

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Vliv koncentrace kyslíku na zastoupení nitritačních
a nitratačních bakterií v aktivovaném kalu.

Diplomová práce

Autor práce: Vojtěch Mráz

Vedoucí práce: Ing. Pavel Švehla, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv koncentrace kyslíku na zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií v aktivovaném kalu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

Poděkování

Rád bych touto cestou velmi rád poděkoval mému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Pavlu Švehlovi, Ph.D. za odborné vedení práce a za čas, který se mnou nad diplomovou prací ochotně trávil. Také bych chtěl dále poděkovat paní Ing. Heleně Radechovské za vedení a výpomoc v laboratoři při získávání dat pro účely pokusu pro tuto diplomovou práci.

Vliv koncentrace kyslíku na zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií v aktivovaném kalu

Souhrn

Tato diplomová práce je zaměřena na posouzení průběhu nitrifikace v čištěné kalové vodě s vysokou koncentrací amoniakálního dusíku v závislosti na koncentraci rozpuštěného kyslíku.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku je jeden z hlavních činitelů ovlivňujících zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií při biologickém čištění odpadní vody. Nitritace je prvním stupněm nitrifikace, kdy dochází k produkci dusitanů. Za určitých podmínek se nitrifikace může v této fázi zastavit, což je výhodné k následné denitrifikaci. S tím je spojeno možné uspoření kyslíku k oxidaci amoniakálního dusíku a organického substrátu potřebného pro denitrifikační proces. Využití těchto skutečností je ekonomicky výhodné.

V rámci této práce bylo cílem simulovat oddělené čištění kalové vody. Kalová voda dosahovala koncentrace N-amon cca 1330 mg/l a byla dávkována do reaktoru provozovaného na principu směšovací aktivace. Hodnota pH byla regulována na 7. Pro zjištění vlivu kyslíku na nitrifikaci byla použita metoda, při které se měnila koncentrace rozpuštěného kyslíku v nitrifikačním reaktoru.

Experiment byl rozdělen do pěti fází. V první fázi byla koncentrace kyslíku nastavena na 3 mg/l. Nitrifikace probíhala až na dusičnany. Účinnost odstranění N-amon se pohybovala v této etapě okolo 98,3 %. Objemové zatížení systému amoniakálním dusíkem v první etapě bylo v rozmezí 0,36 kg/(m³.d) až 0,64 kg/(m³.d), kdy se zvyšoval průtok z 360 ml/d na 504 ml/d. Ve druhé fázi se koncentrace rozpuštěného kyslíku nastavila na 0,5 mg/l a poté zvýšila na 0,8 mg/l. Projevilo se to hromaděním dusitanů. Limitace koncentrace O₂ ovlivnila účinnost odstranění N-amon na cca 42,8 %. V druhé a dalších fázích objemové zatížení amoniakálním dusíkem činilo v průměru 0,57 kg/(m³.d), kdy byl průtok nastaven na hodnotu od 552 ml/d do 576 ml/d. Ve třetí fázi se nastavila koncentrace rozpuštěného kyslíku na 4 mg/l a účinnost odstranění N-amon se pohybovala v této etapě okolo 80,1 %. Ve čtvrté fázi při nastavené koncentraci rozpuštěného kyslíku na 1 mg/l došlo k limitaci aktivity nitratačních bakterií a tím k nárůstu koncentrace dusitanů, aniž by došlo k výraznému snížení celkové účinnosti odstranění N-amon, které činilo 66,9 %. V poslední etapě byla nastavena koncentrace rozpuštěného kyslíku na 4 mg/l a účinnost odstranění N-amon se pohybovala průměrně okolo 89,1 %.

Procentní zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku lze charakterizovat tak, že při koncentraci O_2 vyšší než 3 mg/l je zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami jen 0,1 %. Při limitaci koncentrace O_2 pod 1 mg/l zastoupení N-NO_2^- vzrostlo ve druhé fázi na 29 % a ve čtvrté fázi na změřených 70 %. Což potvrzovalo vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na aktivitu nitritačních a nitratačních bakterií.

Lze tedy předpokládat, že dané podmínky jsou vhodné pro dlouhodobou akumulaci dusitanů v kontinuálním systému na principu směšovací aktivace.

Klíčová slova: čištění odpadních vod, nitrifikace, nitritační bakterie, nitratační bakterie, kyslík, kalová voda.

The Influence of Dissolved Oxygen Concentration on the Occurrence of Ammonia and Nitrite Oxidising Bacteria in Activated Sludge

Summary

This master's thesis is focused on the assessment of nitrification progress in the treated reject water with high total ammonia nitrogen (TAN) concentration depending on the concentration of dissolved oxygen.

The concentration of dissolved oxygen is one of the main factors influencing the presence of nitrifying bacteria during the biological wastewater treatment. The first stage of nitrification is the nitritation during which the nitrite is produced. Under certain conditions the nitrification process can stop at this stage which is convenient for the subsequent denitrification. This can be combined with possible savings of the oxygen for further oxidation of total ammonia nitrogen and organic substrate needed for the denitrification process. Utilization of these facts is economical.

The goal within this thesis was to simulate split reject water treatment. Reject water was reaching TAN concentration of approx. 1330 mg/l and it was added into the reactor working in regime of completely stirring tank reactor (CSTR). Value of pH was set to 7. The method used for the determination of the oxygen effect on the nitrification process was such that the concentration of dissolved oxygen in the nitrification reactor was changing.

Experiment was divided into five stages. During the first stage the oxygen concentration was set to 3 mg/l. Nitrification was left to go all the way to the nitrate. Efficiency of TAN reduction during this stage was around 98.3 %. The capacity load of the system with the TAN in the first stage was between 0.36 kg/(m³.d) and 0.64 kg/(m³.d) while the flow rate was increasing from 360 ml/d to 504 ml/d. During the second stage the concentration of dissolved oxygen was set to 0.5 mg/l and then increased to 0.8 mg/l. The effect was the accumulation of nitrite. The limitation of the concentration of O₂ influenced efficiency of TAN removal to approx. 42.8 %. During the second and subsequent stages the capacity load with the TAN was on average 0.57 kg/(m³.d) while the flow rate was set between 552 ml/d and 576 ml/d. During the third stage the concentration of dissolved oxygen was set to 4 mg/l and the efficiency of TAN removal was around 80.1 %. During the fourth stage, when the dissolved oxygen concentration was set to 1 mg/l, the limitation of the activity of the nitrite-oxidizing bacteria took place which resulted in the increase of the nitrite concentration without considerable

decrease of the overall efficiency of the TAN removal which was 66.9 %. In the final stage of the experiment the concentration of dissolved oxygen was set to 4 mg/l and the efficiency of the TAN removal was on average 89.1 %.

The proportional presence of the N-NO_2^- among oxidized forms of nitrogen can be characterized as such that when the O_2 concentration is higher than the 3 mg/l the N-NO_2^- presence among the oxidized forms of nitrogen is only 0.1 %. When the O_2 concentration was limited under 1 mg/l the presence of the N-NO_2^- increased to 29 % during the second stage and to 70 % during the fourth stage of the experiment. That proves the effect of the dissolved oxygen concentration on the ammonia-oxidizing and nitrite-oxidizing bacteria activity.

Therefore, it can be presumed that given conditions are suitable for the long-term accumulation of nitrite in the CSTR principle.

Keywords: wastewater treatment, nitrification, ammonia-oxidizing bacteria, nitrite-oxidizing bacteria, oxygen, reject water.

Obsah

1 Úvod.....	10
2 Cíle práce a vědecká hypotéza	12
3 Teoretická část.....	13
3.1 Koloběh vody	13
3.2 Koloběh dusíku.....	13
3.2.1 Mikrobiologie odpadních vod v koloběhu dusíku.....	15
3.2.1.1 Nitrifikační bakterie.....	15
3.2.1.2 Denitrifikační bakterie.....	15
3.2.1.3 Amonizační bakterie.....	15
3.2.1.4 Proteolitické bakterie.....	15
3.2.1.5 Anammox bakterie.....	16
3.3 Formy dusíku.....	16
3.3.1 Amoniakální dusík.....	16
3.3.2 Dusičnany.....	17
3.3.3 Dusitany	17
3.3.4 Organický dusík.....	18
3.3.5 Dusík a oxid dusný	18
3.4 Kyslík ve vodě.....	18
3.4.1 Oxygenační kapacita	19
3.5 Biochemické přeměny dusíku	19
3.5.1 Nitrifikace.....	20
3.5.1.1 Nitritace.....	21
3.5.1.2 Nitratace.....	21
3.5.2 Denitrifikace.....	21
3.6 Vliv kyslíku na průběh nitrifikace	22
3.7 Další činitelé ovlivňující průběh nitrifikace	23
3.7.1 Teplota	24
3.7.2 pH.....	24
3.7.3 Toxické látky.....	25
3.7.4 Stáří kalu - doba zdržení kalu v reaktoru	25
3.8 Alternativní metody čištění odpadních vod	26
3.8.1 Sharon	26
3.8.2 Anammox.....	26
3.9 Metody identifikace mikroorganismů	27
3.9.1 FISH – fluorescenční in situ hybridizace	27
3.9.2 PCR	27

3.9.3	Metagenomika.....	27
4	Metodika.....	28
4.1	Laboratorní model.....	28
4.2	Systém fungování modelu	29
4.3	Vlastnosti použité kalové vody	32
4.4	Analytická stanovení	33
4.4.1	Určení hodnot pH, stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku, průtoku a teploty 34	
4.4.2	Stanovení koncentrace forem dusíku	34
4.4.2.1	N-amon.....	35
4.4.2.2	N-NO ₂ ⁻	35
4.4.2.3	N-NO ₃ ⁻	35
4.4.3	CHSK.....	35
4.4.4	VL, RL, NL a ztráta žíháním.....	36
4.5	Použité výpočty	36
5	Výsledky	38
5.1	Koncentrace kyslíku v reaktoru.....	38
5.2	Hodnota pH.....	41
5.3	Zastoupení forem dusíku na výstupu z reaktoru	42
5.4	Odstranění N-amon	44
5.5	Zastoupení N-NO₂⁻ mezi oxidovanými formami dusíku na výstupu z reaktoru.....	46
5.6	Účinnost odstranění a objemové zatížení CHSK.....	47
5.7	Zastoupení FA a FNA.....	48
6	Diskuze	50
6.1	Hodnota pH.....	50
6.2	Vliv koncentrace kyslíku na formy dusíku na odtoku	51
6.3	Koncentrace FA a FNA v reaktoru.....	52
6.4	CHSK	52
6.5	Zhodnocení účinnosti odstranění N-amon.....	53
6.6	Procentní zastoupení N-NO₂⁻ mezi oxidovanými formami dusíku.....	53
6.7	Praktické využití získaných poznatků	54
7	Závěr	55
8	Seznam použité literatury.....	56

1 Úvod

Hlavním úkolem systému čištění odpadních vod je vyčistit vodu. Voda v přírodě již má samočisticí schopnost. Pro potřeby městských odpadních vod, průmyslových vod a vod ze zemědělské činnosti, které jsou v dnešní době ve velkém množství produkovány, si ekosystém nedovede poradit s takovým znečištěním, a proto je implementován systém čištění odpadních vod. Na odtoku z čistírny odpadních vod by tedy vypouštěná voda měla splňovat limity obsahu znečišťujících látek. Systém se zaměřuje převážně na některé sloučeniny, které odstraňuje. Jmenovitě to jsou organické látky, kvantifikované parametry CHSK a BSK, a zejména pak sloučeniny dusíku a fosforu.

Sloučeniny dusíku, převážně amoniakální dusík, který se vyskytuje ve vysokých koncentracích v kalové vodě, je významným negativem v oblasti čištění odpadních vod. V poslední době se velice rozrostl zájem o odvětví čištění odpadních vod, což je dokládáno i mnoha studiemi a odbornými články. Na čistírnách se uplatňují a stále zdokonalují biochemické (biologické) metody čištění. Ty zabraňují přílišnému znečištění životního prostředí, které činnost člověka, spojená s produkcí dusíku, neúměrně zatěžuje. Tomuto znečištění zabráníme tím, že odstraníme sloučeniny dusíku v procesu čištění odpadních vod a na odtoku z čistírny výrazně snížíme zastoupení dusíkatých sloučenin a zamezíme dalšímu znečištění prostředí, vzniku sinic a eutrofizaci vod.

Biologické čištění odpadních vod je proces, kdy se uplatňuje funkce nitrifikace/denitrifikace, kdy biologické mikroorganismy odstraňují dusík z vody. Tato metoda je vcelku ekonomicky výhodná. Kalová voda, která se odstředí v kalovém hospodářství, se v mnoha případech vrací do systému čištění odpadních vod, aby byla znovu pročištěna. Tato voda velice zatěžuje systém čištění, a proto je vhodné ji předčistit. Jako příspěvek k rozšíření poznatků o této metodě byla vytvořena tato diplomová práce, aby přispěla k popisu procesu odděleného čištění kalové vody obsahující vysoké koncentrace amoniakálního dusíku.

Nejnákladnějším faktorem v biologickém stupni čištění odpadních vod je aerace odpadní vody. Proto je výhodné minimalizovat aeraci na co nejmenší možný rozsah. V tomto směru pomáhají nové alternativní a ekonomicky výhodné metody, kde regulace koncentrace rozpuštěného kyslíku v kalové vodě je žádoucí, tedy Sharon a Annamox.

Pro správné fungování nitrifikace je zásadní mnoho faktorů. Jsou to například teplota, množství rozpuštěného kyslíku, hodnota pH a stáří kalu. Tyto faktory se ale navzájem

prolínají a ovlivňují průběh čištění. Tyto interakce znesnadňují jednoduchý popis chování průběhu čištění, kdy se musí brát v úvahu mnoho faktorů, a na problematiku nahlížet komplexně.

Tato práce je zaměřena na popis fungování nitritačních a nitratačních bakterií, jejich funkcí a chování v průběhu procesu čištění, za měnící se veličiny, kterou byl kyslík, rozpuštěný ve vodě.

2 Cíle práce a vědecká hypotéza

Hlavním cílem diplomové práce je zpracovat ucelený přehled literatury o problematice tématu a dále pak vyhodnotit vliv dlouhodobé i krátkodobé limitace dostupnosti kyslíku při nitrifikaci kalové vody na zastoupení nitritačních a nitratačních organismů v aktivovaném kalu.

Základní hypotézou práce je předpoklad, že následkem snížení koncentrace rozpuštěného kyslíku z cca 3 mg/l na hodnoty v rozmezí cca 0,5–1,0 mg/l dojde ke snížení zastoupení nitratačních bakterií v aktivovaném kalu, přičemž tato změna kyslíkového režimu nebude mít zásadní vliv na zastoupení nitritačních organismů, které jsou vůči nedostatku kyslíku podstatně odolnější. Zároveň bude v daných podmínkách nitrifikační proces ukončen ve fázi tvorby dusitanů.

3 Teoretická část

Tato část práce je zaměřena na vytvoření literární rešerše o problematice vlivu koncentrace kyslíku na bakterie v aktivovaném kalu z procesu čištění odpadních vod s důrazem na nitrifikaci.

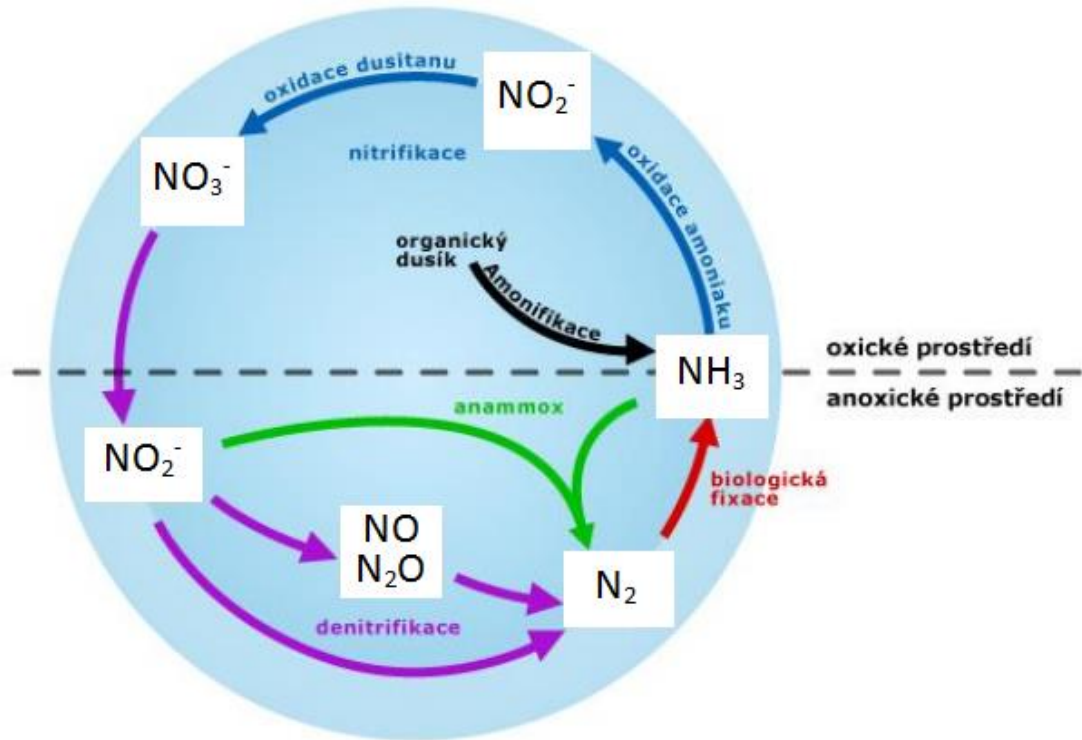
3.1 Koloběh vody

Voda je jednou z nejdůležitějších složek životního prostředí. Její pohyb v atmosféře se nazývá hydrobiologický cyklus. Je to uzavřený koloběh, ve kterém voda neustále cirkuluje díky zemské přitažlivosti a slunečnímu záření. Voda se pomocí vypařování z oceánských a mořských vod akumuluje v podobě vodní páry nad zemským povrchem, kde se ve formě kapalných nebo pevných srážek vrací zpět na kontinentální půdu. Spadlé srážky se pak stékáním dostávají do potoků a řek, nebo jako podzemní voda zpět do moří a oceánů. Doba zdržení vody je například v atmosféře devět dní a v řekách od dvou do šesti měsíců. Největší zásoby vody na zemské kouli jsou uchovávány ve sněhu a ledovcích. Na pevninském povrchu je voda uchovávána ve vodních nádržích, povrchových tocích, jako kapilární voda v půdě a také jako voda hydrofobická. Voda se také dále nachází v živých organismech (Ambrožová, 2003).

