

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Odstraňování kovů z vod biologickou cestou

Diplomová práce

2023

Bc. Kateřina Rýznarová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Rýznarová**  
Osobní číslo: **C21492**  
Studijní program: **N0711A130014 Udržitelný rozvoj v chemii a technologii**  
Téma práce: **Odstraňování kovů z vod biologickou cestou**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

## Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na mikroorganismy schopné redukovat sírany na sulfidy. Vytipujte vhodné mikroorganismy, které budou použity v experimentální části práce. Dále zpracujte rešerši zaměřenou na v současné době nejčastěji využívané metody odstraňování kovů z vod.
2. Proveďte laboratorní testy na modelu kolonového systému, který je využíván k odstraňování kovů z vod. Sledujte vliv různých experimentálních podmínek (druh mikroorganismu, průtok, obsah živin atd.) na produkci sulfidů a dále pak na srážení vybraných kovů z odpadních vod.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, vyhodnoťte, diskutujte a kriticky zhodnoťte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“ v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství  
Konzultant diplomové práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **25. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem *Odstraňování kovů z vod biologickou cestou* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2023

Bc. Kateřina Rýznarová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych velice ráda poděkovala vedoucímu panu Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. a konzultantce mé diplomové práce paní Ing. Květě Koryčanové, Ph.D. za jejich odbornou pomoc, cenné rady a především čas, který mi při zpracování diplomové práce věnovali. Vděk patří i paní Kopicové z laboratoří prvkové analýzy vedené paní docentkou Krejčovou, bez jejichž pomoci bych se neobešla.

Zároveň bych chtěla srdečně poděkovat rodině za podporu a trpělivost, kterou se mnou v rámci studií měli.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce je zaměřena na odstraňování kovů z vod za pomoci síran redukujících bakterií. V teoretické části práce je uveden výskyt kovů ve vodách a možnosti jejich odstranění. Následně je pozornost věnována vytipovaným bakteriím *Desulfovibrio vulgaris* a *Desulfobacter hydrogenophilus*, které byly vybrány jako vhodné síran redukující bakterie do druhého stupně kolonového systému. Experimentální část práce je zaměřena na kolonový systém LITHIM a vhodné podmínky jeho užívání. Z provedených experimentů vyplývá, že testovaný systém LITHIM lze využít k odstranění kovů z vod srážením, kdy účinnost odstranění testovaných kovů (Zn, Fe a Pb) byla v případě Pb téměř 100 %.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Kovy ve vodách, síran-redukující bakterie, odpadní vody, srážení

## **TITLE**

Biological removal methods of metals from water

## **ANNOTATION**

This master thesis focuses on the removal of metals from water using sulfate-reducing bacteria. The theoretical part of the thesis presents the occurrence of metals in waters and the possibilities of their removal. Subsequently, attention is paid to the selected bacteria *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfobacter hydrogenophilus*, which were chosen as suitable sulfate-reducing bacteria for the second stage of the column system. The work's experimental part focuses on the LITHIM column system and suitable conditions for its use. The conducted experiments showed that the tested LITHIM system can be used to remove metals from water by precipitation, where the removal efficiency of the tested metals (Zn, Fe and Pb) was almost 100% in the case of Pb.

## **KEYWORDS**

Metals in water, sulfate-reducing bacteria, wastewater, precipitation

## OBSAH

ÚVOD .....	14
TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1 Kovy ve vodách.....	15
1.1 Fyzikálně chemické metody odstranění kovů .....	17
1.1.1 Reverzní osmóza .....	18
1.1.2 Adsorpce .....	19
1.2 Biologické metody odstranění kovů.....	19
1.2.1 Biosorpce .....	19
1.2.2 Odstraňování těžkých kovů pomocí mikroorganismů .....	19
2 Srážení kovů.....	20
2.1 Srážení hydroxidy.....	22
2.2 Srážení uhličitany a fosforečnany .....	22
2.3 Srážení sulfidy .....	22
2.4 Separace sraženin .....	23
3 Koloběh síry .....	25
4 Síran redukující bakterie .....	27
4.1 Klasifikace, morfologie a přirozený výskyt .....	27
4.2 Vztah ke kyslíku .....	29
4.3 Vztah k teplotě a pH.....	30
4.4 Redukce síranů .....	31
4.4.1 Etapy disimilační redukce síranů .....	31
4.4.2 Donoři elektronů .....	33
4.4.3 Akceptoři elektronů.....	33
4.5 Izolace a kultivace v umělém prostředí .....	35
4.6 Bioreaktor .....	35
4.7 Biofilm.....	36

4.8	Význam síran redukujících bakterií v průmyslu .....	38
4.8.1	Nežádoucí vlastnosti .....	38
5	Mikroorganismy vybrané k testování .....	39
5.1	<i>Bacillus subtilis</i> .....	39
5.2	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> .....	40
5.3	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i> .....	42
6	LITHIM zařízení .....	43
6.1	Třístupňový kolonový systém LITHIM .....	43
6.2	Dvoustupňový kolonový systém LITHIM .....	45
7	Cíl práce .....	46
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	47
6	Materiál .....	47
6.1	Pomůcky .....	47
6.2	Použité mikroorganismy .....	47
6.3	Přístroje .....	47
6.4	Reagencie a chemikálie .....	48
7	Kultivační roztoky a média .....	49
7.1	Fyziologický roztok .....	49
7.2	Nutrient agar No. 2 .....	49
7.3	Anaerobní trypton-sójový agar .....	49
7.4	Síranový API bujón s laktátem sodným .....	50
7.5	Médium pro bakterie redukující sírany .....	51
7.6	Modifikované Van Houten médium .....	52
7.7	Živné médium pro kolony .....	53
8	Postupy zpracování .....	54
8.1	Příprava anaerobní bakteriální kultury .....	54
8.2	Příprava aerobní bakteriální kultury .....	54



8.3	Barvení dle Grama.....	55
8.4	Kultivace síran redukujících bakterií v bioreaktoru .....	55
8.5	Měření koncentrace sulfidu .....	56
8.6	Kultivace a průkaz bakteriálního biofilmu .....	57
8.7	Měření pH.....	58
8.8	Stanovení koncentrace vybraných kovů .....	58
8.9	Biolog .....	58
8.10	Konstrukce zjednodušeného LITHIM zařízení.....	61
9	Výsledky a diskuse.....	62
9.1	Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu.....	62
9.2	Stanovení vytipovaných parametrů kolonového systému .....	65
9.3	Vyhodnocení systému Biolog .....	67
9.4	Srážení sulfidů kovů.....	68
9.4.1	Optimalizace separace sraženin .....	68
9.4.2	Srážení modelových vod vybraných kovů modelovým roztokem sulfidů.....	69
9.4.3	Srážení modelových vod vybraných kovů roztokem sulfidů z kolon .....	71
9.4.4	Srážení vybraných kovů z reálných vod roztokem sulfidů z kolon .....	75
10	Závěr .....	78
11	Zdroje .....	80
12	Přílohy .....	85

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Separační schopnosti jednotlivých membrán .....	17
Obrázek 2: Schéma procesu reverzní osmózy .....	18
Obrázek 3: Schéma průtočného trubkového reaktoru .....	24
Obrázek 4: Cyklus síry na Zemi .....	25
Obrázek 5: Proces detoxikace reaktivní formy kyslíku .....	29
Obrázek 6: Metabolický princip bakterií redukujících sírany .....	31
Obrázek 7: Tvorba biofilmu .....	37
Obrázek 9: <i>B. subtilis</i> pod světelným mikroskopem při zvětšení 500× .....	39
Obrázek 10: Využití <i>B. subtilis</i> .....	40
Obrázek 8: <i>D. vulgaris</i> pod rastrovacím elektronovým mikroskopem při zvětšení 6000× .....	41
Obrázek 11: Třístupňový kolonový systém LITHIM .....	44
Obrázek 12: Dvoustupňový kolonový systém LITHIM .....	45
Obrázek 13: Zdroje uhlíku v anaerobní mikrotitrační destičce systému Biolog .....	60
Obrázek 14: Průkaz biofilmu <i>B. subtilis</i> na nosiči bioMECH pomocí BioFinder, odečet po 5 minutách .....	62

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Srovnání vybraných těžkých kovů, antropogenních zdrojů, symptomů a onemocnění s prozatímním maximálním tolerovatelným denním příjmem dle WHO.....	16
Tabulka 2: Součiny rozpustnosti vybraných sloučenin při 25 °C .....	21
Tabulka 3: Zkrácená klasifikace síran redukujících bakterií .....	28
Tabulka 4: Elektronoví donoři a akceptoři vybraných síran redukujících bakterií.....	34
Tabulka 5: Specifikace RTS-8 bioreaktoru.....	36
Tabulka 6: Seznam použitých přístrojů.....	47
Tabulka 7: Výčet použitých chemikálií .....	48
Tabulka 8: Složení Nutrient agaru No. 2 .....	49
Tabulka 9: Složení Anaerobního Trypton-sójového agaru .....	50
Tabulka 10: Složení Síranového API bujónu s laktátem sodným.....	51
Tabulka 11: Složení média pro bakterie redukující sírany.....	52
Tabulka 12: Složení roztoku solí .....	52
Tabulka 13: Složení modifikovaného Van Houten média .....	53
Tabulka 14: Složení živného média .....	53
Tabulka 15: Koncentrace živného média.....	56
Tabulka 16: Výchozí hodnoty buněčných hustot pro jednotlivé inokulační séra .....	59
Tabulka 17: Výsledné hodnoty absorbancí nezaočkovaného nosiče, tzv. <i>cut off value</i> .....	63
Tabulka 18: Hodnoty koncentrace $Zn^{2+}$ iontů po testovaných separačních metodách .....	68
Tabulka 19: Srážení $Zn^{2+}$ iontů modelovým roztokem sulfidu.....	69
Tabulka 20: Srážení $Fe^{2+}$ iontů modelovým roztokem sulfidů .....	70
Tabulka 21: Srážení $Pb^{2+}$ iontů modelovým roztokem sulfidů.....	70
Tabulka 22: Srážení $Zn^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. hydrogenophilus</i> .....	71
Tabulka 23: Srážení $Zn^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. vulgaris</i> .....	72
Tabulka 24: Srážení $Fe^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. hydrogenophilus</i> .....	72
Tabulka 25: Srážení $Fe^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. vulgaris</i> .....	73

Tabulka 26: Srážení $Pb^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. hydrogenophilus</i> .....	73
Tabulka 27: Srážení $Pb^{2+}$ iontů sulfidy z kolon s obsahem <i>D. vulgaris</i> .....	74
Tabulka 28: ČDV Kutná Hora vstup.....	75
Tabulka 29: ČDV Kutná Hora výstup.....	76
Tabulka 30: Vody Kaňk, srážení roztokem sulfidů z kolon (1 = <i>D. hydrogenophilus</i> , 2 = <i>D. vulgaris</i> ).....	77

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMP	Adenosinmonofosfát
APS	Adenosinfosfosulfát
ATP	Adenosintrifosfát
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
ČDV	Čistička důlních vod
<i>D. hydrogenophilus</i>	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>
<i>D. vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
EPS	Exopolymerní látky
MO	Mikroorganismy
MPB	Masopeptonový bujón
OD	Optická denzita
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PMTDI	Prozatímní maximální tolerovatelný denní příjem
PPi	Pyrofosfát
RO	Reverzní osmóza
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SOD	Superoxid dismutáza
SOR	Superoxid reduktáza
SRB	Síran redukující bakterie

## ÚVOD

Životní prostředí je každodenně kontaminováno plynnými, kapalnými i pevnými typy odpadů. Voda patří mezi základní složky životního prostředí a je kladen důraz na její šetrné používání. V dnešní době se odpadní vody produkují v nemalém množství a opětovné užívání vyžaduje řádné přečištění od různých typů kontaminantů. Mezi využívané metody čištění spadají chemické, fyzikální a biologické procesy, přičemž právě biologické procesy jsou v posledních letech čím dál častěji vyhledávány.

Odpadní vody mohou být mimo jiné kontaminovány i kovy, které se do prostředí dostávají přírodními procesy, nebo antropogenní cestou, která je častější. Těžké kovy se do vod dostávají průmyslovými procesy a vzhledem k jejich kumulativním vlastnostem v organismech jsou v prostředí nežádoucí.

Síran redukující bakterie nacházejí uplatnění při čištění průmyslových odpadních vod. Metabolismus těchto anaerobních bakterií stojí na redukcí síranů, které slouží jako elektronový akceptor. Donorem elektronů je pak nejčastěji vodík a reakcí vzniká využívaný sirovodík.

Diplomová práce se v začátku věnuje kovům ve vodách a možnostem jejich odstranění se zaměřením na biologickou cestu. V teoretické části práce jsou shrnuty poznatky o síran redukujících bakteriích, konkrétně se pak vymezuje na vytipované bakterie *Desulfovibrio vulgaris* a *Desulfobacter hydrogenophilus*. Zmíněné bakterie nacházejí uplatnění v druhé části kolonového systému LITHIM, navrženého pro odstraňování kovů z vod, nímž se práce následně zabývá. V experimentální části práce se prováděly laboratorní testy sledující produkci sulfidů za nastavených experimentálních podmínek a testy demonstrující srážení modelových a reálných vod kovů za pomoci sulfidů ze zjednodušeného kolonového systému LITHIM.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 Kovy ve vodách

Výskyt kovů ve vodách může být zapříčiněn přírodními jevy či antropogenně. V dnešní době je poměrně složité rozlišit antropogenní znečištění od přírodního pozadí. Vulkanické aktivity, eroze půdy či zvětrávání hornin jsou přírodní procesy, při kterých dochází k uvolňování kovů do okolního prostředí, odkud se dostávají do podzemních vod. Přítomná koncentrace kovů v odpadních vodách z průmyslových procesů roste společně s antropogenní činností. Mezi průmyslové procesy obohacující odpadní vody o kovy patří zejména pokovování, galvanizace a výroba či zpracování baterií. Kovy se ve vodním prostředí mohou vyskytovat v iontové podobě, která je zároveň nejčastější a nejtoxičtější formou výskytu. Dále pak jako ionty vázané ve sloučeninách, nebo jako molekuly. Při posuzování znečištění životního prostředí bývají často zmiňovány těžké kovy, jejichž hustota je větší než  $5000 \text{ kg/m}^3$ . Těžké kovy nemohou být degradovány a řadí se mezi karcinogenní látky, které jsou schopné se kumulovat ve tkáních a zapříčiňovat zdravotní komplikace. Významnou bioakumulační schopnost má pak zejména olovo (Pb), kadmium (Cd) a rtuť (Hg). Mezi nejčastěji se vyskytující těžké kovy v životním prostředí patří kromě již zmíněných tří také nikl (Ni), měď (Cu), zinek (Zn), chrom (Cr) a arsen (As). Skutečným celkovým ukazatelem znečištění ve vodách není pouze koncentrace těžkých kovů, nýbrž i jejich obsah v sedimentech, a především v živočišných (rybách) žijících na kontaminovaném místě, kteří představují koncový článek potravního řetězce ve vodním prostředí. *Tabulka 1* srovnává vybrané těžké kovy s jejich antropogenními zdroji, prozatímním maximálním tolerovaným denním příjmem dle WHO, symptomy a onemocněními (1; 2; 3).

Tabulka 1: Srovnání vybraných těžkých kovů, antropogenních zdrojů, symptomů a onemocnění s prozatímním maximálním tolerovatelným denním příjmem dle WHO (3)

<b>Těžký kov</b>	<b>Antropogenní zdroje</b>	<b>Hlavní postižený orgán a systém</b>	<b>PMTDI<sup>1</sup> [μg]</b>
Olovo	Výroba elektronických produktů, zpracování kovů, galvanické pokovování	Poškození reprodukčního systému, centrálního nervového systému, onemocnění jater a ledvin	10
Arsen	Výroba elektroniky a skla	Poškození kůže, plic, mozku, metabolického, kardiovaskulárního, imunologického a endokrinního systému	10
Měď	Zkorodované vodovodní systémy, elektronický a kabelový průmysl, chemické a farmaceutické vybavení, výroba papíru	Wilsonova, Alzheimerova, Parkinsonova choroba, poškození očí a jater, zvracení, křeče	2000
Zinek	Mosazný povlak, antikoroziční nátěry, pryžové výrobky, některá kosmetika, plechovky a aerosolové deodoranty	Deprese, letargie, respirační neschopnost, ztráta chuti k jídlu, průjem, bolesti hlavy	3000
Rtuť	Důlní provozy, koželužny, zubní plomby, pájky, Hg výbojky, zařízení na pokovování, amalgamace, katalyzátory, léčiva	Onemocnění ledvin, plic a očí, kožní dermatitida, dysfunkce nervového systému	1
Nikl	Galvanické pokovování, ražba mincí, mikrofonní kapsle, dobíjecí baterie, katalyzátory, zubní a chirurgické protézy	Anémie, průjem, encefalopatie, hepatitida, poškození plic a ledvin, gastrointestinální potíže, plicní fibróza, renální edém, kožní dermatitida, dysfunkce centrálního nervového systému	20
Kadmium	Rafinace ropy, galvanické pokovování a legování, nikl-kadmiové baterie, spalování uhlí, plastové stabilizátory	Emfyzém, hypertenze, nefropatie, <i>diabetes mellitus</i> , malformace skeletu	3
Chrom	Ocelárny a koželužny, galvanické pokovování	Alergické reakce, krvácení z nosu, vředy, oslabení imunitního systému, změny genetického materiálu, poškození ledvin a jater, rakovina	50

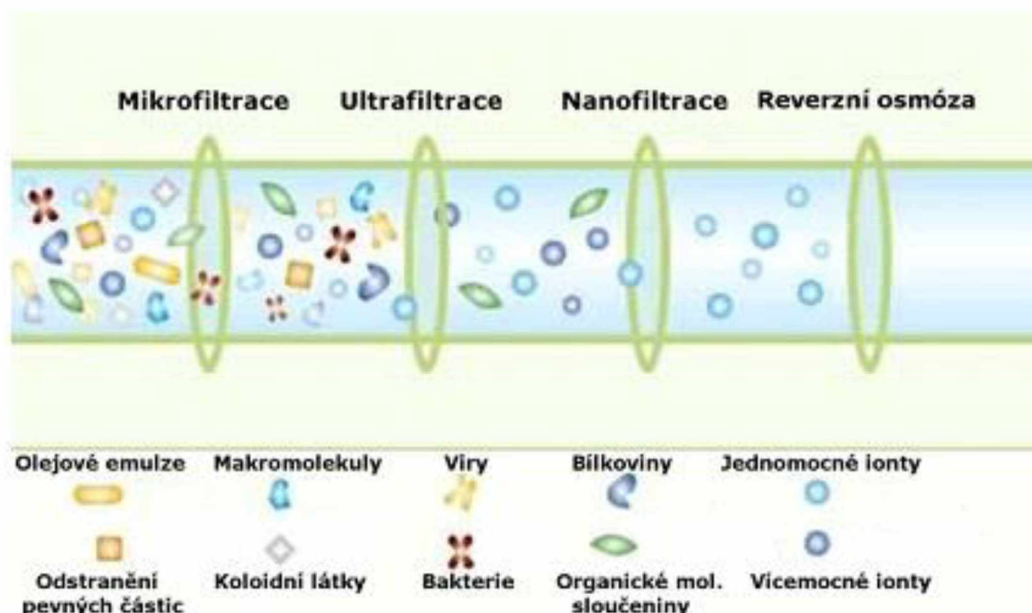
<sup>1</sup>= prozatímní maximální tolerovatelný denní příjem



Kontaminace vodních systémů v důsledku narůstajícího objemu průmyslových výrob je jedním z aktuálních environmentálních problémů, a proto je nezbytné hledat a vyvíjet účinné a vhodné technologie pro odstranění těžkých kovů z vod. K odstranění iontů těžkých kovů z vod se používá několik metod. Mezi nejčastěji používané patří metody fyzikálně chemické, kam řadíme chemické srážení, iontovou výměnu či membránové procesy. Alternativou k chemickým a fyzikálním metodám jsou metody biotechnologické, které využívají biologický materiál, jako jsou mikroorganismy a rostliny. Polutanty lze odstranit jednou metodou, nebo kombinací metod v závislosti na okolních faktorech jako je druh odpadní vody, forma a koncentrace odstraňovaných složek, nebo požadovaná účinnost procesu (1; 3; 4).

## 1.1 Fyzikálně chemické metody odstranění kovů

Membránové separace by se daly považovat za procesy na pomezí mechanického dělení (filtrace) a difuzních procesů. Hlavní roli zde hraje membrána, která odděluje tzv. *permeát*, což je vzniklý produkt po průchodu membránou, od *retentátu*, neboli směsi na vstupní straně permeačního procesu. Mezi procesy využívané v průmyslovém měřítku spadá mikrofiltrace, ultrafiltrace, nanofiltrace a reverzní osmóza (hyperfiltrace). Na *obrázku 1* jsou uvedené separační schopnosti jednotlivých membránových procesů.

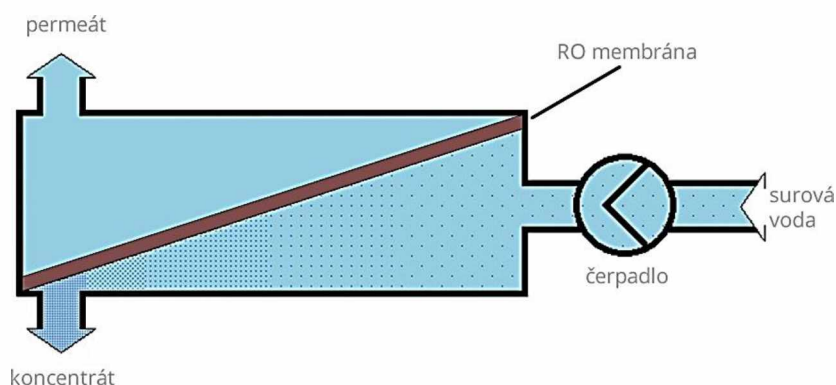


Obrázek 1: Separační schopnosti jednotlivých membrán (5)

### 1.1.1 Reverzní osmóza

Zpočátku bylo využití procesu reverzní osmózy (RO) zamýšleno pro odsolování mořské a brakické vody pro výrobu vody demineralizované. Dnes je tento proces běžně užívaný při odsolování produktů v chemickém průmyslu, nebo při úpravách technologických vod z průmyslu papírenského.

Principiálně jde o separační proces na způsob filtrace, jehož hnací silou je rozdílný tlak na stranách membrány. Působením tlaku v rozmezí 1,5-15 MPa na nástřik, projdou semipermeabilní membránou molekuly vody, kdežto ionty přítomné v roztoku se na membráně zachytí. Výsledkem je pak koncentrovaný roztok iontů tzv. retentát či koncentrát na tlakové straně a na straně permeátu čisté rozpouštědlo, viz *obrázek 2*. Velikost pórů membrány se pohybuje od 0,5 do 1,5 nm a za ideální membránu reverzní osmózy považujeme takovou, která propouští pouze molekuly vody, k čemuž je zapotřebí překonat osmotický tlak.



Obrázek 2: Schéma procesu reverzní osmózy (6)

Proces reverzní osmózy se využívá pro odstraňování iontů těžkých kovů, jako jsou ionty  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  či  $\text{Cr}^{6+}$  z průmyslových odpadních vod. Účinnost odstraňování tímto technologickým postupem dosahuje více než 98 %. K odstraňování těžkých kovů se využívá i proces nanofiltrace, který probíhá za obdobných podmínek jako RO. Ve studii zabývající se odstraňování  $\text{Pb}^{2+}$  z odpadních vod bylo dosaženo účinnosti separace 80-98 % v závislosti na použitém typu membrány, což dokazuje potenciál pro účinné odstraňování kovů z vod. Nevýhodou membránových procesů, a tedy i reverzní osmózy, je zanášení membrán a jejich čištění (3; 7).

### **1.1.2 Adsorpce**

Odstranit těžké kovy z vod lze také pomocí sorpce na aktivním uhlí ve formě granulí či jemnějších zrn. Ionty kovů se vážou na povrch aktivního uhlí, čímž jsou z kontaminované vody vychytávány. V případě vysoké koncentrace iontů kovů ve vodě samotná sorpce na uhlí nestačí a je nutné do procesu přidat další kroky. Pak hovoříme o metodě kombinované a v případě procesu s kroky: koagulace, sedimentace a filtrace s následnou sorpcí na aktivním uhlí, dosáhneme účinnosti čištění v rozmezí 95-99 % (1).

