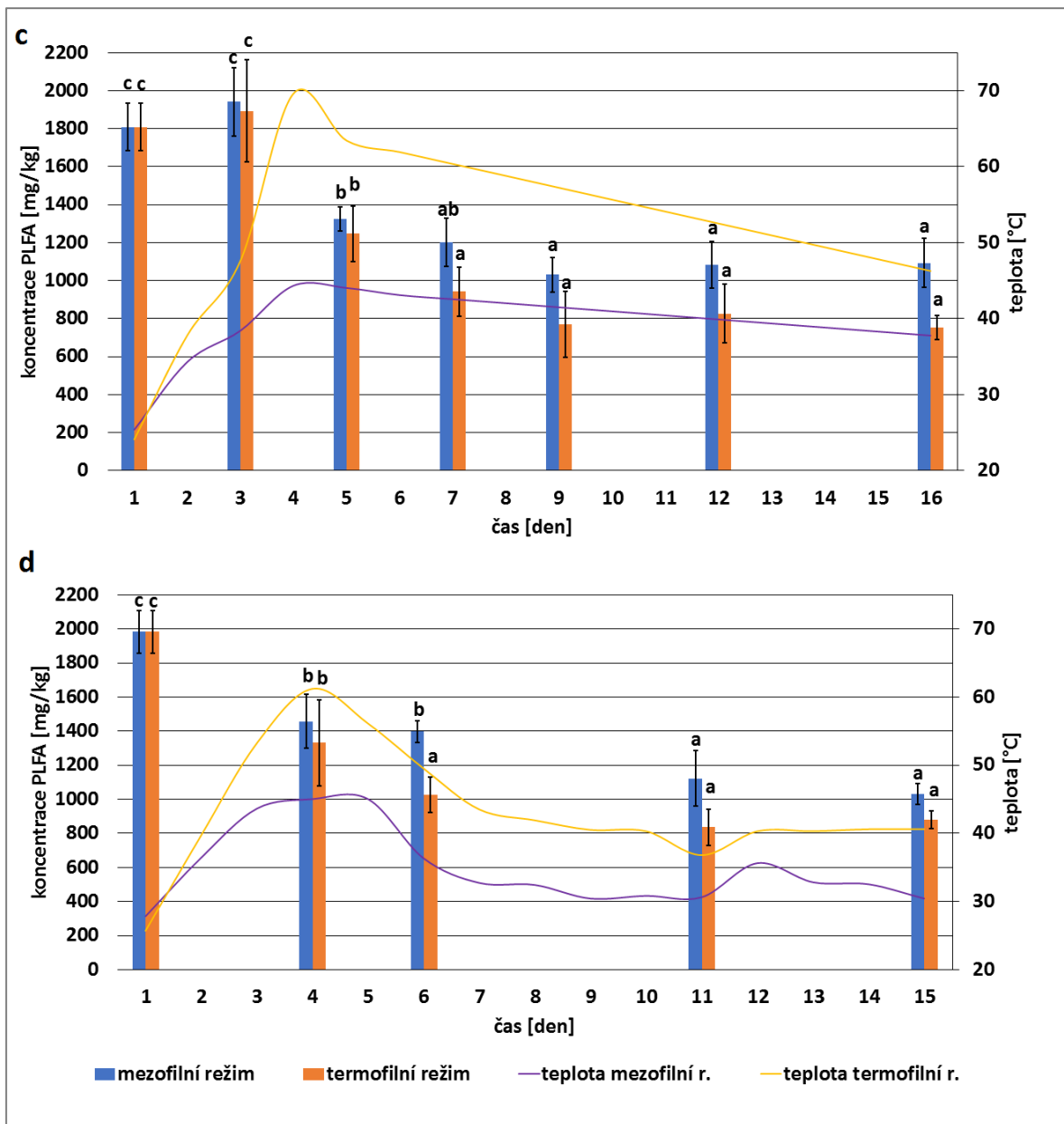
V rámci všech cyklů A, B a C, D, které se vzájemně lišily kalem odebíraným z dvou různých ČOV, byly sledovány vývoje celkové mikrobiální biomasy, poměru H/B, biomasy aktinobakterií a poměru G+/G- bakterií.

5.1.1. Celková mikrobiální biomasa

Vývoj celkové koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase při mezofilním a termofilním režimu cyklu B je zobrazen na Obr. 8b. Celková koncentrace PLFA vykazovala statisticky významný pokles ($p < 0,05$) v průběhu obou teplotních režimů. Při mezofilním režimu došlo k poklesu o 62,0 %, při termofilním režimu bylo pozorováno 69,9% snížení celkové koncentrace PLFA. Tento klesající trend byl zaznamenán i u cyklů C (Obr. 9c) a D (Obr. 9d), u kterých došlo v průběhu mezofilního režimu biosušení k poklesu o 39,6 %, 48,1 % a při termofilním režimu biosušení o 58,4 %, 55,6 %.



Obrázek 8: Celková koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu A (a), B (b). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.



Obrázek 9: Celková koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu C (c), D (d). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.

Jiný vývoj byl pozorován u cyklu A (Obr. 8a), kde při mezofilním režimu biosušení byl zaznamenán statisticky významný ($p < 0,05$) nárůst celkové koncentrace PLFA mezi 12. a 15. dnem a při termofilním režimu mezi 6. a 12. dnem. Nárůst hodnot by mohl být vysvětlen rozvojem nové mezofilní populace (Cahyani a kol., 2002; Herrmann a Shann, 1997). Nicméně i přes tuto skutečnost na konci obou teplotních režimů byly hodnoty celkové

koncentrace PLFA statisticky významně nižší ($p < 0,05$) oproti hodnotám na začátku procesu. Při mezofilním režimu došlo k poklesu o 43,6 % a při termofilním režimu o 34,0 %.

Jiný trend vývoje celkové koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase bývá v závislosti na typu substrátu pozorován u kompostování, při kterém obvykle dochází nejprve k nárůstu a k následnému poklesu (Jiang a kol., 2018; Klamer a Bååth, 1998; Liu a kol., 2017b; Xu a kol., 2010). Nárůst celkové mikrobiální biomasy bývá přisuzován hlavně vysoké dostupnosti snadno rozložitelných organických látek při rozvíjející se termofilní fázi (Klamer a Bååth, 1998; Steger a kol., 2007b). Oproti tomu Steel a kol. (2013) nezanamenali významné změny v průběhu kompostování směsi štěpky z topolové kůry, sena a čerstvé trávy, při kterém celková koncentrace PLFA dosáhla minimálních hodnot při první termofilní fázi a po druhé termofilní fázi. Podobný průběh celkové koncentrace PLFA zaznamenali také další autoři (Steger a kol., 2003).

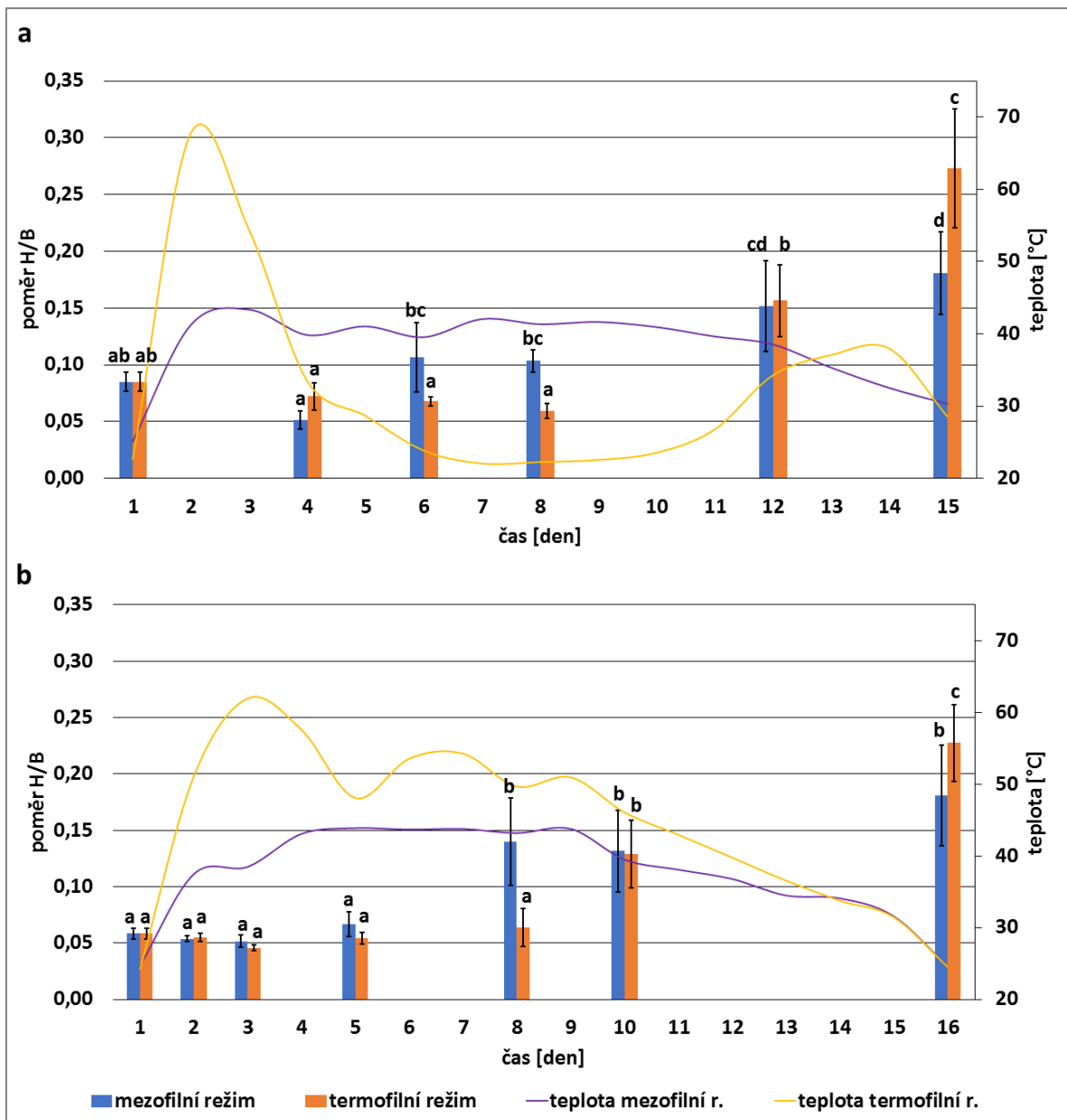
Nicméně Adani a kol. (2002) (viz kap. 3.1.1.) uvádějí, že snížení mikrobiální aktivity ke konci procesu může být důsledkem nevhodného obsahu vlhkosti (efekt sušení) a/nebo kompletní degradaci biologicky rozložitelných látek (efekt degradace), přičemž dospěli k závěru, že efekt degradace se projevuje při procesu podobnému kompostování, zatímco efekt sušení při procesu podobnému biosušení. Optimální obsah vlhkosti pro kompostování se liší podle druhu substrátu, ale obecně by se měla pohybovat mezi 50-60 % (Gajalakshmi a Abbasi, 2008). Při biosušení, kdy obsah vlhkosti klesá pod 50 %, tak panují nevhodné podmínky pro rozvoj mikrobiální biomasy (Yang a kol., 2014), čímž může být vysvětlen klesající trend celkové mikrobiální biomasy v průběhu obou teplotních režimů cyklů B, C a D.

Přestože celková mikrobiální biomasa vykazovala klesající trend u obou teplotních režimů, na konci procesu byl pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi mezofilním a termofilním režimem cyklů B (Obr. 8b), C (Obr. 9c) a D (Obr. 9d), kde celková koncentrace PLFA dosáhla vyšších hodnot v reaktoru pracujícím v mezofilním režimu. Na konci mezofilního a termofilního režimu biosušení celková koncentrace PLFA činila u cyklu B $223,98 \pm 40,34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $177,52 \pm 20,29 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, u cyklu C $1092,62 \pm 129,31 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $753,13 \pm 62,36 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, u cyklu D $1029,59 \pm 60,55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a $879,85 \pm 51,62 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Oproti cyklu A vyšší teploty panující po celou dobu termofilních režimů cyklů B, C a D tak vedly k výraznějšímu omezení celkové mikrobiální biomasy, čímž je podporována hypotéza, že výsledná mikrobiální biomasa bude vyšší při mezofilním režimu biosušení.

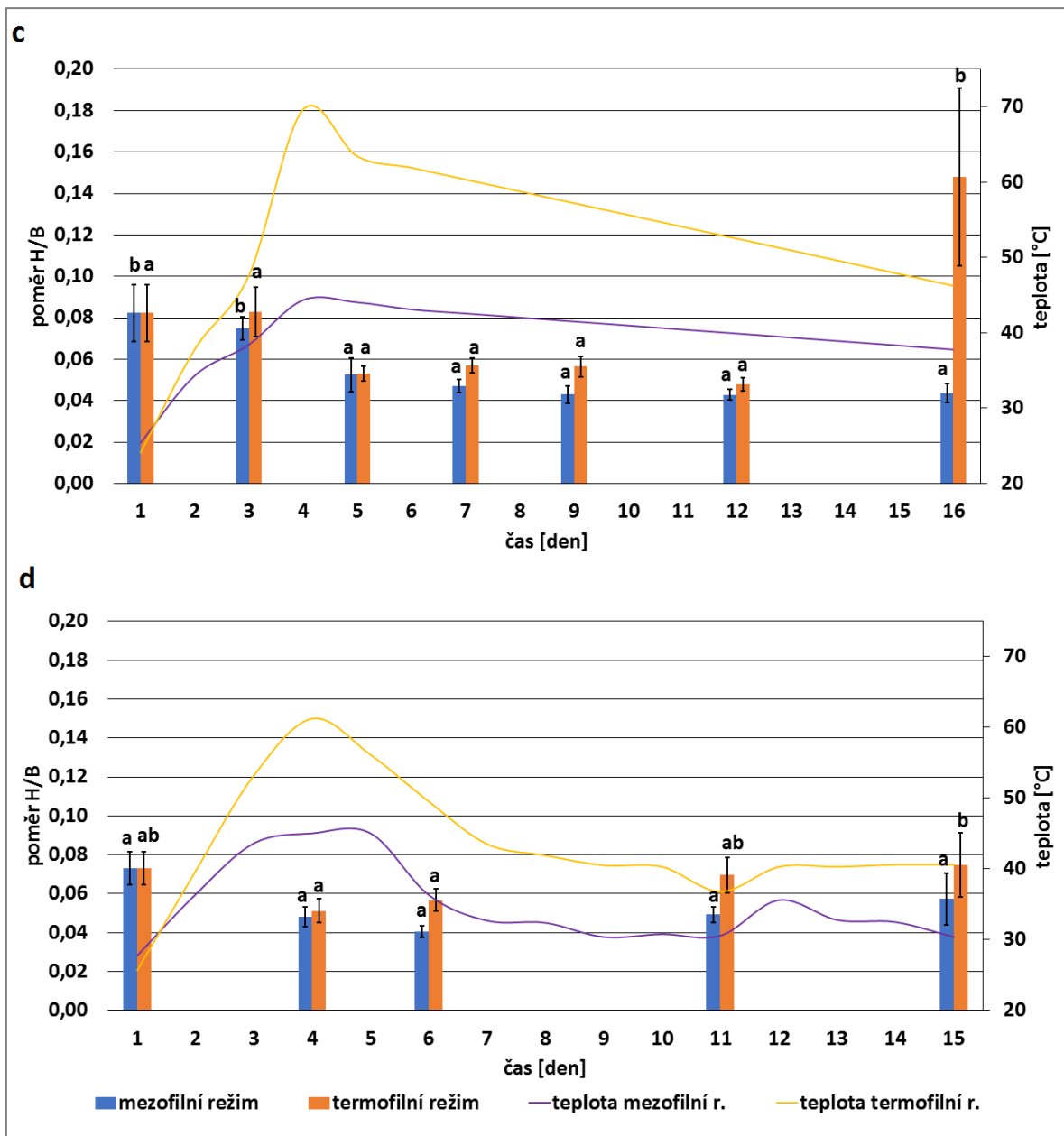
Tyto skutečnosti podporují Bernal a kol. (2009), kteří uvedli, že při teplotách nad 63 °C dochází během kompostování k rychlému poklesu mikrobiální aktivity, protože už je překročena optimální teplota pro různé termofilní mikroorganismy, přičemž mikrobiální aktivita se výrazně snižuje při 72 °C. S tím souhlasí i výsledky Steger a kol. (2007a), kteří zaznamenali vyšší hodnoty celkové koncentrace PLFA při kompostovacím procesu, ve kterém byla maximální teplota 40 °C, oproti procesům, kde maximální teploty byly 55 °C a 67 °C. Kromě toho vyšší teploty při termofilním režimu mohly podpořit zvýšený rozklad snadno rozložitelných organických látek (Cai a kol., 2016a; Liu a kol., 2019) a je možné, že mikrobiální biomasa na konci termofilních režimů cyklů B, C, D byla tedy omezena také v důsledku nižší dostupnosti živin (Jiang a kol., 2018).

5.1.2. Poměr H/B

Pro sledování vývoje biomasy hub a bakterií byl použit poměr H/B, který je běžně používaným ukazatelem změn mikrobiální komunity v půdě (Frosteřád a kol., 2011; Frosteřád a Bååth, 1996), stejně tak při kompostování (Antizar-Ladislao a kol., 2008).



Obrázek 10: Poměr H/B a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu A (a), B (b). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.



Obrázek 11: Poměr H/B a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu C (c), D (d). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.

Vývoj poměru H/B v rámci cyklu A je zobrazen na Obr. 10a. Z výsledků vyplývá, že poměr H/B se v rámci cyklu A významně měnil ($p < 0,05$) v průběhu obou teplotních režimů biosušení. Při mezofilním režimu se poměr H/B významně neměnil až do 4. dne, nicméně poté došlo mezi 4. a 15. dnem k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) z $0,051 \pm 0,008$ na $0,181 \pm 0,037$. Podobně i u termofilního režimu se poměr H/B významně neměnil až do 8. dne, po kterém došlo k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) do 15. dne

z $0,059 \pm 0,007$ na $0,273 \pm 0,052$. Nárůst poměru H/B s postupem obou teplotních režimů biosušení byl pozorován také u cyklu B (Obr. 10b). V průběhu mezofilního režimu biosušení byl zaznamenán statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) mezi 5. a 16. dnem z $0,067 \pm 0,011$ na $0,181 \pm 0,045$, u termofilního režimu pak došlo k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) mezi 8. a 16. dnem z $0,064 \pm 0,017$ na $0,228 \pm 0,034$.

Tento vývoj poměru H/B pozorovali při kompostování také Steel a kol. (2013). V průběhu termofilní fáze zaznamenali minimum poměru H/B ($< 0,4$), nicméně poté poměr H/B významně vzrostl a zůstal relativně konstantní (± 1) v průběhu fáze ochlazování a zrání. Pokles biomasy hub v průběhu termofilní fáze a její následný nárůst je běžně pozorován při kompostování (Cahyani a kol., 2002; Covino a kol., 2016; Liu a kol., 2017b). Podobně i Klamer a Bååth (1998) pozorovali při kompostování drcené slámy z *Miscanthus* rychlý pokles poměru H/B z $0,37$ na $0,007$ během termofilní fáze ($69\text{ }^{\circ}\text{C}$) a došli k závěru, že biomasa hub se rozvíjí hlavně při mezofilních podmínkách, kdy se teploty pohybují do $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco teploty vyšší než $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedou již k inhibici jejich růstu.

Kromě toho nárůst podílu hub ke konci procesu může být dán také jejich konkurenční výhodou degradovat hůře rozložitelné látky jako je celulóza a lignin (Albrecht a kol., 2010; Langarica-Fuentes a kol., 2014; Liu a kol., 2017b).

Při termofilním režimu cyklu C (Obr. 11c) poměr H/B vykazoval podobný trend, jako byl pozorován u termofilních režimů cyklů A, B, nicméně k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) došlo až mezi 12. a 16. dnem z $0,048 \pm 0,003$ na $0,148 \pm 0,043$. Jiných výsledků u cyklu C bylo však dosaženo při mezofilním režimu, kdy poměr H/B statisticky významně klesl ($p < 0,05$) mezi 3. a 5. dnem a poté se již významně neměnil, přičemž jeho hodnoty mezi 1. a 16. dnem klesly o $47,0\%$. I při termofilním režimu cyklu D (Obr. 11d) byl pozorován nárůst poměru H/B mezi 6. a 15. dnem z $0,057 \pm 0,006$ na $0,075 \pm 0,016$, nicméně mezi 1. a 15. dnem nebyl pozorován významný nárůst hodnot. Při mezofilním režimu se však hodnoty poměru H/B významně neměnily v průběhu celého procesu. Tyto výsledky naznačují, že při mezofilním režimu cyklu C a obou teplotních režimech cyklu D nedošlo k významnějšímu uplatnění biomasy hub s postupem biosušení.

Významnější uplatnění hub ke konci kompostování hnoje s dřevěnými hoblinami nezaznamenali Xu a kol. (2010) i přes skutečnost, že došlo k poklesu teploty z $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Amir a kol. (2008) při kompostování čistírenského kalu pozorovali nejprve nárůst $18:2\omega 6,9$ (biomarker hub) a následný pokles po nárůstu teplot, po kterém již tato PLFA

zůstala konstatní, přičemž v průběhu celého procesu teplota nepřesáhla 52 °C. Je tak pravděpodobné, že při mezofilním režimu biosušení cyklu C a obou teplotních režimech cyklu D nebyla teplota hlavním faktorem ovlivňující činnost hub, nicméně to mohl být nevhodný poměr C/N, pH, vlhkost či jiný faktor ovlivňující průběh procesu (Gajalakshmi a Abbasi, 2008).

