



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Možnosti nanovláken jako nosiče pro preferenční růst specifických bakterií z aktivovaného kalu

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Jan Paštika**
Vedoucí práce: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Possibilities of nanofiber carriers for preferential growth of specific bacteria from activated sludge

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Jan Paštika**
Supervisor: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.



Technická univerzita v Liberci
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan Paštika**
Osobní číslo: **M15000146**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Možnosti nanovláken jako nosiče pro preferenční růst specifických bakterií z aktivovaného kalu**
Zadávající katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

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

1. Zpracování odborné rešerše: využití nanovláken při čištění odpadních vod; nanovlákná jako nosiče bakteriálních buněk; rizika použití nanomateriálů (především nanovláken).
2. Provoz laboratorního reaktoru s nanovláknou textilií (sledování vývoje bakteriálního biofilmu, sledování vývoje suspenzní populace, hodnocení stavu nanovlákné textilie, hodnocení účinnosti čištění odpadní vody).
3. Identifikace specifických bakterií v aktivovaném kalu, zejména nitrifikačních bakterií (zvlášť bakterií vázaných k nosiči a zvlášť bakterií v suspenzi, využití fluorescenčních metod FISH, live/dead apod.).
4. Posouzení vhodnosti nanovlákné textilie jako nosiče pro preferenční růst specifické bakteriální populace na čistírnách odpadních vod (případně pro další aplikace).
5. Zhodnocení dosažených výsledků včetně popisu možností využití v reálné praxi.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] ZHANG, T.C., Environmental and Water Resources Institute (U.S.). Nanotechnology Task Committee. Nanotechnologies for water environment applications. 2009: ASCE Publications.
[2] CLOETE, T.E., et al., Nanotechnology in Water Treatment Applications. 2010: Horizon Scientific Press.
[3] LINKOV, I., STEEVENS, J., Nanomaterials: Risks and Benefits. 2009: Springer.
[4] DIALLO, M., et al.: Nanotechnology Applications for Clean Water. William Andrew, 1st ed., ISBN-10: 0815515782, ISBN-13: 978-0815515784, 2009.
[5] PAPAZOGLU, E. S., PARTHASARATHY, A., BioNanotechnology. Morgan and Claypool Publishers, 1st ed., ISBN-10: 1598291386, ISBN-13: 978-1598291384, 2007.
[6] NIELSEN, P.H., DAIMS, H., LEMMER, H., FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and Quantification of Microorganisms in Activated Sludge and Biofilms by FISH, Intl Water Assn, July 15, 2009, ISBN-10: 1843392313, ISBN-13: 978-1843392316

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání bakalářské práce: **19. října 2017**
Termín odevzdání bakalářské práce: **14. května 2018**

prof. Ing. Zdeněk Pliva, Ph.D.
děkan



Ing. Josef Novák, Ph.D.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 19. října 2017

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14.5.2018

Podpis: 

Poděkování

Rád bych poděkoval Bc. Petře Šubrtové, Ing. Karlu Havlíčkovi, Mgr. Mileně Johnové a Ing. Lukáši Dvořákovi, Ph.D. za velikou pomoc a rady při řešení problémů v experimentální části této práce, také Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. za nafocení vzorků na skenovacím elektronovém mikroskopu a Ing. Tomáši Ledererovi, Ph.D. za vedení a pomoc při důležitých rozhodnutích v experimentální i teoretické části. Hlavní poděkování náleží Ing. Lucii Svobodové, Ph.D. za vedení této práce, vyhodnocení nafocených vzorků, pomoc, trpělivost, rady, ochotu a důležité připomínky při psaní této práce.

Poděkování také patří mé rodině, přítelkyni a přátelům za oporu, kterou mi poskytli nejen při celém studiu, ale také při psaní této práce.

Abstrakt

Tato práce se zaměřuje na hodnocení dvou nanovláknenných materiálů z polyamidu 6 a polyuretanu použitých jako nosiče pro nitrifikační bakterie. Vláknna byla připravována pomocí střídavého elektrického pole. Testovacím zařízením byl bioreaktor s fixním ložem, na kterém byla vlákna připevněna. V pravidelných týdenních intervalech byly odebírány vzorky jak pro otestování aktuálního stavu bioreaktoru, tak pro zhodnocení růstu a složení uchyceného biofilmu na nosičích (fluorescenční in-situ hybridizací, FISH). Optická mikroskopie sloužila k porovnání vizuálních aspektů zaplnění nanovláknenné plochy biofilmem. Správnou volbou nanovláknenného pokryvu (materiálu) byl podpořen růst nitrifikačních bakterií ve formě biofilmu. Správnost této volby potvrdilo výrazné snižování podílu všeobecných bakterií na vláknech PU ve prospěch většího zastoupení bakterií nitrifikačních.

Klíčová slova

Polyamid 6, polyuretan, nitrifikační bakterie, bioreaktor, metoda FISH

Abstract

This work focuses on the evaluation of two nanofibrous materials made of polyamide 6 and polyurethane used as carriers for nitrifying bacteria. Fibers were prepared using the alternating electric field. The test device was a fixed bed bioreactor on which the fibers were attached. Samples were taken at regular weekly intervals for both testing the bioreactor condition and assessing the growth and composition of biofilm captured on carriers (fluorescence in situ hybridization, FISH). Optical microscopy served to compare the visual aspects of filling the nanofibrous area with biofilm. By choosing the nanofibrous coating (material) we supported the growth of nitrifying bacteria in the form of biofilm. The accuracy of this choice has been confirmed by a significant reduction in the proportion of generic bacteria on PU fibers in favor of a higher proportion of nitrifying bacteria.

Keywords:

Polyamide 6, polyurethane, nitrifying bacteria, bioreactor, FISH methods

Seznam použitých zkratk

CHSK	... chemická spotřeba kyslíku
NO ₂ ⁻	... dusitan
NO ₃ ⁻	... dusičnan
NH ₄ ⁺	... amonné ionty
AOB	... amonné ionty oxidující bakterie
NOB	... dusitany oxidující bakterie
EUB	... všeobecné bakterie
PBS	... fosfátový pufr
FA	... formamid
PFA	... paraformaldehyd
FISH	... fluorescenční in situ hybridizace
P-pufr	... fosfátový pufr
PA6	... polyamid 6
PU	... polyuretan
MQ voda	... ultra čistá voda
ISO	... citlivost čipu fotoaparátu
RGB	... spektrum červené, zelené a modré (Red, Green, Blue)
HSV	... odstín, sytost, světlost (Hue, Saturation, Value)

Obsah

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1. Použití nanovláken v odpadních vodách.....	12
2.1.1. Důvody k použití nanovláken v odpadních vodách	12
2.1.2. Vlastnosti nosičů s obsahem nanovláken potřebných pro provoz reaktoru	13
2.2. Rizika použití nanomateriálů ve vodním prostředí	14
2.2.1. Nebezpečí nanomateriálů	14
2.3. Nanomateriály a jejich nebezpečí ve vodním prostředí	15
2.4. Nitrifikační bakterie v kalu v čistírnách odpadních vod	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
3.1. Použité metody.....	18
3.1.1. Přístroje a chemikálie použité k testování bioreaktoru.....	18
3.1.2. CHSK filtrovaná i nefiltrovaná.....	18
3.1.3. Stanovení sušiny.....	19
3.1.4. Metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	19
3.1.5. Metoda pozorování povrchu vláken pomocí optického mikroskopu	21
3.1.6. Metoda vyhodnocování snímků z FISH.....	21
3.1.7. Metoda vyhodnocování snímků z optického mikroskopu	22
3.2. Set-up experimentu	23
3.2.1. Úvod k experimentu	23
3.2.2. Příprava reaktoru.....	24
3.2.3. Popis použitých nosičů s nanovláknem	24
3.2.4. Příprava nosičů	26
3.2.5. Spuštění bioreaktoru	27
3.2.6. Cyklus bioreaktoru.....	27
3.3. Testování průběhu experimentu	28
3.3.1. Odběr vzorků z bioreaktoru a nosiče s nanovláknem	28
4. VÝSLEDKY	29
4.1. Testování kondice reaktoru	29
4.2. Výsledky z optické mikroskopie	31
4.3. Zastoupení bakteriálních populací metodou FISH	33
5. VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	37
5.1. Bioreaktor	37
5.2. Optická mikroskopie vzorků vláken s biofilmem	37
5.3. Fluorescenční mikroskopie vzorků FISH.....	38
5.4. Diskuse dosažených výsledků s odbornou literaturou.....	38
6. ZÁVĚR.....	40
POUŽITÁ LITERATURA	41

1. Úvod

V dnešní době je na světě přes 7,6 miliardy lidí, kteří ať už přímo či nepřímo využijí přes polovinu čisté vody ročně (celosvětové snížení čisté vody ročně je 3,928 km³) za neustálé produkce vody odpadní. Se vzrůstajícím počtem lidí má i míra spotřebované čisté vody ročně tendenci se výrazně zvyšovat. Spotřebovaná čistá voda se vypouští zpět do životního prostředí ve formě odpadních vod městských, průmyslových a zemědělských. V zemích s vysokým průměrným příjmem na osobu se v průměru dostatečně vyčistí až 70 % odpadních vod, v zemích s vyšším středním příjmem už klesá procento ideálně vyčištěné odpadní vody na 38 %, a v zemích s nižším středním příjmem je to jen 28 %. V zemích s nízkým průměrným příjmem se tato hodnota sníží na 8 %, což je jednou z hlavních příčin zhoršení životních podmínek v chudých oblastech, kde jsou takto neošetřené odpadní vodě lidé přímo vystaveni. Důsledkem této nízké účinnosti čištění je pro místní obyvatele velmi časté onemocnění až otrava, která v mnoha případech kvůli nedostatečné lékařské péči může skončit až smrtí. [1]

Vypouštění neošetřených odpadních vod nemá vliv jen na lidskou populaci, ale především na ekosystémy po celém světě. Živiny, které jsou ve znečištěné vodě hojně vypouštěny (organické látky, dusík, fosfor a draslík) spolu se zemědělskými chemikáliemi značně urychlují eutrofizaci sladkovodních a pobřežních oblastí při současném znečištění vod podzemních. Eutrofizace způsobuje v ekosystémech nerovnováhu, která se projevuje snížením či vymizením biodiverzity zapříčiněným změnou životních podmínek z vhodných na toxické. [1]

Celosvětový postoj k problému odpadních vod posuzuje už fakt, že zaujímá jednu z nejvyšších příček v nutnosti k řešení mezi globálními problémy. Nejdůležitějším bodem je neustálé zdokonalování již konvenčních procesů čištění odpadních vod, a dbát na šíření těchto metod do všech koutů světa, kde s tím mají velký problém. Ve vyspělých oblastech je snaha spíše o zefektivnění čištění odpadních vod na úroveň nejen bezpečnou pro životní prostředí, ale dokonce až na úroveň pitné vody. [2] Zde je namístě prostor k využití technologií a materiálů současnosti při snaze o vylepšení čistících procesů.

Jedním z hlavních směrů vedoucích ke zlepšení efektivity čištění odpadních vod je skrze poslední dobou velmi známé odvětví nanomateriálů. Využívání nanomateriálů má při čištění odpadních vod velký potenciál, pomocí kterého je snaha účinnost čištění co nejvíce přiblížit ideálnímu stavu (čistě vodě). Hledání správné technologie, její efektivní a levné výroby při správném způsobu aplikace tak, aby výsledný systém byl co nejefektivnější, je cílem všech skupin lidí věnujících se právě této tématice.

Nanovlákna jsou právě jedním ze zmíněných typů materiálů současnosti, které mají zásadní vliv na vylepšení čistících procesů. Jejich aplikace lze najít například v oblasti membránových filtrací, nebo jako nosiče biomasy (pro intenzifikaci růstu bakterií na jejich povrchu) určené k přeměně (čištění) látek obsažených v odpadní vodě. Použití nanomateriálů (nanovláken) v čistírnách odpadních vod umožňuje rychlejší imobilizaci bakterií a tvorbu biofilmu, a také zvýšení odolnosti bakterií vůči toxickým látkám v odpadní vodě. Možnost aplikace a testování nosičů s nanovláknem v průmyslovém měřítku je hnací silou k inovacím právě v této oblasti využití nanomateriálů pro následující léta.

