

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace prvního stupně kolonového systému LITHIM

Bc. Zbyněk Řehák

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zbyněk Řehák**
Osobní číslo: **C16459**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Optimalizace prvního stupně kolonového systému LITHIM**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na vytipování vhodných mikroorganismů, které by mohly nahradit v současnosti používané bakterie *Thiobacillus denitrificans* v prvním stupni kolonového systému LITHIM.
2. Proveďte laboratorní testy na modelu kolonového systému LITHIM s vytipovanými mikroorganismy, výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Peroutková**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2018

.....
Bc. Zbyněk Řehák

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych velice rád poděkoval svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, věnovaný čas, poskytování cenných rad a připomínek, které mi pomohly při zpracování této diplomové práce. Stejně tak bych chtěl poděkovat Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D, Ing. Ivetě Stanové a Bc. Dominikovi Matýskovi, kteří neváhali obětovat svůj volný čas a rovněž přispěli svými znalostmi a zkušenostmi, bez kterých by tato diplomová práce nemohla vzniknout.

Zároveň bych chtěl poděkovat celé své rodině i blízkým, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali jak finančně tak psychicky.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci prvního stupně kolonového systému LITHIM, přesněji optimalizaci aerobní části kolonového systému. Optimalizace spočívala ve vytipování a nahrazení původního fakultativně anaerobního mikroorganismu *Thiobacillus denitrificans*. Testovanými mikroorganismy byly *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*. Na základě jednotlivých měření byly výsledky vzájemně porovnány a vybrán nejvhodnější mikroorganismus.

KLÍČOVÁ SLOVA

čištění odpadních vod, LITHIM, metabolismus mikroorganismů, biofilm

TITLE

Optimization of the first stage of the LITHIM column system

ANNOTATION

This thesis is focused on the optimization of the first stage of the column system LITHIM, more precisely optimization of the aerobic parts of the column system. Optimization consisted of identifying and replacing the original facultative anaerobic microorganism *Thiobacillus denitrificans*. Tested microorganisms were *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*. Based on individual measurements the results were compared and the most suitable microorganism was selected.

KEYWORDS

wastewater treatment, LITHIM, metabolism of microorganisms, biofilm

OBSAH

ÚVOD.....	13
TEORETICKÁ ČÁST	14
1 Voda a její rozdělení.....	14
2 Čištění odpadních vod	15
2.1 Anaerobní biologické čištění vod.....	16
2.1.1 Přednosti a nevýhody anaerobního čištění vod.....	17
2.1.2 Reaktory pro anaerobní čištění	18
2.1.3 Reaktory s biomasou v suspenzi.....	19
2.1.4 Reaktory s imobilizovanou biomasou.....	19
2.2 Aerobní biologické čištění vod	20
2.2.1 Aktivovaný kal.....	20
2.3 Technologie biochemických procesů	21
2.3.1 Růst a množení mikroorganismů	22
2.3.2 Růstová křivka	23
2.3.3 Biofilm a jeho význam.....	24
2.3.4 Využití mikroorganismů v čištění technologických odpadních vod	25
3 Třístupňový kolonový systém LITHIM	26
3.1 Zjednodušený dvoustupňový kolonový systém LITHIM	28
4 Použité mikroorganismy.....	29
4.1 Metabolismus mikroorganismů.....	29
4.2 Síran redukující bakterie	31
4.2.1 <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	33
4.3 <i>Thiobacillus denitrificans</i>	34
4.4 <i>Micrococcus luteus</i>	36
4.5 <i>Bacillus subtilis</i>	37
4.6 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38

5	CÍL PRÁCE.....	39
	EXERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
6	Materiál.....	40
6.1	Použité mikroorganismy	40
6.2	Pomůcky.....	40
6.3	Chemikálie a reagentie	40
6.4	Přístroje	42
7	Kultivační média a roztoky	43
7.1.1	Masopeptonový agar, Masopeptonový bujón.....	43
7.1.2	S8 médium	43
7.1.3	Modifikované Van Houten médium	44
7.1.4	Fyziologický roztok	46
7.1.5	Živný roztok pro <i>M. luteus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	46
7.1.6	Živný roztok pro <i>T. denitrificans</i>	46
8	Pracovní postup	47
8.1	Příprava aerobní bakteriální kultury.....	47
8.2	Příprava anaerobní bakteriální kultury.....	47
8.3	Barvení dle Grama	48
8.4	Měření růstové křivky	48
8.5	Kultivace bakteriálního biofilmu	49
8.6	Průkaz bakteriálního biofilmu.....	50
8.7	Konstrukce zjednodušeného kolonového systému LITHIM.....	51
8.8	Měření pH	52
8.9	Měření oxidačně-redukčního potenciálu.....	52
8.10	Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku.....	52
8.11	Měření teploty	53
9	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
9.1	Růstové křivky testovaných mikroorganismů.....	54
9.1.1	Růstová křivka <i>Micrococcus luteus</i>	54

9.1.2	Růstová křivka <i>Bacillus subtilis</i>	55
9.1.3	Růstová křivka <i>Pseudomonas fluorescens</i>	56
9.2	Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu	57
9.3	Stanovení pH.....	58
9.3.1	Stanovení pH <i>T. denitrificans</i>	58
9.3.2	Stanovení pH aerobních mikroorganismů	59
9.4	Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu	61
9.4.1	Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu <i>T. denitrificans</i>	61
9.4.2	Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu aerobních mikroorganismů.....	62
9.5	Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku	64
9.5.1	Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku <i>T. denitrificans</i>	64
9.5.2	Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku aerobních mikroorganismů	65
10	ZÁVĚR.....	67
11	ZDROJE	69
12	PŘÍLOHY	79

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1 – Zjednodušené schéma čištění odpadních vod	15
Obr. 2 – Rozdělení anaerobních reaktorů	18
Obr. 3 – Biologické procesy v technologii čištění odpadních vod	22
Obr. 4 – Růstová křivka	23
Obr. 5 – Tvorba biofilmu	24
Obr. 6 – Třístupňový systém LITHIM.....	27
Obr. 7 – Zjednodušený dvoustupňový systém LITHIM.....	28
Obr. 8 – Transformace síry	32
Obr. 9 – <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	33
Obr. 10 – <i>Thiobacillus denitrificans</i>	34
Obr. 11 – <i>Micrococcus luteus</i>	36
Obr. 12 – <i>Bacillus subtilis</i>	37
Obr. 13 – <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38
Obr. 14 – Anaerobní box	47
Obr. 15 – <i>Micrococcus luteus</i> obarven dle Grama	48
Obr. 16 – Záznamník růstu buněk RTS-1C	49
Obr. 17 – Pozitivní průkaz biofilmu <i>Bacillus subtilis</i>	50
Obr. 18 – Zjednodušený jednostupňový systém LITHIM.....	51

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 – Rozdělení mikroorganismů podle nároku na kyslík	30
Tab. 2 – Seznam použitých chemikálií	41
Tab. 3 – Seznam použitých přístrojů	42
Tab. 4 – Složení masopeptonového bujónu a agaru	43
Tab. 5 – Složení S8 média	44
Tab. 6 – Složení modifikovaného Van Houten média.....	45
Tab. 7 – Složení zásobního roztoku solí	45
Tab. 8 – Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu	57
Tab. 9 – Naměřené hodnoty pH <i>T. denitrificans</i>	58
Tab. 10 – Naměřené hodnoty pH aerobních bakterií.....	59
Tab. 11 – Naměřené hodnoty ORP <i>T. denitrificans</i>	61
Tab. 12 – Naměřené hodnoty ORP aerobních bakterií.....	62
Tab. 13 – Naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku <i>T. denitrificans</i>	64
Tab. 14 – Naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku aerobních bakterií	65

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ATB	antibiotika
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
ČOV	čistírna odpadních vod
<i>D. hydrogenophilus</i>	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>
EPS	extracelulární polysacharidové matrix
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujón
OD	optická denzita
ORP	oxidačně-redukční potenciál
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SOB	síru oxidující bakterie
SRB	síran redukující bakterie
<i>T. denitrificans</i>	<i>Thiobacillus denitrificans</i>

ÚVOD

V České republice se v současné době vyprodukuje obrovské množství odpadních vod, je to způsobeno nejrůznějšími procesy, každodenním chodem domácností, průmyslovým provozem a mnoha jinými. K zabránění přebytečného plýtvání vodou a umožnění jejího znovuvyužití, musí dojít k jejímu čištění. Znečištění vody můžeme definovat jako změnu fyzikálních, chemických či biologických vlastností vody, podobně jsou rozděleny i způsoby čištění odpadních vod.

Odpadní vody mohou obsahovat mnoho rozpuštěných i nerozpuštěných látek, z tohoto důvodu je potřeba tyto vody vyčistit a následně odvádět vyčištěné do recipientu. Čištění odpadních vod můžeme obecně rozdělit do tří kategorií, mechanické čištění využívající mimo jiné velikost nečistot, jejich zachycení pomocí sít, filtrů, česel. Dále chemické čištění odpadních vod využívající jednoduché chemické reakce jako jsou srážecí reakce, neutralizace, adsorpce. A konečně poslední, biologické čištění odpadních vod, odbourávající převážně organické látky za pomoci činnosti různých druhů speciálně pěstovaných bakterií.

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci prvního stupně kolonového systému LITHIM, který využívá činnost mikroorganismů k zachycení iontů kovů technologicky znečištěných vod, především těžkými kovy. V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty poznatky o vodě a o biologických způsobech čištění odpadních vod. Dále jsou zde vytipovány vhodné mikroorganismy pro optimalizaci prvního stupně kolonového systému LITHIM. Experimentální část práce je pak zaměřena na laboratorní testy prováděné ve zjednodušeném systému LITHIM, díky kterým bylo možno vybrat nejvhodnější z testovaných mikroorganismů (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*), jež může nahradit dosud využívaný mikroorganismus *Thiobacillus denitrificans*.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Voda a její rozdělení

Z technického hlediska můžeme vodu rozdělit na dvě kategorie dle zákona 254/2001 Sb., Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon). Jedná se o vodu povrchovou a podzemní, které mohou být dále využívány pro nejrůznější potřeby [1]. Podzemní vodou rozumíme veškerou vodu, která se nachází pod zemským povrchem. Oproti povrchovým vodám mají podzemní vody stálější fyzikálně-chemické složení (koncentrace kyslíku, oxidu uhličitého a další). Povrchová voda se vyskytuje na zemském povrchu, je tvořena všemi povrchovými vodními zdroji (moře, jezera, oceány). Oproti podzemní vodě obsahuje daleko vyšší množství nejrůznějších mikroorganismů, které ovlivňují její kvalitu [2].

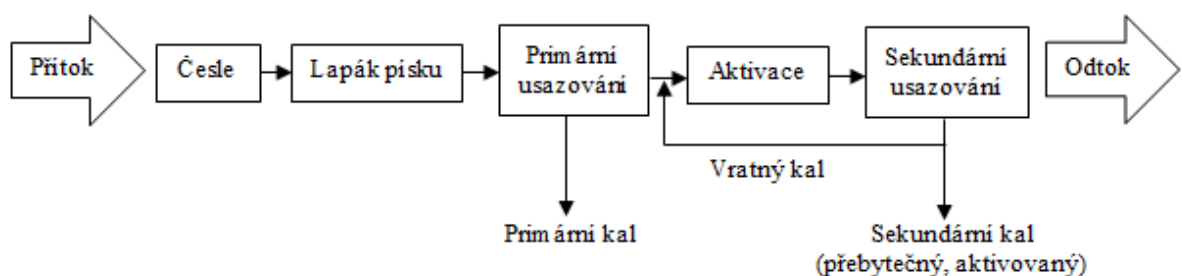
Vodu můžeme rozdělit také dle obsahu nečistot:

- **Pitná voda** – zákon 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví stanovuje, že pitnou vodou je veškerá voda v původním stavu nebo po úpravě, která je určena k pití, vaření, přípravě jídel a nápojů, voda používaná v potravinářství, voda, která je určena k péči o tělo, k čištění předmětů a mnohé další. Z toho jasně vyplývá, že pitná voda nesmí obsahovat žádné škodlivé látky (toxiny, bakterie a další). Zároveň by měla mít příjemnou chuť, bez přítomnosti zápachu a zbarvení [3, 4].
- **Užitková voda** – je čerpána z podzemních i povrchových zdrojů, neobsahuje zdraví škodlivé látky. Není však určena ke konzumaci či přípravě potravy. Využívá se omezeně k mytí, praní prádla, koupání, nesmí se využívat ani k mytí nádobí, mělo by se zamezit jakémukoliv styku s potravinami [5].
- **Odpadní voda** – je odváděna z domácností či průmyslových zařízení. Obecně ji můžeme definovat jako vodu, jejíž kvalita byla zhoršena lidskou činností. Znečištění vody může být tvořeno rozpuštěnými nebo nerozpuštěnými látkami, za znečištění se ale považuje i např. tepelné nebo radioaktivní znečištění [5].

2 Čištění odpadních vod

Zařízení, ve kterém dochází ke zpracování resp. čištění odpadních vod, nazýváme čistírna odpadních vod (ČOV). Tato zařízení bývají velice často poblíž různých provozů, kde slouží k čištění průmyslově znečištěných vod, odpadních vod ze zemědělství a podobně. Čistírny odpadních vod mohou být různé, rozdělují se hlavně dle velikosti a typu čistírenského procesu [6]. Na území ČR je nejčastějším typem mechanicko-biologická čistírna, jejíž zjednodušené schéma je následující:

- **Mechanické čištění** – nečistoty ve vodách jsou různé povahy. Mechanickým čištěním odstraňujeme nečistoty ve vodě nerozpuštěné, které tvoří podstatnou část odpadních vod. Toto čištění můžeme označit jako první fázi čištění odpadní vody, kdy se zbavujeme hrubých nečistot. Voda určená k čištění postupně putuje skrze česle, lapáky písku, tuků a olejů a usazovací nádrž [7].
- **Biologické čištění** – využívá k čištění biochemických procesů, značná část technologie tohoto čištění je rozepsána v následujících kapitolách. Téměř všechny odpadní vody mohou být biologicky čištěny, neboť vždy obsahují alespoň část biologicky rozložitelných rozpuštěných látek. Při biologickém čištění dochází k odstraňování organického znečištění odpadní vody – vzniklá biomasa se od vyčištěné vody odděluje v dosazovací nádrži [8].
- **Terciální stupeň čištění** – slouží k dočištění již mechanicko-biologicky vyčištěných odpadních vod. Při třetím stupni čištění se odstraňují hlavně anorganické ionty a syntetické organické sloučeniny. Využívá se především fyzikálních nebo fyzikálně-chemických metod jako je filtrace, srážení, koagulace [9].



Obr. 1 – Zjednodušené schéma čištění odpadních vod [22]

2.1 Anaerobní biologické čištění vod

Mikrobiální zpracování nejrůznějších organických substrátů za nepřístupu kyslíku, tedy anaerobně, probíhá v přírodě přirozeně, nejčastěji na dnech vodních toků či rybníků. Výsledné produkty takovýchto procesů jsou především methan, voda a oxid uhličitý, tyto látky se významně účastní uhlíkového cyklu. Právě takovýchto i jiných mikrobiálních procesů se využívá především v technologii odstranění organického znečištění. Využívají se především nejrůznější kaly či jiné mikrobiální kultury ve vodních suspenzích. Pod pojmem anaerobní procesy rozumíme anaerobní čištění odpadních vod a anaerobní stabilizaci kalů. Oba ty to procesy využívají směsné kultury mikroorganismů, které rozkládají organický substrát bez přístupu vzduchu, resp. kyslíku [10].

Při aerobních procesech vystupuje v roli konečného akceptoru elektronů kyslík, anaerobní procesy využívají jiné akceptory elektronů, mimo jiné dusičnany, dusitany, sírany, elementární síru a další. Z technologického hlediska jsou anaerobní procesy energeticky málo náročné, až 90 % energie obsažené v substrátu je zachováno ve vzniklém bioplynu (methan) a necelých 10 % je využito pro růst mikroorganismů [11].

Anaerobní rozklad jako takový můžeme shrnout do sledu několika dílčích na sebe navazujících procesů, za které jsou zodpovědné anaerobní mikroorganismy. Rozklad organického substrátu vyžaduje koordinovanou metabolickou činnost těchto mikroorganismů. Produkt metabolismu jedné skupiny mikroorganismů se stává substrátem pro jinou skupinu mikroorganismů, takováto kaskáda metabolismů vede až ke vzniku konečných metabolitů.

Celý proces rozkladu můžeme rozdělit do několika biochemických reakcí, jsou jimi hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze a methanogeneze [12].

Hydrolýzou rozumíme rozklad vysokomolekulárních organických látek (proteiny, lipidy) na nízkomolekulární látky pomocí enzymů. Acidogeneze je zodpovědná za následný rozklad jednodušších organických látek (organické kyseliny). Fermentací těchto látek dochází k tvorbě redukováných produktů. Další fází je acetogeneze, kdy dochází k oxidaci redukováných produktů za vzniku vodíku, oxidu uhličitého a kyseliny octové. Poslední fází rozkladu je pak methanogeneze, kde dochází k rozkladu jednoduchých jednouchlíkatých látek (kyselina mravenčí, oxid uhelnatý) [13].

2.1.1 Přednosti a nevýhody anaerobního čištění vod

Anaerobní čištění odpadních vod zaznamenalo v posledních letech velký rozmach a dnes je již běžnou metodou čištění odpadních vod. Aplikace tohoto způsobu čištění vod se neustále rozšiřují. Porovnání anaerobního zpracování odpadních vod s aerobním můžeme shrnout následovně:

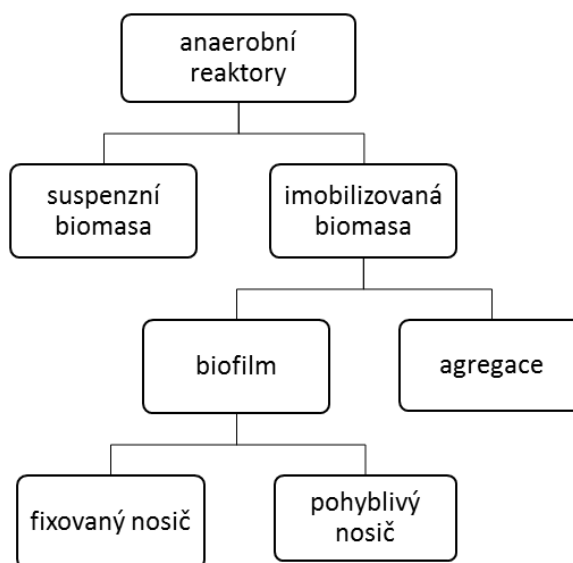
- **Nízká spotřeba energie.** U anaerobních procesů není potřeba vynakládat značné množství energie na optimalizaci podmínek.
- **Nižší produkce biomasy.** Oproti aerobní produkci biomasy je produkce anaerobní biomasy asi desetkrát menší. Z toho vyplývají i nižší náklady na zpracování přebytečného kalu.
- **Nízké požadavky na živiny.** Většina esenciálních živin je využita k tvorbě nové biomasy (růst). Vzhledem k nízké tvorbě biomasy klesá i nutnost přítomnosti esenciálních živin.
- **Nízká reakční rychlost.** Rychlost metabolismů v anaerobních systémech je výrazně nižší než v aerobních, proto vyžadují anaerobní systémy např. nižší průtok, popř. vysoké koncentrace mikroorganismů.
- **Citlivost mikroorganismů na změny reakčních podmínek.** Např. methanogenní bakterie jsou velice citlivé na změny životních podmínek.
- **Dlouhá doba zpracování anaerobních procesů.** Tento fakt vyplývá z nízké reakční rychlosti a metabolismu anaerobních mikroorganismů [14].

2.1.2 Reaktory pro anaerobní čištění

Spolu s neustálým vylepšováním a objasňováním biochemických principů anaerobního čištění odpadních vod dochází i ke konstrukcím nových druhů reaktorů, využívajících nových poznatků. Velké množství druhů a názvů anaerobních reaktorů je dáno konečnými zájmy konstrukčních firem, mnohé typy reaktorů se liší jen nepatrnými detaily v konstrukci [15, 16]. Výkonnost reaktorů závisí především na těchto parametrech:

- množství biomasy, která zůstává v reaktoru,
- kontakt biomasy s přiváděným substrátem,
- rychlost biologické konverze.