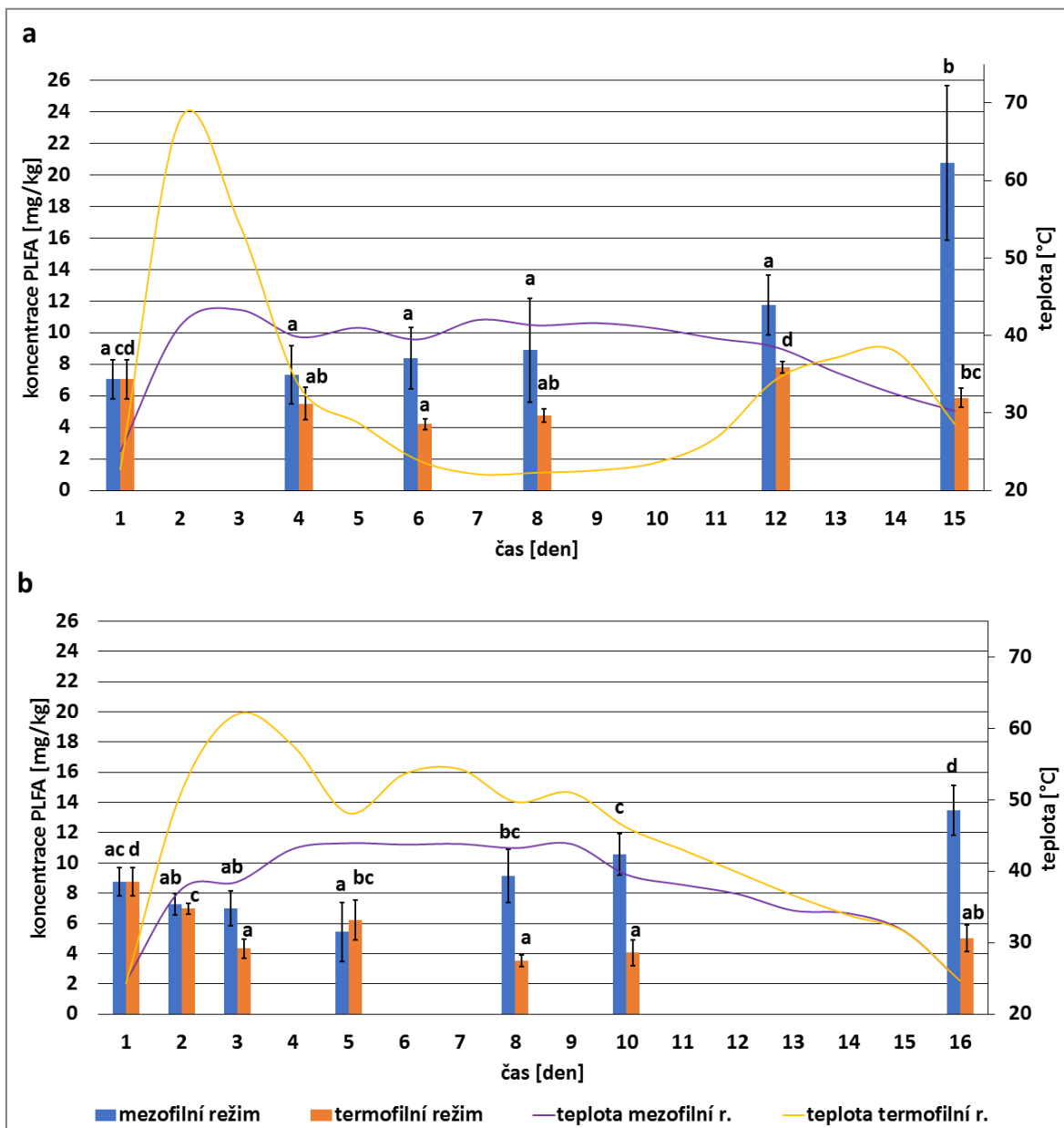
Z výsledků je patrné, že různé teplotní režimy mají vliv na vývoj poměru H/B, který na konci procesu cyklů A (Obr. 10a), B (Obr. 10b) a C (Obr. 11c) dosáhl statisticky vyšších hodnot ($p < 0,05$) v reaktoru pracujícím při termofilním režimu biosušení. Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že mírné teploty panující v průběhu mezofilních režimů biosušení cyklů A, B, C (Tab. 3) byly optimální pro růst hub a oproti termofilním režimům se mohly více uplatňovat v průběhu celého procesu (Gajalakshmi a Abbasi, 2008; Liu a kol., 2017b). S tím souhlasí i výsledky Carpenter-Boggs a kol. (1998), kteří uvedli, že PLFA charakterizující houby (18:2 ω 6,9, 18:3 ω 6,9,12) se významně nezměnily během 60 dnů po obvyklém teplotním profilu kompostování, ve kterém teploty nepřesáhly 60 °C. Kromě toho je pravděpodobné, že při termofilních režimech cyklů A, B, C vyšší teploty (Tab. 3) podpořily činnost bakterií v termofilní fázi, čímž došlo k vyšší spotřebě snadno rozložitelných látek (Cai a kol., 2016a; Zhang a kol., 2018b), což také zvýhodnilo činnost hub ke konci termofilního režimu biosušení (Liu a kol., 2017b).

5.1.3. Biomasa aktinobakterií

Na Obr. 14a je zobrazen vývoj koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu A. Z výsledků vyplývá, že koncentrace PLFA se významně měnila ($p < 0,05$) v průběhu obou režimů biosušení. Při mezofilním režimu biosušení došlo u koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) mezi 12. a 15. dnem, přičemž v průběhu celého procesu se zvýšily 2,9krát. Při termofilním režimu biosušení došlo nejprve k statisticky významnému poklesu ($p < 0,05$) mezi 1. a 4. dnem z $7,04 \pm 1,24 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na $5,51 \pm 1,02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a poté k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) koncentrací PLFA mezi 8. a 12. dnem z $4,75 \pm 0,42 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ na $7,78 \pm 0,37 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Po 12. dni byl však pozorován opět statisticky významný pokles ($p < 0,05$) na $5,87 \pm 0,60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

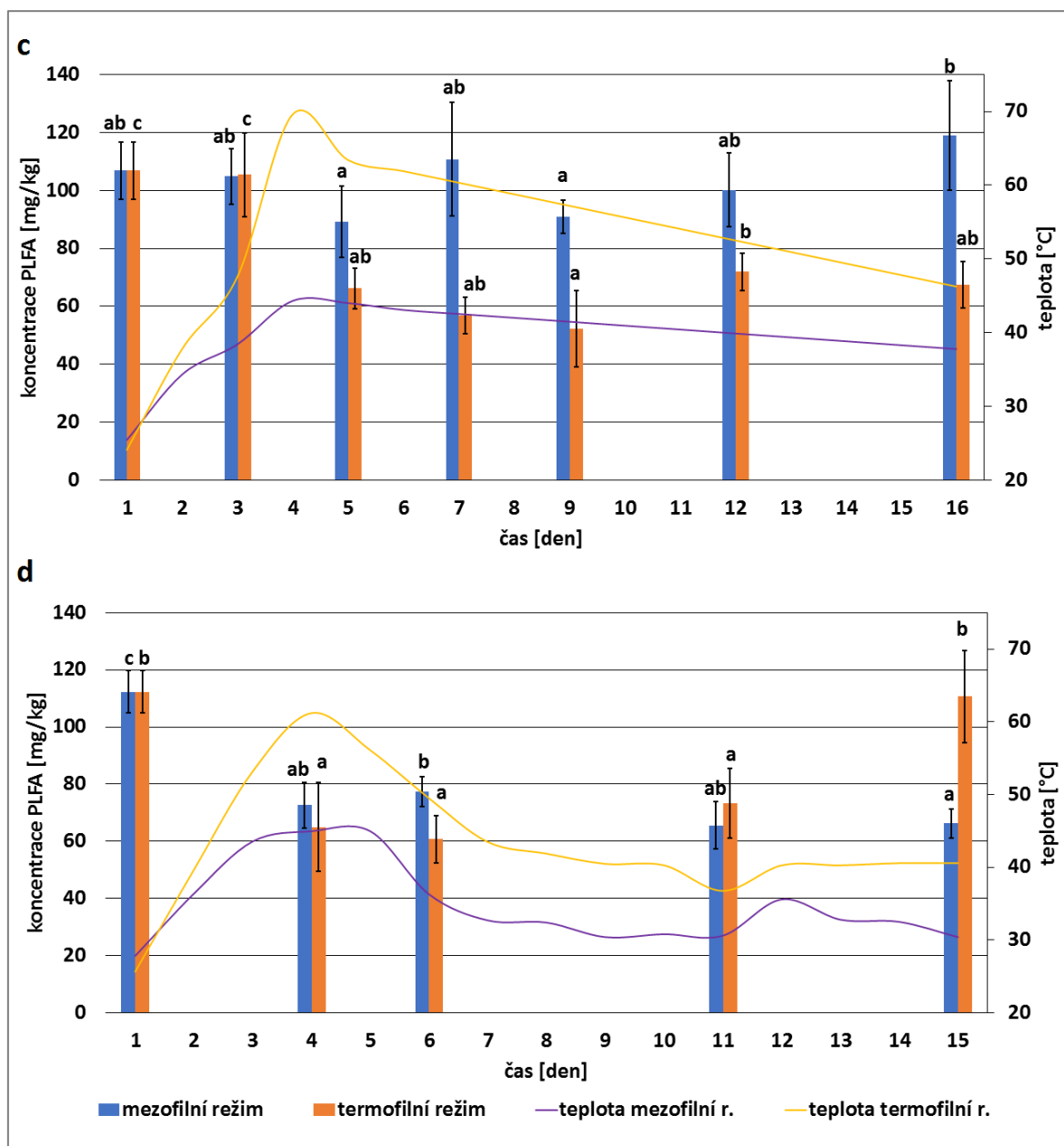
Podobný vývoj byl pozorován i u cyklu B (Obr. 14b), kdy při mezofilním režimu se koncentrace PLFA významně neměnily až do 5. dne, po kterém došlo k statisticky

významnému nárůstu ($p < 0,05$) do 16. dne z $5,45 \pm 1,95 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $13,48 \pm 1,67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Při termofilním režimu byl pozorován statisticky významný pokles ($p < 0,05$) mezi 1. a 3. dnem, kdy se koncentrace PLFA snížila z $8,75 \pm 0,95 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $4,33 \pm 0,64 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Poté došlo k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) do 5. dne, nicméně oproti mezofilnímu režimu koncentrace PLFA opět statisticky významně klesla ($p < 0,05$) mezi 5. a 8. dnem z $6,22 \pm 1,33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $3,50 \pm 0,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Od 8. dne se koncentrace PLFA již významně neměnila až do konce procesu.



Obrázek 12: Koncentrace sumy PLFA charakteristických pro aktinobakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů A (a), B (b). Chybovými úsečkami je

znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.



Obrázek 13: Koncentrace sumy PLFA charakteristických pro aktinobakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů C (c), D (d). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.

Nárůst biomasy aktinobakterií s postupem procesu, jaký byl zaznamenán při mezofilních režimech cyklů A a B, je často pozorován i při kompostování (Bolta a kol., 2003; Boulter a kol., 2002; Kato a kol., 2005; Klamer a Bååth, 1998; Steger a kol., 2003; Xu a kol., 2010; Zhao a kol., 2018), přičemž tento nárůst může být způsoben několika faktory. Steger a kol.

(2007a) uvádějí, že důležitým selektivním faktorem pro vývoj aktinobakterií při kompostování je teplota. Optimální růst aktinobakterií se pohybuje v rozmezí 25-30 °C, a proto mají tendenci růst až v pozdějších fázích kompostování. Kromě toho aktinobakterie se vyvíjejí obvykle pomaleji než většina bakterií nebo hub a jsou neefektivními konkurenty při vysoké dostupnosti živin, ale naopak se stávají konkurenceschopnější při snižujících se hladinách živin (Gajalakshmi a Abbasi, 2008; Nakasaki a kol., 1985).

Zaznamenaný pokles biomasy aktinobakterií ke konci termofilních režimů cyklů A a B mohl být způsoben tím, že vyšší teploty při termofilním režimu vedly k vyšší eliminaci vlhkosti (Velis a kol., 2009) a tím k dosažení vyšší sušiny materiálu (Tab. 2), což mohlo negativně ovlivnit činnost aktinobakterií (Yang a kol., 2014). Tyto výsledky tak podporují část hypotézy, která říká, že ke konci biosušení nedojde k nárůstu biomasy aktinobakterií.

Oproti tomu obnovení biomasy aktinobakterií ke konci procesu bylo pozorováno u obou teplotních režimů cyklu C (Obr. 15c), kdy byl při mezofilním režimu u koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie zaznamenán statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) mezi 9. a 16. dnem z $90,97 \pm 5,65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $119,02 \pm 18,81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Při termofilním režimu byl pozorován statisticky významný pokles ($p < 0,05$) mezi 3. a 5. dnem z $105,50 \pm 14,48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $66,22 \pm 6,97 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Poté došlo k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) mezi 9. a 12. dnem z $52,20 \pm 13,12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $71,93 \pm 6,37 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, po kterém však již nebyl pozorován statisticky významný pokles až do konce procesu. Nárůst biomasy aktinobakterií u obou teplotních režimů cyklu C mohl být podpořen tím, že u obou režimů bylo dosaženo poměrně nízkých hodnot výstupní sušiny (Tab. 2) a efekt sušení nebyl tak výrazný jako u termofilních režimů cyklů A a B (Adani a kol., 2002).

Podobně jako u cyklu C došlo u termofilního režimu cyklu D (Obr. 15d) k obnovení biomasy aktinobakterií ke konci procesu, kdy byl zaznamenán statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie mezi 11. a 15. dnem z $73,20 \pm 12,22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na $110,65 \pm 16,00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Nicméně jiný trend vývoje biomasy aktinobakterií byl pozorován při mezofilním režimu, kdy koncentrace PLFA statisticky významně klesly ($p < 0,05$) mezi 1. a 4. dnem a poté se již významně neměnily až do konce procesu. Mezi 1. a 15. dnem došlo k poklesu o 41 %. Klesající vývoj biomasy aktinobakterií po termofilní fázi, kdy se teploty držely pod 35 °C, zaznamenali při kompostování Liu a kol. (2017b), přičemž tento pokles přisuzovali vyčerpání živin. Tento efekt degradace je pozorován spíše u kompostování (Elouaqoudi a kol., 2015; Steger a kol., 2005). Nicméně

vzhledem k nezaznamenanému nárůstu poměru H/B při mezofilním režimu cyklu D (viz kap. 5.1.2.) je pravděpodobné, že pokles aktinobakterií mohl být způsoben účinky efektu sušení i efektu degradace (Adani a kol., 2002).

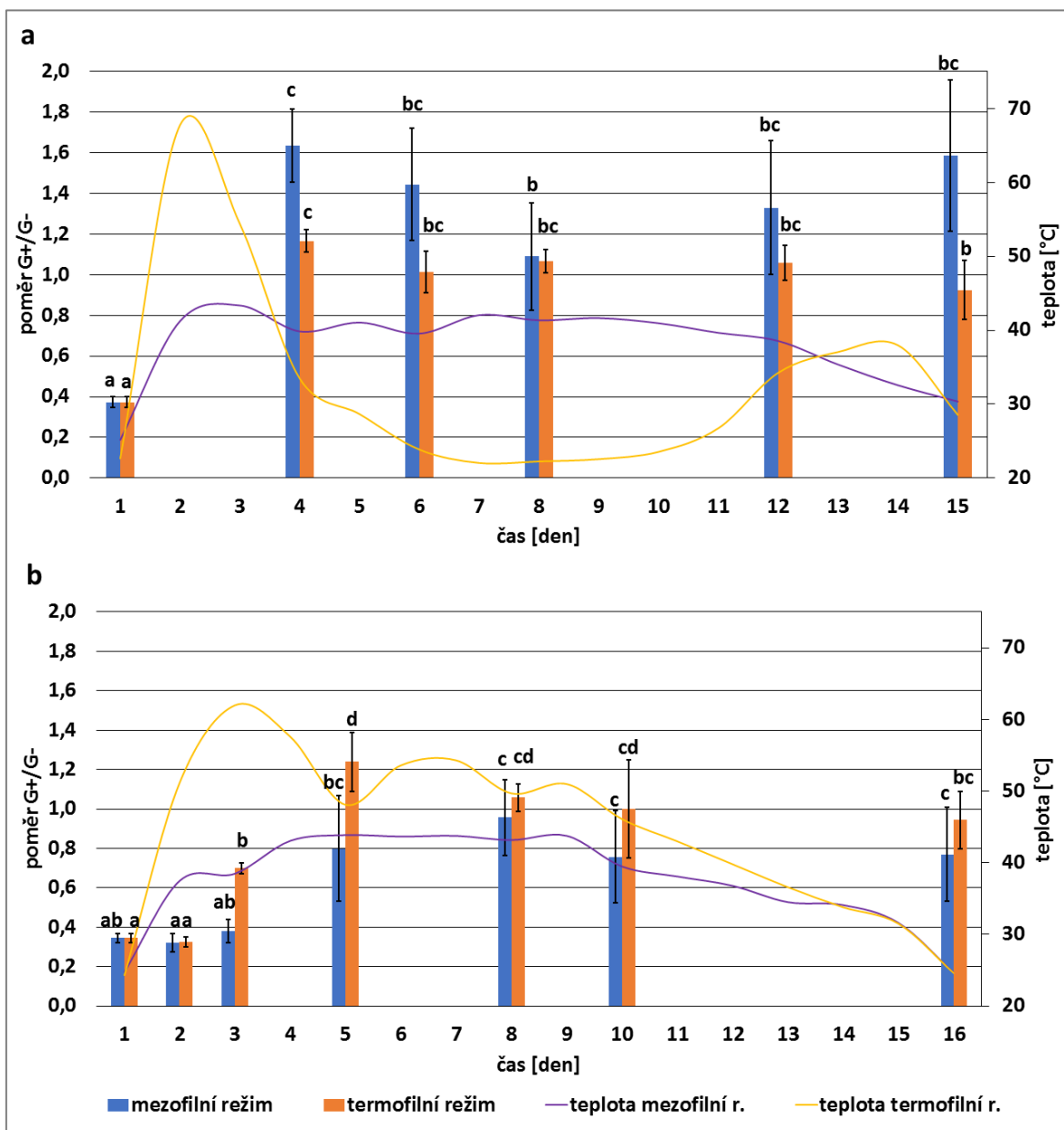
Přestože aktinobakterie se uplatňují více při mezofilních podmínkách v pozdějších fázích kompostování (Gajalakshmi a Abbasi, 2008), existují i termofilní aktinobakterie (Nakasaki a kol., 1985; Steger a kol., 2007b). S tím souhlasí i Herrmann a Shann (1997), kteří zaznamenali nárůst PLFA charakterizující aktinobakterie (10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0) již v termofilní fázi kompostování. Nicméně na základě výsledků cyklů A, B a C je patrné, že aktinobakterie upřednostňovaly podmínky panující při mezofilním režimu biosušení. Tuto skutečnost potvrzuje také vývoj poměru aktinobakterie/mikrob. biomasa cyklů A, B, C (Příloha 3), u kterých hodnota poměru byla na konci procesu statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) v reaktoru pracujícím při mezofilních podmínkách. V průběhu mezofilního režimu biosušení cyklů A, B a C se hodnoty poměru aktinobakterie/mikrob. biomasa zvýšily 5,4krát, 4,2krát a 1,9krát.

Podobných výsledků dosáhli i Steger a kol. (2007a), kteří sledovali vliv různých teplot na vývoj aktinobakterií při kompostování biologického odpadu z domácností se slámou pomocí analýzy PLFA. Došli k závěru, že aktinobakterie se více uplatňovaly při procesech, kde maximální teploty dosahovaly 40 °C a 55 °C. Ke konci těchto procesů byla relativní koncentrace PLFA charakterizující aktinobakterie okolo 15 %. Oproti tomu při procesu, kde maximální teplota byla 67 °C, byla pouze okolo 10 %. Dominance aktinobakterií byla zaznamenána i v dalších studiích, které se zabývaly kompostováním biologických odpadů z domácností ve vsádkovém reaktoru, jež probíhalo bez striktně termofilních teplot (<50 °C) (Hiraishi a kol., 2000; Narihiro a kol., 2003).