2. Teoretická část

2.1. Použití nanovláken v odpadních vodách

2.1.1. Důvody k použití nanovláken v odpadních vodách

Využití nanovláken k čištění odpadních vod je velmi rychle se rozvíjejícím odvětvím, které přináší nové možnosti při výzkumu a vývoji nových prostředků k získání kvalitnějšího procesu čištění. Pokrok v nanotechnologiích umožňuje stále efektivnější výrobu materiálů, které jsou vhodnější k aplikaci na různorodá prostředí. [3]

V průběhu čištění odpadních vod je mnoho způsobů, jak nanotechnologie využít. Práce je zaměřena na využití pro aerobní biologické čištění odpadní vody v biofilmových reaktorech. Hlavním určujícím rysem pro tyto reaktory je způsob, jakým dochází ke kultivaci biomasy. Biomasa je v tomto typu reaktoru umístěna buď na nehybném nosiči tzv. fixním loži, nebo ve fluidním loži. Reaktory s fluidním ložem mají proměnlivý stupeň plnění a částečnou možnost regulace tloušťky biofilmu. Hlavní nevýhodou tohoto typu reaktoru jsou vysoké nároky na mechanickou odolnost, což se prozatím neshoduje s efektivitou nosičů ve formě nanomateriálů. Pro reaktory s fixním ložem je velkou výhodou možnost instalace do stávajících aktivačních systémů bez nutnosti výměny typu aerace. Pro fixní lože existují tyto čtyři základní typy [3]:

a) Reaktor s biofiltrem

- Biofilm je uchycen na nosiči (kolona), na který je přiváděna odpadní voda skrápěním.
- Vzduch proudí okolo nosiče, takže je přiváděn přímo na kolonu s biofilmem.

b) Reaktor s ponořenou biologickou kolonou

- Biofilm je uchycen na nepohyblivém nosiči, který je úplně ponořen v odpadní vodě, která celou kolonou protéká.

c) Rotační biofilmové reaktory

- Biofilm je uchycen na nosiči, který se určitou rychlostí točí na rozhraní odpadní vody a vzduchu pro zajištění oxidačních procesů.

d) Reaktory s kombinovanou kultivací biomasy

- Biomasa se vyskytuje jak na nosiči, tak v pevné části složení aktivovaného kalu.

Čtvrtý typ reaktoru byl použit pro tuto práci. Dále v textu je označován pouze jako bioreaktor.

Při použití tohoto bioreaktoru hraje jednu z nejdůležitějších rolí právě volba nosiče biofilmu. Z důvodu nutnosti imobilizovat biomasu je třeba vytvořit vhodný nosič. Zde velmi pomohou již zmíněná nanovlákná, která jsou při vhodné skladbě (složení, hustota, povrchová morfologie aj.) ideální jako nosič bakterií pro následnou tvorbu biofilmu. [3]

2.1.2. Vlastnosti nosičů s obsahem nanovláken potřebných pro provoz reaktoru

Jak bylo již nastíněno, nosiče musí mít určité vlastnosti, aby mohly správně podpořit růst biofilmu. Ty nejdůležitější jsou:

a) Velký měrný povrch s malými póry a vysokou pórovitostí

Póry na povrchu nosiče zjednodušují imobilizaci bakterií v počátečních fázích provozu reaktoru. Díky vysoké poréznosti se mohou bakterie pevně připoutat k povrchu nosiče, čímž se ochrání před mechanickými vlivy provzdušňovače (střížné síly), a zároveň se nezesnadňuje průnik substrátu a kyslíku k bakteriím. [4]

b) Biokompatibilita

Bakterie se mohou okamžitě uchytit na povrchu, aniž by docházelo k jakýmkoliv toxickým účinkům a tím ke zpoždění adhezi k materiálu. Aby byl materiál biokompatibilní, musí být také netoxický pro životní prostředí a pro bakterie samotné. Materiál musí být také hydrofobní, protože čím je hydrofobicita větší, tím větší šance je na uchycení biofilmu na nosič. [4]

c) Stálost

Toto je velmi důležitý faktor, protože i při vhodném povrchu a biokompatibilitě může být nosič destruován chodem a vlastnostmi reaktoru. V tomto případě je nutné uvažovat především vysokou mechanickou odolnost, a pevnost či stálost výsledného tvaru nosiče (a to i po dlouhé době v reaktoru), především v důsledku vysokých střížných sil v reaktoru (důsledek intenzivního míchání). [4]

d) Odolnost při změně podmínek

Při reálné aplikaci je potřeba počítat s možnou proměnlivostí vnějších (např. teploty se změnou ročního období) i vnitřních podmínek (např. s náhlou změnou pH, koncentrací

látek, vliv samotných bakterií aj.) v reakční nádrži. V laboratorním měřítku je možné vnější podmínky ovlivnit například klimatizací, což v průmyslu není zcela možné kvůli vysokým nákladům. Vnitřní podmínky závisí na použité bakteriální populaci (nosič musí dosahovat nízké biodegradability), na předčištění odpadní vody z předchozí fáze (sorpcí nebo inkrusty jiných látek na nosič může způsobovat zanášení nosiče), na typu a koncentraci látek (v závislosti na produkci/výrobě daného průmyslového podniku) apod. V laboratoři je většina podmínek volitelných a jednoduše nastavitelných, což je velmi zásadní rozdíl oproti reálné aplikaci. Je proto třeba na tyto podmínky myslet už při vývoji nanovláknenného nosiče. [4]

Nosič by měl být také cenově dostupný, aby jeho výroba a aplikace byla v průmyslovém měřítku reálná a konkurence schopná. Existuje více typů nosičů biofilmu, které si lze vybrat, každý typ nosičů má své přednosti a také své nevýhody. [5]

2.2. Rizika použití nanomateriálů ve vodním prostředí

2.2.1. Nebezpečí nanomateriálů

Disciplínou zabývající se nebezpečím a riziky nanomateriálů v životním prostředí je nanoekotoxikologie. Je to subdisciplína ekotoxikologie a zabývá se především identifikací a předvídáním účinků nanomateriálů na ekosystémy. Kvůli velmi rychle rostoucímu trendu vytvářet stále nové nanomateriály v neustále větším množství, je třeba se stejným či rychlejším tempem získávat nové a přesné informace o jejich možném nebezpečí nejen pro člověka, ale i pro celý ekosystém. Prozatím je k nanomateriálům chování až na výjimky stejné, jako ke kterékoli jiné chemické látce dle jejího složení. Škodlivost nanomateriálů má ale stejně velký potenciál jako jejich vlastní využití. Obojí se v současnosti stále rychleji posouvá vpřed velmi rychle, což může při nedostatečné pozornosti vést za desítky let k fatálním důsledkům napáchaných na lidské populaci i životním prostředí, a to v globálním měřítku. [6]

Při zkoumání, posuzování a nastavování bezpečnostních předpisů pro práci s nanomateriály je třeba nejprve upřesnit, co si pod nebezpečím nanomateriálů představit, v čem tkví ona hrozba, proč je nutné být při práci s nimi tak obezřetný, a konečně jak se možnému riziku co nejefektivněji vyvarovat. [6]

Nebezpečí nanomateriálů není každodenním nebezpečím, které si každý z nás dokáže představit jako přímo život či zdraví ohrožující. Jedním z největších rizik je škodlivost způsobená nanomateriály uvnitř těla živých organismů, protože jejich jedinečnost je právě důvodem ke zvýšenému potenciálnímu nebezpečí vůči běžným materiálům. Zmíněnou změnu vlastností oproti běžným materiálům způsobuje řádový rozdíl

ve velikosti alespoň jednoho rozměru výsledného nanomateriálu, což je právě jedním ze základních identifikačních znaků nanomateriálů. Pokud je porovnán onen řádový rozdíl, sama předpona napoví, že se jedná o délky 10^{-9} m. [7]

Pro pochopení potenciálního nebezpečí je třeba si uvědomit, v čem spočívá ono riziko nanorozměru pro živé organismy. Velikost nano je již tak malá, že se mohou nanomateriály dostat požitím i vdechnutím do krevního oběhu a z něj do srdce, jater a dalších orgánů. Nanočástice mají stejné nebo podobné rozměry jako molekuly, což je hlavním důvodem k předpokladu, že jsou rizikem jak pro člověka, tak i pro životní prostředí, dokáží totiž reagovat již na buněčné úrovni. [7] Reakce nanomateriálu s organismem může být způsobena jeho hmotností, jeho tvarem, počtem částic, ze kterých je složen, větší změnou Gibbsovy volné energie povrchu, elektrickým nábojem a neméně důležitá je jejich chtěná i nechtěná povrchová úprava. [7] Nanomateriály mají také schopnost kumulovat více různých znečišťujících a toxických látek, například stopové kovy a organické látky. Hromadění například těžkých kovů v částech organismu je velmi nechtěným jevem. Velkým strašákem pro člověka není pouze možnost otrávit se toxickými nanomateriály, ale především tendence způsobovat rakovinu a v případě teratogenů mít negativní vliv na prenatální vývoj. To by totiž znamenalo, že nanočástice mají od jejich proniknutí do celého organismu dlouhý čas na rozptýlení a působení. [7]

Není zatím jasné, který z těchto parametrů je zásadní pro posouzení toxicity. Je třeba tedy stále pozorovat všechny a statisticky vyhodnocovat, které interakce nanomateriálů nejvíce ovlivňují správnou funkci buněk v organismech zapříčiňující negativní vlivy na celkový chod buněčného systému. Získané informace z pozorování lze při dostatečném objemu dat v budoucnu použít k předpovězení hrozby daného nanomateriálu pro každé specifické prostředí a organismus. [7]

2.3. Nanomateriály a jejich nebezpečí ve vodním prostředí

Nanomateriály jsou a byly v životním prostředí daleko dříve, než prvního člověka napadla možnost jejich pouhé existence. Vyskytují se od pradávna například ve formě přirozeně funkčních nanomateriálů v biologických systémech, jako jsou struktury křídel foraminiferů, kapsid u virů, voskovitých krystalů pokrývající lotosové květy, pavoučí síť, modrý odstín tarantule, spodní část gekonových končetin, živočišných koloidů jako je mléko a krev, aj. Nebiologická existence nanorozměrných materiálů je zastoupena ve formě aerosolů koloidních částic putující skrze celou planetu vzduchem i vodou. Tyto částice mohou mít různý původ, například pomocí suché a mokré atmosférické depozice, což je proces transportu chemických látek z atmosféry, který se na základě rozdílu

chemického potenciálu při termodynamických jevech absorbuje právě do vod nebo půd. Dále jsou tu přímé příčiny jako vulkanické emise částic, kouř z různých přírodních požárů a všechny druhy přírodních oxidačních procesů zodpovědné za vznik koloidních částic. [8 - 11]

Široké využití nanomateriálů je také v medicíně, ve spotřebních výrobcích, v průmyslu a v zemědělských aplikacích. Tyto činnosti jsou hlavní příčinou uvolňování nanomateriálů a nanočástic do životního prostředí, kde končí zejména usazené ve vodních zdrojích. Jakmile se tyto materiály nahromadí ve vodě, mohou pomocí vodních a atmosférických cyklů ovlivňovat celou planetu. Jejich vlastnosti ovlivňují jejich stabilitu a rozmanitost, což má za důsledek špatnou detekci současnými analytickými metodami a zhoršenou schopnost je z vody odstranit. To vede k jejich akumulaci, a díky špatné degradaci i k jejich pohlcení vodními organismy, které v sobě shromažďují škodliviny (toxické nanomateriály). Takto nashromážděné látky se koncentrují u jedinců na vyšší spotřební úrovni. Tento přirozený jev se nazývá biomagnifikace. Vysoké koncentrace těchto látek už mohou vyvolat velmi nepříznivé účinky, nejvíce právě na bytosti na vyšších stupních potravního řetězce. Naakumulované nanomateriály mohou mít velmi negativní účinek na buněčný růst, vývoj, zkrátka celkově na stabilitu a funkčnost daného organismu. Například některé nanočástice mohou svou extrémní antibakteriální schopností mít zásadní vliv na vymizení přirozené bakteriální komunity v biologickém systému. [12]

Chování nanomateriálů závisí nejen na fyzikálně-chemických vlastnostech, ale také na vlastnostech prostředí, které je přijímá. Všechny nanomateriály ve finální fázi svého účelu skončí vždy ve vodním prostředí, v sedimentech a v půdě. Zdroje odpadní vody obsahují širokou škálu znečišťujících látek a patogenů, velmi vysoké hodnoty organické hmoty a anorganických kovů a iontů, které všechny ovlivňují stabilitu a toxicitu nanomateriálů. V mořské vodě dochází kvůli vyšší iontové koncentraci k agregaci a následnému usazení v sedimentech mnohem snadněji než ve vodě sladké. Podle těchto pozorování je usouzeno, že jsou nanomateriály mnohem stabilnější v odpadních vodách. Stabilita nanomateriálů tedy závisí především na vlastnostech vodního prostředí. Stabilní a rozpustné nanomateriály jsou mnohem dostupnější, což vede k akumulaci ve vodních ekosystémech a toxicitě. [12]

Odpady obsahující nanomateriály se uvolňují do vod ve dvou směrech: přímým uvolněním do řek a jezer, u venkovního využití povrchovým odtokem a domácími nebo průmyslovými odpadními vodami. Některé nanomateriály mohou být toxické v laboratoři, ale v přírodním prostředí inertní nebo naopak, přičemž některé z nich se stanou smrtícími v důsledku abiotického a biotického zpracování v komplexní matici vodních útvarů. [13]