První dvě kritéria jsou závislé na konstrukci reaktoru, rychlost biologické konverze závisí především na množství biomasy a optimálních reakčních podmínkách (teplota, koncentrace esenciálního substrátu) [17]. Množství biomasy v reaktoru závisí na způsobu kultivace, rozdělení anaerobních reaktorů je zobrazeno na obr. 2.



Obr. 2 – Rozdělení anaerobních reaktorů [14]

2.1.3 Reaktory s biomasou v suspenzi

První reaktory pracovaly za využití principu ideálního směšovacího reaktoru, kde byla doba zdržení odpadní vody a tuhé fáze stejná. Reakční směs byla promíchávána např. mechanickým míchadlem a odpadní voda byla dávkována kontinuálně. Čištění odpadních vod s využitím takovýchto reaktorů se v dnešní době již moc nepoužívá. Ovšem stále zde jsou možné perspektivní modifikace a těmi jsou membránové anaerobní reaktory. Principem je jednoduchá separace kalné části od biomasy za použití membránové ultrafiltrace mimo reaktor [15, 18].

2.1.4 Reaktory s imobilizovanou biomasou

Reaktory této skupiny tvoří tzv. vysokozátěžové anaerobní reaktory, které jsou charakteristické tím, že doba zdržení biomasy je nesrovnatelně delší než zdržení čištěné kapaliny, v ideálním případě je biomasa statická. Takto je možné dosáhnout vysoké koncentrace anaerobní biomasy v reaktoru a účinnost čištění tak maximalizovat. Z hlediska imobilizace biomasy stojí za zmínku především anaerobní reaktory s biomasou ve formě nárůstu biofilmu na povrchu inertního materiálu [19, 20]. Právě tento reaktor je využit i v níže uvedeném systému LITHIM.

Biomasa, která je imobilizovaná na inertním nosiči, vytváří jakýsi biofiltr. V praxi existují celkem tři základní typy biofiltrů:

- **Biofiltr se sypanou náplní** - náplň tvoří drcený štěrk, vápenec, čedič či jiný minerál, třeba i síra. V závislosti na zatížení se volí i velikost částic s co možná největším specifickým povrchem.
- **Biofiltr s náplní z plastu** - plastová náplň zde nahrazuje minerální náplň. V drtivé většině případů je tvořena speciálně tvarovanými výlisky, které jsou nasypány do reaktoru a vytvářejí náhodně uspořádané lože.
- **Biofiltr s blokovou náplní plastu** - upravená obdoba sypaných plastových náplní. Bohužel u biofiltrů s náplní z plastu často dochází k ucpávání nerozpuštěnými látkami, právě proto byly vyvinuty blokové náplně. Tyto náplně jsou tvořeny bloky tvarovaných plastových desek, které jsou vzájemně spojeny, např. lepením [15, 21].

2.2 Aerobní biologické čištění vod

Aerobní biologické čištění spočívá ve využití mikroorganismů, funkční polykultury, jinak také známou pod názvem aktivovaný kal. Tyto mikroorganismy jsou schopny svým metabolismem odbourat až 99 % organického znečištění [22].

2.2.1 Aktivovaný kal

Jak je zmíněno výše, aktivovaný kal je polykultura mikroorganismů, především bakterie, které jej společně s dalšími organismy vytvářejí. Od čistých monokultur se liší mimo jiné tím, že je možné jej oddělit od kapalné fáze sedimentací. Celkové složení aktivovaného kalu se samovolně stabilizuje v závislosti na složení substrátu či podmínkách během technologického procesu [9, 23]. Mikroorganismy aktivovaného kalu můžeme obecně rozdělit na dvě skupiny:

- **Destruenti** – až 90 % mikroorganismů aktivovaného kalu, způsobují biochemický rozklad znečišťujících látek v čištěných vodách. Tuto skupinu tvoří především bakterie, z malé části i mikroskopické houby či sinice.
- **Konzumenti** – využívají bakteriální buňky jako substrát. Tuto skupinu tvoří především jednobuněčné organismy (protozoa) jako bičíkovci či nálevníci [14].

Z fyziologického hlediska můžeme skupiny bakterií, které se vyskytují v aktivovaném kalu rozdělit na:

- **Organotrofní mikroorganismy využívající organický substrát za oxických podmínek** (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*).
- **Organotrofní mikroorganismy využívající organický substrát za anoxických podmínek**, tzv. denitrifikační bakterie (*Bacillus*, *Alcaligenes*).
- **Chemolitotrofní nitrifikační bakterie** oxidující dusitanový dusík na dusičnanový dusík (*Nitrobacter*).
- **Polyfosfátakumulující (poly-P) bakterie** akumulující lehce rozložitelné substráty, spolu se zvýšenou akumulací fosforečnanů do buněk (*Acinetobacter*, *Klebsiella*) [24].

2.3 Technologie biochemických procesů

Čištění vod využívá metabolismu mikroorganismů, dochází tak k přeměně nechtěných či nepotřebných látek na lépe odbouratelné či lépe technologicky zpracovatelné produkty. Aby tyto procesy mohly fungovat správně, je potřeba poskytnout mikroorganismům co možná nejlepší podmínky. Jednou ze základních podmínek je především vhodný substrát, potřebné nutrienty (chemické prvky potřebné pro syntézu buněk např. dusík, fosfor, síra, ale i kovy jako kobalt, železo, vápník a mnohé další). Neméně podstatnou součástí technologie biochemických procesů jsou i kultivační podmínky [14].

Substrát můžeme obecně definovat jakožto nepostradatelný zdroj energie. Mikroorganismy mohou získávat energii ze světla, přeměnou světelné energie na chemickou, takovéto mikroorganismy označujeme jako fototrofní. Druhou skupinu tvoří mikroorganismy, které získávají energii oxidací anorganických či organických látek. Takovéto mikroorganismy označujeme jako chemotrofní [25].

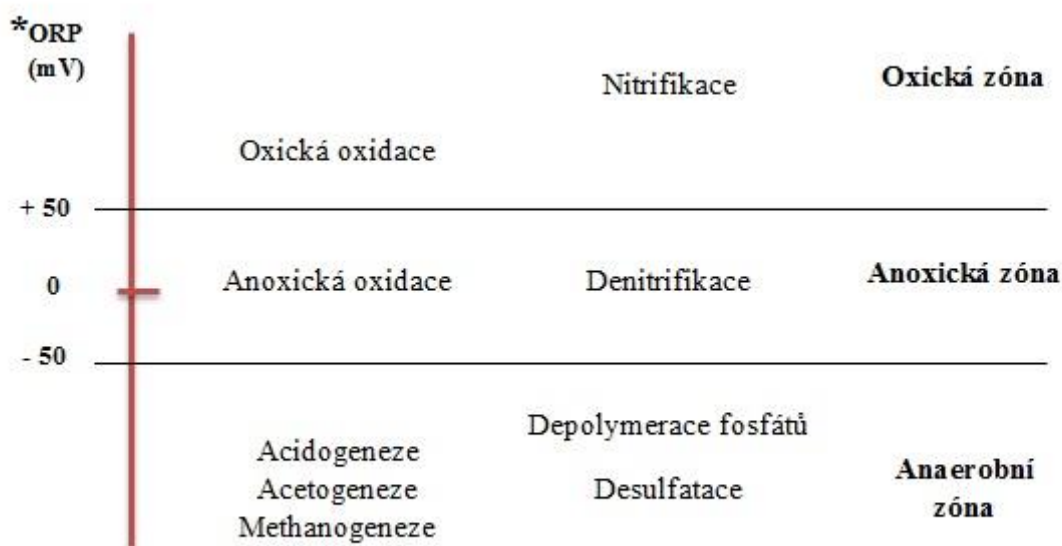
Kromě energie vyžaduje každá živá buňka i zdroj uhlíku, který je využíván pro syntézu buněčné hmoty. Uhlík může být získáván z anorganických sloučenin, poté mluvíme o litotrofních mikroorganismech, nebo může být získáván z organických sloučenin, zde mluvíme o organotrofních mikroorganismech. Drtivá většina mikroorganismů, které se podílejí na čištění odpadních vod, využívají k syntéze biomasy organický uhlík [26]. Tato problematika je podrobnější rozvedena v kapitole 4.1.

Substrát může být navíc dodáván v médiu, mikroorganismy jej tedy musí nejprve transportovat do buněk, tento proces ale vyžaduje energii a jedná se o tzv. exogenní metabolismus. Pro procesy čištění vod je ale typičtější tzv. endogenní metabolismus, kdy je externí substrát vyčerpán, nebo je přítomen jen ve velmi nízké koncentraci. V takovýchto případech musí buňky začít využívat naakumulované nebo zásobní látky [27]. Po vyčerpání i těchto intrabuněčných substrátů dochází většinou k autolýze a rozpadu buňky.

2.3.1 Růst a množení mikroorganismů

Při biologickém čištění odpadních vod jsou hlavním mechanismem odstranění znečištění oxidačně – redukční reakce. Při takovýchto reakcích dochází k přenosu elektronu mezi akceptorem a donorem. Kultivační podmínky jsou založeny na typu akceptoru elektronů a můžeme tak všechny děje rozdělit na:

- **Oxické** – aerobní kultivační podmínky, při kterých je přítomen molekulární kyslík, který zároveň vystupuje jako akceptor elektronů. Nejčastěji je redukován kyslík, který je vázán v molekule vody. Oxidačně – redukční potenciál (ORP) je v takovýchto podmínkách kladný, přibližně od 50 mV výš.
- **Anoxické** – kultivační podmínky, při kterých molekulární kyslík není přítomen, jako akceptor elektronů zde vystupuje dusitanový či dusičnanový dusík. Hodnota ORP se nachází v intervalu 50 až -50 mV.
- **Anaerobní** – kultivační podmínky, při kterých není přítomen ani molekulární kyslík ani dusík, konečným akceptorem elektronů je v tomto případě organická látka. Hodnota ORP je od -50 mV níž [28].



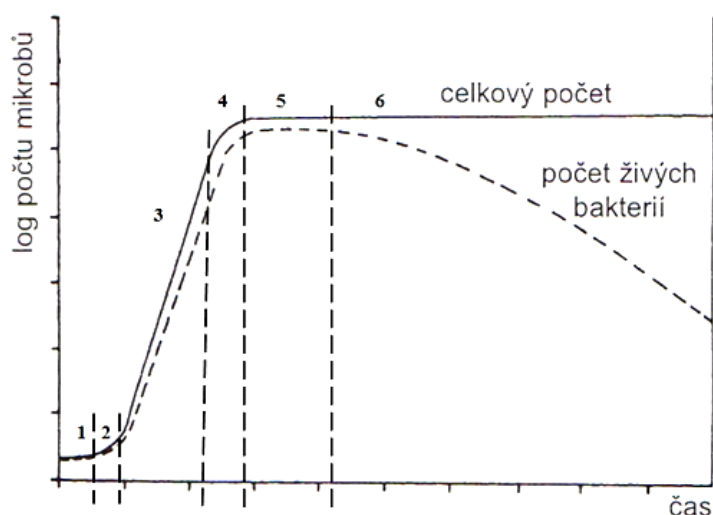
* Uvedené hodnoty ORP jsou uváděny proti nejčastěji používané argentochloridové elektrodě.

Obr. 3 – Biologické procesy v technologii čištění odpadních vod [29]

2.3.2 Růstová křivka

Růst mikroorganismů lze popsat tzv. růstovou křivkou. Tato závislost popisuje mnohonásobné dělení bakteriálních buněk, které probíhá až do spotřebování veškerých živin, či do změny kultivačních podmínek. Růstová křivka má charakteristický průběh a lze ji rozdělit na několik fází [30].

1. **Lag fáze** – buňky se nemnoží, teprve se adaptují na nové prostředí. Vytvářejí si enzymy potřebné pro dělení a zvětšují svůj objem. Délku lag fáze ovlivňuje složení prostředí, dále také velikost a stáří buněk.
2. **Fáze zrychleného růstu** – buňky se již adaptovaly na nové prostředí, začínají se množit s narůstající rychlostí dělení.
3. **Logaritmická/exponenciální fáze** – intenzivní růst buňky do doby dokud není koncentrace živin limitující, všechny buňky se dělí konstantní maximální rychlostí.
4. **Fáze zpomaleného růstu** – dochází k postupnému snížení množení buněk i snížení rychlosti metabolismu v důsledku vyčerpání živin a hromadění metabolitů.
5. **Stacionární fáze** – snížení rychlosti množení, počet nově vzniklých buněk se vyrovnává s počtem odumřelých, mohou vznikat endospory.
6. **Fáze odumírání** – nárůst úbytku buněk, převaha nad přírůstkem, rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu, dochází k rozkladu buněk [12, 31].

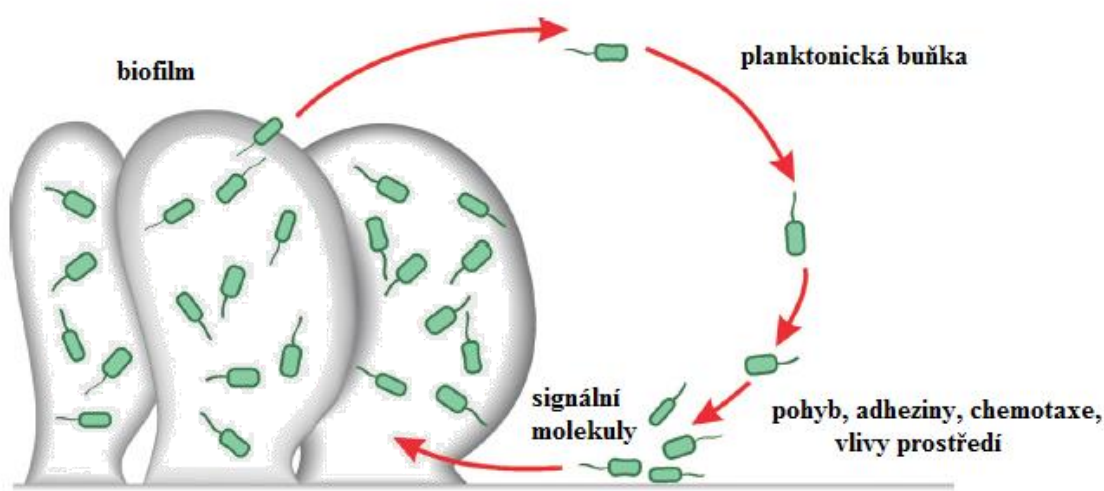


Obr. 4 – Růstová křivka [32]

2.3.3 Biofilm a jeho význam

Biofilm můžeme definovat jako organizované společenství mikroorganismů jednoho či více druhů, které koexistuje v mezibuněčné hmotě - extracelulární polysacharidové matrix (EPS) s možností přichytit se na nejrůznější povrchy (živé i neživé) [33]. Tato společenství mohou být neškodná i patogenní, příkladem může být klasická střevní mikroflóra, která je pro člověka životně důležitá versus biofilmy patogenních bakterií na umělých implantátech způsobující infekci. Biofilmy jsou velice složité struktury, které se liší mimo jiné ve složení EPS, aerobních či anaerobních zónách či složením mikroorganismů [34]. Tvorba biofilmu je pro mikroorganismus velice výhodná, jelikož může dojít ke kolonizaci různých míst, slizová vrstva brání bakterie před nepříznivými vnějšími vlivy jako je vyschnutí či toxické látky (ATB) [35].

Tvorba biofilmu je velice komplexní děj, který je závislý na mnoha faktorech. Zjednodušeně se jedná o přilnutí planktonické buňky či buněk k danému povrchu. Tento proces je známý jako adherence, z počátku má slabý reverzní charakter a je zprostředkována povrchovými strukturami (pili, bičíky), rovněž se zapojují mechanismy jako difúze, Brownův pohyb či chemotaxe. Po úspěšné adhezi bakterií na povrch dojde ke změně jejich vlastností a produkci polysacharidů a jiných polymerů nezbytně nutných pro tvorbu biofilmu. Dochází k vzájemné agregaci a tvorbě stabilního biofilmu. Díky nadměrné tvorbě EPS a vzniku mikrokolonií dojde až k tzv. maturaci biofilmu [36].



Obr. 5 – Tvorba biofilmu [36]

2.3.4 Využití mikroorganismů v čištění technologických odpadních vod

Živé organismy, především mikroorganismy, lze využít v technologii čištění odpadních vod, jelikož se z velké části podílejí na reakčních procesech, v tomto případě na ovlivnění rozpustnosti látek. Jejich metabolické produkty lze využít jako srážecí činidla pro řadu látek a přímo tak ovlivňovat převod látek z pevné fáze do kapalné a naopak. Jako konkrétní příklad můžeme uvést ionty železa, sulfan či jiné sloučeniny síry v různých oxidačních stavech.

Nejnámějšími příklady procesů, kterými je možné imobilizovat řadu toxických kovů, jsou děje spojené s biologickou redukcí síranu, při nichž vznikají ionty S^{2-} vystupující v roli srážecího činidla. Velkým problémem ale může být nutná přítomnost anaerobních podmínek pro správnou funkci mikroorganismů, které umožňují tyto procesy. V tomto kolonovém systému mluvíme o síran redukujících bakteriích (SRB) např. *Desulfobacter hydrogenophilus*, které jsou striktními anaeroby, sebemenší koncentrace kyslíku je pro ně tedy toxická. Právě tyto mikroorganismy produkují klíčové ionty S^{2-} , které následně srážejí toxické ionty kovů na příslušné sulfidy, v drtivé většině nerozpustné ve vodě [37].

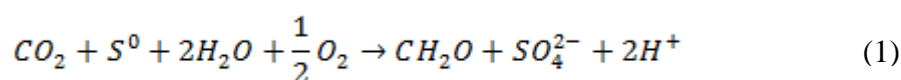
Dosud publikované realizace využívající výše popsaného systému k biologické extrakci kovů jsou založeny na principu dvoustupňového uspořádání, kde v prvním stupni dochází činností mikroorganismů k uvolnění extrahovaného kovu z horninové matrice a ve druhém stupni následuje jeho vyloučení z vodné fáze biologickým srážením. Většina těchto uspořádání nebyla doposud schopna překlenout laboratorní provedení. Ve stavu nynější techniky chybí metody imobilizace některých kovů (Pb, Ni, As, Cu, Hg) z odpadních vod průmyslového typu, které by byly účinné a nízkonákladové.

3 Třístupňový kolonový systém LITHIM

Kolonový systém LITHIM je určený k zachycení iontů z technologicky znečištěných vod biologickou imobilizací. Principem tohoto systému je kombinovatelnost tří modulů se specifickými funkcemi. Těla modulů jsou vyplněny náplněmi, které slouží jako nosiče mikrobiální biomasy v podobě biofilmu a zároveň umožňují maximalizovat styčnou plochu mezi vodou určenou k přečištění a roztokem sulfidových aniontů.

První modul slouží především k vytvoření ideálních podmínek pro růst síru oxidujících bakterií např. *Thiobacillus*. Do modulu je přiváděn živný roztok obsahující např. dusičnany, fosforečnany, hydrogenuhličitany. Z prvního modulu kapalina přechází do druhého modulu, kde je udržováno konsorcium síran redukujících bakterií a kde může být regulováno pH. Třetí modul slouží ke srážení kovů ze znečištěných vod přiváděných se směsí srážedel z druhého modulu. Celé zařízení je možno vybavit odtahem metabolických plynů [37].