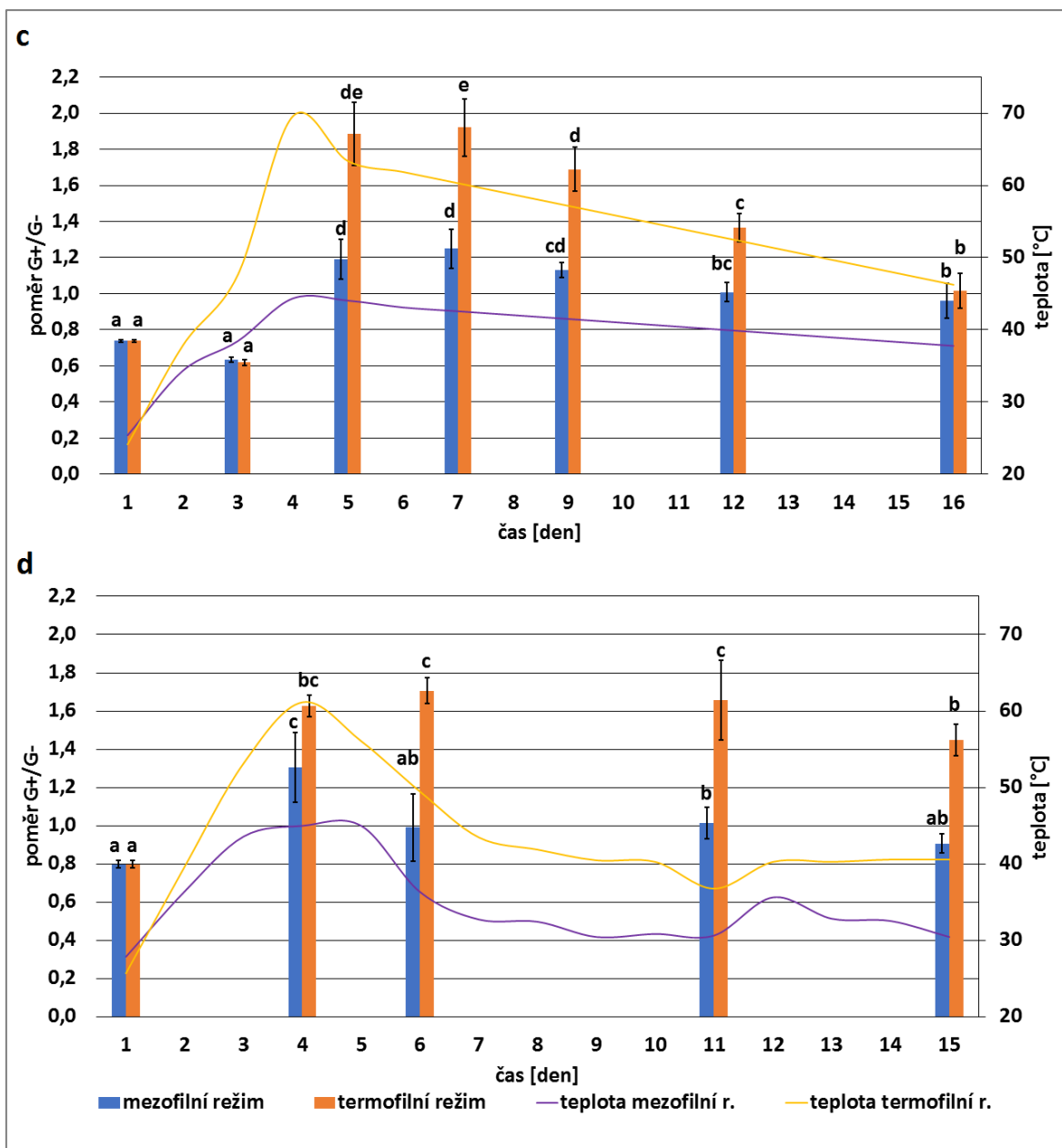
Na základě výsledků (Pilnáček a kol., 2019) (viz kap. 3.1.6.) je tak pravděpodobné, že aktinobakterie by mohly být zodpovědné za degradaci vybraných PPCP při mezofilním režimu biosušení. Aktinobakterie jsou podobně jako houby známé svou schopností degradovat hůře rozložitelné látky včetně persistentních toxických látek, (Bernal a kol., 2009; Nordin a kol., 2005; Rybkina a kol., 2003; Zhao a kol., 2018), přičemž jsou ale schopny tolerovat vyšší teploty a pH (Gajalakshmi a Abbasi, 2008) a mohly by tak mít velký význam při degradaci těchto látek. Z tohoto důvodu při dalším studiu biosušení jako metody odstranění xenobiotik z čistírenských kalů, by měla být aktinobakteriím věnována větší pozornost.

5.1.4. Poměr G+/G-

Pro sledování vývoje G+ a G- bakterií byl při biosušení použit poměr G+/G- (Antizar-Ladislao a kol., 2008; Willers a kol., 2015).



Obrázek 14: Poměr G+/G- a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu A (a), B (b). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.



Obrázek 15: Poměr G+/G- a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu C (c), D (d). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů.

Vývoj poměru G+/G- při mezofilním a termofilním režimu biosušení cyklu A je zobrazen na Obr. 12a. Na základě výsledků je patrné, že poměr G+/G- se významně měnil v průběhu mezofilního i termofilního režimu biosušení ($p < 0,05$). Při mezofilním režimu biosušení byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi 1. a 4. dnem, kdy hodnoty poměru G+/G- narostly z $0,373 \pm 0,028$ na $1,635 \pm 0,181$. Poté došlo k statisticky významnému poklesu ($p < 0,05$) do 8. dne na $1,090 \pm 0,264$, po kterém se poměr G+/G- již významně

neměnil. Podobný vývoj byl pozorován i při termofilním režimu biosušení, kdy opět došlo k statisticky významnému nárůstu ($p < 0,05$) mezi 1. a 4. dnem z $0,373 \pm 0,028$ na $1,166 \pm 0,054$. Poté byl pozorován statisticky významný pokles ($p < 0,05$) až do 15. dne, kdy poměr $G+/G-$ činil $0,925 \pm 0,146$.

Mírný pokles poměru $G+/G-$ byl pozorován také při termofilním režimu cyklu B (Obr. 12b), při kterém poměr $G+/G-$ statisticky významně rostl ($p < 0,05$) mezi 2. a 5. dnem. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) byl pak zaznamenán mezi 5. a 16. dnem, kdy hodnoty klesly z $1,239 \pm 0,149$ na $0,943 \pm 0,147$. Jiného vývoje poměru $G+/G-$ však bylo dosaženo při mezofilním režimu cyklu B, při kterém byl opět pozorován statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) poměru $G+/G-$ mezi 2. a 5. dnem z $0,322 \pm 0,046$ na $0,800 \pm 0,268$, nicméně poté se již významně neměnil až do konce procesu.

Nárůst a následný pokles poměru $G+/G-$ byl pozorován u obou teplotních režimů cyklu D (Obr. 13d). Při mezofilním režimu biosušení byl statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) pozorován mezi 1. a 4. dnem, kdy hodnoty poměru $G+/G-$ narostly z $0,798 \pm 0,019$ na $1,303 \pm 0,182$. Poté došlo k statisticky významnému poklesu ($p < 0,05$) do 6. dne na $0,990 \pm 0,174$, po kterém se již poměr $G+/G-$ významně neměnil. Podobně i při termofilním režimu byl pozorován statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) poměru $G+/G-$ do 4. dne, nicméně statisticky významný pokles ($p < 0,05$) byl pozorován až mezi 6. a 15. dnem, kdy hodnoty klesly z $1,706 \pm 0,068$ na $1,449 \pm 0,082$. Podobný trend vykazoval poměr $G+/G-$ při obou teplotních režimech biosušení také u cyklu C (Obr. 13c).

Zvyšující se poměr $G+/G-$ zaznamenaný u obou teplotních režimů cyklů A, B, C, D vypovídá o větším uplatnění $G+$ bakterií při termofilní fázi, na druhou stranu jeho následný pokles zaznamenaný u obou teplotních režimů cyklů A, C, D a termofilního režimu cyklu B poukazuje na zvyšující se uplatnění $G-$ bakterií (Willers a kol., 2015). Pokles poměru $G+/G-$ však nebyl pozorován u mezofilního režimu cyklu B. Elouaqoudi a kol. (2015) uvádějí, že nepřetržitá přítomnost $G+$ bakterií ke konci kompostování poukazuje na stálou přítomnost biologicky rozložitelných organických látek a dokonce zvýšení $G+$ bakterií v konečné fázi kompostování může pak být podpořeno dostupností organických substrátů v důsledku rozpadu lignocelulózových sloučenin. Je tak pravděpodobné, že mírné teploty při mezofilním režimu cyklu B omezily rychlou spotřebu organických látek, jaká je běžně pozorována při vysokých teplotách v termofilních fázích biosušení (Cai a kol., 2016a; Liu a kol., 2019).

V Příloze 2 je zobrazen vývoj koncentrací PLFA charakteristických pro G+ a G- bakterie, přičemž z vývoje koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie je patrné, že ani u jednoho teplotního režimu experimentálních cyklů A, B, C, D nedošlo k nárůstu biomasy G- baktérií ke konci procesu. Při mezofilním režimu cyklu A došlo u koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie k statisticky významnému poklesu ($p < 0,05$) mezi 1. a 4. dnem a poté již nebyl zaznamenán žádný významný nárůst. Podobných výsledků bylo dosaženo i při termofilním režimu cyklu A. Také u mezofilního režimu cyklu B byl zaznamenán statisticky významný pokles ($p < 0,05$) koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie mezi 1. a 3. dnem, po kterém již nebyl pozorován významný nárůst, u termofilního režimu koncentrace PLFA statisticky významně klesaly ($p < 0,05$) mezi 1. a 5. dnem a poté opět nedošlo již k významnému nárůstu. V rámci mezofilního režimu cyklu C byl nejprve pozorován statisticky významný nárůst ($p < 0,05$) koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie mezi 1. a 3. dnem, nicméně poté došlo k statisticky významnému poklesu do 5. dne, po kterém se koncentrace PLFA významně neměnily až do konce procesu, oproti tomu u termofilního režimu byl zaznamenán statisticky významný pokles ($p < 0,05$) mezi 1. a 5. dnem a poté již nedošlo k významnému nárůstu. Podobný vývoj koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie byl pozorován také v rámci obou teplotních režimů cyklu D.

Tyto výsledky tak nejsou v souladu s vývojem PLFA charakteristických pro G- bakterie, který je většinou pozorován u kompostování, kdy v počátečních fázích se společně s houbami vyskytují převážně G- bakterie, které jsou postupně omezovány zvyšujícími se teplotami při termofilní fázi. Jejich rekolonizace substrátu je pozorována až po následném poklesu teplot (Boulter a kol., 2002; Cahyani a kol., 2002; Klamer a Bååth, 1998; Steel a kol., 2013; Xu a kol., 2010). Obnovení G- bakterií však nepozorovali Amir a kol. (2008) při kompostování čistírenských kalů a slámy. Naopak zaznamenali pokles a úplné zmizení PLFA charakteristických pro G- bakterie (2OH 10:0; 3OH 12:0; 2OH 14:0; 13:0; 16:1; 18:1 trans) již po 30 dnech kompostování. Zelles a kol. (1992) uvedli, že mikroorganismy obsahující mononenasyčené mastné kyseliny, jako jsou 16:1 a 18:1, jsou silně závislé na vysoké dostupnosti substrátu a pokles biomasy těchto mikroorganismů, respektive pokles koncentrací těchto PLFA, poukazuje na nedostatek biologicky dostupného uhlíku. Nicméně jak již bylo uvedeno výše, vyčerpání snadno rozložitelných látek omezuje činnost mikrobiálních skupin hlavně při kompostování, a proto pokles G- bakterií v rámci obou

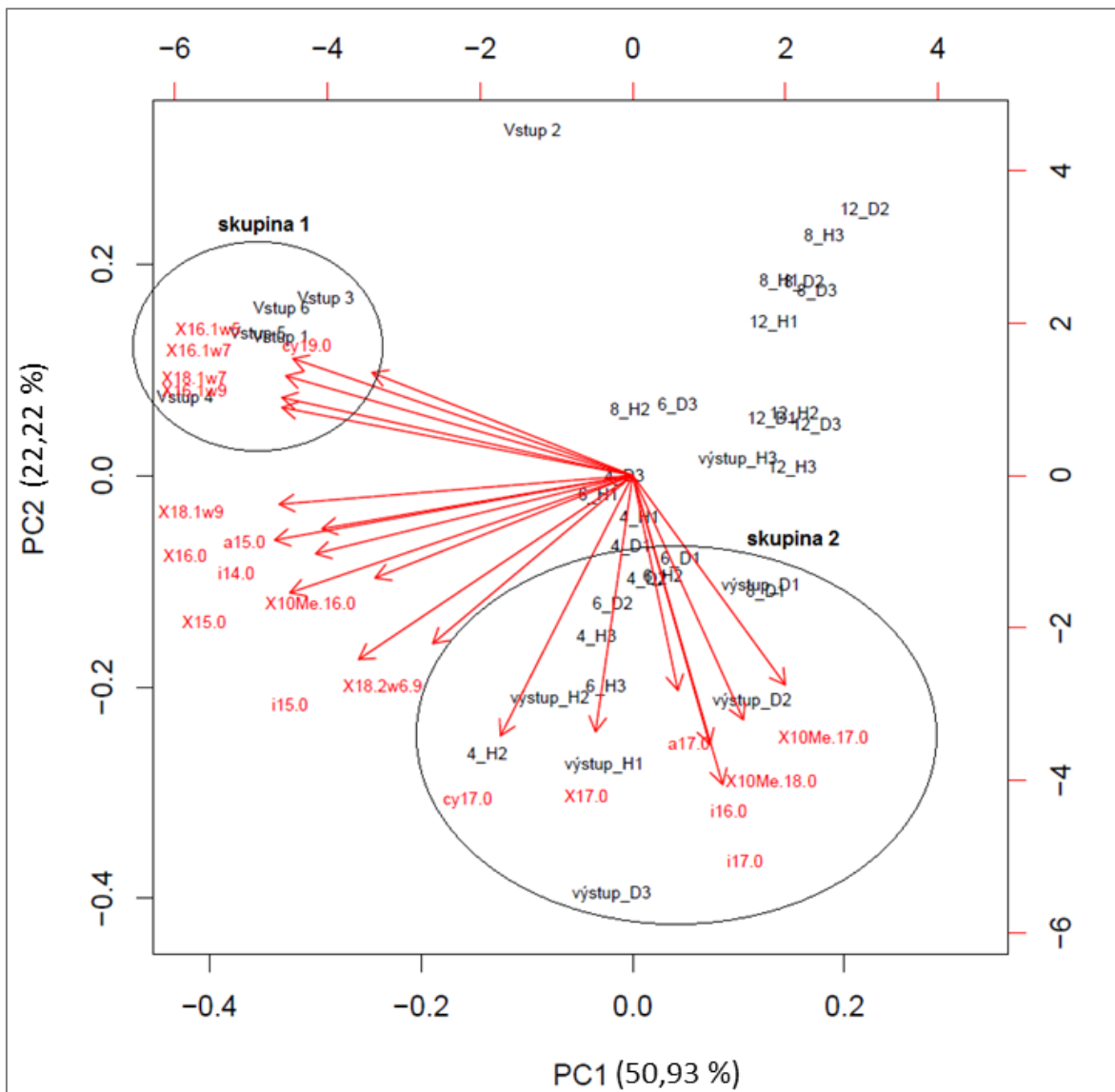
teplotních režimů u cyklů A, B, C a D mohl být způsoben spíše nevhodnými vlhkostními podmínkami panujícími při procesu biosušení (Adani a kol., 2002).

Nicméně G⁺ bakterie představují i striktně termofilní mikroorganismy, které se rychle rozvíjejí zejména během fáze vysokých teplot (Amir a kol., 2010; Steel a kol., 2013), zatímco G⁻ bakterie jsou obecně méně odolné vůči vysokým teplotám a jen málo z nich je při běžném kompostování termotolerantní (Steel a kol., 2013). Z tohoto důvodu se předpokládalo, že G⁺ bakteriím budou oproti G⁻ bakteriím lépe vyhovovat podmínky panující při termofilním režimu. Tato hypotéza byla potvrzena pouze u cyklu B, C a D. Z výsledků je patrné, že poměr G⁺/G⁻ dosáhl maximálních hodnot po 4 (cyklus A, D) a 5 (cyklus B, C) dnech biosušení u obou teplotních režimů. Přičemž u cyklů B (Obr. 12b), C (Obr. 13c) a D (Obr. 13d), dosáhl poměr G⁺/G⁻ v těchto dnech statisticky vyšších hodnot ($p < 0,05$) v reaktoru pracujícím při termofilním režimu biosušení. Oproti tomu v rámci cyklu A (Obr. 12a) hodnoty poměru G⁺/G⁻ byly v 4. dni biosušení statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) v reaktoru pracujícím v mezofilním režimu. Je pravděpodobné, že teploty při termofilním režimu cyklu A (Tab. 3) byly již příliš vysoké a vedly k inhibici růstu G⁺ bakterií (Antizar-Ladislao a kol., 2008; Bernal a kol., 2009).

Nicméně kromě výše uvedených skutečností, nebyl v rámci experimentálních cyklů zaznamenán jednoznačný trend vypovídající o rozdílném vlivu teplotních režimů na poměr G⁺/G⁻. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) na konci procesu byl zaznamenán pouze u cyklu A (Obr. 12a), kde poměr G⁺/G⁻ dosáhl vyšších hodnot při mezofilním režimu biosušení, a cyklu D (Obr. 13b), v rámci kterého však dosáhl vyšších hodnot v reaktoru pracujícím v termofilním režimu.

5.2. PCA

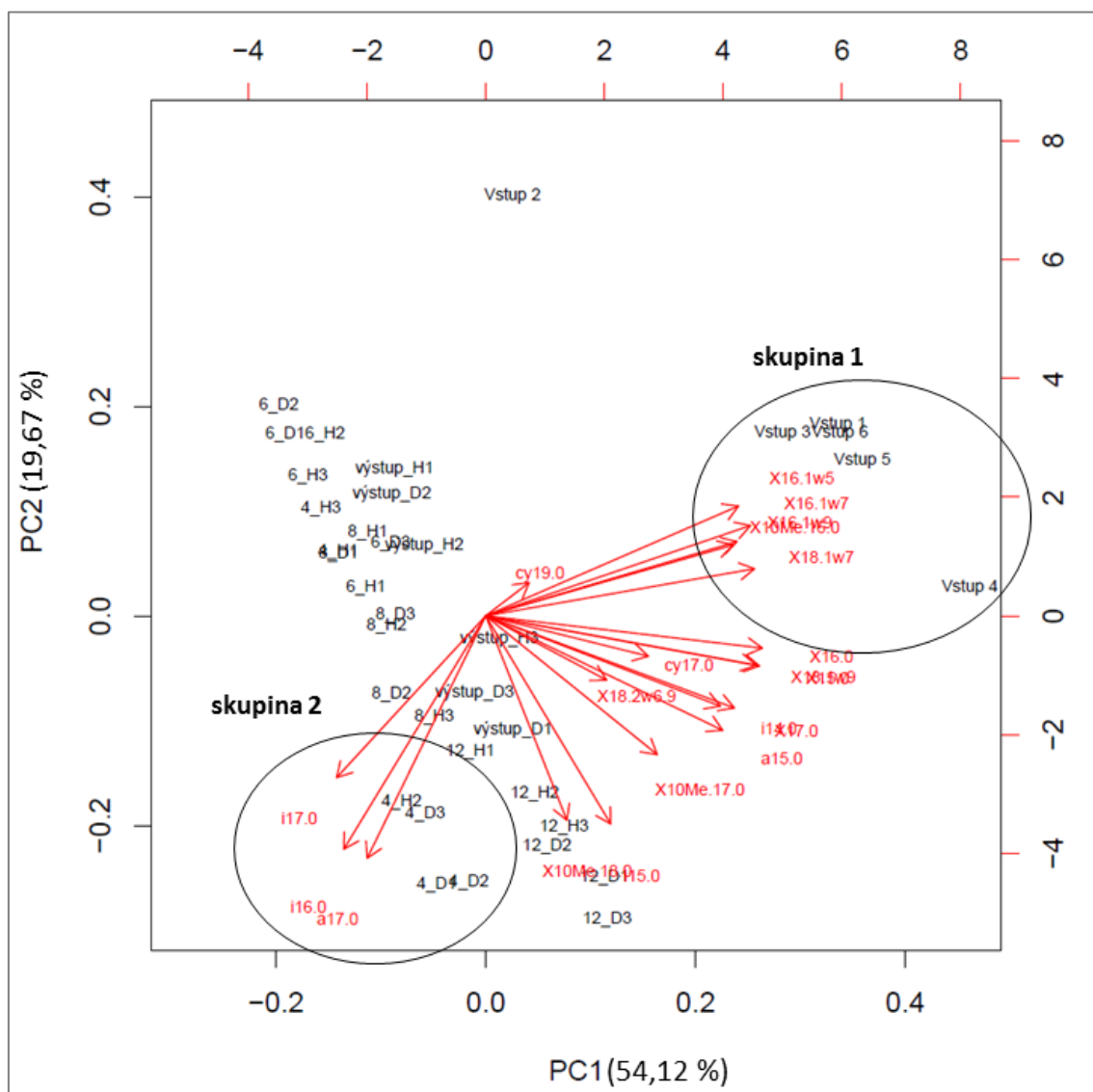
Celkové koncentrace jednotlivých PLFA byly podrobeny PCA, aby se porovnalá struktura komunity v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů A, B a C, D.



Obrázek 16: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu A. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

PCA provedená na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu A odhalila, že první hlavní komponenta PC1 (Principal Component – PC) vysvětlila 50,93 % celkové variability a druhá hlavní komponenta (PC2) dalších 22,22 %. Výsledky shrnuté pomocí biplotu (Obr. 16) ukázaly, že se vzorky odebranými na začátku procesu pozitivně korelují PLFA skupiny 1 (16:1ω7, 16:1ω5, 16:1ω9, 18:1ω7, cy19:0). Poté lze pozorovat skupinu 2, která zahrnuje i16:0, i17:0, a17:0, 17:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0, cy17:0. Z biplotu

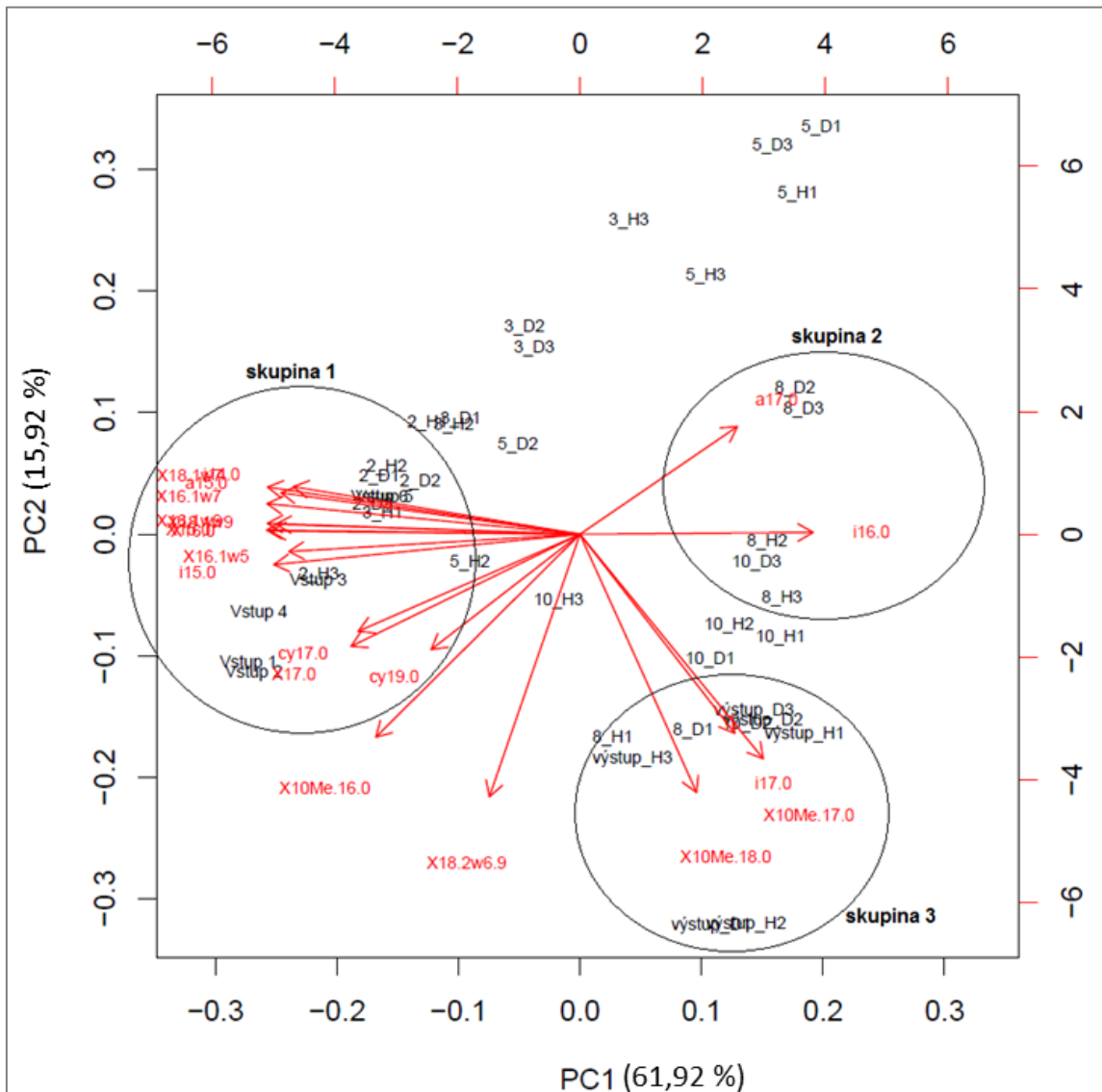
je pak patrné, že PLFA skupiny 2 se prolínají mezi fázemi vysokých teplot (4.-6. den) a koncem procesu.



