

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **PP-COVID-20-0019****Inteligentné monitorovanie odpadových vôd za účelom vytvorenia systému včasného varovania populácie SR pred šírením ochorenia COVID-19**Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Miroslav Gál, PhD.**Príjemca **Slovenská technická univerzita v Bratislave - Fakulta chemickej a potravinárskej technológie**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave
Fakulta elektrotechniky a informatiky Slovenskej technickej univerzity v Bratislave
Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav
Lekárska fakulta UK v Bratislave
Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave

Zoznam spolupracujúcich organizácií zo zahraničia, ktoré sa zapojili do riešenia projektu (uveďte názov, sídlo, štát a identifikačné číslo ak je dostupné)

1. Juhočeská Univerzita v Českých Budějoviciach, Fakulta rybárstva a ochrany vôd (doc. Mgr. Roman Grabic, PhD.) (detekcia a monitoring mikropolutantov)
2. Univerzita Palackého v Olomouci, Regionálne centrum pokročilých technológií a materiálov (Mgr. Ján Filip, PhD.) (vývoj nových typov senzorov na detekciu mikropolutantov a technológií schopných dezinfikovať odpadové vody – najmä oxidačné postupy)
3. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (prof. Carmen Paz Suarez) (možnosť využitia umelej inteligencie pri vyhodnocovaní dát s monitoringu mikropolutantov/ v životnom prostredí)
4. Middlesex University London (MU) (prof. Lian Lundy) (spolupráca pri tvorbe NORMAN medzinárodnej databázy dát ohľadné monitoringu mikropolutantov a RNA fragmentov vírusu)
5. INAB - Institute of Applied Biosciences - CERTH - Center for Research and Technology Hellas (Fotis E. Psomopoulos) Nadnárodný monitoring na úrovni EÚ týkajúci sa monitorovania biomarkerov a RNA SARS-CoV-2 v odpadových vodách (vývoj nových metodík analýzy vôd)

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

1. Marton, M., Vojs, M., Michniak P., Behúl M., Řeháček V., Kromka, A., Stehlík Š., Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fyzikální ústav AV CR, v. v. i, EP21218421, A method for growing boron doped diamond and product thereof
2. Marton, M., Vojs, M., Kromka, A., Stehlík Š., Pfeifer R., Szabó O., Potocký Š, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Fyzikální ústav AV CR, v. v. i, Nanoporous diamond structure, method of production thereof, a battery and a sensor comprising thereof
3. Lipková M., Palušová I., Vičková J., Kubušová V., Vojs M., Vrška M., Slovenská technická univerzita v Bratislave; Palušová Ivana Vičková Jana; Kubušová Vlasta, 76-2021, Ekologické dezinfekčné zariadenie s použitím diamantových nanotechnológií