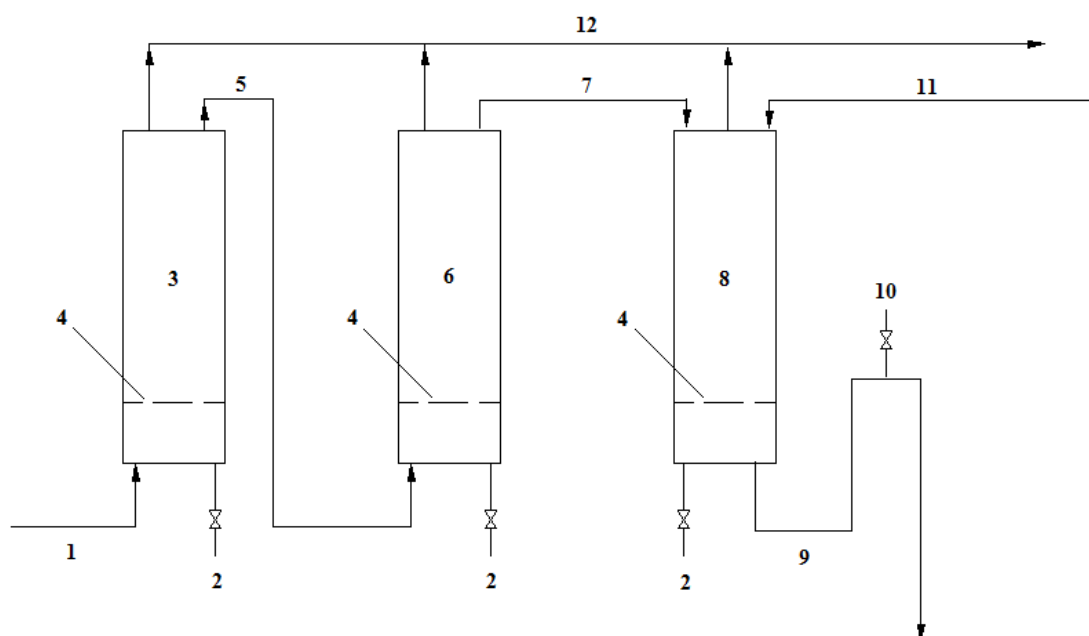
Systém LITHIM se tedy skládá z prvního modulu (sírný modul), který je vyplněn elementární sírou o vhodné frakci (3,15 – 4,0 mm) získané ve výrobě kyseliny sírové v Synthesii Pardubice, která je navíc pokryta sírou oxidujícími bakteriemi *Thiobacillus denitrificans* produkující síranové anionty. Tento modul je opatřen vstupem pro přívod živin, výstupem pro vedení roztoku síranových aniontů ústící do druhého modulu. Síru oxidující bakterie *T. denitrificans* oxidují elementární síru podle rovnice č. 1.



Druhý modul (sulfidový modu) je naplněn inertním nosičem, např. zeolitem, na kterém jsou ukotveny síran redukující bakterie *D. hydrogenophilus*. Tyto bakterie jsou živeny roztokem síranových iontů přicházejícími spolu s dalšími případnými produkty metabolismu bakterií *T. denitrificans* z prvního modulu. Bakterie *D. hydrogenophilus* přeměňují sírany na sulfidy. Dále je tento modul opatřen vstupem pro přívod síranových aniontů z prvního modulu a výstupem pro vedení sulfidových aniontů ústící do třetího modulu.

Třetí modul (imobilizační modul) je bez náplně, popřípadě může být naplněn inertním materiálem sloužícím především k prodloužení doby kontaktu vody určené k přečištění s roztokem sulfidových aniontů. Imobilizační modul je opatřen trubicí pro vedení roztoku sulfidových aniontů z druhého modulu, přívodní trubicí pro přívod vody určené k přečištění, výstupní trubicí pro odvod přečištěné vody a odvodem kalu či sraženin. Na výstupní trubce pro odvod přečištěné vody může být s výhodou umístěn odvzdušňovací ventil [37].

Vodou určenou k čištění rozumíme zejména průmyslovou odpadní vodu, znečištěnou ionty kovů, jejichž sulfidy jsou ve vodě nerozpustné. Jedná se zejména o ionty kovů obsahující Pb, Zn, Ni, Cr, As, Cu, Hg a jiné. Podrobné schéma třístupňového kolonového systému LITHIM je zobrazeno na obr. č. 6.



Obr. 6 – Třístupňový systém LITHIM

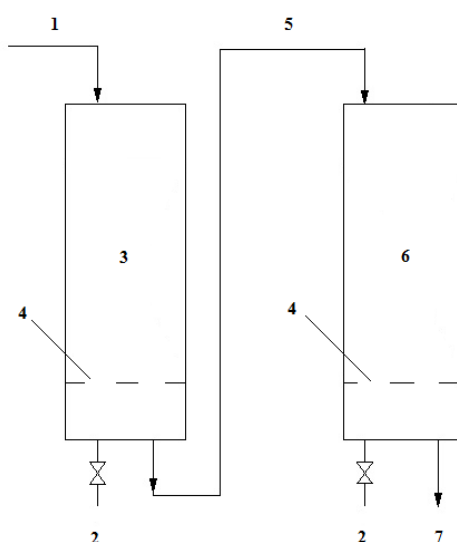
- 1 - přívod živin, 2 - výpusť, 3 - sirný modul, 4 - porézní přepážka, 5 - odvod síranů a metabolitů, 6 - sulfidový modul, 7 - odvod sulfidů, 8 - imobilizační modul, 9 - odvod přečištěné vody, 10 - odvzdušňovací ventil, 11 - přívod technologicky znečištěné vody, 12 - odtah plynů**

3.1 Zjednodušený dvoustupňový kolonový systém LITHIM

Cílem této práce je optimalizace pouze prvního stupně kolonového systému LITHIM. Proto byl celkový třístupňový systém lehce pozměněn a zjednodušen. Namísto tříkolonového systému je využito pouze dvoukolonový, obsahující první (aerobní) kolonu a druhou (anaerobní) kolonu. Poslední (imobilizační) kolona je pro optimalizaci prvního stupně nepotřebná, proto je v rámci zjednodušení celého systému odstraněna. Rovněž je lehce pozměněna konstrukce, jak je patrné na obr. č. 7.

Obě kolony jsou vyrobeny ze skla, propojeny jsou pak gumovými hadicemi. Pro laboratorní testy byly vytvořeny celkem čtyři dvojice kolon, tedy čtyři systémy, každý obsahující jiný mikroorganismus v aerobní koloně. Referenční dvojice kolon obsahuje mikroorganismy z původního tříkolonového systému LITHIM, tedy bakterie *T. denitrificans* imobilizované na elementární síře o vhodné frakci (3,15 – 4,0 mm) v koloně první, vytvářející vhodné anaerobní podmínky pro bakterie *D. hydrogenophilus* imobilizované na zeolitu v koloně druhé.

Zbylé tři systémy obsahují v první koloně vytipované aerobní mikroorganismy (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*) imobilizované na vybraných akvaristických nosičích, vytvářející vhodné anaerobní podmínky pro bakterie *D. hydrogenophilus* imobilizované na zeolitu v koloně druhé.



Obr. 7 – Zjednodušený dvoustupňový systém LITHIM

1 - přívod živin, 2 - výpusť, 3 - aerobní kolona, 4 - porézní přepážka,
5 - odvod metabolitů, 6 - anaerobní kolona, 7 - odvod sulfidů

4 Použité mikroorganismy

Tato práce se zabývá především biologickým čištěním odpadních vod. U těchto procesů je zapotřebí klíčového prvku, kterým jsou mikroorganismy, v tomto případě bakterie. Díky jejich metabolické činnosti dochází až ke konečnému přečištění technologicky znečištěné vody. Po prostudování dostupné literatury byly vybrány celkem tři aerobní mikroorganismy [38]. Celkem je tedy využito pět druhů bakterií, dvou anaerobních (*T. denitrificans*, *D. hydrogenophilus*) a tří aerobních (*M. luteus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*).

4.1 Metabolismus mikroorganismů

Pod pojmem metabolismus mikroorganismů se skrývá celá řada procesů a biochemických reakcí, kterými si daný organismus získává energii a živiny potřebné k životu a reprodukci. Pokud budeme mluvit pouze o bakteriích, už jenom tato skupina organismů využívá nejrůznější metabolické pochody a díky tomu je můžeme rozdělit do mnoha kategorií dle určitých kritérií.

Jedním z nejzákladnějších rozdělení organismů je dle způsobu, jakým si jsou schopny obstarat uhlík pro tolik potřebnou syntézu buněčné hmoty. Heterotrofní organismy využívají jako zdroj uhlíku organické substráty, v drtivé většině spolu s kyslíkem. Část organických látek oxidují s využitím kyslíku na zplodiny s nízkým obsahem energie (CO_2 , H_2O) a získanou energii využívají k zajištění životních dějů, např. k syntéze nových složek svého těla. Autotrofní organismy na rozdíl od heterotrofních přijímají ze svého okolí jako zdroj uhlíku CO_2 a energii získávají buď oxidací anorganických látek (chemolitotrofní bakterie), nebo ve formě světelné energie (fototrofní bakterie a zelené rostliny, tzv. fotoautotrofní organismy) [39, 40].

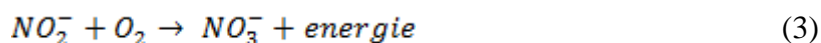
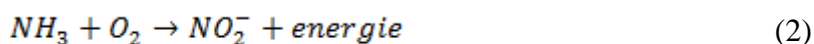
Heterotrofní organismy můžeme dále rozdělit na další kategorie vzhledem k tomu, jaké mají nároky na kyslík. Prvním logickým rozdělením jsou tedy aerobní organismy, které vyžadují kyslík ke svému životu a anaerobní organismy, pro které je přítomný kyslík toxický [41, 42, 43]. Toto rozdělení ovšem není tak jednoduché jak se zdá, přesnější specifikaci uvádí tabulka č. 1.

Tab. 1 – Rozdělení mikroorganismů podle nároku na kyslík

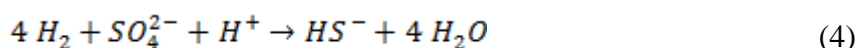
Aerobní organismy		Anaerobní organismy	
Obligátně aerobní	vyžadují k životu kyslík	Obligátně anaerobní	přítomnost kyslíku je pro ně toxická
Fakultativně anaerobní	využívají kyslík, pokud je přítomen, mají i anaerobní způsob tvorby energie	Aerotolerantní anaeroby	nevyužívají kyslík, ale nejsou jeho přítomností ohroženy
Mikroaerofilní	vyžadují nízkou koncentraci kyslíku		

Autotrofní organismy využívají jako zdroj uhlíku oxid uhličitý. Autotrofy, které mají největší význam, jsou tzv. nitrifikační a síran redukující bakterie [44, 45].

Nitrifikační bakterie se účastní následujících reakcí, které popisují rovnice č. 2 a 3.

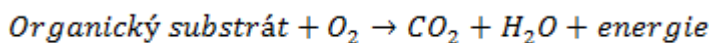


Síran redukující bakterie se účastní reakcí, které popisuje rovnice č. 4.

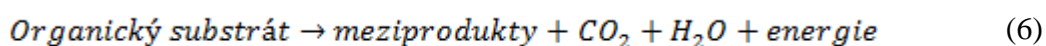


A v neposlední řadě lze mikroorganismy rozdělit dle toho, jaký metabolismus využívají, zda aerobní či anaerobní. Při aerobních podmínkách jsou rozpustné organické sloučeniny oxidovány na konečné produkty oxid uhličitý a vodu [46] dle rovnice č. 5.

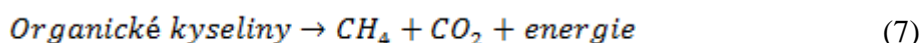
(5)



Při anaerobních podmínkách se rozpustné organické látky rozkládají na meziprodukty, jako jsou organické kyseliny či alkoholy, společně s produkcí oxidu uhličitého a vody. Tento děj popisuje rovnice č. 6. Mnoho meziproduktů, jako je kyselina máselná, merkaptany a sulfan, mají typický zápach.



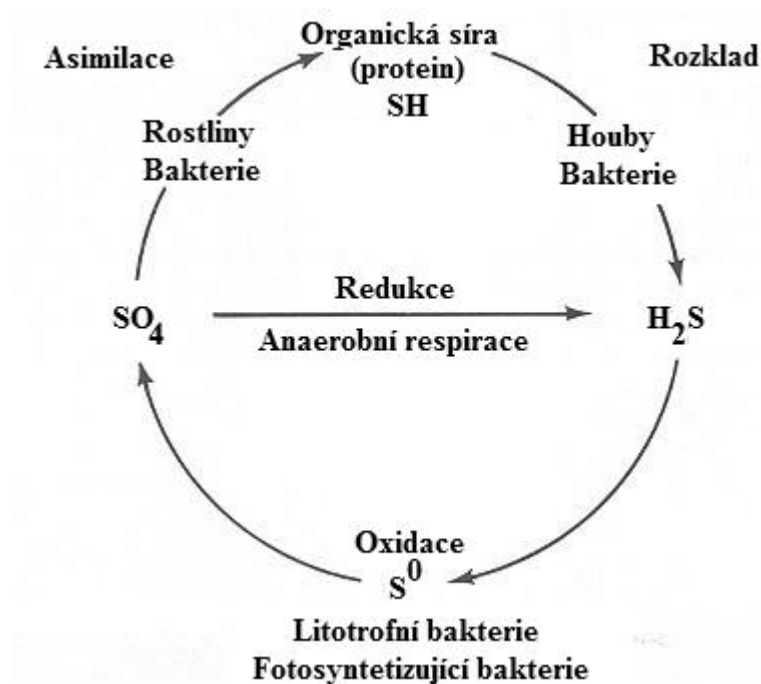
Při anaerobních podmínkách se může vytvořit přebytek organických kyselin, a pH roztoku klesne natolik, že dojde k vytvoření fermentačního procesu. Existují-li však vhodné podmínky, může dojít k zabránění tvorby přebytečné kyselosti při výrobě meziproduktů organických kyselin tak, že populace methanogenních bakterií využije vznikající organické kyseliny jako substrát a přemění je na metan a oxid uhličitý dle rovnice č. 7.



4.2 Síran redukující bakterie

Síran redukující bakterie (SRB) je skupina ubikvitárních anaerobních mikroorganismů. Řadíme zde Gram negativní i pozitivní bakterie či archea. Všechny tyto mikroorganismy mají jedno společné, využívají síran jakožto terminálního akceptoru elektronu, např. k degradaci organických sloučenin. Tyto mikroorganismy mají neodmyslitelnou úlohu v udržování nejrůznějších mikroprostředí, proto je můžeme nalézt v půdách, mořské vodě, horkých pramenech, ale i odpadních vodách a kalech [47].

Síran redukující bakterie využívají tzv. elektron-akceptorového metabolismu a mají tak zásadní roli v koloběhu síry. Využívají síran jako terminální elektronový akceptor při degradaci organických sloučenin, což vede k produkci sulfanu. Následně může být vzniklý sulfid oxidován aerobně nebo i anaerobně na elementární síru či zpět na síran [48]. Veškeré transformace jsou uvedeny na obrázku č. 8.



Obr. 8 – Transformace síry [49]

Tuto skupinu mikroorganismů můžeme z metabolického hlediska rozdělit na dvě skupiny: SRB s neúplnou oxidací substrátu a SRB s úplnou oxidací substrátu.

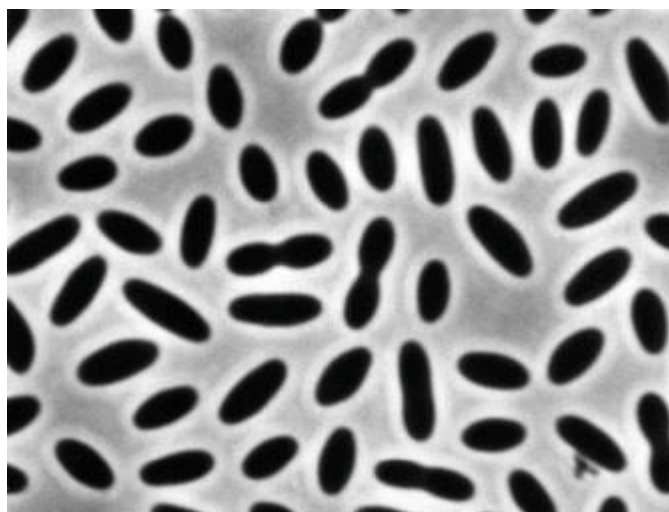
SRB s neúplnou oxidací substrátu nemají mechanismus umožňující oxidaci acetyl-CoA, který je následně vylučován jako kys. octová. Jako skupina rostou značně rychleji než SRB s úplnou oxidací substrátu, za optimálních podmínek mohou některé druhy *Desulfovibrio* růst již za 3–4 hodiny.

SRB s úplnou oxidací substrátu jsou schopny rozkládat i takové substráty jako jsou sukcinát, fumarát či malát až na konečný produkt, kterým je oxid uhličitý. Růst této skupiny mikroorganismů je značně pomalejší, generační doba činí 20 hod i více. Zástupci této skupiny jsou např. *Desulfococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfomonas* [17].

4.2.1 *Desulfobacter hydrogenophilus*

Desulfobacter hydrogenophilus patří do skupiny striktně anaerobních SRB. Jednotlivé buňky můžeme morfologicky klasifikovat jako protáhlé oválné tyčinky velké 1–3 μm , které jsou nepohyblivé, nesporulující a Gram negativní. Od většiny zástupců skupiny SRB se liší svými nároky na teplotu. Původně je tato bakterie mezofilní, optimální teplota pro růst činí 30 $^{\circ}\text{C}$, avšak dokáže růst, ač značně zpomaleně, i při teplotách 0 $^{\circ}\text{C}$. Tento bakteriální kmen byl poprvé izolován v roce 1987 německým mikrobiologem Friedrichem Widdeltem [50].

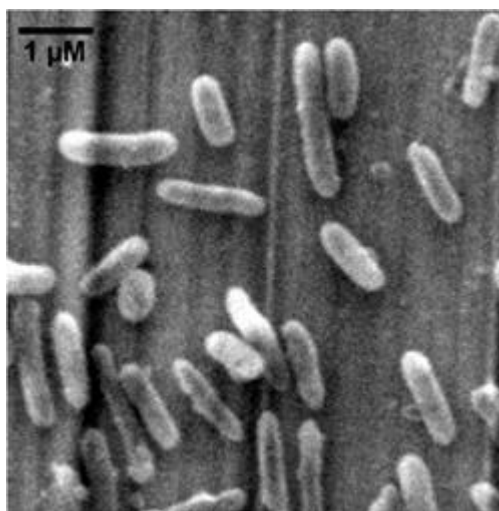
Z biochemického hlediska se řadí do skupiny SRB s úplnou oxidací substrátu, tudíž je schopen rozložit organické substráty až na oxid uhličitý. Jeho klíčovou rolí je biomineralizace anaerobních mořských mikroprostředí, jelikož je schopen redukovat sírany až na sulfidy a významně se tak podílí na koloběhu síry. *D. hydrogenophilus* je jediný popsáný zástupce rodu *Desulfobacter*, který je schopen růst chemolithoautotrofně. Za využití vodíku jakožto dárce elektronů a oxidu uhličitého jako zdroje uhlíku je schopen redukovat sírany na sulfidy. Rovněž ale může vystupovat jako fakultativní lithoautotrof s využitím substrátů jako jsou acetát, pyruvát, ethanol, které zde vystupují zároveň jako dárce elektronů i zdroje uhlíku [51, 52].



Obr. 9 – *Desulfobacter hydrogenophilus* [48]

4.3 *Thiobacillus denitrificans*

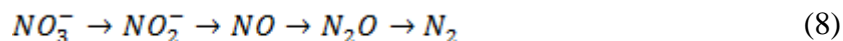
Thiobacillus denitrificans patří do skupiny síru oxidujících bakterií (SOB). Morfologicky můžeme jednotlivé buňky klasifikovat jako krátké pohyblivé Gram negativní tyčinky. Od drtivé většiny ostatních zástupců SOB se liší svými nároky na kyslík, jelikož se jedná o fakultativně anaerobní bakterie. Podobně jako *Desulfobacter hydrogenophilus* i *T. denitrificans* se řadí k obligátním chemolitoautotrofům [53]. Jako fakultativní anaerob dokáže využívat dusičnany namísto kyslíku jako elektronový akceptor. energii pro růst získává oxidací redukovaných forem anorganických sírných sloučenin, ale rovněž je schopen i fixace oxidu uhličitého skrze Calvinův cyklus či dokonce redukce dusičnanu a dusitanů [54]. Díky tomu tvoří *T. denitrificans* významnou roli v propojení koloběhu síry a dusíku. Nejčastěji se vyskytuje v půdě, mořských i sladkovodních sedimentech, v kanalizacích či odpadních vodách.