## **1.2 Biologické metody odstranění kovů**

S ohledem na environmentální prostředí se čím dál více uplatňuje řešení na bázi biotechnologických procesů, které k odstraňování iontů těžkých kovů z vod využívají přirozených vlastností mikroorganismů.

### **1.2.1 Biosorpce**

Biosorpce je nejčastěji používaným biologickým procesem pro odstraňování kovů z vod. Odstraňováním se myslí pouze modifikace na méně toxické formy. V principu jde o schopnost organismů sorbovat na svůj povrch škodlivé látky, v našem případě kovy, a využívat je v rámci svého metabolismu či je jen kumulovat. V takovém případě hovoříme o bioakumulaci.

### **1.2.2 Odstraňování těžkých kovů pomocí mikroorganismů**

Mezi vyzkoušenými typy organismů, které byly využity pro odstranění kovů z vod jsou řasy, houby a bakterie. V posledních letech nabyly v tomto směru velkého významu právě bakterie, konkrétně síran redukující. V případě využití tohoto typu bakterií ovšem nejde o schopnost bakterií sorbovat těžké kovy na svůj povrch, nýbrž o složitý proces, který je v následujících kapitolách podrobně popsán (8).

## 2 Srážení kovů

Srážení neboli precipitace je definováno jako proces podvojně záměny, při kterém se z roztoku kombinací iontů vylučují málo rozpustné pevné látky nazývané sraženiny či precipitáty. Ke srážení může dojít hned z několika důvodů: překročení hranice rozpustnosti dané látky v roztoku, přidáním srážecího činidla či změnou pH, nebo teploty. Tvorba sraženin má tři stádia: nukleaci, růst krystalů a aglomeraci.

a) Nukleace je prvním stádiem tvorby sraženiny. Dochází k ní po smíchání roztoku sráženého iontu s roztokem srážedla za tvorby zárodečného krystalizačního centra, tak zvaného nuklea. Velikost center se pohybuje v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-7}$  m. Samotná nukleace se dělí na homogenní a heterogenní.

K homogenní nukleaci dochází v přesyceném roztoku. Heterogenní nukleace je zapříčiněna cizími částicemi v roztoku a zárodečná centra tak mají jiné chemické složení než vznikající sraženina. U homogenní nukleace má zárodečné centrum stejné chemické složení jako vznikající sraženina.

b) Druhým stádiem je růst krystalů označovaný též jako stárnutí sraženiny. V principu jde o narůstání dalších částic na vzniklé zárodečné krystaly a utváření amorfni či krystalické sraženiny. Během vyžívání sraženiny dochází k:

- změně vlastností jako je rozpustnost či struktura vznikajícího krystalu,
- délkové rozmanitosti celého procesu (může trvat několik sekund, minut i let),
- k přechodu z amorfni na krystalickou strukturu.

c) Posledním stádiem je aglomerace, při které dochází k dalšímu shlukování sraženiny. Velikostně se může jednat o mikroskopické, okem neviditelné útvary, ale i makroskopické částice o velikosti několika centimetrů.

Vznik sraženiny je definován součinem rozpustnosti  $K_s$  za určité teploty a iontové síly roztoku označované  $I$ , který určuje její termodynamickou stabilitu a vyjadřuje rovnováhu mezi sraženinou a nasyceným roztokem. V *tabulce 2* jsou uvedené hodnoty součinů rozpustnosti vybraných sloučenin (9; 10).

Například pro reakci:



Má rovnovážná konstanta tvar: (2)

$$K_{MN} = \frac{a^m(M^{n+}) \times a^n(N^{m-})}{a(M_m N_n)}$$

Aktivita čisté látky se rovná 1, a tudíž rovnice dostává následný tvar:

$$K_{MN} = a^m(M^{n+}) \times a^n(N^{m-}) \quad (3)$$

Čím menší hodnotu součin rozpustnosti má, tím je sraženina méně rozpustná, přičemž rozpustnost ovlivňují následující parametry:

- teplota roztoku,
- nadbytek jednoho z vlastních iontů neboli iontů, z kterých je sraženina vytvořena,
- cizí ionty,
- pH.

Podmínkou pro vznik sraženin je hodnota součinu iontových koncentrací, která musí být větší než  $K_s$ :

a)  $K_{MN} > [M]^m \times [N]^n$  sraženina nevzniká (4)

b)  $K_{MN} < [M]^m \times [N]^n$  sraženina vzniká do rovnováhy  $K_{MN} = [M]^m \times [N]^n$  (5)

Tabulka 2: Součiny rozpustnosti vybraných sloučenin při 25 °C

Sloučenina	pK <sub>s</sub>	Sloučenina	pK <sub>s</sub>
AgBr	12,3	CdS	27
AgCl	9,7	FeS	18,1
AgI	16,1	HgS	52,7
Ag <sub>2</sub> S	50,1	PbF <sub>2</sub>	7,4
CaF <sub>2</sub>	10,4	PbI <sub>2</sub>	8,1
CoS	25,6	PbS	27,5
CuS	36,1	PbSO <sub>4</sub>	7,8
Cu <sub>2</sub> S	48,5	ZnS	24,7

Mezi nejpoužívanější srážedla patří zejména hydroxidy (OH<sup>-</sup>), sulfidy (S<sup>2-</sup>), uhličitany (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) a fosforečnany (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (11).

## 2.1 Srážení hydroxidy

Srážení za pomoci hydroxidů je nejrozšířenější technika pro úpravu odpadních vod. Proces je totiž snadno automatizován a řízen regulátorem pH. Důvodem častého používání je i relativně nízká cena. Mezi nevýhody této metody patří nedostatečná účinnost, jelikož konečná koncentrace kovu zůstává v rozmezí od 0,5 do 2 mg/l (9).

Ve většině provozoven se upřednostňuje srážení vápenným mlékem ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) namísto NaOH, a to i přes to, že vzniká větší množství kalu. Důvodem je omezení následného rozpouštění amorfních hydroxidů NaOH a taktéž snadná příprava neutralizačních roztoků s přesnou a stálou koncentrací (11).

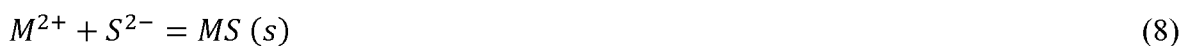
## 2.2 Srážení uhličitany a fosforečnany

Uhličitany se ke srážení používají zejména v případech, kdy jsou ve vodách přítomné dvoumocné ionty, například kadmium  $\text{Cd}^{2+}$ . Vzniklé kaly jsou hustější než při srážení hydroxidy, což napomáhá lepší sedimentaci a filtraci.

Fosforečnany se běžně užívají při srážení vod s vysokým obsahem vápníku, přičemž tvoří suspenze (11).

## 2.3 Srážení sulfidy

Srážení sulfidů kovů je proces, který se využívá k odstranění nebo regeneraci kovů a metaloidů z průmyslových odpadních vod jako jsou drenáže kyselých dolů, odpadní vody z hutí mědi, nebo hydrometalurgické výluhy. V dnešní době se klade důraz spíše na odstranění kovů z vod než na jejich regeneraci. Jako zdroj sulfidů se běžně využívá sulfid sodný, resp. vápenatý, a to k reakci s kationtem kovu ve vodném roztoku dle reakčních mechanismů uvedených v následujících rovnicích:



K reakcím lze využít také síran redukující bakterie (SRB), které redukují kyselý síran z vod na sulfid. V porovnání s hydroxidy mají sulfidy kovů nízkou rozpustnost, což je jejich přední vlastností a značí to potencionálně vysokou účinnost při odstraňování. Tato nízká rozpustnost vzniklých sraženin je však zároveň problémem efektivního využití sulfidů pro odstraňování kovů. Díky tomu totiž celý proces probíhá v přesyceném prostředí a srážecí reakci je velmi obtížné řídit. Zároveň vzniká velké množství drobných částic, které jsou špatně oddělitelné. Z těchto důvodů je praktická účinnost po zavedení procesu do praxe mnohem nižší než účinnost teoretická (9; 11).

## 2.4 Separace sraženin

Mezi typické separační metody využívané pro odstraňování sraženin patří zejména sedimentace, filtrace nebo centrifugace.

Sedimentací neboli usazováním docílíme oddělení pevných částic rozptýlených v kapalně směsi na základě gravitační síly. Nejprve se usazují částice s nejvyšší hustotou, případně velikostí.

Při filtraci kapalina prochází filtračním prostředím, zatímco částice tuhé látky, které mají větší průměr než je průměr pórů filtračního prostředí, jsou jím zadržovány. Filtrační materiál je vždy volen na základě chemických vlastností filtrované směsi a velikosti částic. Rozlišujeme několik typů filtrací:

- Filtrace prostá – základní aparaturou je nálevka, do níž se vkládá nejčastěji papírový filtr, který může být buď hladký, nebo skládaný.
- Filtrace za sníženého tlaku – je v porovnání s prostou filtrací mnohem rychlejší, využívá Büchnerovy nálevky a podtlaku, kterého dosahuje odsáváním za pomoci vodní vývěvy nebo čerpadla.
- Filtrace dráždivých látek – při filtrování chemicky agresivních látek jako jsou například silné alkálie nebo kyseliny, které by mohly filtrační papír rozleptat, se využívá tak zvané frity neboli nálevky s pevnou skleněnou nebo keramickou vložkou a podtlaku, kterého je dosahováno stejně jako u filtrace za sníženého tlaku.

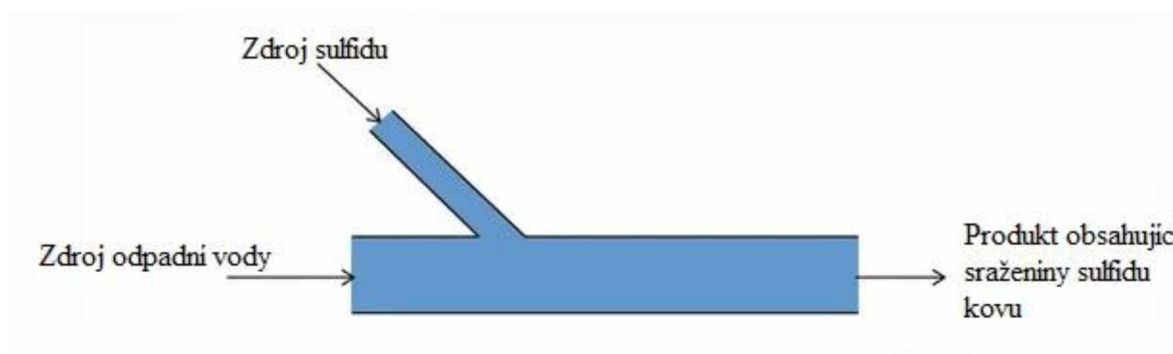
Rychlost filtrace je závislá na velikosti filtrovaných částic, velikosti pórů, teplotě filtrované suspenze a tlaku, za kterého filtrace probíhá (12).

Centrifugace je další možností separace pevných sraženin z kapaliny, a to na základě odstředivé síly. V podstatě jde o urychlenou sedimentaci. Při procesu se částice obsažené v suspenzi separují na základě velikosti, hustoty, viskozity média a rychlosti otáčení rotoru. Dle rychlosti lze centrifugaci rozdělit na (12):

- Pomalootáčkovou – do 5 000 otáček/min,
- Rychlootáčkovou – do 25 000 otáček/min,
- Ultracentrifugaci – do 80 000 otáček/min.

V průmyslovém měřítku je snaha o zavedení metody, která by byla nejlépe průtočná, snadno aplikovatelná do stávajícího procesu, málo energeticky náročná a při níž by vznikalo minimální množství odpadů. Novodobé výzkumy se proto zaměřují na optimalizaci procesu separace vzniklých sraženin od kapaliny. Aby bylo možné účinně kovy z odpadních vod odstraňovat pomocí srážení, je rozhodující návrh reaktoru.

Průtočný trubkový reaktor je častým typem používaným v průmyslových aplikacích. Jednoduchá konstrukce znázorněná na *obrázku 3* využívá rychlou kinetiku srážecí reakce, ke které dochází v samotném potrubí. Vzhledem ke konstrukčnímu řešení zavaděného sulfidu však v místě jeho výpusti vzniká lokální přesycení, a vzniklé precipitáty mají nežádoucí vlastnosti (9; 11).



Obrázek 3: Schéma průtočného trubkového reaktoru (11)

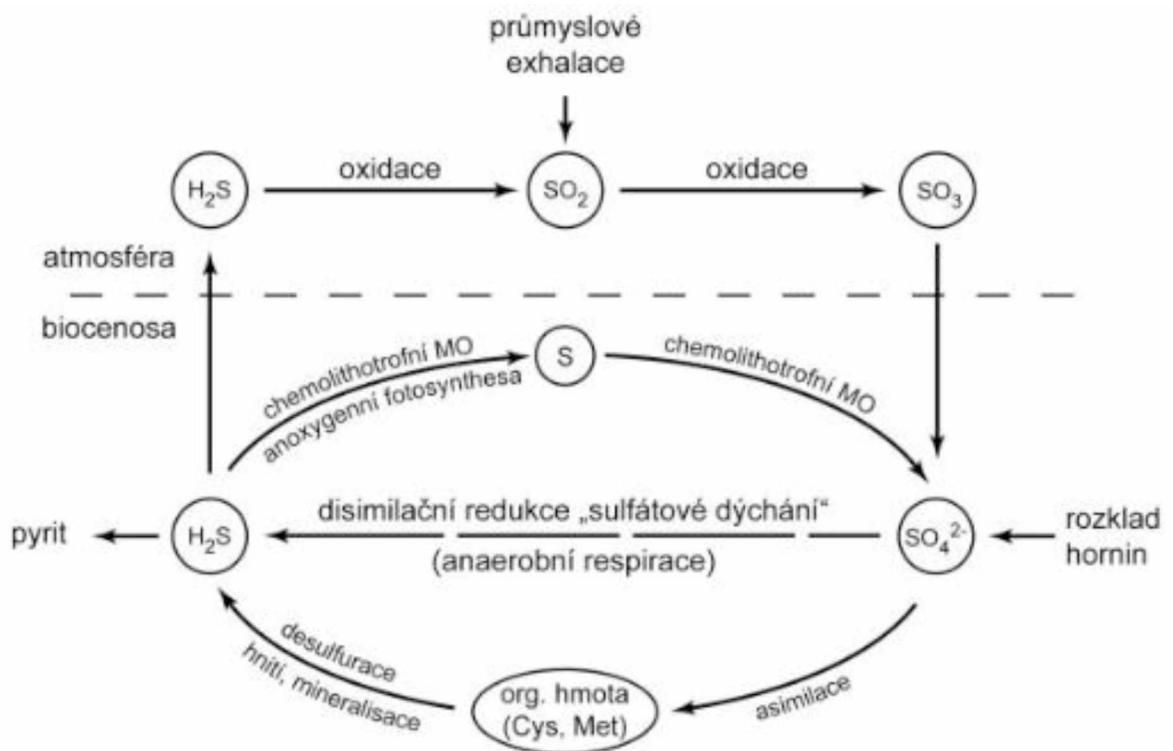
V tématu sanačních a rekultivačních prací po průmyslové či hornické činnosti stojí za zmínku státní podnik DIAMO. Při odstraňování následků těžby se tématu čištění vod věnuje zvláštní pozornost. Kromě čištění důlních vod probíhá také jejich přísné monitorování. Pro účely diplomové práce byla do kapitoly výsledků a diskuze zařazena data o výsledcích monitoringu a stavu složek životního prostředí se záměrem srovnat účinnosti srážení kovů použitými metodami.



### 3 Koloběh síry

Cyklus síry je jedním z hlavních probíhajících biogeochemických procesů na Zemi. V prostředí je síra přítomna v pevných látkách, plynech i vodách.

V pevných látkách se síra vyskytuje v rudách na bázi sulfidů. Mezi nejrozšířenější rudy patří galenit (PbS), sfalerit (ZnS) a pyrit (FeS<sub>2</sub>). Neznámějším minerálem na bázi síranů je sádrovec (CaSO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O). Ve značné míře se síra vyskytuje také v uhlí, či ropě. V plynném skupenství se v atmosféře majoritně vyskytují oxidy síry v důsledku spalování fosilních paliv. Můžeme ji však detekovat taktéž ve formě sirovodíku (H<sub>2</sub>S) či karbonylsulfidu (COS). Síra je ovšem i nepostradatelnou složkou organických materiálů. Je nedílnou součástí aminokyselin (methionin, cystein), struktur vitaminů (vitamín B7) a koenzymu A. Ve vodném prostředí ji nacházíme především ve formě síranů. Ze zmíněného výskytu síry je patrné, že se nejčastěji vyskytuje v oxidačním stavu S<sup>0</sup>, S<sup>-II</sup> a S<sup>VI</sup> (13).



Obrázek 4: Cyklus síry na Zemi (14)

Při rozkladu hornin s obsahem síry vznikají ve vodě rozpustné síranové ionty, které mohou být vstřebávány rostlinami a mikroorganismy (MO). Potravním řetězcem se tyto ionty transformují do organické podoby ve formě bílkovin. Po uhynutí organismu dochází k procesu desulfurace neboli hnití a rozkladu organických sloučenin. Na procesu mineralizace se podílejí bakterie rodu *Escherichia* či *Proteus*. Síra se opět uvolní, tentokrát ve formě sulfanu ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Autotrofní sírné bakterie, například rodu *Beggiatoa*, vzniklý sulfan využijí jako zdroj energie a v metabolickém procesu jej zoxidují na elementární síru. Elementární síra je dále chemoautotrofními organismy jako jsou bakterie rodu *Thiobacillus* oxidována na sírany, které anaerobní SRB využívají jako koncové akceptory elektronů v procesu anaerobní respirace a dávají za vznik sulfidům. Část sulfanu, jakožto toxického plynu, je kromě spotřeby autotrofními bakteriemi uvolňována do atmosféry, kde se oxiduje na oxid siřičitý ( $\text{SO}_2$ ). K vysoké koncentraci oxidu siřičitého v atmosféře přispívá také jeho průmyslová exhalace zapříčiněná spalováním uhlí. Následnou oxidací se  $\text{SO}_2$  mění na  $\text{SO}_3$ , který je taktéž do ovzduší uvolňován i antropogenně. Oxidy síry se v ovzduší vážou na vzdušnou vlhkost a tvoří mlhu kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), která se následně projeví v podobě tak zvaných kyselých dešťů. Kyselá voda následně prosakuje z povrchu do hornin, kde se opět vyskytuje v podobě  $\text{SO}_4^{2-}$ . Koloběh je znázorněn taktéž na *obrázku 4*.

Jak již bylo řečeno, jednotlivé formy výskytu síry mohou být využívány mikroorganismy pro jejich růst či k získání energie. Jakýkoliv proces, který chemicky transformuje nebo transportuje síru mezi jednotlivými matricemi, ve kterých se vyskytuje, má potenciál ji frakcionovat na jednotlivé izotopy. Právě díky detekci izotopů, které jsou 3,5 milionu let staré, dnes víme, jak dlouho se disimilační redukce vyvíjela (13; 14; 15; 16).

## 4 Síran redukující bakterie

SRB lze definovat jako smíšenou skupinu bakterií, která je morfologicky a nutričně diverzifikovaná, avšak bezpodmínečně anaerobní, využívající síran, nebo jiné oxidované sloučeniny síry, jako akceptor elektronů při disimilaci organických sloučenin (17).

Anaerobní SRB ve svém životním cyklu síran využívají k dýchání, stejně jako aeroby využívají kyslík. Síran je takzvaným terminálním akceptorem elektronů. I přes širokou škálu rozmanitostí v morfologických znacích či nárocích na substrát, mají bakterie společnou vlastnost, a to je schopnost redukce síranů za anoxických podmínek, z čehož vyplývá i jejich označení (18).

### 4.1 Klasifikace, morfologie a přirozený výskyt

Historicky byla přeměna síranu na sulfid uznána jako biogenní proces v druhé polovině 19. století a do roku 1886 se předpokládalo, že tuto přeměnu iniciují řasy. V témže roce Hoppe – Seyler demonstroval, že proces vyžaduje přísné anoxické podmínky a externího dárce elektronů neboli podmínky, které řasy neumožňují. O 9 let později v roce 1895 holandský mikrobiolog M. W. Beijerinck dokázal, že redukce síranů je katalyzována bakteriemi a izoloval první čistou kulturu *Spirillum desulfuricans*, dnes známou pod názvem *Desulfovibrio desulfuricans* (19).

Přízvisko *Desulfovibrio* dali první izolované kultuře v roce 1936 Kluver a van Niel. V následujících letech byly bakterie podrobně studovány a klasifikovány. Moderní klasifikace SRB je založená na sekvenční analýze genu 16S rRNA, který je získán metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou elektroforézou. Aktuální seznam síran redukujících bakterií i s morfologickými vlastnostmi je uveden v *tabulce 3* (17; 20; 21; 22).

SRB mají širokou škálu tvarů. Můžeme je pozorovat ve tvaru rovných nebo zakřivených tyčinek, oválů, koků či vibrií. Velikostně se pohybují v rozmezí 0,3-4  $\mu\text{m}$  a vyskytují se jednotlivě, v párech, ale i ve shlucích zvaných agregáty. U některých SRB se vyskytují morfologické znaky, které nejsou pro jejich život nezbytné. Takovýmto znakem může být přítomnost bičíku či fimbrií. Morfologie není ideální způsob pro identifikaci jednotlivých druhů bakterií, jelikož bakterie může mít rozdílnou morfologii za ideálních podmínek než za podmínek extrémních (18).

Tabulka 3: Zkrácená klasifikace síran redukujících bakterií (21; 22)

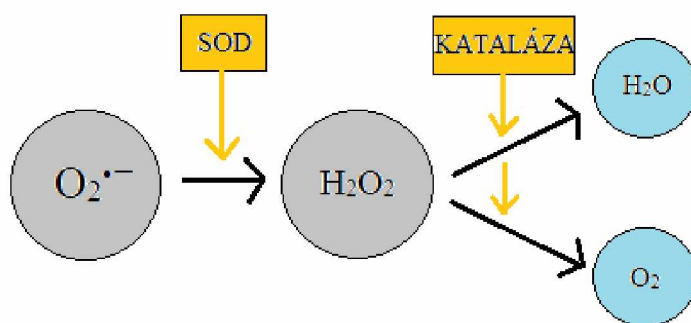
Rod	Morfologický tvar	Bičíky	Desulfoviridin	Oxidace acetátu	Optimální růstová teplota [°C]
I. Gramnegativní, mezofilní, nesporulující síran redukující bakterie					
<i>Desulfobacter</i>	vibria	+/-	-	CAC <sup>1</sup>	28–32
<i>Desulfobacterium</i>	oválné tyčinky	+/-	-	K <sup>2</sup>	20–35
<i>Desulfobulbus</i>	oválné/rovné tyčinky	-/+	-	N <sup>3</sup>	28–39
<i>Desulfococcus</i>	koky	-/+	+	K	28–36
<i>Desulfomicrobium</i>	oválné tyčinky	+/-	-	N	28–37
<i>Desulfomonas</i>	tyčinky	-	+	N	30–40
<i>Desulfomonile</i>	tyčinky	-	+	K	37
<i>Desulfonema</i>	vlákna	+	+/-	K	30–32
<i>Desulfosarcina</i>	oválné tyčinky/koky	+/-	-	K	33
<i>Desulfovibrio</i>	vibrio	+	+	N	25–37
II. Grampozitivní, mezofilní, sporulující síran redukující bakterie					
<i>Desulfotomaculum</i>	rovné/zakřivené tyčinky	+	-	N/K	25–38, termofilní 50–65
III. Gramnegativní, bakteriální, termofilní síran redukující bakterie					
<i>Thermodesulfobacterium</i>	vibrio/rovné tyčinky	-/+	-	N	65–70
IV. Gramnegativní, archeální, termofilní síran redukující bakterie					
<i>Archaeoglobus</i>	koky	+/-	-	K	82–83

<sup>1</sup>Kompletní oxidace přes citrátový cyklus, <sup>2</sup>Kompletní oxidace acetátu, <sup>3</sup>Neúplná oxidace acetátu

Mezi hlavní místa, kde se SRB vyskytují, patří mořské sedimenty, u kterých celý výzkum bakterií započal. Řada z nich se však vyskytuje mimo slané prostředí a můžeme je tedy nalézt i ve sladkovodních sedimentech, půdách, vodních nádržích, ale jejich přítomnost se nevyhýbá ani živočichům. Síran redukujícími bakteriemi může být osídlen i střevní trakt člověka či zvířat (17).