3.2 Koloběh dusíku

Dusík patří spolu s kyslíkem, vodíkem a uhlíkem mezi hlavní nejvíce rozšířené biogenní prvky v prostředí. Při zvyšující se koncentraci dusíku ve vodách se také zvyšuje množství fytoplanktonu. Způsob projevu zastoupení nadměry dusíku ve vodách je vodní květ. Cyklus dusíku závisí na aktivitě nejrůznějších organismů, z nichž každý nese evolučně získané poznatky, vložené do jeho genetického materiálu (Gorman, 2013). Dusík se dostává do koloběhu také díky činnosti člověka, jako je hnojení dusíkatými hnojivy v zemědělství a dále například spalováním veškerých surovin, které se používají k topení. Vyskytuje se v přírodě hlavně ve formě atmosférické molekuly dusíku, v podobě amoniaku, dusitanů a dusičnanů a v neposlední řadě jako nukleové kyseliny, bílkoviny a močoviny. Vazba, která spojuje atomy dusíku v molekule N_2 , je pevná trojná. Díky této vazbě je dusík brán jako

inertní plyn. Na obrázku je znázorněn koloběh dusíku. Složitost koloběhu dokládají reakce, které proces zajišťují (amonifikace, biologická fixace, nitrifikace a denitrifikace).



Obrázek č. 1: Koloběh dusíku (Bernhard, 2010)

Organismy, které dokáží pomocí enzymu nitrogenázy biologickou fixací, využívají atmosférický dusík. Jsou to symbiotičtí a volně žijící vazači různých skupin atmosférického dusíku. Je to například symbiotická hlíznatá bakterie rodu *Rhizobium*, žijící na kořenech bobovitých rostlin. Volně žijícím vazačem jsou bakterie rodu *Azotobacter* a rod *Clostridium*. Ze zástupců fototrofních vazačů jsou to sinice rodu *Anabaena* a *Aphanizomenon*. Enzym transformuje dusík na amonné soli, glutamin a zabudovává ho do vegetativních buněk. Díky rozkladu odumřelých částí rostlin a živočichů a také metabolických jevů organismů se do prostředí uvolňuje dusík. Na mineralizaci dusíku na amoniak se podílejí chemotrofní bakterie procesem amonifikace (Ambrožová, 2003).

3.2.1 Mikrobiologie odpadních vod v koloběhu dusíku

3.2.1.1 Nitrifikační bakterie

Díky nitrifikačním bakteriím je zajištěna oxidace amoniaku pomocí litotrofních aerobních bakterií ve vodním prostředí, a to ve dvou krocích. V prvním – nitrificaci – se amoniak oxiduje na dusitany a v druhém kroku – nitrataci – se dusitany oxidují na dusičnany, viz detailnější rozebrání v kapitole 3.5. Nitrifikační bakterie ve vodě indikují průběh mineralizačních procesů (Ambrožová, 2004).

3.2.1.2 Denitrifikační bakterie

Denitrifikační bakterie se účastní rozkladu různých organických substrátů. Redukují dusičnany na dusitany a molekulární dusík, viz kapitola 3.5 Biochemické přeměny dusíku. Výskyt těchto bakterií indikuje organické znečištění. Význam jejich zastoupení ve vodě spočívá v oxidaci organického znečištění se současnou redukcí dusičnanů na plynný dusík, čímž se dusík z vodního prostředí odstraňuje (Ambrožová, 2004).

3.2.1.3 Amonizační bakterie

Amonizační bakterie pracují na hydrolyzaci bílkovin prostřednictvím enzymů na štěpné produkty typu peptidů a aminokyselin. Indikují znečištění dusíkatými organickými látkami, zejména amoniakem, jenž je produktem těchto bakterií. Množstevní zastoupení amonizačních bakterií v prostředí je ukazatelem probíhajících rozkladných procesů. Jejich stanovení je vhodné pro případy sledování samočisticích procesů a eliminaci organického znečištění dusíkem ve vodním prostředí (Ambrožová, 2004).

3.2.1.4 Proteolitické bakterie

Proteolitické bakterie jsou aerobní ale i anaerobní a jsou doplňující skupinou amonizačních bakterií. Tyto bakterie vylučují do prostředí hydrolytické enzymy proteinázy, prostřednictvím kterých hydrolyzují vysokomolekulární bílkoviny na nízkomolekulární.

Stanovení jejich obsahu je důležité, protože ukazují zatížení vod vyšším obsahem bílkovinných látek (Ambrožová, 2004).

3.2.1.5 Anammox bakterie

Tyto bakterie zajišťují pomocí Anammox (anaerobní oxidace amoniaku) přeměnu dusitanu a amoniakálního dusíku na molekulární dusík. Bakterie patří do kmene *Planctomycetes*. Zatím je objeveno 5 rodů. Čtyři jsou sladkovodní - *Brocadia*, *Kuenenia*, *Anammoxoglobus*, *Jettenia* a jeden rod mořský - *Scalindua* (Jetten et al., 2009). Zajímavé je, že u všech rodů, probíhá proces Anammox v tělísku (anammoxozomu) uchyceném na membráně, které je vázáno v cytoplazmě (Boumann et al., 2009).

3.3 Formy dusíku

Hydrochemik Pitter (1999) uvádí, že dusík se řadí mezi nejdůležitější makrobiogenní prvky. Je nepostradatelný pro vývoj organismů, tzv. nutrient. Účastní se všech procesů, které probíhají v podzemních, povrchových a i odpadních vodách a také při procesech úprav a čištění vod.

Sloučeniny dusíku se vyskytují v přírodě ve formě anorganického nebo organického původu. Sloučeniny dusíku biogenního původu vznikají při rozkladu organických dusíkatých látek živočišného a rostlinného původu.

Jedním z nejvýznamnějších antropogenních zdrojů sloučenin organického a anorganického dusíku v prostředí jsou splaškové vody. Specifická produkce celkového dusíku se nejběžněji počítá v množství 12 g na 1 obyvatele za 1 den. Dalšími zdroji sloučenin dusíku jsou zemědělství, potravinářství a v neposlední řadě průmyslové odpadní vody.

Dusík je zastoupen ve vodách v několika formách s různým oxidačním číslem. Jsou to amoniakální dusík, kyanatany, kyanidy, elementární dusík, hydroxylamin, oxid dusný, dusitanový dusík a dusičnanový dusík.

3.3.1 Amoniakální dusík

Amoniakální dusík se vyskytuje ve vodách jako disociovaný iont NH_4^+ a nedisociovaný NH_3 . Jejich podíl v prostředí je daný hodnotou pH a teplotou vody. V přírodních a

splaškových vodách je koncentrace amoniakálního dusíku velmi malá (v desetinách mg/l), kdežto v některých průmyslových odpadních vodách a v odpadních vodách ze zemědělství lze zaznamenat i stovky mg/l až jednotky g/l amoniakálního dusíku. Stanovení amoniakálního dusíku patří mezi nejvíce prováděné rozbory všech druhů vod. Například pitná voda je limitována mezní hodnotou 0,5 mg/l. Rozbor povrchové vody řadí amoniakální dusík mezi základní chemické ukazatele. Při vypouštění odpadních vod do vod povrchových, náleží obsah amoniakálního dusíku k závazně stanoveným ukazatelům. Při kontrole biologických čistíren odpadních vod je rozbor amoniakálního dusíku součástí dusíkových bilancí.

Obsah amoniakálního dusíku ve vodě se stanovuje vždy jako součet ve vodě disociovaného NH_4^+ amonného iontu a nedisociovaného amoniaku NH_3 , protože běžně používanými chemickými metodami se nerozliší obsah zastoupení jednotlivých forem. Vyjadřuje se jako $\text{N}-(\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+)$ nebo N_{amon} (Pitter, 1999). Podle Chudoby et al. (1991) má amoniakální dusík vysokou spotřebu kyslíku pro biochemickou oxidaci (asi 4,57 g kyslíku na 1 g NH_3), proto by se mělo zamezit odtoku vod z čistírny odpadních vod, které mají vysoké koncentrace amoniakálního dusíku.

3.3.2 Dusičnany

Dusičnany (NO_3^-) jsou konečným produktem mineralizace organicky vázaného dusíku. Za oxických podmínek jsou stabilní. Za anoxických podmínek podléhají denitrifikaci. Dusičnany se vyskytují téměř ve všech vodách a patří mezi 4 hlavní anionty. Jejich koncentrace v přírodních vodách neustále vzrůstá díky zintenzivňování zemědělské činnosti a vzrůstajícímu počtu obyvatel a jejich činností. Koncentrace dusičnanů v přírodních vodách se mění také v závislosti na vegetačním období. Maximální koncentrace dusičnanů je mimo vegetační období (Pitter, 1999). Ačkoliv dusičnany jsou prospěšné v zemědělství Chudoba et al. (1991) říká, že zvyšování koncentrace dusičnanů v životním prostředí a v pitné vodě je nebezpečné a zapříčiňují u dětí kojeneckého věku nemoc methemoglobinaemii.

3.3.3 Dusitany

Dusitany (NO_2^-) vznikají zpravidla ve vodách jako přechodná forma při biologické redukci dusičnanů nebo biologické oxidaci N-amon. Protože jsou velmi nestálé, objevují se pouze v malých koncentracích. V čistých přírodních vodách se vyskytují pouze ve stopových

koncentracích. Ve znečištěných odpadních a splaškových vodách se mohou vyskytovat ve vyšších jednotkách mg/l. Výskyt dusitanů znamená indikaci fekálního znečištění.

Obsah dusitanů je důležitou součástí rozboru pitných vod a jsou součástí dusíkových bilancí při kontrole biologických čistíren odpadních vod (Horáková, 2003).

3.3.4 Organický dusík

Organický dusík (N-org) se vyskytuje v přírodních vodách a odpadních splaškových vodách vázaný v bílkovinách a jejich štěpných produktech (peptidy, aminokyseliny, peptony) v purinech, pyrimidinech a v močovině. Organický dusík se stanovuje hlavně ve splaškových a průmyslových odpadních vodách. Není součástí rozboru pitné vody. Nejdůležitější význam má stanovení organického dusíku při sledování technologických procesů biologického čištění odpadních vod a při hodnocení čistírenských kalů. Udává se jako hmotnostní koncentrace N_{org} v mg/l (Horáková, 2003).

3.3.5 Dusík a oxid dusný

Zdrojem elementárního dusíku (N_2) ve vodách je hlavně dusík atmosférický. Dále se tvoří ve vodě nebo půdě biochemickými denitrifikačními pochody z dusičnanů. Dusík rozpuštěný ve vodě je stabilní a nepodléhá chemickým reakcím. Některé bakterie jsou však schopné elementární dusík fixovat. Díky nim se pak může stát součástí biomasy.

Oxid dusný (N_2O) vzniká denitrifikačními pochody v zemědělských procesech a při spalování paliv (Pitter, 1999).

3.4 Kyslík ve vodě

Pro proces biologického čištění odpadních vod je koncentrace kyslíku důležitá veličina, která se při procesu spotřebovává. Je žádoucí zajistit dostatečné množství rozpuštěného kyslíku ve vodném prostředí, aby biologické procesy probíhaly. Dispergované nebo suspendované bakterie, které využívají volný molekulární kyslík (O_2), fungují již při koncentraci rozpuštěného kyslíku od 0,3 mg/l. Nicméně, koncentrace rozpuštěného kyslíku okolo vločky není stejná, jako koncentrace kyslíku uvnitř vločky. Množství rozpuštěného kyslíku mimo vločky musí být dostatečné, aby byl schopen proniknout do středu vloček a

zajistil dostatečnou koncentraci rozpuštěného kyslíku v jádru (Gerardi et al., 2010). Optimální množství volně rozpuštěného kyslíku ve vodě v čistírně odpadních vod je takové, které je rovno nebo větší jeho spotřebě.

Chudoba et al. (1991) uvádí, že na oxidaci 1 kg organické látky je zapotřebí cca 1,42 kg O₂. Tato hodnota spotřeby kyslíku je závislá na chemickém složení organické látky a je v praxi okolo 1,3 až 1,5 kg. Množství spotřebovaného kyslíku obecně závisí na rozdílu průměrného oxidačního čísla uhlíku biomasy a exogenního substrátu. Substráty se zápornou hodnotou průměrného oxidačního čísla uhlíku budou potřebovat na syntézu biomasy dostatečný přísun kyslíku. Substráty s kladnou hodnotou průměrného oxidačního čísla uhlíku mají v molekule více kyslíku než je potřebné k syntéze biomasy (Chudoba et al., 1991).

3.4.1 Oxygenační kapacita

Pro procesy čištění odpadních vod je potřeba vhánět kyslík do aktivačních nádrží. Ten je původu vzdušného, nebo se používá čistý plyn (kyslíková aktivace).

Oxygenační kapacita zařízení, které vhání kyslík do nádrže, je množství kyslíku, které je schopno vyprodukovat za jednotku času do jednotkového objemu dané nádrže při jeho nulové koncentraci v nádrži (Chudoba et al., 1991).

Na oxygenační kapacitě přístroje závisí koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vodě. S tím je spojena intenzita nárůstu bakterií, které následně odstraňují dusíkaté sloučeniny, viz kapitola 3.5. Pomocí množství rozpuštěného kyslíku ve vodním prostředí lze korigovat probíhající procesy. Potřebu zvýšení biologického odbourávání dusíkatých látek ve vodě je možno realizovat navýšením objemu denitrifikace na úkor nitrifikace, viz další kapitola 3.5. Poté za podpory vhánění kyslíku lze opět zaktivovat nitrifikaci a tím navýšit účinnost odstraňování dusíku (Chudoba et al., 1991).

3.5 Biochemické přeměny dusíku

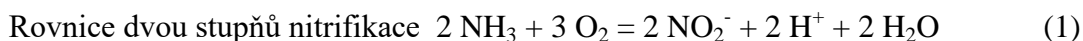
Jednou z důležitých přeměn anorganického dusíku na čistírně odpadních vod je oxidace amoniakálního dusíku na dusitany a dusičnany, což je nitrifikace.

Redukce dusičnanů na elementární dusík je denitrifikace.

Téma této diplomové práce se soustředí na zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií v aktivovaném kalu a proto jsou následně pasáže obsáhlejšího rozsahu.

3.5.1 Nitrifikace

Nitrifikace je oxidace amoniakálního dusíku na dusitany až dusičnany pomocí biochemických procesů (Gerardi, 2010). Způsobují ji především litotrofní a zřídka i organotrofní organismy. Z nitrifikačních bakterií jsou zastoupeny například tyto dva rody: *Nitrosomonas* a *Nitrobacter*. V přírodě jsou zastoupeny nejvíce a mají schopnost zachycování a ulpívání na různých površích. Výskyt bakterií je na pevných látkách plovoucích ve vodě, usazeninách a v půdě. Při vhodných podmínkách probíhá nitrifikace v oxickém prostředí velmi snadno. První krok oxidace zajišťují například bakterie rodu *Nitrosomonas*, nitritace kterými je dusík přeměňován na dusitany. Jejich geneze je pomalejší, než u rodu *Nitrobacter* (Pitter, 1999). *Nitrobacter* oxiduje dusitany na dusičnany. Díky těmto bakteriím se ve vodách dusitany neakumulují a jejich zastoupení je minimální. Nejvhodnější teplota pro nitrifikaci se pohybuje od 20 °C do 30 °C. Pod 5 °C nitrifikace neprobíhá, při biologickém čištění odpadních vod začíná inhibice nitrifikace již pod 12 °C (Pitter, 1999). Důležitou veličinou je hodnota pH. Pro účinnou nitrifikaci by se hodnota pH měla pohybovat v rozmezí 7 až 8,5.



Výslednou rovnici nitrifikace, kdy se zoxiduje amoniakální dusík na dusičnanový dusík, lze zapsat takto: $\text{NH}_3 + 2 \text{ O}_2 = \text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$. (3)

Důležitou informací je, že pro efektivní zoxidování 1 g amoniakálního dusíku, jak je v literatuře uváděno, je zapotřebí 4,57 g kyslíku. Největší spotřeba kyslíku v reakci je tehdy, když probíhá oxidace na dusitany (rovnice prvního stupně nitrifikace). Ve větším množství se také uvolňuje vodíkový iont, který způsobuje okyselení prostředí. Při malé tlumivé kapacitě vody pH výrazně klesá, pod hodnotu 6 až 6,5 pH, kdy dochází k inhibici nitrifikace. Průběh nitrifikace a zastoupení bakterií při nitrifikačních reakcích je ovlivněn řadou anorganických a i organických látek, obsažených ve vodě. Nejvíce se inhibuje druhý stupeň reakce, to má velký význam pro stanovení biochemické spotřeby kyslíku a při procesech biologického čištění odpadních vod (Pitter, 1999).

3.5.1.1 Nitritace

Mezi nitritační bakterie patří bakterie rodu *Nitrosomonas*, jak je zmíněno v kapitole 3.5.1, čili nitrifikanti prvního stupně. Uvádí se, že jsou obligátně aerobní, chemolitotrofní. Základním živným substrátem pro tyto bakterie je N-amon. Anorganický uhlík sice využívají jako zdroj uhlíku, ale za určitých podmínek jsou schopné asimilovat i některé organické sloučeniny (tzv. mixotrofní růst).

Nitritace, viz rovnice č. 1, je proces, který probíhá ve vícero krocích. Nejdůležitějším meziproduktem je hydroxylamin NH_2OH , který je relativně stabilní. Oxidace N-amon na hydroxylamin je endotermická. Saturační konstanta *Nitrosomonas* pro N-amon v rozmezí hodnot pH 7 až 8 je relativně konstantní, když se vyjádří v mgN-amon/l (Buday, 2002).

3.5.1.2 Nitratace

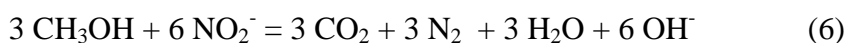
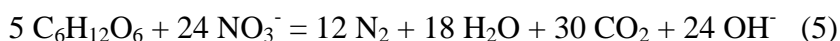
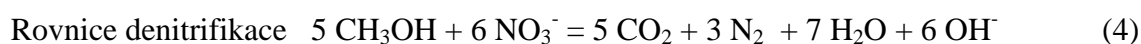
Nitratace navazuje v pochodu nitrifikace na její první část - nitritaci. Mezi nitratační bakterie patří bakterie rodu *Nitrobacter*, čili nitrifikanti druhého stupně. Základní metabolismus *Nitrobacter* je spjat s oxidací NO_2^- na NO_3^- a asimilací anorganických forem uhlíku. Samotná oxidace nitratace není složitá, vzhledem k přesunu pouze dvou elektronů, a není spojena s produkcí významných meziproduktů. Jako substrát pro *Nitrobacter* se udává nedisociovaná i disociovaná forma dusitanu (Buday, 2002). Nitratace není spjata s významnou produkcí H^+ iontů a když je spotřeba CO_2 minimální, vliv této reakce na pH je v porovnání s nitritací zanedbatelný.

Nitratační organismy jsou fakultativně aerobní chemolitotrofní mikroorganismy. Rostou i v anoxických podmínkách prostředí a jsou schopny redukovat zpětnou reakcí NO_3^- na NO_2^- , NO a N_2O . Při oxických podmínkách prostředí jsou schopny oxidovat NO_2^- na NO_3^- , viz rovnice č. 2. Stejně jako v případě nitritačních bakterií, tak byl u některých nitratačních bakterií prokázán růst díky organickému substrátu jako zdroje uhlíku. *Nitrobacter* je schopen rozmnožování dokonce i při anoxických podmínkách, kdy využívá NO_3^- jako konečný akceptor elektronů (Bock, 1988).