Obr. 10 – *Thiobacillus denitrificans* [55]

V této práci je *T. denitrificans* využit především za anoxických podmínek, jelikož je schopen v první koloně vytvářet ideální podmínky a substrát pro *D. hydrogenophilus* v koloně druhé. Nejen, že biologicky redukuje dusičnany na dusík, který je pro vznik anaerobních podmínek téměř nepostradatelný, ale rovněž dokáže z elementární síry, na které je imobilizován, uvolňovat sírany. Ty v druhé koloně slouží jako nepostradatelný substrát pro následnou biotransformaci síranů na sulfidy.

Dusičnany ve vodách jsou obecně považovány za kontaminanty a mohou ohrozit zdraví jedince, stejně tak jako mohou zapříčinit snížení kvality vody. Vysoká koncentrace dusičnanu v pitné vodě může způsobit methemoglobinémii i jiné zdravotní komplikace [56]. Elegantní metodou, jak odstranit dusičnany může být právě biologická transformace skrze bakteriální metabolismus, kterou popisuje rovnice č. 8.

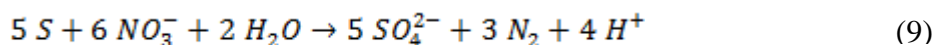


Takováto metoda je výhodná především v tom, že výsledkem biotransformace je neškodný dusík v plynném skupenství. Mnohé druhy bakterií jsou schopny denitrifikace, v podstatě je můžeme rozdělit na dvě skupiny na základě druhu substrátu vystupujícího v roli elektronového donoru.

První skupinu tvoří denitrifikační bakterie, které využívají organický substrát. Takový pochod se nazývá heterotrofní denitrifikace (*Bacillus*, *Pseudomonas*) [57]. Druhou skupinu tvoří denitrifikační bakterie, které využívají jednoduché anorganické sloučeniny. Tento pochod se pak nazývá autotrofní denitrifikace a jedním ze zástupců této skupiny je právě *T. denitrificans* [58].

Tento bakteriální kmen byl využit především proto, jelikož získává energii k růstu oxidací elementární síry (nosiče), přičemž se uvolňují elektrony. Při anoxických podmínkách jsou dusitany a dusičnany redukovány právě těmito uvolněnými elektrony. Celý proces může být navíc katalyzován bakteriálními enzymy. Získaná energie je využita k utilizaci oxidu uhličitého jakožto zdroje uhlíku [59].

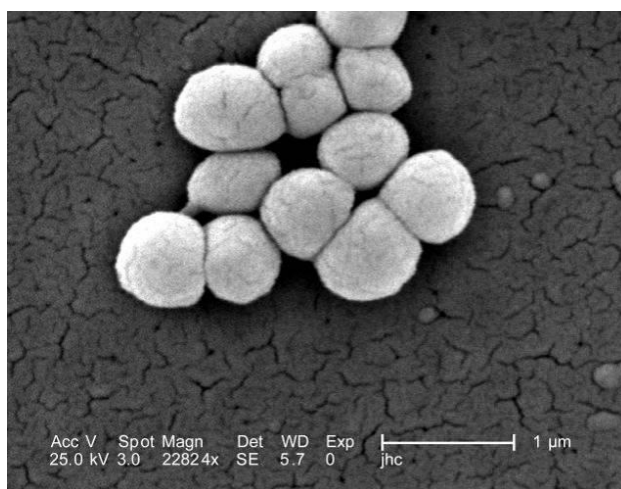
Optimální autotrofní denitrifikace je ovlivněna mnohými faktory. Těmi nejdůležitějšími je druh substrátu (elektronového donoru) a hodnota pH. Odstraňování dusičnanů autotrofní denitrifikací je spojeno s produkcí vodíkových iontů, které vedou ke snížení celkového pH [60]. Celý proces s využitím elementární síry popisuje následující rovnice č. 9.



Úprava pH je tedy nezbytná. A to tak, aby bylo celkové pH udržováno nad hodnotou 5,5 pro ideální bakteriální aktivitu. Navíc se běžně přidává i kamenný vápenec, který udržuje stabilní pH po celou dobu denitrifikace. Optimální poměr elementární síry a vápence byl přibližně 1:3.

4.4 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus je Gram pozitivní bakterie, která tvoří kokovité buňky o velikosti 0,5 – 3,5 μm . Jednotlivé buňky nejsou pohyblivé, často se vyskytují v tetradách. Jedná se o striktně aerobní bakterie s respiračním metabolismem, které jsou katalasa i oxidasa pozitivní. Můžeme je nalézt primárně na pokožce savců, sekundárně se vyskytuje jako saprofyt v půdě, prachu, vodě i vzduchu. Je součástí přirozené flóry. Na agarových plotnách (MPA) vytváří světle žluté kolonie. Růstové optimum se udává od 25 – 37 $^{\circ}\text{C}$ [61, 62].

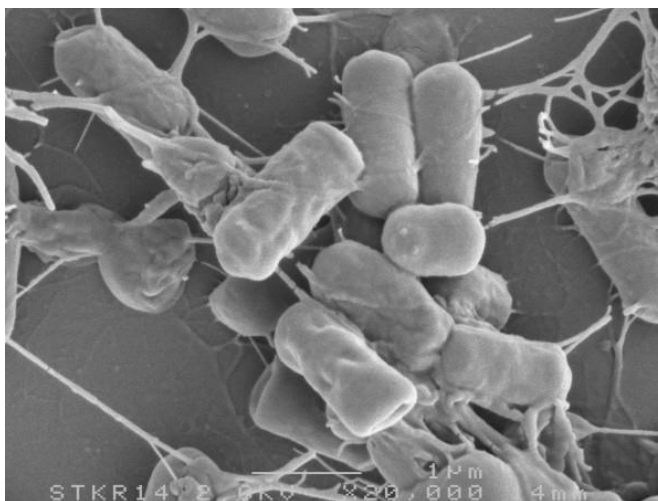


Obr. 11 – *Micrococcus luteus* [63]

M. luteus je obecně považován za nepatogenní mikroorganismus, ovšem dokáže vyvolat infekce u jedinců s oslabeným imunitním systémem (např. HIV) [64]. Jelikož se jedná o striktně aerobní bakterii, oxiduje organický substrát až na oxid uhličitý a vodu, přičemž neprodukuje kyselé produkty z cukrů (glukosy), čímž se liší od většiny dalších zástupců rodu *Micrococcus*. Dobře roste i v prostředí s nízkou koncentrací vody či vysokou koncentrací solí, je však nutno podotknout, že netvoří spóry. Navíc je schopen využívat jako substrát i velmi toxické organické molekuly či kovy a proto může být využit v degradaci kovů jako je např. zinek, olovo či nikl. V této práci byl *M. luteus* zvolen především pro svou nenáročnou kultivaci a efektivní respirační metabolismus [65].

4.5 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis je Gram pozitivní sporulující katalasa pozitivní bakterie, morfologicky můžeme jednotlivé buňky klasifikovat jako krátké tyčinky o velikosti 4 – 10 μm , které velmi často tvoří krátké řetízky [66]. Díky tvorbě endospór je tato bakterie schopna přežít i extrémní podmínky, především razantní změny teplot a sucho. Tato bakterie patří do skupiny obligátních aerobních bakterií, existují zmínky o tom, že může fungovat také jako fakultativně anaerobní bakterie. Jedná se o nepatogenní mikroorganismus, který můžeme nalézt přirozeně v zažívacím traktu přežvýkavců i lidí, dále v půdě a to především ve formě endospór, ve vodě či rozložených zbytcích rostlin. Na agarových plotnách (MPA) vytváří suché drsné kolonie, růstové optimum se udává v rozmezí 30 – 37 $^{\circ}\text{C}$ [67, 68].

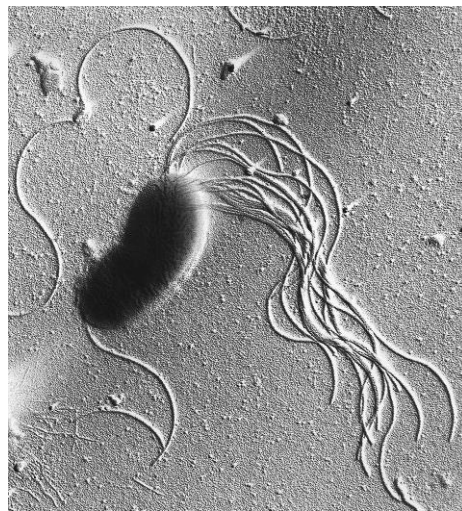


Obr. 12 – *Bacillus subtilis* [69]

Tato bakterie je považována za jednu z nejvíce prozkoumaných, proto slouží jako tzv. modelový organismus pro laboratorní studie. Díky dobré odezvě na genetickou manipulaci je hojně využíván v molekulární biologii, především pro tvorbu rekombinantních proteinů [70, 71]. Jak již bylo zmíněno, tato bakterie je nepatogenní, avšak může kontaminovat potraviny, ve velmi vzácných případech může dojít k alimentární otravě. *B. subtilis* je totiž využíván jako biologický fungicid. Může se rovněž aplikovat na semena rostlin jako fungicid. Princip spočívá v kompetici buněk *B. subtilis*, které kolonizují kořenový systém rostliny a houbovými organismy, které ve výsledku způsobují choroby. Díky rychlému a značnému růstu tak *B. subtilis* neponechá houbovým organismům (plísním) dostatek živin, což vede k jejich úhynu [72, 73].

4.6 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens je Gram negativní bakterie, katalasa i oxidasa pozitivní, morfologicky můžeme jednotlivé buňky klasifikovat jako krátké rovné nebo nepatrně zahnuté tyčinky o velikosti 2 – 5 μm [74, 75]. Jednotlivé tyčinky mají několik bičíků, což umožňuje pohyb. Má velice přizpůsobivý metabolismus, proto bývá často nevídanou kontaminací. Tato bakterie patří do skupiny obligátních aerobních bakterií, avšak některé kmeny jsou schopny využívat dusičnany místo kyslíku jako konečný akceptor elektronu během buněčného dýchání [76]. *P. fluorescens* je považována za nepatogenní bakterii, která se běžně vyskytuje v půdě, vodách či zkažených potravinách. Na agarových plotnách (MPA) vytváří lesklé hladké zelenožlutě pigmentované kolonie, růstové optimum je 25 – 30 °C [77].



Obr. 13 – *Pseudomonas fluorescens* [78]

Kolonie mají svou charakteristickou barvu díky pigmentu pyoverdinu. Právě tento pigment dodává *P. fluorescens* další specifickou vlastnost a tím je fluorescence pod UV zářením [79]. Extrémně všestranné metabolické schopnosti *P. fluorescens* umožňují této bakterii přetrvávat v širokém spektru prostředí mimo savčího hostitele včetně rhizosféry, povrchů rostlin, nesterilních léčiv, sprchových hlav a dokonce i vnitřních stěnových ploch [80].

5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na vytipování vhodných mikroorganismů, které by mohly nahradit v současnosti používané bakterie *Thiobacillus denitrificans* v prvním stupni kolonového systému LITHIM. Cílem experimentální části bylo provést laboratorní testy s vybranými mikroorganismy (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*) na zjednodušeném kolonovém systému LITHIM, získané výsledky experimentů vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 Materiál

6.1 Použité mikroorganismy

Pro optimalizaci prvního stupně kolonového systému LITHIM byl použit referenční kmen *Thiobacillus denitrificans* DSM 12475 z německé sbírky mikroorganismů DSMZ. Stejně tak byl použit i referenční kmen druhého stupně kolonového systému LITHIM, *Desulfobacter hydrogenophilus* DSM 3380 rovněž z německé sbírky mikroorganismů DSMZ.

Jednotlivé testy byly prováděny na bakteriích *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, *Micrococcus luteus* CCM 735, *Bacillus subtilis* CCM 2216, všechny tyto mikroorganismy byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů, Brno. Všechny výše zmíněné kmeny byly pro dlouhodobé uchování uloženy v kryozkumavkách v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

6.2 Pomůcky

Laboratorní sklo – kádinky, odměrné válce, odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky různých objemů, nálevky, stříčky, pinzety, gumové zátky, plastové misky, lžičky, skleněné i plastové zkumavky (50, 15 ml), kahan, mikropipety, špičky, jednorázové očkovací kličky, Petriho misky, krycí a podložní sklíčka, gumové hadice, kolony.

6.3 Chemikálie a reagentie

Seznam všech použitých chemikálií je uveden v tabulce č. 2.

Tab. 2 – Seznam použitých chemikálií

Název, čistota	Vzorec	Výrobce
Agarový prášek		HiMedia
Destilovaná voda	H ₂ O	UPa
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.	KH ₂ PO ₄	Lach-Ner
Dusičnan draselný, p.a.	KNO ₃	Lach-Ner
Dusičnan sodný, p.a.	NaNO ₃	Lach-Ner
Etanol denaturovaný	C ₂ H ₅ OH	Penta
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, p.a.	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	Lach-Ner
Hydrogenuhlíčan sodný, p.a.	NaHCO ₃	Penta
Chlorid amonný, p.a.	NH ₄ Cl	Penta
Chlorid draselný, p.a.	KCl	Lach-Ner
Chlorid hořečnatý hexahydrát, p.a.	MgCl ₂ · 6H ₂ O	Lach-Ner
Chlorid sodný, p.a.	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý hexahydrát, p.a.	CaCl ₂ · 6H ₂ O	Lach-Ner
Chlorid železitý	FeCl ₃	Penta
Krystalová violet	C ₂₅ H ₃₀ N ₃ Cl	Merck
Kvasnicový extrakt		HiMedia
Lugolův roztok	KI ₃	Merck
Masový extrakt		HiMedia
Odbarvovací roztok		Merck
Pepton bakteriologický		HiMedia
Safranin	C ₁₈ H ₁₂ N _x	Merck
Síran amonný, p.a.	(NH ₄) ₂ SO ₄	Lach-Ner
Síran hořečnatý heptahydrát, p.a.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Lachema
Síran manganatý monohydrát, p.a.	MnSO ₄ · H ₂ O	Penta
Síran sodný, p.a.	Na ₂ SO ₄	Lach-Ner
Síran železnatý heptahydrát, p.a.	FeSO ₄ · 7H ₂ O	Lach-Ner
Thioglykolát sodný 96%	C ₂ H ₃ O ₂ NaS	HiMedia
Thiosíran sodný, p.a.	Na ₂ S ₂ O ₃	Lachema

6.4 Přístroje

Seznam všech použitých chemikálií je uveden v tabulce č. 3.

Tab. 3 – Seznam použitých přístrojů

Název	Výrobce
Analytické váhy	Kern ABJ
Autokláv	System VX-40
Digitální jednokanálový multimetr HQ30D	Hach
Horkovzdušný sterilizátor	Memmert
Chladnička s mrazákem	Electrolux, Gorenje
INTELLICAL Standardní gelová pH elektroda	Hach
INTELLICAL standardní plnitelná ORP elektroda	Hach
INTELLICAL Standardní sonda LDO	Hach
Mikroskop	Nikon Eclipse 80i s dig. kamerou DSFI-1
Předvážky	Kern 440-49N
Termostat	Memmert
Třepačka	Heidolph Rotamax 120
Záznamník růstu buněk RTS-1C	BioSan

7 Kultivační média a roztoky

7.1.1 Masopeptonový agar, Masopeptonový bujón

Rozdíl mezi masopeptonovým agarem (MPA) a masopeptonovým bujónem (MPB) je pouze v přítomnosti agarového prášku, proto je tabulka č. 4 uvedena pro oba druhy médií. Dle složení uvedeného v tabulce č. 4 bylo naváženo celkem 20 g přípravku, v případě MPA 40 g. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Následně bylo pH výsledného roztoku upraveno na hodnotu $7,2 \pm 0,2$. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. V případě MPA bylo čerstvě připravené médium rozlito do sterilních plastových Petriho misek o tloušťce vrstvy pohybující se mezi 3 - 5 mm. V případě MPB bylo médium ponecháno v zásobní lahvi. Takto připravené půdy byly uchovávány v chladničce při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 4 – Složení masopeptonového bujónu a agaru

Složení	g/l
Masový extrakt	10,0
Pepton bakteriologický	5,0
Chlorid sodný	5,0
Agar (pouze u MPA)	20,0
Konečné pH (při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ $7,2 \pm 0,2$)	

7.1.2 S8 médium

Dle složení uvedeného v tabulce č. 5 bylo naváženo celkem 28,77 g přípravku. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Takto připravené médium bylo ponecháno v zásobní lahvi a uchováváno v chladničce při teplotě $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 5 – Složení S8 média

Složení	g/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,2
KH_2PO_4	11,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,03
FeCl_3	0,02
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	10
NaHCO_3	0,5
KNO_3	5

7.1.3 Modifikované Van Houten médium

Dle složení uvedeného v tabulce č. 6 bylo naváženo celkem 9,26 g přípravku. Následně bylo přidáno 5 ml zásobního roztoku thioglykolátu sodného a 100 ml zásobního roztoku solí. Složení zásobního roztoku solí je uvedeno v tabulce č. 7, postup přípravy roztoku je totožný s přípravou média. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené médium bylo ponecháno v zásobní lahvi a uchováváno v chladničce při teplotě 5 °C.

Tab. 6 – Složení modifikovaného Van Houten média

Složení	g/l
Pepton bakteriologický	0,216
Kvasničný extrakt	0,204
Roztok thioglykolátu sodného	5 ml (zás. roztok 3,5 g/350 ml dest. H ₂ O)
Na ₂ SO ₄	4,953
KH ₂ PO ₄	0,409
NH ₄ Cl	0,297
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,091
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0,178
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,32
KCl	0,385
NaHCO ₃	1,209
Zásobní roztok solí	100 ml/l

Tab. 7 – Složení zásobního roztoku solí

Složení	g/l
NH ₄ Cl	3,5
KH ₂ PO ₄	0,6
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	18,35
CaCl ₂ ·6H ₂ O	10

7.1.4 Fyziologický roztok

Byl připraven 1 litr fyziologického roztoku. Do 1 litru destilované vody bylo přidáno 9 g NaCl. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a uchováván v chladničce při teplotě 5 °C.

7.1.5 Živný roztok pro *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*

Byl připraven 1 litr živného roztoku pro *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*. Živný roztok se skládal z 0,6 litru MPB a 0,4 litru kohoutkové vody, která byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

7.1.6 Živný roztok pro *T. denitrificans*

Byl připraven 1 litr živného roztoku pro *T. denitrificans*. Živý roztok obsahoval NaNO₃ o koncentraci 50 mg/l NO₃⁻. Bylo naváženo 0,0685 g NaNO₃, který byl rozpuštěn v 1 litru kohoutkové vody, která byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

8 Pracovní postup

8.1 Příprava aerobní bakteriální kultury

Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury příslušného aerobního mikroorganismu (*M. luteus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*) uschovaného v kryozkumavkách. Následně byla inkubována 24 – 48 hod při 30 °C, poté byla přeočkována na nové médium (MPA, MPB) a opět inkubována 24 – 48 hod při 30 °C. Takto připravené kultury na MPA byly uloženy do chladničky, kde byly při teplotě 5 °C uchovány pro další manipulaci.