## 4.2 Vztah ke kyslíku

Ačkoliv SRB spadají pod anaerobní bakterie, je dokázáno, že jsou po danou dobu schopny tolerovat určité množství kyslíku. Roku 1985 Cypionka studoval vztah mezi kyslíkem a 8 druhů SRB, přičemž došel k závěru, že tolerance se mění s druhem bakterie. SRB si vyvinuly obranné adaptační mechanismy, které jim umožňují expozici kyslíkem přežít. Mechanismy můžeme rozdělit na behaviorální strategie a molekulární strategie. Behaviorální strategie zahrnuje aerotaxi a agregaci, která bakteriím umožní přežít periodickou expozici kyslíkem. Molekulární strategie jsou schopné pouze některé druhy bakterií, které dokážou eliminovat kyslík i jeho reaktivní formy (ROS), a ochránit tak buňku před poškozením. Mezi reaktivní formy kyslíku patří superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ ). Superoxidový anion je u desulfovibrií vychytáván dvěma enzymy – superoxid dismutázou (SOD) a superoxid reduktázou (SOR). SOD eliminuje superoxidové ionty dismutací na peroxid vodíku a molekulární kyslík, jak je zobrazeno na obrázku 5. U rodu *Desulfovibrio* byla také pozorována aerotaxe – bakteriální buňky v živném médiu migrovaly na místo s obsahem kyslíku 0,02 až 0,04 %, čímž bylo prokázáno, že bakterie z rodu *Desulfovibrio* má na svém povrchu chemoreceptor, sloužící jako snímač koncentrace kyslíku a redox potenciálu okolního prostředí. Růst *Desulfovibria* při nízkém obsahu kyslíku tudíž značí mikroaerobní povahu (23; 24).



Obrázek 5: Proces detoxikace reaktivní formy kyslíku (18), upraveno autorem

Při kultivacích SRB však nestačí pouze zajištění anaerobního prostředí, nýbrž musíme mít na paměti i klíčový faktor růstu, kterým je redoxní potenciál. Hodnota redoxního potenciálu by se měla pohybovat alespoň pod -50 mV a dosáhneme jí přidávkem redox-potenciálního činidla, pokud již není součástí anaerobní kultivační půdy. Jako činidlo můžeme použít sulfid sodný, či kyselinu askorbovou. Ideální hodnota redoxního potenciálu je však -200 mV (18; 25; 26).

### 4.3 Vztah k teplotě a pH

Mezi SRB patří mezofilní a termofilní druhy. Teplota je jednou z hlavních podmínek ovlivňující účinnost a rychlost redukce síranů. Mezi mezofilní rody patří i *Desulfovibrio*, jehož teplotní škála je poměrně široká. Tato bakterie dokáže růst za pokojové teploty 25 °C, nicméně z časového hlediska růst potrvá déle, než kdyby byla kultivace provedena za ideální růstové teploty 37 °C. Kmen *Desulfotomaculum* je zástupce termofilních bakterií a můžeme jej kultivovat v teplotním rozmezím od 25 °C do 60 °C. Z hlediska použití SRB v průmyslových odvětvích jsou však termofilní bakterie nákladné na provoz, a tudíž se přiklání k použití bakterií mezofilních.

Společně s teplotou je zásadním faktorem pro zajištění správné metabolické aktivity bakterií také pH. Zvýšené hodnoty pH okolního prostředí mají za následek sníženou enzymatickou kapacitu pro degradaci organických substrátů a koncentrace protonů a hydroxylů ovlivňuje i možnost rozpouštění živin. Požadavky na optimální hodnoty pH se liší kmen od kmene a z celkového pohledu se jedná o široké rozmezí hodnot, při kterých jsou SRB schopny fungovat. Již při odchylce o 1 jednotku od optimální hodnoty pH bylo zaznamenáno až 50 % zpomalení rychlosti mikrobiálního metabolismu, a tudíž i růstu.

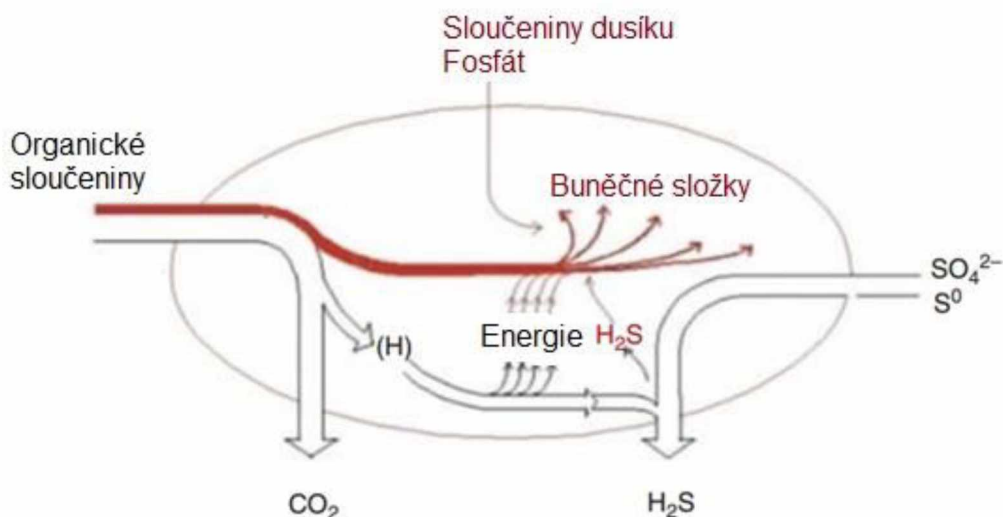
SRB můžeme rozdělit do tří skupin na základě jejich optimálního pH pro růst. První skupinou jsou acidofilní SRB, které jsou schopny přežít i v extrémních hodnotách pH, které jsou menší než 1. Druhou skupinou jsou alkalofilní bakterie přežívající v prostředí o hodnotě pH větší než 11 a poslední, neutrofilní skupinou SRB jsou bakterie s optimálním pH mezi 6 až 8. Neutrofilní SRB se považují za nejběžnější druh a z výzkumů vyplývá, že jsou schopny přežít i v pro ně extrémních podmínkách pH. Příkladem mohou být antropogenně znečištěné kyselé či alkalické půdní vody, na jejichž remediaci se s vysokou preferencí využívají (18; 27).

## 4.4 Redukce síranů

Proces redukce oxidovaných sloučenin síry jako jsou thiosíran, siřičitany nebo síran je v přírodě nepostradatelný. Rostliny i zvířata totiž dokážou využít pouze redukovanou formu zmíněných sloučenin. Mikroorganismy jsou schopné asimilační redukce, kterou začleňují zredukovanou síru přímo do buněk. Asimilací tak MO dokážou syntetizovat esenciální sloučeniny, jako jsou aminokyseliny obsahující síru (cystein, methionin). Proces disimilační redukce sulfátu je typ anaerobního dýchání, označován taktéž jako respirace sulfátu, při kterém je využit síran jako terminální akceptor elektronů (28).

### 4.4.1 Etapy disimilační redukce síranů

Bakterie redukující síran získávají energii pro syntézu a růst spojením oxidace vodíku nebo organických sloučenin, na *obrázku 6* vyznačeno červeně, s redukcí síranu na sulfid, vyznačeno černě.



Obrázek 6: Metabolický princip bakterií redukujících síran (21)

Mechanismus disimilační redukce zahrnuje několik fází, z nichž první by se dala nazvat jako transport síranu. Jelikož proces redukce probíhá na vnitřní straně cytoplasmatické membrány bakteriální buňky, je třeba síran z extracelulárního prostředí importovat do prostředí intracelulárního. Přestup je realizován za pomoci H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> antiportního přenašeče. Disimilační mechanismus redukce síranů je v porovnání s mechanismem asimilačním odlišný například typem transportéru umožňující přechod síranu do intracelulárního prostředí.

Příkladem asimilační redukce může být *Escherichia coli*, která pro transport  $\text{SO}_4^{2-}$  využívá membránové proteiny, tak zvané ABC transportéry. Proces redukce začíná konverzí síranového aniontu na adenosinfosfosulfát (APS). Síranový anion není snadno redukovatelný. Jeho redoxní potenciál je velmi nízký ( $E_0 = -0,516 \text{ V}$ ), a proto musí nejprve dojít ke zvýšení neboli k tak zvané aktivaci síranu. Aktivace je zprostředkována adenosintrifosfátem (ATP) sulfurylázou za současného spotřebování ATP, kdy produktem je adenosin-5-fosfosulfát a pyrofosfát (PPi):



Reakci ve prospěch tvorby produktů posouvá právě vznik pyrofosfátu, který je za pomoci enzymu anorganické pyrofosfatázy hydrolyzován, a tedy udržován na nízkých koncentracích. Enzym APS reduktáza katalyzuje redukcí adenosinfosfosulfát na adenosinmonofosfát (AMP) a siřičitan následující reakcí:



V následujícím kroku, kdy se siřičitany ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) redukují na sulfidy ( $\text{S}^{2-}$ ), je zapotřebí 6 elektronů od elektronových donorů:



U bakterií redukujících sírany se rozlišují čtyři hlavní typy disimilačních sulfidreduktáz, které redukcí siřičitanů iniciují. Reduktázy se rozlišují dle absorpčních spekter na desulfoviridin, desulforubidin, desulfofuscidin a protein P582, přičemž jsou všechny skupinově specifické. Desulfoviridin byl identifikován prakticky u všech druhů rodu *Desulfovibrio*, a tak je považován za jeho taxonomický marker. Desulfoviridin byl identifikován i u *Desulfococcus* bakterií a většiny bakterií z rodu *Desulfonema*. Desulforubidin byl identifikován u kmene *Desulfomicrobium* a *Desulfosarcina*. Desulfofuscidin se nachází v termofilním rodu *Thermodesulfobacterium* a protein P582 je přítomen ve sporulujícím kmeni *Desulfotomaculum* (23; 28).



#### 4.4.2 Donoři elektronů

Donory elektronů jsou nezbytné pro zajištění mechanismu disimilační redukce. Jako zdroj uhlíku a energie jsou SRB schopny využívat různé substráty, přehled je uveden v *tabulce 4*. Běžně používanými donory jsou vodík, methanol, ethanol, acetát, laktát či pyruvát (29).

#### 4.4.3 Akceptoři elektronů

SRB redukuje síran na sirovodík ve stejném smyslu, jako aerobní bakterie redukuje kyslík na vodu. Při využití síranů ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), elementární síry ( $\text{S}^0$ ) nebo thiosíranů ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) jakožto terminálních elektronových akceptorů, vzniká značné množství  $\text{H}_2\text{S}$ . Kromě sloučenin obsahujících síru jsou SRB schopny využívat i jiné molekuly přítomné v prostředí jako terminální akceptory elektronů. Rod *Desulfovibrio* může využívat dusitany a dusičnany. Společně s přehledem donorů jsou v *tabulce 4* uvedeni i elektronoví akceptoři (18; 21; 30).

Tabulka 4: Elektronoví donoři a akceptoři vybraných síran redukujících bakterií (21)

Rod	Elektronoví akceptoři (jiní, než $\text{SO}_4^{2-}$ )	Elektronoví donoři <sup>1</sup>						
		H <sub>2</sub>	Acetát	Propionát	Ethanol	Laktát	Sukcinát/Fumarát/Malát	Fruktóza / Glukóza
<i>Desulfobacter</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	±	+	-	±	-	-	-
<i>Desulfobacterium</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	±	(+)	(±)	±	±	±	-
<i>Desulfobulbus</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , $\text{NO}_3^-$	+	-	+	+	+	-	-
<i>Desulfococcus</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-	(+)	+	+	+	-	-
<i>Desulfomicrobium</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+	-	-	±	+	+	-
<i>Desulfomonile</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+	-	N	-	-	-	-
<i>Desulfonema</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	±	(+)	+	-	±	+	-
<i>Desulfosarcina</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+	(+)	+	+	+	±	-
<i>Desulfovibrio</i>	$\text{SO}_3^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , Fumarát, Nitrát	+	-	-	+	+	±	±
<i>Desulfotomaculum</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , Fumarát	±	±	±	+	±	±	±
<i>Thermodesulfobacterium</i>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	+	-	-	-	+	-	-
<i>Archaeoglobus</i>	-	+	-	N	N	+	N	+

<sup>1</sup>Symboly: +, využívá; (+), slabě využívá; -, nevyužívá; ±, využívá/nevyužívá; (±), využívá slabě nebo vůbec; N, není stanoveno

## 4.5 Izolace a kultivace v umělém prostředí

Izolace bakteriálních kultur se provádí z řádně odebraných vzorků z vybraného místa. Množení SRB bakterií probíhá na kultivačních půdách. Využívají se umělé půdy s obsahem živin zajišťujících optimální růst bakterií. Nejčastěji používanou půdou je živná půda Postgate, která má hned několik modifikací označených písmeny B, C a E. Postgate B se dá také najít pod označením DSM-63. Zmíněná půda a její modifikace se uplatňuje především při kultivaci rodu *Desulfovibrio*. Další může být Starkey's médium či Baar's médium. Díky nejednotným nárokům jednotlivých SRB bakterií na živná média neexistuje jedno univerzální, které by vyhovovalo všem (2; 31).

Optimální růstová teplota bakteriálních kultur v živných půdách se pohybuje v rozmezí 25 až 37 °C, u termofilních kmenů až 60 °C, přičemž k pomnožení dojde přibližně za 5 až 7 dní. V tekutých půdách indikuje růst SRB vznik černých sraženin FeS a typický sirovodíkový zápach, který je patrný již za 3 dny po inokulaci půdy. Růst SRB na Petriho miskách se projevuje vznikem černě zbarvených kolonií prorůstajících agar a typickým zápachem.

Nejběžněji používaná média obsahují laktát, který je jeden z nejčastějších donorů elektronů pro růst SRB v živných médiích (18).

## 4.6 Bioreaktor

RTS-8 je bioreaktor využívající patentovanou technologii Reverse-Spin® vyráběný firmou Biosan, jehož podrobnější specifikace jsou uvedeny v *tabulce 5*. Jde o neinvazivní mechanickou metodu míchání s nízkou spotřebou energie, při které se buněčná suspenze promíchává díky rotaci trubice bioreaktoru kolem své osy se změnami rotačních směrů, což zajišťuje vysoce účinné míchání. V kombinaci s infračerveným optickým systémem je možné neinvazivně v reálném čase zaznamenávat kinetiku růstu buněk. Mezi základní funkce bioreaktoru RTS-8 patří:

- Paralelní kultivace 8 bioreaktorů,
- Individuální nastavení podmínek každého bioreaktoru,
- Princip míchání Reverse-Spin®,
- Infračervený optický systém,
- Bezplatný software pro ukládání, předvádění a analýzu dat,
- Cloudové úložiště dat pro vzdálené sledování procesu kultivace.

Tabulka 5: Specifikace RTS-8 bioreaktoru

Zdroj světla	Laser
Vlnová délka ( $\lambda$ )	850 $\pm$ 15 nm
Rozsah měření	0-100 OD600
Chyba měření uživatelské kalibrace (rozsah 0,1-6 OD600)	$\pm$ 0,3
Periodicita měření za hodinu	1-60
Rozsah nastavení teploty	+15 °C ... +60 °C
Teplotní stabilita	$\pm$ 0,3 °C
Možná maximální počet bioreaktorů	8
Rozsah pracovního objemu	3–50 ml
Rozsah regulace rychlosti	150-2700 ot/min

Mezi typické aplikace RTS-8 patří sledování kinetiky růstu buněk v reálném čase, testy inhibice a toxicity, kontroly kvality kmene, optimalizace bioproduktu, nebo experimenty s teplotním stresem.

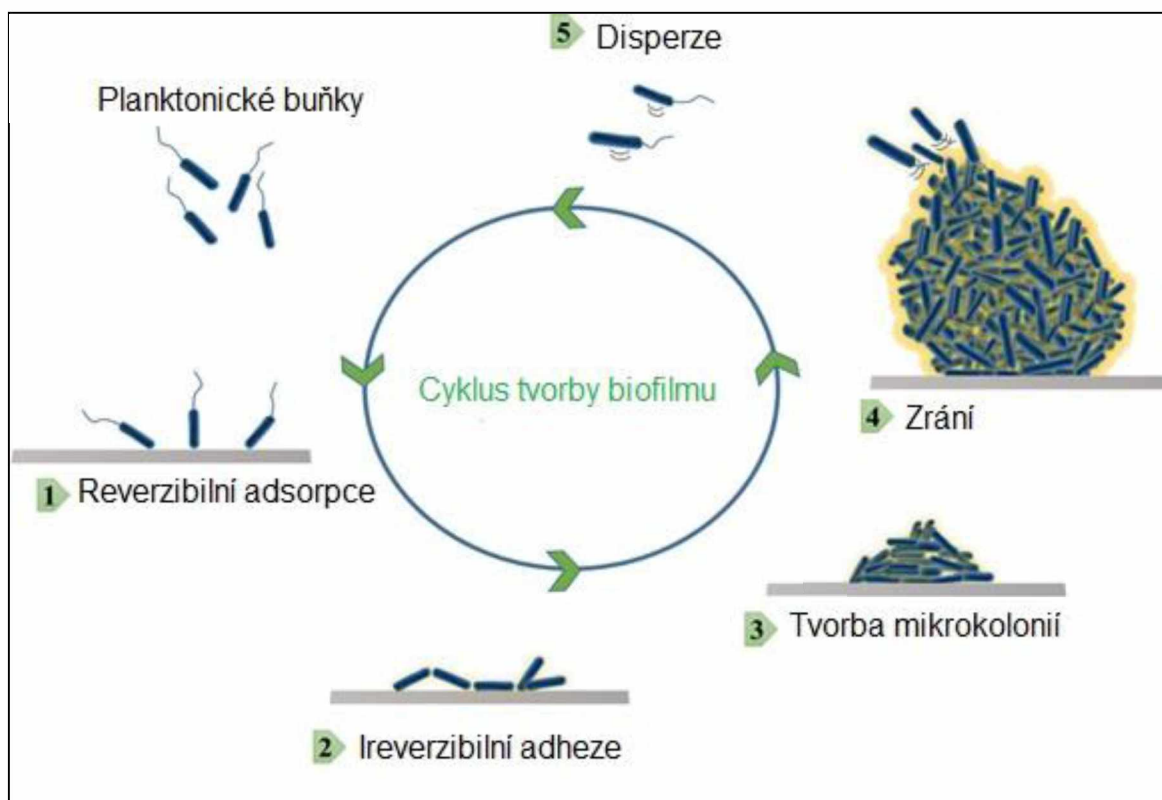
## 4.7 Biofilm

Bakterie v přírodním prostředí často vytvářejí biofilm, který zajišťuje vhodné prostředí pro jejich růst a přežití. Jako biofilm označujeme společenství bakterií adhezi k povrchu, které je obklopené extracelulární biopolymerní maticí tvořenou polysacharidy, proteiny a extracelulární DNA s bakteriálním původem, viz *obrázek 7*.

Historicky prvním pozorovatelem biofilmu je Nizozemec Anthony van Leeuwenhoek, který na přelomu 17. a 18. století pomocí jednoduchého mikroskopu pozoroval a popisoval zubní plak neboli bakteriální biofilm. Termín biofilm se vyskytuje v publikacích již od roku 1935, avšak za průkopníka se považuje Bill Costerton, který je uznáván jako zakladatel studií o biofilmech. Následný rozmach výzkumu bakteriálních biofilmů je tak datován v 80. letech 20. století. Biofilm je momentálně nejčastěji sledován za pomoci konfokálního laserového mikroskopu, za použití fluorescenčně značeného bakteriálního proteinu v kombinaci s *in silico* analýzou obrazu pro získání 3D náhledu.

Tvorba biofilmu se dá rozdělit do několika fází:

- 1) Reverzibilní adsorpce
- 2) Ireverzibilní adheze
- 3) Tvorba mikrokolonií
- 4) Zrání
- 5) Disperze



Obrázek 7: Tvorba biofilmu, převzato z (32)

Při tvorbě biofilmu hrají důležitou roli environmentální faktory a povrch, na kterém se biofilm má tvořit. Pro produkci biofilmu jsou potřeba volně se pohybující bakteriální buňky, tzv. planktonické buňky. Reverzibilní adheze neboli adsorpce je iniciována nekovalentními vazbami, jako jsou Van der Waalsovy síly, acidobazické síly nebo elektrostatické interakce a dochází k ní při prvotním kontaktu planktonické bakteriální buňky s povrchem. V této fázi se buňky stále mohou od povrchu odloučit a vrátit se do prostoru, kde dále žijí planktonicky. Působení zmíněných sil v kombinaci s okolními podmínkami jako je pH, teplota, ale i vlastnosti povrchu, dávají prostor pro produkci exopolymerních látek (EPS), díky kterým se bakterie k povrchu naváže ireverzibilně. Při ireverzibilní adhezi dochází k nevratnému přilnutí

buňky na povrch a k následné tvorbě mikrokolonií. Ve fázi zrání se buňky množí a produkují extracelulární biopolymerní matrici, jejíž tvorba je ovlivněná okolními podmínkami (přísun živin, přítomnost kyslíku, teplota, pH). V matrici se mezi mikrokoloniemi formují kanály, kterými protéká voda, a tak se jednotlivým koloniím dostává neustálého přísunu živin. Zráním vytvořený biofilm může dosáhnout tloušťky až 50  $\mu\text{m}$  a jeho struktura se odvíjí od typu proudění, ve kterém se buňky nachází. Při laminárním proudění je biofilm mikrokolonií kulatý, kdežto při turbulentním proudění se biofilm mikrokolonií rozšiřuje ve směru proudu. Poslední fází je disperze, při které dochází ke změně ve struktuře mikrokolonií. Bakteriální buňky znovu získávají pohyblivé schopnosti a oddělují se od struktury do prostoru, kde mohou začít tvořit nový biofilm.

Bakteriální biofilm je rezistentní pro širokou škálu bakteriím toxických látek, mezi které patří antibiotika či dezinfekční prostředky a taktéž bakterie chrání před nepříznivými vlivy prostředí jako je UV záření, vyschnutí nebo změny pH. V lidském těle všechny zmíněné vlastnosti tvoří podklad pro rozvoj chronického onemocnění v případě, že je biofilm bakteriemi tvořen například na povrchu kloubních implantátů (32; 33; 34; 35).

## **4.8 Význam síran redukujících bakterií v průmyslu**

Využití SRB můžeme najít hned v několika oblastech průmyslových výrob, respektive ve zpracování jejich odpadních vod.

Schopnost měnit síran na sulfid se široce uplatňuje při bioremediaci. V hydrometalurgii se v odpadních vodách po zpracování sulfidových rud nachází vysoký obsah těžkých kovů, které jsou schopny akumulace, a jelikož jsou toxické, jejich výskyt v životním prostředí je nežádoucí. Využitím SRB pro čištění odpadních vod dojde k detoxikaci, přičemž jsme schopni vyzískat zpět i kovové prvky jako je měď, stříbro, antimon či zinek ve formě kovových sulfidů. SRB mohou být použity i pro výrobu kyseliny sírové či samotné síry z kalů vznikajících čištěním odpadních vod.