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. ŠELEŠOVSKÁ, Renáta - NAVRÁTIL, Tomáš - HRDLÍČKA, Vojtěch - MICHNIAK, Pavol - HATALA, Michal - VOJS, Marian - MARTON, Marián - MATVIEIEV, Oleksandr - JANÍKOVÁ, Lenka - CHÝLKOVÁ, Jaromíra. Novel screen-printed sensors with chemically deposited boron-doped diamond and their use for voltammetric determination of attention deficit hyperactivity disorder medication atomoxetine. In *Electrochimica Acta*. Vol. 403, (2022), Art. no. 139642 [11] s. ISSN 0013-4686 (2020: 6.901 - IF, Q2 - JCR Best Q, 1.534 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1016/j.electacta.2021.139642 ; SCOPUS: 2-s2.0-85120708277.
2. Hatala, M., Gemeiner, P., Lorencová, L. et al. Screen-printed conductive carbon layers for dye-sensitized solar cells and electrochemical detection of dopamine. *Chem. Pap.* 75, 3817–3829 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11696-021-01601-2>
3. BIMOVÁ, Paula [Brandeburová] - ROUPCOVÁ, Petra - KLOUDA, Karel - MATĚJOVÁ, Lenka - VOJS STAŇOVÁ, Andrea - GRABICOVÁ, Kateřina - GRABIC, Roman - MAJOVÁ, Veronika - HÍVEŠ, Ján - ŠPALKOVÁ, Viera - GEMEINER, Pavol - CELEC, Peter - KONEČNÁ, Barbora - BÍROŠOVÁ, Lucia - KRAHULCOVÁ, Monika - MACKULÁK, Tomáš. Biochar - An efficient sorption material for the removal of pharmaceutically active compounds, DNA and RNA fragments from wastewater. In *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Vol. 9, iss. 4 (2021), s. [1-9]. ISSN 2213-3437 (2020: 5.909 - IF, Q1 - JCR Best Q, 0.965 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1016/j.jece.2021.105746 ; CC: 000670384900006.
4. KRIVONÁKOVÁ, Naďa - ŠOLTÝSOVÁ, Andrea - TAMÁŠ, Michal - TAKÁČ, Zdenko - KRAHULEC, Ján - FICEK, Andrej - GÁL, Miroslav - GALL, Marián - FEHÉR, Miroslav - KRIVJANSKÁ, Anna - HORÁKOVÁ, Ivana - BELIŠOVÁ, Noemi [Belišová, Noemi] - BIMOVÁ, Paula [Brandeburová] - BUTOR ŠKULCOVÁ, Andrea [Škulcová] - MACKULÁK, Tomáš. Mathematical modeling based on RT-qPCR analysis of SARS-CoV-2 in wastewater as a tool for epidemiology. In *Scientific Reports*. Vol. 11, Iss. 1 (2021), s. [1-10], art. no. 19456. ISSN 2045-2322 (2020: 4.379 - IF, Q1 - JCR Best Q, 1.240 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1038/s41598-021-98653-x ; SCOPUS: 2-s2.0-85116318937 ; CC: 000702737500114.
5. BELIŠOVÁ, Noemi - KONEČNÁ, Barbora a kol. Sorption of SARS-CoV-2 Virus Particles to the Surface of Microplastics Released during Washing Processes. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Akceptované 24.12.2021. ISSN 1660-4601 (2020: 3.390 - IF, Q1 - JCR Best Q, 0.747 - SJR, Q2 - SJR Best Q). V databáze: DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph19010281>.
6. MACKULÁK, Tomáš - GÁL, Miroslav - ŠPALKOVÁ, Viera - FEHÉR, Miroslav - BRIESTENSKÁ, Katarína - MIKUŠOVÁ, Miriam - TOMČÍKOVÁ, Karolína - TAMÁŠ, Michal - BUTOR ŠKULCOVÁ, Andrea [Škulcová]. Wastewater-Based Epidemiology as an Early Warning System for the Spreading of SARS-CoV-2 and Its Mutations in the Population. In *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 18, iss. 11 (2021), s. [1-21], art. no. 5629. ISSN 1660-4601 (2020: 3.390 - IF, Q1 - JCR Best Q, 0.747 - SJR, Q2 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.3390/ijerph18115629 ; SCOPUS: 2-s2.0-85106453298 ; CC: 000659925200001.
7. BUTOR ŠKULCOVÁ, Andrea [Škulcová] - TAMÁŠOVÁ, Katarína - VOJS STAŇOVÁ, Andrea - BÍROŠOVÁ, Lucia - KRAHULCOVÁ, Monika - GÁL, Miroslav - KONEČNÁ, Barbora - JANÍKOVÁ, Monika - CELEC, Peter - GRABICOVÁ, Kateřina - GRABIC, Roman - FILIP, Ján - BELIŠOVÁ, Noemi [Belišová, Noemi] - RYBA, Jozef - KEREKEŠ, Kamil - ŠPALKOVÁ, Viera - HÍVEŠ, Ján - MACKULÁK, Tomáš. Effervescent ferrate(VI)-based tablets as an effective means for removal SARS-CoV-2 RNA, pharmaceuticals and resistant bacteria from wastewater. In *Journal of Water Process Engineering*. Vol. 43, (2021), s. [1-5], art. no. 102223. ISSN 2214-7144. V databáze: DOI: 10.1016/j.jwpe.2021.102223 ; SCOPUS: 2-s2.0-85110651213 ; CC: 000703751700004.
8. LUNDY, Lian - FATTA-KASSINOS, Despo - SLOBODNÍK, Jaroslav - KARAOLIA, Popi - ČIRKA, Ľuboš - FICEK, Andrej - KRAHULEC, Ján - MACKULÁK, Tomáš - ŠOLTÝSOVÁ, Andrea et al.. Making Waves: Collaboration in the time of SARS-CoV-2-rapid development of an international co-operation and wastewater surveillance database to support public health decision-making. In *Water Research*. Vol. 199, (2021), s. [1-7], art. no. 117167. ISSN

0043-1354 (2020: 11.236 - IF, Q1 - JCR Best Q, 3.099 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1016/j.watres.2021.117167 ; SCOPUS: 2-s2.0-85106318931 ; CC: 000659348700013.