Obrázek 17: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA termofilního režimu biosušení cyklu A. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

V rámci termofilního režimu cyklu A, PC1 vysvětlila 54,12 % a PC2 19,67 % celkové variability. Biplot (Obr. 17) pak ukázal, že se vzorky odebranými na začátku procesu pozitivně korelují hlavně PLFA patřící do skupiny 1 (16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:1 ω 9, 18:1 ω 7, 10Me-16:0), zatímco se vzorky odebranými během termofilní fáze (4. den) korelují PLFA

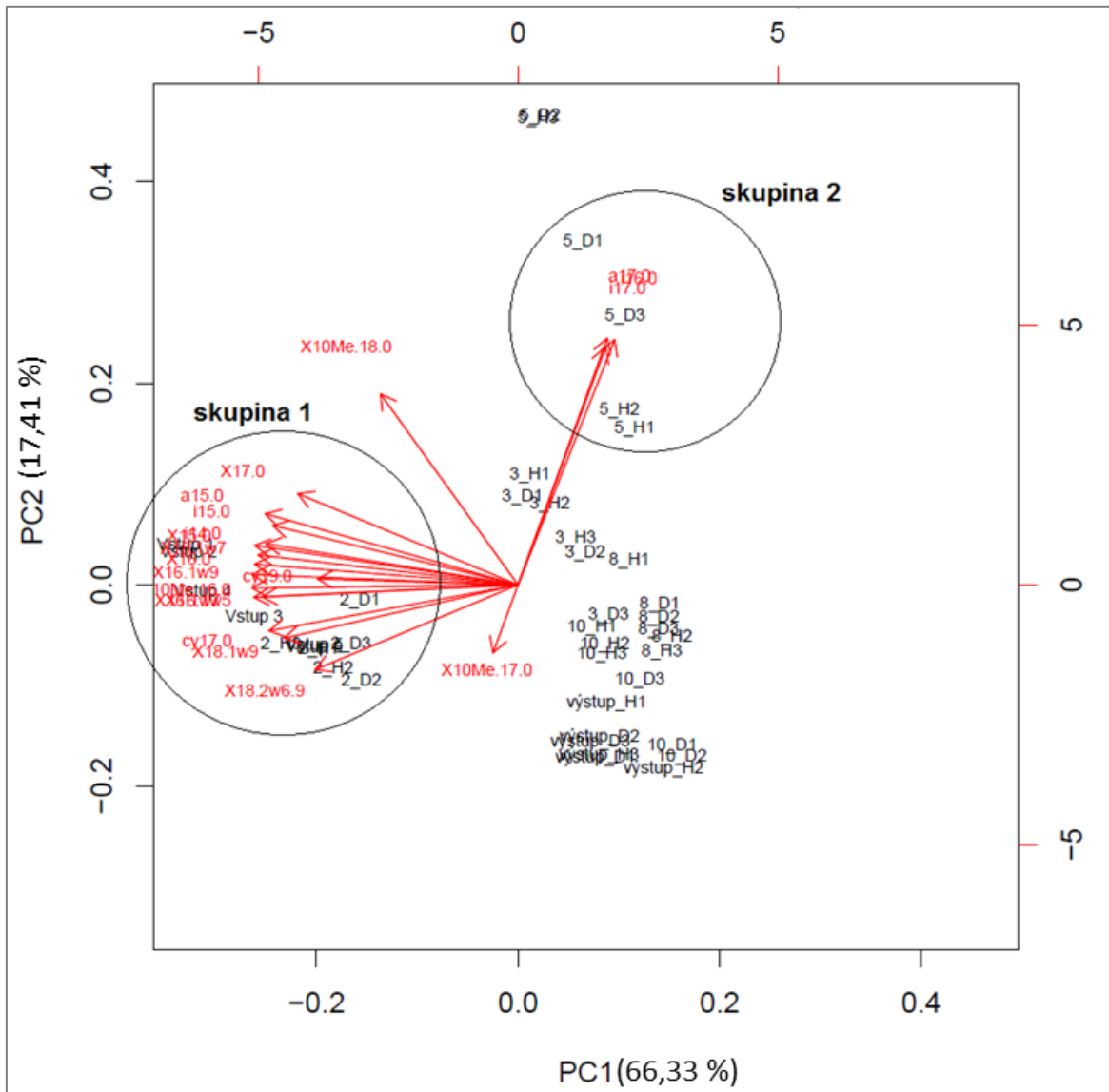
spadající do skupiny 2 (i16:0, i17:0, a17:0). Na konci procesu však není patrná žádná silná korelace mezi konkrétními PLFA a vzorky odebranými na konci procesu.



Obrázek 18: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu B. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

Jiné výsledky poskytla PCA provedená na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu B, kde PC1 vysvětlila 61,92 % celkové variability a PC2 dalších 15,92 %. Biplot (Obr. 18) pak ukázal, že PLFA spadající do skupiny 1 (15:0, 16:0, 17:0, i15:0, i14:0, a15:0, 16:1w9, 16:1w7, 16:1w5, 18:1w9, 18:1w7, cy17:0, cy19:0) korelují se

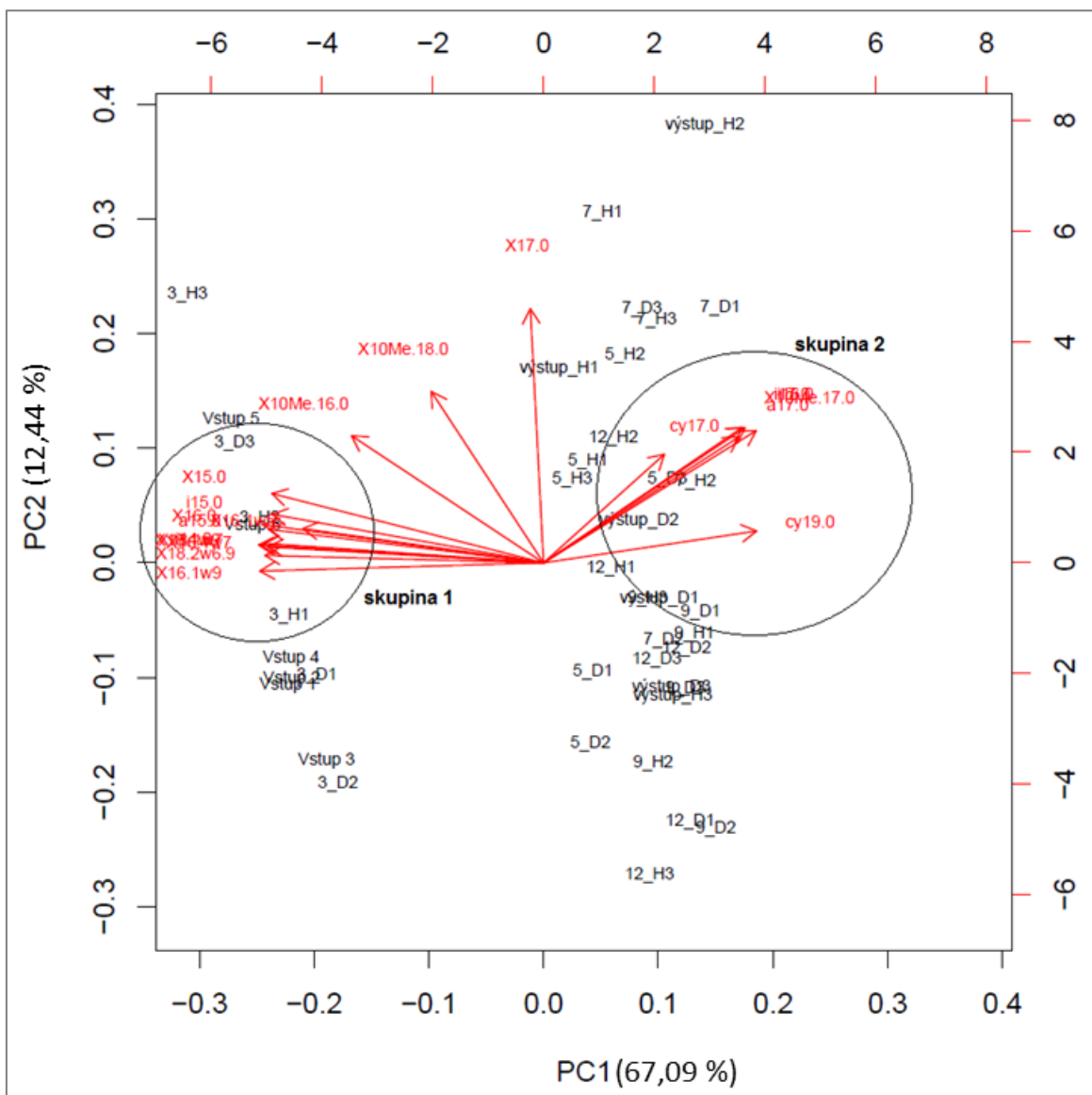
vzorky odebranými na začátku procesu a PLFA spadající do skupiny 2 (a17:0, i16:0) se vzorky odebranými v polovině procesu (8.den). Se vzorky spojenými s koncem procesu korelují PLFA patřící do skupiny 3 (10Me-17:0, 10Me-18:0, i17:0).



Obrázek 19: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA termofilního režimu biosušení cyklu B. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

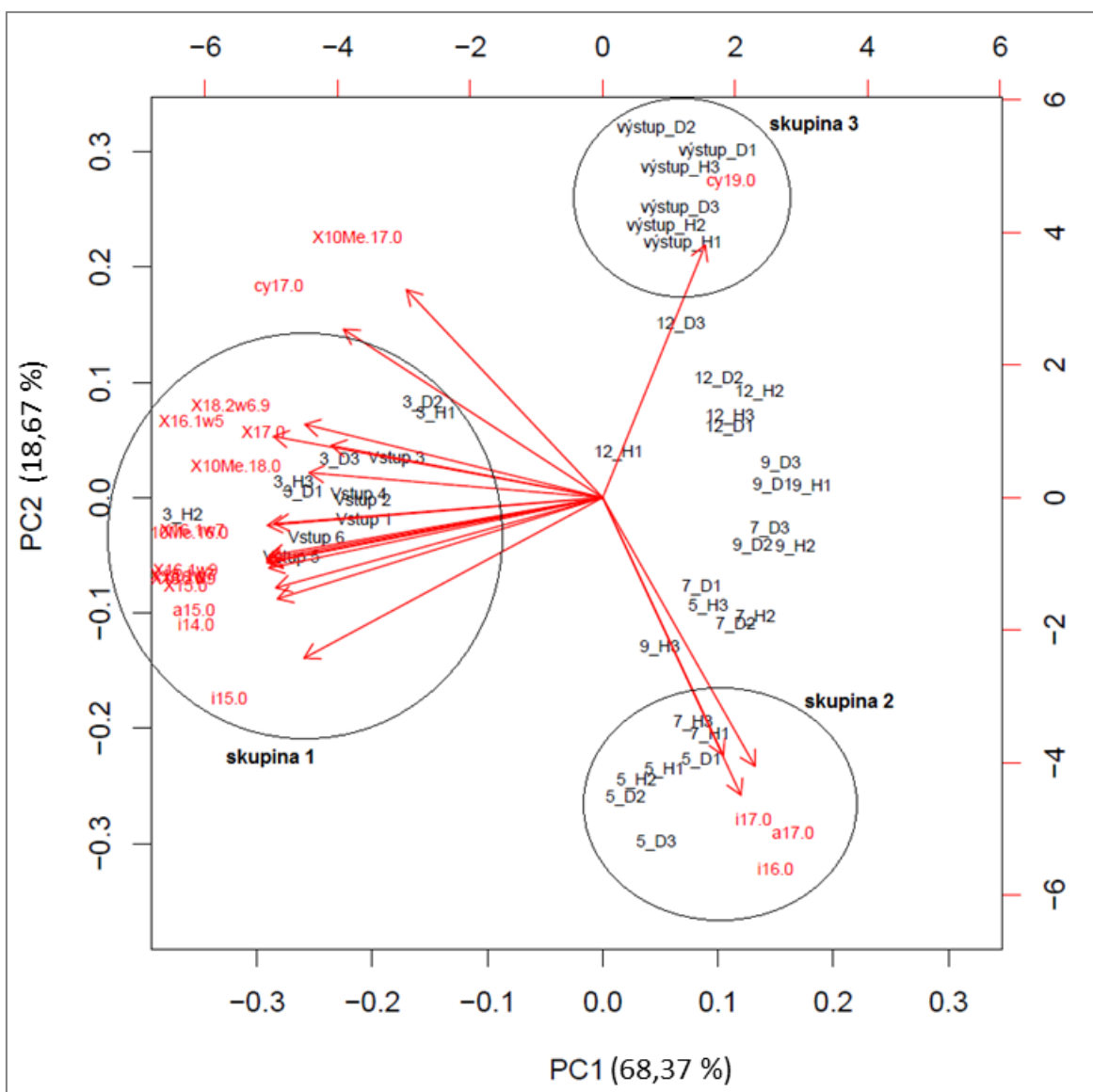
Podobné výsledky byly pozorovány i u termofilního režimu biosušení cyklu B, kde PC1 vysvětlila 66,33 % celkové variability a PC2 dalších 17,41 %. Biplot znázorněný na Obr. 19 ukazuje, že PLFA spadající do skupiny 1 (i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, 16:1w9, 16:1w7, 16:1w5,

16:0, 10Me-16:0, cy17:0, 17:0, 18:1 ω 7, cy19:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9) jsou negativně korelovány podél PC1 směrem ke vzorkům odebraným na začátku procesu. PLFA spadající do skupiny 2 (i16:0, i17:0, a17:0) pak pozitivně koreluje se vzorky odebranými 5. den. Nicméně podobně jako u termofilního režimu cyklu A není pozorována žádná korelace mezi konkrétními PLFA a vzorky odebranými na konci procesu.



Obrázek 20: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu C. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

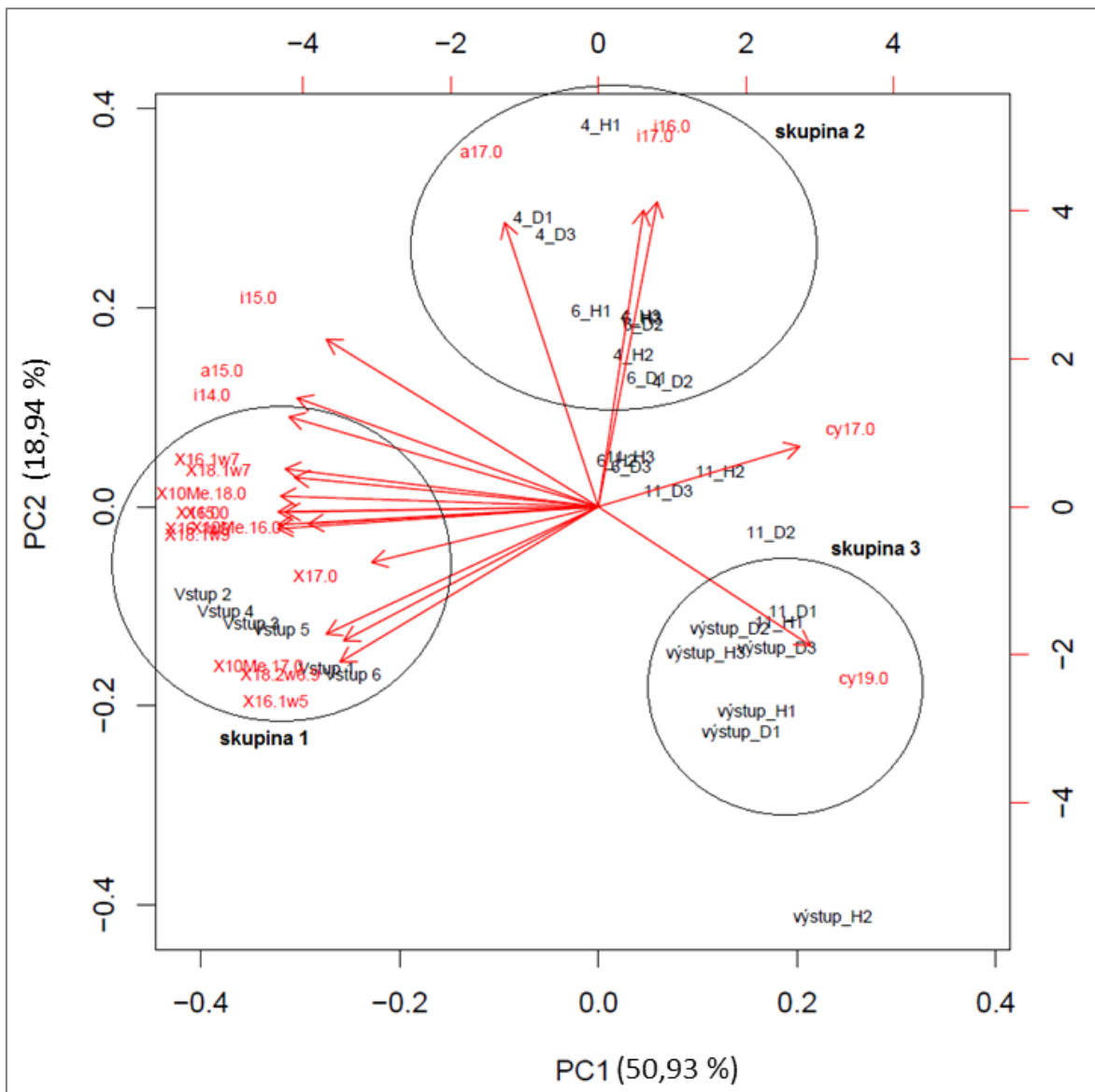
PCA profilů PLFA mezofilního režimu cyklu C vedla k jasné diskriminaci zejména podél PC1 (67,09 % celkové variability) mezi vzorky odebranými na začátku procesu a vzorky odebranými ve fázi vysokých teplot, fázi ochlazování a na konci procesu. Biplot (Obr. 20) pak ukazuje, že PLFA patřící do skupiny 1 (i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, 16:1ω9, 16:1ω7, 16:1ω5, 16:0, 18:1ω7, 18:2ω6,9, 18:1ω9) opět pozitivně koreluje se vzorky odebranými na začátku procesu, zatímco PLFA spadající do skupiny 2 (i16:0, i17:0, a17:0, 10Me-17:0, cy19:0, cy17:0) se podobně jako u mezofilního režimu cyklu A prolínají mezi fází vysokých teplot (5.den) a koncem procesu.