8.2 Příprava anaerobní bakteriální kultury

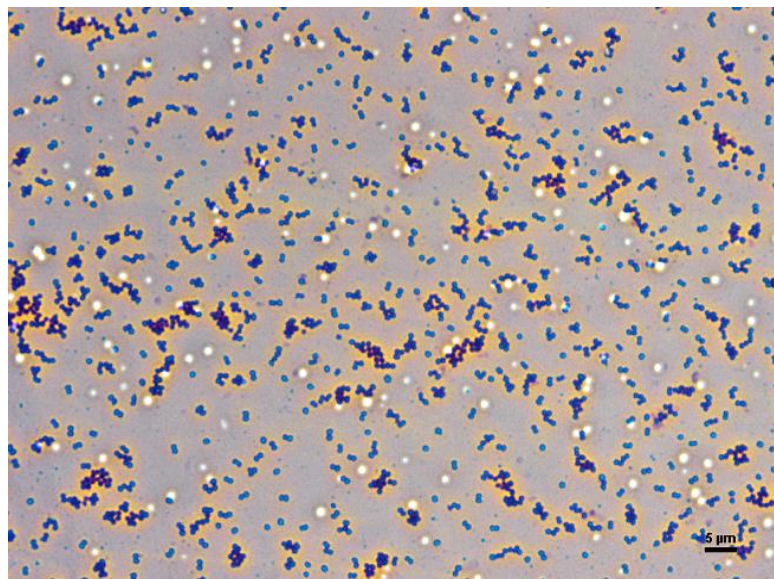
Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury příslušného anaerobního mikroorganismu (*T. denitrificans*, *D. hydrogenophilus*) uschovaného v kryozkumavkách, celý proces musel být proveden v anaerobní boxu za inertní atmosféry vytvořené přísunem inertního N₂. Do zvoleného objemu média (S8, Van Houten) bylo pipetováno 100 – 250 µl bakteriální kultury voleno dle velikosti objemu média. Následně byly nádoby hermeticky uzavřeny a inkubovány po dobu 7 – 10 dní při 30 °C. Takto připravené kultury byly uloženy do chladničky, kde byly při teplotě 5 °C uchovány pro další manipulaci.



Obr. 14 – Anaerobní box

8.3 Barvení dle Grama

Na podložním sklíčku byla v kapce fyziologického roztoku rozetřena bakteriální kultura. Po zaschnutí byla provedena fixace plamenem. Následně bylo provedeno barvení krystalovou violetí po dobu 60 s. Barvivo bylo slito a preparát byl překryt Lugolovým roztokem po dobu 15 s a opláchnut destilovanou vodou po dobu 5 s. Poté byl použit dekolorizující roztok 15 s. Preparát byl dobarven safraninem po dobu 1 minuty a opláchnut destilovanou vodou po dobu 5 s. Takto připravený preparát byl pozorován pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i v režimu fázového kontrastu při celkovém zvětšení 1000x s imerzí.



Obr. 15 – *Micrococcus luteus* obarven dle Grama

8.4 Měření růstové křivky

Do sterilní zkumavky bylo aplikováno 30 ml vytemperovaného sterilního MPB. Takto připravená zkumavka byla vložena do záznamníku růstu buněk a proměřena jako tzv. slepý vzorek. Následně bylo do proměřeného média rozetřeno malé množství bakteriální kultury daného mikroorganismu, který byl kultivován 24 hod před samotným měřením. Zkumavka s inokulovaným médiem byla umístěna zpět do záznamníku růstu buněk, kde byla měřena optická denzita vzorku (OD) po dobu 48 hodin při dané teplotě. Výsledné hodnoty byly graficky vyhodnoceny.



Obr. 16 – Záznamník růstu buněk RTS-1C [81]

8.5 Kultivace bakteriálního biofilmu

Ke kultivaci bakteriálního biofilmu bylo vybráno celkem 6 nosičů. Prvním nosičem byla drcená síra o frakci (4,0 – 3,15 mm) získaná ve výrobě kyseliny sírové v Synthesii Pardubice. Dalším nosičem byl zeolit o frakci (1 – 5 mm), plastové kroužky pro výplň kolon, vápenec o frakci (1 – 5 mm) a zvolené akvaristické nosiče firmy EHEIM, přesněji nosiče Biomech a Substrat Pro.

Drcená síra a plastové kroužky byly nejprve několika násobně propláchnuty destilovanou vodou pro odloučení mechanických nečistot, následně byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 80 °C po dobu 48 hod. Zbylé nosiče (zeolit, vápenec, Biomech a Substrat Pro) byly rovněž několik násobně propláchnuty destilovanou vodou pro odloučení mechanických nečistot a následně byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 145 °C po dobu 48 hod.

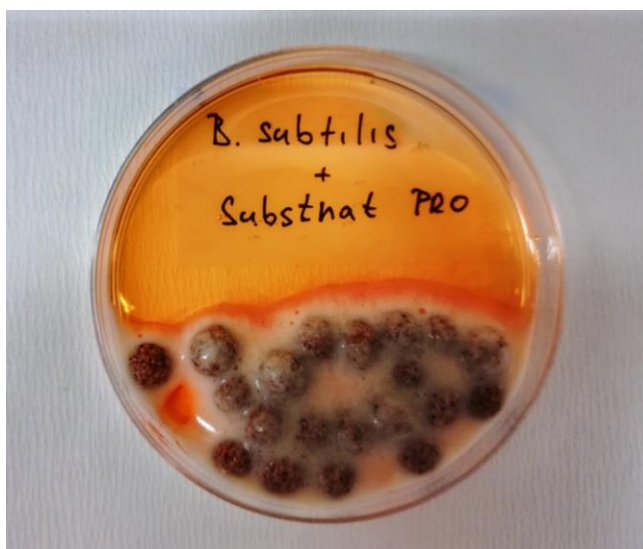
Do 250 ml Erlenmayerových baněk bylo převedeno 150 ml vytemperovaného MPB. Do takto připraveného média bylo rozetřeno velké množství bakteriální kultury daného mikroorganismu. Do inokula pak byly asepticky převedeny předem sterilizované nosiče, hrdla baněk byly překryty sterilním alobalem. Takto připravené baňky s inokuly a nosiči byly umístěny do třepačky, kde byl kultivován biofilm po dobu 14 dní při frekvenci 100 otáček/min. Každý den bylo odebráno 100 ml starého média, které bylo nahrazeno 100 ml čerstvého média.

V případě kultivace biofilmu *T. denitrificans* byl využit rozdílný postup. Do sterilní kolony byla asepticky převedena drcená síra, která byla zalita vytemperovaným S8 médiem a následně byla aplikována bakteriální suspenze. Po uplynutí 14 dní byl proveden průkaz biofilmu na jednotlivých nosičích.

8.6 Průkaz bakteriálního biofilmu

K průkazu bakteriálního biofilmu na nosičích bylo využito komerčního přípravku Biofinder. Tento přípravek je určen ke kontrole hygieny v potravinářském průmyslu. Jedná se o gelovitý roztok, který je nanesen na testovaný povrch. S největší pravděpodobností funguje tento roztok na principu katalasového testu, který využívá přítomnosti enzymu katalasy. Bakteriální buňky jsou přelity roztokem H_2O_2 , pokud je v bakteriálních buňkách přítomen tento enzym, dojde k rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík, což se projeví vznikem bublinek (O_2). Princip přípravku Biofinder je totožný, pozitivní nálezy se projevují pěněním, zatímco při negativním nálezu nedochází ke změně aplikovaného roztoku [82].

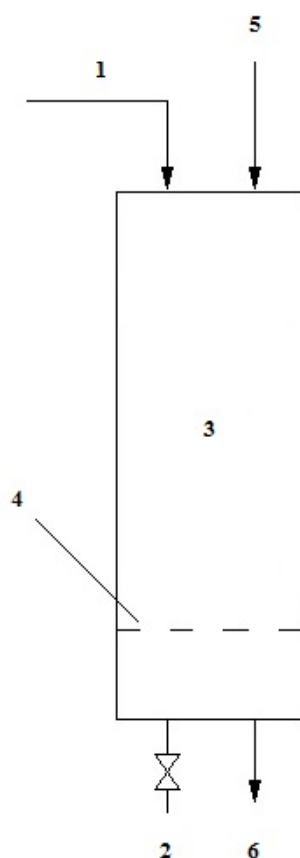
Průkaz biofilmu byl proveden následovně, z Erlenmayerových baněk byl sterilní pinzetou odebrán vzorek nosiče. Nosič byl opláchnut silným proudem sterilní destilované vody pro odplavení planktonických buněk. Opláchnutý nosič byl umístěn na sterilní Petriho misku, kde byl aplikován přípravek Biofinder. Přípravek se nechal působit po dobu 5 minut, poté byly vizuálně odečteny výsledky průkazu biofilmu.



Obr. 17 – Pozitivní průkaz biofilmu *Bacillus subtilis*

8.7 Konstrukce zjednodušeného kolonového systému LITHIM

Kolonový systém se skládal ze speciálně vyrobené skleněné kolony, skleněných kohoutů, přívodních a odvodních hadic s tlačkami a zásobního barelu s médiem. Veškeré skleněné součástky, kromě samotných těl kolon, byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 145 °C po dobu 48 hod. Zásobní barel i hadice byly několikanásobně propláchnuty denaturovaným lihem. Samotné kolony byly několikrát propláchnuty denaturovaným lihem a poté ještě vysvíceny baktericidní UV lampou. Zásobní barely byly propojeny s kolonou gumovou hadicí, stejně tak byl zajištěn i odvod z kolony do sběrného barelu. Z důvodu špatného růstu *D. hydrogenophilus* byl dvoustupňový kolonový systém, který je popsán v kapitole 3.1 upraven. Veškeré měření probíhalo pouze v jednostupňovém systému, jehož konstrukci popisuje obr. č. 18.



Obr. 18 – Zjednodušený jednostupňový systém LITHIM

1 - přívod živin, 2 - výpust', 3 - aerobní kolona, 4 - porézní přepážka,
5 - přívod vzduchu, 6 - odvod z kolony

8.8 Měření pH

Z kolony bylo odpuštěno 50 ml vzorku do 100 ml kádinky. Hodnota pH byla měřena standardní gelovou pH elektrodou (argentschloridová elektroda s dvojitým solným můstkem). Elektroda byla před samotným měřením opláchnuta destilovanou vodou a osušena buničinou. Poté byla elektroda připojena k digitálnímu multimetru HQ30D. Po vyzvání přístroje byla elektroda umístěna do kádinky se vzorkem a spuštěno měření. Po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota pH. Měření hodnoty pH bylo provedeno celkem třikrát, ze všech tří hodnot byla vypočtena průměrná hodnota.

8.9 Měření oxidačně-redukčního potenciálu

Z kolony bylo odpuštěno 50 ml vzorku do 100 ml kádinky. Hodnota ORP byla měřena standardní plnitelnou ORP elektrodou (argentschloridová elektroda s keramickým solným můstkem). Elektroda byla před samotným měřením opláchnuta destilovanou vodou a osušena buničinou. Poté byla elektroda připojena k digitálnímu multimetru HQ30D. Po vyzvání přístroje byla elektroda umístěna do kádinky se vzorkem a spuštěno měření. Po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota ORP. Měření hodnoty ORP bylo provedeno celkem třikrát, ze všech tří hodnot byla vypočtena průměrná hodnota.

8.10 Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku

Z kolony bylo odpuštěno 50 ml vzorku do 100 ml kádinky. Hodnota koncentrace rozpuštěného kyslíku byla měřena standardní elektrodou LDO (fungující na principu luminiscenčního zhášení). Elektroda byla před samotným měřením opláchnuta destilovanou vodou a osušena buničinou. Poté byla elektroda připojena k digitálnímu multimetru HQ30D. Po vyzvání přístroje byla elektroda umístěna do kádinky se vzorkem a spuštěno měření. Po ustálení rovnováhy byla odečtena koncentrace rozpuštěného kyslíku. Měření hodnoty koncentrace kyslíku bylo provedeno celkem třikrát, ze všech tří hodnot byla vypočtena průměrná hodnota.

8.11 Měření teploty

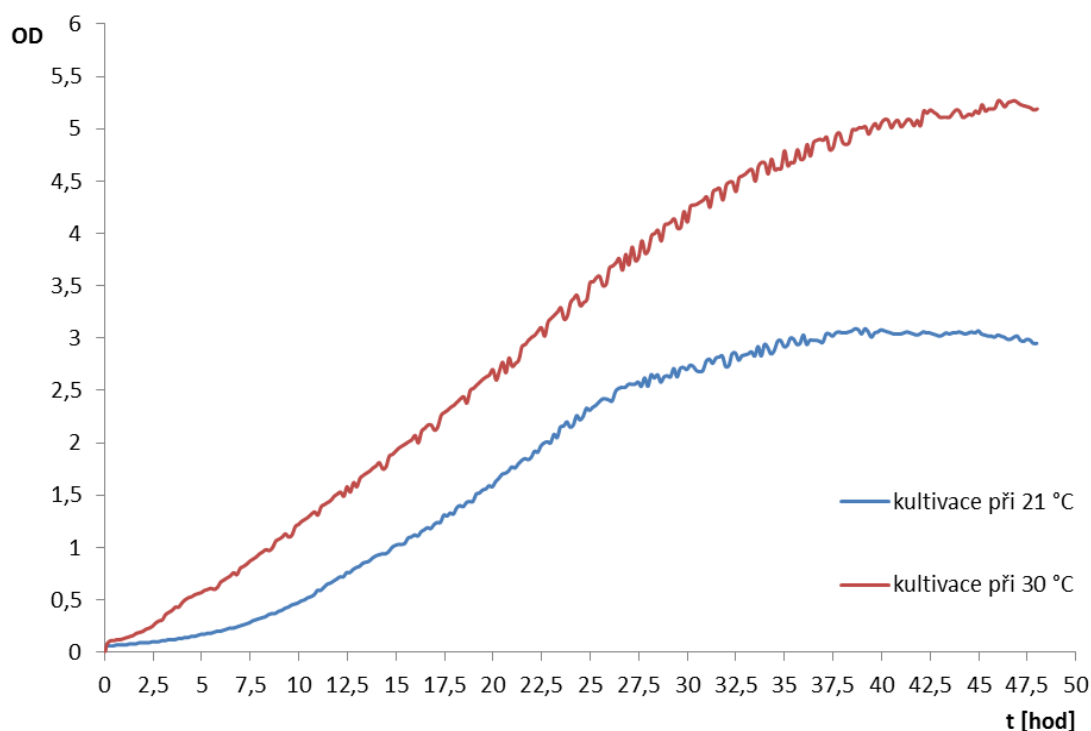
Z kolony bylo odpuštěno 50 ml vzorku do 100 ml kádinky. Teplota byla měřena standardní elektrodou LDO, jelikož tato elektroda má ve své konstrukci zabudovaný i teplotní senzor s přesností $\pm 0,3$ °C. Postup měření teploty byl stejný, jako měření koncentrace rozpuštěného kyslíku viz kapitola 8.10. Měření teploty bylo provedeno celkem třikrát, ze všech tří hodnot byla vypočtena průměrná hodnota.

9 VÝSLEDKY A DISKUZE

9.1 Růstové křivky testovaných mikroorganismů

Proměření jednotlivých růstových křivek probíhalo v záznamníku růstu buněk RTS-1C, kde byla sledována závislost optické denzity (OD) v čase. Proměření probíhalo při různých teplotách a trvalo celkem 48 hodin.

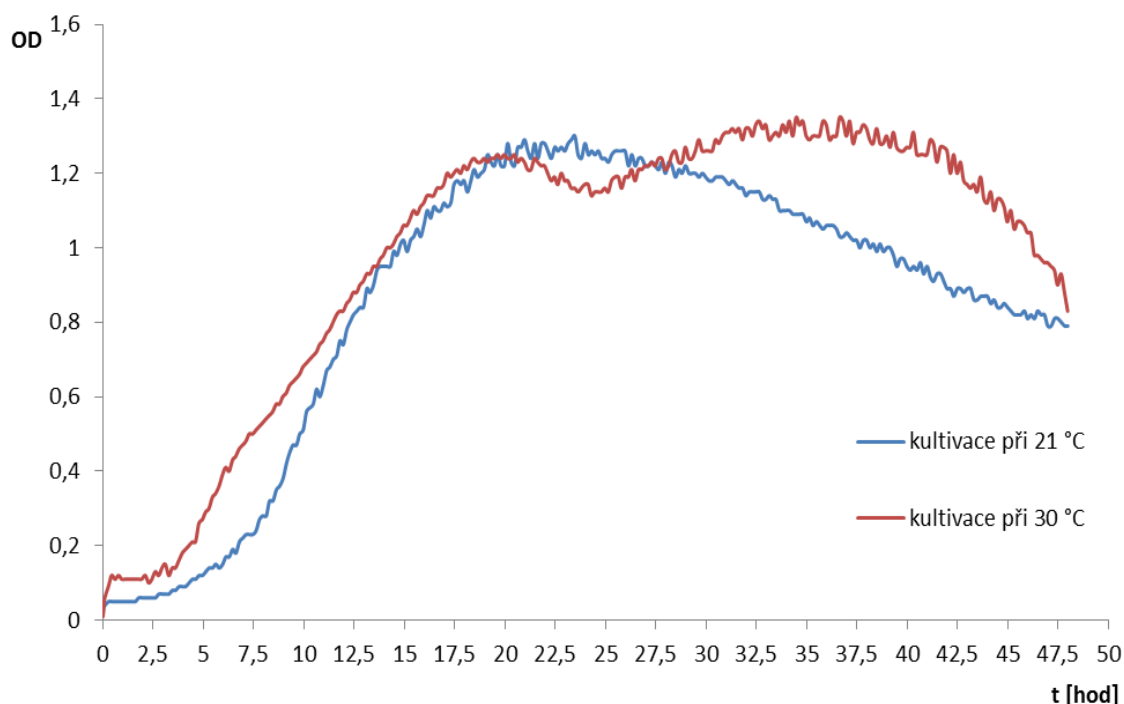
9.1.1 Růstová křivka *Micrococcus luteus*



Graf 1- Růstové křivky pro *Micrococcus luteus*

Z grafu č. 1 vyplývá, že se naměřená optická denzita výrazně lišila s měnící se teplotou. Kultivace při 21 °C neměla tak strmý průběh a maximální OD dosahuje hodnot 3. Oproti tomu kultivace při 30 °C, což je optimální teplota pro kultivaci *M. luteus*, dosahovala hodnot OD téměř dvojnásobných. Obě křivky měly klasický průběh, výrazně rozdílné hodnoty OD je možno vysvětlit přítomností žlutého pigmentu, kterým je *M. luteus* charakteristický. Při optimálních teplotách dochází k tvorbě většího množství pigmentu, který zkresluje výsledné hodnoty OD. V obou případech lze zaznamenat exponenciální fázi až do 30. hodiny měření, což je více než dostačující. Z výsledků tedy jasně vyplývá, že kultivace *M. luteus* je možná i při laboratorní teplotě (21 °C) s optimálním růstem do 24 hodin.