2.4. Nitrifikační bakterie v kalu v čistírnách odpadních vod

Využití bakteriálních populací k čištění odpadních je stále více se rozvíjející oblastí pro aplikace nových poznatků z mnoha technologických odvětví. Aby bylo možné využít bakterie co nejvíce, je třeba aby měly dobré podmínky. K tomu je vhodné využít nosiče s co největším funkčním povrchem. To mohou obstarat právě nanomateriály přesněji nanovlákna. Nosič musí splňovat řadu podmínek, kterým vyhovují například vlákna polyethylenová, polypropylenová, polyamidová či polyuretanová. Tato vlákna v nanoměřítku slouží hlavně k nárůstu bakteriálních kolonií ve formě biofilmu, který má díky těmto vláknům až o 90 % vyšší účinnost biopurifikace. [15] Další výhodou je prokázaná stabilita procesu čištění odpadní vody i v přítomnosti toxických látek. [15]

Biologické čištění odpadních vod je nejčastěji používanou technikou odstraňování dusíku (v odpadních vodách hlavně amonný iont- $\text{NH}_4\text{-N}$) kvůli nízkým nákladům a vysoké účinnosti, se k tomu účelu využívají nitrifikační bakterie. Hlavní roli mají nitrifikační bakterie *Nitrosomonas sp.*, *Spirillum sp.*, *Nitrobacter sp.* a *Nitrospirae sp.* V prvním kroku odstraňování amonného iontu ($\text{NH}_4\text{-N}$) z odpadní vody bakterie rodu *Nitrosomonas* a *Spirillum* přeměňují oxidací amonné ionty ($\text{NH}_4\text{-N}$) na dusitan ($\text{NO}_2\text{-N}$). Ve druhém kroku bakterie rodu *Nitrobacter* a *Nitrospirae* přeměňují vzniklý dusitan ($\text{NO}_2\text{-N}$) na dusičnan ($\text{NO}_3\text{-N}$). [16]

Nitrifikační bakterie jsou druhem velmi citlivým na podmínky prostředí, jako je pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace ($\text{NH}_4\text{-N}$), koncentrace ($\text{NO}_2\text{-N}$) a koncentrace ($\text{NO}_3\text{-N}$). Dále mají oproti ostatním bakteriím vyskytujícím se v kalu velmi nízkou rychlost růstu, což je důvodem jejich snadného vyplavení z reakčních nádrží. Proto je nutné použít některé z technik určených pro usnadnění a nápomoc jejich vývoji (např. imobilizovat biomasu). [17]

3. Experimentální část

Cílem experimentu bylo zhodnotit funkčnost a použitelnost vybraných nanovlákných materiálů jako nosiče pro reálné použití v čistírnách odpadních vod, především se zaměřením se na nitrifikační bakterie (tj. zjistit, zda je možné selektovat pro tyto bakterie takový podklad, aby došlo k rychlejší kolonizaci nosiče). Výsledkem má být zhodnocení možnosti existence efektivnějšího odstranění dusíkatých látek (například amonných iontů) z odpadní vody pomocí nitrifikačních bakterií.

3.1. Použité metody

3.1.1. Přístroje a chemikálie použité k testování bioreaktoru

K testování byl využit laboratorní multimetr WTW inoLab Multi 9310 se sondou na měření pH a sondou na měření rozpuštěného kyslíku. Obsah rozpuštěných látek byl vyhodnocován pomocí kyvetových testů společnosti HACH na spektrofotometru UV-VIS DR6000 od téže firmy. V tomto experimentu byl také vyhodnocován obsah chemické spotřeby kyslíku (LCI 400), obsah dusitanů (LCK 341), dusičnanů (LCK 339), fosforečnanů (LCK 348) a amonných iontů (LCK 303). Pro vyhodnocení obsahu chemické spotřeby kyslíku byly využívány kyvetové testy CHSK obsahující 90% kyselinu sírovou. Kyvetový test na dusitany obsahoval kyselinu aminonaftalensulfonovou, sodnou sůl kyseliny aminonaftalensulfonové, dihydrát sodné soli kyseliny aminonaftalensulfonové a kyselinu citronovou. Kyvetový test na obsah dusičnanů obsahoval propanol, 60% kyselinu sírovou a 30% kyselinu fosforečnou. Kyvetový test na obsah fosforečnanů obsahoval peroxosíran disodný, 11% kyselinu sírovou a 16% kyselinu sírovou. Kyvetový test na amonné ionty obsahoval sodnou sůl kyseliny dichlorisokyanurové, dihydrát sodné soli kyseliny dichlorisokyanurové, hydroxid sodný a dihydrát pentakyanonitrosylželezitanu sodného. Pro stanovení sušiny byl používán filtr o maximální propustnosti 0,45 μm , laboratorní sušárna, laboratorní filtrační aparatura, pipeta, vývěva a laboratorní váhy Kern ABJ.

3.1.2. CHSK filtrovaná i nefiltrovaná

Koncentrace chemické spotřeby kyslíku byla měřena na čerstvém odtoku z bioreaktoru, který byl získán po jeho odtahu z reaktoru. Získání filtrovaného vzorku odtoku probíhá přefiltrováním čerstvého odtoku přes filtrační aparaturu s filtrem o maximální propustnosti 0,45 μm . Po přefiltrování se oba vzorky odtoku podrobí kyvetovému testu na CHSK (LCI 400), po kterém byla získána informace koncentraci CHSK filtrované a nefiltrované.

3.1.3. Stanovení sušiny

Stanovení sušiny se provádí pro zjištění koncentrace suspenze v kalu bioreaktoru. Nejprve bylo nutné odebrat homogenizovaný kal, který se bude filtrovat. Před samotným filtrováním bylo nutné si filtr zvážit na laboratorních vahách. Do filtrační aparatury byl filtr připevněn tak, aby kal protékal skrze něj. Homogenizovaný kal o objemu 10 ml byl napipetován do filtrační aparatury a až poté byla zapnuta vývěva. Jakmile byl všechn kal přefiltrován, tak byl filtr opatrně vyjmut z filtrační aparatury a následně vložen do laboratorní sušárny na 105 °C na 2 hodiny. Po vysušení filtru od tekutin byl filtr se sušinou opět zvážen na laboratorních vahách. Rozdílem hmotností filtru se sušinou a filtru samotného byla získána hmotnost sušiny, která se obecně uvádí v koncentraci g/l.

3.1.4. Metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato práce se zabývá nitrifikačními bakteriemi, což dále specifikuje dílčí kroky a použité chemikálie. Postup metody FISH pro nitrifikační bakterie zahrnuje tyto kroky:

a) Příprava biofilmu na fixaci

Po vytažení nerezové klece z bioreaktoru byla okamžitě odstřižena nosná vlákna s nanovláknem z PA6 a s nanovláknem z PU. Takto ustřižená nosná vlákna obsahovala na nanovlákně vrstvě biofilm, který byl spolu s nanovláknem pomocí pinzety odstraněn z nosných vláken a vložen do zkumavky eppendorf.

b) Fixace vzorku

Prvním krokem k charakterizaci bakterií pomocí metody FISH je jejich fixace. Fixace začíná smícháním 0,5 ml vzorku a 0,5 ml 4% paraformaldehydu (PFA) do zkumavky eppendorf. Takto vytvořený roztok je potřeba inkubovat v chladničce při 4 °C po dobu 3 hodin. Po inkubaci se vzorek několikrát promýval absolutním ethanolem s fosfátovým pufrům (PBS) v poměru 1:1. Vymývání je důležité pro odstranění PFA, který by také vykazoval fluorescenci. Tento proces byl proveden 3x, přičemž třetí dávka PBS s absolutním ethanolem se již nevytláčí. Takto zafixovaný vzorek je třeba uchovávat při -20 °C. [19]

c) Příprava vzorku na sklíčko

V tomto kroku bylo nejprve aplikováno 5–30 µl fixovaného vzorku podle jeho koncentrace na jednu ze šesti jamek na sklíčko. Vysušený vzorek byl převrstven 100 µl lysozymu o koncentraci 0,5 mg/ml. Sklíčko bylo necháno vysušit a poté vzorek důkladně omyt ledovým PBS. Opět necháno vysušit. Posledním krokem této fáze byla dehydratace

pomocí ethanolové řady o koncentracích 50 %, 80 % a 96 %, kde byla sklíčka máčena vždy po dobu 3 minut. V tuto chvíli byl vzorek připraven na hybridizaci. [19]

d) Hybridizace sondami

K identifikaci slouží právě sondy, které byly pipetovány do hybridizačních pufrů o přesných koncentracích formamidu. Nejprve bylo třeba připravit hybridizační pufr s 55 % formamidu pro sondu Nso 190 (pro rod *Spirillum*) na amonné ionty oxidující bakterie (AOB). Další sondou na AOB je Nso 1225 (pro rod *Nitrosomonas*) pro koncentraci formamidu 35 %. Pro dusitany oxidující bakterie (NOB) byly použity sondy Ntspa 662 (pro rod *Nitrospira*) a Ntspa 712 (pro rodinu bakterií *Nitrospirae*), které obě náleží hybridizačnímu pufru o koncentraci formamidu 35 %. Nyní jak na sklíčko pro identifikaci AOB, tak na sklíčko pro identifikaci NOB byly přidány ještě obecné sondy EUB 338 I, EUB 338 II a EUB 338 III pro hybridizační pufr o koncentraci formamidu 20 %. Pro každé aplikování sond s různými koncentracemi formamidu bylo nutné, aby byla dodržena doba 1,5 h na inkubaci ve zkumavce s tímtež hybridizačním pufrém, do kterého byla umístěna daná sonda, tentokrát ale byl aplikován pufr bez sondy. [19]

e) Promývání k odstranění nenačkaných sond

Před dokončením či před aplikací další sondy bylo nutné celé sklíčko vložit do pracího pufru, nechat 15 minut inkubovat, a poté ihned ponořit do ledové ultra čisté MQ vody na 2–3 sekundy. Prací pufrы jsou opět rozděleny podle toho, jakou koncentraci formamidu mají vymýt, tyto pufrы se liší pouze obsahem 5 molárního roztoku chloridu sodného a obsahem MQ vody. Zbytek látek přidávaných do pracích pufrů pro výše zmíněné koncentrace formamidu byly ve všech případech o stejném objemu. Takto promyté a zchlazené sklíčko se vzorky bylo třeba vysušit přiměřeným proudem dusíku, aby na sklíčku nezbyla pro následující kroky žádná vlhkost. V této fázi již bylo možné na vzorky aplikovat další sondy a celý předchozí postup opakovat, nebo celé sklíčko uložit do chladničky při 4 °C k následné dokumentaci. V případě dokončení procesu FISH bylo nutné sklíčko připravit k vyhodnocení převrstvením 7 µl Citifluoru na každou jamku se vzorkem. Pak už byly vzorky pouze překryty krycím sklíčkem, které pomocí bezbarvého laku na nehty bylo upevněno tak, aby zabránilo mechanickému poškození připravených vzorků či jejich nechtěnému posunu. Takto připravené vzorky je třeba uchovávat v chladničce. [19]

f) Vizualizace a dokumentace výsledků po FISH

Vzorky připravené a uchované v lednici je třeba co nejdříve zdokumentovat, protože dochází k degradaci fluorescenční vlastnosti navázaných sond na nukleovou kyselinu bakterií. K vizualizaci vzorků po FISH byl použit fluorescenční mikroskop Axio Imager.M2 vybavený příslušnými filtry (43 Cy3 a 44 FTIC) spolu s programem Axio vision při zvětšení 630x.

3.1.5. Metoda pozorování povrchu vláken pomocí optického mikroskopu

Pro tuto metodu byl použit optický mikroskop Olympus BX51M využívající čip digitální zrcadlovky Canon EOS 700D k zaznamenání snímaného vlákna s biofilmem při zvětšení objektivu 10x (celkové zvětšení tedy 100x). Pro složení jedné výsledné fotografie v programu QuickPHOTO MICRO 2.3 funkcí Deep Focus bylo třeba nafotit průměrně 80 fotografií daného místa, a to ve všech hloubkách ostrosti s co nejmenším krokem posuvu. Při snížené citlivosti čipu na ISO 800 a za zvýšeného přisvícení byly získány ty nejlepší složené snímky pro následné vyhodnocení.

Odstřižená nosná vlákna s nanovláknem a biofilmem bylo nutné nechat dostatečně oschnout, aby při osvětlení v mikroskopu nevznikaly odlesky. Vlákna byla pomocí izolepy uchycena na podložním sklíčku, které bylo důkladně očištěno pomocí buničiny a ethanolu. V této fázi již byla vlákna připravena k nasnímání a následnému složení.

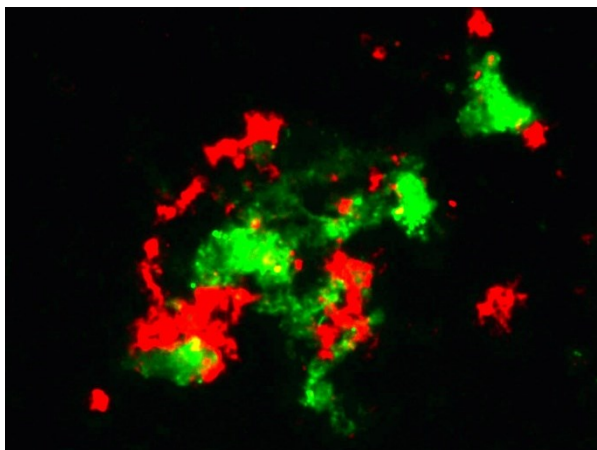
3.1.6. Metoda vyhodnocování snímků z FISH

Z proostřených snímků bylo třeba získat informace o množství nitrifikačních bakterií zastoupených ve vzorku biofilmu na daném typu nanovláknem. K vyhodnocení byl použit programový skript ve vývojovém prostředí Matlab. Autorkou tohoto skriptu je vedoucí této práce (Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.).