### **4.8.1 Nežádoucí vlastnosti**

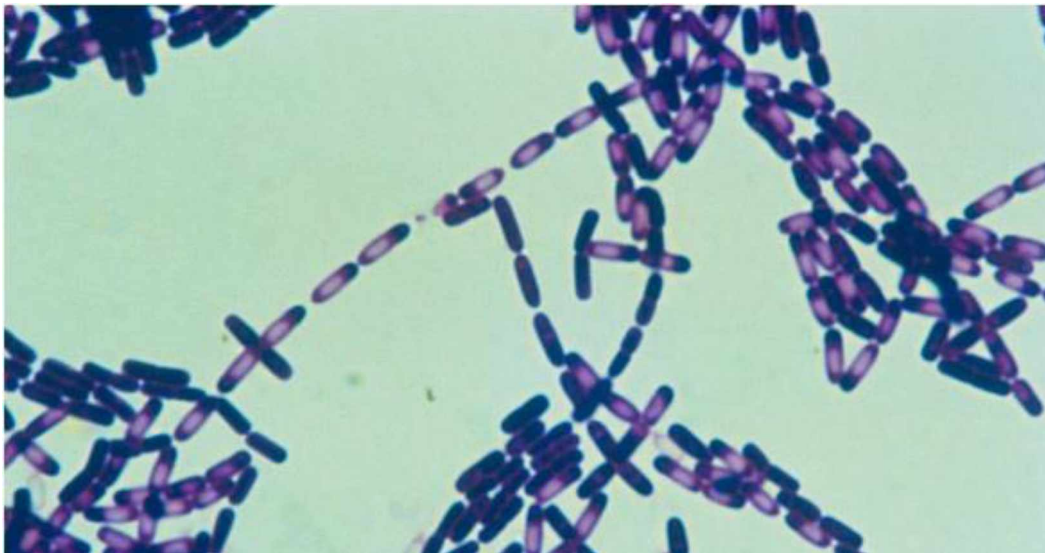
I přes značné pozitivní účinky SRB na životní prostředí má jejich působení i negativní dopady. Svou bioaktivitou jsou schopné zapříčinit biokorozi kovů přítomných v potrubích, ale i ve staveních materiálech, například v betonu. Mikrobiologicky ovlivněná koroze kovů je však ovlivněna řadou dalších podmínek, včetně typu kovu, teploty, pH, podmínek proudění, povlaků, biocidů a hydrofobnosti (27).

## 5 Mikroorganismy vybrané k testování

### 5.1 *Bacillus subtilis*

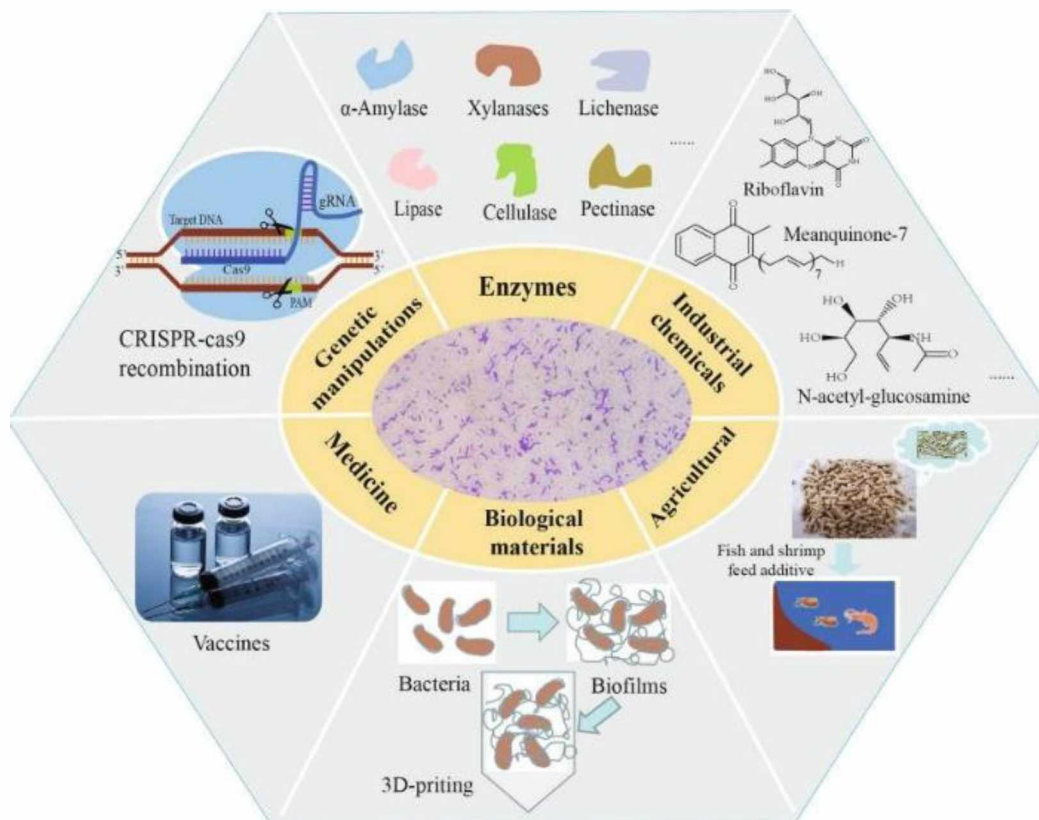
Bakterie druhu *Bacillus subtilis* patří pod kmen *Firmicutes*, třídu *Bacilli*, řád *Bacillales*, čeleď *Bacillaceae* a rod *Bacillus*. Je zástupcem obligátně aerobních mikroorganismů, který byl poprvé podrobně popsán F. Cohnem v roce 1872.

Díky produkci enzymů degradujících substráty a vysoce adaptivnímu metabolismu je bakterie schopna přežít v neustále se měnícím prostředí. Je rychle rostoucí, grampozitivní tyčinkovitého tvaru (viz obrázek 8) o průměrné délce 2-6  $\mu\text{m}$  a šířce menší, než je 1  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 8: *B. subtilis* pod světelným mikroskopem při zvětšení 500 $\times$  (36)

Optimální teplota růstu bakterií je v rozmezí 30-35  $^{\circ}\text{C}$  a za nepříznivých podmínek jsou bakterie schopné sporulace. Vytvořené endospory jsou vysoce rezistentní vůči okolnímu stresu (UV záření či vysoká teplota), ale za příznivých podmínek se opět mění na plnohodnotnou bakterii. Podobně jako *D. vulgaris* je i *B. subtilis* ubikvitní. Vzhledem k nenáročným podmínkám kultivace a všudypřítomnosti nalézá *B. subtilis* širokou škálu uplatnění (37).



Obrázek 9: Využití *B. subtilis* (38)

Bakterie nalézají uplatnění v medicínském a průmyslovém odvětví díky produkci hydrolytických enzymů a chemikálií jako je riboflavin (vitamín B2). Bakterie se také používá jako probiotikum a je přidávána do krmných směsí zvířat. Je nejlépe prostudovaným organismem gram pozitivní linie a ideálním modelem pro studium tvorby biofilmu, viz obrázek 9 (37; 38).

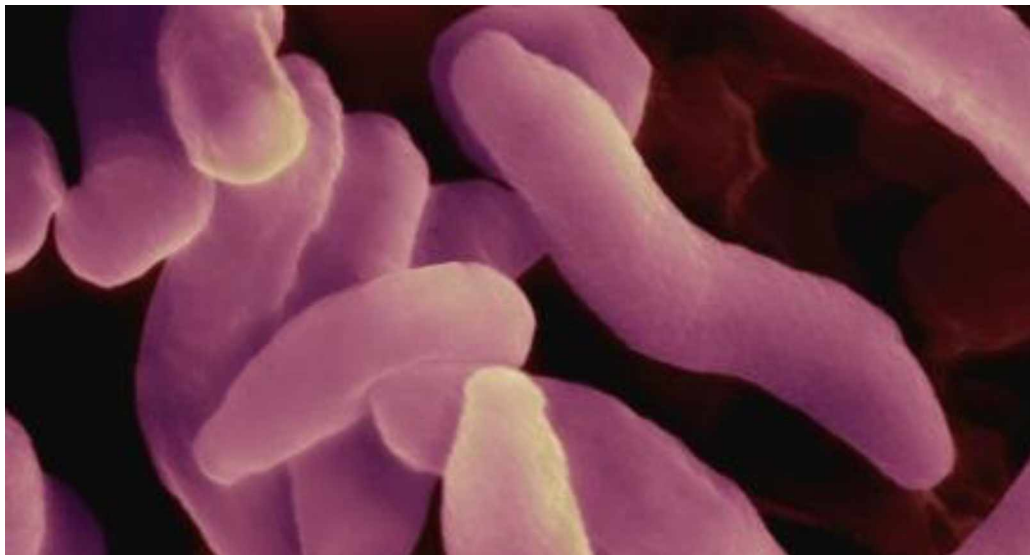
## 5.2 *Desulfovibrio vulgaris*

Druh *Desulfovibrio vulgaris* spadá pod kmen *Proteobacteria*, třídu *Deltaproteobacteria*, řád *Desulfovibrionales*, čeleď *Desulfovibrionaceae* a rod *Desulfovibrio*. Tato gramnegativní, mezofilní, nesporulující pohyblivá bakterie byla poprvé izolována roku 1946 ve Velké Británii poblíž Hildenborough, odkud si také nese pojmenování „*D. vulgaris* Hildenborough“.

Ačkoliv bakterie patří mezi striktně anaerobní SRB, je schopna kyslík do určité míry tolerovat, a proto ji označujeme jako obligátně anaerobní. Maximální koncentrace kyslíku v prostředí, která ještě nezpůsobí buněčnou smrt, je okolo 0,02 %. Bakterie má zakřivený tyčinkovitý tvar, který nedosahuje délky větší než 1,6  $\mu\text{m}$  (viz obrázek 10).



Kmen *D. vulgaris* Hildenborough (*DvH*) je dodnes používán a vyznačuje se přítomností desulfoviridinu, disimilační sulfidreduktázy iniciující redukci siřičitanů, který můžeme považovat za taxonomický marker, jelikož se vyskytuje u všech druhů desulfovibria.



Obrázek 10: *D. vulgaris* pod rastrovacím elektronovým mikroskopem při zvětšení 6000× (39)

Optimální růstová teplota bakterie *D. vulgaris* se pohybuje v rozmezí 25-37 °C a rozmezí optimálního pH je 6,5-7,3. Jako elektronové donory využívá především H<sub>2</sub>, laktát či ethanol.

*DvH* se běžně nachází na anoxických místech, jako jsou spodní vody a sedimenty, ropná stanoviště nebo plynovody, ale nevyhýbá se ani lidskému střevu. Z výčtu míst, kde ho můžeme nalézt je patrné, že je organismus tak zvaně ubikvitární neboli všudypřítomný. Bakterie je modelovým organismem pro studium energetického metabolismu bakterií redukujících sírany, a pro sledování koroze strojních zařízení zapříčiněné schopností bakterií rozkládat kovy. Pozoruhodnou vlastností je schopnost degradace toxického Cr<sup>VI</sup> na méně toxický Cr<sup>III</sup> v kontaminované půdě či ve vodě (39; 40; 41).

Využití mikroorganismu *D. vulgaris* se nesoustředí pouze na technologie pro čištění vod. Ministerstvo zemědělství České republiky při řešení problematiky a optimalizace vsádek pro bioplynové stanice zpracovávající zemědělské odpady živočišného i rostlinného původu a další vedlejší živočišné produkty, mikroorganismus využívalo při odsiřování bioplynu (42).

### 5.3 *Desulfobacter hydrogenophilus*

Druh *Desulfobacter hydrogenophilus* řadíme do kmene *Proteobacteria*, třídy *Deltaproteobacteria*, řádu *Desulfobacterales*, čeledi *Desulfobacteraceae* rodu *Desulfobacter*. Tato anaerobní gramnegativní bakterie byla poprvé izolována a charakterizována z mořského sedimentu roku 1987 F. Widdelem v Německu.

Buňky jsou díky absenci bičíku nepohyblivé, nesporující a mají protáhlý oválný tvar, dosahující délky až 3  $\mu\text{m}$  a šířky 1,3  $\mu\text{m}$ . Bakterie tohoto druhu dokážou žít autotrofně, a jejich optimální růstová teplota se pohybuje mezi 28 a 32 °C. Bylo zjištěno, že dokážou růst i při teplotách pohybujících se okolo 0 °C, čímž se od ostatních síran redukujících bakterií liší. Bakterie nemá pouze široké rozmezí růstové teploty, nýbrž i hodnot pH. Optimum je v rozmezí 7,1 až 7,4, ale růst dokážou v rozmezí 5,5 až 7,6.

*D. hydrogenophilus* je schopen redukovat sírany, siřičitany i thiosírany. Nejvyužívanějším elektronovým donorem a zdrojem uhlíku je acetát, který je zcela oxidován na oxid uhličitý ( $\text{CO}_2$ ). Kromě acetátu je schopen jako elektronového donora využívat i  $\text{H}_2$  či ethanol.

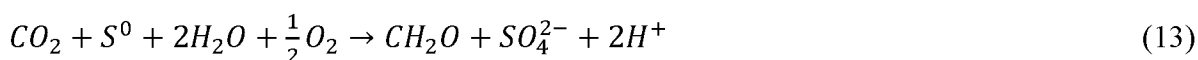
Nejčastěji se *D. hydrogenophilus* vyskytuje v anoxických braktických či mořských sedimentech, ale také ve sladkovodních sedimentech či v aktivovaném kalu (43; 44; 45).

## 6 LITHIM zařízení

### 6.1 Třístupňový kolonový systém LITHIM

Jedná se o zařízení, jehož funkcí je záchyt iontů kovů ze znečištěných odpadních, zejména průmyslových, vod biologickou (lithotrofní) imobilizací. Technologickou podstatou je kombinace tří modulů, viz *obrázek 11*, přičemž každý z nich má specifickou funkci. Pro jejich výrobu může být využito plastového materiálu, skla, nebo nerezové oceli.

První z modulů, tak zvaný sirný, má za úkol vytvořit ideální podmínky pro růst síru oxidujících bakterií, například bakterie *Thiobacillus denitrificans*. Tato bakterie elementární síru oxiduje dle následující rovnice:

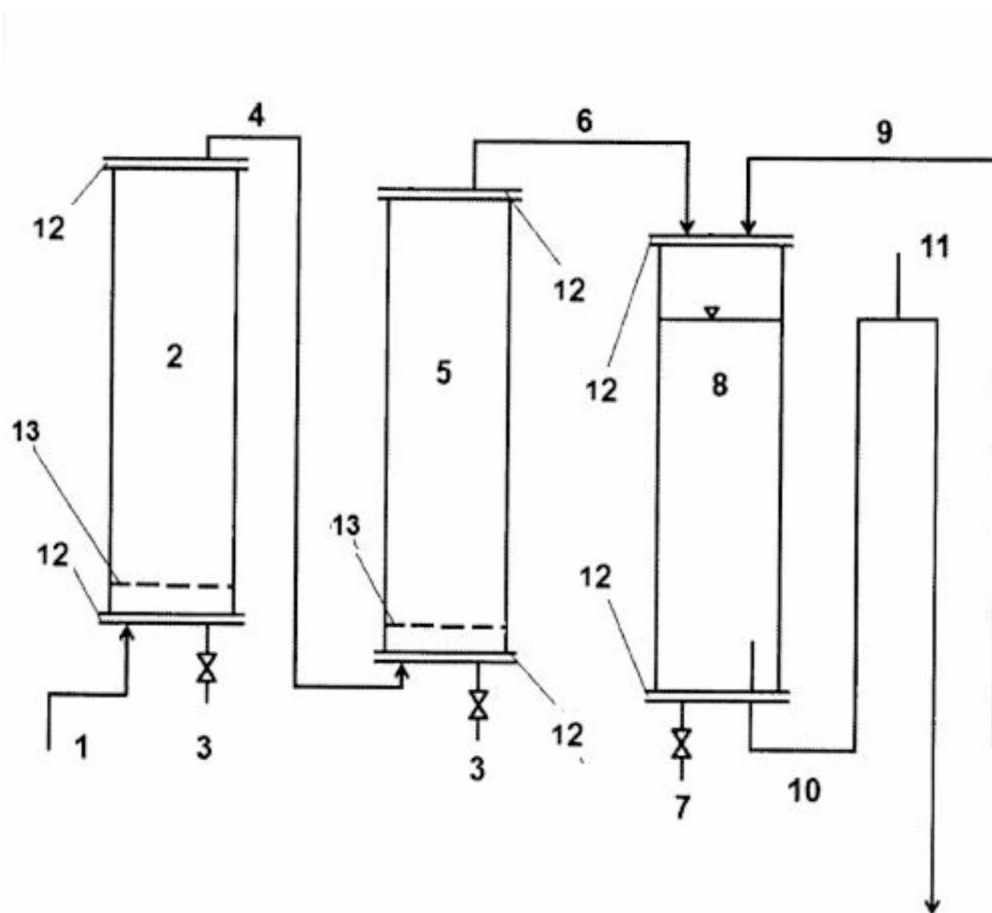


Náplň první kolony tvoří materiál s obsahem síry, na němž jsou v bakteriálním biofilmu ukotveny síru oxidující bakterie produkující  $SO_4^{2-}$  anionty. Jako náplň se používá elementární síra, nebo směs elementární síry a horniny s obsahem pyritu o ideální velikosti 3,15-4 mm. Do kolony je přiváděn živný roztok s obsahem dusičnanů, fosforečnanů a hydrogenuhlíčanů. Z prvního modulu je roztok obohacený o metabolity bakterií *T. denitrifikans*, především pak o síranové anionty, veden do následujícího druhého modulu, tak zvaného sulfidového. Hodnoty pH se na výstupu ze sirného modulu pohybují v rozmezí 5,5-7,5.

Náplň sulfidového modulu je tvořena inertním drceným zeolitem, nebo drceným slinutým sklem, na němž jsou bakteriálním biofilmem ukotveny SRB, například *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio desulfuricans* nebo *Desulfobacter hydrogenophilus*. Zmíněné SRB přeměňují sírany na sulfidy. Sulfidový modul je opatřen přívodem obohaceného roztoku živin o  $SO_4^{2-}$  anionty z prvního modulu a výstupem roztoku obohaceného o sulfidy ústícím do třetího modulu. Hodnoty pH na výstupu ze sulfidového modulu mají rozmezí hodnot vyšší v rozsahu 6-8 a jejich hodnota lze na rozdíl od modulu sirného regulovat.

Poslední, třetí část zařízení, která je taktéž nazývána jako imobilizační modul, navazuje na modul sulfidový. Náplň třetího modulu není nezbytná, ale pokud jí zařízení disponuje je tvořena inertními tvarovanými deskami, které mají za cíl prodloužit dobu kontaktu vody určené k přečištění s roztokem širokospektrálních srážedel – sulfidových

aniontů, přiváděných ze sulfidového modulu. V imobilizačním modulu tedy dochází k vysrážení iontů kovů obsažených v znečištěné vodě za pomoci metabolických produktů bakterií dodávaných z druhého modulu. Do třetího modulu tedy ústí přívod sulfidových aniontů ze sulfidového modulu, a přívod znečištěné vody. Mezi ionty kovů, které se nejčastěji vyskytují v průmyslově znečištěných vodách, patří zejména Zn, Pb, Ni, Cr, As, Cd, Cu, Ag a Hg. Voda se po průchodu imobilizačním modulem označuje jako přečištěná. Výstupní trubici pak odchází přečištěná voda, kal či sraženina. Odvodová trubice přečištěné vody může být navíc opatřena odvodušňovacím ventilem (46).



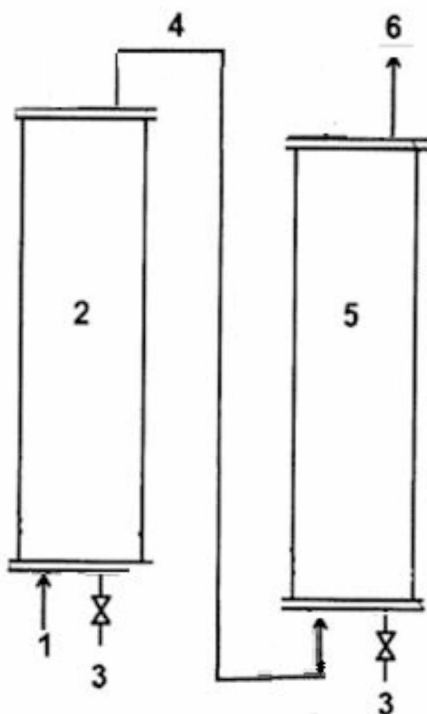
Obrázek 11: Třístupňový kolonový systém LITHIM (46)

1 – přívod živin, 2 – sírný modul, 3 – výpust', 4 – odvod obohaceného živého roztoku o sírany, 5 – sulfidový modul, 6 – odvod obohaceného živého roztoku o sulfidy, 7 – výpust', 8 – imobilizační modul, 9 – přívod průmyslové vody, 10 – odvod přečištěné vody, 11 – odvodušňovací ventil, 12 – přírubové uzávěry, 13 - rošt

## 6.2 Dvoustupňový kolonový systém LITHIM

Při vypracovávání práce byl sestaven a využit pouze dvoustupňový kolonový systém, který je zjednodušenou podobou třístupňového LITHIM zařízení. Chybějícím stupněm je poslední, imobilizační modul. Zařízení tudíž disponuje modulem sirtým (aerobním) a sulfidovým (anaerobním).

Použité skleněné kolony byly pospojovány hadičkami z gumy. V rámci laboratorní práce byly sestaveny dvě dvojice, viz *obrázek 12*. Každý ze zmíněných systémů obsahoval jinou bakteriální kulturu pro pozdější porovnání.



Obrázek 12: Dvoustupňový kolonový systém LITHIM (schéma autor)

1 – přívod živin, 2 – sirtý modul, 3 – výpuř, 4 – odvod obohaceného živého roztoku o sirtany, 5 – sulfidový modul, 6 – odvod obohaceného živného roztoku o sulfidy

## 7 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na současně využívané metody odstraňování kovů z vod a mikroorganismy schopné redukovat sírany na sulfidy za účelem vytipovat vhodné bakteriální kandidáty pro experimentální část práce.

Cílem experimentální části bylo provést laboratorní testy na zjednodušeném modelu kolonového systému LITHIM využívaného k odstraňování kovů z vod s průběžným sledováním vlivu různých podmínek na produkci sulfidů. Konečným krokem bylo provést srážení kovů z modelových vod za pomoci sulfidů vytvořených síran redukujícími bakteriemi v kolonovém modelu. Následně výsledky experimentů zpracovat, vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 6 Materiál

### 6.1 Pomůcky

Mezi využitě pomůcky patří Erlenmayerovy baňky, odměrné válce, odměrné kádinky a skleněné zásobní láhve v různých objemech. Dále pak stříčky, gumové zátky, plastové uzávěry, skleněné zkumavky (10 ml), plastové zkumavky (15 a 50 ml), plastové Petriho misky, stojánky na zkumavky, jednorázové očkovací kličky, jednorázové očkovací L-hokejky, krycí a podložní sklíčka, kahan, mikropipety, gumové hadice, skleněné kolony, sada kyvetových testů LCK 653 a kanystry různých objemů.

### 6.2 Použité mikroorganismy

Pro zjednodušený systém LITHIM zařízení byl do prvního stupně obou kolonových systémů použit referenční kmen *Bacillus subtilis* CCM 2216 pocházející z německé sbírky mikroorganismů DSMZ. Pro druhý stupeň byl v jednom případě použit rod *Desulfovibrio vulgaris*, a ve druhém *Desulfobacter hydrogenophilus* DSM 3380, taktéž z německé sbírky mikroorganismů DSMZ.

### 6.3 Přístroje

Výčet všech používaných přístrojů je uveden v *tabulce 6*.

*Tabulka 6: Seznam použitých přístrojů*

Název	Výrobce
Analytické váhy	Kern ABJ
Autokláv	System VX-40
Bioreaktor RTS-8	Biosan
Čerpadlo	Envicomp
Chladnička	Electrolux
Mikroskop	Nikon Eclipse 80i s dig. Kamerou DSFI-1
Předvážky	Kern 440-49N
Spektrofotometr UV-VIS DR6000	Hach
Standartní gelová pH elektroda	Hanna Instruments Czech s.r.o.
Termostat	Memmert
Třepačka	Heidolph Rotamax 120

## 6.4 Reagencie a chemikálie

Všechny využití chemikálie jsou shrnuty v *tabulce 7*.