Obrázek 21: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA termofilního režimu biosušení cyklu C. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé

kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

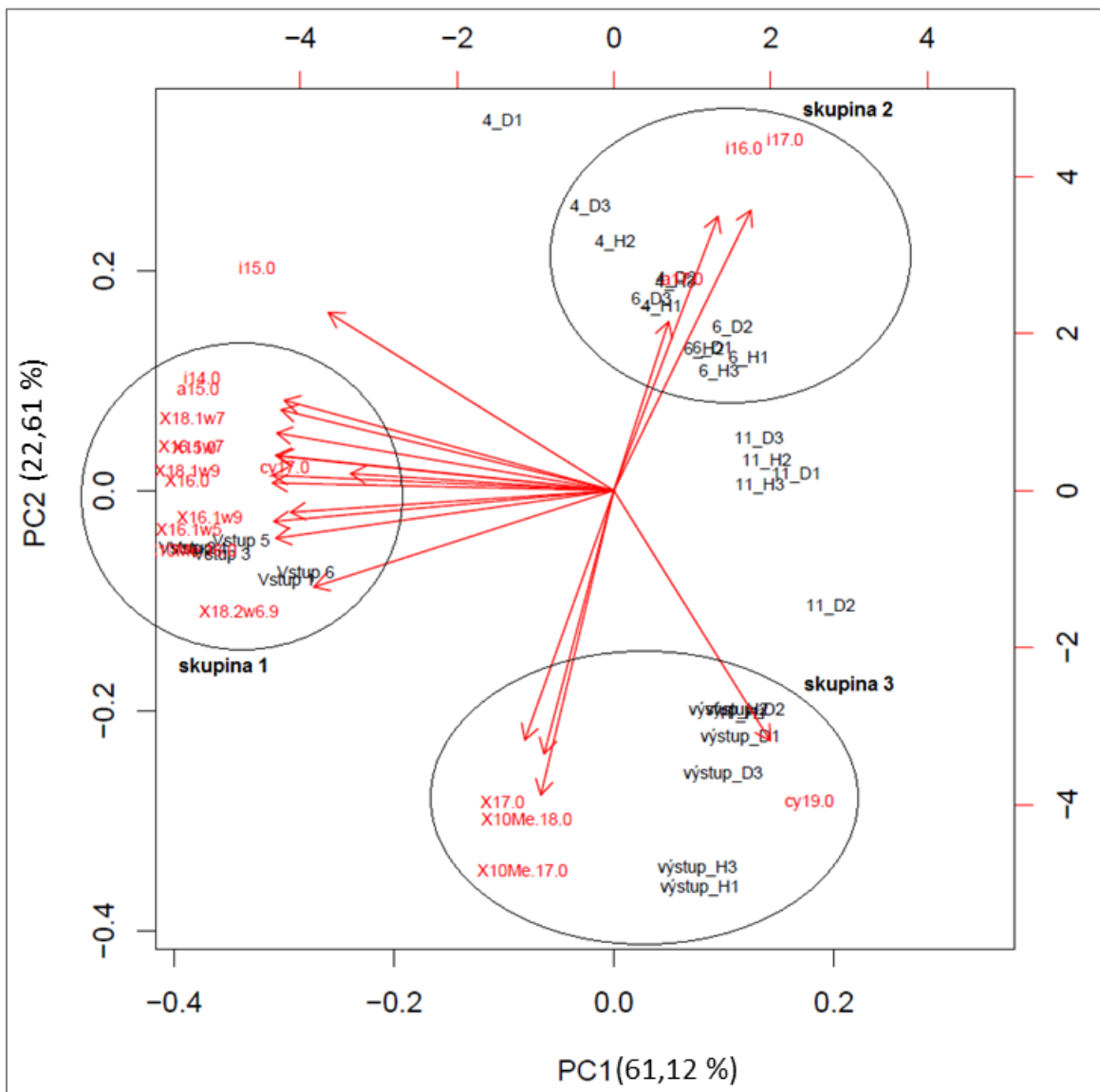
Podobný vývoj lze pozorovat také na základě výsledků PCA provedené na základě změn v profilech PLFA u termofilního režimu cyklu C, u kterého PC1 vysvětlila 68,37 % a PC2 18,67 % celkové variability. V biplotu (Obr. 21) jsou opět zřetelné tři skupiny PLFA, které korelují se vzorky odebranými v různých fázích biosušení. Se vzorky odebranými na začátku procesu korelují PLFA patřící do skupiny 1 (i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:0, 10Me-16:0, 17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9), s fází vysokých teplot (5. den) pak i16:0, i17:0, a17:0 (skupina 2). Se vzorky odebranými na konci procesu pozitivně koreluje pouze cy19:0 (skupina 3).



Obrázek 22: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA mezofilního režimu biosušení cyklu D. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

U cyklu D PCA opět seskupila vzorky podle jednotlivých fází v průběhu obou teplotních režimů biosušení. V rámci mezofilního režimu PC1 vysvětlila 66,73 % celkové variability v profilech PLFA a PC2 dalších 18,94 %, přičemž biplot (Obr. 22) ukazuje, že PLFA patřící do skupiny 1 (15:0, 16:1ω9, 16:1ω7, 16:1ω5, 16:0, 10Me-16:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1ω7, 10Me-18:0, cy19:0, 18:2ω6,9, 18:1ω9) opět pozitivně korelují se vzorky odebranými na začátku procesu, PLFA náležící do skupiny 2 (i16:0, i17:0, a17:0) pak se vzorky odebranými

4. a 6. den procesu. Nicméně pozitivní korelace se vzorky odebranými na konci procesu je pozorována opět pouze u cy19:0 (skupina 3).



Obrázek 23: Biplot znázorňující výsledky PCA provedené na základě změn v profilech PLFA termofilního režimu biosušení cyklu D. Černé číslice označují vzorky, přičemž číslice před podtržítkem odpovídá dni procesu, vstup a výstup označuje první a poslední den. Písmeno s číslicí za podtržítkem představuje označení vzorku. Jednotlivé PLFA jsou znázorněny červenými biplotovými vektory. Černé kruhy byly dokresleny za účelem označit PLFA, která souvisejí s určitou fází procesu, PLFA mimo skupiny se prolínají mezi jednotlivými fázemi procesu.

V rámci termofilního režimu biosušení cyklu D PC1 vysvětlila 61,12 % a PC2 22,61 % celkové variability. Z výsledků shrnutých pomocí biplotu (Obr. 23) je patrné, že PLFA patřící do skupiny 1 (i14:0, a15:0, 15:0, 16:1ω9, 16:1ω7, 16:1ω5, 16:0, 10Me-16:0, cy17:0, 18:1ω7, 18:2ω6,9, 18:1ω9) jsou negativně korelovány podél PC1 směrem ke vzorkům

odebraným na začátku procesu. PLFA spadající do skupiny 2 (i16:0, i17:0, a17:0) jsou pak pozitivně korelovány podél PC2 směrem ke vzorkům odebraným ve fázi vyšších teplot (4.-6. den), zatímco PLFA patřící do skupiny 3 (17:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0, cy19:0) jsou negativně korelovány podél PC2 směrem ke vzorkům odebraným na konci procesu.

Na základě těchto výsledků je patrné, že na začátku obou teplotních režimů biosušení cyklů A (Obr. 16, 17), B (Obr. 18, 19), C (Obr. 20, 21) a D (Obr. 22, 23) byly v substrátu zastoupeny jak G⁻ bakterie (převážně mononenasyčené PLFA), G⁺ bakterie (terminálně rozvětvené PLFA), aktinobakterie (methyl-substituované PLFA) a houby (18:2 ω 6,9). Nicméně jak proces postupoval skrz fázi maximálních teplot, došlo zřejmě k navýšení terminálně rozvětvených PLFA. Tato skutečnost poukazuje na rozvoj G⁺ bakterií během této fáze, což je v souladu s výsledky uvedenými v kap. 5.1.4. Posun od mononenasyčených PLFA na začátku procesu po terminálně rozvětvené PLFA v termofilní fázi je také obvykle pozorovaný u kompostování (Amir a kol., 2010; Herrmann a Shann, 1997; Klamer a Bååth, 1998; Steel a kol., 2013; Steger a kol., 2007a). Cahyani a kol. (2002) zaznamenali, že v termofilní fázi měly z terminálně rozvětvených PLFA největší zastoupení i16:0, i17:0, a17:0 (18,8 %, 10,6 %, 7,1 %). Právě iso- a anteiso- rozvětvené PLFA jsou spojovány s výskytem rodu *Bacillus*, který je běžně pozorován v termofilních fázích u kompostování (Beffa a kol., 1996; Strom, 1985a, 1985b), ale také u biosušení (Cai a kol., 2018a, 2017; Hao a kol., 2018; Liu a kol., 2018a; Zhang a kol., 2015).

Pozitivní korelace methyl-substituovaných PLFA se vzorky odebranými na konci mezofilního režimu cyklů A (Obr. 16), B (Obr. 18), C (Obr. 20) a termofilního režimu cyklu D (Obr. 23) poukazuje na rozvoj aktinobakterií ke konci procesu, což souhlasí s výsledky uvedenými v kap. 5.1.3. Zastoupení různých methyl-substituovaných PLFA na začátku a na konci procesu poukazuje na jejich sukcesi v průběhu biosušení (Cahyani a kol., 2002). Dominance methyl-substituovaných PLFA byla často pozorována ke konci kompostovacích procesů (Bolta a kol., 2003; Boulter a kol., 2002; Xu a kol., 2010; Zhao a kol., 2018), přičemž Steger a kol. (2003) uvádějí, že tyto PLFA mohou být považovány za dobré ukazatele zralosti kompostu na základě změn ve složení druhů a jejich zvýšeného podílu v mikrobiálních společenstev během pozdějších fází kompostování. Tato skutečnost tak naznačuje, že proces biosušení vede k částečné stabilizaci substrátu (Tambone a kol., 2011). Přítomnost i17:0 na konci mezofilního režimu biosušení cyklu B (Obr. 18) naznačuje, že mírné změny teplot umožnily setrvat některým G⁺ bakteriím až do konce procesu (Steger

a kol., 2003), což mohlo být podpořeno i tím, že substrát mohl obsahovat ještě dostatek živin (Elouaqoudi a kol., 2015) (viz kap. 5.1.4.).

U mezofilního režimu cyklu A (obr. 16) a u obou teplotních režimů cyklů C (Obr. 20, 21) a D (Obr. 22, 23) lze pozorovat pozitivní korelaci mezi cyklopropylovými nasycenými PLFA a vzorky odebranými na konci procesu. Nárůst cyklopropylových nasycených PLFA byla zaznamenána některými autory ke konci kompostování (Amir a kol., 2010; Kato a kol., 2005). Zvýšená přeměna mononenasycených PLFA (16:1 ω 7c a 18:1 ω 7c) na cy17:0 a cy19:0 gram-negativními bakteriemi bývá pozorována při působení stresových podmínek jako je vysoká teplota, snížené pH, nízká dostupnost živin, nedostatek kyslíku apod. (Amir a kol., 2008; Kaur a kol., 2005). S tím souhlasí i Herrmann a Shann (1997), kteří uvádějí, že cy17:0 a cy19:0 prošly konzistentním nárůstem v době zrání kompostu, přičemž naznačili, že vysoké úrovně těchto PLFA mohly být spojeny se snížením metabolické aktivity, protože snadno odbouratelná frakce kompostu byla vyčerpána, a proto přítomnost těchto PLFA může představovat prostředek pro stanovení stáří a stability kompostovaného materiálu. Přestože tato tvrzení mají svá omezení (viz kap. 3.2.1.1.) (Frostegård a kol., 2011), vzhledem ke skutečnosti, že při termofilním režimu cyklu C (Obr. 21) a mezofilním režimu cyklu D (Obr. 22) koreluje se vzorky odebranými na konci procesu pouze cy19:0, lze předpokládat, že došlo k limitaci dostupnými živinami, či k působení jiných stresových faktorů jako je například nízký obsah vlhkosti (Adani a kol., 2002; Gajalakshmi a Abbasi, 2008).

Oproti tomu u termofilních režimů cyklů A (Obr. 17) a B (Obr. 19) nebyla pozorována žádná korelace mezi vzorky odebranými na konci procesu a konkrétními PLFA. To může být tím, že podmínky na konci procesu jsou velmi selektivní, a tak přežívá pouze malá část mikroflóry (Elouaqoudi a kol., 2015).

Zajímavé také je, že u mezofilních režimů cyklů A (Obr. 16) a C (Obr. 20) došlo k oddělení pouze 2 skupin, přičemž PLFA spadající do skupiny 2 se prolínaly mezi vzorky vyšších teplot a vzorky odebranými na konci procesu. Podobných výsledků pomocí PCA dosáhli Steger a kol. (2003), kteří zaznamenali na grafu scórů 2 skupiny PLFA. První skupina zahrnovala hlavně nasycené a mononenasycené PLFA s přímými řetězci a odpovídala vzorkům odebraným na začátku kompostování, zatímco druhá skupina zahrnovala terminálně rozvětvené PLFA, methyl-substituované PLFA a cyklopropylové PLFA a korelovala se vzorky odebranými ve středních a konečných fázích kompostování. Přičemž maximální zaznamenaná teplota v průběhu procesu byla 55 °C. Prolnutí PLFA typických

většinou pro termofilní fáze a PLFA objevujících se obvykle v konečných fázích procesu by tak u mezofilních režimů cyklů A a C mohlo být způsobeno mírnými teplotami panujícími v průběhu těchto režimů (Tab. 3), v důsledku kterých nebyly změny teplot tak výrazné, aby došlo k významnějšímu omezení jednotlivých mikrobiálních skupin (Antizar-Ladislao a kol., 2007; Gajalakshmi a Abbasi, 2008; Nakasaki a kol., 1985; Steger a kol., 2007b).

6. Závěr

V této diplomové práci byly sledovány 4 experimentální cykly biosušení A, B, C a D, přičemž cykly A, B a C, D se lišily čistírenským kalem odebíraným ze dvou ČOV. Každý cyklus probíhal ve dvou reaktorech, ve kterých díky rozdílnému provzdušňování byl sledován mezofilní a termofilní režim biosušení. Cílem diplomové práce bylo využití analýzy PLFA pro stanovení mikrobiálních skupin v průběhu biosušení čistírenských kalů a jejich popis ve vztahu k teplotnímu režimu.

Z výsledků je patrné, že celková koncentrace PLFA odpovídající celkové mikrobiální biomase vykazovala klesající trend v průběhu obou teplotních režimů cyklů B, C, D, čímž byla potvrzena 1. hypotéza, která předpokládala, že celková mikrobiální biomasa bude klesat v průběhu biosušení. Oproti tomu u obou teplotních režimů cyklu A byl pozorován nárůst mikrobiální biomasy ke konci procesu. Druhá hypotéza, která předpokládala, že výsledná mikrobiální biomasa bude vyšší na konci mezofilního režimu biosušení, byla potvrzena pouze u cyklů B, C a D. U cyklu A nebyl zaznamenán u výsledných celkových koncentrací PLFA statisticky významný rozdíl mezi teplotními režimy.

Vývoj poměru H/B ukázal, že část 3. hypotézy, která předpokládala, že houby se budou oproti bakteriím více uplatňovat s postupem biosušení, byla potvrzena u obou teplotních režimů cyklů A, B a termofilního režimu cyklu C. Oproti tomu v průběhu mezofilního režimu cyklu C byl zaznamenán statisticky významný pokles ($p < 0,05$) hodnot poměru H/B. Při cyklu D se hodnoty H/B významně neměnily v průběhu celého mezofilního režimu, zatímco při termofilním režimu došlo k nárůstu mezi 6. a 15. dnem, nicméně mezi hodnotami na začátku a konci procesu nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Kromě toho statisticky významně vyšších ($p < 0,05$) hodnot poměr H/B dosáhl na konci termofilních režimů cyklů A, B a C.

Výsledky vývoje koncentrací PLFA charakteristických pro aktinobakterie ukázaly, že druhá část 3. hypotézy, která předpokládala, že ke konci biosušení nebude pozorován nárůst biomasy aktinobakterií, byla potvrzena pouze u termofilních režimů cyklů A, B a mezofilního režimu cyklu D. Oproti tomu při mezofilních režimech došlo u cyklu A k nárůstu koncentrací PLFA po 12. dni, u cyklu B po 5. dni a u cyklu C po 9. dni. Při termofilních režimech cyklů C a D byl pozorován nejprve pokles koncentrací PLFA, po kterém však došlo k opětovnému nárůstu po 9. dni a 11. dni. Z výsledků je také patrné, že

aktinobakterie upřednostňovaly podmínky panující v rámci mezofilních režimů cyklů A, B a C, kdy hodnoty poměru aktinobakterie/mikrob.biomasa dosahovaly na konci procesu statisticky významně vyšších ($p < 0,05$) hodnot v reaktoru pracujícím při mezofilních podmínkách. U cyklu D bylo dosaženo opačných výsledků.

Poměr G+/G- dosáhl maximálních hodnot po 4 (cyklus A, D) a 5 (cyklus B, C) dnech biosušení u obou teplotních režimů, přičemž u cyklu B, C, D dosáhl statisticky významně vyšších ($p < 0,05$) hodnot při termofilním režimu. Tyto výsledky tak potvrzují část 4. hypotézy, která předpokládala, že G+ bakterie se oproti G- bakteriím budou více uplatňovat při termofilním režimu biosušení. Oproti tomu část této hypotézy nebyla potvrzena u cyklu A, kde hodnoty poměru byly ve 4. dni procesu statisticky významně vyšší ($p < 0,05$) při mezofilním režimu. Jak se předpokládalo v druhé části 4. hypotézy, v rámci biosušení nebyla pozorována rekolonizace substrátu G- bakteriemi, neboť byl u obou teplotních režimů cyklů A, B, C, D pozorován pokles koncentrací PLFA charakteristických pro G- bakterie.

Výsledky PCA shrnuté pomocí biplotů ukázaly korelaci mezi PLFA i16:0, i17:0, a17:0 a vzorky odebranými ve fázích vyšších teplot, což poukazuje na nárůst G+ bakterií během počáteční fáze zvyšování teploty. Naopak se vzorky odebranými na konci procesu nejčastěji korelovaly methyl-substituované PLFA a cyklopropylové PLFA, což poukazuje na přítomnost aktinobakterií a G- bakterií. Prolnutí vzorků odpovídající fázi vyšších teplot a konci procesu u mezofilních režimů cyklů A a C, se kterými korelují jak PLFA i16:0, i17:0, a17:0, tak methyl-substituované PLFA a cyklopropylové PLFA, poukazuje na malý vliv mírných teplot umožňující koexistenci obvykle termofilních G+ bakterií a obvykle mezofilních aktinobakterií a G- bakterií. Naopak nezaznamenaná korelace mezi vzorky odebranými na konci procesu a konkrétními PLFA u termofilních režimů cyklů A a B, či zaznamenaná korelace pouze s cy19:0 u termofilního režimu cyklu C a mezofilního režimu cyklu D poukazuje na velmi selektivní podmínky na konci biosušení.

Analýza PLFA poskytla účinné hodnocení vývoje skupin mikroorganismů v průběhu biosušení čistírenských kalů. Její výsledky ukázaly, že vývoje skupin mikroorganismů při biosušení čistírenského kalu u cyklů A a B vykazovaly podobné trendy. Oproti tomu výsledky získané z biosušení čistírenského kalu u cyklů C a D byly různorodé. V důsledku těchto skutečností je patrné, že kromě efektu sušení se u biosušení, podobně jako

u kompostování, uplatňuje mnohem více faktorů, které ovlivňují činnost mikroorganismů a pro lepší porozumění výše uvedených rozdílů je potřeba další výzkum.

Literatura

- Aarathi, Leelapriya, T., Kalaichelvan, P. T., Dhilip, K. S., Sanker Narayan, P. V. (2004). Application of weak sinusoidal magnetic field on *Flavobacterium* species in the treatment of paper mill effluent. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 23(3), 215–227. <https://doi.org/10.1081/JBC-200044235>
- Abad, E., Martínez, K., Planas, C., Palacios, O., Caixach, J., Rivera, J. (2005). Priority organic pollutant assessment of sludges for agricultural purposes. *Chemosphere*, 61(9), 1358–1369. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.018>
- Adani, F., Baido, D., Calcaterra, E., Genevini, P. (2002). The influence of biomass temperature on biostabilization – biodrying of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, 83, 173–179.
- Al-Chalabi, A. S., Hawker, D. (1997). Response of vehicular lead to the presence of street dust in the atmospheric environment of major roads. *Science of the Total Environment*, 206(2–3), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00224-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00224-6)
- Al-Khashman, O. A. (2004). Heavy metal distribution in dust, street dust and soils from the work place in Karak Industrial Estate, Jordan. *Atmospheric Environment*, 38(39), 6803–6812. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2004.09.011>
- Albrecht, R., Périssol, C., Ruaudel, F., Petit, J. Le, Terrom, G. (2010). Functional changes in culturable microbial communities during a co-composting process: Carbon source utilization and co-metabolism. *Waste Management*, 30(5), 764–770. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2009.12.008>
- Amir, S., Abouelwafa, R., Meddich, A., Souabi, S., Winterton, P., Merlina, G., Revel, J.-C., Pinelli, E., Hafidi, M. (2010). PLFAs of the microbial communities in composting mixtures of agro-industry sludge with different proportions of household waste. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 64(7), 614–621. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.01.012>
- Amir, S., Merlina, G., Pinelli, E., Winterton, P., Revel, J.-C., Hafidi, M. (2008). Microbial community dynamics during composting of sewage sludge and straw studied through phospholipid and neutral lipid analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 159(2–3), 593–601. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.02.062>
- Andrés, P., Rosell-Melé, A., Colomer-Ventura, F., Deneff, K., Cotrufo, M. F., Riba, M., Alcañiz, J. M. (2019). Belowground biota responses to maize biochar addition to the soil of a Mediterranean vineyard. *Science of The Total Environment*, 660, 1522–1532. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.101>
- Antizar-Ladislao, B., Beck, A. J., Spanova, K., Lopez-Real, J., Russell, N. J. (2007). The influence of different temperature programmes on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *Journal of Hazardous Materials*, 144(1–2), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.031>
- Antizar-Ladislao, B., Spanova, K., Beck, A. J., Russell, N. J. (2008). Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in-vessel composting. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61(4), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.10.002>
- Bååth, E., Anderson, T.-H. (2003). Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), 955–963. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(03\)00154-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(03)00154-8)