3.5.2 Denitrifikace

Dalším klíčovým pojmem v procesu odstraňování dusíku z odpadních vod, je denitrifikace. Denitrifikace je redukce dusičnanů - denitratace a dusitanů - denitritace na

elementární dusík nebo na oxidy dusíku (Gerardi, 2010). Denitrifikace probíhá v anoxických podmínkách. Cílovým akceptorem elektronů je dusík v oxidačním stupni III nebo V. Denitrifikace probíhá ve vodách poměrně snadno, stejně tak, jako nitrifikace, avšak pouze tehdy, jestliže jsou zajištěny anoxické podmínky. Denitrifikace způsobuje odstraňování dusíku, a proto se záměrně používá při biologickém čištění odpadních vod. Proces biochemické redukce dusičnanů a dusitanů na elementární dusík je způsoben organotrofními striktně i fakultativně anaerobními mikroby, jako jsou například rody *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Denitrobacillus* a *Achromobacter* (Liu, 2014). Pro správnou funkci denitrifikačních bakterií je nutný substrát organického původu, který slouží jako zdroj energie. Tyto organické látky, které jsou zdrojem energie, jsou při denitrifikaci oxidovány.



V průběhu denitrifikace se uvolňují hydroxidové ionty. Díky OH^- se prostředí zpravidla alkalizuje a když voda nemá dostatečně tlumivou kapacitu, hodnota pH se zvyšuje. Rozmezí hodnot pH, ve kterých probíhá denitrifikace, se pohybuje od 6 do 9. Reakce není tak náchylná na výkyvy pH jako je tomu u nitrifikace. Z rovnice č. 5 vyplývá, že pro denitrifikaci je potřeba určité množství organického uhlíku, ke zredukování N-NO_3^- . Podle Pittra (1999) je zapotřebí množství 0,7 g organického uhlíku, ke zredukování 1 g N-NO_3^- . Tento uhlík je bakteriím dostupný jak z extracelulárních tak i intracelulárních látek. V anoxických podmínkách je průběh denitrifikace nejúčinnější, může ale probíhat také i při velmi malých koncentracích rozpuštěného kyslíku, při hodnotách méně než 0,5 mg/l (Pitter, 1999).

3.6 Vliv kyslíku na průběh nitrifikace

Koncentrace rozpuštěného kyslíku má zásadní vliv na průběh nitrifikace, protože se jedná o aerobní proces, kdy je spotřebováváno velké množství kyslíku. Jednotlivé skupiny bakterií mají různou afinitu ke kyslíku.

Chudoba et al. (1991) uvádí, že optimum rozmezí rozpuštěného kyslíku ve vodě pro nitrifikaci je od 0,3 do 1,0 mg/l. Protože koncentrace rozpuštěného kyslíku se může kombinovat i s jinými uváděnými činiteli, ovlivňujícími nitrifikaci, je doporučeno zajistit koncentraci cca 2 mg/l kyslíku ve vodě.

Do odpadní vody se vhání vzduch a rozpuštěný kyslík je následně přijímán pomocí difúze do kalové vložky, v níž probíhá nitrifikace. Potřebné množství O_2 pro optimální průběh nitrifikace se dle různých autorů liší a je ovlivněno různými podmínkami měření, různým složením analyzované biomasy a je ovlivněno i velikostí kalové vložky.

Guisasola et al. (2005) udává, že koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru pro uspokojivou aktivitu nitritačních bakterií je nižší, než pro uspokojivou aktivitu nitratačních bakterií a to tak, že pro funkci nitritačních bakterií dostačuje 0,74 mg/l koncentrace rozpuštěného kyslíku a pro nitratační bakterie 1,75 mg/l koncentrace rozpuštěného kyslíku. Blackburne et al. (2007) uvádí koncentraci rozpuštěného kyslíku 0,03 mg/l pro nitritační a 0,4 mg/l pro nitratační bakterie. Weismann (1994) zmiňuje koncentraci rozpuštěného kyslíku pro nitritační bakterie na 0,3 mg/l a pro nitratační bakterie 1,1 mg/l. Schramm et al. (1999) popisuje, že dostačující koncentrace rozpuštěného kyslíku je pro nitritační bakterie 0,5 mg/l a pro nitratační 1,9 mg/l.

Kyslík je využíván přednostně pro oxidaci amoniakálního dusíku. V případě nedostatku koncentrace rozpuštěného kyslíku může dojít ke znevýhodňování nitratačních bakterií vůči nitritačním bakteriím. V čištěných odpadních vodách s vysokou koncentrací amoniakálního dusíku byla při koncentraci rozpuštěného kyslíku pod 1,5 mg/l pozorována možnost akumulace $N-NO_2^-$ (Ruiz et al., 2003). Blackburne et al. (2007) udává hodnotu 0,5–1 mg/l koncentrace rozpuštěného kyslíku.

Úspora kyslíku pro průběh zkrácené nitrifikace, viz kapitola 3.8, se jeví jako ekonomicky výhodná, ovšem může vést k technologickým omezením, kdy nedostatek kyslíku způsobí výpadky účinnosti, vyšší produkci oxidu dusného a dále nevhodné sedimentační vlastnosti kalu (Blackburne et al., 2007).

Ekonomický přínos zkrácené nitrifikace amoniakálního dusíku, díky limitaci koncentrace rozpuštěného kyslíku, byl popsán mnoha autory (Ciudad et al., 2005; Guo et al., 2009; Wang et Yang, 2004).

3.7 Další činitelé ovlivňující průběh nitrifikace

Vliv na průběh a rychlost nitrifikace má i mnoho dalších faktorů. Jednotlivé interakce následně popsaných faktorů jsou natolik různorodé a specifické, že jejich působení nemá vždy

stejný průběh a lze je jen těžko popsat. Při posuzování rychlosti nitrifikace musíme zohlednit všechny faktory celkově.

3.7.1 Teplota

Teplota výrazně ovlivňuje průběh nitrifikace a je zásadním činitelem, který se zjišťuje a zaznamenává. Má velký význam pro vývoj mikroorganismů, kdy inhibuje nebo podporuje jejich růst. Nitritační a nitratační bakterie mají pro svou činnost odlišné teplotní nároky. Jednotliví autoři se ve svých pracích v konkrétních hodnotách teplot liší. Hao et al. (2002) udává hranici rychlosti růstu teplotu 20 °C. Při teplotách nad touto hranicí rostou rychleji nitritační bakterie než nitratační bakterie. Při teplotách nižších je tomu naopak. Proces nitrifikace, jak udává Chudoba et al. (1991), probíhá již od 5 °C do 30 °C. Vyšších teplot (30 – 40 °C) pro zvýšení aktivity nitritačních bakterií je využíváno i v metodě Sharon, viz kapitola 3.8.1 (Anthonisen et al., 1976). Bakterie odpovědné za průběh nitrifikace jsou náchylnější na změny teplot než bakterie organotrofní. Optimální hodnota teploty pro funkci nitritačních a nitratačních bakterií a průběh nitrifikace v aktivačním kalu je kolem 28 °C. S poklesem teploty o 10 °C se ale rychlost reakcí snižuje přibližně o polovinu. Při nitrifikaci také může při nižších teplotách docházet k hromadění nežádoucích dusitanů. V kalu s rostoucím stářím jsou jednotlivé procesy více náchylné na výkyvy teplot (Chudoba et al., 1991).

3.7.2 pH

Také hodnota pH ovlivňuje průběh nitrifikace. Dosažení vhodné hodnoty pH se externě pomocí činidel upravuje a reguluje. Specificky pro rod *Nitrobacter* je nejvhodnější pH 7,2 až 7,6. Pro *Nitrosomonas* je to 7,9 až 8,2. Vyšší hodnoty pH vedou k vyššímu zastoupení dusitanů a mají vliv na jejich hromadění (Chudoba et al., 1991). Bakterie si sami okyselují prostředí, to může vést až k okyselení čištěné vody, bohaté na amoniakální dusík, natolik, že se začne projevovat inhibice nitrifikace. Při vyšším pH (kolem 8) dochází k nárůstu volného amoniaku a k inhibici činnosti bakterií oxidujících dusitany. Při nižším pH (pod 7) dochází k nárůstu množství volné kyseliny dusité a naopak zastoupení volného amoniaku klesá.

3.7.3 Toxické látky

Složení vod přitékajících do čistírny odpadních vod je velmi různorodé a leckdy nepředvídatelné. To často inhibuje proces nitrifikace, ať už to je přitékající množství toxických organických látek (nejvíce inhibující vliv mají ty sloučeniny, které obsahují síru nebo dusík - thiomočovina aj.) nebo inhibujících anorganických látek (těžké kovy, kyanidy a kyanatany, neiontové formy NH_3 a HNO_2) (Chudoba et al., 1991).

Z hlediska ovlivnění nitrifikace bychom se měli podívat i na koncentrace jednotlivých forem anorganického dusíku vyskytujících se v čistírnách odpadních vod. Obzvláště pak na koncentrace volného amoniaku (FA – free ammonia) a volné kyseliny dusité (FNA – free nitrous acid), protože inhibují průběh nitrifikace. Anthonisen et al. (1976) uvádí, že při koncentraci FA přesahující 0,1 – 1,0 mg/l a u FNA 0,2 – 2,8 mg/l jsou nitrifikační organismy inhibovány, naopak nitrifikační organismy lépe snášejí vyšší koncentrace nedisociovaných forem FA a FNA. Nejen koncentrace volného amoniaku a volné kyseliny dusité ovlivňuje průběh nitrifikace. Také spojení koncentrace FA a FNA s hodnotou pH a dalšími jevy, například teplotou prostředí, ovlivňuje průběh nitrifikace. Při hodnocení dopadu vysoké koncentrace látek na proces nitrifikace je důležité zabývat se i dalšími faktory, hlavně teplotou a hodnotou pH (Švehla et al., 2010).

3.7.4 Stáří kalu - doba zdržení kalu v reaktoru

Nitrifikační bakterie, které se nacházejí v aktivovaném kalu, mají určitou růstovou rychlost. Proto, když je doba zdržení kalu kratší než rychlost nárůstu bakterií, neprobíhá nitrifikace s plným účinkem, protože se bakterie odplavují. Nitrifikační organismy, oxidující amoniakální dusík na dusitaný, často rostou rychleji než nitrifikační organismy, které oxidují dusitanový dusík na dusičnanový. To může mít za následek nechtěné hromadění dusitanů, pokud bude aplikována krátká doba zdržení biomasy v aktivovaném kalu. Naopak, při záměru vyvolat produkci převážně dusitanů a zamezit produkci dusičnanů, jde tento úmysl uskutečnit pomocí regulace doby zdržení kalu. Tohoto postupu využívá technologie, která je provozována převážně v Nizozemí s názvem Sharon (Dongen et al., 2001).

3.8 Alternativní metody čištění odpadních vod

V přírodních podmínkách probíhá proces nitrifikace až do fáze vzniku dusičnanů. Při alternativních metodách se zastavuje přirozený průběh nitrifikace, kdy pro potřeby následné úpravy čištěných vod se proces zastaví v první fázi nitrifikace - po vzniku dusitanů. Tento proces nazýváme zkrácená nitrifikace.

Aplikací alternativních metod v procesu čištění odpadních vod, se uspoří zdroj energie - organické látky a také spotřeba rozpuštěného kyslíku v kalové vodě, který je spotřebováván v nižším množství. A jeví se tedy jako ekonomicky výhodné.

3.8.1 Sharon

Sharon (Single-reactor high activity ammonia removal over nitrite) je biotechnologie pro řízenou produkci dusitanů. Proces se využívá při odděleném čištění kalové vody v jedné nebo dvou nádržích pro lepší kontrolu procesu (Hellings et al., 1998; American Water Works Association, 2013). Reaktor, ve kterém probíhá nitrifikace, je nastaven tak, aby pracoval se stejnou dobou zdržení kalu, jako je hydraulická doba zdržení vstupující vody na principu chemostatu. Toto vede k získání optimálního složení mikrobiální populace v aktivovaném kalu, protože nitratační organismy jsou pomaleji rostoucí, jsou z procesu vyplavovány ještě předtím, než stihnou narůst a aktivně se začít zapojovat do procesu přetváření dusitanů na dusičnany (Dongen et al., 2001; Švehla et al., 2010).

Tuto domněnku potvrzuje studie od Fuxe et al. (2002), kde je uvedeno, že zdržení kalu na dobu kratší než 1,2 dne vykazuje zřetelné snížení intenzity nitratace, díky vyplavování nitratačních bakterií.

3.8.2 Anammox

Anammox (Anaerobic ammonium oxidation) je anaerobní oxidace amoniaku. Hu et al. (2011) popisuje Anammox jako proces, při kterém se uplatňují přírodní mikrobiální pochody, kdy je N-amon anaerobně oxidován na volný dusík. Při této reakci jsou používány dusitany jako akceptory elektronu (Hao et al., 2005). Tento proces většinou přichází po procesu Sharon.

3.9 Metody identifikace mikroorganismů

Pro potřeby přesné identifikace mikroorganismů, podílejících se na nitrifikačních procesech, při kterých je spotřebováván kyslík, které se nacházejí například v aktivovaném kalu, biofilmech atd., se využívá různých metod jejich stanovení. Pro toto stanovení byl vyvinut proces zjišťování organismů pomocí mikroskopické analýzy.

3.9.1 FISH – fluorescenční in situ hybridizace

Podle Thangaduraie (2007) je FISH hybridizace proces, kdy klonovaná DNA je vpravena do intaktních chromozomů. Klonovaná DNA je barevně označena fluorescenčním barvivem. Toto je hlavní metoda, pomocí které se fyzikálně mapují klonované DNA fragmenty na chromozomech. Metoda FISH je proces, kterým se zjišťuje přítomnost základních vláknitých mikroorganismů a také nitrifikačních bakterií prvního i druhého stupně. Zakládá se na navázání fluorescenčně značených genových sond na nukleové kyseliny v mikrobiální sondě. Tato metoda a její proces nám umožňuje stanovovat v relativně krátkém časovém úseku přesné množství přítomných mikroorganismů ve zkoumaném vzorku.

3.9.2 PCR

Technika PCR (polymerázová řetězová reakce) byla vyvinuta v roce 1986 Mullisem a spolupracovníky (Mullis et Faloona, 1987). Tato technika v podstatě napodobuje in vitro proces replikace DNA, vyskytující se in vivo. Skládá se ze zesilování jednotlivých fragmentů DNA (Atlas, 1991). Během buněčného dělení se dvě nové kopie DNA vyrobí a jedna sada genů je přenesena na dceřinou buňku. Kopie genů se zvyšují exponenciálně. PCR simuluje in vitro procesy opakování dělení DNA a může vytvořit až miliony kopií cílové sekvence DNA.

3.9.3 Metagenomika

Metagenomika studuje kolektivní genom mikroorganismů (archaea, bakterie, eukarya, viry) v ekosystému a poskytuje informace o struktuře a rozmanitosti mikrobiálních společenstvech (Hugenholtz et Tyson, 2008). Nicméně neposkytuje informace o funkci detekovaných genů. Funkce mikroorganismů v ekosystému jsou známy až když se provede analýza RNA transkriptů (metatranscriptomics) nebo exprimovaných proteinů (metaproteomics).

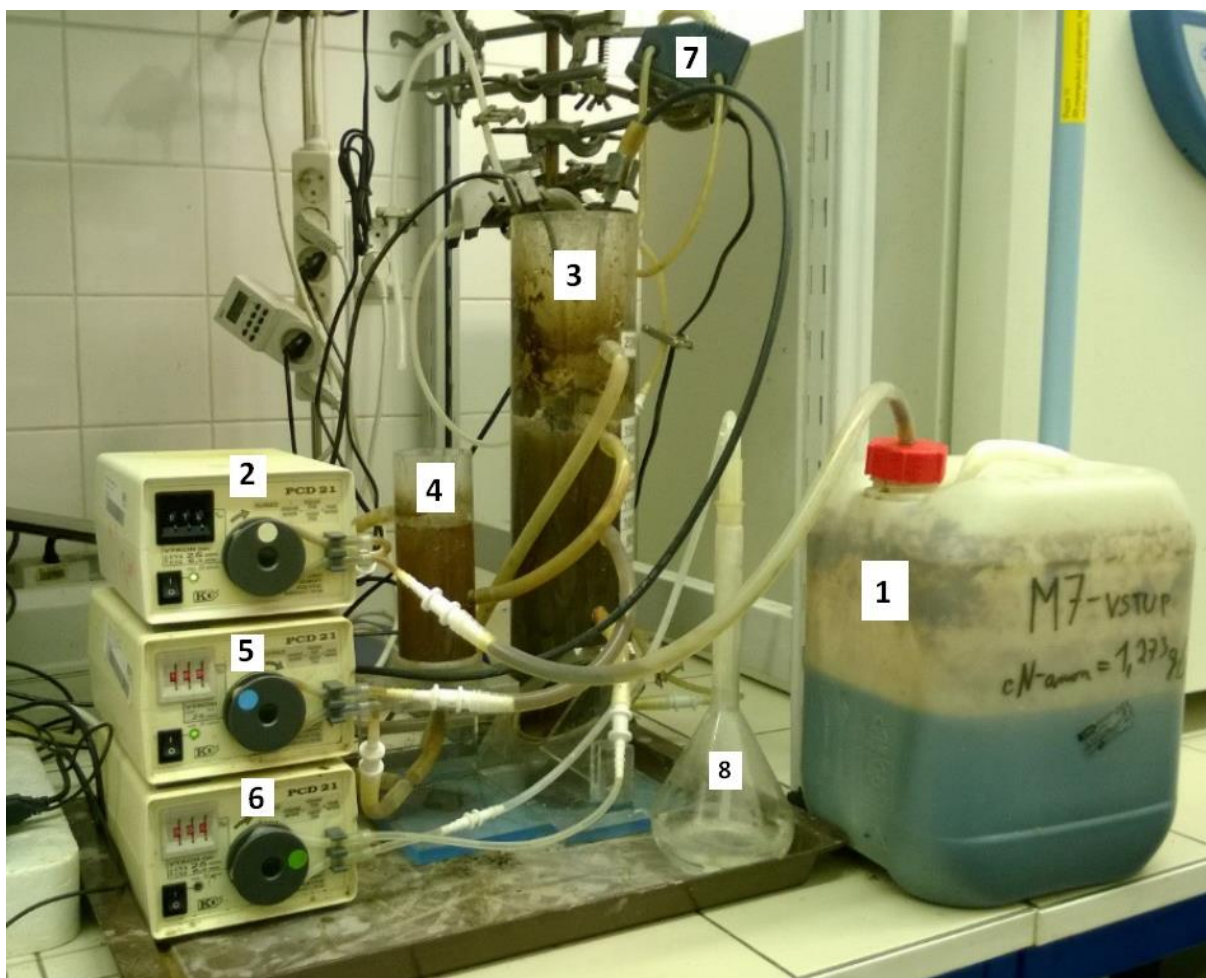
4 Metodika

V této části práce bude popsán laboratorní model, ve kterém pokus probíhal a podmínky, které pokusy ovlivňovaly.