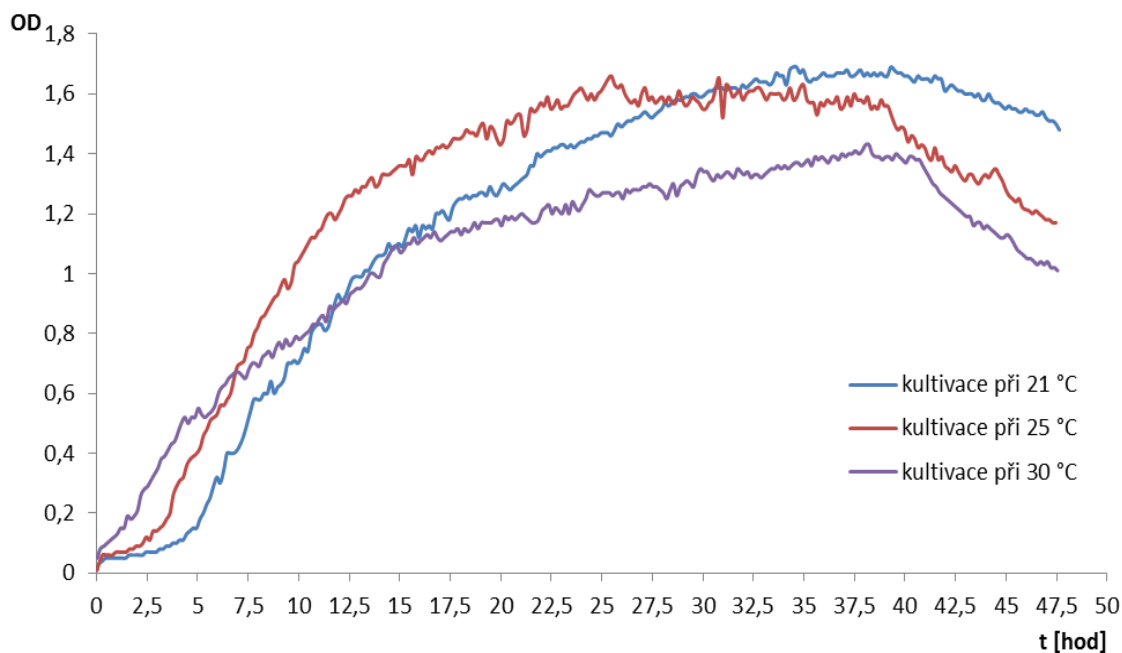
9.1.2 Růstová křivka *Bacillus subtilis*



Graf 2 - Růstové křivky pro *Bacillus subtilis*

Z grafu č. 2 vyplývá, že naměřená OD se s rostoucí teplotou výrazně nelišila, došlo však ke změně průběhu růstové křivky. Maximální hodnoty OD nepřekročily ani v jednom z případů hodnotu 1,4. Kultivace při 30 °C, což je optimální teplota pro kultivaci *B. subtilis*, měla strmější exponenciální část se snížením hodnot OD po dosažení stacionární fáze. Pokles OD je způsoben odumíráním buněk z důvodu nedostatku živin. *B. subtilis* patří ke sporulujícím bakteriím, k tvorbě spór dochází za nepříznivých podmínek, v tomto případě za nedostatku živin, tvorba spór tedy vysvětluje pozdější nárůst OD i po dosažení stacionární fáze [83]. Naproti tomu kultivace při 21 °C měla klasický průběh s dlouhou fází odumírání, jelikož nedošlo k tvorbě spór. To může být zapříčiněno sníženou teplotou kultivace a pomalejším metabolismem jednotlivých buněk. V obou případech lze zaznamenat exponenciální fázi až do 20. hodiny měření, což je dostačující. Z výsledků jasně vyplývá, že s rostoucí teplotou se hodnoty OD výrazně nelišily, kultivace při 21 °C měla klasický průběh a není doprovázena sporulací, proto je možné kultivovat *B. subtilis* při laboratorní teplotě s optimálním růstem do 20 hodin.

9.1.3 Růstová křivka *Pseudomonas fluorescens*



Graf 3 - Růstové křivky pro *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens má na rozdíl od předešlých mikroorganismů rozmezí doporučených kultivačních teplot 25 – 30 °C a její růst je velmi proměnlivý právě v závislosti na kultivační teplotě, proto byla růstová křivka proměřena celkem třikrát. Z grafu č. 3 vyplývá, že hodnoty OD byly ve všech třech případech podobné, nejnižší hodnoty OD byly paradoxně naměřeny u kultivace při 30 °C. Kultivace při 30 °C měla nestandardní průběh, exponenciální fáze nastala již v první hodině měření a setrvala až do 41. hodiny měření, kde nastal rychlý zlom a následovala fáze odumírání. Kultivace při 25 °C měla velmi strmou exponenciální část, dosažení stacionární fáze nastalo při 20. hodině měření. Poslední byla kultivace při 21 °C, která měla ze všech tří křivek nejklasičtější průběh, přiměřeně strmou exponenciální část, k dosažení stacionární fáze nastalo až při 30. hodině měření, což není optimální. Z výsledků vyplývá, že kultivace při 21 °C měla klasický průběh růstové křivky oproti ostatním teplotám, stejně tak měla optimální exponenciální část, proto je z možno doporučit kultivaci *P. fluorescens* při laboratorní teplotě s optimálním růstem do 30. hodin.

9.2 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu

Průkaz bakteriálního biofilmu byl proveden pomocí komerčně dostupného přípravku Biofinder, který byl aplikován na nosič s nakultivovaným biofilmem. Všechny testované mikroorganismy vytvářely biofilm, který je velmi výhodný nejen pro bakterie samotné, ale také pro imobilizaci těchto bakterií na inertní nosič [84, 85, 86]. Přípravek se nechal působit po dobu 5 minut, poté byly vizuálně odečteny výsledky, které jsou shrnuty v tabulce č. 8. Fotodokumentace provedených experimentů je uvedena v příloze.

Tab. 8 – Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu

	Zeolit	Vápenec	Plast	Biomech	Substrat Pro
Kontrola (pouze nosiče)	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	+	-	++	++
<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	++	+++	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	++	++

Před samotným provedením jednotlivých experimentů byly otestovány samotné nosiče, jednotlivé sterilní nosiče byly umístěny na sterilní Petriho misky, kde byl aplikován přípravek Biofinder. Jak je zřejmé z tabulky č. 8, ani po 5 minutách nedošlo k žádné reakci, roztok zůstal beze změny, neobjevily se žádné bublinky plynu, proto byla vyloučena falešná pozitivita nosičů.

Nejvíce pozitivní nosiče na průkaz biofilmu byly akvaristické nosiče Biomech a Substrat Pro. Jedná se o porézní nosiče, které svými póry zajišťují ideální prostředí pro kolonizaci bakteriemi. Jejich výhodou je velká aktivní plocha substrátu (400 – 450 m²/l). Všechny testované bakterie byly schopny kolonizovat tyto akvaristické nosiče, v případě *M. luteus* byla kolonizace největší, tomu odpovídala i tvorba bublinek plynu, která téměř zakryla veškerý testovaný nosič. Dále byla pozorována pozitivní reakce u plastového nosiče i vápence, reakce ale nebyla natolik bouřlivá. V případě *B. subtilis* byla pozitivní reakce u akvaristických nosičů o něco menší, avšak stále dostatečně intenzivní. *P. fluorescens* poskytla taktéž o něco méně pozitivní reakci, rovněž se projevilo mírné šumění u vápence. Zeolit neposkytl pozitivní reakci s žádnou z testovaných bakterií. Z výsledků jasně vyplývá, že pro imobilizaci bakterií na inertní nosič byly nejvhodnější akvaristické nosiče Biomech a Substrat Pro, které byly na základě tohoto testu vybrány jako ideální nosič do kolonového systému.

9.3 Stanovení pH

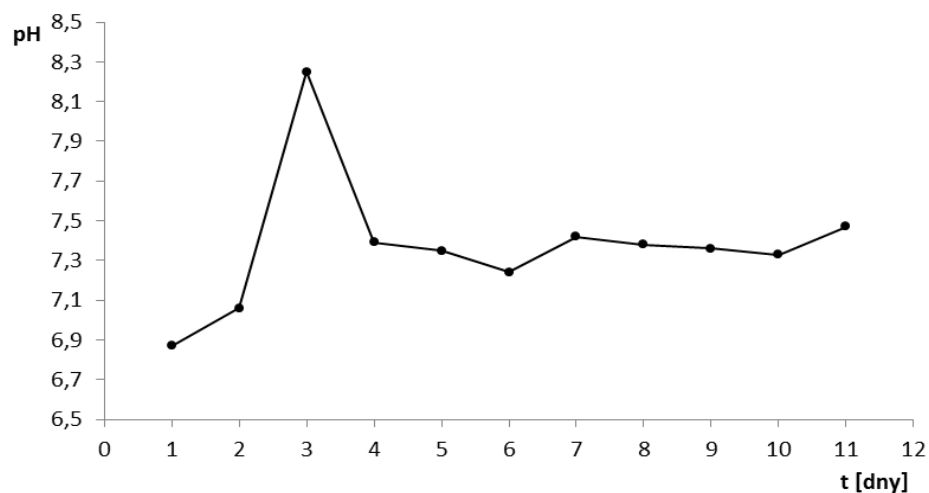
Stanovení pH bylo provedeno pomocí standardní gelové pH elektrody (argentochloridová elektroda s dvojitým solným můstkem), která byla ponořena do 50 ml odebraného vzorku, měření bylo prováděno každých 24 hodin. Veškeré měření bylo prováděno v intervalu teplot od 19,5 – 21,5 °C, jelikož se jedná o rozdíl pouhých 2 °C, nejsou hodnoty teplot uváděny v následujících tabulkách ani grafech, platí i pro kapitoly 9.4 a 9.5.

9.3.1 Stanovení pH *T. denitrificans*

Tab. 9 – Naměřené hodnoty pH *T. denitrificans*

t [dny]	pH	
	Vstup	Výstup
1	8,44	6,87
2	8,45	7,06
3	8,46	8,25
4	8,38	7,39
5	8,42	7,35
6	8,5	7,24
7	8,52	7,42
8	8,51	7,38
9	8,45	7,36
10	8,32	7,33
11	8,42	7,47

V případě měření *T. denitrificans* byla sledována závislost hodnoty pH na uplynulém čase, jelikož koncentrace živného roztoku byla udržována na konstantní hodnotě 50 mg/l NaNO₃. Hodnoty na vstupu kolony byly téměř konstantní, pohybovaly se v rozmezí od 8,38 – 8,52 pH, proto jsou hodnoty uvedeny pouze v tabulce č. 9. Naproti tomu výsledné hodnoty na výstupu kolony se pohybovaly v širším rozmezí, mezi 2. a 4. dnem došlo k nárůstu hodnoty pH až na 8,25, který byl během následujících 24 hodin opět téměř o jednotku snížen, jak vyplývá z grafu č. 4. Dostupná literatura uvádí, že ideální hodnota pH pro denitrifikaci *T. denitrificans* činí 6,85 [87]. Z naměřených hodnot jasně vyplývá, že hodnota pH v průběhu času mírně rostla a pohybovala se kolem hodnoty 7,4 pH. Tento jev byl s největší pravděpodobností způsoben nedostatečnou koncentrací živin, proto metabolismus *T. denitrificans* nefungoval dle očekávání.



Graf 4 – Závislost hodnot pH *T. denitrificans* na výstupu z kolony na čase

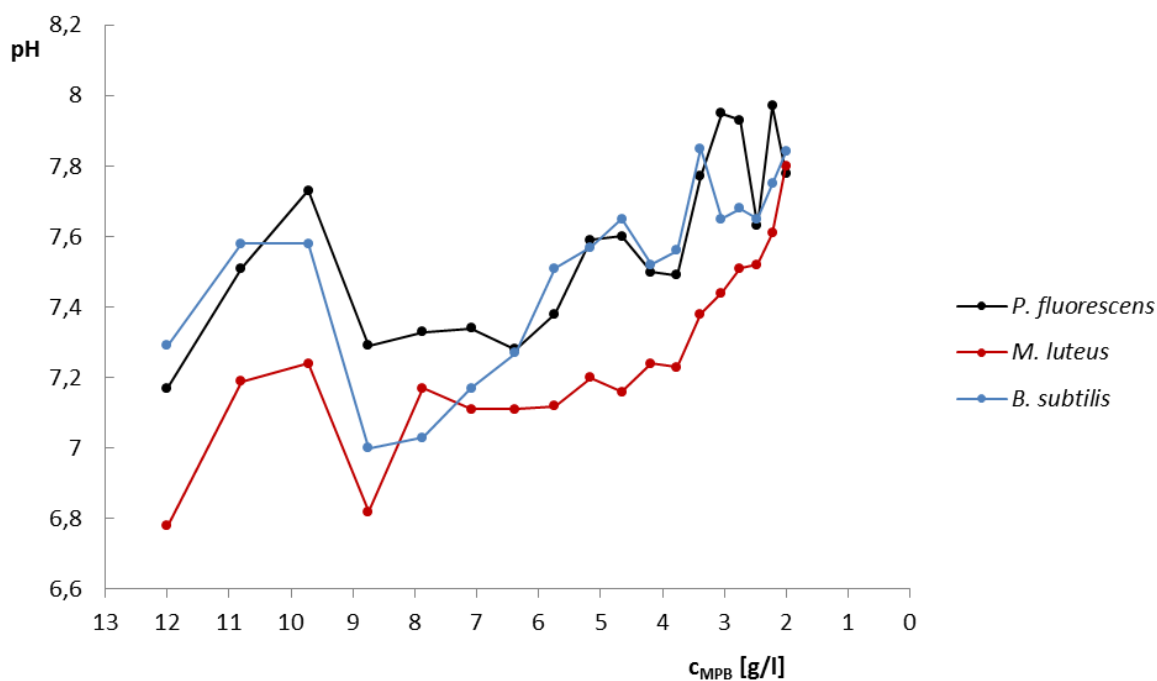
9.3.2 Stanovení pH aerobních mikroorganismů

V případě aerobních mikroorganismů byla sledována závislost hodnoty pH na snižující se koncentraci MPB. Původní koncentrace MPB činila 12 g/l a postupně byla ředěna sterilní kohoutkovou vodou, která byla přidávána do zásobního barelu každých 24 hodin.

Tab. 10 – Naměřené hodnoty pH aerobních bakterií

c _{MPB} [g/l]	<i>B. subtilis</i>		<i>M. luteus</i>		<i>P. fluorescens</i>	
	pH					
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup
12,00	7,63	7,29	7,72	6,78	7,78	7,17
10,80	7,72	7,58	7,74	7,19	7,68	7,51
9,72	7,75	7,58	7,83	7,24	7,75	7,73
8,75	7,68	7	7,78	6,82	7,74	7,29
7,87	7,73	7,03	7,72	7,17	7,71	7,33
7,09	7,78	7,17	7,76	7,11	7,8	7,34
6,38	7,71	7,27	7,81	7,11	7,82	7,28
5,74	7,83	7,51	7,79	7,12	7,68	7,38
5,17	7,89	7,57	7,87	7,2	7,82	7,59
4,65	7,71	7,65	7,82	7,16	7,86	7,6
4,18	7,69	7,52	7,79	7,24	7,79	7,5
3,77	7,75	7,56	7,9	7,23	7,9	7,49
3,39	7,78	7,85	7,74	7,38	7,81	7,77
3,05	7,7	7,65	7,77	7,44	7,72	7,95
2,75	7,73	7,68	7,78	7,51	7,75	7,93
2,47	7,78	7,65	7,78	7,52	7,79	7,63
2,22	7,82	7,75	7,8	7,61	7,81	7,97
2	7,84	7,84	7,85	7,8	7,85	7,78

Hodnoty vstupů do kolon u všech testovaných aerobních mikroorganismů byly téměř konstantní, pohybovaly se v rozmezí od 7,63 – 7,9 pH, proto jsou hodnoty uvedeny pouze v tabulce č. 10. Výstupní hodnoty pH *P. fluorescens* s klesající koncentrací MPB pomalu rostou, dostupná literatura uvádí, že ideální pH pro *P. fluorescens* se pohybuje v rozmezí od 6,5 – 8,5 pH, čemuž odpovídají i naměřené hodnoty [88]. Výstupní hodnoty pH *B. subtilis* mají velmi podobný charakter, rovněž s klesající koncentrací MPB pomalu narůstají, dostupná literatura uvádí ideální rozmezí pH od 7 – 8 pH [88], čemuž rovněž odpovídají naměřené hodnoty. Výstupní hodnoty *M. luteus* mají celkově ze všech testovaných mikroorganismů nejmenší hodnoty, avšak kopírují průběh ostatních křivek mikroorganismů. V dostupné literatuře nebylo možno nalézt optimální hodnoty pH pro tento mikroorganismus, proto je za ideální hodnotu pH bráno pH MPB, které činí $7,2 \pm 0,2$ pH. S klesající koncentrací MPB narůstají hodnoty pH. Všechny tři křivky mají obdobný charakter, z čehož můžeme usuzovat, že se snižující se koncentrací MPB dochází ke zpomalování metabolismu a hromadění metabolitů, které jsou zodpovědné za pomalý nárůst hodnot pH. V případě *P. fluorescens* můžeme usuzovat na optimální koncentraci MPB z průběhu grafu č. 5 na hodnotu 8 g MPB/l, v případě *B. subtilis* 5 g MPB/l a v případě *M. luteus* 7,5 g MPB/l.



Graf 5 - Závislost hodnot pH aerobních mikroorganismů na výstupu z kolony na koncentraci MPB

9.4 Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu

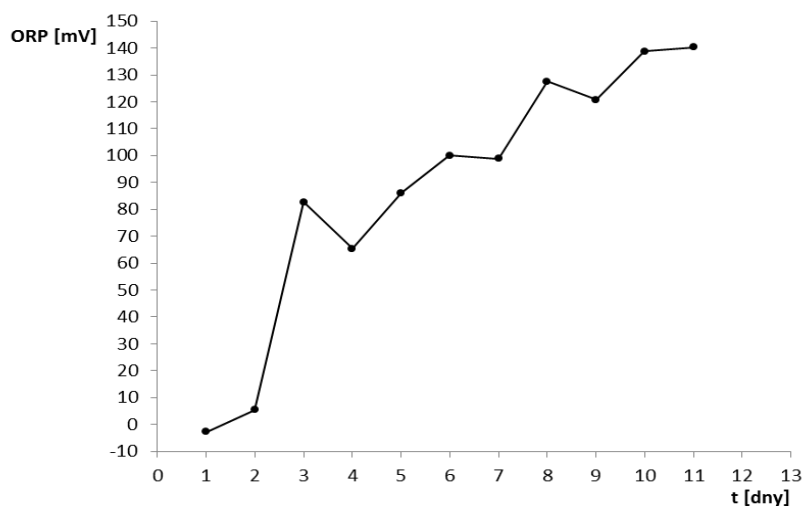
Stanovení ORP bylo provedeno pomocí standardní plnitelné ORP elektrody (argentschloridová elektroda s keramickým solným můstkem), která byla ponořena do 50 ml odebraného vzorku, měření bylo prováděno každých 24 hodin.

9.4.1 Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu *T. denitrificans*

Tab. 11 – Naměřené hodnoty ORP *T. denitrificans*

t [dny]	ORP [mV]	
	Vstup	Výstup
1	85,9	-2,8
2	55,55	5,4
3	81,9	82,7
4	85,9	65,3
5	56,7	86,1
6	22,1	100
7	26,9	98,9
8	97,8	127,6
9	96,8	120,7
10	98	138,7
11	80,6	140,2
15	79,6	159,6

V případě měření *T. denitrificans* byla sledována závislost hodnoty ORP na čase. Koncentrace živného roztoku byla udržována na konstantní hodnotě 50 mg/l NaNO₃. Hodnoty na vstupu kolony se pohybovaly v rozmezí 22,1 – 98 mV, hodnoty na výstupu z kolony pak v rozmezí -2,8 až 159 mV. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 11. Nárůst hodnot ORP na výstupu z kolony je v rozporu s očekáváním, že bude docházet ke snižování těchto hodnot v čase. Zpočátku ke snížení došlo, následně však hodnoty ORP vzrostly na hodnoty vyšší než ve vstupním médiu. To je pravděpodobně způsobeno více faktory, jedním z nich budou i produkty metabolismu *T. denitrificans*.



Graf 6 - Závislost ORP *T. denitrificans* na výstupu z kolony na čase

9.4.2 Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu aerobních mikroorganismů

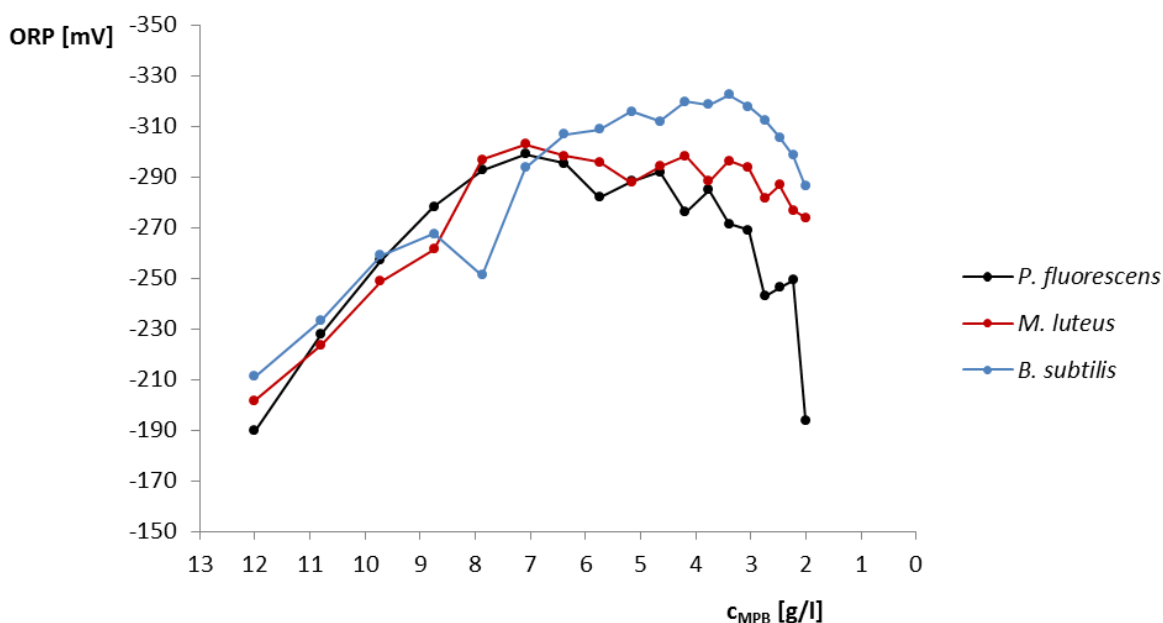
V případě aerobních mikroorganismů byla sledována závislost ORP na snižující se koncentraci MPB. Původní koncentrace MPB činila 12 g/l a postupně byla ředěna sterilní kohoutkovou vodou, která byla přidávána do zásobního barelu každých 24 hodin.