- Balasooriya, W. K., Deneff, K., Huygens, D., Boeckx, P. (2014). Translocation and turnover of rhizodeposit carbon within soil microbial communities of an extensive grassland ecosystem. *Plant and Soil*, 376(1–2), 61–73. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1343-z>
- Beffa, T., Blanc, M., Aragno, M. (1996). Obligately and facultatively autotrophic, sulfur- and hydrogen-oxidizing thermophilic bacteria isolated from hot composts. *Archives of Microbiology*, 165(1), 34–40. <https://doi.org/10.1007/s002030050293>
- Bernal, M. P., Alburquerque, J. A., Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, 100(22), 5444–5453. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.027>
- Birgander, J., Rousk, J., Olsson, P. A. (2017). Warmer winters increase the rhizosphere carbon flow to mycorrhizal fungi more than to other microorganisms in a temperate grassland. *Global Change Biology*, 23(12), 5372–5382. <https://doi.org/10.1111/gcb.13803>
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1139/cjpm2014-0700>
- Bolta, S. V., Mihelic, R., Lobnik, F., Lestan, D. (2003). Microbial community structure during composting with and without mass inocula. *Compost Science and Utilization*, 11(1), 6–15. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2003.10702104>
- Boschker, H. T. S., Middelburg, J. J. (2002). Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 40(2), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(02\)00194-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(02)00194-0)
- Bossio, D. A., Scow, K. M., Gunapala, N., Graham, K. J. (1998). Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s002489900087>
- Boulter, J. I., Trevors, J. T., Boland, G. J. (2002). Microbial studies of compost: Bacterial identification, and their potential for turfgrass pathogen suppression. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), 661–671. <https://doi.org/10.1023/A:1016827929432>
- Breulmann, M., Masyutenko, N. P., Kogut, B. M., Schroll, R., Dörfler, U., Buscot, F., Schulz, E. (2014). Short-term bioavailability of carbon in soil organic matter fractions of different particle sizes and densities in grassland ecosystems. *Science of the Total Environment*, 497–498, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.080>
- Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465(1–2), 1–37. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01467-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01467-2)
- Buckeridge, K. M., Banerjee, S., Siciliano, S. D., Grogan, P. (2013). The seasonal pattern of soil microbial community structure in mesic low arctic tundra. *Soil Biology and Biochemistry*, 65, 338–347. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.06.012>
- Caforio, A., Driessen, A. J. M. (2017). Archaeal phospholipids: Structural properties and biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), 1325–1339. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.12.006>
- Cahyani, V. R., Watanabe, A., Matsuya, K., Asakawa, S., Kimura, M. (2002). Succession of microbiota estimated by phospholipid fatty acid analysis and changes in organic constituents during the composting process of rice straw. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(5), 735–743. <https://doi.org/10.1080/00380768.2002.10409264>

- Cai, L., Chen, T.-B., Gao, D., Yu, J. (2016). Bacterial communities and their association with the bio-drying of sewage sludge. *Water Research*, 90, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.026>
- Cai, L., Chen, T.-B., Gao, D., Zheng, G.-D., Liu, H.-T., Pan, T.-H. (2013). Influence of forced air volume on water evaporation during sewage sludge bio-drying. *Water Research*, 47(13), 4767–4773. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.048>
- Cai, L., Chen, T.-B., Zheng, S.-W., Liu, H.-T., Zheng, G.-D. (2018). Decomposition of lignocellulose and readily degradable carbohydrates during sewage sludge biodrying, insights of the potential role of microorganisms from a metagenomic analysis. *Chemosphere*, 201, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.177>
- Cai, L., Gao, D., Chen, T.-B., Liu, H.-T., Zheng, G.-D., Yang, Q.-W. (2012). Moisture variation associated with water input and evaporation during sewage sludge bio-drying. *Bioresource Technology*, 117, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.092>
- Cai, L., Gao, D., Hong, N. (2015). The Effects of Different Mechanical Turning Regimes on Heat Changes and Evaporation During Sewage Sludge Biodrying. *Drying Technology*, 33(10), 1151–1158. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1016574>
- Cai, L., Krafft, T., Chen, T.-B., Gao, D., Wang, L. (2016). Structure modification and extracellular polymeric substances conversion during sewage sludge biodrying process. *Bioresource Technology*, 216, 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.102>
- Cai, L., Krafft, T., Chen, T.-B., Lv, W.-Z., Gao, D., Zhang, H.-Y. (2017). New insights into biodrying mechanism associated with tryptophan and tyrosine degradations during sewage sludge biodrying. *Bioresource Technology*, 244, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.118>
- Cai, L., Zheng, S. W., Shen, Y. J., Zheng, G. Di, Liu, H. T., Wu, Z. Y. (2018). Complete genome sequence provides insights into the biodrying-related microbial function of *Bacillus thermoamylovorans* isolated from sewage sludge biodrying material. *Bioresource Technology*, 260(March), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.121>
- Canarini, A., Carrillo, Y., Mariotte, P., Ingram, L., Dijkstra, F. A. (2016). Soil microbial community resistance to drought and links to C stabilization in an Australian grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.024>
- Card, S. M., Quideau, S. A. (2010). Microbial community structure in restored riparian soils of the Canadian prairie pothole region. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(9), 1463–1471. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.05.010>
- Carpenter-Boggs, L., Kennedy, A. C., Reganold, J. P. (1998). Use of Phospholipid Fatty Acids and Carbon Source Utilization Patterns To Track Microbial Community Succession in Developing Compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4062–4064.
- Castro-Gómez, P., Garcia-Serrano, A., Visioli, F., Fontecha, J. (2015). Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids to human health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 101, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.07.004>
- Cavigelli, M. A., Robertson, G. P., Klug, M. J. (1995). Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 170(1), 99–113. <https://doi.org/10.1007/BF02183058>
- Chen, G., Yue, P. L., Mujumdar, A. S. (2002). Sludge dewatering and drying. *Drying Technology*,

20(4–5), 883–916. <https://doi.org/10.1081/DRT-120003768>

- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., Booksh, K. (2003). Fluorescence Excitation-Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 37(24), 5701–5710. <https://doi.org/10.1021/es034354c>
- Chen, Y. H., Chai, L. Y., Zhu, Y. H., Yang, Z. H., Zheng, Y., Zhang, H. (2012). Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 900–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05275.x>
- Chodak, M., Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., Niklińska, M. (2013). Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology*, 64, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.11.004>
- Chowdhury, T. R., Dick, R. P. (2012). Standardizing methylation method during phospholipid fatty acid analysis to profile soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 88(2), 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.12.008>
- Collick, A. S., Inglis, S., Wright, P., Steenhuis, T. S., Bowman, D. D. (2007). Inactivation of in a Biodrying Compost System. *Journal of Environment Quality*, 36, 1528–1533. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0523>
- Colomer-Mendoza, F. J., Herrera-Prats, L., Robles-Martínez, F., Gallardo-Izquierdo, A., Piña-Guzmán, A. B. (2013). Effect of airflow on biodrying of gardening wastes in reactors. *Journal of Environmental Sciences*, 25(5), 865–872. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60123-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60123-5)
- Contarini, G., Povolò, M. (2013). Phospholipids in milk fat: Composition, biological and technological significance, and analytical strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 2808–2831. <https://doi.org/10.3390/ijms14022808>
- Covino, S., Fabianová, T., Křesinová, Z., Čvančarová, M., Burianová, E., Filipová, A., Voříšková, J., Baldrian, P., Cajthaml, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and microbial community shifts during co-composting of creosote-treated wood. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.08.023>
- Cozzolino, V., Di Meo, V., Monda, H., Spaccini, R., Piccolo, A. (2016). The molecular characteristics of compost affect plant growth, arbuscular mycorrhizal fungi, and soil microbial community composition. *Biology and Fertility of Soils*, 52(1), 15–29. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-1046-8>
- Cummings, D. E., Caccavo Jr., F., Spring, S., Rosenzweig, R. F. (1999). *Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments. *Archives of Microbiology*, 171(3), 183–188.
- DeGroot, S. H., Claassen, V. P., Scow, K. M. (2005). Microbial community composition on native and drastically disturbed serpentine soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1427–1435. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.12.013>
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., Trevors, J. T. (2003). *Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes*. *Journal of Microbiological Methods* (Vol. 52). [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00155-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0)
- Díaz-Cruz, M. S., García-Galán, M. J., Guerra, P., Jelic, A., Postigo, C., Eljarrat, E., Farré, M., López de Alda, M. J., Petrovic, M., Barceló, D. (2009). Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1263–1275.

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.09.003>

- Dominczyk, A., Krzystek, L., Ledakowicz, S. (2014). Biodrying of Organic Municipal Wastes and Residues from the Pulp and Paper Industry. *Drying Technology*, 32(11), 1297–1303. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.901349>
- Drenovsky, R. E., Elliott, G. N., Graham, K. J., Scow, K. M. (2004). Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11), 1793–1800. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.05.002>
- Eichorst, S. A., Varanasi, P., Stavila, V., Zemla, M., Auer, M., Singh, S., Simmons, B. A., Singer, S. W. (2013). Community dynamics of cellulose-adapted thermophilic bacterial consortia. *Environmental Microbiology*, 15(9), 2573–2587. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12159>
- Elouaqoudi, F. Z., El Fels, L., Amir, S., Merlina, G., Meddich, A., Lemee, L., Ambles, A., Hafidi, M. (2015). Lipid signature of the microbial community structure during composting of date palm waste alone or mixed with couch grass clippings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 97, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.016>
- Ezzariai, A., Hafidi, M., Khadra, A., Aemig, Q., El Fels, L., Barret, M., Merlina, G., Patureau, D., Pinelli, E. (2018). Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: Global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 465–481. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.092>
- Feng, C., Zeng, G., Huang, D., Hu, S., Zhao, M., Lai, C., Huang, C., Wei, Z., Li, N. (2011). Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process Biochemistry*, 46(7), 1515–1520. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.038>
- Fichtner, A., von Oheimb, G., Härdtle, W., Wilken, C., Gutknecht, J. L. M. (2014). Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.015>
- Frei, K. M., Cameron, D., Jasmin, S., Stuart, P. R. (2006). Novel sludge drying process for cost-effective on-site sludge management. *Pulp and Paper Canada*, 107(4), 47–53.
- Frei, K. M., Cameron, D., Stuart, P. R. (2004). Novel drying process using forced aeration through a porous biomass matrix. *Drying Technology*, 22(5), 1191–1215. <https://doi.org/10.1081/DRT-120038587>
- Frostegård, A., Bååth, E. (1996). The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils*, 22(1–2), 59–65. <https://doi.org/10.1007/s003740050076>
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E. (1991). Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods*, 14(3), 151–163. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90018-L](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90018-L)
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E. (1993). Phospholipid Fatty Acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3605–3617. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://aem.asm.org/content/59/11/3605.short>

- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E. (2011). Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(8), 1621–1625. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.021>
- Gabriel, J. (2010). Development of soil microbiology methods: From respirometry to molecular approaches. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0866-7>
- Gajalakshmi, S., Abbasi, S. A. (2008). Solid waste management by composting: State of the art. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(5), 311–400. <https://doi.org/10.1080/10643380701413633>
- Garcia-Mina, J. M. (2006). Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost. *Organic Geochemistry*, 37(12), 1960–1972. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2006.07.027>
- García-Orenes, F., Caravaca, F., Morugán-Coronado, A., Roldán, A. (2015). Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem. *Agricultural Water Management*, 149, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2014.10.030>
- Garg, A., Smith, R., Hill, D., Simms, N., Pollard, S. (2007). Wastes as co-fuels: The policy framework for solid recovered fuel (SRF) in Europe, with UK implications. *Environmental Science and Technology*, 41(14), 4868–4874. <https://doi.org/10.1021/es062163e>
- Gea, T., Barrena, R., Artola, A., Sánchez, A. (2007). Optimal bulking agent particle size and usage for heat retention and disinfection in domestic wastewater sludge composting. *Waste Management*, 27(9), 1108–1116. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.07.005>
- Green, C. T., Scow, K. M. (2000). Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal*, 8(1), 126–141.
- Guckert, J. B., Hood, M. A., White, D. C. (1986). Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 794–801.
- Guo, H., Zhao, X., Rosskopf, E. N., Di Gioia, F., Hong, J. C., McNear Jr., D. H. (2018). Impacts of anaerobic soil disinfestation and chemical fumigation on soil microbial communities in field tomato production system. *Applied Soil Ecology*, 126, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.018>
- Hahn, A. S., Quideau, S. A. (2013). Long-term effects of organic amendments on the recovery of plant and soil microbial communities following disturbance in the Canadian boreal forest. *Plant and Soil*, 363(1–2), 331–344. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1306-4>
- Hamidian, A., Sarshar, Z., Stuart, P. R. (2017). Technoeconomic analysis of continuous biodrying process in conjunction with gasification process at pulp and paper mills. *Drying Technology*, 35(3), 300–311. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1164182>
- Hannam, K. D., Quideau, S. A., Kishchuk, B. E. (2006). Forest floor microbial communities in relation to stand composition and timber harvesting in northern Alberta. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2565–2575. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.03.015>
- Hao, Z., Yang, B., Jahng, D. (2018). Spent coffee ground as a new bulking agent for accelerated biodrying of dewatered sludge. *Water Research*, 138, 250–263. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.049>

- He, X.-S., Xi, B.-D., Wei, Z.-M., Jiang, Y.-H., Geng, C.-M., Yang, Y., Yuan, Y., Liu, H.-L. (2011). Physicochemical and spectroscopic characteristics of dissolved organic matter extracted from municipal solid waste (MSW) and their influence on the landfill biological stability. *Bioresource Technology*, 102(3), 2322–2327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.085>
- Heipieper, H. J., Meulenbeld, G., Van Oirschot, Q., De Bont, J. A. M. (1996). Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2773–2777.
- Herrmann, R. F. F., Shann, J. F. F. (1997). Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microbial Ecology*, 33(1), 78–85. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Hiraishi, A., Yamanaka, Y., Narihiro, T. (2000). Seasonal microbial community dynamics in a flowerpot-using personal composting system for disposal of household biowaste. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 46(3), 133–146. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.133>
- Högberg, M. N., Högberg, P., Myrold, D. D. (2007). Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 150(4), 590–601. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0562-5>
- Huang, D.-L., Zeng, G.-M., Feng, C.-L., Hu, S., Lai, C., Zhao, M.-H., Su, F.-F., Tang, L., Liu, H.-L. (2010). Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. *Bioresource Technology*, 101(11), 4062–4067. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.145>
- Huang, J., Yang, Z.-H., Zeng, G.-M., Wang, H.-L., Yan, J.-W., Xu, H.-Y., Gou, C.-L. (2015). A novel approach for improving the drying behavior of sludge by the appropriate foaming pretreatment. *Water Research*, 68, 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.036>
- Huiliñir, C., Villegas, M. (2015). Simultaneous effect of initial moisture content and airflow rate on biodrying of sewage sludge. *Water Research*, 82, 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.046>
- Jang, H. M., Cho, H. U., Park, S. K., Ha, J. H., Park, J. M. (2014). Influence of thermophilic aerobic digestion as a sludge pre-treatment and solids retention time of mesophilic anaerobic digestion on the methane production, sludge digestion and microbial communities in a sequential digestion process. *Water Research*, 48(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.041>
- Janzen, R. A., Raverkar, K. P., Rutherford, P. M., McGill, W. B. (1994). Decreasing amounts of extractable phospholipid-linked fatty acids in a soil during decline in numbers of pseudomonads. *Canadian Journal of Soil Science*, 74(3), 277–284.
- Jiang, J., Huang, H., Huang, Y., Liu, X., Liu, D. (2018). Relationship between maturity and microbial communities during pig manure composting by phospholipid fatty acid (PLFA) and correlation analysis. *Journal of Environmental Management*, 206, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.067>
- Johansen, A., Olsson, S. (2005). Using phospholipid fatty acid technique to study short-term effects of the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* DR54 on the microbial microbiota in barley rhizosphere. *Microbial Ecology*, 49(2), 272–281. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0135-2>
- Jurado, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., Vargas-García, M. C., López-González, J. A., Moreno, J. (2014). Exploiting composting biodiversity: Study of the persistent and biotechnologically relevant microorganisms from lignocellulose-based composting. *Bioresource Technology*, 162,

283–293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.145>

- Kacprzak, M., Neczaj, E., Fijałkowski, K., Grobelak, A., Grosser, A., Worwag, M., Rorat, A., Brattebo, H., Almås, Å., Singh, B. R. (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>
- Kalamdhad, A. S., Kazmi, A. A. (2009). Effects of turning frequency on compost stability and some chemical characteristics in a rotary drum composter. *Chemosphere*, 74(10), 1327–1334. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.058>
- Kapanen, A., Vikman, M., Rajasärkkä, J., Virta, M., Itävaara, M. (2013). Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. *Waste Management*, 33(6), 1451–1460. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.022>
- Karadag, D., Özkaya, B., Ölmez, E., Nissilä, M. E., Çakmakçı, M., Yildiz, Ş., Puhakka, J. A. (2013). Profiling of bacterial community in a full-scale aerobic composting plant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.10.011>
- Karlowsky, S., Augusti, A., Ingrisch, J., Hasibeder, R., Lange, M., Lavorel, S., Bahn, M., Gleixner, G. (2018). Land use in mountain grasslands alters drought response and recovery of carbon allocation and plant-microbial interactions. *Journal of Ecology*, 106(3), 1230–1243. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12910>
- Kato, K., Miura, N., Tabuchi, H., Nioh, I. (2005). Evaluation of maturity of poultry manure compost by phospholipid fatty acids analysis. *Biology and Fertility of Soils*, 41(6), 399–410. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0855-6>
- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., Kaushik, R. (2005). Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, 89(7), 1103–1112. <https://doi.org/10.2307/24110962>
- Kchaou, R., Baccar, R., Bouzid, J., Rejeb, S. (2018). Agricultural use of sewage sludge under sub-humid Mediterranean conditions : effect on growth, yield, and metal content of a forage plant. *Arabian Journal of Geosciences*, 11:746, 1–7.
- Klamer, M., Bååth, E. (1998). Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(1), 9–20. [https://doi.org/10.1016/s0168-6496\(98\)00051-8](https://doi.org/10.1016/s0168-6496(98)00051-8)
- Kunihiro, T., Veuger, B., Vasquez-Cardenas, D., Pozzato, L., Le Guitton, M., Moriya, K., Kuwae, M., Omori, K., Boschker, H. T. S., van Oevelen, D. (2014). Phospholipid-derived fatty acids and quinones as markers for bacterial biomass and community structure in marine sediments. *PLoS ONE*, 9(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096219>
- Kuo, T. M., Lanser, A. C., Kaneshiro, T., Hou, C. T. (1999). Conversion of oleic acid to 10-ketostearic acid by *Sphingobacterium* sp. strain O22. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(6), 709–712. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0163-7>
- Lagerlöf, J., Adolfsson, L., Börjesson, G., Ehlers, K., Vinyoles, G. P., Sundh, I. (2014). Land-use intensification and agroforestry in the Kenyan highland: Impacts on soil microbial community composition and functional capacity. *Applied Soil Ecology*, 82, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.015>
- Lamastra, L., Suci, N. A., Trevisan, M. (2018). Sewage sludge for sustainable agriculture: Contaminants' contents and potential use as fertilizer. *Chemical and Biological Technologies*

in Agriculture, 5:10, 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40538-018-0122-3>

- Langarica-Fuentes, A., Zafar, U., Heyworth, A., Brown, T., Fox, G., Robson, G. D. (2014). Fungal succession in an in-vessel composting system characterized using 454 pyrosequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 296–308. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12293>
- Lange, M., Habekost, M., Eisenhauer, N., Roscher, C., Bessler, H., Engels, C., Oelmann, Y., Scheu, S., Wilcke, W., Schulze, E.-D., Gleixner, G. (2014). Biotic and Abiotic Properties Mediating Plant Diversity Effects on Soil Microbial Communities in an Experimental Grassland. *PLoS ONE*, 9(5), e96182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096182>
- Leckie, S. E. (2005). Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*, 220(1–3), 88–106. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.007>
- Leckie, S. E., Prescott, C. E., Grayston, S. J., Neufeld, J. D., Mohn, W. W. (2004). Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.014>
- Li, X., Dai, X., Dai, L., Liu, Z. (2015). Two-dimensional FTIR correlation spectroscopy reveals chemical changes in dissolved organic matter during the biodrying process of raw sludge and anaerobically digested sludge. *RSC Advances*, 5(100), 82087–82096. <https://doi.org/10.1039/c5ra13069g>
- Li, X., Dai, X., Yuan, S., Li, N., Liu, Z., Jin, J. (2015). Thermal analysis and 454 pyrosequencing to evaluate the performance and mechanisms for deep stabilization and reduction of high-solid anaerobically digested sludge using biodrying process. *Bioresource Technology*, 175, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.078>
- Li, Y.-L., Peacock, A. D., White, D. C., Geyer, R., Zhang, C. L. (2007). Spatial patterns of bacterial signature biomarkers in marine sediments of the Gulf of Mexico. *Chemical Geology*, 238(3–4), 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2006.11.007>
- Liang, C., Das, K. C., McClendon, R. W. (2003). The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology*, 86(2), 131–137. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00153-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00153-0)
- Liu, H., Wang, Y., Liu, X., Gao, D., Zheng, G., Lei, M., Guo, G., Zheng, H., Kong, X. (2017a). Reduction in greenhouse gas emissions from sludge biodrying instead of heat drying combined with mono-incineration in China. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 67(2), 212–218. <https://doi.org/10.1080/10962247.2016.1227282>
- Liu, N., Zhou, J., Han, L., Huang, G. (2017b). Characterization of lignocellulosic compositions' degradation during chicken manure composting with added biochar by phospholipid fatty acid (PLFA) and correlation analysis. *Science of the Total Environment*, 586, 1003–1011. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.081>
- Liu, S., Song, F., Zhu, N., Yuan, H., Cheng, J. (2010). Chemical and microbial changes during autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 101(24), 9438–9444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.064>
- Liu, T., Cui, C., He, J., Tang, J. (2018a). Biodrying of storage sludge and analysis of the stability and agricultural properties of biodried products. *Desalination and Water Treatment*, 109, 104–111. <https://doi.org/10.1007/BF00115976>

- Liu, T., Cui, C., He, J., Tang, J. (2018b). Effect of different bulking agents on water variation and thermal balance and their respective contribution to bio-generated heat during long-term storage sludge biodrying process. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(18), 17602–17610. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1906-5>
- Liu, T., Cui, C., He, J., Tang, J. (2018c). Insights into the succession of the bacterial microbiota during biodrying of storage sludge mixed with beer lees: Studies on its biodiversity, structure, associations, and functionality. *Science of the Total Environment*, 644, 1088–1100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.298>
- Liu, T., He, J., Cui, C., Tang, J. (2019). Exploiting community structure, interactions and functional characteristics of fungi involved in the biodrying of storage sludge and beer lees. *Journal of Environmental Management*, 232, 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.089>
- Long, Y.-Y., Fang, Y., Zhang, C., Du, Y., Shentu, J., Shen, D.-S. (2015). Degradation of Polychlorinated Biphenyls by Sequential Anaerobic–Aerobic Composting. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226:44, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2333-6>
- López-González, J. A., del Carmen Vargas-García, M., López, M. J., Suárez-Estrella, F., del Mar Jurado, M., Moreno, J. (2015). Biodiversity and succession of mycobiota associated to agricultural lignocellulosic waste-based composting. *Bioresource Technology*, 187, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.124>
- Lordan, R., Tsoupras, A., Zabetakis, I. (2017). Phospholipids of animal and marine origin: Structure, function, and anti-inflammatory properties. *Molecules*, 22(11), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules22111964>
- Luo, W., Chen, T. B., Zheng, G. D., Gao, D., Zhang, Y. A., Gao, W. (2008). Effect of moisture adjustments on vertical temperature distribution during forced-aeration static-pile composting of sewage sludge. *Resources, Conservation and Recycling*, 52(4), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2007.08.004>
- Lupwayi, N. Z., Larney, F. J., Blackshaw, R. E., Kanashiro, D. A., Pearson, D. C. (2017). Phospholipid fatty acid biomarkers show positive soil microbial community responses to conservation soil management of irrigated crop rotations. *Soil and Tillage Research*, 168, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.12.003>
- Ma, J., Zhang, L., Li, A. (2016). Energy-efficient co-biodrying of dewatered sludge and food waste: Synergistic enhancement and variables investigation. *Waste Management*, 56, 411–422. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.06.007>
- Ma, J., Zhang, L., Mu, L., Zhu, K., Li, A. (2018). Thermally assisted bio-drying of food waste: Synergistic enhancement and energetic evaluation. *Waste Management*, 80, 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.09.023>
- Machnicka, A. (2014). Escherichia Coli in Sewage Sludge - Detection Method. *Chemistry-Didactics-Ecology-Metrology*, 19(1–2), 79–85. <https://doi.org/10.1515/cdem-2014-0007>
- Mara, K., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Papaleo, M. C., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M., Vanechoutte, M., Nemeč, A., van den Barselaar, M., Dijkshoorn, L., Fani, R. (2012). Molecular and phenotypic characterization of Acinetobacter strains able to degrade diesel fuel. *Research in Microbiology*, 163(3), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.12.002>
- Margesin, R., Hämmerle, M., Tschërko, D. (2007). Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: Effects of hydrocarbon concentration, fertilizers, and incubation time. *Microbial Ecology*, 53(2), 259–269.