*Tabulka 7: Výčet použitých chemikálií*

Všechny použité chemikálie	Vzorec	Výrobce
Agarový prášek		HiMedia
Bakteriologický pepton		HiMedia
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	UPCE
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Lach-Ner
Dusičnan draselný p.a.	KNO <sub>3</sub>	Lach-Ner
Dusičnan olovnatý p.a.	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lach-Ner
Dusičnan sodný p.a.	NaNO <sub>3</sub>	Penta
Ethanol denaturovaný	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Lach-Ner
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 12H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO <sub>3</sub>	Penta
Chlorid amonný p.a.	NH <sub>4</sub> Cl	Penta
Chlorid draselný p.a.	KCl	Lach-Ner
Chlorid hořečnatý hexahydrát p.a.	MgCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Chlorid sodný p.a.	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý dihydrát p.a.	CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Krystalová violet	C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> Cl	Merck
Kvasničný extrakt		HiMedia
Lugolův roztok	KI <sub>3</sub>	Merck
Octan sodný trihydrát p.a.	CH <sub>3</sub> COONa × 3H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Síran sodný p.a.	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lach-Ner
Síran zinečnatý heptahydrát p.a.	ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Penta
Síran železnatý heptahydrát p.a.	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	Lach-Ner
Siřičitan sodný p.a.	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Penta
Sulfid sodný monohydrát p.a.	Na <sub>2</sub> S × H <sub>2</sub> O	Penta
Thioglykolát sodný 96 %	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> NaS	HiMedia
Thiosíran sodný p.a.	N <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Lachema
Uhličitan sodný p.a.	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Lach-Ner



## 7 Kultivační roztoky a média

### 7.1 Fyziologický roztok

Pro přípravu 1 litru fyziologického roztoku bylo naváženo 9 g NaCl do 1 litru destilované vody. Takto připravený roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a následně uchováván v lednici při 5 °C pro další zpracování.

### 7.2 Nutrient agar No. 2

Živné médium Nutrient agar No. 2 dodávané společností HiMedia, je obecně používaným kultivačním médiem umožňujícím vyšetření odpadních vod či mléčných výrobků. Může být používáno pro testování sterility aerobních kultur, nebo pro jejich udržování. Složení agaru je uvedeno v *tabulce 8*. Masový pepton a hovězí extrakt v médiu zajišťují dostatek dusíkatých sloučenin, uhlíku, vitaminů a aminokyselin, zatímco chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu média a agar slouží jako želírovací látka.

Pro účely diplomové práce bylo celkově připraveno 200 ml Nutrient agaru No. 2. Ze zásobní lahve se odvážílo 8 g sypkého agaru, který byl doplněn 200 ml destilované vody. Připravený agar se nechal sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Teplý agar se za aseptických podmínek rozlil do Petriho misek a nechal ztuhnout. Výška agaru v misce byla vyšší, než bývá zvykem, a to 4-5 mm z důvodu vysychání agarů při dlouhodobém uchovávání. Petriho misky se následně skladovaly v lednici při 5 °C pro další použití.

*Tabulka 8: Složení Nutrient agaru No. 2*

Složení	g/l
Masový pepton	10
Hovězí extrakt	10
Chlorid sodný	5
Agar	15

### 7.3 Anaerobní trypton-sójový agar

Médium, jehož složení je uvedeno v *tabulce 9*, je v podstatě modifikací anaerobního krevního agaru, formulovanou Dowellem a kolegy. Trypton-sójový agar je doplněn o kvasničný extrakt, který společně se sójovým agarem a enzymatickým hydrolyzátem kaseinu zajišťuje přísun uhlíku a dusíkatých sloučenin. Dále je doplněn o vitamin K1, hemin

a L-cystin, což jsou složky podporující růst anaerobních mikroorganismů. Stejně jako u Nutrient agaru No. 2 i u trypton-sójového, má chlorid sodný funkci udržování osmotické rovnováhy média.

Na přípravu 200 ml média bylo odváženo 10,08 g agarové směsi od dodavatele HiMedia. Navážka byla doplněna 200 ml destilované vody a roztok se dal na 15 minut sterilizovat do autoklávu za teploty 121 °C. Ještě teplé médium se rozlilo do Petriho misek tak, že výška agaru v misce byla opět 4-5 mm. Agar se nechal zatuhnout a následně byl uskladněn v lednici při 5 °C pro další použití.

*Tabulka 9: Složení Anaerobního trypton-sójového agaru*

<b>Složení</b>	<b>g/l</b>
Enzymatický hydrolyzát kaseinu = trypton	15
Sójový pepton	5
Chlorid sodný	5
Kvasničný extrakt	5
Hemin	0,005
Vitamin K1	0,01
L-cystin	0,4
Agar	20

#### **7.4 Síranový API bujón s laktátem sodným**

Bujón od společnosti HiMedia, jehož složení je uvedeno v *tabulce 10*, se využívá pro kultivaci SRB. Kvasničný extrakt v médiu zajišťuje přísun živin nezbytných pro růst bakterií, kyselina askorbová přísun sacharidů. Síran hořečnatý, síran železito-amonný a chlorid sodný slouží jako zdroj iontů, zatímco hydrogenfosforečnan (di)draselný médium pufruje. Přidaný laktát sodný slouží jako substrát pro bakteriální redukci, která pokračuje redukcí síranů na sulfidy. Právě produkce sulfidů (černého zbarvení) je v API bujónu průkazem přítomnosti SRB.

Na přípravu 200 ml média bylo odváženo 2,28 g práškového agaru, ke kterému se následně přidalo 0,8 ml laktátu sodného, a směs se doplnila 200 ml destilované vody. Připravený roztok se rozlil do plastových šroubovacích zkumavek o objemu 15 a 50 ml a dal se na 10 minut autoklávovat při 121 °C. Vychlazené tekuté médium se následně dalo skladovat do lednice při 5 °C pro další použití.

Tabulka 10: Složení Síranového API bujónu s laktátem sodným

Složení	g/l
Kvasničný extrakt	1
Kyselina askorbová	0,1
Síran hořečnatý	0,2
Hydrogenfosforečnan draselný	0,01
Síran železito-amonný	0,1
Chlorid sodný	10

## 7.5 Médium pro bakterie redukující sírany

Médium se doporučuje využívat pro stanovení počtu SRB ve vzorcích vody. Při stanovení se využívá schopnosti bakterií redukovat sírany na sulfidy, které reagují s železnatými ionty za vzniku černých sraženin. Masový pepton a hovězí extrakt médiu poskytují přísun dusíku, hydrogenfosforečnan draselný slouží jako pufrovací látka. Chlorid sodný a soli síranu jsou zdrojem iontů.

Složení média od společnosti HiMedia je uvedeno v *tabulce 11*. Pro přípravu 200 ml části A, bylo ze zásobní lahve odváženo 1,57 g sušiny, doplněné 200 ml destilované vody. Na 200 ml části A, se připravilo 22,2 ml části B následujícím postupem. Odvážilo se 0,11 g části B ze zásobní lahve, a k navážce se přidalo 22,2 ml destilované vody. U třetí části média, části C, se předpokládalo, že 1 ml = 1 g, a tak bylo odpipetováno 0,77 ml tekuté části C do plastové mikrozkušavky. Připravená část A a C se následně daly sterilizovat do autoklávu na 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci se část C asepticky převedla do části A. Část B se sterilizovala procesem filtrace na membránovém filtru o velikosti pórů 0,45 µm. Filtrát se následně asepticky převedl do zásobní lahve se směsí částí A a C. Po promíchání se roztok rozlil do šroubovacích zkumavek o objemu 15 a 50 ml, které byly následně skladovány v lednici při 5 °C do dalšího použití.

Médium se dá připravit v tekuté, ale i v pevné formě. Příprava pevného agaru je totožná s přípravou tekuté formy s tím rozdílem, že k části A se před sterilizací v autoklávu navíc přidává práškový agar.

Tabulka 11: Složení média pro bakterie redukující sírany

Složení	g/l
<b>Část A</b>	
Masový pepton	2
Hovězí extrakt	1
Síran železnatý	2
Síran sodný	1,5
Hydrogenfosforečnan draselný	0,5
Chlorid vápenatý	0,1
Agar (pouze u přípravy pevné formy)	20
<b>Část B</b>	
Síran železito-amonný	0,392
Askorban sodný	0,1
<b>Část C</b>	
Laktát sodný	3,5

## 7.6 Modifikované Van Houten médium

Nejprve se připravilo 100 ml roztoku solí, jehož složení je uvedeno v *tabulce 12*. Následně se odvážíly gramáže, uvedené v *tabulce 13*, k přípravě modifikovaného Van Houten média, ke kterým se roztok solí přidal. Posledním krokem bylo přidání 5 ml roztoku thioglykolátu sodného a následné dolití směsi 1000 ml destilované vody. Roztok se dal ve skleněných zásobních lahvích o objemu 500 ml na 15 minut sterilizovat do autoklávu za teploty 121 °C. Po sterilizaci byl umístěn do lednice, kde se uchovával pro další použití při teplotě 5 °C.

Tabulka 12: Složení roztoku solí

Roztok solí	100 ml/l
Chlorid amonný	3,5
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,6
Heptahydrát síranu železnatého	10
Hexahydrát chloridu hořečnatého	18,35
Dihydrát chloridu vápenatého	6,75

Tabulka 13: Složení modifikovaného Van Houten média

Složení	g/l
Bakteriologický pepton	0,216
Kvasničný extrakt	0,204
Síran sodný	4,953
Dihydrogenfosforečnan draselný	0,409
Chlorid amonný	0,297
Hexahydrát chloridu hořečnatého	0,091
Dihydrát chloridu vápenatého	0,12
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	1,32
Chlorid draselný	0,385
Hydrogenuhlíčan sodný	1,209
Roztok thioglykolátu sodného	5 ml (zás. roztok 3,5g/350 ml dest. vody)

## 7.7 Živné médium pro kolony

Pro udržení SRB v umělém prostředí je nutné bakterie zásobovat živinami. Ty jim zaopatřuje živné médium, jehož složení je uvedeno v *tabulce 14*.

Pro přípravu 6krát zkoncentrovaného roztoku se navázilo celkem 20,475 g sypkých chemikálií, které byly doplněny 500 ml kohoutkové vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. K vysterilizovanému chladnému roztoku bylo přidáno 1,2 ml ethanolu. Současně s roztokem byla v autoklávu sterilizována i samotná kohoutková voda, která se používala pro ředění připraveného živného média na požadované nižší koncentrace a to na 4–2–1–0,5 a 0,25krát koncentrovaný roztok. Oba roztoky byly následně uskladněny v lednici při 5 °C pro další použití.

Tabulka 14: Složení živného média

Složení	g/l
Octan sodný trihydrát	3,825
Chlorid sodný	3
Ethanol	0,4 ml/l

## 8 Postupy zpracování

### 8.1 Příprava anaerobní bakteriální kultury

Anaerobní bakteriální kultura *Desulfobacter hydrogenophilus* a obligátně anaerobní bakteriální kultura *Desulfovibrio vulgaris*, byly skladovány v kryozkumavkách v mrazáku. Po rozmrznutí byly bakteriální kultury zaočkovány do připravených médií.

Prvním médiem byl anaerobní trypton-sójový agar, který se po naočkování uložil do sáčku s anaerobním prostředím a uskladňoval se 7 dní v termostatu při 30 °C, následně byl přendán do lednice a uchováván při 5 °C do dalšího použití.

Druhým použitým médiem byl síranový API bujón s laktátem sodným, přičemž do jedné zkumavky se naočkovalo 100 µl inokula *D. hydrogenophilus*, a do druhé zkumavky 200 µl inokula *D. vulgaris*. Zkumavky se daly temperovat na 30 °C do termostatu, kde byly uskladněny 14 dní a poté byly přendány do lednice, kde byly uskladněny při 5 °C do dalšího použití.

Do zkumavek s třetím médiem, médiem pro bakterie redukující sírany, bylo naočkováno 100 µl inokula *D. hydrogenophilus* a 200 µl inokula *D. vulgaris* a zkumavky byly uskladněny totožně jako zkumavky s API bujónem. Pro zjištění, na jakých půdách se SRB daří nejlépe, bylo médium pro bakterie redukující sírany připraveno i v tuhé formě na Petriho miskách. Na jednotlivé misky se naočkovalo po 200 µl inokula kultur. Misky se následně vložily do anaerobního sáčku a daly temperovat do termostatu na 30 °C po dobu 7 dní, poté byly přesunuty do lednice s teplotou 5 °C.

Důvodem využití rozdílných médií pro kultivaci anaerobních bakterií byla snaha porovnat jednotlivá média mezi sebou a určit tak, které z vyjmenovaných a použitých médií je pro následnou práci ideální.

### 8.2 Příprava aerobní bakteriální kultury

Aerobní bakteriální kultura byla připravena z udržovaného, dlouhodobě skladovaného aerobního mikroorganismu *Bacillus subtilis*. Po zaočkování 1 ml *B. subtilis* do nového živného masopeptonového bujónu (MPB) o objemu 5 ml, se zkumavka nechala 48 hodin inkubovat v termostatu při 30 °C. Po inkubaci se 100 µl inokula zaočkovalo pomocí L-hokejky na tuhý Nutrient agar No. 2, který se nechal inkubovat za stejných podmínek jako

masopeptonový bujón. Jelikož bakteriální kultura přerostla zaočkovanou Petriho misku, po 24 hodinách byl *B. subtilis* přeočkován čárkováním na nový Nutrient agar No. 2, který se nechal znova inkubovat. Po inkubaci se kultura přendala do lednice, kde se udržovala při 5 °C pro další používání.

### 8.3 Barvení dle Grama

Nejpoužívanější mikrobiologické barvení, barvení dle Grama, umožňuje rozpoznávat dvě skupiny bakterií. Grampozitivní bakterie, barví se do modro-fialova a gramnegativní bakterie barví se do růžovo-červena.

Při barvení kultur z agarů se prvně na podložní sklíčko kápne kapka fyziologického roztoku, ve které se sterilní kličkou odebraná část kultury rozmíchá a nechá volně zaschnout. Kultury z tekutých médií se ve fyziologickém roztoku nerozmíchávají, kapka tekuté kultury se pouze nechá volně zaschnout. Sklíčko se zaschlým preparátem se následně fixuje plamenem. Zafixovaný preparát se překryje vrstvou krystalové violeti, která se nechá působit po dobu 60 sekund. Po uplynutí stanovené doby se violet slije, a preparát se na 20 sekund převrství Lugolovým roztokem, který se posléze opatrně oplachuje lihem po dobu 5 sekund a následně destilovanou vodou taktéž 5 sekund. Posledním krokem je 60sekundové barvení karbolfuchsinem, který se poté oplachuje destilovanou vodou. Preparáty se po obarvení imerzně mikroskopovaly světelným mikroskopem s celkovým zvětšením 1000×.

### 8.4 Kultivace síran redukujících bakterií v bioreaktoru

Pro kultivaci bylo připraveno 8 zkumavek o objemu 50 ml s různou koncentrací živného média, ke kterým bylo následně přidáno 5 ml kultury *D. hydrogenophilus* – viz *tabulka 15*. Zkumavky byly následně vloženy do bioreaktoru na 14 dní za následujících podmínek: 30 °C, za tmy, bez rotace. Po 14 dnech se stejný postup opakoval s kulturou *Desulfovibrio vulgaris*.

Tabulka 15: Koncentrace živného média

Zkumavka	Koncentrace živného média
1	6x zkoncentrovaný
2	4x zkoncentrovaný
3	2x zkoncentrovaný
4	1x zkoncentrovaný
5	0,5x zkoncentrovaný
6	0,25x zkoncentrovaný
7	Van Houten médium
8	Voda

Během kultivace bakteriálního rodu *D. hydrogenophilus* se celkem udělalo 180 záznamů kinetiky růstu buněk, přičemž se záznamy automaticky dělaly každou hodinu. Buněčné kultury se ovšem držely u dna zkumavek, jelikož byl systém spuštěn bez otáček. A právě absence rotace měla za následek nulové změny v hodnotách optické hustoty (OD) u jednotlivých vzorků. Optická hustota se využívá k určení velikosti mikrobiální populace, jelikož je přímo úměrná hustotě/koncentraci buněk. Měření OD probíhá ve výšce cca 1,5 cm ode dna zkumavky, kde se buněčná suspenze držela. Obdobně tomu bylo u *D. vulgaris*, u něhož se udělalo celkem 330 záznamů. Růst SRB byl tedy hodnocen na základě zápachu a změny barvy pozorované v průběhu kultivace. Změny zbarvení v průběhu kultivace *D. vulgaris* jsou zdokumentovány v příloze 1.

## 8.5 Měření koncentrace sulfidu

Vzhledem k citlivosti bakterií, se kterými se pracovalo, bylo nutné koncentraci sulfidů proměřovat a sledovat tak metabolickou činnost bakterií zasazených do nového prostředí i před spuštěním průtočného dvoukolonového systému LITHIM.

Ke stanovení se využívaly komerční kyvetové testy LCK 653 firmy HACH. Koncentrační rozsah sulfidů se u tohoto typu testu pohybuje v rozsahu 0,1-2 mg/l S<sup>2-</sup>, a je vhodný pro stanovení koncentrace v odpadních či surových vodách. Omezení využití testu je dáno oblastí pH, jehož hodnota by měla být v rozmezí 3-10 a teplotou, která by měla být ideálně laboratorní do 25 °C. Princip testu je založen na reakce dimethyl-p-fenylendiaminu se sirovodíkem za vzniku meziprojektu, který se mění na leukomethylenovou modř. Ta se následně za pomoci železitých iontů oxiduje na methylenovou modř.



Postup měření probíhal následovně. Ze sulfidové (anaerobní) kolony, ve které byl přítomen *D. hydrogenophilus*, byl odebrán vzorek do 50 ml zkumavky. Z odebraného objemu byly následně odpipetovány 4 ml vzorku do měrné kyvety a bylo přidáno 0,2 ml reagentie. Vzhledem k vysokým koncentracím sulfidů v kolonách byly vzorky pro proměření za pomoci kyvetových testů 15x ředěny. Kyveta se vzorkem byla uzavřena, protřepána a nechala se 10 minut stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí dané doby se vzorky proměřily ve spektrofotometru při vlnové délce 665 nm. Stejným způsobem byly odebrány, ředěny a stanovovány výsledky koncentrace sulfidů i z kolon osídlených bakteriemi *D. vulgaris*.

## 8.6 Kultivace a průkaz bakteriálního biofilmu

Ke kultivaci bakteriálního biofilmu byl vybrán nosič bioMECH od firmy EHEIM. Tento akvaristický typ nosiče tvaru kostiček o přibližné délce hrany 1 cm a šířce do 0,5 cm je vhodným médiem určeným k osídlení bakteriemi.

V aseptickém prostředí se do 50ml zkumavek převedly kostičky nosiče, které byly zalaty předem připravenou bakteriální kulturou vybraných mikroorganismů. Připravené kultury byly v objemu 5 ml o výchozí hodnotě zákalu 0,5 dle McFarlandovy stupnice. Tato hodnota odpovídá hustotě buněčné suspenze  $1,5 \times 10^8$  buněk/ml. Zkumavky byly následně doplněny vytemperovaným médiem. Druh média se volil dle typu organismu, u aerobních bakterií šlo o MPB, u anaerobních bakterií se doplňovalo Médium pro bakterie redukující sírany. Doplněné zkumavky byly uloženy do termostatu a v časovém horizontu 62, 168 a 336 hodin byly provedené komerční i nekomerční testy pro stanovení vytvořeného biofilmu na nosiči.

K rychlému průkazu bakteriálního biofilmu se používá komerční přípravek BioFinder. Preparát se využívá k průkazu kontaminace mikroorganismy – biofilmu v potravinářském či farmaceutickém průmyslu, v sociálních službách nebo domovech důchodců. Jedná se o kapalný přípravek, který se za pomoci rozprašovače nastříká na testovaný povrch. Přípravek funguje na principu katalázového testu, kde se využívá přítomnosti enzymu peroxidázy. Pokud jsou buňky s peroxidázovým enzymem zasažené přípravkem BioFinder, jehož hlavní složkou je peroxid vodíku, dojde k rozpadu zmíněného peroxidu na kyslík a vodu. V takovém případě jde o pozitivní reakci, která je díky viskózní povaze přípravku pozorovatelná i 10 minut po provedení a barevný kontrast přirozeně oranžového přípravku s mikro bublinami vznikajícího kyslíku umožňuje pozorování pouhým okem. V případě, že se mikro bubliny netvoří ani minutu po aplikaci přípravku, jde o reakci negativní.

## 8.7 Měření pH

Z kolony bylo do 50 ml zkumavky odpuštěno 45 ml. Hodnota pH byla měřena standartní gelovou argentschloridovou elektrodou s dvojitým solným můstkem. Voděodolný přenosný pH metr se zapnul. Následně se vyjmula elektroda z ochranného obalu proti vyschnutí, opláchnula se destilovanou vodou a osušila buničinou. Poté byla ponořena do odebraného vzorku až do ustálení rovnováhy, načež se odečetala stanovená hodnota pH. Měření bylo provedeno celkem třikrát a z hodnot byla následně vypočtena průměrná hodnota.

## 8.8 Stanovení koncentrace vybraných kovů

Stanovení obsahů iontů vybraných kovů (Zn, Fe a Pb) bylo provedeno metodou atomové emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Metoda je založena na zmlžení roztoku analytického vzorku vedeného proudem argonu do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě až 10 000 K, kde dochází k excitaci elektronů přítomných atomů a následné emisi záření o přesně definované vlnové délce. Intenzita emitovaného záření odpovídá množství prvku přítomného v analyzovaném vzorku. Veškerá stanovení byla provedena formou servisního měření.

## 8.9 Biolog

Systém Biolog má několik funkcí. Pro účely této diplomové práce se využívalo funkce mikrobiální identifikace. Ta rychle a přesně identifikuje více než 2900 druhů anaerobních a aerobních bakterií, kvasinek a hub. Kromě identifikace na úrovni druhu je pokročilá fenotypová technologie schopna poskytovat informace o vlastnostech kmenů. Tato technologie, která využívá uhlík jakožto zdroje informací, identifikuje environmentální a patogenní MO vytvořením charakteristického vzoru z reakcí probíhajících na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Na *obrázku 13* jsou znázorněny zdroje uhlíku v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky. Pozornost je zaměřena na „AN MicroPlate™“, která slouží pro identifikace širokého spektra anaerobních bakterií a „GEN III MicroPlate™“, sloužícího k identifikaci aerobních bakterií. Oba typy destiček využívají stejnou redoxní reakci, která je založená na redukci barviva tetrazolium. Proces identifikace je tak díky již obsahujícímu barvivu zjednodušen a do mikrotitrační destičky není třeba nic přidávat. Databáze anaerobních bakterií obsahuje přes 360 taxonů. Celý postup procesu je velmi rychlý a skládá se z několika následujících kroků:

1. Čistá bakteriální kultura se pěstuje na univerzálním agaru BUG za anaerobních podmínek v anaerostatu či anaerobní komoře do doby, než je nárůst bakterií použitelný ke stanovení. V případě aerobů se pěstuje za podmínek aerobních.
2. Bakterie se setřou z povrchu agaru a suspendují se na od výrobce systému Biolog specifikovanou hustotu v anaerobním inokulačním séru. Pro anaerobní mikroorganismy se využívá speciální anaerobní sérum, u aerobů se sérum vybírá v závislosti na typu zkoumaného mikroorganismu ze 4 variant (A, B, C1 a C2)
  - I. Protokol A se využívá ve většině případů, je tak zvaným výchozím protokolem.
  - II. Protokol B se upřednostňuje u silně redukujících a zapouzdřených druhů bakterií jako jsou kmeny *Aeromonas*, *Vibrio* a *Bacillus*.
  - III. Protokol C1 se využívá u pomalu rostoucích bakterií, mikroaerofilních či kapnofilních.
  - IV. Protokol C2 se používá pro velmi náročné kapnofilní bakterie citlivé na kyslík (například *Actinobacillus*).