9. BODÍK, Michal - MACKULÁK, Tomáš - FEHÉR, Miroslav - VOJS STAŇOVÁ, Andrea - GRABICOVÁ, Kateřina - VARJÚOVÁ, Dóra - BODÍK, Igor. Searching for the correlations between the use of different groups of pharmaceuticals from wastewaters. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 228, (2021), s. [1-7], art. no. 112973. ISSN 0147-6513 (2020: 6.291 - IF, Q1 - JCR Best Q, 1.377 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112973 ; SCOPUS: 2-s2.0-85119058292.

10. MACKULÁK, Tomáš - CVERENKÁROVÁ, Klára - VOJS STAŇOVÁ, Andrea - FEHÉR, Miroslav - TAMÁŠ, Michal - BUTOR ŠKULCOVÁ, Andrea [Škulcová] - GÁL, Miroslav - NAUMOWICZ, Monika - ŠPALKOVÁ, Viera - BÍROŠOVÁ, Lucia. Hospital Wastewater-Source of Specific Micropollutants, Antibiotic-Resistant Microorganisms, Viruses, and Their Elimination. In *Antibiotics*. Vol. 10, iss. 9 (2021), s. [1-14], art. no. 1070. ISSN 2079-6382 (2020: 4.639 - IF, Q2 - JCR Best Q, 0.960 - SJR, Q1 - SJR Best Q). V databáze: DOI: 10.3390/antibiotics10091070 ; WOS: 000699307200001.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu môžu byť uplatnené v rôznych oblastiach verejného zdravia, čiastkarenských technológií, štatistickom vyhodnocovaní a v neposlednom rade aj pri rozvoji vedeckého poznania v oblastiach, ktorým sa projekt venoval. Ide najmä, ale nie len:

- po dokončenej optimalizácii pri detekcii vírusu v odpadovej vode a v iných maticiacich využitím LAMP technológie a biosenzora pri bodovom monitoringu
- pri dezinfekcii bodových zdrojov po detekcii vírusu
- pri dočisťovaní lokálnych čistiarň odpadových vôd napr. v nemocniciach, domovoch dôchodcov, škôl a pod.
- pri modelovaní šírenia vírusu SARS-CoV-2 v odpadovej vode ako predikcie šírenia sa nákazy v jednotlivých uzloch využitím umelej inteligencie a štatistickom spracovaní veľkých dát
- v monitoringu zdravotného stavu populácie pomocou analýzy odpadových vôd a to nie len v prípade tejto pandémie, ale aj iných ochorení
- po modifikácii biosenzorov v súčinnosti s tradičnou PCR technikou sa ponúka možnosť sledovania mutačných zmien vírusu. Tieto údaje by sa mohli v budúcnosti využiť pri vakcinačnej stratégii (big data analysis) pri predikovaní vakcíny proti COVID-19 (ale nie len v prípade modifikácie senzorov) na podobnom princípe, ako sa pracuje s vakcínou proti chrípke.
- rozvoji vedeckého poznania v oblasti elektrochémie, molekulárnej biológie, lekárskej biochémie, verejného zdravotníctva, epidemiológie, virológie a pod.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Počas riešenia grantu sa v rámci plnenia cieľov projektu podarilo:

- Boli vyvinuté a otestované substráty na prípravu biosenzora na báze keramiky (BDDE a BDDE modifikované zlatými nanočasticami) a na báze plastového substrátu (uhlíkové, modifikované uhlíkové elektródy – čistý uhlík, sadze, pozlátené elektródy)
- Bola otestovaná a optimalizovaná chemická a elektrochemická predúprava povrchu pracovnej elektródy v závislosti na type biorekogničnej vrstvy
- Podarilo sa optimalizovať techniku imobilizácie protilátok na povrchu elektródy a aptamérov na zlatom povrchu terčika QCM
- Bol vypracovaný a úspešne odskúšaný a rutinne zavedený protokol na predúpravu odpadových vôd s ohľadom na prítomnosť rôznych nečistôt v tejto komplikovanej matici v súvislosti s dekcíou RNA SARS-CoV-2 pomocou PCR a LAMP
- Spoluprácou troch prestížnych pracovísk na Slovensku sa úspešne zaviedla metodika izolácie vírusovej RNA z odpadovej vody – komunálnej a nemocničnej
- Na detekciu RNA vírusu SARS-CoV-2 v odpadovej vode sa zoptimalizovala metóda izotermálnej amplifikácie a SHERLOCK
- Na podklade optimalizácie izolácie a amplifikácie RNA sa podarilo vírusovú RNA detegovať v rôznych typoch odpadových vôd pomocou PCR techniky
- Využitím sekvenčných techník sme analýzou odpadových vôd získali informácie o