<https://doi.org/10.1007/s00248-006-9136-7>

- Markowicz, A., Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z. (2016). Microbial community structure and diversity in long-term hydrocarbon and heavy metal contaminated soils. *International Journal of Environmental Research*, 10(2), 321–332. <https://doi.org/10.1080/02841850701697408>
- Martins, L. F., Antunes, L. P., Pascon, R. C., de Oliveira, J. C. F., Digiampietri, L. A., Barbosa, D., Peixoto, B. M., Vallim, M. A., Viana-Niero, C., Ostroski, E. H., Telles, G. P., Dias, Z., da Cruz, J. B., Juliano, L., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A. M., Setubal, J. C. (2013). Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. *PLoS ONE*, 8(4), e61928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>
- McIntosh, A. C. S., Macdonald, S. E., Quideau, S. A. (2013). Linkages between the forest floor microbial community and resource heterogeneity within mature lodgepole pine forests. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.028>
- McKinley, V. L., Peacock, A. D., White, D. C. (2005). Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(10), 1946–1958. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.033>
- Mechri, B., Manga, A. G. B., Tekaya, M., Attia, F., Cheheb, H., Meriem, F. B., Braham, M., Boujnah, D., Hammami, M. (2014). Changes in microbial communities and carbohydrate profiles induced by the mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) in rhizosphere of olive trees (*Olea europaea* L.). *Applied Soil Ecology*, 75, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.11.001>
- Merga, J. Y., Royden, A., Pandey, A. K., Williams, N. J. (2014). *Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent. *Letters in Applied Microbiology*, 59(1), 122–126. <https://doi.org/10.1111/lam.12256>
- Mrozik, A., Nowak, A., Piotrowska-Seget, Z. (2014). Microbial diversity in waters, sediments and microbial mats evaluated using fatty acid-based methods. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(5), 1487–1496. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0449-z>
- Müller, G. (2003). Sense or no-sense of the sum parameter for water soluble “adsorbable organic halogens” (AOX) and “absorbed organic halogens” (AOX-S18) for the assessment of organohalogen in sludges and sediments. *Chemosphere*, 52(2), 371–379. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00215-7](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00215-7)
- Nakasaki, K., Sasaki, M., Shoda, M., Kubota, H. (1985). Change in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 37–41.
- Nakasaki, K., Tran, L. T. H., Idemoto, Y., Abe, M., Rollon, A. P. (2009). Comparison of organic matter degradation and microbial community during thermophilic composting of two different types of anaerobic sludge. *Bioresource Technology*, 100(2), 676–682. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.046>
- Narihiro, T., Yamanaka, Y., Hiraishi, A. (2003). High Culturability of Bacteria in Commercially Available Personal Composters for Fed-batch Treatment of Household Biowaste. *Microbes and Environments*, 18(2), 94–99. <https://doi.org/10.1264/jsme2.18.94>
- Navaee-Ardeh, S., Bertrand, F., Stuart, P. R. (2006). Emerging biodrying technology for the drying of pulp and paper mixed sludges. *Drying Technology*, 24(7), 863–878. <https://doi.org/10.1080/07373930600734026>

- Navae-Ardeh, S., Bertrand, F., Stuart, P. R. (2010). Key variables analysis of a novel continuous biodrying process for drying mixed sludge. *Bioresource Technology*, 101(10), 3379–3387. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.037>
- Nichols, P., Stulp, B. K., Jones, J. G., White, D. C. (1986). Comparison of fatty acid content and DNA homology of the filamentous gliding bacteria *Vitreoscilla*, *Flexibacter*, *Filibacter*. *Archives of Microbiology*, 146(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00690149>
- Nielsen, P., Petersen, S. O. (2000). Ester-linked polar lipid fatty acid profiles of soil microbial communities: A comparison of extraction methods and evaluation of interference from humic acids. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8–9), 1241–1249. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00041-9)
- Nordin, K., Unell, M., Jansson, J. K. (2005). Novel 4-chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6538–6544. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6538-6544.2005>
- Olsson, P. A. (1999). Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 29(4), 303–310. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00021-5)
- Orwin, K. H., Dickie, I. A., Holdaway, R., Wood, J. R. (2018). A comparison of the ability of PLFA and 16S rRNA gene metabarcoding to resolve soil community change and predict ecosystem functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 117, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.036>
- Pamplona-Silva, M. T., Mazzeo, D. E. C., Bianchi, J., Marin-Morales, M. A. (2018). Estrogenic Compounds: Chemical Characteristics, Detection Methods, Biological and Environmental Effects. *Water, Air, and Soil Pollution*, 229, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3796-z>
- Papadopoulou, E. S., Karpouzas, D. G., Menkissoglu-Spiroudi, U. (2011). Extraction Parameters Significantly Influence the Quantity and the Profile of PLFAs Extracted from Soils. *Microbial Ecology*, 62(3), 704–714. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9863-2>
- Park, S., Song, H., Kim, M. (2018). Performance and Bacterial Communities for Bio-drying with Thermophili Bacteria of Sewage Sludge. *KSCE Journal of Civil Engineering*, 22(12), 4806–4813. <https://doi.org/10.1007/s12205-017-2298-7>
- Parker, J. H., Smith, G. A., Fredrickson, H. L., Vestal, J. R., White, D. C. (1982). Sensitive assay, based on hydroxy fatty acids from lipopolysaccharide lipid A, for gram-negative bacteria in sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(5), 1170–1177.
- Pathak, V. M., Singh, A. (2016). Screening and Characterization of Cellulose Degrading Bacterial Isolates of Waste disposal Site. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 898–907. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.097>
- Pennanen, T. (2001). Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH - A summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog (R) and H-3-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma*, 100(1–2), 91–126. [https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(00\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(00)00082-3)
- Petersen, S. O., Klug, M. J. (1994). Effects of sieving, storage, and incubation temperature on the phospholipid Fatty Acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(7), 2421–2430. [https://doi.org/0099-2240/94/\\$04.00](https://doi.org/0099-2240/94/$04.00)

- Petric, I., Šestan, A., Šestan, I. (2009). Influence of wheat straw addition on composting of poultry manure. *Process Safety and Environmental Protection*, 87(3), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2009.02.002>
- Pettersson, M., Bååth, E. (2003). The rate of change of a soil bacterial community after liming as a function of temperature. *Microbial Ecology*, 46(2), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-0001-7>
- Pietikäinen, J., Hiukka, R., Fritze, H. (2000). Does short-term heating of forest humus change its properties as a substrate for microbes? *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00164-9)
- Pietikäinen, J., Pettersson, M., Bååth, E. (2005). Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(1), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.10.002>
- Pilnáček, V., Innemanová, P., Šereš, M., Michalíková, K., Stránská, Š., Wimmerová, L., Cajthaml, T. (2019). Micropollutant biodegradation and the hygienization potential of biodrying as a pretreatment method prior to the application of sewage sludge in agriculture. *Ecological Engineering*, 127, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.11.025>
- Pinault, M., Guimaraes, C., Couthon, H., Thibonnet, J., Fontaine, D., Chantôme, A., Chevalier, S., Besson, P., Jaffrès, P.-A., Vandier, C. (2018). Synthesis of alkyl-glycerolipids standards for gas chromatography analysis: Application for chimera and shark liver oils. *Marine Drugs*, 16(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md16040101>
- Piotrowska-Seget, Z., Mroziak, A. (2003). Signature Lipid Biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(6), 669–675.
- Poulsen, T. G., Bester, K. (2010). Organic Micropollutant Degradation in Sewage Sludge during Composting under Thermophilic Conditions. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 44(13), 5086–5091.
- Prabhakaran, M., Couger, M. B., Jackson, C. A., Weirick, T., Fathepure, B. Z. (2015). Genome Sequences of the Lignin-Degrading Pseudomonas sp. Strain YS-1p and Rhizobium sp. Strain YS-1r Isolated from Decaying Wood. *Genome Announcements*, 3(2), e00019-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00019-15>. Copyright
- Puspasari, F., Radjasa, O. K., Noer, A. S., Nurachman, Z., Syah, Y. M., van der Maarel, M., Dijkhuizen, L., Janeček, Š., Natalia, D. (2013). Raw starch-degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: Isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), 108–120. <https://doi.org/10.1111/jam.12025>
- Quideau, S. A., McIntosh, A. C. S., Norris, C. E., Lloret, E., Swallow, M. J. B., Hannam, K. (2016). Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. *Journal of Visualized Experiments*, (114), 1–9. <https://doi.org/10.3791/54360>
- Ramsey, P. W., Rillig, M. C., Feris, K. P., Holben, W. E., Gannon, J. E. (2006). Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia*, 50(3), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2006.03.003>
- Rannekleiv, S. B., Bååth, E. (2003). Use of Phospholipid Fatty Acids To Detect Previous Self-Heating Events in Stored Peat. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 69(6), 3532–3539. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3532>

- Ruess, L., Chamberlain, P. M. (2010). The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(11), 1898–1910. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.020>
- Rybkina, D. O., Plotnikova, E. G., Dorofeeva, L. V., Mironenko, Y. L., Demakov, V. A. (2003). A new aerobic gram-positive bacterium with a unique ability to degrade ortho- and para-chlorinated biphenyls. *Microbiology*, 72(6), 672–677. <https://doi.org/10.1023/B:MICI.0000008367.24540.6c>
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J. (2003). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53(4), 349–410. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0,5&q=survey+of+bacteria+and+fungi+occurring+during+composting+process+for+mushroom+cultivation+based+on+initial+substrate+composition
- Said-Pullicino, D., Erriquens, F. G., Gigliotti, G. (2007). Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. *Bioresource Technology*, 98(9), 1822–1831. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.018>
- Schoug, Å., Fischer, J., Heipieper, H. J., Schnürer, J., Håkansson, S. (2008). Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 175–181. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0281-x>
- Shao, L.-M., Ma, Z.-H., Zhang, H., Zhang, D.-Q., He, P.-J. (2010). Bio-drying and size sorting of municipal solid waste with high water content for improving energy recovery. *Waste Management*, 30(7), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.01.011>
- Shao, L., Wang, T., Zhao, L., Wang, G., Lü, F., He, P. (2015). The Effect of Adding Straw on Natural Solar Sludge Drying. *Drying Technology*, 33(4), 414–419. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.970259>
- Shao, Z.-H., He, P.-J., Zhang, D.-Q., Shao, L.-M. (2009). Characterization of water-extractable organic matter during the biostabilization of municipal solid waste. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2–3), 1191–1197. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.035>
- Shi, H., Wang, X. C., Li, Q., Jiang, S. (2016). Degradation of typical antibiotics during human feces aerobic composting under different temperatures. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15076–15087. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6664-7>
- Shon, H. K., Tian, D., Kwon, D.-Y., Jin, C.-S., Lee, T.-J., Chung, W.-J. (2002). Degradation of fat, oil, and grease (FOGs) by lipase-producing bacterium *Pseudomonas* sp. strain D2D3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(4), 583–591.
- Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T., Baldrian, P. (2008). Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2068–2075. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.015>
- Sole-Mauri, F., Illa, J., Magrí, A., Prenafeta-Boldú, F. X., Flotats, X. (2007). An integrated biochemical and physical model for the composting process. *Bioresource Technology*, 98(17), 3278–3293. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.012>
- Song, X., Ma, J., Gao, J., Liu, Y., Hao, Y., Li, W., Hu, R., Li, A., Zhang, L. (2017). Optimization of

- bio-drying of kitchen waste: inoculation, initial moisture content and bulking agents. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 19(1), 496–504. <https://doi.org/10.1007/s10163-015-0450-3>
- Song, Y., Zheng, G., Huo, M., Zhao, B., Zhou, L. (2014). Extracellular polymeric substances and bound water drastically affect bioleached sludge dewaterability at low temperature. *Environmental Technology*, 35(20), 2538–2545. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.911755>
- Stanford, K., Hao, X., Xu, S., McAllister, T. A., Larney, F., Leonard, J. J. (2009). Effects of age of cattle, turning technology and compost environment on disappearance of bone from mortality compost. *Bioresource Technology*, 100(19), 4417–4422. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.061>
- Stasinakis, A. S. (2012). Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 121, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.074>
- Steel, H., Buchan, D., De Neve, S., Couvreur, M., Moens, T., Bert, W. (2013). Nematode and microbial communities in a rapidly changing compost environment: How nematode assemblages reflect composting phases. *European Journal of Soil Biology*, 56, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.01.003>
- Steger, K., Eklind, Y., Olsson, J., Sundh, I. (2005). Microbial community growth and utilization of carbon constituents during thermophilic composting at different oxygen levels. *Microbial Ecology*, 50(2), 163–171. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0139-y>
- Steger, K., Jarvis, Å., Smårs, S., Sundh, I. (2003). Comparison of signature lipid methods to determine microbial community structure in compost. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 371–382. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00187-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00187-8)
- Steger, K., Jarvis, Å., Vasara, T., Romantschuk, M., Sundh, I. (2007a). Effects of differing temperature management on development of Actinobacteria populations during composting. *Research in Microbiology*, 158(7), 617–624. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.05.006>
- Steger, K., Sjögren, Å. M., Jarvis, Å., Jansson, J. K., Sundh, I. (2007b). Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *Journal of Applied Microbiology*, 103(2), 487–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03271.x>
- Stella, T., Covino, S., Burianová, E., Filipová, A., Křesinová, Z., Voříšková, J., Větrovský, T., Baldrian, P., Cajthaml, T. (2015). Chemical and microbiological characterization of an aged PCB-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 533, 177–186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.019>
- Strom, P. F. (1985a). Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 899–905.
- Strom, P. F. (1985b). Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 906–913.
- Štursová, M., Šnajdr, J., Cajthaml, T., Bárta, J., Šantrůčková, H., Baldrian, P. (2014). When the forest dies: The response of forest soil fungi to a bark beetle-induced tree dieback. *ISME Journal*, 8(9), 1920–1931. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.37>
- Su, J.-Q., Wei, B., Ou-Yang, W.-Y., Huang, F.-Y., Zhao, Y., Xu, H.-J., Zhu, Y.-G. (2015). Antibiotic

- Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environmental Science and Technology*, 49(12), 7356–7363. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01012>
- Sugni, M., Calcaterra, E., Adani, F. (2005). Biostabilization-biodrying of municipal solid waste by inverting air-flow. *Bioresource Technology*, 96(12), 1331–1337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.016>
- Sumpter, J. P., Johnson, A. C. (2005). Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, 39(12), 4321–4332. <https://doi.org/10.1021/es048504a>
- Swallow, M., Quideau, S. A. (2013). Moisture effects on microbial communities in boreal forest floors are stand-dependent. *Applied Soil Ecology*, 63, 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.09.006>
- Swallow, M., Quideau, S. A., MacKenzie, M. D., Kishchuk, B. E. (2009). Microbial community structure and function: The effect of silvicultural burning and topographic variability in northern Alberta. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(4), 770–777. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.01.014>
- Tambone, F., Scaglia, B., Scotti, S., Adani, F. (2011). Effects of biodrying process on municipal solid waste properties. *Bioresource Technology*, 102(16), 7443–7450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.010>
- Tavi, N. M., Martikainen, P. J., Lokko, K., Kontro, M., Wild, B., Richter, A., Biasi, C. (2013). Linking microbial community structure and allocation of plant-derived carbon in an organic agricultural soil using ¹³CO₂ pulse-chase labelling combined with ¹³C-PLFA profiling. *Soil Biology and Biochemistry*, 58, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.013>
- Tom, A. P., Pawels, R., Haridas, A. (2016). Biodrying process: A sustainable technology for treatment of municipal solid waste with high moisture content. *Waste Management*, 49, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.01.004>
- Topp, E., Hanson, R. S. (1990). Degradation of pentachlorophenol by a Flavobacterium species grown in continuous culture under various nutrient limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 541–544.
- Trois, C., Coulon, F., de Combret, C. P., Martins, J. M. F., Oxarango, L. (2010). Effect of pine bark and compost on the biological denitrification process of non-hazardous landfill leachate: Focus on the microbiology. *Journal of Hazardous Materials*, 181(1–3), 1163–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.077>
- Usman, K., Khan, S., Ghulam, S., Khan, M. U., Khan, N., Khan, M. A., Khalil, S. K. (2012). Sewage Sludge: An Important Biological Resource for Sustainable Agriculture and Its Environmental Implications. *American Journal of Plant Sciences*, 3(12), 1708–1721. <https://doi.org/10.4236/ajps.2012.312209>
- Velis, C. A., Longhurst, P. J., Drew, G. H., Smith, R., Pollard, S. J. T. (2009). Biodrying for mechanical-biological treatment of wastes: A review of process science and engineering. *Bioresource Technology*, 100(11), 2747–2761. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.026>
- Velis, C., Wagland, S., Longhurst, P., Robson, B., Sinfield, K., Wise, S., Pollard, S. (2012). Solid recovered fuel: Influence of waste stream composition and processing on chlorine content and fuel quality. *Environmental Science and Technology*, 46(3), 1923–1931. <https://doi.org/10.1021/es2035653>

- Verlicchi, P., Zambello, E. (2015). Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil - A critical review. *Science of the Total Environment*, 538, 750–767. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.108>
- Vesilind, P. A. (1994). The role of water in sludge dewatering. *Water Environment Research*, 66(1), 4–11.
- Vestal, J. R., White, D. C. (1989). Lipid Analysis Microbial Ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities. *BioScience*, 39(8), 535–541. <https://doi.org/10.2307/1310976>
- Villegas, M., Huiliñir, C. (2014). Biodrying of sewage sludge: Kinetics of volatile solids degradation under different initial moisture contents and air-flow rates. *Bioresource Technology*, 174, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.136>
- Wang, C., Dong, D., Wang, H., Müller, K., Qin, Y., Wang, H., Wu, W. (2016). Metagenomic analysis of microbial consortia enriched from compost: New insights into the role of Actinobacteria in lignocellulose decomposition. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0440-2>
- Wang, K., Li, X., He, C., Chen, C.-L., Bai, J., Ren, N., Wang, J.-Y. (2014). Transformation of dissolved organic matters in swine, cow and chicken manures during composting. *Bioresource Technology*, 168, 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.129>
- Watzinger, A. (2015). Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 86, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.019>
- White, D. C., Davis, W. M., Nickels, J. S., King, J. D., Bobbie, R. J. (1979). Determination of the Sedimentary Microbial Biomass by Extractible Lipid Phosphate. *Oecologia*, 40(1), 51–62.
- Willers, C., van Rensburg, P. J. J., Claassens, S. (2015). Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities-a review of interpretations and recent applications. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5), 1207–1218. <https://doi.org/10.1111/jam.12902>
- Winkler, M. K. H., Bennenbroek, M. H., Horstink, F. H., van Loosdrecht, M. C. M., van de Pol, G.-J. (2013). The biodrying concept: An innovative technology creating energy from sewage sludge. *Bioresource Technology*, 147, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.138>
- Wu, Q., Lam, J. C. W., Kwok, K. Y., Tsui, M. M. P., Lam, P. K. S. (2017). Occurrence and fate of endogenous steroid hormones, alkylphenol ethoxylates, bisphenol A and phthalates in municipal sewage treatment systems. *Journal of Environmental Sciences*, 61, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.02.021>
- Wu, Y., Ding, N., Wang, G., Xu, J., Wu, J., Brookes, P. C. (2009). Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses. *Geoderma*, 150(1–2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.02.003>
- Wu, Z.-Y., Cai, L., Krafft, T., Gao, D., Wang, L. (2018). Biodrying performance and bacterial community structure under variable and constant aeration regimes during sewage sludge biodrying. *Drying Technology*, 36(1), 84–92. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1301951>
- Xiong, X., Yan-xia, L., Ming, Y., Feng-song, Z., Wei, L. (2010). Increase in complexation ability of humic acids with the addition of ligneous bulking agents during sewage sludge composting. *Bioresource Technology*, 101(24), 9650–9653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.098>