Tento skript využívá rozdělení snímku do jednotlivých barevných složek RGB. Každá samostatná vrstva RGB je tvořena 256 úrovněmi šedé, které jsou pomocí metody prahování (metoda Otsu) převedeny na bílou a černou. Tímto byl získán černobílý obraz. V každém binárním obraze jednotlivých vrstev RGB jsou vyhodnocovány počty objektů a také jejich plocha. Parametrem jsou jednotlivé pixely, či po přepočtu mikro-metry. V obraze nejsou hodnoceny objekty odpovídající šumu v obraze způsobeným překročením detekčního limitu mikroskopu, nebo objekty s velice nízkou intenzitou fluorescence (odpovídající dvojnásobku jasů pozadí).

Samotné vyhodnocení fotek tímto skriptem ukáže celkový počet buněk obarvených obecnými sondami EUB 338 (I, II a III) a NONEUB, které odpovídají zelené části obrazu, a sondami Ntspa 662, Ntspa 712, Nso 1225 a Nso 190, které odpovídají červené části

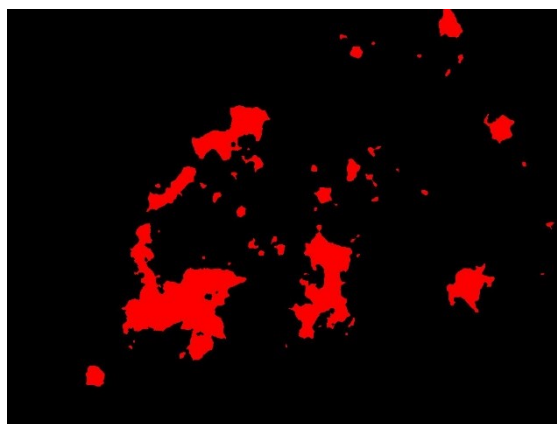
obrazu. Výsledek byl obdržen ve formě tabulky s počtem procentuálního zastoupení nitrifikačních bakterií.



Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3

Příklad fluorescenčního FISH snímku kalu s nitrifikačními bakteriemi (Obrázek 1). Rozklad obrazu na Green (Obrázek 2) a Red (Obrázek 3) složku.

3.1.7. Metoda vyhodnocování snímků z optického mikroskopu

Tato metoda vyhodnocuje průměrný přírůstek biofilmu během celého experimentu. K vyhodnocení byl použit programový skript ve vývojovém prostředí Matlab. Autorkou tohoto skriptu je vedoucí práce (Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.).

Aby bylo správně určené množství biofilmu, bylo třeba nejprve určit procentuální zastoupení samotného nosiče zaplněného i nezaplněného biofilmem na fotografii. To bylo opět provedeno metodou prahování, která si určí hodnotu jasu pro pozadí. Hodnoty vyšší, než tento práh zaujímá nosič s biofilmem. Tímto byl oddělen nosič s biofilmem od pozadí, ještě bylo třeba oddělit nosič s biofilmem od nosiče bez biofilmu. K tomu byla použita metoda segmentace, která využívá jednotlivých vrstev HSV. Pro selekci biofilmu bylo

využito saturace z HSV vrstvy obrazu. Saturace nad 40 % byla považována za biofilm (hodnota byla získána empiricky). [20]

Výstupem této metody je informace o plošném zaplnění nosiče biofilem. S těmito údaji jsou získány přesné informace o narůstajícím biofilmu v průběhu experimentu.



Obrázek 4



Obrázek 5



Obrázek 6



Obrázek 7

Příklad snímků z optické mikroskopie (vlevo). Identifikace biofilmu na nosiči (vpravo).

3.2. Set-up experimentu

3.2.1. Úvod k experimentu

Nejvhodnějším způsobem, jak v laboratoři otestovat nanomateriály způsobem co nejvíce příbuzným reálnému čištění odpadních vod, je takzvaný bioreaktor. Bioreaktor je vodotěsná válcová nádoba, ve které se v tomto případě vyskytují bakteriální směsi z již funkční čistírny, kde se nitrifikační bakterie skutečně vyskytují. Typ reaktoru, který je pro tuto práci využit, je reaktor s kombinovanou kultivací biomasy, kde nanovláknenný nosič je umístěn přímo do aktivační nádrže (reaktoru). Variantou se stal nosič, který je instalován napevno, tudíž se nepohybuje spolu s aktivační směsí, a je použita jemnobublinná aerace, což jej činí více odolným vůči negativním mechanickým vlivům na jeho nanovláknennou složku.

Velmi důležitou částí celého experimentu je samotná aktivační směs. V tomto případě se jedná o kal z již zaběhlé komunální čistírny odpadních vod z oddílu, kde se právě

nitrifikační bakterie využívají k čištění. Z těchto důvodů byl tento aktivovaný kal použit jako směsné inokulum, ze kterého lze nitrifikační bakterie využít.

3.2.2. Příprava reaktoru

Před samotným sestavením reaktoru bylo nutné zajistit co nejlépe stálost vnějších podmínek po celou dobu trvání experimentu. Vlhkost byla vzhledem k povaze experimentu zanedbatelná, pozornost tedy byla soustředěna na teplotu a tlak. Tlak byl okamžitý atmosférický. Nejnáročnějším parametrem byla tedy stálá teplota i přes velmi proměnlivé prostředí v období nastávajícího léta. Tento problém byl ale zdárně vyřešen samostatnou místností s klimatizací, což udržovalo stabilní teplotu (20 ± 1) °C.

Nejprve byla vybrána dostatečně velká 18l skleněná válcová nádoba pro nenáročnou manipulaci s vnitřním zařízením a dobrou přístupností pro pravidelné odběry na testování. Dále bylo třeba připojit kvalitní provzdušňování kvůli zajištění vhodných podmínek pro kultivaci aerobní bakteriální populace, a pro dostatečnou homogenizaci obsahu nádoby. Aby docházelo k provzdušňování reaktoru v celém jeho objemu, využil se plochý vzduchovací kámen připojený na aerátor SERA air 550 R plus, na kterém se nastavila optimální síla vzduchování (2–3 litry vzduchu na 1 litr objemu reaktoru za 1 hodinu).

Odtah přebytečné kapaliny z reaktoru byl realizován pomocí odsávání, a to připojením hadice na peristaltické čerpadlo Watson-Marlow. Cílem je zajistit konstantní objem média v reaktoru.

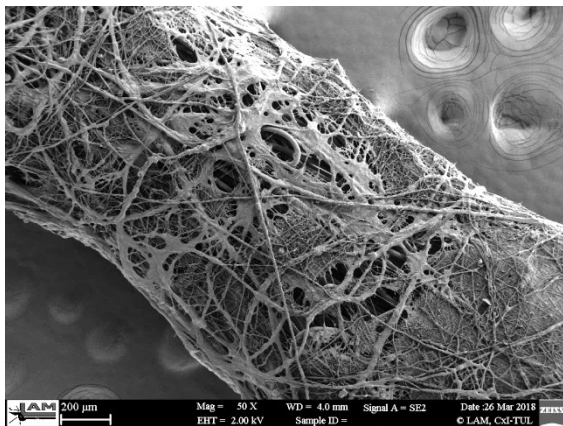
Poslední hadicový přívod do reaktoru doplňuje sedimentovaný kal vodou spolu s P-pufrem a chloridem amonným jako substrátem pro nitrifikační mikroorganismy. Toto médium skládající se z vody, P-pufru a NH_4Cl je pomocí peristaltického čerpadla Watson Marlow 323 vedeno do reaktoru.

Předposlední složkou k plně funkčnímu reaktoru je dodání bakteriální směsi – aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod. Na počátku byly přidány 4 l aktivační směsi z komunální ČOV vysoce zatěžované amoniakálním dusíkem. Užitečný objem aktivační směsi byl nastaven na 6 l. Reaktor byl provozován v režimu (Sequencing Batch Reactor) s periodou 12 hodin a dobou zdržení 1,5 dne.

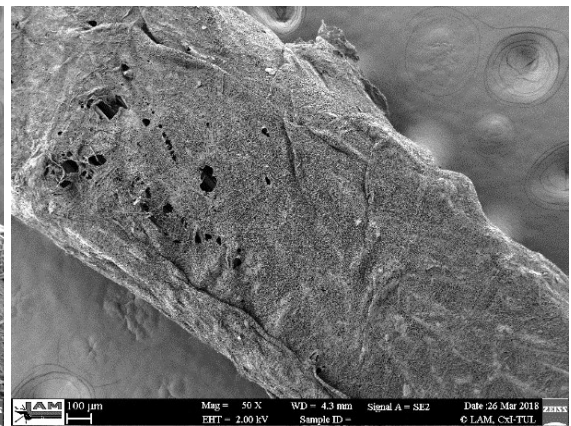
3.2.3. Popis použitých nosičů s nanovlákný

V experimentu byly použity dva druhy nanovláknenného nosiče lišící se především chemickým složením. Samotná nanovláknna byla zvlákněna na nosnou nit z polypropylenu o jemnosti 1200 dtex (jedná se o textilní jednotku označující gramy na 10 km), průměru

1 mm a s 3 % předimpregnátu firmy Nanoprogres. První typ nanovláken byl z polyuretanu Larithane 1083 s jemností 10 dtex o průměru nad 300 nm (Obrázek 8). Druhý typ nanovláken byl z polyamidu 6 s jemností 9 dtex a průměrem nad 400 nm (Obrázek 9). V obou případech šlo o jeden nános. Nanovláknna byla zvlákněna technikou střídavého zvláknňování na nosnou nit s předimpregnátem, který slouží jako spojující materiál mezi nosnou nití a nanovláknennou vrstvou. Předimpregnát je know-how firmy Nanoprogres, která tento systém uchycení nanovláken vyvíjí.



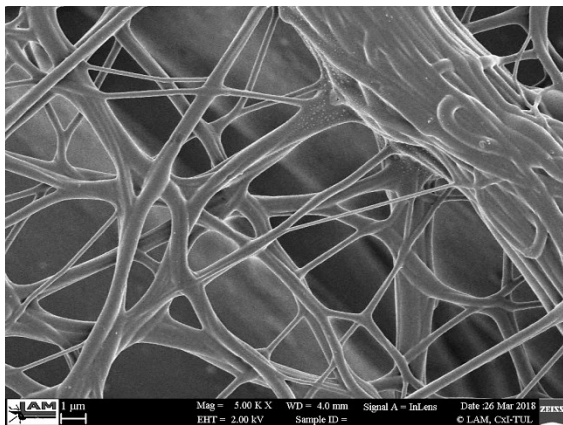
Obrázek 8



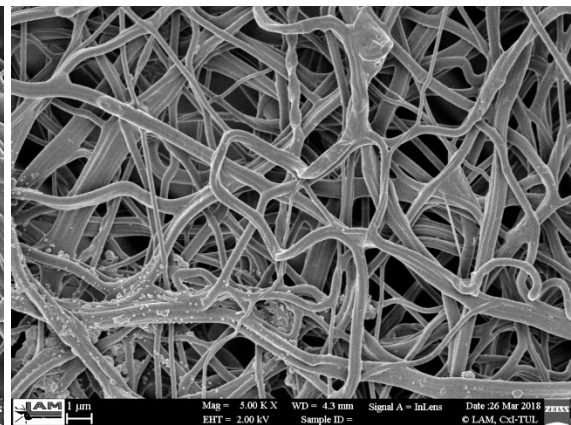
Obrázek 9

Obrázek 8. Nosné vlákno pokryté vrstvou polyuretanu o zvětšení 50x.

Obrázek 9. Nosné vlákno pokryté vrstvou polyamidu 6 o zvětšení 50x.



Obrázek 10



Obrázek 11

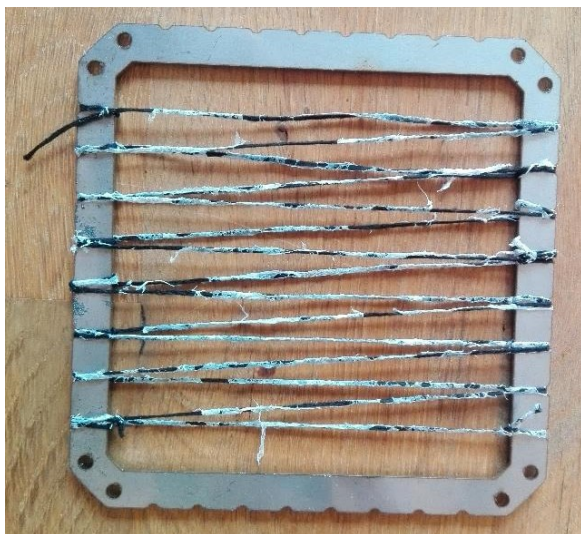
Obrázek 10. Hustota nanovláken polyuretanu při zvětšení 5000x.