šíriacich sa variantoch vírusu v populácii v čase a mieste

- Navrhnuté biosenzory na báze aptamérov (elektrochemické, QCM) a protilátok boli otestované v rôznych matriciach pričom sa ukázala nie dokonalá odolnosť týchto vrstiev voči adsorpcii rôznorodých látok z odpadových vôd. Vyčistenie (napr. pomocou membránových technológií) sa ukazuje ako dôležitá pomoc pri využití tohto typu senzora v odpadovej vode. Ako dôsledok sa ukazuje pravdepodobne nevyhnutná predúprava tých vôd pred samotnou detekciou.

- V spolupráci s externým pracoviskom boli vykonané interferenčné štúdie za účelom určenia selektivity vrstiev.

- V dôsledku masívneho šírenia sa rôznych variantov vírusu v populácii sa podarilo navrhnúť správanie sa tohto vírusu (na základe analýzy RNA fragmentov) v odpadových vodách a vytvoriť štatistickým spracovaním analyzovaných dát z odberov vzoriek matematický model šírenia sa COVID-19 v populácii a predikovať zaťaženie zdravotníckeho systému niekoľko dní dopredu pred nárastom počtu pozitívnych nasofaryngálnych PCR testov.

- Okrem samotnej detekcie vírusu a predikcie šírenia sa choroby sme v rámci projektu zoptimalizovali podmienky pre následnú dezinfekciu zisteného znečisteného zdroja pomocou čistých a tabletovaných železanov a pomocou elektrochemickej degradácie BDD elektródami (optimalizácia B/C, prúdovo-napäťových parametrov, podmienok pre elektrolyzu)

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

During the solution of the project, the following was achieved within the fulfillment of the project objectives:

- Substrates for the preparation of a biosensor based on ceramics (BDDE and BDDE modified with gold nanoparticles) and based on a plastic substrate (carbon, modified carbon electrodes - pure carbon, carbon black, gold-plated electrodes) were developed and tested
- Chemical and electrochemical pretreatment of the working electrode surface depending on the type of biorecogenic layer was tested and optimized.

- We managed to optimize the technique of immobilization of antibodies on the surface of the electrode and aptamers on the gold surface of the QCM target

- A protocol for wastewater pre-treatment has been developed and successfully tested and routinely implemented with regard to the presence of various impurities in this complicated matrix in connection with the detection of SARS-CoV-2 RNA by PCR and LAMP.

- The cooperation of three prestigious workplaces in Slovakia has successfully introduced a methodology for the isolation of viral RNA from wastewater - municipal and hospital

- The isothermal amplification method and SHERLOCK were optimized for the detection of SARS-CoV-2 virus RNA in wastewater

- Based on the optimization of RNA isolation and amplification, viral RNA was detected in various types of wastewater using PCR techniques

- Using sequencing techniques, we obtained information about the spread of virus variants in the population at the time and place by analyzing the wastewater.

- The proposed biosensors based on aptamers (electrochemical, QCM) and antibodies were tested in various matrices, while the perfect resistance of these layers to adsorption of various substances from wastewater was shown. Cleaning (eg using membrane technologies) is proving to be an important aid in the use of this type of sensor in wastewater. As a consequence, it is probably necessary to pre-treat those waters before the detection itself.

- In cooperation with an external workplace, interference studies were performed to determine the selectivity of the layers.

- Due to the massive spread of different virus variants in the population, it was possible to design the behavior of this virus (based on RNA fragment analysis) in wastewater and to create a mathematical model of COVID-19 spread in the population by statistical processing of analyzed sampling data and to predict system several days in advance before the increase in the number of positive nasopharyngeal PCR tests.

- In addition to virus detection and disease spread prediction, we optimized the conditions for subsequent disinfection of the identified contaminated source using pure and tableted irons and electrochemical degradation by BDD electrodes (optimization of B / C, current-

voltage parameters, conditions for electrolysis)