- Xu, S., McAllister, T. A., Leonard, J. J., Clark, O. G., Belosevic, M. (2010). Assessment of Microbial Communities In Decomposition of Specified Risk Material Using a Passively Aerated Laboratory-Scale Composter. *Compost Science and Utilization*, 18(4), 255–265. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2010.10736964>
- Yang, B., Hao, Z., Jahng, D. (2017). Advances in biodrying technologies for converting organic wastes into solid fuel. *Drying Technology*, 35(16), 1950–1969. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1322100>
- Yang, B., Jahng, D. (2015). Optimization of Food Waste Bioevaporation Process Using Response Surface Methodology. *Drying Technology*, 33(10), 1188–1198. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.943235>
- Yang, B., Zhang, L., Jahng, D. (2014). Importance of Initial Moisture Content and Bulking Agent for Biodrying Sewage Sludge. *Drying Technology*, 32(2), 135–144. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.795586>
- Yang, F., Li, G. X., Yang, Q. Y., Luo, W. H. (2013). Effect of bulking agents on maturity and gaseous emissions during kitchen waste composting. *Chemosphere*, 93(7), 1393–1399. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.002>
- Yuan, J., Zhang, D., Li, Y., Chadwick, D., Li, G., Li, Y., Du, L. (2017). Effects of adding bulking agents on biostabilization and drying of municipal solid waste. *Waste Management*, 62, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.02.027>
- Zawadzka, A., Krzystek, L., Stolarek, P., Ledakowicz, S. (2010). Biodrying of organic fraction of municipal solid wastes. *Drying Technology*, 28(10), 1220–1226. <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.483034>
- Zelles, L. (1999). Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 29(2), 111–129.
- Zelles, L., Bai, Q. Y., Beck, T., Beese, F. (1992). Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 317–323. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90191-Y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90191-Y)
- Zelles, L., Palojarvi, A., Kandeler, E., von Lütow, M., Winter, K., Bai, Q. Y. (1997). Changes in Soil Microbial Properties and Phospholipid Fatty Acid Fractions After Chloroform Fumigation. *Soil Biology & Biochemistry*, 29(9–10), 1325–1336.
- Zhang, D.-Q., He, P.-J., Jin, T.-F., Shao, L.-M. (2008). Bio-drying of municipal solid waste with high water content by aeration procedures regulation and inoculation. *Bioresource Technology*, 99(18), 8796–8802. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.046>
- Zhang, D.-Q., He, P.-J., Yu, L.-Z., Shao, L.-M. (2009). Effect of inoculation time on the bio-drying performance of combined hydrolytic-aerobic process. *Bioresource Technology*, 100(3), 1087–1093. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.059>
- Zhang, D.-Q., Zhang, H., Wu, C.-L., Shao, L.-M., He, P.-J. (2011). Evolution of heavy metals in municipal solid waste during bio-drying and implications of their subsequent transfer during combustion. *Waste Management*, 31(8), 1790–1796. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.04.006>
- Zhang, D., Luo, W., Yuan, J., Li, G. (2018a). Co-biodrying of sewage sludge and organic fraction of municipal solid waste: Role of mixing proportions. *Waste Management*, 77, 333–340.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.016>

- Zhang, H.-Y., Krafft, T., Gao, D., Zheng, G.-D., Cai, L. (2018b). Lignocellulose biodegradation in the biodrying process of sewage sludge and sawdust. *Drying Technology*, 36(3), 316–324. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1326502>
- Zhang, J., Cai, X., Qi, L., Shao, C., Lin, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Shen, P., Wei, Y. (2015). Effects of aeration strategy on the evolution of dissolved organic matter (DOM) and microbial community structure during sludge bio-drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7321–7331. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6640-z>
- Zhang, J., Gao, D., Chen, T.-B., Zheng, G.-D., Chen, J., Ma, C., Guo, S.-L., Du, W. (2010). Simulation of substrate degradation in composting of sewage sludge. *Waste Management*, 30(10), 1931–1938. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2010.04.004>
- Zhao, C., Wang, Y., Wang, Y., Wu, F., Zhang, J., Cui, R., Wang, L., Mu, H. (2018). Insights into the role of earthworms on the optimization of microbial community structure during vermicomposting of sewage sludge by PLFA analysis. *Waste Management*, 79, 700–708. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.041>
- Zhao, L., Gu, W.-M., He, P.-J., Shao, L.-M. (2010). Effect of air-flow rate and turning frequency on bio-drying of dewatered sludge. *Water Research*, 44(20), 6144–6152. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.002>
- Zhao, L., Gu, W.-M., He, P.-J., Shao, L.-M. (2011). Biodegradation potential of bulking agents used in sludge bio-drying and their contribution to bio-generated heat. *Water Research*, 45(6), 2322–2330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.014>
- Zhao, L., Gu, W., Shao, L., He, P. (2012). Sludge Bio-drying Process at Low Ambient Temperature: Effect of Bulking Agent Particle Size and Controlled Temperature. *Drying Technology*, 30(10), 1037–1044. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.665113>

Internetové zdroje:

ČSÚ – Český statistický úřad. Dostupné online na:
<https://www.czso.cz/documents/10180/61546960/2800211811.pdf/cc0a3963-0487-4f91-8313-63a4798ae783?version=1.0> (k 5.4.2019)

TZB-info – Internetový portál pro stavebnictví, technická zařízení budov a úspory energií. Dostupné online na: <https://vytapeni.tzb-info.cz/tabulky-a-vypocty/11-vyhrevnosti-paliv> (k 5.4.2019)

Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Reaktory pro biosušení (Obr. 24)

Příloha 2: Vývoj koncentrace sumy PLFA charakteristických pro G⁺ a G⁻ bakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů A (Obr. 25a), B (Obr. 25b) a C (Obr. 26c), D (Obr. 26d).

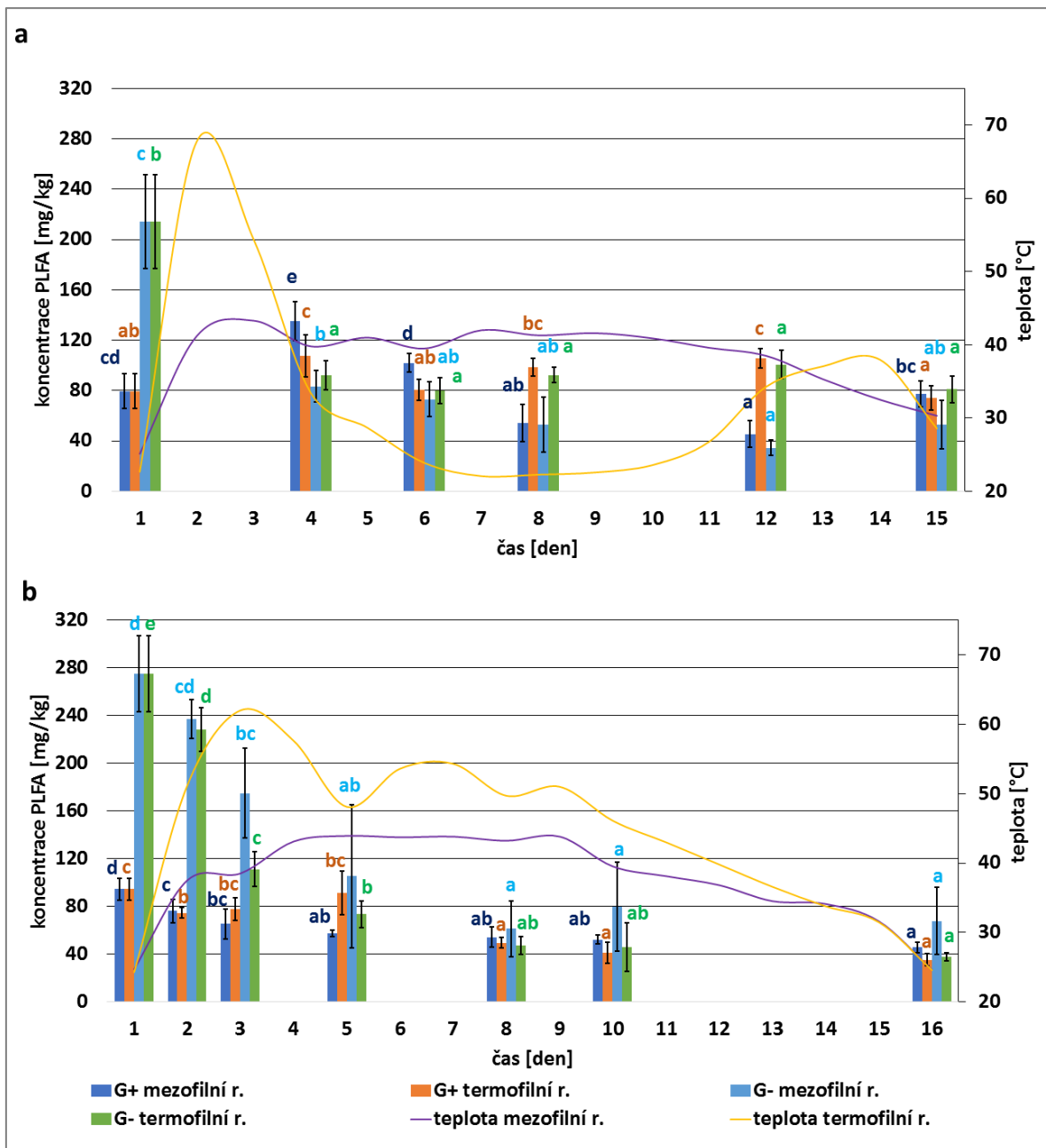
Příloha 3: Vývoj poměru aktinobakterie/mikrob. biomasa při cyklu A (Obr. 27a), B (Obr. 27b) a C (Obr. 28c), D (Obr. 28d)

Příloha 1: Reaktory pro biosušení (Obr. 21)

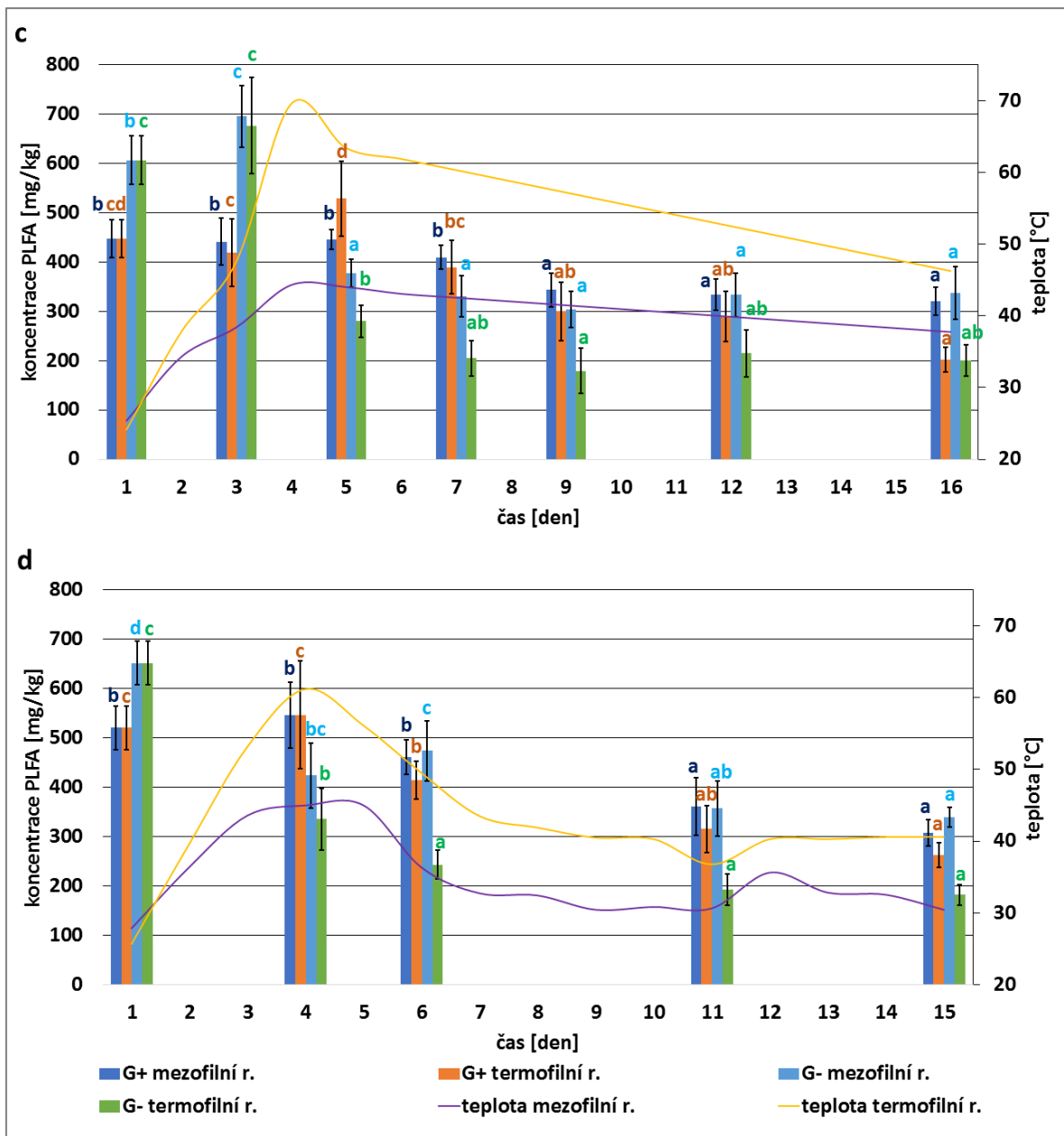


Obrázek 24: Pohled na reaktory umístěné v laboratoři společnosti DEKONTA a.s.

Příloha 2: Vývoj koncentrace sumy PLFA charakteristických pro G+ a G– bakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů A (Obr. 25a), B (Obr. 25b) a C (Obr. 26c), D (Obr. 26d).

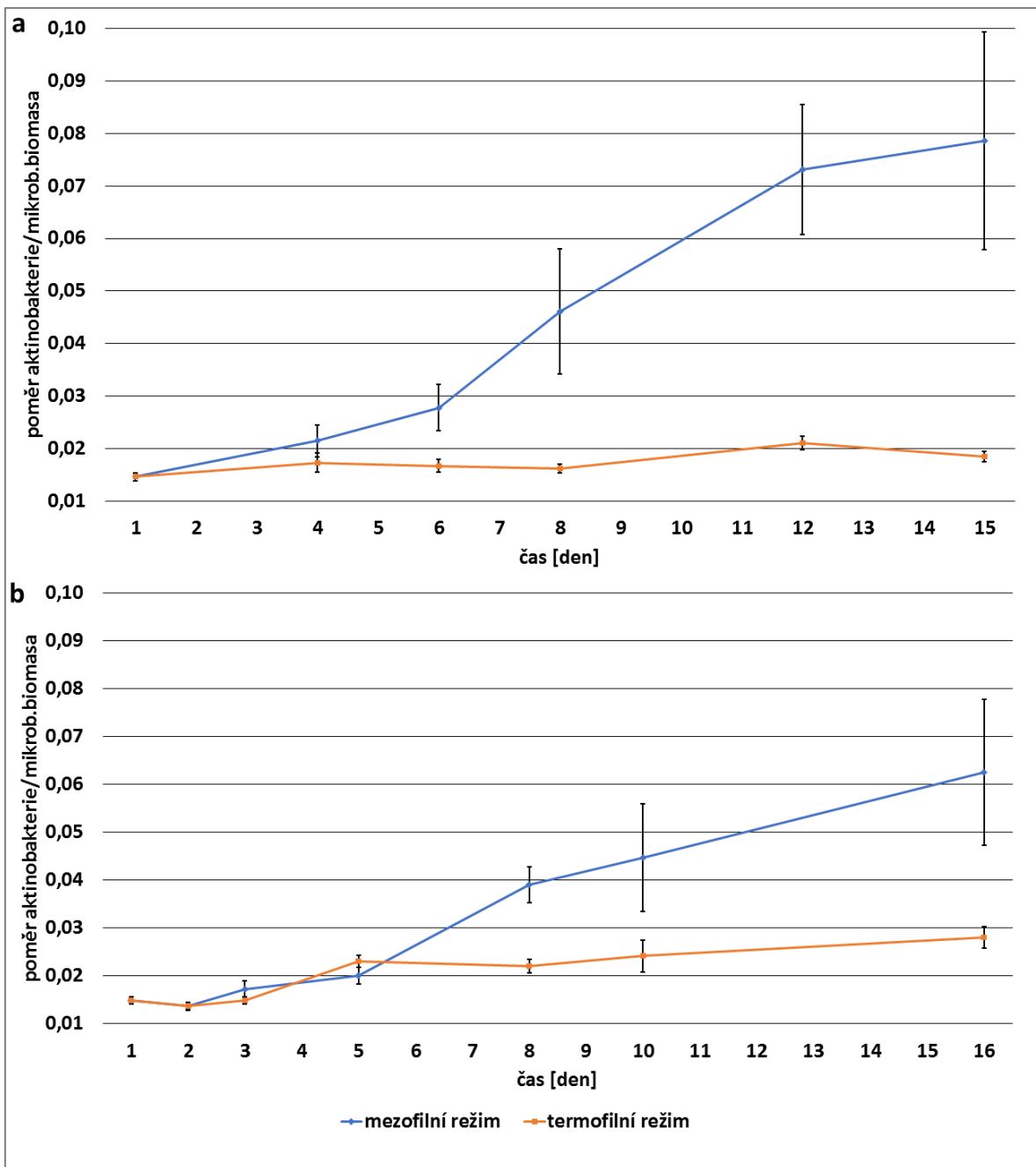


Obrázek 25: Koncentrace sumy PLFA charakteristických pro G+ a G- bakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů A (a), B (b). Chybými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů pro koncentrace PLFA charakteristických pro G+ a G- bakterie.

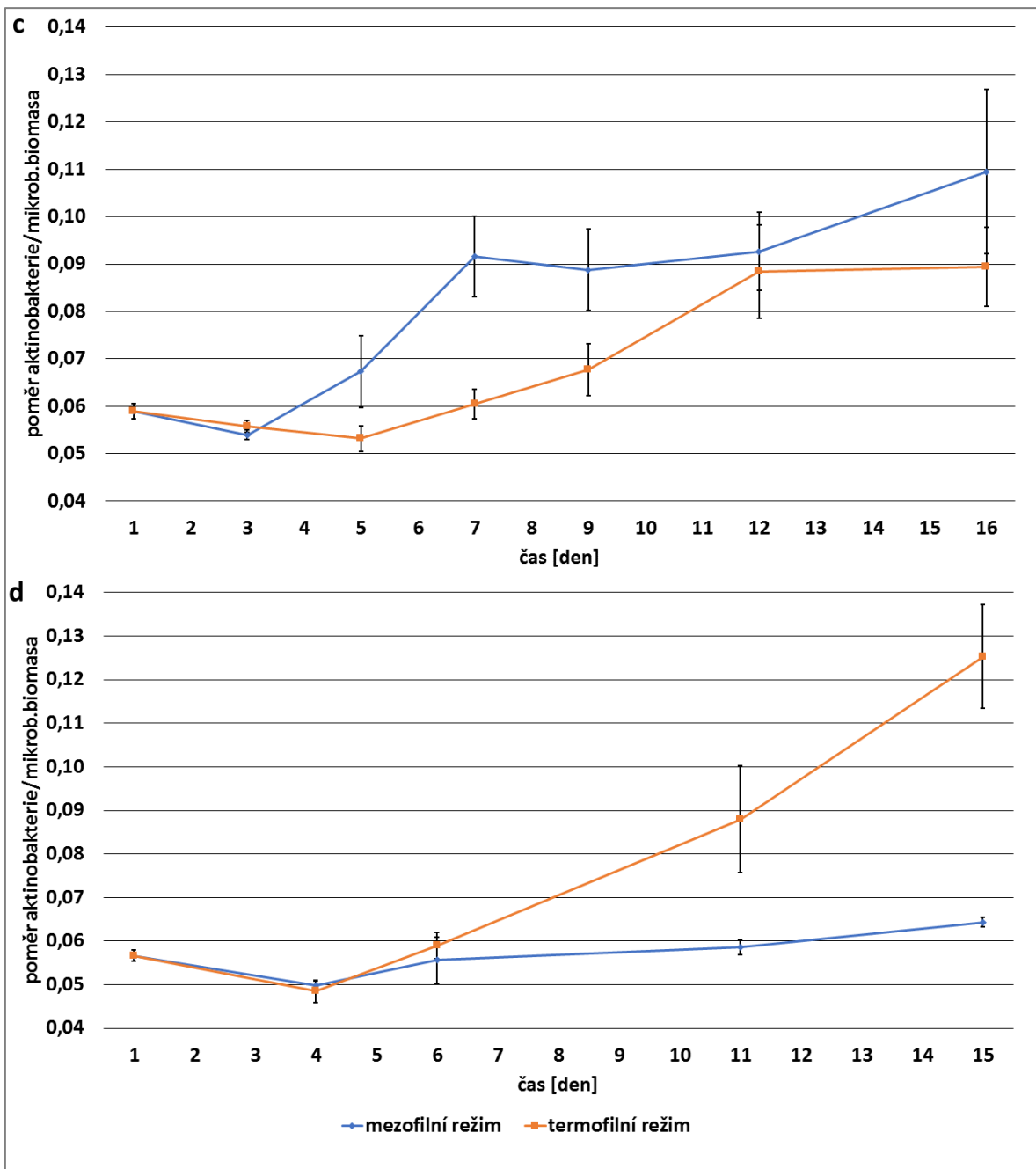


Obrázek 26: Koncentrace sumy PLFA charakteristických pro G+ a G- bakterie a teplota střední vrstvy v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklů C (c), D (c). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků). Různá písmena reprezentují statisticky významné rozdíly dle Tukeyho testu ($p < 0,05$) v průběhu jednotlivých teplotních režimů pro koncentrace PLFA charakteristických pro G+ a G- bakterie.

Příloha 3: Vývoj poměru aktinobakterie/mikrob. biomasa při cyklu A (Obr. 27a), B (Obr. 27b) a C (Obr. 28c), D (Obr. 28d)



Obrázek 27: Poměr aktinobakterie/mikrob. biomasa v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu A (a), B (b). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků).



Obrázek 28: Poměr aktinobakterie/mikrob. biomasa v průběhu mezofilního a termofilního režimu biosušení cyklu C (c), D (d). Chybými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka (6 nezávislých vzorků).