Hodnoty turbidity pro jednotlivé protokoly jsou uvedeny v *tabulce 16*:

*Tabulka 16: Výchozí hodnoty buněčných hustot pro jednotlivé inokulační séra*

Protokol	IF <sup>1</sup>	Buněčná hustota
A	A	95 %
B	B	95 %
C <sub>1</sub>	C	95–92 %
C <sub>2</sub>	C	65 %

IF<sup>1</sup>= inokulační sérum

3. Pomocí vícekanálové pipety se do každé jamky mikrotitrační destičky napipetuje 100 µl připravené bakteriální suspenze.
4. Mikrotitrační destička se po dobu 24 hodin inkubuje v anaerobní komoře při 35 °C, u aerobů se potřebný čas k inkubaci vyčte z databáze systému.
5. Po inkubaci se destička vyjme z anaerobní atmosféry či termostatu a výsledky se odečítají na přístroji Biolog MicroStation<sup>TM</sup> Reader, kde je výsledek rovnou porovnán s databází (47).

A1 Water	A2 N-Acetyl-D-Galactosamine	A3 N-Acetyl-D-Glucosamine	A4 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A5 Adonitol	A6 Amygdalin	A7 D-Arabitol	A8 Arbutin	A9 D-Cellobiose	A10 $\alpha$ -Cyclodextrin	A11 $\beta$ -Cyclodextrin	A12 Dextrin
B1 Dulcitol	B2 i-Erythritol	B3 D-Fructose	B4 L-Fucose	B5 D-Galactose	B6 D-Galacturonic Acid	B7 Gentiobiose	B8 D-Gluconic Acid	B9 D-Glucosaminic Acid	B10 $\alpha$ -D-Glucose	B11 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	B12 D-Glucose-6-Phosphate
C1 Glycerol	C2 D,L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate	C3 m-Inositol	C4 $\alpha$ -D-Lactose	C5 Lactulose	C6 Maltose	C7 Maltotriose	C8 D-Mannitol	C9 D-Mannose	C10 D-Melezitose	C11 D-Melibiose	C12 3-Methyl-D-Glucose
D1 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	D2 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	D3 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside	D4 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D5 Palatinose	D6 D-Raffinose	D7 L-Rhamnose	D8 Salicin	D9 D-Sorbitol	D10 Stachyose	D11 Sucrose	D12 D-Trehalose
E1 Turanose	E2 Acetic Acid	E3 Formic Acid	E4 Fumaric Acid	E5 Glyoxylic Acid	E6 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E7 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E8 Itaconic Acid	E9 $\alpha$ -Ketobutyric Acid	E10 $\alpha$ -Ketovaleric Acid	E11 D,L-Lactic Acid	E12 L-Lactic Acid
F1 D-Lactic Acid Methyl Ester	F2 D-Malic Acid	F3 L-Malic Acid	F4 Propionic Acid	F5 Pyruvic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 D-Saccharic Acid	F8 Succinamic Acid	F9 Succinic Acid	F10 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	F11 m-Tartaric Acid	F12 Urocanic Acid
G1 Alaninamide	G2 L-Alanine	G3 L-Alanyl-L-Glutamine	G4 L-Alanyl-L-Histidine	G5 L-Alanyl-L-Threonine	G6 L-Asparagine	G7 L-Glutamic Acid	G8 L-Glutamine	G9 Glycyl-L-Aspartic Acid	G10 Glycyl-L-Glutamine	G11 Glycyl-L-Methionine	G12 Glycyl-L-Proline
H1 L-Methionine	H2 L-Phenylalanine	H3 L-Serine	H4 L-Threonine	H5 L-Valine	H6 L-Valine plus L-Aspartic Acid	H7 2'-Deoxy Adenosine	H8 Inosine	H9 Thymidine	H10 Uridine	H11 Thymidine-5'-Mono-phosphate	H12 Uridine-5'-Mono-phosphate

Obrázek 13: Zdroje uhlíku v anaerobní mikrotitrační destičce systému Biolog (47)

## 8.10 Konstrukce zjednodušeného LITHIM zařízení

Zjednodušený kolonový systém disponuje pouze dvěma stupni, a to prvním takzvaným sirným (aerobním) a druhým sulfidovým (anaerobním). Chybějící součástí je poslední imobilizační modul.

Zařízení bylo sestaveno ze skleněných kolon, které byly ukončeny skleněnými kohouty. Všechny skleněné spoje byly promazány vazelínou. Mezi sebou byly kolony propojeny gumovými hadicemi, které zajišťovaly přívod živin ze zásobního barelu a odvod výstupu z kolon do koncového sběrného barelu. Všechny součásti zařízení byly před použitím vysterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 145 °C po dobu 48 hodin. Skleněné kolony byly následně vysvíceny UV lampou. Barely a hadice řádně vymyty a několikrát vypláchnuty denaturovaným líhem. Nejprve byl hledán vhodný typ nosiče pro vytvoření bakteriálního biofilmu za pomoci SRB, s následnou produkcí sulfidů. Mezi vyzkoušenými typy byl BioMECH, EHEIM substrát Pro a EHEIM substrát.

Nosič byl nadávkován do dvou kolon a zalit připravenou bakteriální kulturou *B. subtilis*. Do další kolony s obsahem bioMECHU byla přidána kultura *D. hydrogenophilus* a do poslední, čtvrté, kolony byla k bioMECHU přidána kultura *D. vulgaris*. Všechny kolony byly následně dolity živným roztokem. U kolon se pravidelně odebíralo 30 ml vzorku pro stanovení sulfidů, a dolévaly se novým živným roztokem. V tomto stavu byly kolony ponechány necelé dva měsíce, a to z důvodu kultivace biofilmu na vybraném nosiči.

Ve chvíli, kdy byla koncentrace sulfidů z odebraných vzorků v požadovaném rozmezí 0,1-2 mg/l S<sup>2-</sup>, byla ke koloně obsahující bioMECH s nakultivovaným anaerobním *D. hydrogenophilus*, resp. *D. vulgaris* gumovou hadicí připojena kolona s aerobním *B. subtilis* a celým kolonovým systémem pak byl za pomoci čerpadla kontinuálně veden živný roztok.

## 9 Výsledky a diskuse

### 9.1 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu

Na základě výsledků předchozích diplomových prací (48; 49) byl jako náplň kolonového systému vybrán nosič bioMECH. U tohoto typu nosiče byl sledován růst biofilmu pro testované druhy bakterií.

Průkaz biofilmu byl proveden následovně. Ze zkumavek byly sterilní pinzetou vyjmuty kostičky bioMECHU, které byly opláchnuty destilovanou vodou a položeny na Petriho misky. Na kostičky nosiče byl naaplikován přípravek BioFinder, který se nechal působit 5 minut, a poté byly odečítány výsledky. Na *obrázku 14* je vyobrazený pozitivní průkaz biofilmu *B. subtilis*. V *příloze 2* je znázorněno srovnání reakcí ostatních MO.



Obrázek 14: Průkaz biofilmu *B. subtilis* na nosiči bioMECH pomocí BioFinder, odečet po 5 minutách (foto autor)

Vytvořený bakteriální biofilm lze prokázat i nekomerční cestou takzvanou modifikovanou Christensenovou metodou. Tato metoda a její modifikace je vhodná pro průkaz grampozitivních i gramnegativních mikroorganismů.

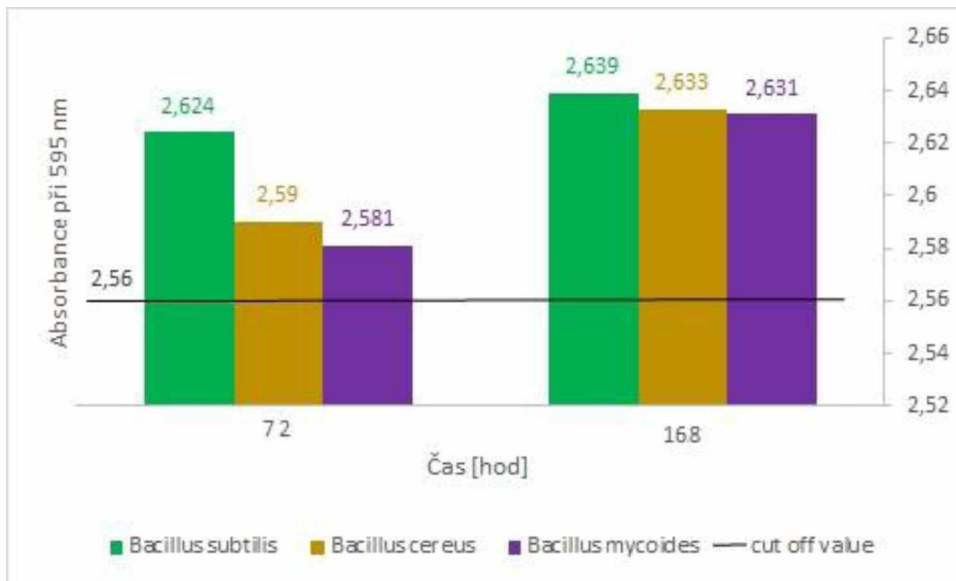
Postup průkazu byl následovný. Ze zkumavky se vzorkem se v aseptickém prostředí sterilní pinzetou vytáhla kostička bioMECHU, která byla řádně opláchnuta destilovanou vodou. Opláchnutá kostička byla následně 45 minut sušena při laboratorní teplotě. Po oschnutí byla převedena do 50ml zkumavky, a zalita roztokem 2% octanu sodného, který se

nechal působit po dobu 15 minut. Poté se octan slil do odpadu a kostička se převrstvila roztokem krystalové violeti. Barvivo bylo následně slito do odpadu a kostička se opláchla destilovanou vodou od jeho přebytků. Nosič se poté opět dal na Petriho misku osušit, tentokrát na 30 minut. Po osušení byla kostička nosiče převedena zpět do zkumavky, převrstvena 96% ethanolem a umístěna na třepačku, kde se nechala 5 minut třepat. Po uplynutí dané doby se barevný roztok převedl do kyvety a proměřil se na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Získaná hodnota absorpance je zanesená do grafu v závislosti na čase a porovnává s hodnotou *cut off value*. Prahová hodnota *cut off value* udává pomezí, nad jehož hodnotou vidíme pozitivní trend růstu biofilmu u daných mikroorganismů, viz *tabulka 17*.

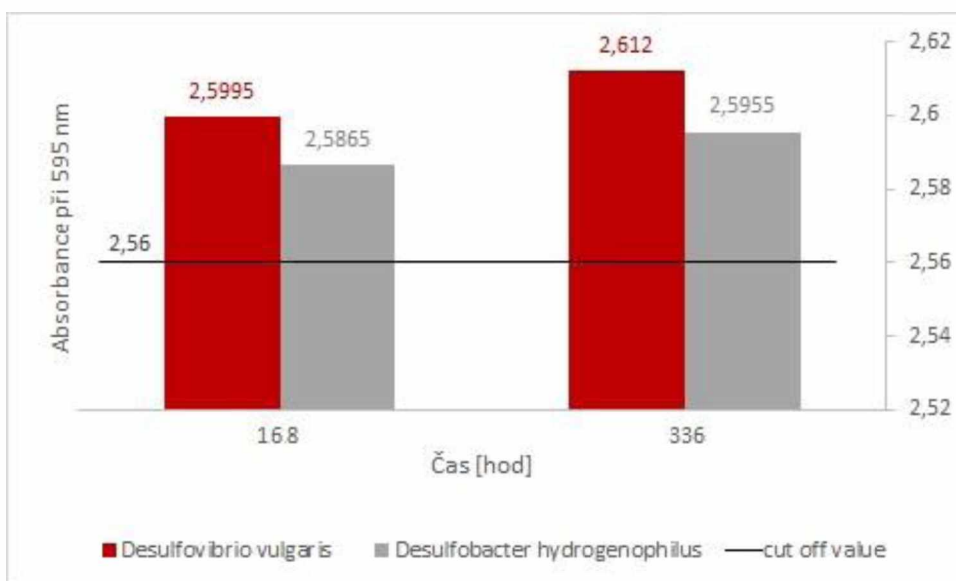
*Tabulka 17: Výsledné hodnoty absorpance nezaočkovaného nosiče, tzv. cut off value*

Absorbance při 595 nm	Absorbance při 595 nm	Absorbance při 595 nm	Čas [hod]
2,561	2,559	2,560	48
2,560	2,561	2,561	168
2,561	2,560	2,561	336

Na *grafu 1* jsou graficky znázorněny výsledky tvorby biofilmu u aerobních mikroorganismů rodu *Bacillus*. Tvorba biofilmu se porovnávala u tří druhů mikroorganismů, a to u *Bacillus subtilis*, *cereus* a *mycoides*. Výsledky ukazují, že všechny tři testované MO na použitém nosiči tvořily biofilm. Dále je z výsledků patrné, že počet buněk začleněných do biofilmu závisí na délce expozice. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u *Bacillus subtilis*, který byl vybrán jako vhodný MO do prvního stupně kolonového systému LITHIM. Na *grafu 2* jsou poté graficky znázorněny výsledky pro anaeroby, kde je trend růstu s časem stejný jako u aerobů.



Graf 1: Výsledky tvorby biofilmu u aerobních mikroorganismů



Graf 2: Výsledky tvorby biofilmu u anaerobních mikroorganismů



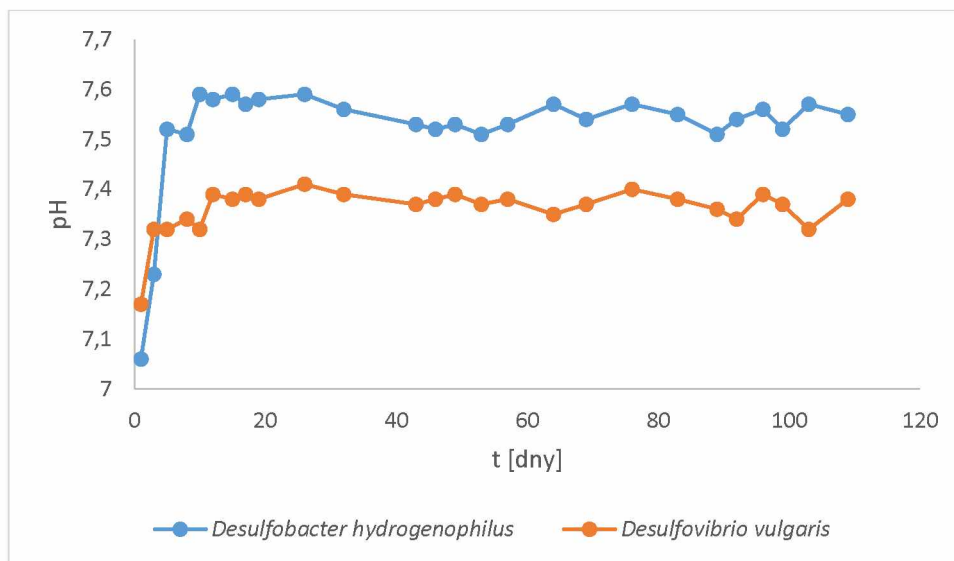
## 9.2 Stanovení vytipovaných parametrů kolonového systému

Hodnoty pH byly stanoveny za pomoci standartní gelové argentchloridové elektrody s dvojitým solným můstkem, která byla ponořena do odebraného vzorku o objemu 45 ml. Měření bylo prováděno v průběhu laborování v teplotním intervalu 22,2-23,8 °C. Naměřené hodnoty jsou shrnuty v příloze 3.

Měření hodnot pH u kolon s bakteriemi *D. hydrogenophilus* se provádělo na vstupu a výstupu. Vstupní hodnoty pH se pohybují v téměř neměnném rozmezí od 7,41 do 7,48. Hodnoty výstupů jsou v patrně širším rozmezí od 7,06 do 7,59. Z dostupných dat vyplývá, že optimální hodnota pH pro růst bakterie *Desulfibacter hydrogenophilus* je 7,1-7,4, přičemž se dokážou adaptovat i prostředí s hodnotou pH 7,6 (45). Z výsledných dat je patrné, že mezi 1. a 5. dnem došlo k nejrazantnějšímu nárůstu pH, a ve zbylých dnech se hodnoty dostaly na své maximum 7,59. Měření hodnot pH je graficky vyobrazeno na grafu 3.

V případě *D. vulgaris* byly vstupní hodnoty pH v rozmezí 7,41-7,48 a výstupní se pohybovaly od 7,17 do 7,41. Dostupné zdroje uvádí optimální hodnotu pH pro bakterii *Desulfovibrio vulgaris* v rozmezí 6,5-7,3 (41). K největšímu nárůstu hodnot pH došlo mezi 1. a 3. dnem, od kterého pH rostlo až na svou maximální hodnotu 7,41.

Oproti kolonám s *D. hydrogenophilus* dosáhly kolony s *D. vulgaris* stabilnějších hodnot pH již o dva dny dříve, nejspíš díky tomu, že se více blíží optimálním hodnotám pH.

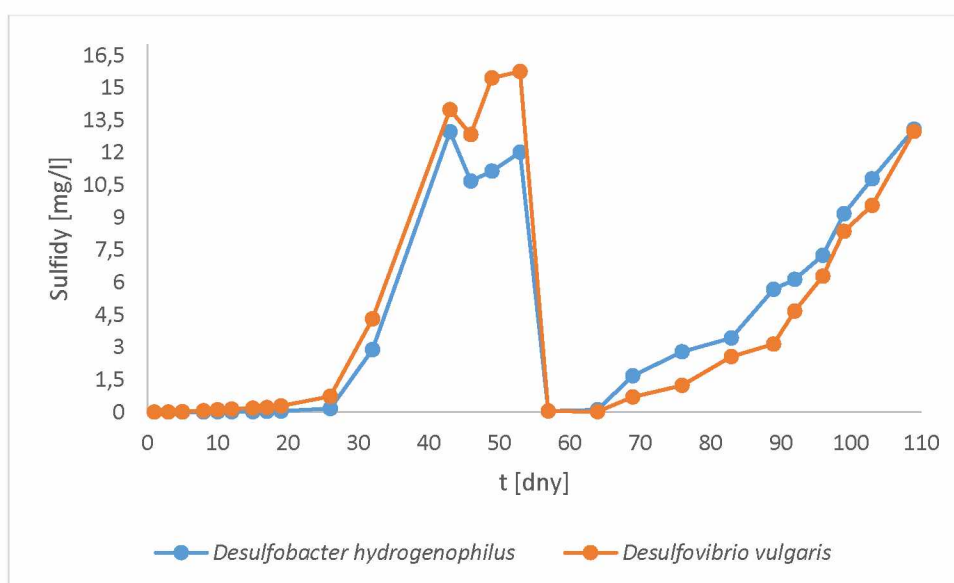


Graf 3: Závislost hodnot pH *D. hydrogenophilus* a *D. vulgaris* na výstupu z průtočných kolon v čase t

Společně s pH byla z pravidelně odebíraných vzorků stanovována i koncentrace sulfidů, jejíž hodnoty jsou společně s pH uvedeny v příloze 3.

Prvotní odběry ukázaly, že obě dvojice kolon potřebují více času pro kultivaci, jak je patrné z grafu 4. U *D. hydrogenophilus* byla redukce od počátku o poznání pomalejší oproti koloně s *D. vulgaris*, což bylo patrné i při hodnocení zbarvení kapalně naplně kolon. 43. den došlo k mírnému poklesu koncentrace sulfidů u obou kolon, což lze přikládat zavzdušnění při doplňování nového živného roztoku. Během následujících 10 dní se systém dostal na své původní maximální hodnoty, a jelikož byla redukce síranů na sulfidy již bezproblémová a hodnoty sulfidů dostatečné pro využití ke srážení, systém se mohl 53. den zprovoznit průtočně.

Po napojení na čerpadlo a spuštění se redukce síranů téměř zastavila. Tento stav lze přikládat z počátku špatně nastavenému vysokému průtoku, který byl u *D. vulgaris* cca 0,4 l/hod. Díky přechodu na průtočný režim nebyly MO schopny okamžitě zareagovat na změnu podmínek, zejména na přítomnost kyslíku, který MO v 1. stupni nedokázaly tak rychle odstranit. Bylo proto potřeba počkat na adaptaci MO na změněné podmínky. Adaptaci také prospělo snížení průtoku u obou kolon na průměrnou hodnotu 0,21 l/hod, po kterém se produkce sulfidů opět pomalu zvyšovala. I když se zpočátku lépe dařilo kolonovému systému s *D. vulgaris*, po zprovoznění průtočného systému se rychleji stabilizovala kolona s bakterií *D. hydrogenophilus*. Po přibližně 30 dnech od spuštění průtočného systému však v produkci sulfidů u obou kolon již nebyl významný rozdíl, viz graf 4.



Graf 4: Závislost koncentrace sulfidů na čase pro kolonové systémy s *D. hydrogenophilus* a *D. vulgaris*

### 9.3 Vyhodnocení systému Biolog

Systém Biolog slouží mimo jiné k identifikaci kultivovaného MO – zdali nedošlo k jeho záměně či kontaminaci. Pro potvrzení kultivovaných bakterií v diplomové práci byl k identifikaci vybrán aerobní *B. subtilis* z prvního sirného a anaerobní *D. vulgaris* z druhého sulfidového modulu LITHIM zařízení. Nejprve byly připraveny Petriho misky s univerzálním BUG agarem. Na misky bylo následně zaočkováno vždy 100 µl vzorku odebraného z vybraných kolon. Petriho misky s aerobním MO se daly kultivovat do termostatu, anaerobní kultura musela být nejprve vložena do anaerobního sáčku. Po 24 hodinách byly misky připraveny pro další použití. Nachystal se turbidimetr, sterilní vatové tyčinky a plastové vaničky, vícekanálová pipeta, špičky, kontrolní roztok a dané reagentie k systému biolog – vytemperovaná zavakuovaná mikrotitrační destička AN MicroPlate™ a GEN III MicroPlate™ a tekuté inokulační sérum AN-IF a B-IF. Na turbidimetru se nejprve proměřil kontrolní roztok o turbiditě 85 %. Poté se proměřilo nezaočkované inokulační sérum, jehož hodnota se na turbidimetru nastavila na 100 %. Do jednotlivých sér se následně za aseptických podmínek pomocí sterilní vatové tyčinky zaočkovaly kolonie bakterií z BUG agaru. V médiu se rozetřely tyčinkou o dno zkumavky, aby se vytvořil zákal. Po rozmíchání se vzniklé suspenze proměřily na trubidimetru, zdali vykazují požadovanou hodnotu zákalu. Následně se roztok přelil do jednorázové plastové vaničky, odkud byl nasát vícekanálovou pipetou. Do každé jamky předem připravené a nadepsané mikrotitrační destičky se následně pipetovalo 100 µl bakteriální suspenze a přikryla se víčkem. Dle databáze systému biolog byla destička s *B. subtilis* dána do termostatu za následujících podmínek, 33 °C s odečtem po 8 hodinách. Anaerobní kultura s *D. vulgaris* se nejprve vložila do anaerobního sáčku a nechala se kultivovat při 35 °C s odečtem po 20-24 hodinách. Po inkubaci se výsledky odečetly na přístroji Biolog MicroStation™ Reader, kde byl výsledek porovnáván s databází. Podoba výsledného protokolu je v příloze 4.

Odečet po 8 hodinách u *B. subtilis* nebyl možný, jelikož systém hlásil nedostatečnou dobu inkubace. Následně se odečet dělal po 10, 12, 14 a nakonec 20 hodinách, s výsledkem „*Bacillus subtilis ss subtilis*“. Delší doba inkubace byla nejspíše zapříčiněna nízkou výchozí hodnotou zákalu v inokulačním séru. U anaerobní kultury *D. vulgaris* se odečet prováděl po 22 hodinách s výsledkem „*Desulfovibrio vulgaris ss vulgaris*“. Identifikaci tak byly potvrzeny kultivované bakterie použité v kolonovém systému.