4.1 Laboratorní model

Pro potřeby této diplomové práce bylo umožněno provádět výzkum v laboratoři na katedře Agroenvironmentální chemie a výživy rostlin na ČZU, kde se také nacházel zkoumaný laboratorní model a další potřebné nástroje. Toto pracoviště bylo zvoleno pro dostatečné vybavení špičkovou technikou a působí v něm zaškolený personál. Odborní pracovníci laboratoře se věnují výzkumu v odvětví odstraňování dusíku pomocí nitrifikace již řadu let, a proto mají s podobnými modelovými pokusy mnoho zkušeností.

V našem případě laboratorní model s interním názvem M7 je provozován dlouhodobě, již od roku 2010. Pro tuto práci byla stanovena doba měření ode dne 0 - 02.02.2016 do dne 48 - 21.03.2016. Kalová voda, použitá pro technologické testy, pochází z ÚČOV Praha. Tím byl zajištěn zdroj odpadní vody reálného znečištění a díky tomu jsme mohli naše pozorování postavit na reálných základech a přiblížit se problémům, které se běžně řeší na čistírnách odpadních vod. Laboratorní model se skládá z kanystru se vstupní vodou o objemu 5 litrů, nádrže reaktoru, která je objemu 1,2 litru a dosazovací nádrže o objemu 0,4 litru. Tyto nádoby jsou spojeny systémem silikonových hadic a hadiček, které jsou vedeny přes peristaltická čerpadla různého výkonu. Ta přesně dávkuje množství odpadní vody a roztoku NaOH do reaktoru. Reaktor je pak podle potřeby dodatečně, pomocí externích aeračních zařízení, viz kapitola 4.2, provzdušňován pro žádaný chod modelu. Na obrázku č. 2 je fotografie používaného laboratorního modelu.



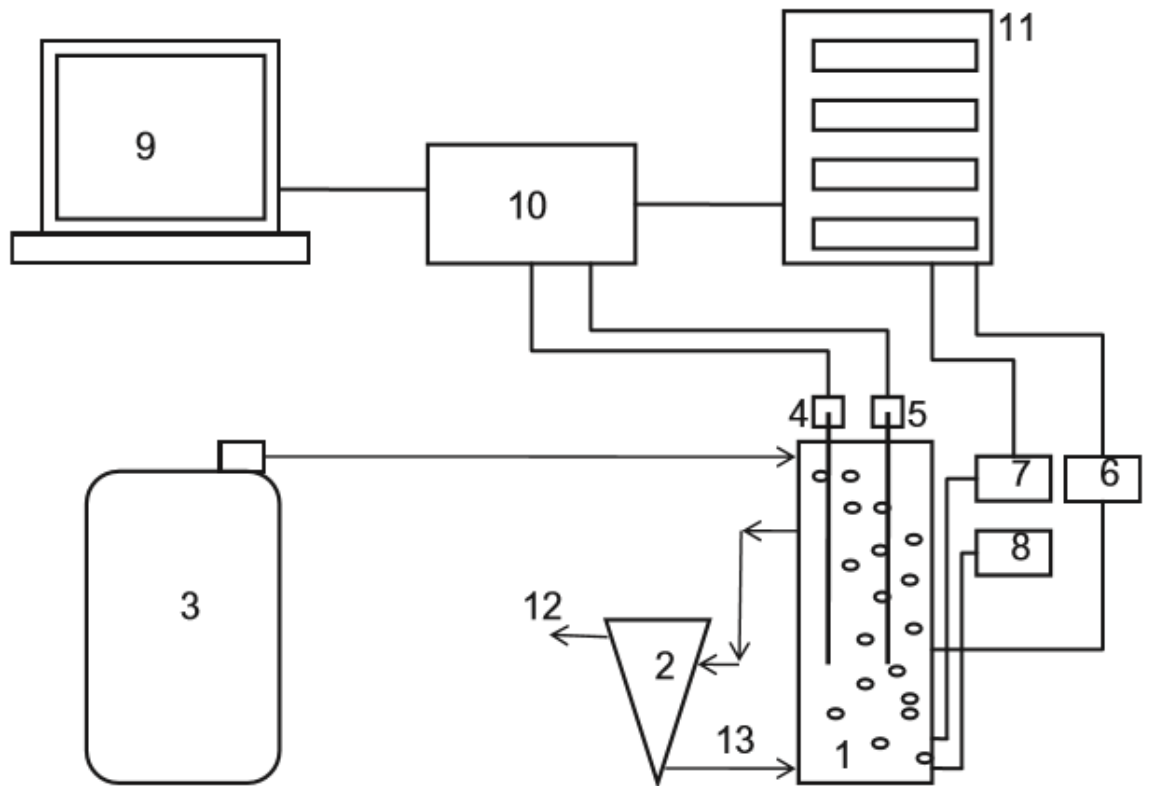
Obrázek č. 2: Fotografie používaného modelu

- 1) kanystr se vstupní kalovou vodou
- 2) peristaltické čerpadlo dávající kalovou vodu z kanystru do reaktoru
- 3) reaktor s probíhající nitrifikací
- 4) dosazovací nádrž
- 5) recirkulační peristaltické čerpadlo kalu
- 6) peristaltické čerpadlo dávající NaOH do reaktoru
- 7) aerační zařízení
- 8) roztok NaOH

4.2 Systém fungování modelu

Počítač s nainstalovaným systémem Magic XBC spravoval provoz reaktoru. Měřil a reguloval hodnotu pH a koncentraci O_2 . Měřené hodnoty zaznamenával a vyhodnocoval, kdy při překročení nastavených limitů spínač, ovládaný pomocí počítače, sepnul nebo vypnul

přísun energie do aerátoru nebo do peristaltického čerpadla dávkujícího NaOH, viz obrázek č. 3.



Obrázek č. 3: schéma zapojení modelu (Pacek et al., 2014)

- 1) nitrifikační reaktor
- 2) dosazovací nádrž
- 3) kanystr se vstupní kalovou vodou
- 4) pH elektroda
- 5) kyslíková elektroda
- 6) čerpadlo regulující pH
- 7) vzdušnění
- 8) promíchávání reaktoru pomocí O₂ bublin
- 9) PC
- 10) interface
- 11) spínače elektriky kontrolované pomocí PC
- 12) odtok
- 13) čerpadlo recirkulující aktivní kal

Díky tomuto způsobu bylo umožněno měnit a upravovat nastavení hystereze u koncentrace kyslíku a hodnoty pH v reaktoru počítačem. Stálé promíchávání reaktoru zajišťovalo aerační zařízení, které také zvyšovalo koncentraci rozpuštěného kyslíku ve vodě. Při nedostatku koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru se spouštělo další přídatné aerační zařízení, které bylo napojeno na počítač. Chod modelu byl rozdělen do pěti fází:

1. fáze – nelimitovaná koncentrace O₂
2. fáze – limitovaná koncentrace O₂
3. fáze – nelimitovaná koncentrace O₂
4. fáze – limitovaná koncentrace O₂
5. fáze – nelimitovaná koncentrace O₂

V jednotlivých fázích byla koncentrace kyslíku nastavena na různé koncentrace rozpuštěného kyslíku, viz tabulka č. 1, s hysterezí -0,1 až +0,1 mg/l, což znamená, že pokud koncentrace rozpuštěného kyslíku například v první fázi klesla pod 2,9 mg/l spínač zapnul aeraci a následně ji vypnul, když koncentrace rozpuštěného kyslíku překročila 3,1 mg/l. Hodnota pH byla udržována na 7 a to i ve všech následujících fázích, díky dávkování 10% roztoku NaOH s nastavenou hysterezí -0,05 až +0,05, kdy mechanismus spínače fungoval podobně jako u aerace.

Fáze	Koncentrace rozpuštěného kyslíku [mg/l] s hysterezí -0,1 až +0,1	Hodnota pH s hysterezí -0,05 až +0,05	Doba trvání fází (dny)
1. fáze	3	7	14
2. fáze	0,5-0,8		7
3. fáze	4		7
4. fáze	1		16
5. fáze	4		5

Tabulka č. 1: Nastavené koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru, hodnota pH a doba trvání jednotlivých fází

Experiment probíhal za níže popsanych podmínek. Průměrná teplota reaktoru dosahovala hodnot 21,8±1,2 °C a průměrná hodnota pH se pohybovala okolo 7,26±0,24 pH,

díky regulaci roztokem NaOH. Model M7 byl veden jako model s kontinuálním systémem na principu ideálního směšování. Koncentrace N-amon byla na vstupu 1330 mg/l. Objemové zatížení laboratorního modelu amoniakálním dusíkem se pohybovalo v první etapě v průměru okolo 0,49 kg/(m³.d), kdy byl nastaven průtok na 360 ml/d a zvyšoval se na 504 ml/d. V dalších fázích 2 až 5 bylo objemové zatížení amoniakálním dusíkem v průměru 0,57 kg/(m³.d), kdy byl průtok nastaven na hodnotu 552–576 ml/d. Hydraulická doba zdržení kalové vody v první etapě byla v průměru 65,5 hod a v dalších etapách 50,9 hod díky změně rychlosti průtoku. Stáří kalu nebylo ovlivňováno, protože kal nebyl odtahován, byl pouze recirkulován z dosazovací nádrže do reaktoru. Kal odtékal v zanedbatelném množství pouze při samovolném odtoku kalové vody z dosazovací nádrže.

Pro názornost, jsou výše zmíněné hodnoty zobrazeny v tabulce č. 2:

Čas (od, do trvání pokusu)	Počet dnů pokusu	Koncentrace N-amon [mg/l]	Θ [hod]	BV _{N-amon} [kg/(m ³ .d)]	Teplota [°C]
2.02.2016 - 21.03.2016	48	1330,2	50,9 – 65,5	0,49 – 0,57	21,8 ± 1,2

Tabulka č. 2: Zaznamenané hodnoty systému

4.3 Vlastnosti použité kalové vody

Vzorek odpadní kalové vody z ÚČOV Praha se odebíral velkoobjemově v intervalu jednou za dva měsíce. V laboratoři na ČZU pak byla voda uchovávána externě, za venkovních přírodních podmínek, kdy teplota byla 6±5 °C. V tabulce č. 3 byly shrnuty hodnoty vstupní kalové vody.

pH	P	N	N-amon	CHSK		VL	VL	NL	NL
	celk.	celk.		homog.	odstř.		org		org
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l		g/l			
8,4	142	1259	1330,2	2612	1652	2,24	1,31	0,38	0,36

Tabulka č. 3: Průměrné hodnoty vstupní kalové vody

4.4 Analytická stanovení

U modelu byly stanovovány hodnoty dále uvedených parametrů, které byly technologicky testovány:

- 1) koncentrace rozpuštěného kyslíku [mg/l], (stanovováno v reaktoru)
- 2) hodnota pH, (stanovováno v reaktoru)
- 3) teplota [°C], (stanovováno v reaktoru)
- 4) koncentrace dusíku N-amon, N-NO₂⁻ a N-NO₃⁻ [mg/l], (N-amon stanovován ve vstupní vodě i v odtoku vody z reaktoru, N-NO₂⁻ a N-NO₃⁻ bylo stanovováno pouze v odtoku)
- 5) CHSK [mg/l], (stanovováno ve vstupní vodě do reaktoru i v odtoku vody z reaktoru)
- 6) stanovení VL, NL, RL [g/l], (stanovováno ve vstupu a odtoku vody do a z reaktoru i přímo v reaktoru)
- 7) Ztráta žiháním VL_{org}, NL_{org}, RL_{org} [g/l], (stanovováno ve vstupu a odtoku vody do a z reaktoru i přímo v reaktoru)
- 8) průtok [ml/d], (stanovováno při čerpání vstupní kalové vody do reaktoru)

Pro měření bylo použito tohoto vybavení:

- 1) odštědivka Hettlich – Rottina 420
- 2) kyslíková sonda WTW Oxi 340i
- 3) pH sonda WT pH 340i
- 4) mineralizační box Hach DRB 200
- 5) měřicí systém Magic XBC, měřicí hlavice a elektrody pro měření hodnot pH od společnosti GRYF HB spol. s r. o.
- 6) topná ploténka STUART CB 500
- 7) spektrofotometr HACH DR/4000
- 8) analytické váhy DENVER INSTRUMENT SL – 2002 a SL – 234
- 9) sušárna BMT, typu ECOCELL
- 10) mechanické pipety značky Eppendorf
- 11) elektrická muflová pec ELSKLO spol. s r.o.
- 12) laboratorní sklo
- 13) chemikálie

Hodnoty rozborů vody, které byly zjišťovány pomocí přístrojů uvedených výše, byly měřeny zpravidla v intervalu jednoho týdne. Pro stanovení hodnot VL, NL, RL a ztráty žiháním, bylo užito získávání dat v intervalu jednou za tři až čtyři týdny. Pro potřeby rozborů se pracovalo v laboratoři se vstupní vodou z kanystru a dále pak s vodou v reaktoru a vodou odtékající z reaktoru, která byla zachycována v dosazovací nádrži. Tato voda se poté odebírala do umělohmotných zkumavek o objemu 10 ml, které byly následně odstředovány v odstředivce Hettlich – Rottina 420. Doba odstředění byla stanovena na minimálně 12 minut a otáčky byly nastaveny na rychlost 9 500 ot./min. Při tomto čase a otáčkách se dostatečně oddělila nerozpuštěná část ve vzorku od zbývající vody a tím byl zajištěn dostatek materiálu k provádění pokusů.

4.4.1 Určení hodnot pH, stanovení koncentrace rozpuštěného kyslíku, průtoku a teploty

Stanovení parametrů kalové vody v reaktoru - pH, teploty, koncentrace rozpuštěného kyslíku, se provádělo zpravidla jednou týdně, popřípadě vícekrát a na přítoku do reaktoru se stanovoval průtok. Pomocí přenosného pH metru WTW pH 340i, uchovávaného v roztoku KCL (3 M/l), se stanovovalo pH, poté co se vložil do měřené kapaliny. Po ustálení hodnoty na displeji přenosného pH metru, byla hodnota zaznamenána. Hodnota pH se ještě měřila pomocí měřicího systému Magic XBC. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla měřena pomocí přenosného oxi-metru WTW oxi 340i, který dále zároveň umožňoval měření teploty. Průtok se stanovoval pomocí odměrného válce o objemu 100 ml, který se naplnil vstupní odpadní vodou. Následně do něj byla umístěna odčerpávací hadice, která čerpala kontinuálně vodu z odměrného válce. Hodnota průtoku se měřila po dobu jedné hodiny a poté byla vynásobena dvaceti čtyřmi, aby se dospělo k výsledku denního průtoku systému.

4.4.2 Stanovení koncentrace forem dusíku

Postup stanovení koncentrace anorganických sloučenin dusíku byl zahájen odebráním vzorků vody do zkumavek. Následným odstředěním vzorků a poté přesným ředěním pomocí demineralizované vody v baňkách o objemu 50 ml, ve kterých se stanovovala koncentrace rozpuštěných N-amon a N-NO₂⁻ byl postup dokončen. Do již zředěných příslušných vzorků se aplikovala patřičná činidla, která zbarvila vzorky do specifických odstínů barev. Poté se vzorky měřily a vyhodnocovaly na spektrofotometru HACH DR/4000.

4.4.2.1 N-amon

Zastoupení amoniakálního dusíku ve vzorku kalové vody se stanovovalo pomocí metody, která byla popsána Horákovou et al. (2003). Koncentrace N-amon se měřila ze vstupní a výstupní kalové vody. Jednalo se o indofenolovou metodu, která využívá reakce amoniaku, salicylanu a chlornanu za vzniku sloučeniny indofenolového typu. Spektrofotometr je schopen měřit vzorky v rozmezí od 0,1 až 1,0 mg/l amoniakálního dusíku. Absorbance se měřila v hranaté kyvetě optické dráhy 1 cm vlnové délky 655 nm.

4.4.2.2 N-NO₂⁻

Zastoupení dusitanového dusíku bylo stanovováno dle Horákové et al. (2003), spektrofotometricky, pomocí absorbance vlnové délky 540 nm. Potřebného zbarvení vzorků bylo dosahováno přidáním činidel kyseliny sulfanilové a N-(1-naftyl)-1,2-ethylendiamindihydrochloridu. Rozbor se prováděl pouze z výstupní kalové vody. Pro potřeby správného měření byl vzorek naředěn na hodnoty od 0,025 až 0,15 mg/l N-NO₂⁻. Doba potřebná na vybarvení vzorku byla stanovena na minimálních 20 minut. Pro potřeby měření byl vzorek měřen kyvetou o velikosti jednoho palce.

4.4.2.3 N-NO₃⁻

Zastoupení dusičnanového dusíku ve vzorcích odpadní vody bylo prováděno pouze na výstupu. Stanovení koncentrace N-NO₃⁻ se řídilo postupem popsaným Horákovou et al. (2003), kdy se vzorek naředil do vhodné koncentrace N-NO₃⁻ od 1,0 – 12,0 mg/l a byl ve skleněné vialce poměřován s 2, 6-dimethylfenolem. Absorbance se měřila při vlnové délce 324 nm.

4.4.3 CHSK

Pro stanovení hodnot chemické spotřeby kyslíku bylo zapotřebí vzorky odstředit. Vzorky se odebíraly ze vstupní i výstupní vody. Po aplikaci všech potřebných činidel do vialky o velikosti 16 mm, postup popsán u Horákové et al. (2003), se stanovovaná hodnota změřila spektrofotometrem HACH DR/4000 při vlnové délce 600 nm. Pro vhodné měření se vzorky ředily v rozmezí od 50 do 800 mg/l. Pro správný výpočet CHSK na výstupu se užívalo

korekce naměřených výsledků, aby byla eliminována chyba, spojená s oxidací dusitanů. Vzorec eliminace oxidace dusitanů pro výpočet CHSK na výstupu je uveden níže.

$$\text{CHSK}_v = \text{CHSK}_n - (1,1422 \cdot \text{N-NO}_2^-) \quad (7)$$

4.4.4 VL, RL, NL a ztráta žiháním

Hodnota koncentrace veškerých látek, rozpuštěných látek a nerozpuštěných látek se stanovovala z odstředěných vzorků kalové vody jak na vstupu, v reaktoru (pro zjištění hodnot kalu), tak i na odtoku. Pro stanovení se použilo gravimetrické metody popsané Horákovou et al. (2003). Metodou ztráty žiháním se stanovovaly látky VL_{org} , RL_{org} , NL_{org} a RAS (rozpuštěné anorganické soli) (Horáková et al., 2003).

4.5 Použité výpočty

Pro potřeby zhodnocení funkce chodu reaktoru, byly použity různé typy výpočtů, které nám pomohly s posouzením stavu.

- Hydraulická doba zdržení vody (Θ)

$$\Theta = V / Q \quad [\text{dny}] \quad (8)$$

V je objem nádrže udáván v $[\text{m}^3]$.