Obrázek 11. Hustota nanovláken polyamidu 6 při zvětšení 5000x.

3.2.4. Příprava nosičů

Připravené nitě s nanovlákněným pokryvem bylo nutné upevnit tak, aby se nepohybovali (tzv. fixní lože). Byl zvolen klecový způsob uchycení. Vlákna byla uvázána přímo na nerezovou mříž tak, aby docházelo co nejméně k poškození nanovlákněné vrstvy. Na tyto mříže bylo třeba přivázat nosné nitě s nanovlákněnou úpravou povrchu (Obrázek 12). Samotné připevňování vláken bylo velmi náročné, protože i při sebemenším otěru vláken o sebe se z nich sdírala nanovlákněná vrstva. Bohužel pro tento typ reaktoru bylo nutné vlákna pevně uchytit, aby nedocházelo k jejich volnému pohybu, takže ztráta hustoty nanovlákněného pokryvu na vlákně nosném byla nevyhnutelná. Snaha se oděru vyvarovat byla zbytečná, jelikož k němu stejně docházelo i při velmi opatrné práci.

Jákmile byla všechna vlákna navázána na mřížích, bylo třeba k sobě mříže připevnit, aby byla zajištěna jejich stabilita v reaktoru. Na připevnění byla použita lněná nit spolu se zbytky hadiček na vymezení prostoru 2,5 cm mezi jednotlivými mřížemi. Tímto způsobem byl vytvořen celý nosný systém vláken, který v reaktoru tvoří fixní lože (Obrázek 13).



Obrázek 12

Obrázek 12. Navázaná vlákna na mříž.

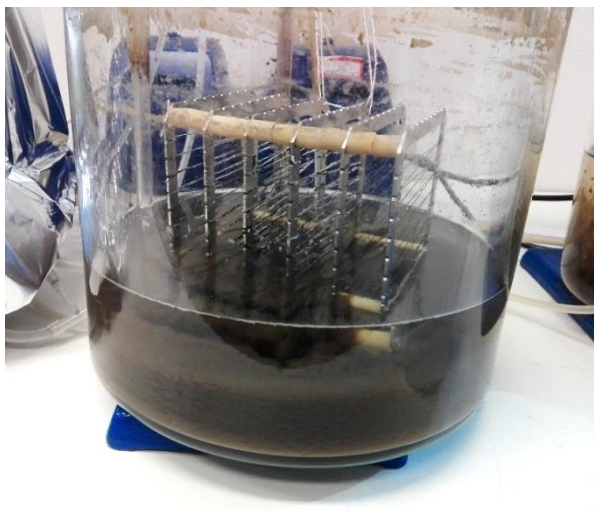


Obrázek 13

Obrázek 13. Dokončený nosný systém vláken.

3.2.5. Spuštění bioreaktoru

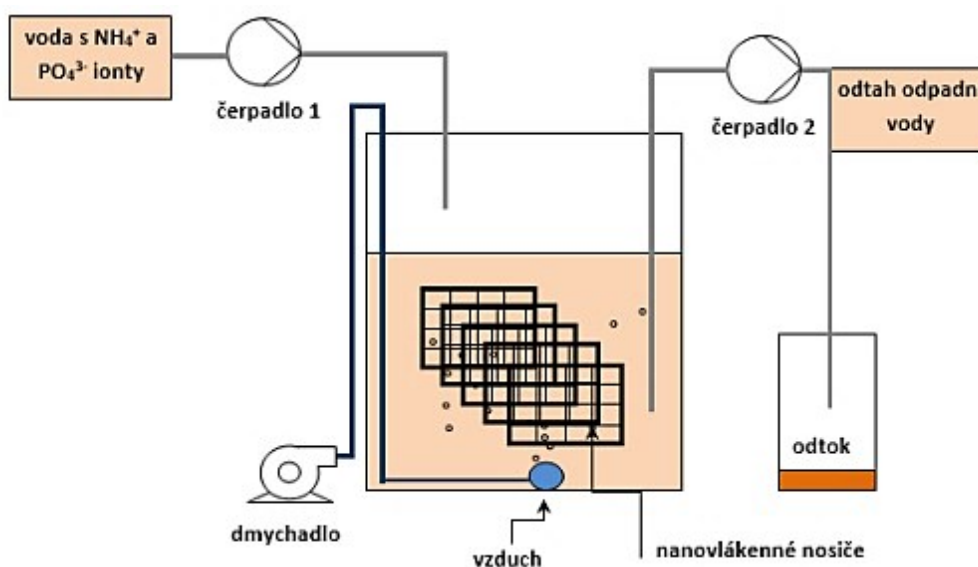
Nosič s vlákny byl položen přímo na vzduchovací kámen tak, aby byla zajištěna jeho maximální stabilita během cyklu reaktoru (Obrázek 14).



Obrázek 14
Obrázek 14. Nosič vložený do reaktoru.

3.2.6. Cyklus bioreaktoru

Ke správnému chodu bioreaktoru bylo potřeba vytvořit koloběh celého systému (Obrázek 15), aby byl zajištěn bezproblémový průběh experimentu. Reaktor popisovaný v tomto experimentu byl nastaven na 12h cyklus. Po dobu 11 hodin dochází ke stálé aeraci (provzdušňování). Poté se aerace vypne a 40 minut celá aktivační směs sedimentuje, tedy se odděluje kapalná a pevná fáze. Nakonec je z reaktoru odsávána kapalná složka po dobu 20 minut, aby se uvolnil objem reaktoru pro postupné doplňování média v dalších 11 hodinách.



Obrázek 15
Obrázek 15. Schéma prototypu laboratorního bioreaktoru s fixním ložem.

3.3. Testování průběhu experimentu

Bylo potřeba provést celou řadu testů ke správnému vyhodnocení stavu nosičů s nanovláknou, včetně hodnocení chodu reaktoru samotného. Vzhledem k pomalému růstu bakteriální populace (nitrifikační bakterie) byly vzorky z reaktoru odebírány vždy jednou týdně.

3.3.1. Odběr vzorků z bioreaktoru a nosiče s nanovláknou

Aby bylo možné otestovat reaktor s vlákny, a přitom nepřerušovat jeho chod, bylo třeba dělat odběry v určitém pořadí a fázi cyklu reaktoru. Největším zásahem do reaktoru je odběr nanovláken s biofilmem, tudíž se tímto odběrem začíná a provádí se za oné jedenáctihodinové aerace. Jelikož se musí vyzvednout celý nosič, tak není možné jej odebírat v době sedimentace a odtahu z reaktoru, protože by se celý proces sedimentace zrušil, kal by se rozvířil a odcházel z reaktoru spolu s kapalnou složkou. Vlákna je tedy třeba odebírat co nejdříve kvůli správnému načasování celého testování, tudíž v době aerace a před odtahem. Odběr vláken musí probíhat co nejrychleji, aby nedocházelo k jejich vysychání a tím k úbytku aktivního biofilmu.

Dalším krokem je změření pH a koncentrace kyslíku pomocí sond připojených na multimetr. Koncentrace kyslíku byla měřena především pro kontrolu stálosti podmínek experimentu. Kdežto měření pH sondou je velmi důležitým zdrojem informací o aktuální kondici bioreaktoru a efektivitě čistícího procesu.

Po změření koncentrace kyslíku a pH je třeba odebrat část suspendovaného kalu přímo z reaktoru kvůli zjištění koncentrace sušiny v gramech na jeden litr. Vzorek se odebírá také při aeraci pro zachování homogenity, čímž bylo zajištěno získání objektivních hodnot sušiny v reaktoru.

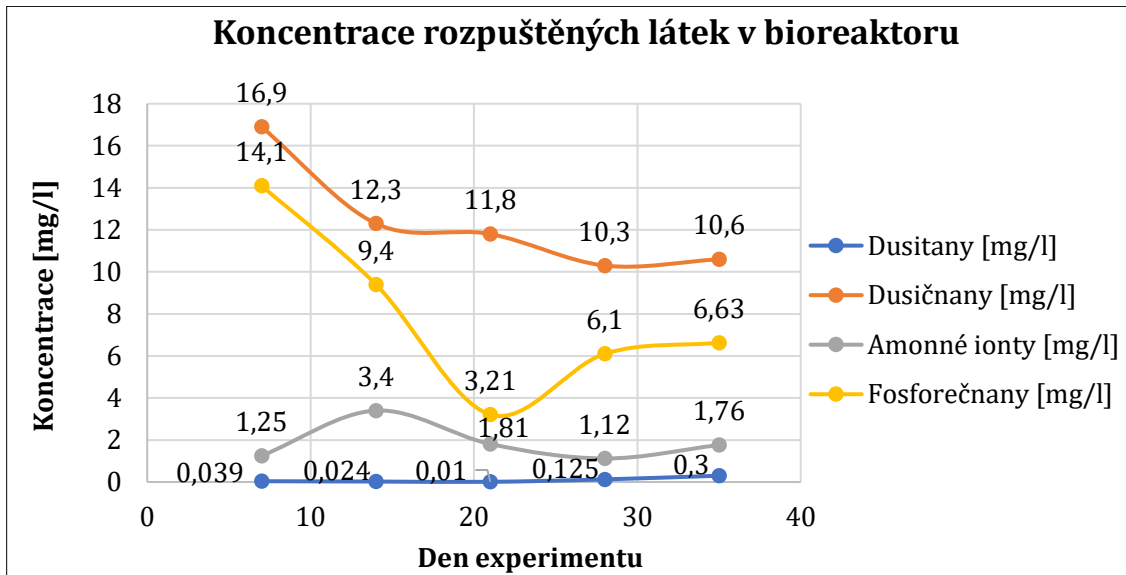
Následujícím krokem je odběr odtažené kapaliny z reaktoru po fázi sedimentace pro přesné změření koncentrace rozpuštěných látek, aby bylo možné zjistit, zda se nitrifikační bakterie opravdu vyskytují v reakční nádrži, a zda proces čištění reaktoru od amonných iontů funguje. Kapalná fáze se při sedimentaci dá odebrat přímo z reaktoru, ale pro zjednodušení celého procesu odběrů se před jejím odtažením vloží konec odvodné hadice do samostatné nádoby, tím je zajištěna časová variabilita pro přesnější plánování průběhu testování, protože už není třeba se řídit cyklem reaktoru.

4. Výsledky

4.1. Testování stavu reaktoru

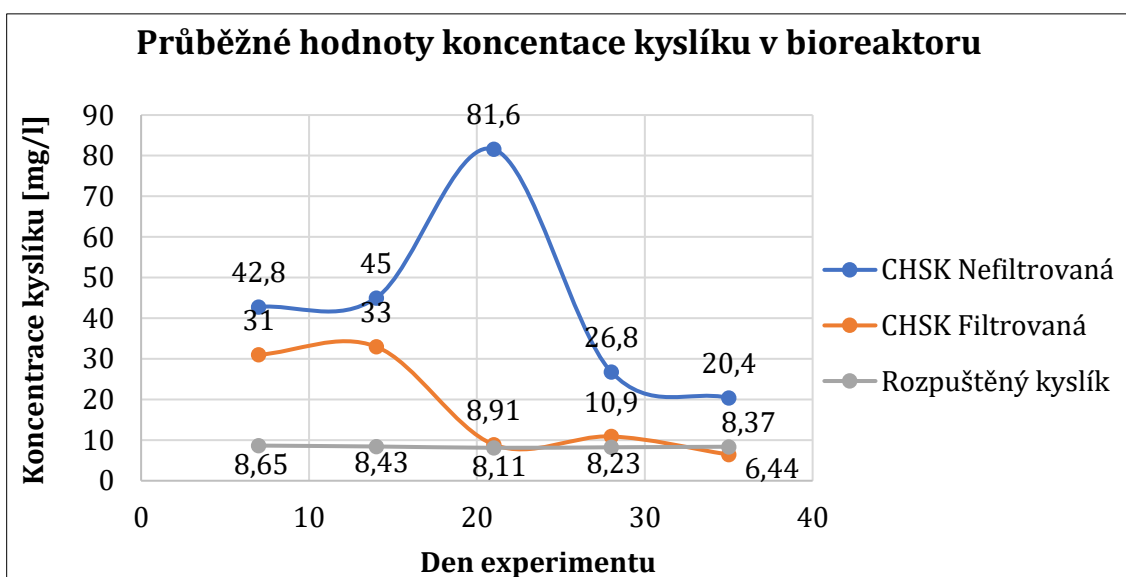
Stav bioreaktoru během experimentu lze vyčíst z následujících grafů.