## 9.4 Srážení sulfidů kovů

### 9.4.1 Optimalizace separace sraženin

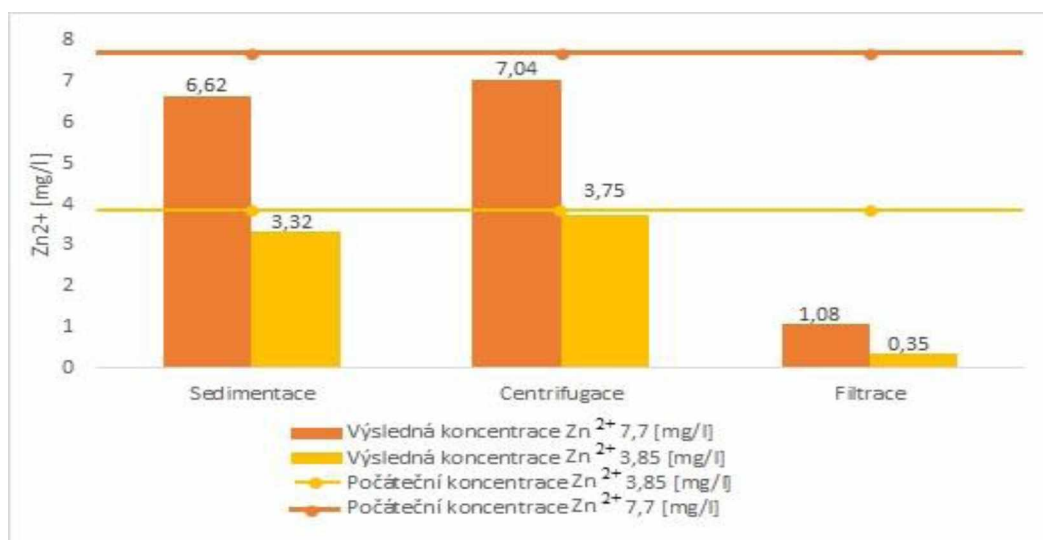
Pro analytické stanovení kovů v roztoku bylo nejprve zapotřebí nalézt vhodný způsob separace sraženin a případných nečistot. Experimentálně byly testovány tři postupy, filtrace, centrifugace a prostá sedimentace.

Pro zjištění vhodné separační metody byl namíchan zásobní roztok  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  s koncentrací zinečnatých iontů  $\text{Zn}^{2+}$  7,7 mg/l. Tento roztok byl následně rozlit do 3 zkumavek, přičemž každá byla zpracována jinak. Pro kontrolu byl připraven i roztok o poloviční koncentraci zinečnatých iontů 3,85 mg/l  $\text{Zn}^{2+}$ , který se opět rozdělil do tří částí pro další zpracování viz *tabulka 18*.

Tabulka 18: Hodnoty koncentrace  $\text{Zn}^{2+}$  iontů po testovaných separačních metodách

Způsob separace	Počáteční koncentrace $\text{Zn}^{2+}$ [mg/l]	Výsledná koncentrace $\text{Zn}^{2+}$ [mg/l]	Zbytková koncentrace $\text{Zn}^{2+}$ [%]
Sedimentace	7,7	6,62	85,97
Sedimentace	3,85	3,32	86,23
Centrifugace	7,7	7,04	91,43
Centrifugace	3,85	3,75	97,40
Filtrace	7,7	1,08	14,03
Filtrace	3,85	0,35	9,09

Vyzkoušené postupy měly za cíl najít vhodnou separační metodu pro další krok diplomové práce. Hlavním kritériem bylo, aby se výsledná koncentrace  $\text{Zn}^{2+}$  iontů po separaci co nejvíce blížila koncentraci počáteční, tedy aby nerušila stanovení koncentrace vybraných iontů, výsledky jsou shrnuty v *grafu 5*. Filtrace se ukázala jako zcela nevhodná, jelikož se na filtračním papíře zachytila většina iontů z roztoku a došlo tak k výraznému zkreslení výsledků. U sedimentace a centrifugace bylo dosaženo obdobných výsledků. Výhodou při použití sedimentace byla skutečnost, že se jedná o jednodušší a materiálně nenáročnější metodu. Z hlediska jistoty odstranění vzniklých sraženin v další části práce, kde také hrají roli čas a podmínka, že nesmí po sedimentaci dojít k následnému rozvíření sraženiny (pohybem nádoby, pipetací, ...), tak byla jako separační metoda zvolena centrifugace.



Graf 5: Naměřené hodnoty koncentrace Zn<sup>2+</sup> po vybraných separačních metodách v porovnání s počáteční koncentrací

#### 9.4.2 Srážení modelových vod vybraných kovů modelovým roztokem sulfidů

Po vybrání vhodné separační metody byly namíchány modelové roztoky zinečnatých, železnatých, olovnatých a sulfidových iontů. V *tabulce 19* jsou uvedena vstupní a výstupní data ke srážení ZnS, v *tabulce 20* data ke srážení FeS a v *tabulce 21* data ke srážení Pb<sup>2+</sup> iontů modelovým roztokem sulfidů za vzniku sraženiny PbS. Uvedené hodnoty jsou průměrem celkem tří měření, které se v rámci experimentálních testů dělaly.

Tabulka 19: Srážení Zn<sup>2+</sup> iontů modelovým roztokem sulfidu

	Vstupní koncentrace Zn <sup>2+</sup> [mg/l]	Výstupní koncentrace Zn <sup>2+</sup> [mg/l]	Koncentrace S <sup>2-</sup> [mg/l]	Odstraněno Zn <sup>2+</sup> [%]
Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,02	5,00	99,20
Zn <sup>2+</sup>	5,00	2,58	5,00	48,46
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	1,25	0,49	5,00	60,88
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	2,50	0,55	5,00	78,12
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	1,25	0,59	5,00	52,48
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,47	5,00	81,16
Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,03	10,00	98,80
Zn <sup>2+</sup>	5,00	2,21	10,00	55,80
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	1,25	0,16	10,00	86,88
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	2,50	0,47	10,00	81,08
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	1,25	0,48	10,00	61,60
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,37	10,00	85,20

Tabulka 20: Srážení  $Fe^{2+}$  iontů modelovým roztokem sulfidů

	Vstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Fe^{2+}$ [%]
$Fe^{2+}$	2,50	0,11	5,00	95,44
$Fe^{2+}$	5,00	0,28	5,00	94,42
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,20	5,00	83,84
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,34	5,00	86,24
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,08	5,00	93,36
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,22	5,00	91,24
$Fe^{2+}$	2,50	0,05	10,00	98,08
$Fe^{2+}$	5,00	0,04	10,00	99,20
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	<0,01	10,00	~99,99
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,07	10,00	97,40
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	<0,01	10,00	~99,99
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	<0,01	10,00	~99,99

Tabulka 21: Srážení  $Pb^{2+}$  iontů modelovým roztokem sulfidů

	Vstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Pb^{2+}$ [%]
$Pb^{2+}$	2,50	0,29	5,00	88,44
$Pb^{2+}$	5,00	0,31	5,00	93,80
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	1,25	0,23	5,00	81,44
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	2,50	0,11	5,00	95,52
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	<0,02	5,00	~99,98
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	<0,02	5,00	~99,98
$Pb^{2+}$	2,50	<0,02	10,00	~99,98
$Pb^{2+}$	5,00	0,77	10,00	84,58
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	1,25	0,36	10,00	71,60
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	2,50	0,02	10,00	99,12
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	<0,02	10,00	~99,98
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	<0,02	10,00	~99,98

Z experimentů je patrné, že výsledky srážení Zn z modelových vod jsou velmi rozdílné. Účinnost odstranění se pohybovala v širokém rozmezí cca od 50 % až do 99,2 %. V porovnání se srážení dalších kovů je to nejhorší výsledek, byť dle teorie by se měl ZnS srážet daleko lépe než FeS (10). V rámci diplomové práce se tento jev nepodařilo dostatečně

vysvětlit, pravděpodobně zde bude hrát významnou roli také pH, při kterém ke srážení došlo. Z časových důvodů již tento faktor nebyl experimentálně ověřen.

Stejně jako srážení Zn bylo provedeno srážení modelových vod s obsahem Fe. Účinnost srážení byla vyšší než v případě srážení Zn, a to i přes to, že rozpustnost FeS je vyšší než u ZnS (10). Nejnižší účinnost odstranění Fe byla 83,84 %, ve většině případů však byla vyšší než 95 %.

V souladu s očekáváním bylo nejvyšší míry účinnosti dosaženo v případě srážení Pb, kdy se hodnoty odstranění pohybovaly často blízko 100 %.

### 9.4.3 Srážení modelových vod vybraných kovů roztokem sulfidů z kolon

Po modelových roztocích se k experimentálnímu testování odebraly reálné vzorky s obsahem sulfidů z kolon, u kterých se prvně změřila jejich přesná koncentrace pomocí LCK 653 kyvetových testů. Stejně jako u modelových roztoků i zde jsou uvedeny zprůměrované hodnoty z celkem tří měření provedených v rámci experimentálních testů. V *tabulce 22* jsou uvedena data ze srážení zinečnatých iontů sulfidy z kolonového systému s obsahem *D. hydrogenophilus*, v *tabulce 23* srážení za pomoci sulfidů z kolony s obsahem *D. vulgaris*.

*Tabulka 22: Srážení Zn<sup>2+</sup> iontů sulfidy z kolon s obsahem D. hydrogenophilus*

	Vstupní koncentrace Zn <sup>2+</sup> [mg/l]	Výstupní koncentrace Zn <sup>2+</sup> [mg/l]	Koncentrace S <sup>2-</sup> [mg/l]	Odstraněno Zn <sup>2+</sup> [%]
Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,17	2,78	93,16
Zn <sup>2+</sup>	5,00	0,81	2,78	83,80
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	1,25	0,14	2,78	88,80
Zn <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup>	2,50	0,17	2,78	93,16
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	1,25	0,60	3,40	52,24
Pb <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	2,50	0,32	3,40	87,16
Pb <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	1,66	0,34	3,40	79,82
Pb <sup>2+</sup> + Fe <sup>2+</sup> + Zn <sup>2+</sup>	3,32	0,14	3,40	95,90

Tabulka 23: Srážení  $Zn^{2+}$  iontů sulfidy z kolon s obsahem *D. vulgaris*

	Vstupní koncentrace $Zn^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Zn^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Zn^{2+}$ [%]
$Zn^{2+}$	2,50	1,52	0,24	39,24
$Zn^{2+}$	5,00	3,44	0,24	31,24
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,76	0,24	38,96
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	1,15	0,24	54,08
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	1,25	0,58	2,56	54,00
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	2,50	0,07	2,56	97,12
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	1,66	0,23	2,56	85,96
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	3,32	0,12	2,56	96,27

V tabulce 24 jsou uvedeny data ze srážení železnatých iontů sulfidy z kolonového systému s obsahem *D. hydrogenophilus*, v tabulce 25 srážení za pomoci sulfidů z kolony s obsahem *D. vulgaris*.

Tabulka 24: Srážení  $Fe^{2+}$  iontů sulfidy z kolon s obsahem *D. hydrogenophilus*

	Vstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Fe^{2+}$ [%]
$Fe^{2+}$	2,50	0,05	2,78	98,04
$Fe^{2+}$	5,00	0,04	2,78	99,12
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,14	3,40	88,48
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,04	3,40	98,52
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,06	2,78	97,76
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	5,00	<0,01	2,78	~99,98
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	3,32	0,13	3,40	96,05
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	1,66	0,14	3,40	91,39



Tabulka 25: Srážení  $Fe^{2+}$  iontů sulfidy z kolon s obsahem *D. vulgaris*

	Vstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Fe^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Fe^{2+}$ [%]
$Fe^{2+}$	2,50	0,02	0,24	99,40
$Fe^{2+}$	5,00	<0,01	0,24	~99,99
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,16	2,56	87,44
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,13	2,56	94,64
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,07	0,24	94,80
$Zn^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,04	0,24	98,36
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	1,66	0,10	2,56	94,22
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	3,32	0,03	2,56	99,22

V tabulce 26 jsou uvedeny data ze srážení olovnatých iontů sulfidy z kolonového systému s obsahem *D. hydrogenophilus*, v tabulce 27 srážení za pomoci sulfidů z kolony s obsahem *D. vulgaris*.

Tabulka 26: Srážení  $Pb^{2+}$  iontů sulfidy z kolon s obsahem *D. hydrogenophilus*

	Vstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Pb^{2+}$ [%]
$Pb^{2+}$	2,50	0,34	3,40	86,52
$Pb^{2+}$	5,00	0,33	3,40	93,50
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,18	3,40	85,28
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,14	3,40	94,52
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	1,25	0,56	3,40	55,20
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	2,50	0,13	3,40	94,76
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	1,66	0,02	3,40	98,67
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	3,32	<0,02	3,40	~99,98

Tabulka 27: Srážení  $Pb^{2+}$  iontů sulfidy z kolon s obsahem *D. vulgaris*

	Vstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Výstupní koncentrace $Pb^{2+}$ [mg/l]	Koncentrace $S^{2-}$ [mg/l]	Odstraněno $Pb^{2+}$ [%]
$Pb^{2+}$	2,50	0,53	2,56	78,96
$Pb^{2+}$	5,00	0,14	2,56	97,26
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	1,25	0,16	2,56	87,36
$Pb^{2+} + Fe^{2+}$	2,50	0,30	2,56	87,84
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	1,25	0,46	2,56	90,78
$Pb^{2+} + Zn^{2+}$	2,5	<0,02	2,56	~99,98
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	1,66	<0,02	2,56	~99,98
$Pb^{2+} + Fe^{2+} + Zn^{2+}$	3,32	<0,02	2,56	~99,98

V případě srážení modelových vod kovů sulfidy z kolonového systému LITHIM pozorujeme, že došlo ke zlepšení účinnosti srážení u prakticky všech kovů, patrné je to však zejména v případě srážení Zn. Nejnižší účinnost byla v případě srážení sulfidy z kolony osídlené *D. vulgaris* v první etapě testování, kdy produkce sulfidů byla na úrovni 0,24 mg/l. Jakmile koncentrace stoupla na 2,56 mg/l, byly výsledky srovnatelné s kolonovým systémem osídleným *D. hydrogenophilus* a dosahovaly účinnosti srážení až 97,12 %. Je tedy patrné, že produkce sulfidů v obou kolonových systémech je dostatečná pro srážení testovaných kovů. Obecně vyšší účinnost srážení je také dána tím, že v případě modelových vod byla použita demineralizovaná voda, ve které nebyly přítomny žádné další příměsi. V případě kolonových systémů se jednalo o vodu z vodovodního řádu, která také na výstupu z kolon obsahovala zbytky drobných pevných částic, které se staly zárodečnými centry pro růst sraženiny. Tento jev je v souladu s teorií heterogenní nukleace, kdy zárodkem sraženiny je cizí částice (viz. Kapitola 2, Srážení kovů).

#### 9.4.4 Srážení vybraných kovů z reálných vod roztokem sulfidů z kolon

Z dostupných dat od firmy DIAMO můžeme porovnat účinnost srážení vápenným mlékem se srážení sulfidy vytvořenými za pomoci vybraných SRB z diplomové práce. Pro porovnání byl vybrán monitoring důlní vody čerpané z bývalého dolu Kaňk u Kutné Hory.

Tabulka 28: ČDV Kutná Hora vstup (50)

Ukazatel	Jednotka	Hodnota		
		Minimum	Maximum	Průměr
pH	-	3,1	5,1	3,96
As	mg/l	23,1	58,4	45,8
<b>Fe</b>	<b>mg/l</b>	<b>1,5</b>	<b>1850</b>	<b>1554,8</b>
Mn	mg/l	28	37,8	33,6
<b>Zn</b>	<b>mg/l</b>	<b>103</b>	<b>171</b>	<b>135,5</b>
SO <sub>4</sub>	mg/l	5180	6500	5831,2

Tabulka 28 obsahuje data z DIAMA v průběhu roku 2021, kdy se celkem odebralo 42 vzorků důlní vody na vstupu do čističky. Důlní voda je z bývalého dolu odčerpávána a přiváděna do čističky důlních vod (ČVD), konkrétně na první, aerační stupeň čištění. Zde je voda provzdušněna a následně je odváděna do reaktoru s vápenným mlékem kde se mísí až na hodnotu pH 5,5. Suspenze je následně odváděna do druhého reaktoru, kde opět reaguje s vápenným mlékem, a to do hodnoty pH 9,0. Toto dvoustupňové srážení umožňuje lépe odstraňovat nežádoucí kontaminanty. Vzniklá suspenze je z druhého srážecího reaktoru odváděna do rozdělovače, odkud samospádem směřuje do sedimentačních nádrží.

Ze sedimentačních nádrží se zahuštěný kal odvádí do zásobních kalových nádrží, následně na kalolis. V místě výtokové šachtice se provádí druhý kontrolní odběr, ve kterém se stanovují ty samé parametry jako na vstupu jakožto monitoring čistícího procesu. Výstupní hodnoty jsou uvedeny v *tabulce 29*.

Tabulka 29: ČDV Kutná Hora výstup (50)

Stanovené parametry			Dosažená skutečnost		
Ukazatel	Hodnota	Jednotka	Hodnota		
			Minimum	Maximum	Průměr
pH	6-9	-	6,4	8,9	7,96
As	„m <sup>1</sup> “ 0,2 „p <sup>2</sup> “ 0,15	mg/l	<0,01	0,047	0,011
Fe	„m“ 4 „p“ 2	mg/l	<0,05	1,145	0,329
Mn	„m“ 8 „p“ 4	mg/l	0,034	3,91	0,337
Zn	„m“ 2 „p“ 1,5	mg/l	<0,05	1,18	0,055
SO <sub>4</sub>	„m“ 4000 „p“ 3500	mg/l	1 840	3440	2931

m<sup>1</sup>= maximální hodnota a p<sup>2</sup>= přípustná hodnota koncentrace ukazatele znečištění vypouštěných odpadních vod v mg/l stanovená nařízením vlády o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových a odpadních vod

Výstupní data jsou zprůměrována celkem z 54 odběrů a je patrné, že ani jednou nebyl překročen emisní limit „p“. Dvoustupňové srážení zabezpečuje stabilní a přijatelné výstupní parametry (50).

Pro porovnání s touto reálně provozovanou technologií jsou v *tabulce 30* uvedeny hodnoty, které byly stanoveny v rámci experimentů provedených v této diplomové práci. Sledovány byly pouze dva kovy, konkrétně Zn a Fe. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty vždy ze 3 experimentů. Reálná voda byla srážena vodou z kolonových systémů s obsahem sulfidů v objemovém poměru 1:3, přičemž kovy s indexem 1 (v tabulce označeno jako Fe (1) a Zn (1)) byly sráženy sulfidy z kolonového systému s *D. hydrogenophilus*. Kovy s indexem 2 (v tabulce označeno jako Fe (2) a Zn (2)) byly sráženy sulfidy z kolonového systému s *D. vulgaris*. Z výsledků je patrné, že došlo k odstranění sledovaných kovů s účinností vyšší než 99,5 %. Porovnáme-li tyto výsledky s výsledky srážení z praxe, kde se užívá metoda srážení vápenným mlékem, zjistíme, že účinnost srážení Zn je v obou případech srovnatelná a výsledná hodnota koncentrace splňuje limity pro vypouštění těchto vod. V případě Fe je i přes účinnost srážení až 99,5 % výstupní koncentrace vyšší, než jsou povolené limity. V rámci této diplomové práce se nepodařilo dostat na úroveň koncentrací, kterých je dosaženo srážením v podniku DIAMO.

Při srážení Zn z reálné vody docházelo k daleko vyšší účinnosti v porovnání se s modelovými vodami. To je pravděpodobně způsobeno několika faktory. Hlavním z nich bude patrně ten, že v testované reálné vodě se Zn neodstraňuje pouze jako sraženina ZnS, ale dochází i k tvorbě dalších sraženin, do kterých se Zn váže (ať již ve formě sloučeniny, nebo formou adsorpce).

Tabulka 30: Vody Kaňk, srážení roztokem sulfidů z kolon (1 = *D. hydrogenophilus*, 2 = *D. vulgaris*)

Srážení kov	Jednotka	Hodnota		
		Vstup	Výstup	Odstraněno [%]
Fe (1)	mg/l	1592	6,79	99,57
Fe (2)	mg/l	1590	6,45	99,59
Zn (1)	mg/l	130,26	0,06	99,95
Zn (2)	mg/l	129,13	0,07	99,95

## 10 Závěr

První část diplomové práce obsahuje literární rešerši zaměřenou na mikroorganismy schopné redukovat sírany na sulfidy včetně vytipovaných vhodných typů bakterií pro použití v experimentální části, která měla za cíl využít bakteriemi produkováný sulfid ke srážení kovů z vod. Na základě rešerše byly do druhého, sulfidového modulu zjednodušeného LITHIM zařízení vybrány bakterie *Desulfovibrio vulgaris* a *Desulfobacter hydrogenophilus*. U prvního, sírného modulu byly vybrány tři druhy bakterií rodu *Bacillus*. Konkrétně se jednalo o *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus mycoides*. Z těchto bakterií byl pak na základě testování jako nejvhodnější vybrán *Bacillus subtilis*, který byl dále v kolonovém systému používán.

Kolonový systém LITHIM byl nejprve provozován ve vsádkovém režimu, aby si bakterie zvykly na nové prostředí a dostatečně kolonizovaly náplň kolon. Tato první fáze trvala necelé dva měsíce, po kterých již byly bakterie zcela adaptovány a produkovaly sulfidy v dostatečném množství. Koncentrace sulfidů byla u *D. vulgaris* 15,75 mg/l a u *D. hydrogenophilus* 12,02 mg/l. Spuštěním průtočného systému koncentrace sulfidů klesla téměř na nulové hodnoty, ale v následujících 30 dnech se systém stabilizoval.

Srážení iontů kovů z vod bylo provedeno jak s modelovými roztoky, tak s reálnou vodou. Z dat naměřených v rámci srážení jednotlivých iontů modelovými roztoky vyplývá, že se nejlépe dařilo odstraňovat Fe, a to v průměru s 94,93% účinností. U odstraňování Pb byla účinnost 92,87 %, a u Zn pouhých 74,14 %. Při srážení kovů sulfidy vyprodukovanými kolonovým systémem LITHIM se v případě dvojice kolon s přítomným *D. hydrogenophilus* dařilo nejlépe srážet Fe s účinností až 96,17 %, Pb se dařilo srážet s 88,55% a Zn s 84,26% účinností. Sulfidy vyprodukované metabolickou činností *D. vulgaris* měly opět největší účinnost u srážení Fe, a to 96,01 %, poté u Pb, které se podařilo vysrážet s 92,77% účinností a Zn se srážel s 62,11% účinností.

Bylo provedeno také srážení reálné důlní vody, kde byly sledovanými kovy pouze Fe a Zn. V případě srážení Fe byla vyšší než 99,5 % a u Zn pak vyšší než 99,9 %. Tyto výsledky jsou lepší než výsledky srážení modelových vod, přičemž největší rozdíl je u Zn. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že u reálné vody nedošlo k odstranění Zn pouze ve formě ZnS, ale že se zinek vázal i ve formě dalších sraženin, případně se na další sraženiny adsorboval a byl s nimi následně odstraněn. Porovnáním těchto výsledků s daty od společnost DIAMO, která ionty kovů z vod sráží vápenným mlékem je patrné, že i přes vysokou účinnost

odstranění Fe v rámci diplomové práce nebylo dosaženo stejných výsledků účinnosti jako ve společnosti DIAMO. Ta má účinnost srážení u Fe 99,98 % a u Zn 99,96 %. Důvodem vyšší úspěšnosti v DIAMU může být zavedený dvoustupňový systém vápenného srážení s kontrolovanou úpravou pH v jednotlivých krocích a následná lepší separace sraženiny.

Pro kontrolu, že nedošlo ke kontaminaci či záměně použitých bakterií byl v rámci diplomové práce použit systém Biolog. Na něm byly průběžně monitorovány bakterie z kolonových systémů LITHIM. Biolog potvrdil očekávanou přítomnost *B. subtilis* v aerobních kolonách a *D. vulgaris*, resp. *D. hydrogenophilus* v kolonách anaerobních.