A Q je průtok, jakým je voda čerpána ze vstupu do reaktoru $[\text{m}^3/\text{den}]$.

- Objemové zatížení (B_v)

$$B_v = (Q \cdot \rho_1) / V = \rho_1 / \Theta \quad [\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})] \quad (9)$$

ρ_1 je koncentrace znečištění kalové vody buď amoniakálním dusíkem, nebo CHSK. Udává se v $[\text{kg}/\text{m}^3]$.

- Objemová rychlost odstraňování znečištění (r_v)

$$r_v = (\rho_1 - \rho_2) / \Theta \quad [\text{kg}/(\text{m}^3 \cdot \text{d})] \quad (10)$$

ρ_2 je míra znečištění kalové vody na výstupu z reaktoru buď amoniakálním dusíkem, nebo CHSK. Udává se v $[\text{kg}/\text{m}^3]$.

- Procentní zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku na výstupu z reaktoru ($\%_{\text{N-NO}_2^-}$)

$$\%_{\text{N-NO}_2^-} = [\text{N-NO}_2^- / (\text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-)] \cdot 100 \quad (11)$$

N-NO_2^- je koncentrace N-NO_2^- na výstupu. N-NO_3^- je koncentrace N-NO_3^- také na výstupu.

- Účinnost odstranění N-amon ($E_{\text{N-amon}}$) a CHSK (E_{CHSK})

$$E_{\text{N-amon}} = [(\rho_{(\text{N-amon vstup})} - \rho_{(\text{N-amon výstup})}) / \rho_{(\text{N-amon vstup})}] \cdot 100 \quad [\%] \quad (12)$$

$$E_{\text{CHSK}} = [(\rho_{(\text{CHSK vstup})} - \rho_{(\text{CHSK výstup})}) / \rho_{(\text{CHSK vstup})}] \cdot 100 \quad [\%] \quad (13)$$

$\rho_{(\text{N-amon výstup})}$ a $\rho_{(\text{N-amon vstup})}$ je koncentrace N-amon z výstupu a vstupu. $\rho_{(\text{CHSK výstup})}$ a $\rho_{(\text{CHSK vstup})}$ je koncentrací CHSK z výstupu a vstupu.

- Výpočet FA a FNA

$$\text{FA} = 17/14 \cdot \rho_{(\text{N-amon})} \cdot 10^{\text{ph}} / [\exp(6344/(273 + T)) + 10^{\text{ph}}] \quad [\text{mg}/\text{l}] \quad (14)$$

$$\text{FNA} = 47/14 \cdot \rho_{(\text{N-NO}_2^-)} / [\exp(-2300/(273 + T)) \cdot 10^{\text{ph}}] \quad [\text{mg}/\text{l}] \quad (15)$$

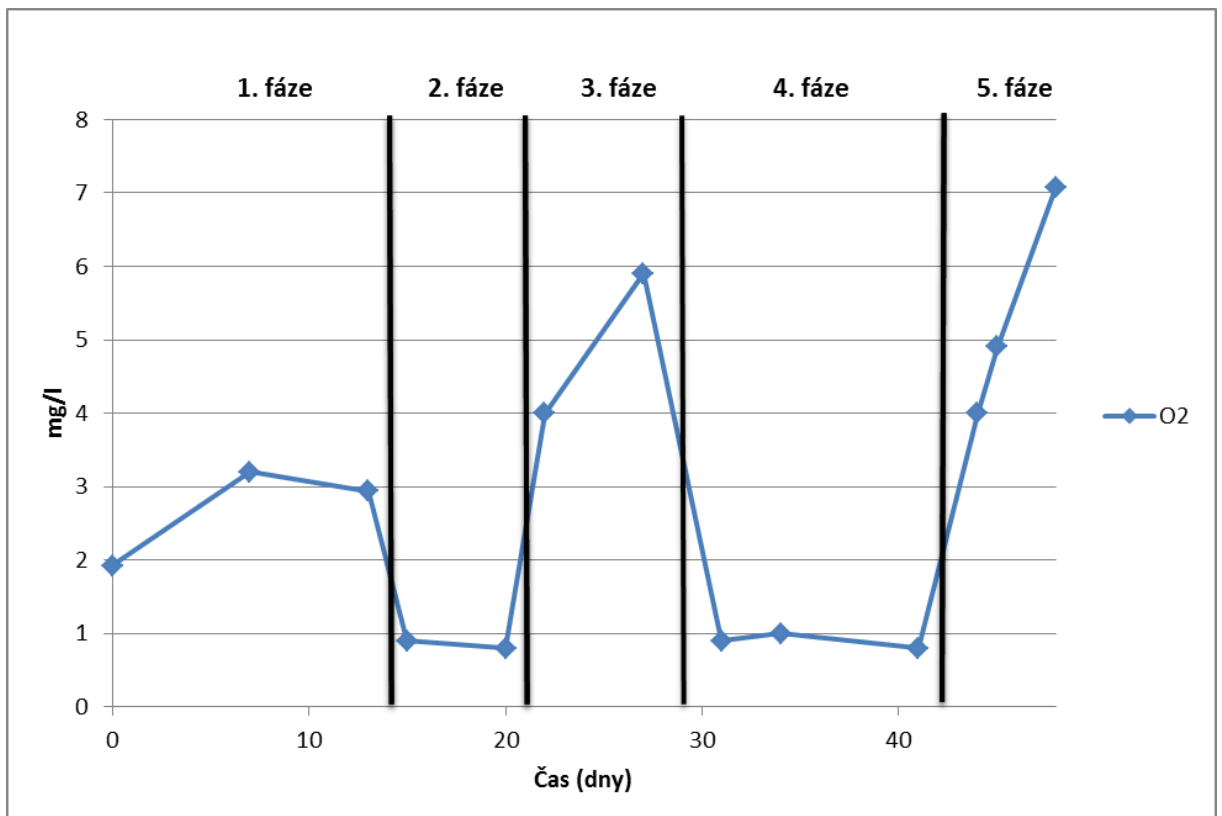
FA a FNA je momentální koncentrace FA a FNA.

5 Výsledky

V nadcházející kapitole budou uvedeny výsledky měření experimentu, znázorněny grafy a popsán průběh provozu modelu M7.

5.1 Koncentrace kyslíku v reaktoru

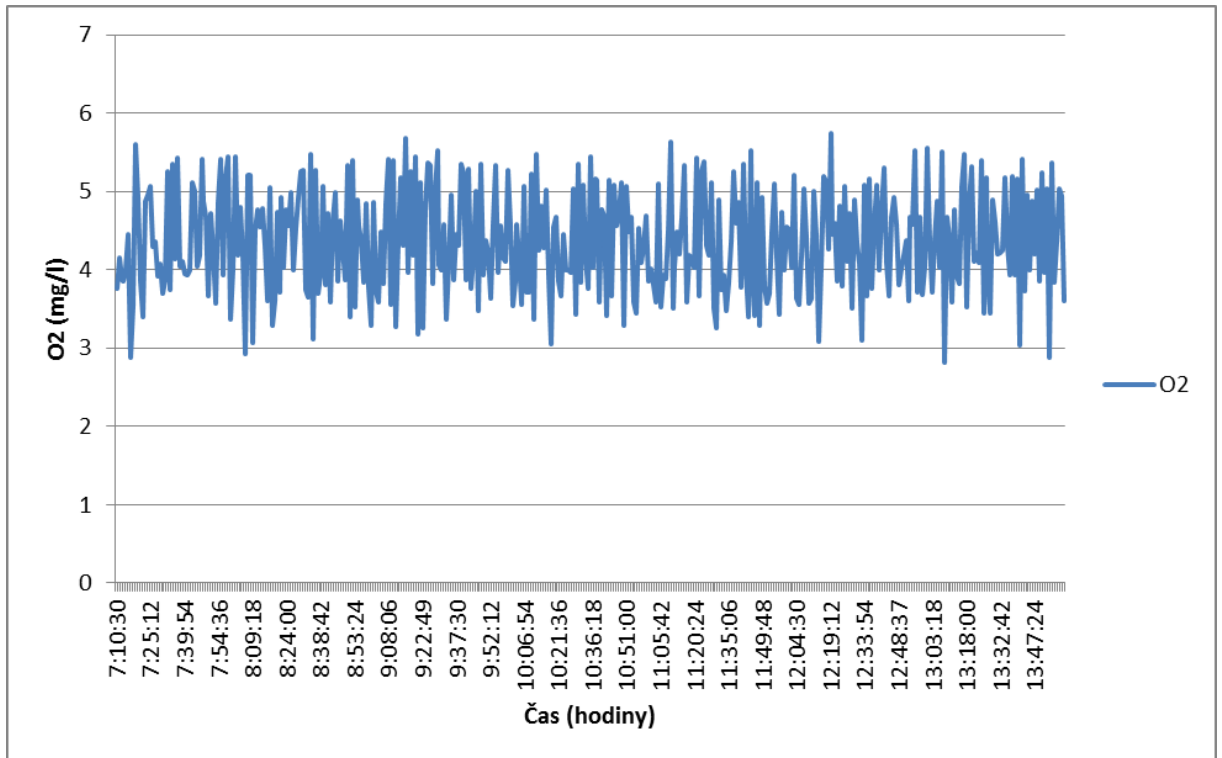
Koncentrace kyslíku v reaktoru byla zásadní veličinou, která se upravovala pro chod a potřeby prováděných pokusů. Pro názornost jsou dále zobrazeny grafy, ve kterých je koncentrace rozpuštěného kyslíku zaznamenána.



Obrázek č. 4: Změny koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru, (jednorázová měření)

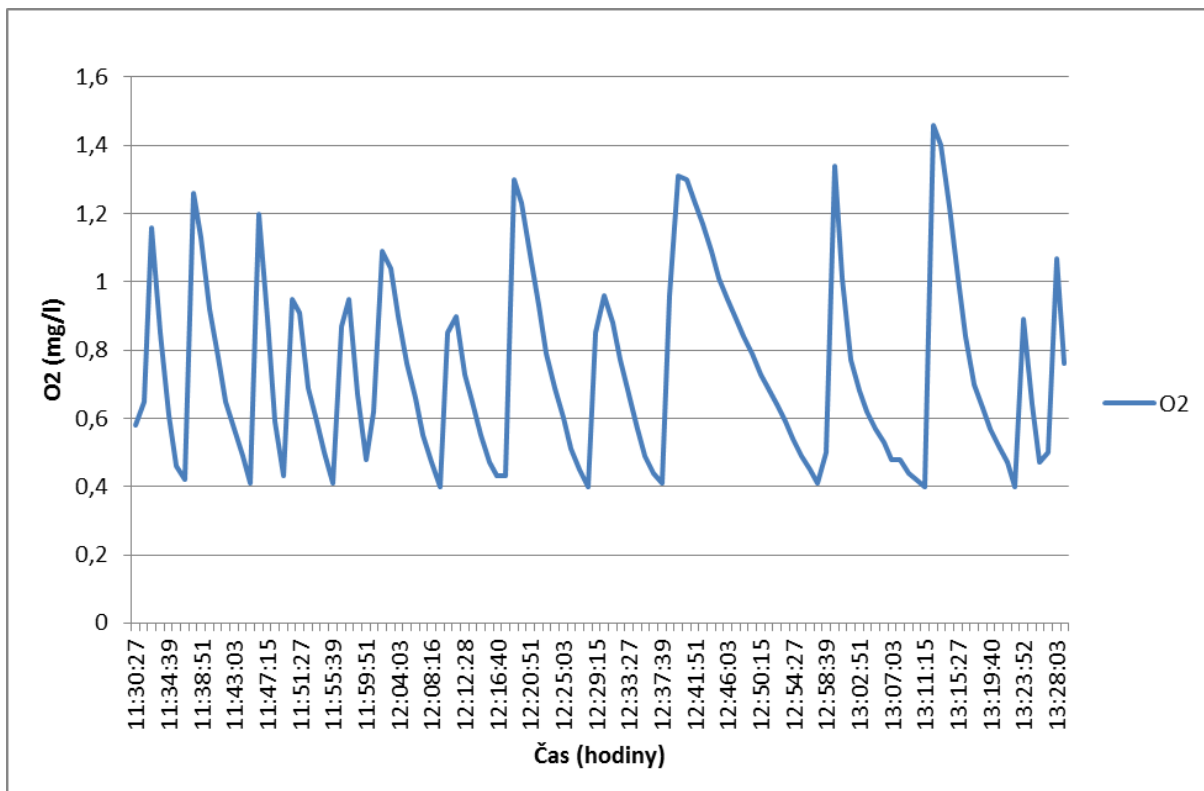
Obrázek č. 4 znázorňuje růst a klesání jednotlivých měření koncentrace kyslíku v reaktoru za celé období. V první fázi byla koncentrace rozpuštěného kyslíku v intervalu od 1,92 do 3,2 mg/l. V druhé fázi byla limitována koncentrace O₂ v intervalu od 0,8 do 0,9 mg/l. Ve třetí etapě byla koncentrace rozpuštěného kyslíku od 4 do 5,9 mg/l. Čtvrtá etapa byla

znovu limitována a koncentrace O_2 byla v rozmezí od 0,8 až 1,0 mg/l. V páté etapě byla koncentrace rozpuštěného kyslíku od 4 do 7,1 mg/l.



Obrázek č. 5: Výkyvy koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru modelu (24.02.2016, 6. měření, fáze 2)

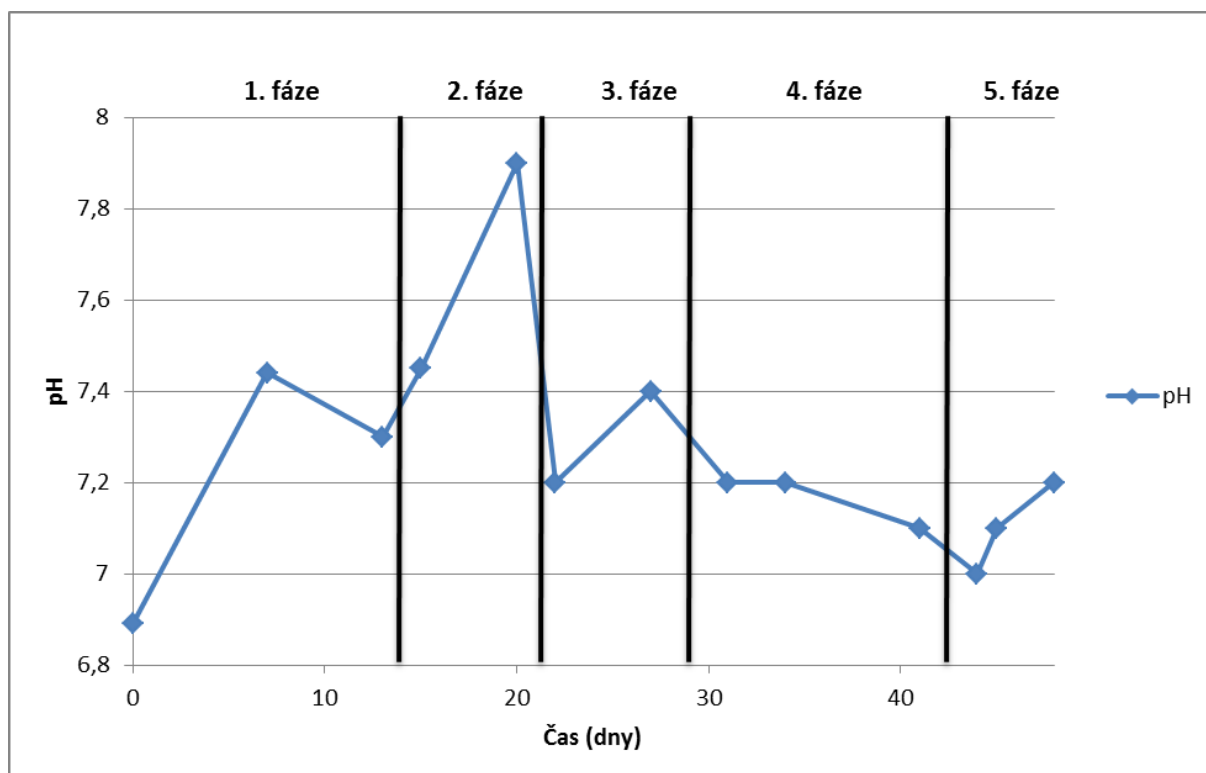
Fungování kontinuálního měření aerace je vidět na obrázku č. 5. Je uveden pohyb koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru, kdy byla nastavena koncentrace O_2 na hodnotu 4 mg/l s hysterezí -0,1 až +0,1 mg/l. Osa x ukazuje krátký časový údaj, vybraný z celkového měření.



Obrázek č. 6: Výkyvy koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru modelu (15.02.2016, 3. měření, fáze 1)

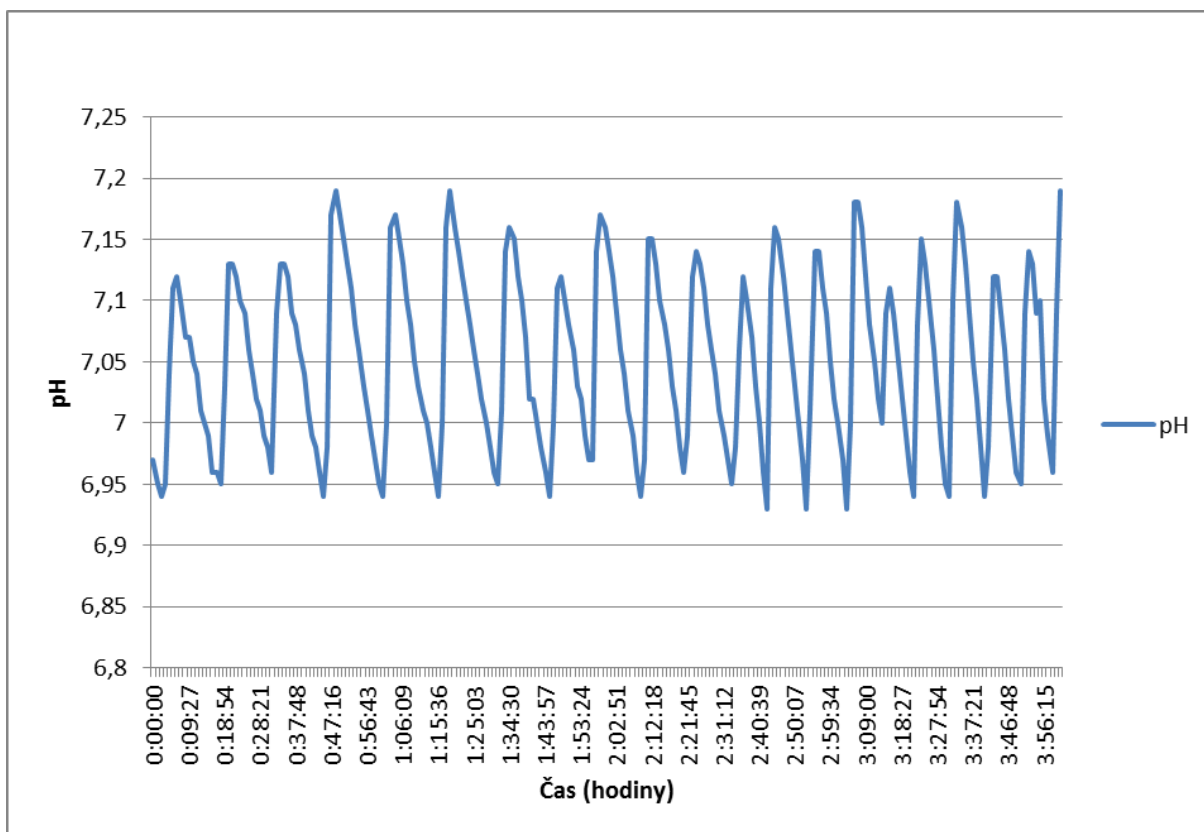
Na obrázku č. 6 je patrný pohyb koncentrace O₂, kdy se nastavení limitace rozpuštěného kyslíku záměrně snížilo na 0,8 mg/l s hysterezí -0,1 až +0,1 mg/l. Byl použit pouze krátký časový interval zaznamenání měření, který byl vyjmutý z celkového průběhu měření.