Tab. 12 – Naměřené hodnoty ORP aerobních bakterií

c_{MPB} [g/l]	<i>B. subtilis</i>		<i>M. luteus</i>		<i>P. fluorescens</i>	
	ORP [mV]					
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup
12,00	53,7	-211,2	49,8	-201,7	54,6	-189,7
10,80	49,7	-233,5	48,7	-223,7	49,7	-227,9
9,72	53,8	-258,9	51,3	-248,7	58,7	-257
8,75	52,7	-267,5	51,8	-261,4	62,4	-278,2
7,87	56,8	-251,2	54,7	-296,7	52,4	-292,7
7,09	58,7	-293,7	57,6	-303	54,8	-299
6,38	53,4	-306,8	55,9	-298,3	55,8	-295,3
5,74	56,7	-308,7	58,7	-295,8	59,3	-281,9
5,17	67,2	-315,9	63,7	-287,7	60,7	-288,2
4,65	65,4	-311,8	73	-294,1	66,8	-291,9
4,18	70,1	-319,7	72,7	-298,3	72,1	-276,1
3,77	73,8	-318,5	69,7	-288,3	70,5	-284,8
3,39	71,8	-322,5	73	-296,3	72,5	-271,3
3,05	79,2	-317,8	75,6	-293,7	79,3	-268,9
2,75	78,3	-312,5	75,2	-281,5	81,2	-243
2,47	72,1	-305,6	72,3	-286,7	75,8	-246,2
2,22	74,3	-298,4	75	-276,8	72,4	-249,2
2,00	75,8	-286,4	76,3	-273,8	75,2	-193,8

Hodnoty ORP vstupů do kolon u všech testovaných aerobních mikroorganismů rostly se snižující se koncentrací MPB, celkově se pohybovaly v rozmezí od 48,7 – 81,2 mV, na rozdíl od hodnot na výstupu kolon rostly hodnoty ORP na vstupu kolon postupně se snižující se koncentrací MPB, proto jsou hodnoty uvedeny pouze v tabulce č. 12. V dostupné literatuře nebyly nalezeny hodnoty ORP využitých aerobních mikroorganismů, se kterými by bylo možno porovnat výsledky experimentů, proto byly výsledky experimentů vztaženy k obecným hodnotám ORP uvedených v kapitole 2.3.1.

Z grafu č. 7 jasně vyplývá, že hodnoty ORP klesaly u všech testovaných mikroorganismů velice podobně, jak zobrazují jednotlivé křivky. Od počáteční koncentrace 12 g MPB/l až po konečnou koncentraci 2 g MPB/l se hodnoty ORP pohybovaly pouze v anaerobní zóně, což je ideální pro správnou funkci druhé kolony obsahující striktního anaeroba *D. hydrogenophilus*. Až do koncentrace 7 – 6 g MPB/l hodnoty ORP u všech testovaných mikroorganismů klesaly, jejich aerobní metabolismus tak fungoval optimálně, až od koncentrace 5 g MPB/l, poté dochází k nárůstu hodnot ORP, což dokazuje menší efektivitu metabolismu. Nejvhodnějším mikroorganismem se na základě tohoto experimentu jeví být *B. subtilis*, jehož hodnoty ORP byly ze všech nejnižší a stejně tak vydržely v záporných hodnotách pod -310 mV až do koncentrace 2,75 g MPB/l. Nejméně vhodným mikroorganismem se pak jeví být *P. fluorescens*. Nárůst hodnot ORP je způsoben menší efektivitou metabolismu, nedostatkem živin, postupným hromaděním metabolitů a odumíráním mikroorganismů.



Graf 7 - Závislost hodnot ORP aerobních mikroorganismů na výstupu z kolony na koncentraci MPB

9.5 Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku

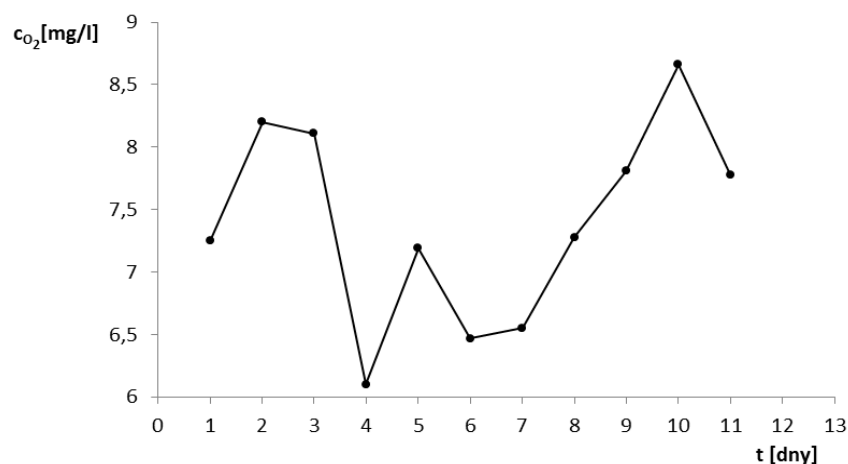
Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku bylo provedeno pomocí standardní elektrody LDO (fungující na principu luminiscenčního zhášení), která byla ponořena do 50 ml odebraného vzorku, měření bylo prováděno každých 24 hodin.

9.5.1 Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku *T. denitrificans*

Tab. 13 – Naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku *T. denitrificans*

t [dny]	c _{O₂} [mg/l]	
	Vstup	Výstup
1	8,76	7,25
2	8,63	8,2
3	8,65	8,11
4	8,62	6,1
5	8,53	7,19
6	8,58	6,47
7	8,7	6,55
8	8,76	7,28
9	8,8	7,81
10	8,83	8,66
11	8,72	7,78
15	8,79	8,63

V případě měření *T. denitrificans* byla sledována závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na uplynulém čase, jelikož koncentrace živného roztoku byla udržována na konstantní hodnotě 50 mg/l NaNO₃. Hodnoty koncentrace na vstupu kolony byly téměř konstantní, pohybovaly se v rozmezí od 8,53 – 8,83 mg/l, proto jsou hodnoty uvedeny pouze v tabulce č. 13. Hodnoty koncentrací rozpuštěného kyslíku na výstupu kolon s rostoucím časem nikterak nekorelovaly, nebyla patrná žádná závislost. K nejnižšímu snížení hodnot koncentrace rozpuštěného kyslíku došlo ve 4. dni, ale ihned na to koncentrace opět vzrostla a i po 7. dni si hodnoty udržovaly narůstající charakter. Z grafu č. 8 můžeme určit ideální rozmezí, při kterém došlo k nejnižšímu snížení koncentrace rozpuštěného kyslíku, toto rozmezí bylo mezi 4. a 7. dnem, i tak jsou výsledné hodnoty koncentrace kyslíku příliš vysoké. Z výsledných hodnot jasně vyplývá, že *T. denitrificans* jakožto zástupce anaerobních mikroorganismů není vhodným kandidátem pro vytvoření anaerobních podmínek.



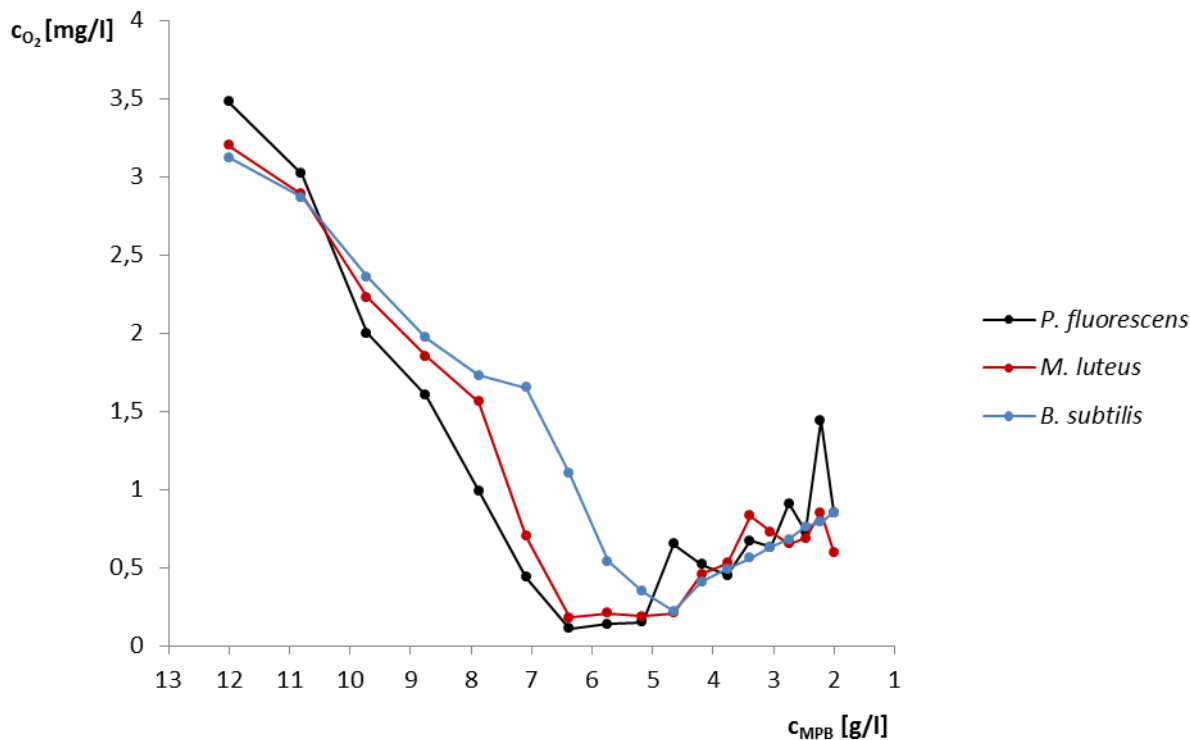
Graf 8 - Závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku *T. denitrificans* na výstupu z kolony na čase

9.5.2 Stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku aerobních mikroorganismů

V případě aerobních mikroorganismů byla sledována závislost koncentrace rozpuštěného kyslíku na snižující se koncentraci MPB. Původní koncentrace MPB činila 12 g/l a postupně byla ředěna sterilní kohoutkovou vodou, která byla přidávána do zásobního barelu každých 24 hodin.

Tab. 14 – Naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku aerobních bakterií

c _{MPB} [g/l]	<i>B. subtilis</i>		<i>M. luteus</i>		<i>P. fluorescens</i>	
	cO ₂ [mg/l]					
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup
12,00	6,12	3,12	6,2	3,2	6,25	3,48
10,80	6,22	2,87	6,35	2,89	6,11	3,02
9,72	6,38	2,36	6,4	2,23	6,35	2
8,75	6,41	1,97	6,48	1,85	6,47	1,6
7,87	6,52	1,73	6,43	1,56	6,28	0,99
7,09	6,78	1,65	6,53	0,7	6,52	0,44
6,38	6,83	1,1	6,79	0,18	6,7	0,11
5,74	7,11	0,54	6,92	0,21	6,68	0,14
5,17	7,35	0,35	7,26	0,19	6,92	0,15
4,65	7,62	0,22	7,68	0,21	7,24	0,65
4,18	7,87	0,41	7,79	0,46	7,6	0,52
3,77	7,86	0,49	7,88	0,53	7,72	0,45
3,39	7,99	0,56	7,83	0,83	7,62	0,67
3,05	8,12	0,63	7,96	0,73	7,5	0,63
2,75	8,03	0,68	8,03	0,65	7,42	0,91
2,47	8,1	0,76	8,09	0,69	7,38	0,73
2,22	8,16	0,79	8,06	0,85	7,59	1,44
2,00	7,99	0,85	7,91	0,6	7,51	0,85



Graf 9 – Závislost hodnot koncentrace rozpuštěného kyslíku aerobních mikroorganismů na výstupu z kolony na koncentraci MPB

Hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku vstupu do kolon u všech testovaných aerobních mikroorganismů rostly se snižující se koncentrací MPB, celkově se pohybovaly v rozmezí od 6,12 – 8,16 mg/l, na rozdíl od hodnot na výstupu kolon rostla koncentrace kyslíku na vstupu kolon postupně se snižující se koncentrací MPB, proto jsou hodnoty uvedeny pouze v tabulce č. 14. Z grafu č. 9 jasně vyplývá, že hodnoty koncentrací klesaly u všech testovaných mikroorganismů velice podobně, jak zobrazují jednotlivé křivky. U všech testovaných mikroorganismů došlo ke snížení koncentrace až pod 0,5 mg/l, což je mnohem nižší koncentrace, než které byl schopen dosáhnout *T. denitrificans*. Během prvních 6 dní došlo k rapidnímu snížení koncentrace kyslíku i se snižující se koncentrací živin. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u *P. fluorescens*, naopak nejvyšší u *B. subtilis*. Optimální koncentrace MPB se v tomto případě u všech testovaných mikroorganismů shoduje, její rozmezí činí 7,5 – 5 g MPB/l. Poté dochází k nárůstu koncentrace rozpuštěného kyslíku, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno nedostatečnou koncentrací živin, zpomalením metabolismu a postupným odumíráním mikroorganismů.

10 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na vytipování vhodných mikroorganismů, které by mohly nahradit v současnosti používaný mikroorganismus *T. denitrificans* v prvním stupni kolonového systému LITHIM. S tím byla spojena i volba vhodného nosiče. Vybranými mikroorganismy byly *M. luteus*, *B. subtilis* a *P. fluorescens*. Tyto mikroorganismy byly podrobeny laboratorním testům na zjednodušeném modelu kolonového systému LITHIM, kdy byly sledovány hodnoty pH, oxidačně-redukčního potenciálu a koncentrace rozpuštěného kyslíku, což jsou klíčové parametry pro správné fungování druhého stupně kolonového systému LITHIM.

V případě testování vhodného inertního nosiče bylo otestováno celkem pět nosičů, přičemž nejvhodnějšími se ukázaly být akvaristické nosiče EHEIM Biomech a Substrat Pro, které byly využity při konstrukci zjednodušeného kolonového systému LITHIM. Výhodou těchto nosičů je velká aktivní plocha a jejich snadná dostupnost ve specializovaných prodejnách. Nevýhodou je jejich vyšší cena v porovnání s ostatními testovanými materiály.

Z výsledků měření růstových křivek jednotlivých mikroorganismů jasně vyplývá, že všechny testované mikroorganismy (*M. luteus*, *B. subtilis*, *P. fluorescens*) jsou schopny optimálně růst i při laboratorní teplotě 21 °C, při které probíhaly veškeré provedené experimenty. Všechny testované mikroorganismy měly standardní průběh růstových křivek, výjimku tvořil *B. subtilis*, u kterého byl na záznamu při 30 °C pozorován pokles a následný nárůst OD. Toto pozorování je však v souladu s literaturou a je vysvětlováno sporulací tohoto mikroorganismu.

Při sledování hodnot pH v závislosti na snižující se koncentraci MPB bylo zjištěno, že veškeré testované mikroorganismy se pohybovaly v rozmezí svých optimálních hodnot pH. Z výsledků měření pH vyplývá, že každý z testovaných mikroorganismů je z hlediska hodnot pH vhodnou náhradou za *T. denitrificans*.

Sledováním hodnot oxidačně-redukčního potenciálu v závislosti na snižující se koncentraci MPB, bylo zjištěno, že pro všechny testované aerobní mikroorganismy je koncentrace MPB nad 2 mg/l dostačující pro zajištění anaerobních podmínek v druhém stupni kolonového systému LITHIM. Je zde však patrný trend, kdy se snižující se koncentrací MPB absolutní hodnota ORP klesá. Jako optimální koncentrace z hlediska činnosti mikroorganismů a zároveň z hlediska nákladů se proto jeví koncentrace 5 mg/l MPB. Nejnížší hodnoty oxidačně-redukčního potenciálu -322 mV i s nízkou koncentrací substrátu byly naměřeny u *B. subtilis*.

Posledním sledovaným parametrem byla koncentrace rozpuštěného kyslíku. Ani v tomto případě se *T. denitrificans* neukázal být dostatečně účinným. Oproti tomu mnohonásobně nižší koncentrace rozpuštěného kyslíku byly naměřeny u vytipovaných aerobních bakterií, nejnížší hodnoty byly naměřeny u *P. fluorescens*. Také zde byla sledována klesající závislost na koncentraci MPB, která koresponduje s výsledky popsány v souvislosti s ORP.

Po shrnutí veškerých výše uvedených poznatků můžeme říci, že nejvhodnější náhradou z vytipovaných a testovaných mikroorganismů za dosud používaný *T. denitrificans* je *B. subtilis*. Vezmeme-li také v potaz, že se navíc jedná o tzv. modelový organismus a jeho kultivace byla ze všech testovaných mikroorganismů nejkratší, je *B. subtilis* rozhodně tím nejvhodnějším z testovaných mikroorganismů.

11 ZDROJE

- [1] SBÍRKA ZÁKONŮ. *Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon)*. In: Sbíрка zákonů. Praha, 2001, ročník 2001, 254/2001 Sb.
- [2] PELIKÁN, V. 1983. *Ochrana podzemních vod*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.
- [3] PITTER, P. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-928-0
- [4] SBÍRKA ZÁKONŮ. *Zákon o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů* In: Sbíрка zákonů. Praha, 2001, ročník 2001, 258/2000 Sb.
- [5] DOLEJŠ, P. *Příručka pro čištění a úpravu vody*. Přerov: KEMIFLOC, 1996. 133s.
- [6] TCHOBANOGLIOUS, George, Franklin L. BURTON a H. David. STENSEL. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4th ed. Boston: McGraw-Hill, c2003. ISBN 0-07-112250-8.
- [7] GRODA, Bořivoj a kol. *Čištění odpadních vod jako nástroj k ochraně životního prostředí v zemědělské praxi a na venkově*. Ministerstvo zemědělství ČR. Brno, 2007
- [8] SPERLING, Marcos von. *Basic principles of wastewater treatment*. London. IWA Publishing, : 2007. ISBN 1843391627.
- [9] AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2003, 226 s. ISBN 978-80-7080-521-3.
- [10] JEWELL, William J. *Anaerobic sewage treatment. Part 6*. Environmental Science & Technology [online]. 1987, 21(1), 14-21 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1021/es00155a002. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00155a002>
- [11] LA REVIÉRE. *Microbial ecology of liquid waste treatment*. Advances in microbial ecology. 1977, 1, 215 - 259
- [12] HENZE, Mogens a kol. *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*. Londýn: IWA Publishing, 2008. ISBN 9781843391883.
- [13] VAN HAANDEL, Adrianus a Jeroen VAN DER LUBBE. *Handbook of biological wastewater treatment*. 2. vyd. Londýn: IWA Publishing, 2012. ISBN 9781780400006.