## 11 Zdroje

- (1) **ZABOCHNICKA ŠWIATEK M., KRZYWONOS M.** Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. *Polish Journal of Environmental Studies*. 23, 2014, 2.
- (2) **GHAZY E.A., MAHMOUD M.G., ASKER M.S. et al.** Cultivation and Detection of Sulfate Reducing Bacteria (SRB) in Sea Water. *Journal of American Science* 2011. [Online] 7 2011. [Citace: 16. 11 2022.] [http://jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0702/63\\_4707am0702\\_604\\_608.pdf](http://jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0702/63_4707am0702_604_608.pdf).
- (3) **QUASEM N.A.A., MOHAMMED R.H., LAWAL D.U.** Removal of heavy metal ions from wastewater: a comprehensive and critical review. *Nature - npj Clean water*. [Online] 8. 7 2021. [Citace: 2. 3 2023.] <https://www.nature.com/articles/s41545-021-00127-0#Abs1>.
- (4) **WOIOWIEC M., KOMOROWSK-KAUFMAN M., PRUSS A., RZEPA G., BAJDA T.** Removal of Heavy Metals and Metalloids from Water Using Drinking Water Treatment Residuals as Adsorbents. [Online] 14. 8 2019. [Citace: 2. 3 2023.] <https://www.mdpi.com/2075-163X/9/8/487>.
- (5) **CZEMP - Česká membránová platforma.** *Tlakové membránové procesy*. [Dokument] Praha : autor neznámý.
- (6) **KOTAS, J.** Základní funkce a princip reverzní osmózy. [Online] 22. 8 2016. [Citace: 18. 4 2023.] <https://voda.tzb-info.cz/vlastnosti-a-zdroje-vody/14589-zakladni-funkce-a-princip-reverzni-osmozy-ro>.
- (7) **CUHORKA J., MIKULÁŠEK P.** Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions by Nanofiltration. *Chemical Engineering Transaction*. 2016, 47.
- (8) **NERIA-GONZÁLES M.I., AGUILAR-LOPÉZ R.** Heavy Metal Removal Processes by Sulfate-Reducing Bacteria. *Environmental Pollution and Remediation*. [Online] Springer, 17. 4 2021. [Citace: 9. 3 2023.] [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5499-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5499-5_13).
- (9) **KAKSONEN A.H., PUHAKKA J.A.** Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. *Engineering in Life Sciences*. 2007, Sv. 7, 6.
- (10) **PALARČÍK J., SLEZÁK M.** Odstranění iontů kovů z důlních vod biologickou metodou. [Online] 30. 5 2018. [Citace: 15. 3 2023.] [http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/13\\_slezak\\_tabor\\_2018.pdf](http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/filepath/prezentace/13_slezak_tabor_2018.pdf).
- (11) **LEWIS, A.** *Sustainable heavy metals remediation*. místo neznámé : Springer, 2017.
- (12) **DRBAL K., KRÍŽEK M.** *Anorganická a analytická chemie 2*. České Budějovice : Scientific - Pedagogical Publishing, 1993. 80-85645-08-4.



- (13) **HOLOUBEK, I.** Síra v atmosféře. [Online] RECETOX, 19. 4 2016. [Citace: 19. 1 2023.]  
[https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/C4310/um/11\\_CHZP\\_II\\_Atmosfera\\_04\\_Sira\\_v\\_ovzdu\\_i.pdf](https://is.muni.cz/el/sci/jaro2016/C4310/um/11_CHZP_II_Atmosfera_04_Sira_v_ovzdu_i.pdf).
- (14) **KODENÍČEK, M.** Biochemické pojmy - výkladový slovník. [Online] Vysoká škola chemicko-technologická, 2007. [Citace: 19. 1 2023.] [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/hesla/kolobeh\\_siry.html.978-80-7080-669-2](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/kolobeh_siry.html.978-80-7080-669-2).
- (15) **CANFIELD, D.E.** Biogeochemistry of Sulfur Isotopes. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. [Online] 1. 1 2001. [Citace: 19. 1 2023.]  
<https://pubs.geoscienceworld.org/msa/rimg/article-abstract/43/1/607/140690/Biogeochemistry-of-Sulfur-Isotopes>.
- (16) **ANANTHARAMAN K., HAUSMANN B. et al.** Expanded diversity of microbial groups that shape the dissimilatory sulfur cycle. *International Society for Microbial Ecology*. [Online] The ISME Journal, 21. 2 2018. [Citace: 19. 1 2023.]  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6018805/>.
- (17) **GIBSON, G.R.** Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. [Online] 23. 8 1990. [Citace: 16. 11 2022.] <https://ami-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01575.x>.
- (18) **LEŠČANOVÁ, O.** Střevní sulfát-redukující bakterie: morfologická a fyziologická klasifikace. *Masarykova Univerzita*. [Online] 2019. [Citace: 16. 12 2022.]  
[https://is.muni.cz/th/zy0f8/DP\\_Lescanova\\_TISK.pdf](https://is.muni.cz/th/zy0f8/DP_Lescanova_TISK.pdf).
- (19) **SASS H., CYPIONKA H.** Sulphate-Reducing bacteria. *Environmental and Engineered Systems*. [Online] Cambridge University Press, 8 2009. [Citace: 17. 11 2022.]  
<https://www.cambridge.org/core/books/abs/sulphatereducing-bacteria/response-of-sulphatereducing-bacteria-to-oxygen/011F3A6195D4E554DBBD46613608685D>.
- (20) **KUSHKEVYCH I., BARTOŠ M., BARTOŠOVÁ L.** Sequence analysis of the 16s rRNA gene of sulfate-reducing bacteria isolated from human intestine. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. [Online] 2014. [Citace: 17. 11 2022.]  
[https://www.researchgate.net/publication/297360864\\_Sequence\\_analysis\\_of\\_the\\_16S\\_rRNA\\_gene\\_of\\_sulfate-reducing\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_human\\_intestine](https://www.researchgate.net/publication/297360864_Sequence_analysis_of_the_16S_rRNA_gene_of_sulfate-reducing_bacteria_isolated_from_human_intestine).
- (21) **DWORNIK M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K.H.** *The Prokaryotes - A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3. New York : Springer, 2006.
- (22) **HECTOR F. C., NORRIS H. W.,** Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. [Online] 1 2000. [Citace: 23. 11 2022.]  
<https://academic.oup.com/femsec/article/31/1/1/531119?login=false>.
- (23) **DOLLA A., FOURNIER M., DERMOUN Z.** Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *ScienceDirect*. [Online] ELSEVIER, 29. 3 2006. [Citace: 17. 12 2022.]  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0168165606003208?token=D82D969EEA823B>

4F3F8985DDC8ED2AD195A46A7BA9D275949958E81FA3852990488F80036D8E209  
A2AF94A7D258FC908&originRegion=eu-west-1&originCreation=20221217115622.

- (24) **JOHNSON M. S., ZHULIN I. B., GAPUZAN M. E., TAYLOR B. L.** Oxygen-dependent growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *PubMed Central*. [Online] *Journal of Bacteriology*, 9 1997. [Citace: 17. 12 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179436/>.
- (25) **CYPIONKA H., WIDDEL F., PFENNIG N.** Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. [Online] 1985. [Citace: 16. 12 2022.] [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01129.x?saml\\_referrer](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1574-6968.1985.tb01129.x?saml_referrer).
- (26) **MUKWEVHOA M. J., CHIRWAA E.M.N.** The Effect of pH and Temperature on Biological Sulphate Reduction. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*. [Online] 2019. [Citace: 16. 12 2022.] <https://www.aidic.it/cet/19/74/087.pdf>.
- (27) **TRAN T.T.T., KANNOORPATTI K., PADOVAN A., THENNADIL S.** Sulphate-Reducing Bacteria's Response to Extreme pH Environments and the Effect of Their Activities on Microbial Corrosion. *MDPI Journals*. [Online] 3. 3 2021. [Citace: 17. 12 2022.] <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/5/2201>.
- (28) **KUSHKEVYCH, I.** Dissimilatory sulfate reduction in the intestinal sulfate-reducing bacteria. *Studia Biologica*. [Online] 3 2016. [Citace: 17. 12 2022.] [https://www.researchgate.net/publication/299978565\\_Dissimilatory\\_sulfate\\_reduction\\_in\\_the\\_intestinal\\_sulfate-reducing\\_bacteria](https://www.researchgate.net/publication/299978565_Dissimilatory_sulfate_reduction_in_the_intestinal_sulfate-reducing_bacteria).
- (29) **CAO J., ZHANG G., MAO Z.S., LI Y., FANG Z., YANG Ch.** Influence of electron donors on the growth and activity of sulfate-reducing bacteria. *Science Direct*. [Online] *International Journal of Mineral Processing*, 3. 20 2012. [Citace: 17. 12 2022.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301751612000269>.
- (30) **BARTON L. L., FARDEAU M.L., FAUQUE G.** Hydrogen Sulfide: A Toxic Gas Produced by dissimilatory sulphate and sulfur reduction and consumed by microbial oxidation. *Metal ions in life sciences*. [Online] *Research Gate*, 11 2014. [Citace: 17. 12 2022.] [https://www.sciencetheearth.com/uploads/2/4/6/5/24658156/2014\\_barton\\_hydrogen\\_sulfide\\_a\\_toxic\\_gas\\_produced\\_by\\_dissimilatory\\_sulfate\\_and\\_sulfur\\_reduction\\_and\\_consumed\\_by\\_microbial\\_oxidation.pdf](https://www.sciencetheearth.com/uploads/2/4/6/5/24658156/2014_barton_hydrogen_sulfide_a_toxic_gas_produced_by_dissimilatory_sulfate_and_sulfur_reduction_and_consumed_by_microbial_oxidation.pdf).
- (31) **KOVAC J., KUSHKEVYCH I.** New modification of cultivation medium for isolation and growth of intestinal sulphate reducing bacteria. *Mendel Net*. [Online] 8. 11 2017. [Citace: 16. 11 2022.] <https://mendelnet.cz/pdfs/mnt/2017/01/52.pdf>.
- (32) **HAGE M., KHELISSA S., AKOUM H. et al.** Cold plasma surface treatments to prevent biofilm formation in food industries and medical sectors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [Online] 10. 12 2021. [Citace: 12. 11 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8661349/>.

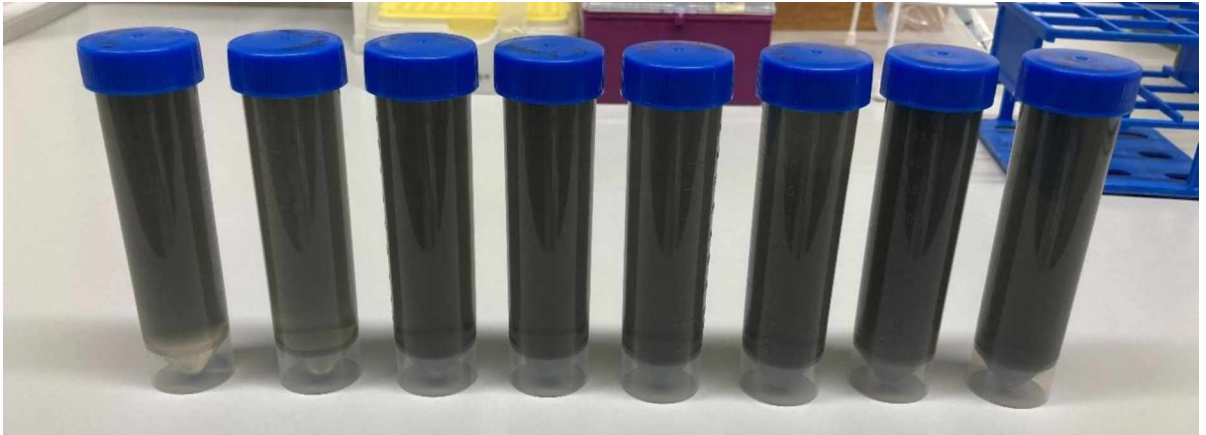
- (33) **MARIĆ S., VRANEŠ J.** Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum biologorum*. [Online] 2007. [Citace: 12. 11 2022.] [https://www.researchgate.net/publication/235983173\\_Characteristics\\_and\\_significance\\_of\\_microbial\\_biofilm\\_formation](https://www.researchgate.net/publication/235983173_Characteristics_and_significance_of_microbial_biofilm_formation).
- (34) **HØIBY N., CIOFU O., JOHANSEN H.K., et al.** The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*. [Online] Springer Nature B.V., 4 2011. [Citace: 12. 11 2022.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3469878/>.
- (35) **HØIBY, N.** A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*. [Online] 13. 4 2017. [Citace: 14. 11 2022.] <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/apm.12686>.
- (36) **DURHAM, J.** Colony Of Bacillus Subtilis Bacteria. *SCIENCEphotoGALLERY*. [Online] 17. 2 2021. [Citace: 17. 1 2023.] <https://sciencephotogallery.com/featured/colony-of-bacillus-subtilis-bacteria-john-durhams-science-photo-library.html>.
- (37) **ERRINGTON J., van der AART L.** Microbe Profile: Bacillus subtilis: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*. [Online] PubMed Central, 5 2020. [Citace: 16. 1 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376258/>.
- (38) **SU Y., LIU Ch., FANG H., ZHANG D.** Bacillus subtilis: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*. [Online] National Library of Medicine, 3. 9 2020. [Citace: 20. 1 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7650271/>.
- (39) **KUNKEL, D.** Desulfovibrio vulgaris. *SCIENCEphotoGALLERY*. [Online] 16. 9 2018. [Citace: 23. 1 2023.] <https://sciencephotogallery.com/featured/desulfovibrio-vulgaris-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>.
- (40) **LOVLEY D.R., PHILLIPS E.J.P.** Reduction of Chromate by Desulfovibrio vulgaris and its c3 chromosome. *Applied and environmental microbiology*. [Online] American Society for Microbiology, 2 1994. [Citace: 16. 1 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201373/pdf/aem00019-0350.pdf>.
- (41) **ZHOU Ch., VANNELA R., HAYES K.F., RITTMANN B.E.** Effect of growth conditions on microbial activity and iron-sulfide production by Desulfovibrio vulgaris. *Journal Of Hazardous Material*. [Online] ELSEVIER, 14. 3 2014. [Citace: 15. 2 2023.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389414001733>.
- (42) **STRAKA F., KUNČAROVÁ M., LACEK P.** *Optimalizace vsázek pro bioplynové stanice při použití biomasy, živočišných odpadů nebo dalších možných vedlejších živočišných produktů*. [dokument] Praha : Ústav pro výzkum a využití paliv a.s., 9 2007.
- (43) **WIDDEL, F.** New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing Desulfo bacter species, D. hydrogenophilus sp. nov., D. latus sp. nov., and D. curvatus sp. nov. *Archives of Microbiology*. [Online] Springer, 1987. [Citace: 19. 1 2023.] <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00456706>.

- (44) **MARITEU, A.** Complete genome sequence of *Desulfobacter hydrogenophilus* AcRS1. *Marine Genomics*. [Online] 25. 5 2019. [Citace: 16. 1 2023.] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874778719301102?via%3Dihub>.
- (45) **BERTRAN E., WARD L.M., JOHNSTON D.T.** Draft Genome Sequence of *Desulfobacter hydrogenophilus* DSM 3380, a Psychrotolerant Sulfate-Reducing Bacterium. *National Center for Biotechnology Information*. [Online] Microbiology Resource Announcements, 2. 4 2020. [Citace: 12. 3 2023.] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7118185/>.
- (46) **SLEZÁK M., PALARČÍK J., SLEHOVÁ E., BLAŽKOVÁ Z.** Zařízení pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací. [Online] 2016. [Citace: 20. 1 2023.]
- (47) **BIOLOG.** Anaerobe Identification Test Panel. [Online] 6 2007. [Citace: 12. 4 2023.] <https://www.biolog.com/wp-content/uploads/2020/04/00A-006rB-AN-Sell-Sheet-Jul07.pdf>.
- (48) **PAPÁČKOVÁ, E.** *Optimalizace produkce sulfidů pomocí síran redukujících bakterií*. [Diplomová práce] Pardubice : Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2019.
- (49) **ŘEHÁK, Z.** *Optimalizace prvního stupně kolonového systému LITHIM*. [Diplomová práce] Pardubice : Univerzita Pardubice, Fakulta chemiko-technologická, 2018.
- (50) **DIAMO s.p.** *ZPRÁVA o výsledcích monitoringu a stavu složek životního prostředí o.z. SUL za rok 2021*. [dokument] Příbram : autor neznámý, 2022.

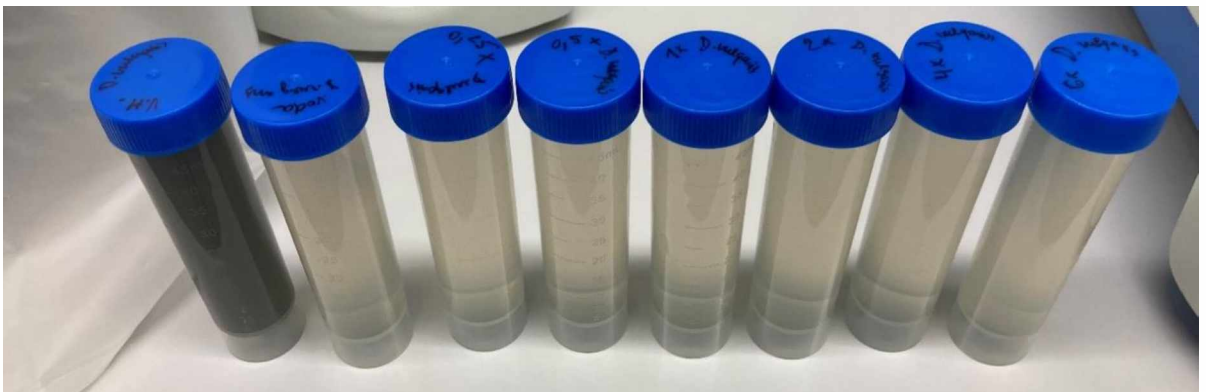
## 12 Přílohy

Příloha 1: Pozorování změn zbarvení bakterií *D. vulgaris* při kultivaci v bioreaktoru za různých koncentračních podmínek živného Van Houten média: a) počáteční zbarvení v čase 0 hodin, b) zbarvení v čase 48 hodin, c) zbarvení v čase 330 hodin

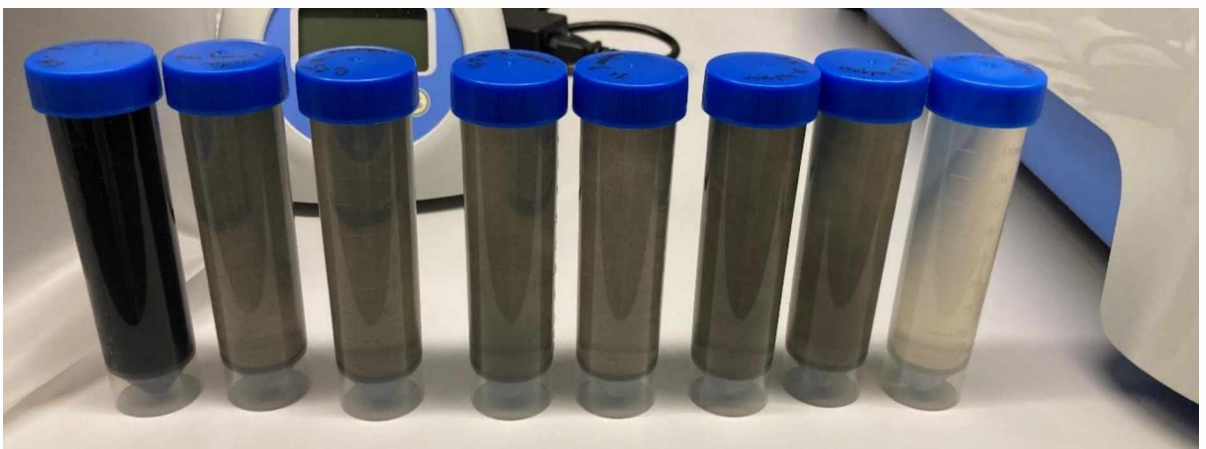
a)



b)



c)



Příloha 2: Průkaz biofilmu u *B. cereus*, *B. mycoides* a *B. subtilis* na nosiči bioMECH pomocí přípravku BioFinder, odečet po 5 minutách (foto autor)



Příloha 3: Vytipované parametry kolonových systémů

doba provozu kolon [dny]	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>			<i>Desulfovibrio vulgaris</i>		
	pH		Sulfidy S <sup>2-</sup> [mg/l]	pH		Sulfidy S <sup>2-</sup> [mg/l]
	Vstup	Výstup	Výstup	Vstup	Výstup	Výstup
1	7,45	7,06	0	7,43	7,17	0
3	7,44	7,23	0	7,48	7,32	0
5	7,41	7,52	0	7,48	7,32	0,011
8	7,43	7,51	0,009	7,44	7,34	0,068
10	7,48	7,59	0,012	7,42	7,32	0,103
12	7,48	7,58	0,014	7,41	7,39	0,137
15	7,45	7,59	0,016	7,44	7,38	0,174
17	7,43	7,57	0,036	7,43	7,39	0,208
19	7,44	7,58	0,048	7,44	7,38	0,289
26	7,46	7,59	0,169	7,42	7,41	0,726
32	7,42	7,56	2,897	7,44	7,39	4,319
43	7,43	7,53	12,961	7,41	7,37	13,986
46	7,44	7,52	10,68	7,45	7,38	12,825
49	7,48	7,53	11,145	7,41	7,39	15,457
53	7,41	7,51	12,015	7,43	7,37	15,753
<b>Spuštění průtočného režimu s průměrnou hodnotou průtoku 0,33 l/hod pro <i>D. hydrogenophilus</i> a 0,34 l/hod pro <i>D. vulgaris</i></b>						
57	7,43	7,53	0,053	7,45	7,38	0,052
64	7,45	7,57	0,101	7,43	7,35	0,014
<b>Snížení průtočného režimu na průměrnou hodnotou průtoku 0,21 l/hod pro <i>D. hydrogenophilus</i> a 0,2 l/hod pro <i>D. vulgaris</i></b>						
69	7,44	7,54	1,682	7,42	7,37	0,701
76	7,45	7,57	2,784	7,45	7,4	1,238
83	7,42	7,55	3,432	7,47	7,38	2,56
89	7,41	7,51	5,67	7,43	7,36	3,15
92	7,45	7,54	6,14	7,41	7,34	4,67
96	7,47	7,56	7,24	7,46	7,39	6,29
99	7,46	7,52	9,17	7,45	7,37	8,36
103	7,42	7,57	10,78	7,48	7,32	9,55
109	7,48	7,55	13,09	7,42	7,38	12,98

Příloha 4: Výsledný protokol identifikace systému Biolog

Program	MicroLog 3/5.2.01 35
Project	ML5
File Name	
User	uzivatel
Instrument	MicroStation 2 Reader
Instrument S/N	15021218
Incubation Hours	20.00
Plate Number	1
Plate Type	GEN III
Protocol	B
Sample Name	
Operator	
Comments	
Date & Time of Read	Feb 16 2023 9:10 AM
Biolog ID DB	GEN-III_2.7.1.40.15G

Result	Species ID: <i>Bacillus subtilis</i> ss <i>subtilis</i>
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	---	0.168	7.659	GP-Rod-SB	<i>Bacillus subtilis</i> ss <i>subtilis</i>
2	---	0.167	7.666	GP-Rod-SB	<i>Bacillus mojavensis</i> /subtilis
3	---	0.068	8.768	GP-Rod-SB	<i>Bacillus subtilis</i> ss <i>spizizenii</i>
4	---	0.067	8.797	GP-Rod-SB	<i>Bacillus atrophaeus</i> /subtilis

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	59	< 175	{ 143	< 178	{ 143	{ 154	< 179	< 167	68	< 294	< 288	{ 228
B	< 165	57	{ 130	{ 141	< 180	{ 134	92	55	65	< 301	< 286	{ 240
C	{ 145	< 174	< 190	68	57	86	88	71	86	< 315	61	46
D	< 239	{ 154	{ 110	< 181	{ 136	76	{ 115	63	91	< 260	< 276	68
E	86	69	< 185	{ 155	< 168	< 165	< 159	{ 118	93	< 263	< 245	< 274
F	{ 114	{ 142	{ 115	< 174	69	89	< 212	58	< 214	< 277	< 399	{ 173
G	59	{ 126	68	{ 141	< 251	{ 156	- { 100	< 250	< 162	63	< 275	< 287
H	{ 127	97	57	< 168	- 44	87	{ 120	{ 145	{ 123	61	+ < 248	92

Report Date	Feb 16 2023 9:10 AM
-------------	---------------------