5.2 Hodnota pH



Obrázek č. 7: Hodnoty pH v průběhu celého pokusu

Na obrázku č. 7 jsou uvedeny jednorázově naměřené hodnoty pH za měřené období. V první fázi byly hodnoty pH v intervalu od 6,9 až do 7,4. V druhé fázi hodnoty dosahovaly 7,5 až 7,9 pH. 3. fáze reprezentovala hodnoty pH 7,2 až 7,4 pH. Ve čtvrté fázi byla hodnota relativně stabilní, kdy průměrná hodnota pH byla 7,2. V poslední, 5. fázi, byl průměr hodnot pH 7,1.



Obrázek č. 8: Výkyvy hodnot pH v reaktoru modelu (24.02.2016, 6. měření, fáze 3)

Obrázek č. 8 zobrazuje kolísání hodnot pH měřených kontinuálně, za krátký časový interval čtyř hodin, kdy pH bylo nastaveno na hodnotu 7 s hysterezí -0,05 až +0,05.

5.3 Zastoupení forem dusíku na výstupu z reaktoru

Na obrázku č. 9 jsou zřetelné změny koncentrací forem dusíku v průběhu etap jedna až pět. V první etapě byl na odtoku majoritně zastoupen dusičnanový dusík. Koncentrace dusičnanů v odtoku z reaktoru v první fázi byla v průměru 752,8 mg/l. Koncentrace amoniakálního a dusitanového dusíku je v první fázi oproti dusičnanovému dusíku velmi malá a to v průměru 22,1 mg/l, respektive 0,9 mg/l.

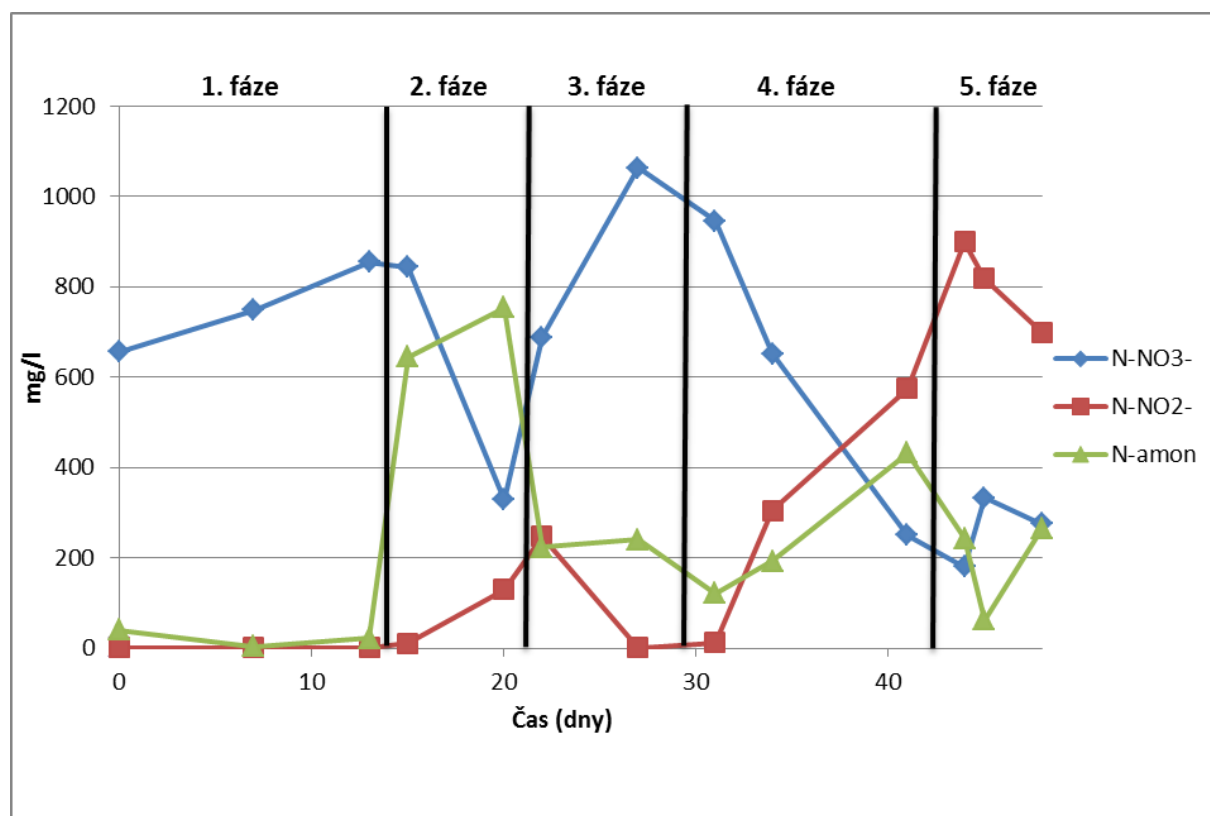
Během druhé etapy dusičnanový dusík prudce klesá z hodnot koncentrace 844 mg/l na 328,5 mg/l. Naopak stoupá koncentrace dusitanového dusíku z 10,9 mg/l na 129,6 mg/l. Také se zvýšila koncentrace amoniakálního dusíku na 645,3 mg/l a na 754,2 mg/l.

Ve třetí etapě následují znovu změny koncentrace různých forem dusíku na odtoku. Koncentrace dusičnanů dosáhla 688 mg/l až 1062,9 mg/l. Koncentrace dusitanů klesá a to

z 247 mg/l na 0,81 mg/l. Koncentrace amoniakálního dusíku byla ve třetí etapě celkem konstantní a to od 223,5 mg/l do 239,9 mg/l.

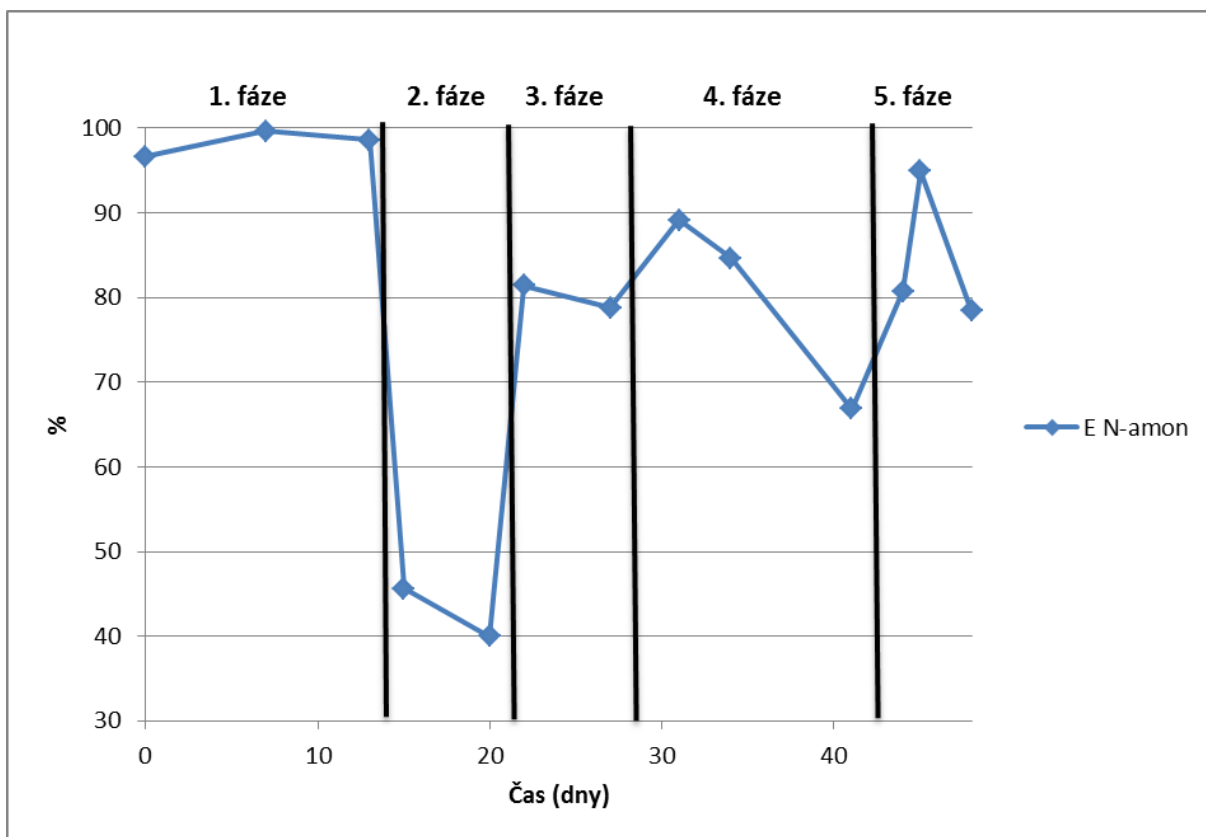
Ve čtvrté etapě koncentrace dusičnanů klesá až pod hodnotu koncentrace dusitanů a to z 945 mg/l na 250 mg/l. Naopak koncentrace dusitanů roste a to z 12,9 mg/l do 575 mg/l. Koncentrace amoniakálního dusíku byla v rozmezí 122 mg/l až 432,6 mg/l.

V poslední, páté, etapě je dramaticky vyšší koncentrace dusitanů nad zbylými formami dusíku. Dusitany mají v páté etapě koncentraci 899 mg/l a klesají až na koncentraci 700 mg/l. Koncentrace dusičnanů se pohybovala v rozmezí od 180,5 mg/l do 333 mg/l. Koncentrace amoniakálního dusíku se pohybovala v páté etapě v intervalu od 62,6 mg/l do 263,9 mg/l.



Obrázek č. 9: Zastoupení forem dusíku na výstupu z reaktoru

5.4 Odstranění N-amon



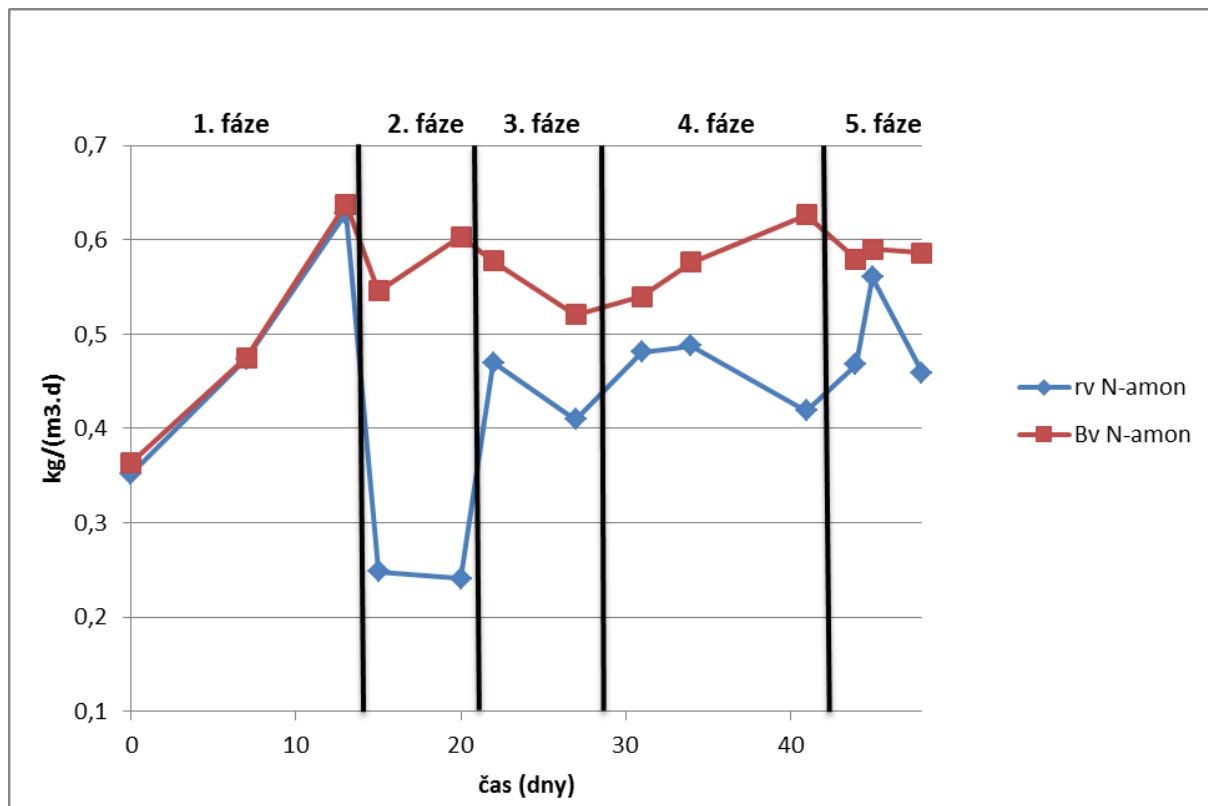
Obrázek č. 10: Účinnost odstranění N-amon

Účinnost odstranění amoniakálního dusíku v průběhu jednotlivých etap nebyla celkově stabilní. V průměru první etapy byla 98,3 %. To dokazuje i obrázek č. 10, kde vidíme procenta účinnosti odstranění N-amon. Ve fázi dva byla účinnost odstranění N-amon v průměru 42,8 %. Ve třetí etapě se účinnost odstranění znovu navýšila na průměrnou hodnotu 80,1 %. Ve čtvrté fázi se účinnost odstranění N-amon pohybovala v rozmezí od 66,9 % do 89,1 %. Během poslední, páté fáze účinnost odstranění N-amon vystoupala až na 94,9 % a poté klesla na 78,4 %.

Na obrázku č. 11 je znázorněna objemová rychlost odstranění amoniakálního dusíku a objemové zatížení amoniakálním dusíkem.

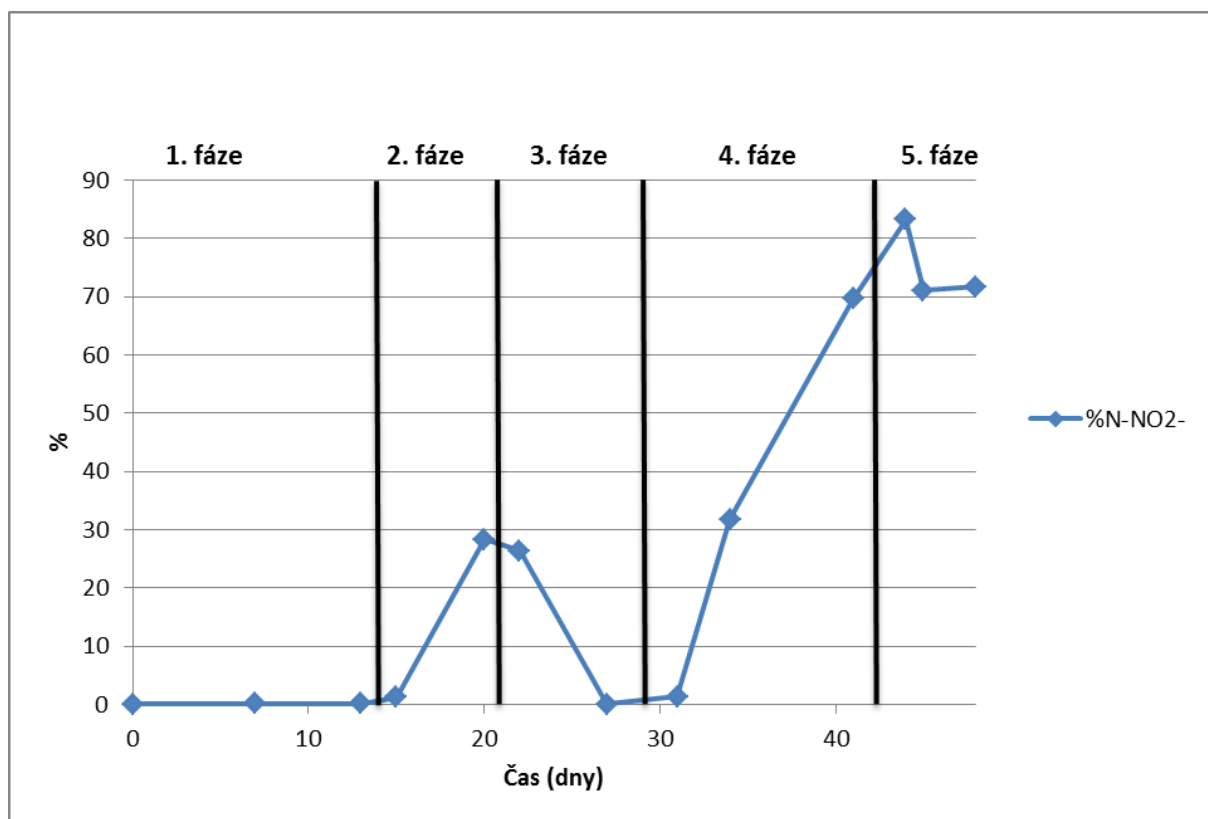
Objemová rychlost odstranění N-amon byla během první fáze v intervalu od 0,35 kg/(m³.d) do 0,63 kg/(m³.d). Následuje prudký propad objemové rychlosti odstranění N-amon na 0,25 kg/(m³.d) a dále pak na 0,24 kg/(m³.d). Ve třetí fázi objemová rychlost odstranění N-amon narostla na 0,47 kg/(m³.d) a poté se snížila na 0,41 kg/(m³.d). Ve čtvrté fázi byl zaznamenán pokles objemové rychlosti odstranění N-amon z 0,49 kg/(m³.d) na 0,42 kg/(m³.d). V páté fázi objemová rychlost odstranění N-amon narostla z 0,47 kg/(m³.d) na 0,56 kg/(m³.d) a poté znovu klesla na 0,46 kg/(m³.d).