Graf 1



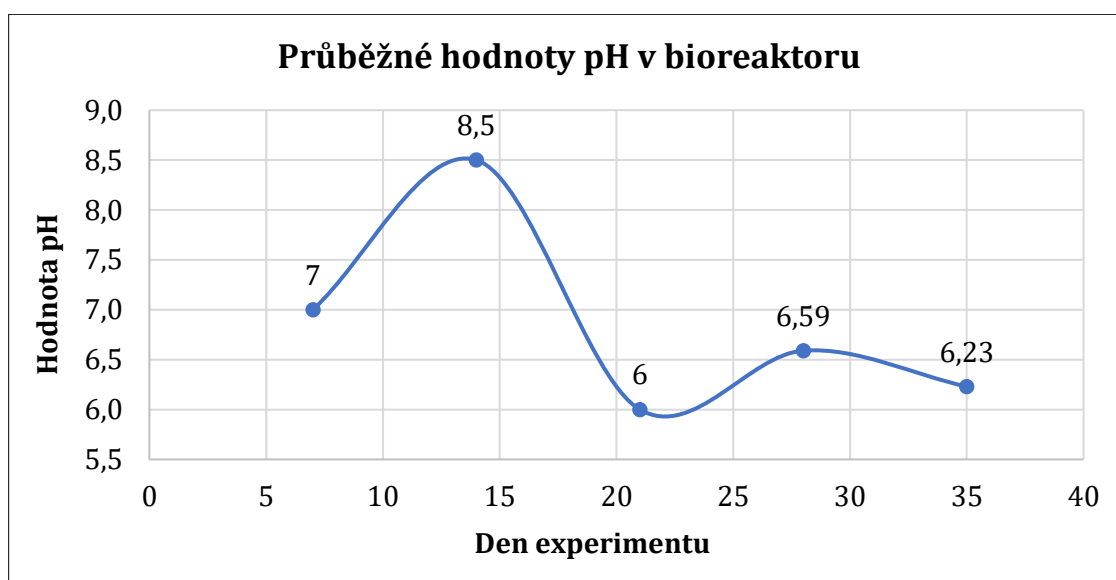
Graf 1 zobrazuje koncentraci dusitanů, dusičnanů, amonných iontů a fosforečnanů. Křivka průběžné koncentrace amonných iontů ukazuje jejich zbytkové koncentrace, tedy účinnost prvního stupně nitrifikace – činnost AOB jak v biomase reaktoru, tak o AOB bakteriích uchycených na nosiči. Křivka koncentrace dusitanů podává informaci o funkčnosti NOB bakterií. Křivka koncentrace dusičnanů podává informaci o konečném produktu NOB bakterií v bioreaktoru.

Graf 2



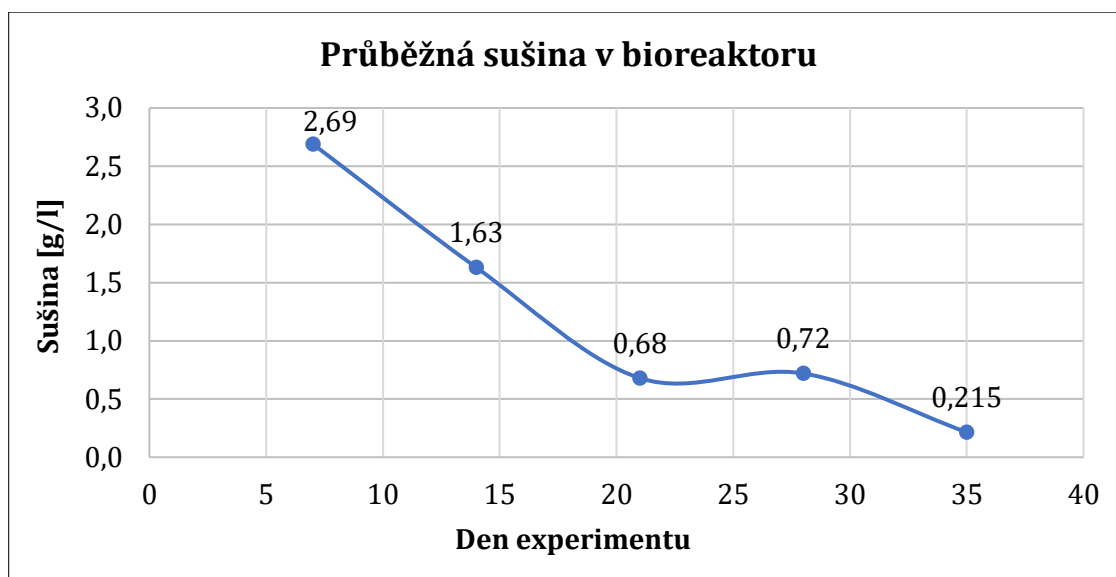
Graf 2 znázorňuje změnu různých ukazatelů. Křivka rozpuštěného kyslíku potvrzuje stálost vzduchování během cyklů reaktoru a při pravidelných odběrech. Křivka CHSK nefiltrovaná charakterizuje koncentraci organických látek jako chemickou spotřebu kyslíku na oxidaci jak biologických, tak nebiologických organických látek (rozpuštěných i nerozpuštěných). CHSK filtrovaná zahrnuje již pouze látky rozpuštěné, jelikož dochází k odfiltrování látek nerozpuštěných. Jak lze vidět v CHSK nefiltrované, tak od druhého ke třetímu odběru došlo k masivnímu nárůstu, který mohla způsobit rostoucí neusaditelná biomasa.

Graf 3



Graf 3 zobrazuje průběžné hodnoty pH za celou dobu průběhu tohoto experimentu. Kvůli nitrifikačním bakteriím je velmi důležité tuto hodnotu kontrolovat, protože může způsobit jejich odumírání.

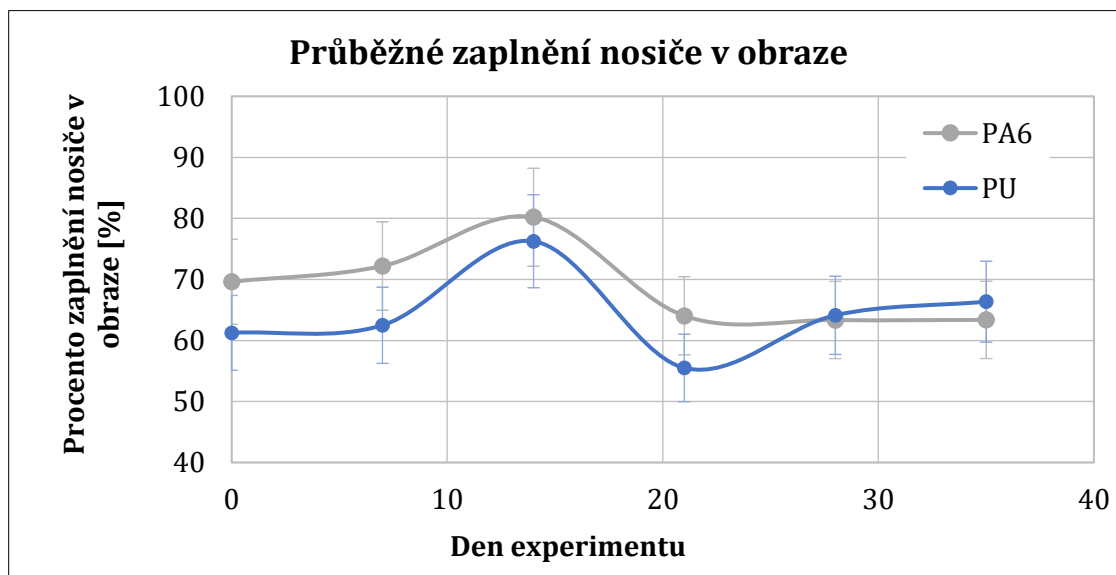
Graf 4



Graf 4 zobrazující průběžné hodnoty sušiny naznačuje, že během celého testování docházelo k úbytku sušiny v reaktoru, protože byl reaktor zatěžován pouze amoniakálním dusíkem jako substrátem pro nitrifikující mikroorganismy. Model reaktoru tak simuloval proces post-nitrifikace bez organického substrátu.

4.2. Výsledky z optické mikroskopie

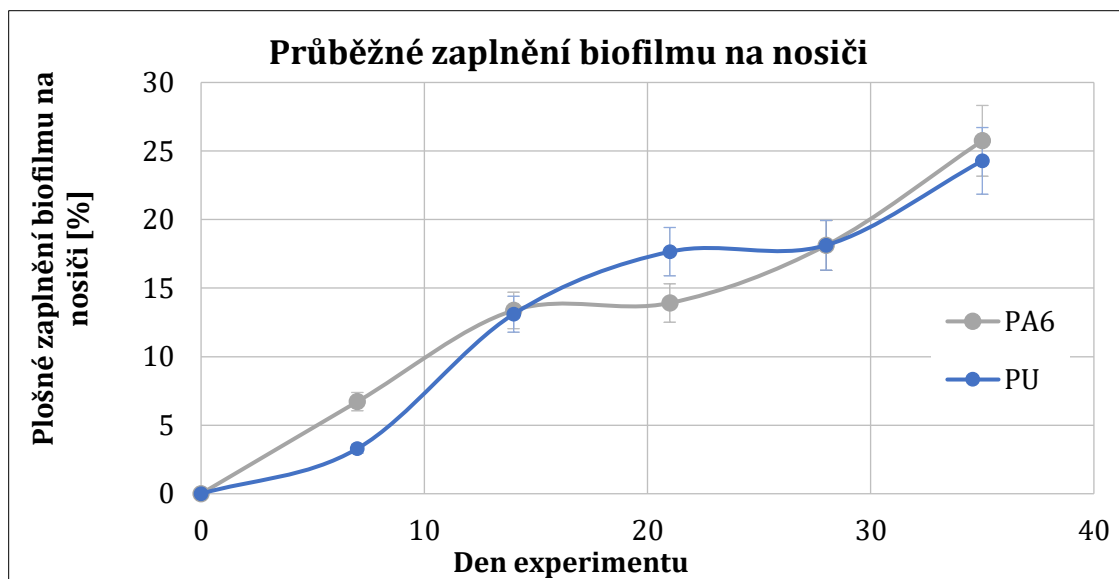
Graf 5



Graf 5 znázorňuje zastoupení nanovláknenného nosiče ve snímaném obraze. Jedná se o jednoduché hodnocení stavu nosiče (tj. zda například nedochází k rozplétání či úniku jednotlivých nití z vláken). Jelikož je zaplnění nosiče v obraze téměř konstantní, resp. není pozorován žádný trend, lze hovořit o tom, že struktura nosiče (resp. průměr) byl

v průběhu experimentu stálý. Odchýlené hodnoty ve 14.den den testu může být chyba měření.

Graf 6



Graf 6 poukazuje na růst biofilmu (nitrifikačních bakterií) na nanovlákněném nosiči. Velice shodný trend růstu biofilmu na obou nosičích poukazuje na vhodnost aplikace nanovláken v daném směru. Nicméně je nutné podotknout, že při této analýze se jedná o celkový biofilm (tj. bez rozlišení o jaké bakterie se jedná).

Následující obrázky porovnávají zaplnění nosiče biofilmem pro 0. a 5. odběr u obou typů nanovláken.



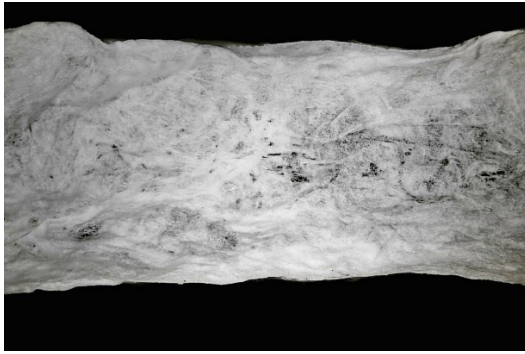
Obrázek 16

Obrázek 16: Čistý nosič s nanovlákný z PU.



Obrázek 17

Obrázek 17: Nosič s vlákny z PU při 5. odběru.



Obrázek 18



Obrázek 19

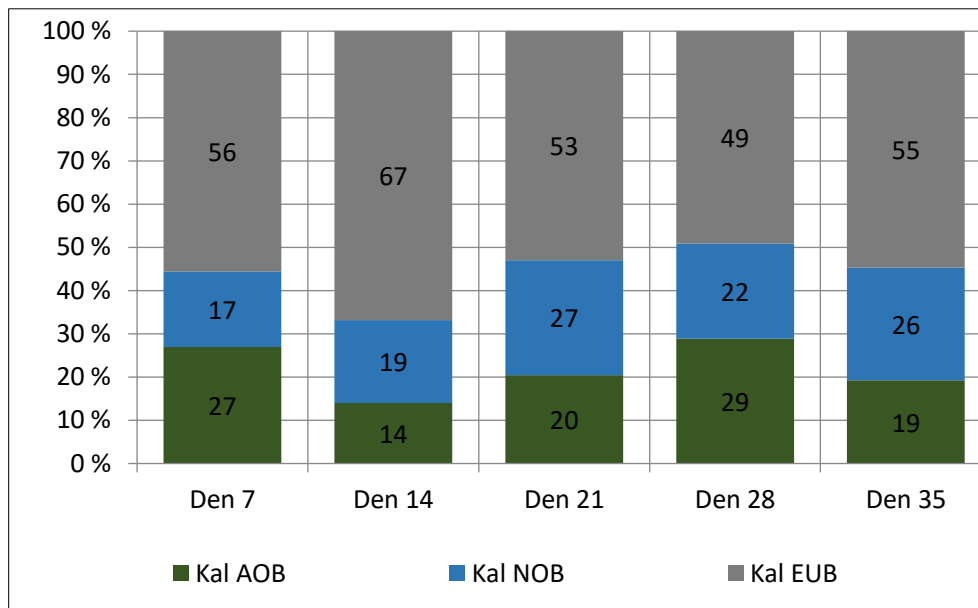
Obrázek 18: Čistý nosič s nanovláknky z PA6.