- [14] JAN BINDZAR A KOLEKTIV. *Základy úpravy a čištění vod*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 9788070807293.
- [15] CARLOS AUGUSTO DE LEMOS CHERNICHARO. *Anaerobic Reactors*. London: IWA Publishing, 2007. ISBN 1843391643.
- [16] HALL, E.R. Biofilm reactors in anaerobic wastewater treatment. *Biotechnology Advances* [online]. 1987, 5(2), 257-269 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/0734-9750(87)90321-1. ISSN 07349750. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0734975087903211>
- [17] DOHÁNYOS, Michal. *Anaerobní čistírenské technologie*. Brno: NOEL 2000, c1998. ISBN 80-86020-19-3.
- [18] VIOTTI, P., A. LUCIANO, G. MANCINI a V. TORRETTA. A wastewater treatment using a biofilm airlift suspension reactor with biomass attached to supports: a numerical model. *International Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2014, 11(3), 571-588 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/s13762-013-0256-6. ISSN 1735-1472. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13762-013-0256-6>
- [19] TSEZOS, Marios a Ake A. DEUTSCHMANN. An investigation of engineering parameters for the use of immobilized biomass particles in biosorption. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 1990, 48(1), 29-39 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/jctb.280480104. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.280480104>
- [20] SPERLING, Marcos von. *Activated sludge and aerobic biofilm reactors*. London. IWA Publishing, 2007. ISBN 1843391651.
- [21] Wastewater biofilters used for advanced treatment of papermill effluent. *Water Science and Technology* [online]. 1999, 40(11-12), - [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/S0273-1223(99)00706-4. ISSN 0273-1223. Dostupné z: <http://wst.iwaponline.com/content/40/11-12/101>
- [22] RACLAVSKÁ, Helena. *Technologie zpracování a využití kalů z ČOV*. Ostrava, 2007, 171 s. ISBN 978-80-248-1600-5.

- [23] WANNER J., *Activated sludge - 100 years and counting*. S.l.: Iwa (Intl Water Assn), 2014. ISBN 9781780404936.
- [24] METCALF & EDDY a INC. REV. BY GEORGE TCHOBANOGLOUS. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. Internat. ed., 4. ed. New York [u.a.]: McGraw-Hill, 2004. ISBN 9780071241403.
- [25] GALLERT, Claudia a Josef WINTER. Bacterial Metabolism in Wastewater Treatment Systems. JÖRDENING, Hans-Joachim a Josef WINTER, ed. *Environmental Biotechnology* [online]. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2004, 2005-07-26, s. 1-48 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/3527604286.ch1. ISBN 9783527604289. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527604286.ch1>
- [26] LANHAM, Ana B., Adrian OEHMEN, Aaron M. SAUNDERS, Gilda CARVALHO, Per H. NIELSEN a Maria A.M. REIS. Metabolic versatility in full-scale wastewater treatment plants performing enhanced biological phosphorus removal. *Water Research* [online]. 2013, 47(19), 7032-7041 [cit. 2018-04-26].
- [27] DAWES, E A a D W RIBBONS. The Endogenous Metabolism of Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* [online]. 1962, 16(1), 241-264 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1146/annurev.mi.16.100162.001325. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.mi.16.100162.001325>
- [28] ARCEIVALA, S. J. *Wastewater treatment and disposal: engineering and ecology in pollution control*. New York: M. Dekker, c1981. ISBN 0-8247-6973-2.
- [29] JENÍČEK, Pavel. *Slideplayer* [online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: <http://slideplayer.cz/slide/11308096/>
- [30] LERNER, K a Brenda Wilmoth LERNER. *World of microbiology and immunology*. Detroit: Gale, c2003. ISBN 0787665428.
- [31] MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* [online]. 1949, 3(1), 371-394 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>

- [32] KOPECKÁ, Jana. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakteri*[online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/steril_prace_ockovani_uchovavani.html
- [33] GUPTA, Priya, Subhasis SARKAR, Bannhi DAS, Surajit BHATTACHARJEE a Prosun TRIBEDI. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology* [online]. 2016, **198**(1), 1-15 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.1007/s00203-015-1148-6. ISSN 0302-8933. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00203-015-1148-6>
- [34] BOGINO, Pablo, María OLIVA, Fernando SORROCHE a Walter GIORDANO. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(8), 15838-15859 [cit. 2018-04-25]. DOI: 10.3390/ijms140815838. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/8/15838>
- [35] JAMAL, Muhsin, Ufaq TASNEEM a Saadia ANDLEEB. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, **4**(3), 1 - 14.
- [36] MARIC, SVJETLANA a JASMINA VRANEŠ. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *PERIODICUM BIOLOGORUM*. 2007, **109**(2), 1 - 7.
- [37] SLEZÁK, Milolav, Jiří PALARČÍK, Eva SLEHOVÁ a Zuzana BLAŽKOVÁ. *Zařízení pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou immobilizací*. Česká republika. 2016-32637. Zapsáno 27. 09. 2016.
- [38] ROSADA, Keukeu K., Navisan NAJIA, Rahma Widya NINGRUM, Dea Indriani ASTUTI, Gede SUANTIKA a Pingkan ADITIAWATI. The Ability of Biofilm Community Sampled from Metal Surfaces at Saguling Hydro Power in Utilizing Carbon Sources by Using Biolog EcoPlate™. *Journal of Biological Sciences* [online]. 2016, **17**(1), 11-20 [cit. 2018-05-02]. DOI: 10.3923/jbs.2017.11.20. ISSN 17273048. Dostupné z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jbs.2017.11.20>
- [39] ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Praha: Scientia, 2003. ISBN 978-80-86960-23-4.

- [40] BONILLA-FINDJI, O., J.-P. GATTUSO, M.-D. PIZAY a M. G. WEINBAUER. Autotrophic and heterotrophic metabolism of microbial planktonic communities in an oligotrophic coastal marine ecosystem: seasonal dynamics and episodic events. *Biogeosciences* [online]. 2010, **7**(11), 3491-3503 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.5194/bg-7-3491-2010. ISSN 1726-4189. Dostupné z: <http://www.biogeosciences.net/7/3491/2010/>
- [41] HOGG, Stuart. *Essential microbiology*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2005. ISBN 0-471-49754-1.
- [42] PRESCOTT, Lansing M., John P. HARLEY a Donald A. KLEIN. *Microbiology*. 3rd ed. Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers, c1996. ISBN 0-697-29390-4.
- [43] GEO. F. BROOKS ... [ET AL.]. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology*. 24th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2007. ISBN 0071287353.
- [44] GIBSON, G. R. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1990, **69**(6), 769-797 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01575.x. ISSN 00218847. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01575.x>
- [45] WARD, B.B. Nitrification. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* [online]. Elsevier, 2013, 2013 [cit. 2018-05-09]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7. ISBN 9780124095489. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095489006977>
- [46] TUCHMAN, Nancy C., Marc A. SCHOLLETT, Steven T. RIER a Pamela GEDDES. Differential Heterotrophic Utilization of Organic Compounds by Diatoms and Bacteria under Light and Dark Conditions. *Hydrobiologia* [online]. 2006, **561**(1), 167-177 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1007/s10750-005-1612-4. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10750-005-1612-4>
- [47] RZECZYCKA, M. a M. BLASZCZYK. *Growth and Activity of Sulphate-Reducing Bacteria in Media Containing Phosphogypsum and Different Sources of Carbon*. Polish Journal of Environmental Studies. 2005, **14**(6), 891-895.
- [48] MUYZER, Gerard. *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*. Nature Reviews Microbiology. 2008, **6**, 441-454.

- [49] TODAR, Kenneth. *Online Textbook of Bacteriology* [online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: http://textbookofbacteriology.net/environment_4.html
- [50] WIDDEL, F. New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing *Desulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov. *Archives of Microbiology* [online]. 1987, 148(4), 286-291 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1007/BF00456706. ISSN 0302-8933.
- [51] LONDRY, K. L. a D. J. DES MARAIS. Stable Carbon Isotope Fractionation by Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2003, 69(5), 2942-2949 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2942-2949.2003. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.5.2942-2949.2003>
- [52] KUEVER J., RAINEY F. A., WIDDEL F. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2 Part C. The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. 2005. pp.922-1144.
- [53] BLAŽKOVÁ, Zuzana a Jiří PALARČÍK. DENITRIFICATION EFFECT OF BACTERIA *THIOBACILLUS DENITRIFICANS*. 2017, , 1-7.
- [54] AMINUDDIN, M. *The Oxidation of Elemental Sulphur by Thiobacillus denitrificans*. *Pertanika*. 1979, 2(1), 21-27.
- [55] BELLER H. R., CHAIN P. S. G., LETAIN T. E., et al. *The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium Thiobacillus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 2006. 188:1473-1488.
- [56] MANASSARAM, Deana M., Lorraine C. BACKER a Deborah M. MOLL. A Review of Nitrates in Drinking Water: Maternal Exposure and Adverse Reproductive and Developmental Outcomes. *Environmental Health Perspectives* [online]. 2005, 114(3), 320-327 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1289/ehp.8407. ISSN 0091-6765. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1392223/>
- [57] *Wastewater Microorganisms*. GERARDI, Michael H. *Wastewater Bacteria* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2006, 2006-04-19, s. 1-10 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1002/0471979910.ch1. ISBN 9780471979913. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471979910.ch1>

- [58] OH, S.-E. a K.-S. KIM. Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulfur bacteria. *Water Science and Technology*. 2000, 42(3), 59-69.
- [59] KELLY, D. P. a A. P. WOOD. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2000, 50(2), 547-550 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1099/00207713-50-2-547. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-2-547>
- [60] SUN, Yimin a Mehdi NEMATI. Evaluation of sulfur-based autotrophic denitrification and denitritation for biological removal of nitrate and nitrite from contaminated waters. *Bioresource Technology* [online]. 2012, 114, 207-216 [cit. 2018-04-26]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.061. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412005044>
- [61] LIU, H., Y. XU, Y. MA a P. ZHOU. Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 2000, 50(2), 715-719 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1099/00207713-50-2-715. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-2-715>
- [62] Madigan M; Martinko J, eds. (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.
- [63] *Wikimedia Commons* [online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/18/Micrococcus_luteus_9758.jpeg
- [64] SMITH, NEAFIE, YEAGER a SKELTON. *Micrococcus folliculitis* in HIV-1 disease. *British Journal of Dermatology* [online]. 1999, 141(3), 558-561 [cit. 2018-04-23]. DOI: 10.1046/j.1365-2133.1999.03060.x. ISSN 00070963. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2133.1999.03060.x>
- [65] *Micrococcus luteus*. *JGI Genome Portal* [online]. [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <https://genome.jgi.doe.gov/portal/miclu/miclu.home.html>

- [66] YU, Allen C. S., Jacky F. C. LOO, Samuel YU, S. K. KONG a Ting-Fung CHAN. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(2), 855-862 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1007/s00253-013-5377-9. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5377-9>
- [67] MICHAEL T. MADIGAN a JOHN M. MARTINKO. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall, 2006. ISBN 0131443291.
- [68] NAKANO, Michiko M. a Peter ZUBER. ANAEROBIC GROWTH OF A “STRICT AEROBE” (BACILLUS SUBTILIS). *Annual Review of Microbiology* [online]. 1998, **52**(1), 165-190 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.165. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.52.1.165>
- [69] ZWEERS, Jessica C. *Towards the development of Bacillus subtilis as a cell factory for membrane proteins and protein complexes* [online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2323362/>
- [70] KOBAYASHI, K., S. D. EHRLICH, A. ALBERTINI, et al. Essential Bacillus subtilis genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*[online]. 2003, **100**(8), 4678-4683 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1073/pnas.0730515100. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0730515100>
- [71] GRAUMANN, Peter. *Bacillus: cellular and molecular biology*. Norfolk: Caister Academic Press, c2007. ISBN isbn978-1-904455-12-7.
- [72] MARDANOVA, Ayslu Mirkasimovna, Guzel FANISOVNA HADIEVA. *Bacillus subtilis Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. Agricultural Sciences* [online]. 2017, **08**(01), 1-20 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.4236/as.2017.81001. ISSN 2156-8553. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/as.2017.81001>
- [73] NAKANO, Michiko M. a Peter ZUBER. ANAEROBIC GROWTH OF A “STRICT AEROBE” (BACILLUS SUBTILIS). *Annual Review of Microbiology* [online]. 1998, **52**(1), 165-190 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1146/annurev.micro.52.1.165. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.52.1.165>

- [74] RAINEY, Paul B. a Mark J. BAILEY. Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome. *Molecular Microbiology* [online]. 1996, **19**(3), 521-533 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1996.391926.x. ISSN 0950-382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2958.1996.391926.x>
- [75] RHODES, MURIEL E. The Characterization of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of General Microbiology*[online]. 1959, (21), 221 - 263 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/21/1/mic-21-1-221.pdf?expires=1524597546&id=id&accname=guest&checksum=CB3B711101A2CB5F7CEA558D33DBC722>
- [76] PAULSEN, Ian T, Caroline M PRESS, Jacques RAVEL, et al. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* [online]. 2005, **23**(7), 873-878 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1038/nbt1110. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt1110>
- [77] GANESHAN, Girija a A. MANOJ KUMAR. *Pseudomonas fluorescens* , a potential bacterial antagonist to control plant diseases. *Journal of Plant Interactions* [online]. 2005, **1**(3), 123-134 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1080/17429140600907043. ISSN 1742-9145. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17429140600907043>
- [78] STARR SCALES, Brittan. *Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans*[online]. [cit. 27.4.2018]. Dostupný na WWW: https://www.researchgate.net/figure/Scanning-electron-micrograph-of-P-fluorescens-Photo-reprinted-with-permission-of_fig1_266401452
- [79] MEYER, J. M. a M. A. ABDALLAH. The Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology* [online]. 1978, **107**(2), 319-328 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1099/00221287-107-2-319. ISSN 0022-1287. Dostupné
- [80] SCALES, Brittan S., Robert P. DICKSON, John J. LIPUMA a Gary B. HUFFNAGLE. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(4), 927-948 [cit. 2018-04-24]. DOI: 10.1128/CMR.00044-14. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00044-14>

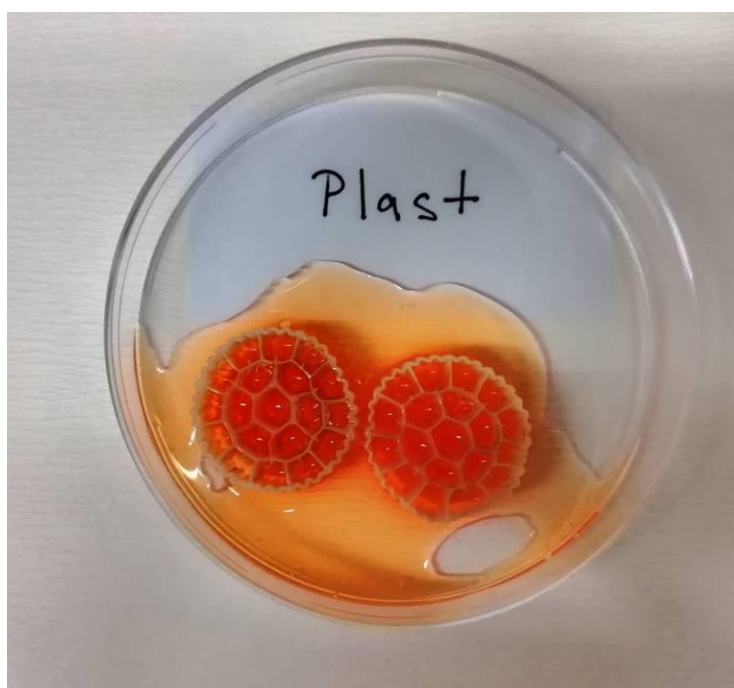
- [81] RTS-1C – Osobní bioreaktor. *LABOSERV s.r.o.* [online]. 2015 [cit. 2018-05-03]. Dostupné z: <http://www.laboserv.cz/tento-tyden-vam-radi-39-2/>
- [82] Biofinder. *QSL s.r.o.* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: <http://qualitysl.cz/biofinde>
- [83] CARVALHO, André Lacerda Ulysses de, Fábio Henrique Portella Corrêa de OLIVEIRA, Rosa de Lima Ramos MARIANO, Ester Ribeiro GOUVEIA a Ana Maria SOUTO-MAIOR. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Brazilian Archives of Biology and Technology* [online]. 2010, **53**(3), 643-652 [cit. 2018-05-04]. DOI: 10.1590/S1516-89132010000300020. ISSN 1516-8913. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000300020&lng=en&tlng=en
- [84] CAIRNS, Lynne S., Laura HOBLEY a Nicola R. STANLEY-WALL. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology* [online]. 2014, **93**(4), 587-598 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1111/mmi.12697. ISSN 0950382X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/mmi.12697>
- [85] MATSUURA, Koji, Yuka ASANO, Akira YAMADA a Keiji NARUSE. Detection of *Micrococcus Luteus* Biofilm Formation in Microfluidic Environments by pH Measurement Using an Ion-Sensitive Field-Effect Transistor. *Sensors* [online]. 2013, **13**(2), 2484-2493 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.3390/s130202484. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/13/2/2484>
- [86] HINSA, S. M. Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiology* [online]. 2006, **152**(5), 1375-1383 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1099/mic.0.28696-0. ISSN 1350-0872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28696-0>
- [87] *Thiobacillus denitrificans*. *MicrobeWiki* [online]. [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Thiobacillus_denitrificans
- [88] IGEN TOULOUSE. *Study of the optimum growth conditions of Bacillus subtilis (strain WT 168), and Pseudomonas fluorescens (strain SBW25)* [online]. 2016, 1 - 6 [cit. 2018-05-04]. Dostupné z: http://2016.igem.org/wiki/images/e/e0/T--Imperial_College--ToulouseGrowthStudy.pdf

12 PŘÍLOHY

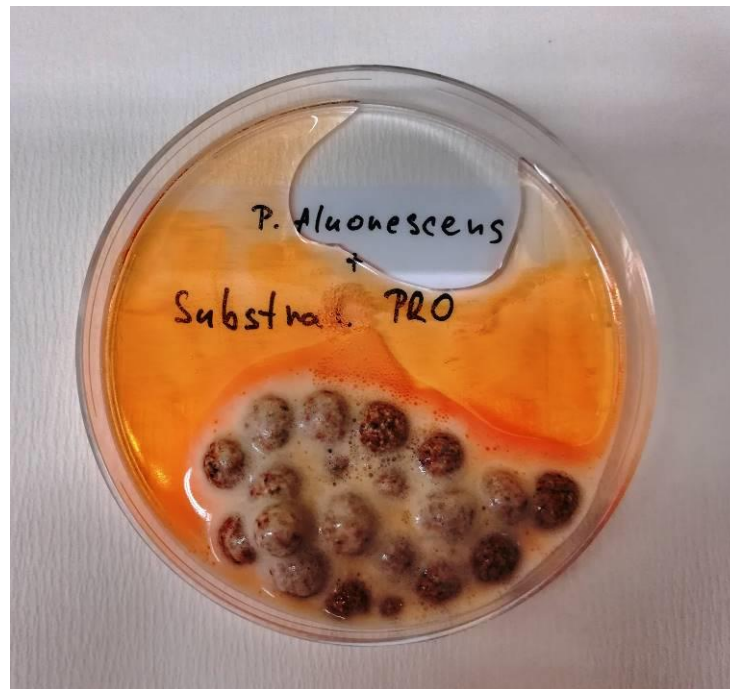
Fotografie výsledků průkazu bakteriálního biofilmu pomocí přípravku Biofinder a použitých nosičů.



Příloha 1 – Negativní průkaz čistého nosiče (zeolit)



Příloha 2 – Negativní průkaz čistého nosiče (plast)



Příloha 3 – Pozitivní průkaz nosiče s *P. fluorescens* (Substrat Pro)



Příloha 4 – Pozitivní průkaz nosiče s *M. luteus* (Biomech)



Příloha 5 – Použitý nosič (zeolit)



Příloha 6 – Použitý nosič (síra)



Příloha 7 – Použitý nosič (vápenec)



Příloha 8 – Použitý nosič (plast)



Příloha 9 – Použitý nosič (Substrat Pro)



Příloha 5 – Použitý nosič (Biomech)