Objemové zatížení systému amoniakálním dusíkem v první etapě bylo v rozmezí 0,36 kg/(m³.d) do 0,64 kg/(m³.d). V druhé fázi byl zaznamenán pokles objemového zatížení systému na 0,55 kg/(m³.d) s následným nárůstem na 0,60 kg/(m³.d). Ve třetí fázi objemové zatížení systému amoniakálním dusíkem klesá na 0,58 kg/(m³.d) a dále až na 0,52 kg/(m³.d). Ve čtvrté fázi byly naměřeny hodnoty mezi 0,54 kg/(m³.d) až 0,63 kg/(m³.d). Během páté fáze bylo objemové zatížení systému amoniakálním dusíkem stabilní, kdy dosahovalo 0,58 kg/(m³.d) až 0,59 kg/(m³.d).



Obrázek č. 11: Objemová rychlost odstranění N-amon a objemové zatížení systému amoniakálním dusíkem

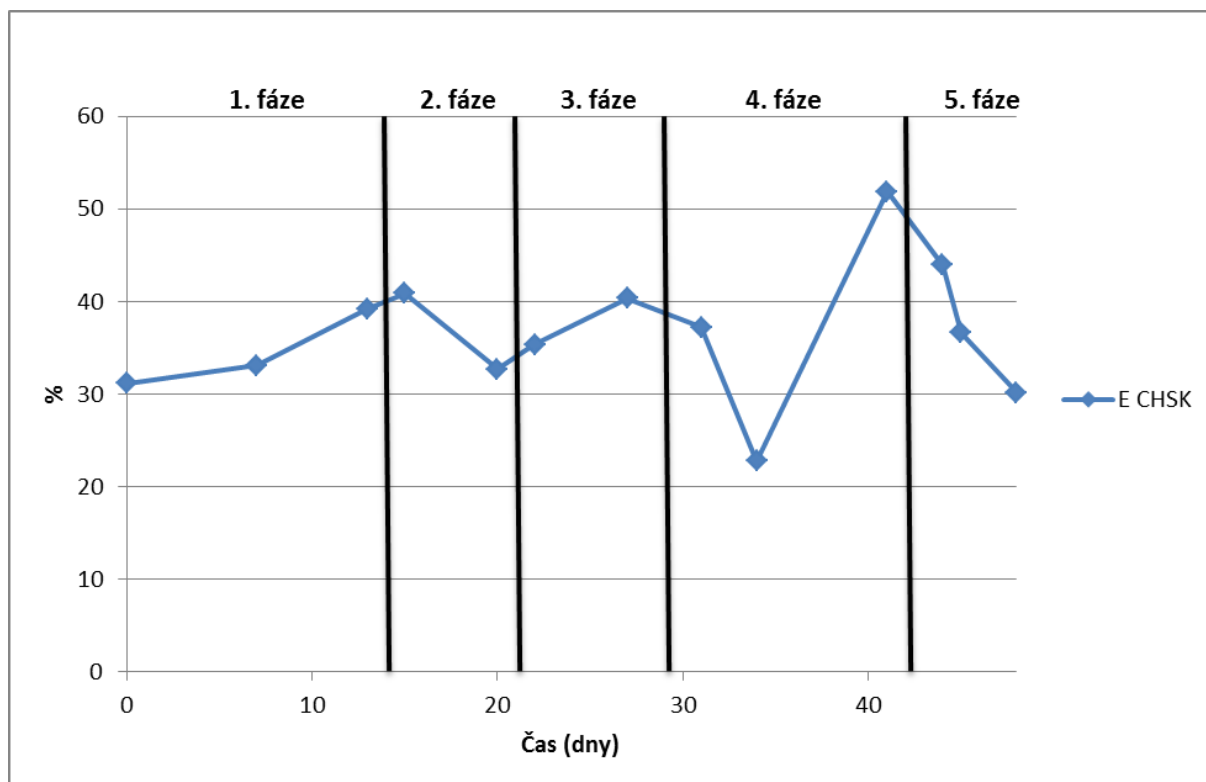
5.5 Zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku na výstupu z reaktoru



Obrázek č. 12: Procentní zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku

Obrázek č. 12 ukazuje vývoj procentního zastoupení N-NO_2^- z celkového množství oxidovaných forem. Procentní zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami v první fázi pokusu bylo téměř nulové, od 0,06 % do 0,15 % a ve druhé fázi bylo zastoupeno v intervalu od 1,28 % do 28,29 %. Třetí fáze zaznamenává pokles procentního zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku z 26,42 % na 0,08 %. Zatímco ve čtvrté fázi zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku narůstá z 1,35 % na 68,7 %. V konečné páté fázi se procentní zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dostává až na 83,28 % a poté mírně klesá na 71,01 %.

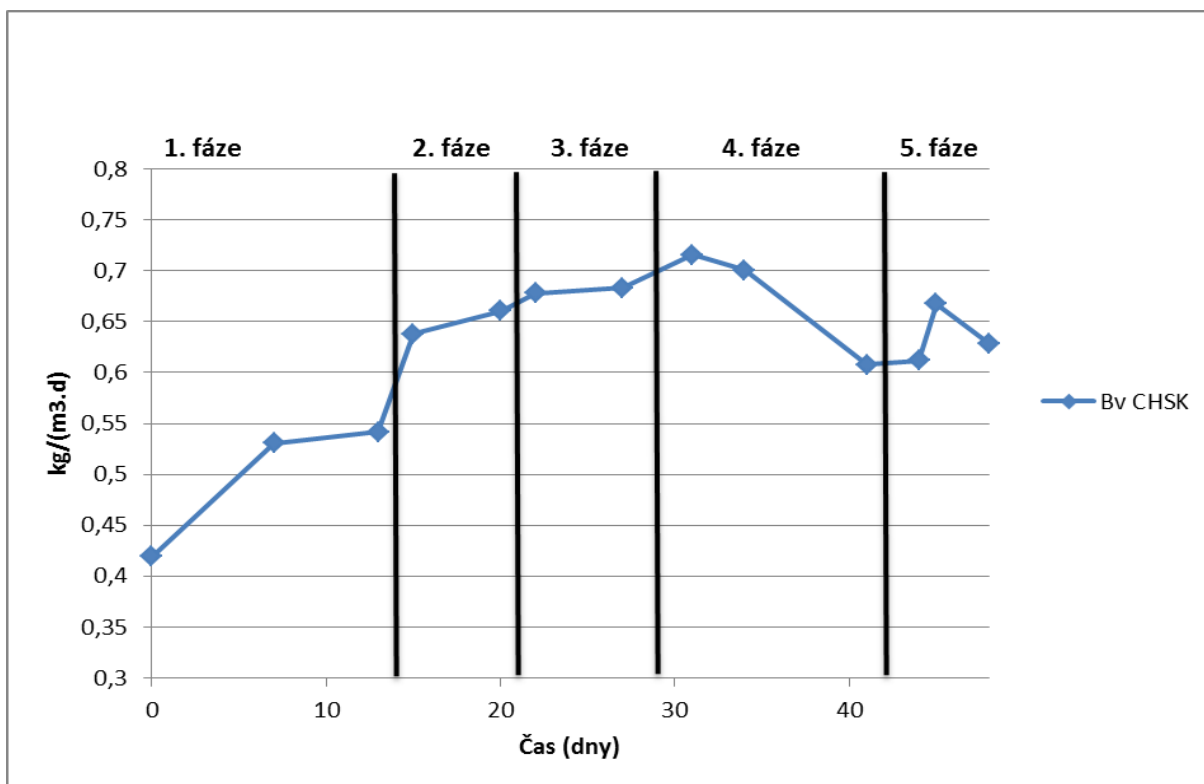
5.6 Účinnost odstranění a objemové zatížení CHSK



Obrázek č. 13: Účinnosti odstranění CHSK

Účinnosti odstranění CHSK se dá z obrázku č. 13 popsat ve fázích jedna až tři jako více méně stabilní. Hodnota účinnosti v těchto fázích se pohybovala v průměru 36,1 %. Ve čtvrté fázi nastal větší výkyv, kdy se hodnota účinnosti odstranění CHSK pohybovala mezi 22,8 % až 51,9 %. V následné páté etapě účinnost odstranění CHSK již jen klesala na 30,2 %.

Objemové zatížení CHSK je znázorněno na obrázku č. 14. Naměřené objemové zatížení CHSK v první etapě dosahovalo 0,42 kg/(m³.d) až 0,54 kg/(m³.d). Ve druhé fázi bylo naměřeno rozmezí od 0,64 kg/(m³.d) do 0,66 kg/(m³.d). Během třetí fáze se objemové zatížení CHSK pohybovalo na konstantní hodnotě 0,67 kg/(m³.d) až 0,68 kg/(m³.d). Ve čtvrté fázi se objemové zatížení CHSK snižovalo z 0,72 kg/(m³.d) až na 0,61 kg/(m³.d). Během páté etapy se objemové zatížení CHSK pohybovalo mezi 0,61 kg/(m³.d) až 0,67 kg/(m³.d).



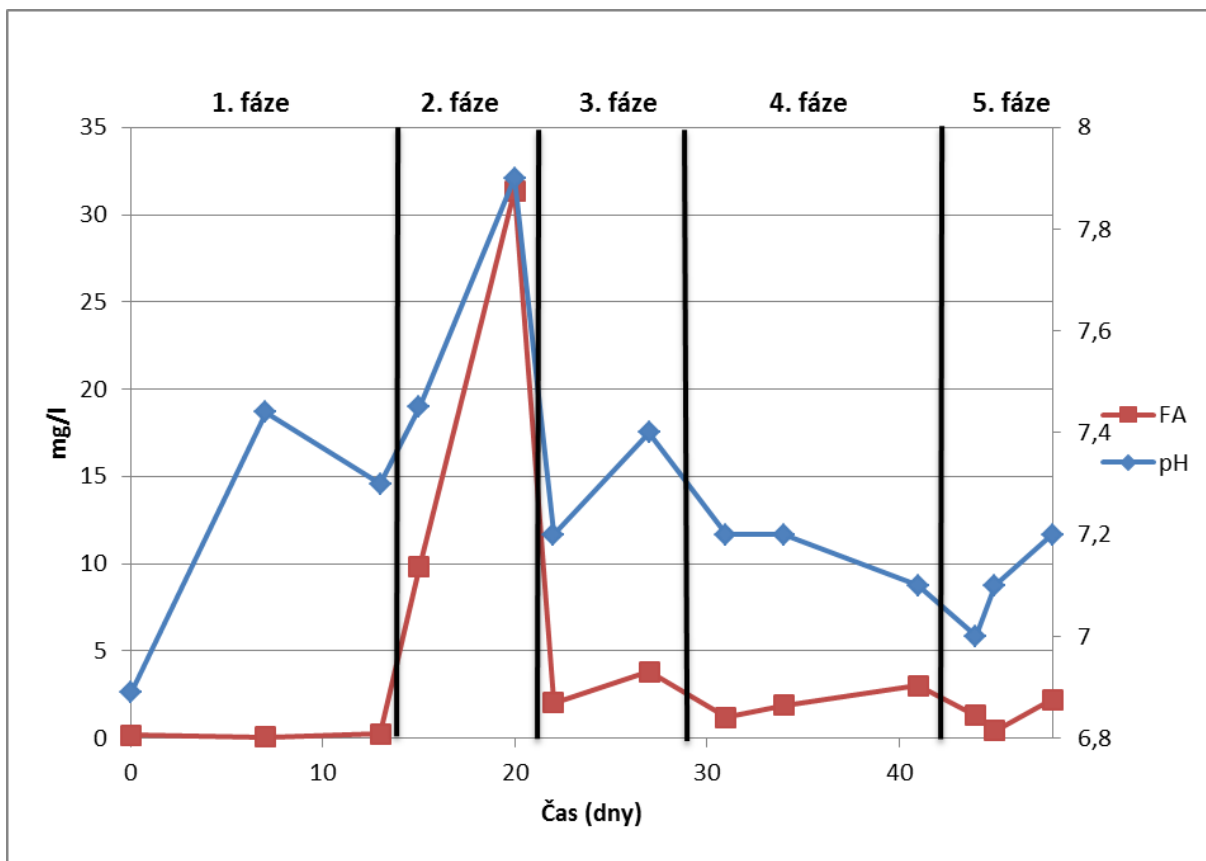
Obrázek č. 14: Objemové zatížení CHSK

5.7 Zastoupení FA a FNA

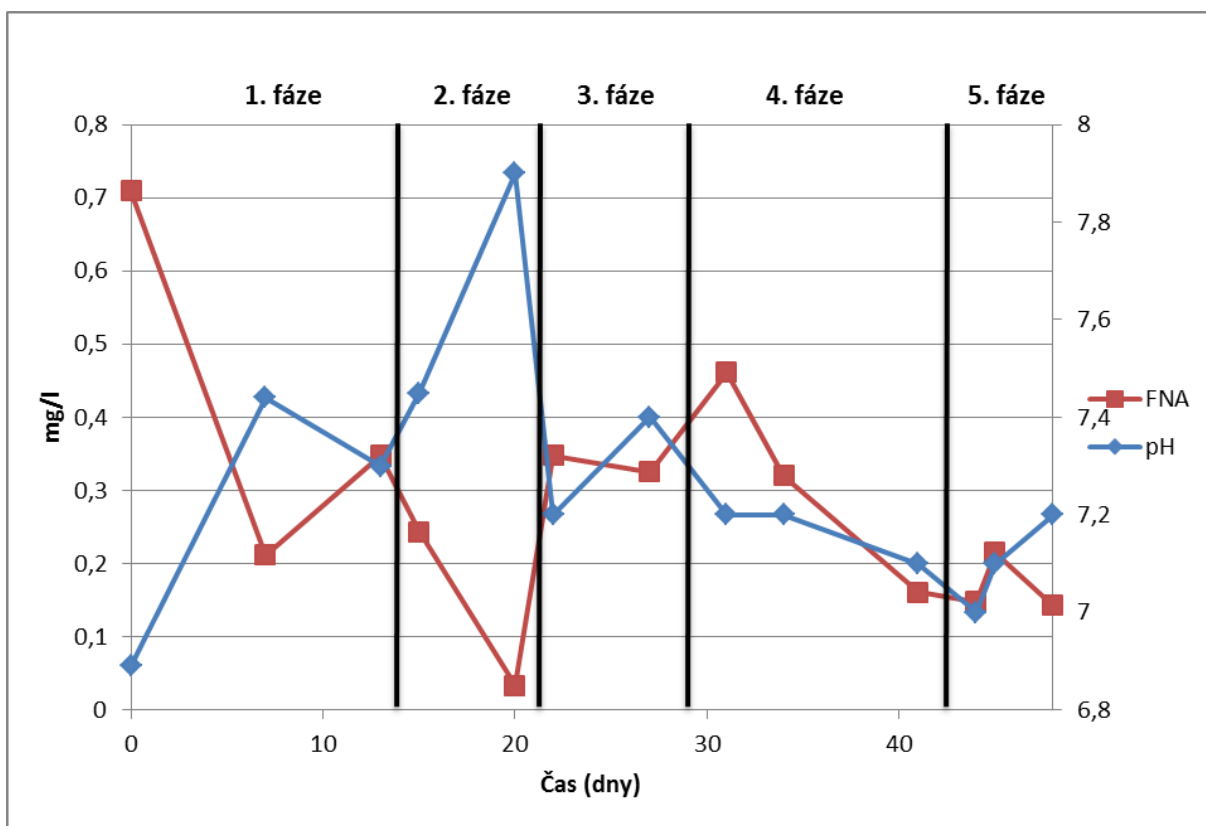
Koncentrace FA a FNA je uvedena na obrázcích č. 15 a 16. Dále je do obrázků pro přehlednost vložena křivka hodnot pH.

Obrázek s číslem 15 znázorňuje koncentraci FA. V první fázi nedošlo k žádnému výraznému výkyvu. Koncentrace FA se pohybovala mezi 0,07 mg/l až 0,24 mg/l. V druhé fázi byl skokový nárůst koncentrace FA až na 31,37 mg/l. Ve třetí fázi nastal pokles FA na hodnotu 2,0 mg/l a poté se mírně zvýšila na 3,81 mg/l. V následující, čtvrté fázi se koncentrace FA držela na 1,2 mg/l až 3,0 mg/l. V poslední, páté fázi koncentrace FA klesla až na 0,43 mg/l a poté mírně stoupla na 2,22 mg/l.

Koncentrace FNA je uvedena na obrázku č. 16. Koncentrace FNA se v první fázi pohybuje mezi 0,71 mg/l až 0,21 mg/l. Ve druhé fázi koncentrace FNA klesá až na 0,04 mg/l. Koncentrace ve třetí fázi vystoupala na 0,35 mg/l a klesla na 0,32 mg/l. Ve čtvrté fázi koncentrace FNA dosáhla vrcholu 0,46 mg/l a klesala na 0,16 mg/l. Fáze číslo pět zaznamenává koncentraci FNA v rozmezí 0,15 mg/l až 0,21 mg/l.



Obrázek č. 15: Zastoupení FA s hodnotou pH



Obrázek č. 16: Zastoupení FNA s hodnotou pH

6 Diskuze

V následujícím textu této kapitoly budou zhodnoceny získané výsledky a porovnány s výsledky publikovanými dalšími autory.

6.1 Hodnota pH

Hodnota pH byla v průběhu experimentu regulována pro zajištění neutrálních hodnot v reaktoru, aby nedocházelo k výrazným výkyvům, jak tomu může být u systémů v režimu SBR (Švehla et al., 2014). Nitrifikační bakterie mají tendenci okyselovat prostředí, a tím způsobovat inhibici procesu (Buday et al., 1999).

Upravováním pH na hodnotu 7 bylo docíleno podmínek, kdy neutrální hodnota pH nezvýhodňuje ani jednu skupinu nitrifikačních bakterií. Z toho vychází, že průběh nitrifikace kalové vody, účinnost a změny v poměru oxidovaných forem, byly ovlivňovány hlavně změnami koncentrace kyslíku (Pacek et al., 2011). Což potvrdily i výsledky našeho experimentu. Předpokládáme, že důvodem zvyšování pH, je snížená aktivita nitrifikačních bakterií, způsobená limitací O_2 .

Kalová voda z čistírny odpadních vod má za běžných podmínek hodnotu pH kolem 8. Při tlumení aktivity nitrifikačních bakterií, díky limitování O_2 , dochází ke zvyšování pH, jak dokazují hodnoty ve druhé fázi našeho experimentu. pH v reaktoru vystoupalo na 7,9. Pro regulaci pH byl v našem případě aplikován NaOH. Ten neutralizoval pH. V případě větší frekvence výskytu zvyšování hodnoty pH by bylo možné uvažovat o aplikaci vhodného činidla, které navýšené pH dokáže neutralizovat. Je ovšem nutné zvážit ekonomické dopady této aplikace.

Z obrázku č. 8 lze vyčíst výkyvy hodnot pH, kdy se peristaltické čerpadlo, dávkující NaOH, spouštělo při poklesu pH na 6,95 a mělo zastavit proces zvyšování pH při dosažení hodnoty 7,05. Přesto hodnota pH stoupala až k hodnotám 7,18. To mohlo být způsobeno přísunem zbytku zásaditého činidla v dávkujících hadičkách vždy po vypnutí čerpadla.