Obrázek 19: Nosič s vlákny z PA6 při 5. odběru.

4.3. Zastoupení bakteriálních populací metodou FISH

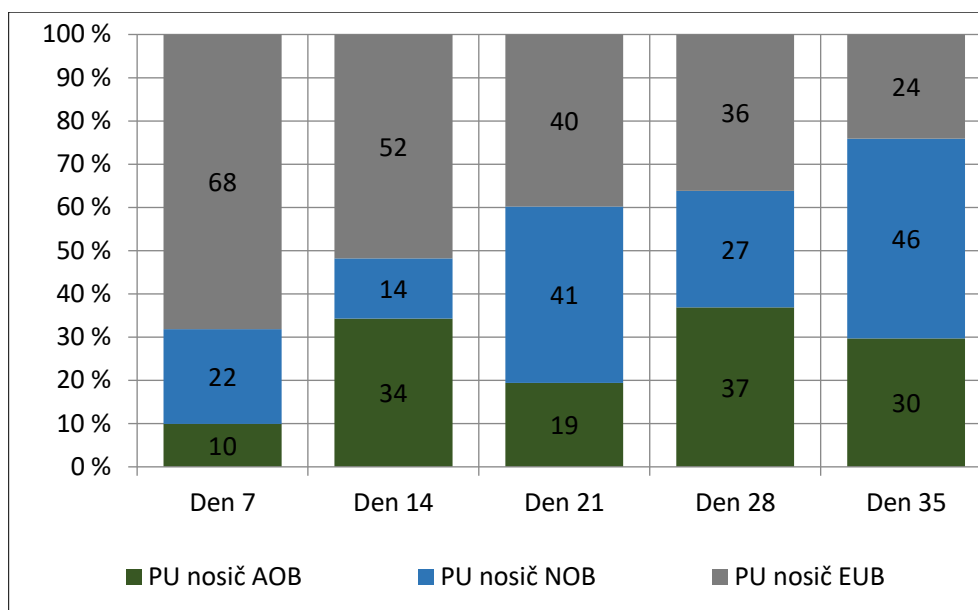
Grafy zastoupení bakteriálních populací metodou FISH, jež jsou uvedeny níže, mohou ukázat procentuální zastoupení specifických bakterií (tj. AOB, NOB) nebo ostatních bakterií (jako EUB). Chyba měření byla pro následující výsledky max. 10 %.

Graf 7



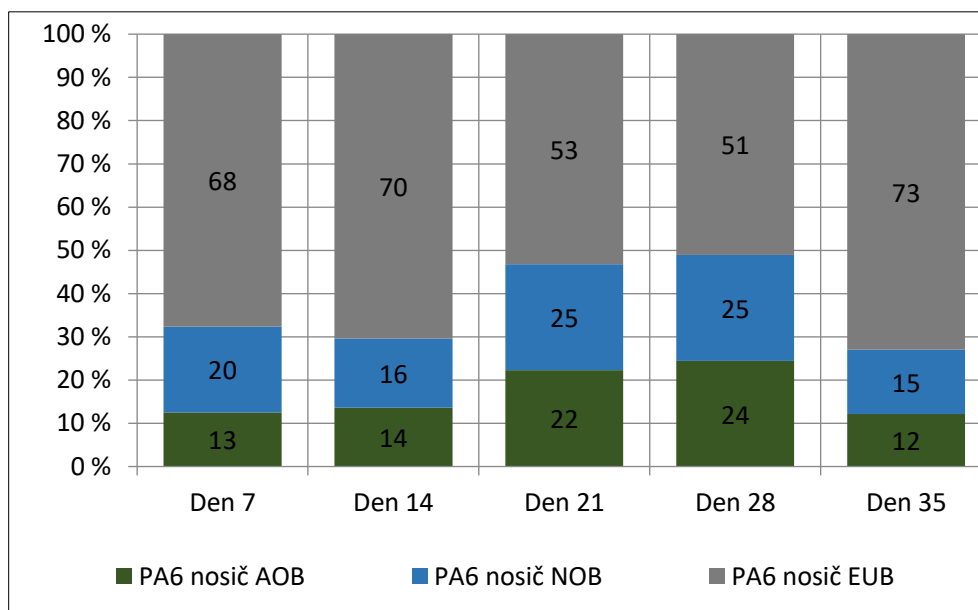
Graf 7 dokládá zastoupení nitrifikačních bakterií v kalu. Mírný rozkmit hodnot v jednotlivých odběrech (dnech) může odrážet jistou bakteriální nerovnováhu v bioreaktoru.

Graf 8



Graf 8 potvrzuje úbytek EUB bakterií a podává informaci o složení bakterií vyskytujících se na nanovlákněném nosiči z PU. Vyšší podíl zaujímají dusitany oxidující bakterie (NOB), i když při druhém odběru došlo k jisté odchylce.

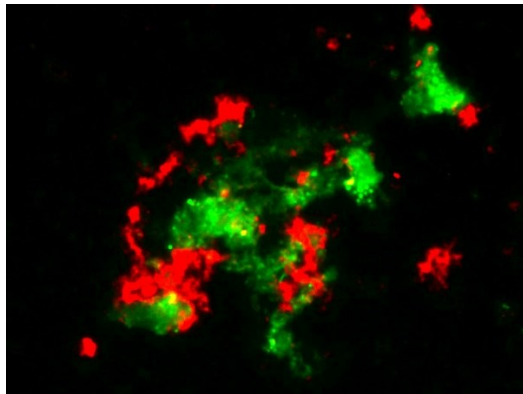
Graf 9



Graf 9 se týká nanovlákněného nosiče z PA6, na němž se prokazatelně zadržovalo větší množství EUB bakterií; bakterie oxidující amonné ionty i dusitany byly v téměř stejném poměru. Na nosiči PA6 se vyskytovalo více EUB bakterií, než bylo přítomno v kalu (Graf 7), což může naznačovat, že nosič PA6 není pro nitrifikační bakterie příliš vhodný.

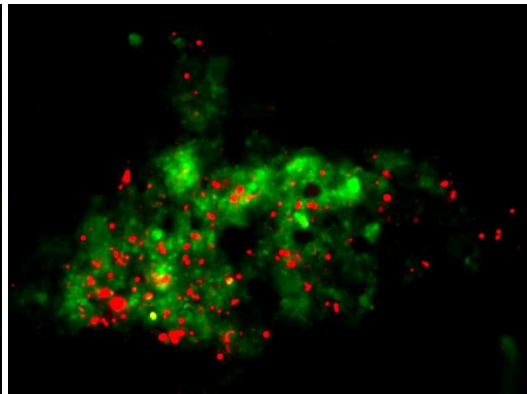
Z výsledků optické mikroskopie (které dokládají shodné zastoupení biomasy na nosiči PA6 i PU) pak byl vyvozen závěr, že biomasa na nosičích PA6 a PU je shodná, ale zastoupení nitrifikačních bakterií je zcela jiné.

V následujících obrázcích z fluorescenční mikroskopie lze vidět FISH vzorky AOB i NOB bakterií zastoupených na obou typech vláken a v kalu reaktoru. Ve všech případech se jedná o 5. odběr.



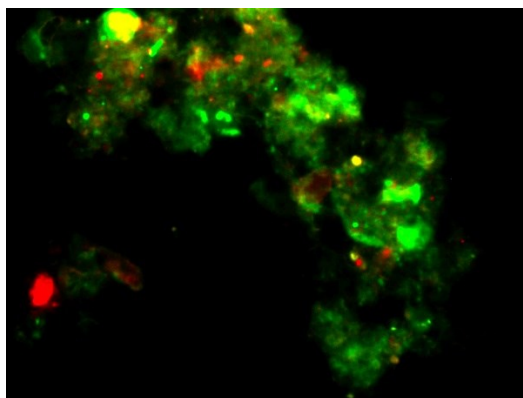
Obrázek 20

Obrázek 20: Obarvení AOB bakterií na nosiči s PU nanovláknny.



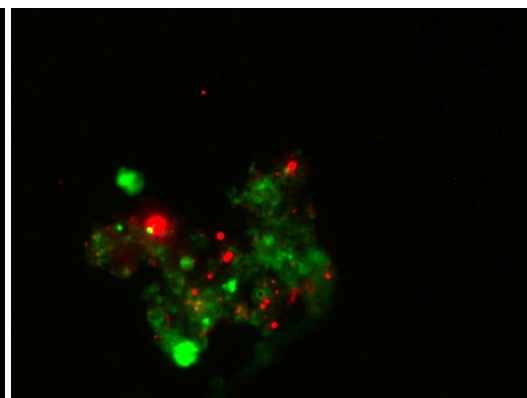
Obrázek 21

Obrázek 21: Obarvení NOB bakterií na nosiči s PU nanovláknny.



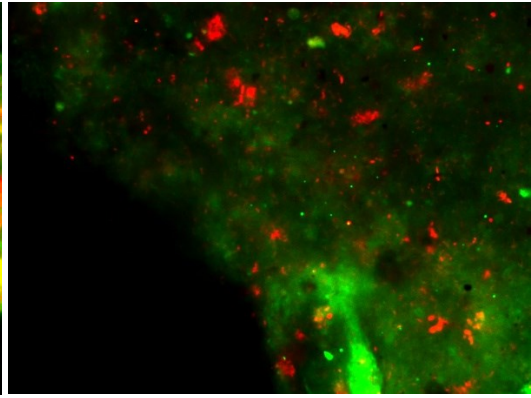
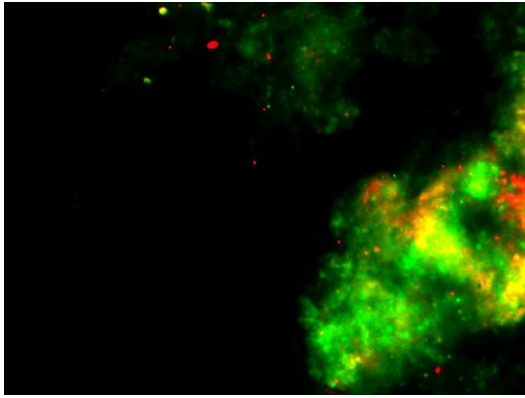
Obrázek 22

Obrázek 22: Obarvení AOB bakterií na nosiči s PA6 nanovláknny.



Obrázek 23

Obrázek 23: Obarvení NOB bakterií na nosiči s PA6 nanovláknny.



Obrázek 24

Obrázek 25

Obrázek 20: Obarvení AOB bakterií z kalu v bioreaktoru.

Obrázek 21: Obarvení NOB bakterií z kalu v bioreaktoru.

5. Vyhodnocení výsledků

5.1. Bioreaktor

Velmi zajímavou částí z dat získaných z bioreaktoru bylo období od 2. do 4. odběru. Lze zde vidět výchyly téměř ve všech křivkách, až na rozpuštěný kyslík (Graf 1) a koncentraci amonných iontů (Graf 2), protože tyto veličiny byly doplňovány externími zdroji tak, aby jejich přísun byl stabilní. Tento jev byl s největší pravděpodobností zapříčiněn nekontrolovatelným přemnožením nítěnkovitých vodních červů z čeledi máloštětinatců, kteří se živí aktivovaným kalem i s bakteriemi, což velmi ovlivnilo celkový stav v reaktoru. Jelikož je jejich potravou veškerá biomasa reaktoru, tak lze vidět (Graf 4) velmi rychle se snižující koncentraci sušiny (při 5. odběru byl reaktor téměř bez kalu). [21] Nejvýraznější změny v trendu křivek si lze všimnout u CHSK, kde je nepochybně nárůst u nefiltrované CHSK, což opět odpovídá přemnožení organické hmoty (opět se jedná s největší pravděpodobností o vodní červy).

U 4. a 5. odběru jsou již opět viditelné ustálenější hodnoty ukazatelů stavu rozpuštěných látek v bioreaktoru. Hlavní podíl na této změně má nedostatečné množství živin (kalu), které mělo za následek radikální úbytek vodních červů.

Jak si lze všimnout, funkčnost AOB a NOB bakterií byla v pořádku, protože stále docházelo k oxidačním procesům, což dokládají hodnoty prakticky nulové koncentrace dusitanů a koncentrace dusičnanů odpovídající oxidovaným amonným iontům.

5.2. Optická mikroskopie vzorků vláken s biofilmem

Obrázek 8 poukazuje na rozdíly mezi nanosenými nanovláknými vrstvami PU a PA6. Vrstva PU je již na první pohled oproti PA6 velmi nehomogenní a celkově „nekvalitně zpracovaná“. Obrázek 10 zobrazuje poréznost obou materiálů, kde PA6 má mnohem větší zahuštění vlákny bez výrazně splených částí.

Růst biofilmu byl vzhledem k událostem v reaktoru ovlivněn také, což se promítlo na rychlosti růstu u PA6 nosiče od 2. do 3. odběru, a u PU nosiče od 3. do 4. odběru (Graf 6). Od 4. odběru biofilm opět zvyšoval svůj podíl na ploše nosičů. Za 35 dní pokrýval u PU nanovlákného nosiče přes 24 % jeho plochy, a u PA6 nanovlákného nosiče téměř 26 % jeho plochy (odchylka měření byla 10 %). Oba nosiče jsou v tomto směru srovnatelné. Lze tedy s jistotou říci, že oba nanovlákné nosiče podporují rychlý růst biofilmu i za přítomnosti vodních červů, kteří celý proces velice komplikují.

5.3. Fluorescenční mikroskopie vzorků FISH

Výsledky z FISH analýzy aktivovaného kalu reaktoru potvrzují fakt, že vstupní aktivovaný kal pocházel z čistírny odpadních vod z oblasti, kde byla hojnost nitrifikačních bakterií. AOB (27 %) a NOB (17 %). Průměrně se jejich podíl AOB a NOB pohyboval kolem 44 % z celkového zastoupení bakterií v bioreaktoru. Od 2. do 4. odběru docházelo k úbytku všeobecných EUB bakterií za zvyšujícího se procentuálního zastoupení nitrifikačních bakterií.

Nanovlákná vrstva PA6 vykazuje velmi dobrou afinitu k všeobecným bakteriím, což lze porovnat i s výsledky bakteriálního složení kalu. Na této nanovlákné vrstvě docházelo taktéž k výraznému napadení vodním červem, což ale vzhledem ke zpracování této vrstvy nečinilo zásadní problém. Jakmile již nebyli vodní červy aktivní, došlo k velmi rychlé obnově složení biofilmu na tomto nosiči podle původního trendu.

Velmi dobrých hodnot podílu nitrifikačních bakterií bylo na nanovlákné vrstvě PU, která ačkoli měla znatelně horší technické zpracování, tak projevila vysokou míru podpory růstu těchto bakterií. Zajímavé také je, že v průběhu experimentu docházelo na tomto typu nosiče k neustálému snižování podílu všeobecných bakterií, a již od třetího odběru tudíž k zásadní převaze procentuálního zastoupení nitrifikačních bakterií, což bylo cílem předkládané práce.

5.4. Diskuse dosažených výsledků s odbornou literaturou

Polypropylen použitý v této práci jako nosné vlákno pro samotný nanovlákný povrch je ověřeným materiálem pro aplikaci v biotechnologiích na nosiče bakteriálních populací při čištění odpadních vod. Aplikace tohoto materiálu jako nosného systému pro další vrstvy vláken stejně jako v této práci je velmi častá vzhledem k udržení jeho standartních vlastností během experimentu odvíjejících se od způsobu výroby. Sám o sobě je tedy výborným univerzálním nosičem bakteriálních populací závisících pouze na složení biomasy (na rozdíl od polyesteru, který je výrazně horším nosičem). V případě jeho použití jako nosného systému pro vlákné vrstvy z různých materiálů nezpůsobuje zkreslení výsledků, a naopak výrazně napomáhá při imobilizaci biomasy, což zejména v experimentu této práce bylo velkou výhodou. [15, 18]

Další důležitou složkou je efektivita zvolených materiálů vzhledem k povaze experimentu. V experimentu z literatury [5] týkajícího se použití namotaných materiálů z aktivovaných uhlíkových vláken, polyvinylalkoholových vláken a z křemíkových vláken na polypropylenový nosič, který měl podpořit růst biofilmu methanogenních bakterií, se ukázalo, že stejně jako v tomto experimentu je velmi důležité správně zvolit vstupní

směs bakterií, která bude nosiče kolonizovat. Schopnost lépe imobilizovat biomasu se ukázala jako neméně důležitou. V jejich případě byl nejlepší nosič z aktivovaných uhlíkových vláken, který velmi dobře udržoval a podporoval dominantní mikroflóru methanogenních bakterií. Vlákná z polyvinylalkoholu a z křemíku jim nevykazovala žádnou zlepšenou schopnost podpořit růst těchto methanogenních bakterií. [5]

V experimentální části této práce byla zvolena vlákna z polyamidu 6 a polyuretanu, která mají velmi dobré předpoklady pro dobrý růst bakteriálních populací. Vlákná obsahující uhlík mají totiž dle literatury větší tendenci k podpoře růstu biofilmu. Rozdíl mezi jejich efektivitou na růst nitrifikačních bakterií byl však velmi znatelný. Polyamid 6 se choval jako velmi efektivní imobilizátor biomasy, a stejně tak dobře podporoval v růstu všechny bakterie bez rozdílu. Nanovláknenná vrstva z polyuretanu však svou schopností preferenčního růstu nitrifikačních bakterií polyamid 6 výrazně předčila. Polyuretan je tedy výborným materiálem pro nosič nitrifikačních bakterií.

6. Závěr

Ačkoliv v reaktoru došlo ke zhoršeným podmínkám (způsobené výskytem a přemnožením vodního červa rodu nítěnkovitých), bylo to paradoxně nakonec ve prospěch ověření testu nanovláknenných nosičů. V reaktoru došlo k razantnímu úbytku kalu, ale navzdory tomu stále docházelo k růstu bakteriálních populací na nosičích a díky tomu byl získán velice dobrý náhled do situace, která může v reálných podmínkách skutečně nastat. Proces oxidace amonných iontů byl i za této situace stále aktivní, což byl jeden z důležitých ukazatelů existence nitrifikačních bakterií v bioreaktoru. Nanovláknenná vrstva zde působila ve velké míře i jako prostředek k ochraně bakterií před jejich predátory. Díky těmto podmínkám bylo také nakonec možné identifikovat materiál, který bude pro nitrifikační bakterie vhodnější (umožní rychlejší nebo i stabilnější kolonizaci).

Vhodnějším nanovláknenným materiálem pro nosič nitrifikačních bakterií byl polyuretan. Ačkoli měl výrazně horší homogenitu nánosu nežli polyamid 6, nejpodstatnějším ukazatelem bylo vysoké procentuální zastoupení nitrifikačních bakterií v biofilmu. Nejslabší stránkou těchto vláken je však jejich mechanická odolnost, protože již při lehkém dotyku dochází k odstraňování nanovláknenné vrstvy. Přestože je metoda přípravy nanovláknenných nosičů pomocí předimpregnáty levná, není ještě zdaleka ve finální fázi svého vývoje. Současný stav dodávaných vláken nemá dostatečnou odolnost (např. vůči ruční instalaci na fixní lože), což má za následek snížení hustoty pokrytí nanovláken na vlákně nosném.

V této práci byla hodnocena použitelnost vybraných nanovláknenných materiálů (PUR a PA6) jako nosiče pro reálné použití v čistírnách odpadních vod, a to pro kolonizaci nitrifikačními bakteriemi. Bylo zjištěno, že je možné selektovat pro tento typ bakterií takový podklad, aby došlo k rychlejší kolonizaci nosiče a k tvorbě stabilního a vysoce aktivního biofilmu. Finálně pak (jakmile se vyřeší technické zpracování vláken) bude možné takový nosič použít pro efektivnější odstraňování dusíkatých látek (například amonných iontů) z odpadní vody, jelikož tím bude docíleno zvýšení biomasy nitrifikačních bakterií na jejich povrchu.

Použitá literatura

- [1] Wastewater: An untapped resource. World water development report 2017. [online]. [cit. 27.3.2018]. Dostupné z: <http://www.unwater.org/publications/world-water-development-report-2017/#>
- [2] PESCOD, M. B., 1992. *Wastewater treatment and use in agriculture*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO irrigation and drainage paper, 47. ISBN 978-92-5-103135-3.
- [3] DOHÁNYOS, Michal, Nina STRNADOVÁ a Jan KOLLER, 1998. *Čištění odpadních vod*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-80-7080-316-5.
- [4] SVOBODOVÁ (Křiklavová, Lucie & Lederer, Tomas. (2011). A review study of nanofiber technology for wastewater treatment. NANOCON 2011 - Conference Proceedings, 3rd International Conference. [online]. [cit. 27.3.2018]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/264885983_A_review_study_of_nanofiber_technology_for_wastewater_treatment
- [5] GONG, Wei-jia, Heng LIANG, Wen-zhe LI a Zhen-zhen WANG, 2011. Selection and evaluation of biofilm carrier in anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Energy* [online]. 36(5), 3572–3578. ISSN 03605442. Dostupné z: doi:10.1016/j.energy.2011.03.068
- [6] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ, 2012. *Rizika nanomateriálů*. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-3201-4.
- [7] VISWANATH, Buddolla a Sanghyo KIM, 2016. Influence of Nanotoxicity on Human Health and Environment: The Alternative Strategies. In: Pim DE VOOGT, ed. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 242* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 61–104 [vid. 2018-03-27]. ISBN 978-3-319-51242-6. Dostupné z: doi:10.1007/398_2016_12
- [8] HOOVER, Mark, et al. *Radiation Safety Aspects of Nanotechnology*. Los Alamos National Laboratory (LANL), 2017.
- [9] HOLOUBEK, Ivan, *Chemie životního prostředí III – Hydrosféra*. [online]. [cit. 2.4.2018]. Dostupné z: <http://www.recetox.muni.cz/res/file/prednasky/holoubek/chzp-iii/chzp-iii-hydrosfera-03-sedimenty.pdf>

- [10] PHYS.ORG. Novel natural nanomaterial spins off from spider-mite genome sequencing. 2013. [online]. Miodrag Grbic, 2011. [cit. 2.4.2018]. Dostupné z: <https://phys.org/news/2013-05-natural-nanomaterial-spider-mite-genome-sequencing.html>
- [11] HSIUNG, Bor-Kai, Radwanul Hasan SIDDIQUE, Lijia JIANG, Ying LIU, Yongfeng LU, Matthew D. SHAWKEY a Todd A. BLACKLEDGE, 2017. Tarantula-Inspired Noniridescent Photonics with Long-Range Order. *Advanced Optical Materials* [online]. 5(2), 1600599. ISSN 21951071. Dostupné z: doi:10.1002/adom.201600599
- [12] HORVÁTH, Lenke, Arnaud MAGREZ, Beat SCHWALLER a László FORRÓ, 2011. Toxicity Study of Nanofibers. In: Jasminka BRNJAS-KRALJEVIĆ a Greta PIFAT-MRZLJAK, ed. *Supramolecular Structure and Function 10* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, s. 133–149 [vid. 2018-04-09]. ISBN 978-94-007-0892-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-0893-8_9
- [13] BRAR, Satinder Kaur a ENVIRONMENTAL COUNCIL (ENVIRONMENTAL AND WATER RESOURCES INSTITUTE), ed., 2015. *Nanomaterials in the environment*. Reston, Virginia: American Society of Civil Engineers. ISBN 978-0-7844-1408-8.
- [14] RACLAVSKÁ, Helena. *Technologie zpracování a využití kalů z ČOV*. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 2007. ISBN 978-80-248-1600-5.
- [15] JURECSKA, Laura, Katalin BARKÁCS, Éva KISS, Gergő GYULAI, Tamás FELFÖLDI, Balázs TÖRŐ, Róbert KOVÁCS a Gyula ZÁRAY, 2013. Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers. *Microchemical Journal* [online]. 107, 108–114. ISSN 0026265X. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2012.05.028
- [16] NAGHDI, Mitra, Maximiliano CLEDON, Satinder Kaur BRAR a Antonio Avalos RAMIREZ, 2017. Nitrification of vegetable waste using nitrifying bacteria. *Ecological Engineering* [online]. [vid. 2018-05-03]. ISSN 09258574. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoleng.2017.07.003
- [17] CORREA, Camila Zoe, Kátia Valéria Marques Cardoso PRATES, Edson Fontes DE OLIVEIRA, Deize Dias LOPES a Ana Cláudia BARANA, 2018. Nitrification/denitrification of real municipal wastewater in an intermittently aerated structured bed reactor. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 23, 134–141. ISSN 22147144. Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2018.03.013

[18] FELFÖLDI, Tamás, Laura JURECSKA, Balázs VAJNA, Katalin BARKÁCS, Judit MAKK, Gábor CEBE, Attila SZABÓ, Gyula ZÁRAY a Károly MÁRIALIGETI, 2015. Texture and type of polymer fiber carrier determine bacterial colonization and biofilm properties in wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal* [online]. 264, 824–834. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.12.008

[19] LIEHR, Thomas, ed., 2010. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): application guide*. Berlin: Springer. Springer protocols. ISBN 978-3-540-70581-9.

[20] KŘIKLAVOVÁ, Lucie. *Vývoj nanovláknenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur: Development of nanofiber carrier for hybrid bioreactors with immobilized biomass and using image analysis for biofilm structures evaluation [CD-ROM]*. Liberec: Technická univerzita v Liberci, 2013.

[21] BRINKHURST, Ralph O., 1986. *Guide to the freshwater aquatic microdrile oligochaetes of North America*. Ottawa: Dept. of Fisheries and Oceans. Canadian special publication of fisheries and aquatic sciences, 84. ISBN 978-0-660-11924-3.