6.2 Vliv koncentrace kyslíku na formy dusíku na odtoku

Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla během experimentu v reaktoru regulována. Z výsledků je patrné, že když koncentrace rozpuštěného kyslíku byla nad 3 mg/l, což je hodnota, která zajišťuje dostatek koncentrace kyslíku pro činnost všech nitrifikačních bakterií v reaktoru (Ruiz et al., 2003; Chudoba et al., 1991), tak zastoupení dusitanů bylo téměř nulové, při koncentraci dusičnanů nad 600 mg/l. Při poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru na 0,5 mg/l – 0,8 mg/l se inhibovala činnost nitratačních bakterií a zastoupení forem dusíku se měnilo. Koncentrace N-NO_2^- výrazně vzrostla z téměř nuly na 247 mg/l a koncentrace dusičnanů klesla z cca 600 mg/l na 328,5 mg/l. K podobným principům dospěli i Wang et Yang, (2004). Z toho se dá dále usuzovat, že koncentrace rozpuštěného kyslíku ovlivňuje činnost nitritačních a nitratačních bakterií, a tím i koncentraci dusitanů a dusičnanů. Tento závěr je v souladu s již publikovanými pracemi Packa et al. (2014); Ruize et al. (2003). Stejně tak Guisola et al. (2005) uvádí, že koncentrace rozpuštěného kyslíku pod 0,7 mg/l omezuje činnost nitratačních bakterií, přičemž aktivitu nitritačních bakterií neomezuje.

Ačkoliv v páté etapě našeho pokusu byla nastavena koncentrace rozpuštěného kyslíku na 4 mg/l, tedy byla ukončena limitace rozpuštěného kyslíku, nedošlo k rapidnímu zvýšení činnosti nitratačních bakterií a zvýšení zastoupení dusičnanů v reaktoru. Stále docházelo k přeměně téměř veškerého N-amon na dusitany až do konce experimentu. Tento jev probíhající na přelomu 4. a 5. fáze by se dal vysvětlit jako spolupůsobení limitace kyslíku a nastaveného objemového zatížení, kde byl omezeně dostupný kyslík využit především na oxidaci N-amon aktivnějšími nitritačními organismy a poté již nezbyval dostatek rozpuštěného kyslíku na druhý stupeň nitrifikace v poslední, páté, fázi pokusu. Lze také připustit možnost, že aktivita nitratačních bakterií, v již nelimitované fázi koncentrace kyslíku, mohla být omezena následkem specifické činnosti nitritačních bakterií, spočívající ve vlivu jejich metabolitů na nitratační bakterie i při udržování neutrální hladiny pH. Jako inhibitor nitratačních bakterií se může považovat například meziproduct nitritace – hydroxylamin, který může ovlivňovat hromadění dusitanů, tedy zastavení průběhu nitrifikace v prvním stupni (Jetten et al., 1998; Yang et al., 2007). Také mohlo dojít, jak uvádí Buday et al. (1999) k inhibici nitratačních bakterií, díky koncentraci disociovaného N-NO_2^- v koncentracích nad 198 mg/l. V našem případě bylo dosaženo v páté fázi koncentrace N-NO_2^- až koncentrace 899 mg/l. Což mělo za následek inhibici tvorby N-NO_3^- až ke koncentraci 180 mg/l.

Další studie od Packa et al. (2014), která ukazuje možné vysvětlení pomalého nárůstu nitratačních bakterií udává, že při limitaci koncentrace kyslíku na hodnotu 0,7 mg/l po dobu 38 dní vede k úbytku významného množství nitratačních bakterií a jejich následnému odplavení z reaktoru. S autorem se ztotožňujeme, přestože při našich podmínkách byla nastavena limitace koncentrace kyslíku na 1,0 mg/l a limitace trvala po dobu 16 dnů. Jmenovaný autor udává následnou dobu obnovení původního stavu zastoupení bakterií na 90 dnů.

6.3 Koncentrace FA a FNA v reaktoru

Anthonisen et al. (1976) uvádí, že koncentrace FNA v intervalu od 0,2 mg/l do 2,8 mg/l způsobuje inhibici nitratačních bakterií. Koncentrace FA v rozmezí 0,1 mg/l až 1,0 mg/l inhibuje nitratační bakterie při zachování aktivity nitratačních bakterií.

Koncentrace FA v intervalu 10 mg/l až 150 mg/l inhibuje nitratační bakterie, produkující dusitany (Anthonisen et al., 1976). Ve druhé etapě našeho experimentu dosáhla koncentrace FA maximální hodnoty 31,4 mg/l, což způsobovalo inhibici jak nitratačních, tak i nitratačních bakterií.

V první a třetí až páté fázi koncentrace FA nedosahovala intervalu 10 mg/l až 150 mg/l, pohybovala se od 0,1 do 3,8 mg/l, tudíž všechny procesy mohly probíhat optimálně.

Naměřená koncentrace FNA se pohybovala, mimo druhou fázi měření, v intervalu 0,15 – 0,7 mg/l, tedy v intervalu, inhibujícím činnost nitratačních bakterií, jak uvádí Anthonisen et al. (1976). Inhibice nitratačních bakterií se v našem experimentu projevila pouze částečně.

Interakce FA a FNA s koncentrací rozpuštěného kyslíku v různých fázích pokusu nelze vysledovat a nejsou průkazné. Předpokládáme, že regulovaná střední hodnota pH má podstatný vliv na eliminaci interakcí FA a FNA s rozpuštěným kyslíkem.

6.4 CHSK

V našem případě byla účinnost odstranění CHSK zaznamenána v průměru $36,6 \pm 6,9$ %, což v souvislosti s obsahem organických látek ukazuje na nízké zastoupení snadno rozložitelných organických látek v čištěné vodě.

6.5 Zhodnocení účinnosti odstranění N-amon

Odstranění N-amon je nejvýznamnějším procesem při čištění odpadních vod. V první fázi našeho experimentu při nastavené koncentraci rozpuštěného kyslíku v reaktoru na 3 mg/l účinnost odstranění N-amon dosahovala 96–99 %.

Ve druhé fázi účinnost odstranění N-amon rapidně klesla téměř ze 100 % o více jak polovinu a pohybovala se od 40 % do 46 %. Tyto poznatky jsou ve shodě s Wang et al. (2014); Blackburne et al. (2007), kteří udávají, že při limitaci rozpuštěného kyslíku, například ve skládkových výluzích, za podobných podmínek, ve kterých probíhal náš experiment, v hodnotách pod 1 mg/l, se sníží účinnost odstranění N-amon.

Účinnost odstranění amoniakálního dusíku se dá navýšit, jak zmiňuje Švehla et Jeníček (2004), díky regulaci hodnoty pH alkalickým činidlem. V našem případě se i přes použití NaOH v procesu čištění efekt této metody nepotvrdil. Hodnota pH byla udržována na 7 a účinnost odstranění N-amon kolísala ve druhé i čtvrté fázi, což bylo způsobeno nejspíše limitací koncentrace rozpuštěného kyslíku.

Ruiz et al. (2003) nezaznamenal žádné snížení účinnosti odstranění N-amon při nastavené koncentraci rozpuštěného kyslíku v reaktoru nad 0,5 mg/l. V našem experimentu bylo snížení účinnosti odstranění N-amon zaznamenáno. Účinnost klesla z již zmíněných téměř 100 % až na 40 % při limitaci koncentrace kyslíku 0,5 mg/l až 0,8 mg/l.

Účinnost odstranění N-amon je těsně svázána s poklesem rychlosti odstraňování N-amon. Je také ovlivněna stripováním N-amon do vzduchu, což se může projevit při hodnotě pH kolem 8 a při intenzivním vzdušnění (Hlavínek et Malý, 1996). Vzhledem k poměru námi naměřených koncentrací N-amon na vstupu a součtu forem dusíku na výstupu však změny koncentrace stripováním nebyly významné.

6.6 Procentní zastoupení N-NO₂⁻ mezi oxidovanými formami dusíku

Limitace koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru pod 1 mg/l, jak uvádí Blackburne et al. (2007), vede k produkci dusitanů, což bylo ve shodě s naším experimentem. Procentní zastoupení N-NO₂⁻ mezi oxidovanými formami dusíku se zvýšilo při limitaci rozpuštěného kyslíku na 0,5 až 0,8 mg/l v druhé etapě, kdy vystoupalo téměř z nuly na 28,3 % a poté při navýšení koncentrace rozpuštěného kyslíku opět kleslo. Tento proces byl očekáván i ve čtvrté fázi, kdy se zastoupení N-NO₂⁻ mezi oxidovanými formami dusíku zvyšovalo, díky snížení

koncentrace rozpuštěného kyslíku na 1 mg/l. To bylo námi naměřenými hodnotami i potvrzeno. Zvyšování zastoupení N-NO_2^- mezi oxidovanými formami dusíku ale pokračovalo až do 5. fáze, kde již byla znovu navýšena koncentrace rozpuštěného kyslíku na 4 mg/l. To bylo nejspíše způsobeno setrvačným potlačením činnosti nitratačních bakterií v aktivovaném kalu, například vysokou koncentrací N-NO_2^- (899 mg/l). Vliv na výsledky experimentu a průběh činnosti nitratačních bakterií měla i doba trvání druhé a čtvrté fáze (7 a 16 dní). Jak uvádí Peng et al. (2008), vysoká koncentrace rozpuštěného kyslíku vede ke snížení zastoupení nebo úplnému přerušení akumulace N-NO_2^- maximálně do jednoho týdne od navýšení koncentrace O_2 . Náš experiment byl ukončen po 5 dnech udržování vysoké koncentrace rozpuštěného kyslíku (4 mg/l) ale k vrácení akumulace N-NO_2^- do stavu fáze 3 v tomto časovém intervalu nedošlo.

6.7 Praktické využití získaných poznatků

Protože se pracovalo s reálnými vzorky z čistírny odpadních vod, mohly by být získané poznatky využity v provozech, které pracují s kalovou vodou kontaminovanou vysokými koncentracemi N-amon.

Práce v laboratorních podmínkách prokázala, že koncentrace forem dusíku na výstupu je ovlivňována regulací koncentrace rozpuštěného kyslíku v reaktoru a můžeme ji prakticky využívat za účelem produkce dusitanů v ekonomicky výhodných alternativních metodách.

Poznatky z této diplomové práce lze do budoucna využít k dalšímu směřování výzkumu při používání procesů alternativních metod odstraňování N-amon z odpadních vod.

Praktickou část této diplomové práce by bylo vhodné rozšířit například o analýzu FISH, nebo jednu z dalších metod, schopnou stanovit zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií ve vzorcích. Ta by snáze odhalila mikrobiologické složení aktivovaného kalu z laboratorního modelu. Z technických důvodů ale toto stanovení nebylo možné provést.

7 Závěr

Výsledky této práce je možno sumarizovat následovně:

- Koncentrace rozpuštěného kyslíku je limitujícím faktorem pro zastoupení nitritačních a nitratačních bakterií.
- Zvyšování koncentrace kyslíku v kalové vodě nad 3 mg/l má za následek zvyšování výskytu a činnosti nitritačních a nitratačních bakterií, kdy se účinnost odstranění N-amon může pohybovat až do 100 %.
- Snižování koncentrace kyslíku na hodnotu 0,5–0,8 mg/l má za následek inhibici nitratačních bakterií a hromadění dusitanů.
- Optimální koncentrace kyslíku v procesu čištění odpadních vod způsobuje podporu činnosti nitrifikace, kdy reakce probíhají až na dusičnany.
- Možnou cestou, v ekonomicky účinném procesu čištění odpadních vod, by mohlo být střídání fází s limitovanou a nelimitovanou koncentrací rozpuštěného kyslíku.
- Využití poznatků této diplomové práce při biologickém čištění kalových vod (s vysokou koncentrací dusíkatých látek), by mělo přispět k odstranění N-amon v čistírně odpadních vod a následnému výraznému snížení ekologického zatížení.
- Metoda může vést k úspoře provozních nákladů vynaložených na vzdušnění při využití netradičních postupů čištění kalových vod.

8 Seznam použité literatury

- Ambrožová, J. 2004. Mikrobiologie v technologii vod. Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha. ISBN: 807080534X.
- Ambrožová, J. 2003. Aplikovaná a technická hydrobiologie. Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha. 226 s. ISBN: 8070805218.
- American Water Works Association. 2013. Nitrification Prevention and Control in Drinking Water - M56 2nd edition. American Water Works Association. ISBN: 9781583214194.
- Anthonisen, A., Loehr, R., Prakasam, T., Srinath, E. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. Journal Water Pollution Control Federation. 48 (5), 835.
- Atlas, R. 1991. Environmental applications of the polymerase chain reaction. ASM News. 57 630–632.
- Bernhard A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact [online]. 2010. Nature Education Knowledge 3 (10):25. [cit. 2016-03-30]. Dostupné z <<http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-15644632> >.
- Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J. 2007. Partial nitrification to nitrite using low dissolved oxygen concentration as the main selection factor. Biodegradation. 19 303-312.
- Bock, E., Wildere, P., Freitag, A., 1988. Growth of Nitrobacter in the absence of dissolved oxygen. Water Research. 22 245-250.
- Boumann, H., Longo, M., Stroeve, P., Poolman, B., Hopmans, E., Stuart, M., Sinninghe Damsté, J., Schouten, S. 2009. Biophysical properties of membrane lipids of anammox bacteria: I. Ladderane phospholipids form highly organized fluid membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 7 1444–1451.

Buday, J. 2002. Intenzifikácia procesov odstraňovania dusíka z odpadových vod – substrátová a produktová inhibícia nitrifikácie. Výskumný ústav vodného hospodárstva Bratislava. ISBN: 8089062067.

Buday, J., Drtil, M., Hutnan, M., Derco, J. 1999. Substrate and product inhibition of nitrification. *Chemical Papers*. 53 379-383.

Ciudad, G., Rubilar, O., Munoz, P., Ruiz, G., Chamy, R., Vergara, C., Jeison, D. 2005. Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal proces. *Process Biochemistry*. 40 1715–1719.

Dongen, U., Jetten, M., van Loosdrecht, M. 2001. The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater. *Water science and technology*. 44 153–160.

Fux, C., Boehler, M., Huber, P., Brunner, I., Siegrist, H. 2002. Biological treatment of ammonium-rich wastewater by partial nitritation and subsequent anaerobic ammonium oxidation (anammox) in pilot plant. *Journal of Biotechnology*. 99. 295.

Gerardi, M., Munro, M., Silverman, D. 2010. *Wastewater Microbiology : Troubleshooting the Sequence Batch Reactor*. John Wiley & Sons, Incorporated. ISBN: 9780470050736.

Gorman, H. 2013. *Studies in Modern Science, Technology, and the Environment: Story of N : A Social History of the Nitrogen Cycle and the Challenge of Sustainability*. Rutgers University Press. ISBN: 9780813554389.

Guisola, A., Jubany, I., Baeza, J., Carrera, J., Lafuente, J. 2005. Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80 388–396.

Guo, J., Peng, Y., Wang, S., Zheng, Y., Huang, H., Wang, Z. 2009. Long-term effect of dissolved oxygen on partial nitrification performance and microbial community structure. *Bioresource Technology*. 11 2796-2802.

Hai, F., Yamamoto, K., Lee, Ch. 2013. Membrane Biological Reactors Theory, Modeling, Design, Management and Applications to Wastewater Reuse. IWA Publishing. ISBN: 9781780401331.

Hao, X., Cao, X., Picorenu, C., van Loosdrecht, M., 2005. Model-based evaluation of oxygen consumption in a partial nitrification – Anammox biofilm process. Water science and technology, IWA Publishing. 155-160.

Hellinga, C., Schellen, A., Mulder, J., van Loosdrecht, M., Heijnen, J. 1998. The SHARON process: An innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. Water science and technology. 37 135–142.

Hlavínek, P., Malý, J. 1996. Čištění průmyslových odpadních vod. Noel 2000. ISBN: 8086020053.

Horáková, M., a kol. 2003. Analytika vody. Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha. 335 s. ISBN: 807080520X.

Hu, B., Shen, L., Xu, X., Zheng, P. 2011. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. Portland Press Limited. 1470-8752.

Hugenholtz, P., Tyson, G. 2008. Metagenomics. Nature. 455 481–483.

Chudoba, J., Dohányos, M., Wanner, J. 1991. Biologické čištění odpadních vod. Nakladatelství technické literatury, Praha. 468 s. ISBN: 8003006112.

Jetten, M., Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J., Op den Camp H. 2009. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 44 65-84.

Jetten, M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K., Schalk, J., van Dongen, U., van de Graaf, A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M., Kuenen, J. 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. FEMS Microbiology Reviews. 22 421 – 437.

Liu, S. 2014. Food and Agricultural Wastewater Utilization and Treatment 2E (2nd Edition). Wiley. ISBN: 9781118353974.

Mullis, K., Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 335-50.

Pacek, L., Švehla, P., Bartáček, J., Radechovský, J., Hrnčířová, H., Shejbalová, Š., Balík, J., Jeníček, P. 2014. Direct and indirect effects of oxygen limitation on nitrification process applied to reject water treatment. *Desalination and Water Treatment.* 1944-3994.

Pacek, L., Švehla, P., Radechovský, J., Vašák, F., Balík, J. 2011. Možnosti využití regulace koncentrace kyslíku při nitrifikaci kalové vody. *Vodní hospodářství.* 10 372-376. ISSN: 1211-0760.

Peng, Y., Zhang, S., Zeng, W., Zheng, S., Mino, T., Satoh, H. 2008. Organic removal by denitrification and methanogenesis and nitrogen removal by nitritation from landfill leachate. *Water Research.* 42 883-892.

Pitter, P. 1999. *Hydrochemie.* Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, Praha. 568 s. ISBN: 8070803401.

Ruiz, G., Jeison, D., Chamy, R. 2003. Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Research.* 37 1371–1377.

Schramm, A., Beer, D., Heuvel, J., Ottengraf, S., Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospora* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. *Applied Environmental Microbiology.* 65 3690–3696.

Švehla, P., Bartáček, J., Pacek, L., Hrnčířová, H., Radechovský, J., Hanč, A., Jeníček, P. 2014. Inhibition effect of free ammonia and free nitrous acid on nitrite-oxidising bacteria during sludge liquor treatment: influence of feeding strategy. *Chemical Papers.* 68 871-878.

Švehla, P., Jeníček, P., Habart, J., Hanč, A., Balík, J. 2010. Testování vlivu vybraných faktorů na průběh nitrifikace kalové vody. *Chemické listy*. 104 343–348.

Thangadurai, D. 2007. *Dictionary of Biotechnology*. Oxford Book Co, Jaipur. 335. ISBN: 9788189473099.

Wiesmann, U. 1994. Biological nitrogen removal from wastewater. *Biotechnics/Wastewater*. 51 113–154.

Wang, J., Yang, N. 2004. Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions. *Process Biochemistry*. 30 1223–1229.

Wang, L., Zeng, G., Yang, Z., Luo, L., Xu, H., Huang, J. 2014. Operation of partial nitrification to nitrite of landfill leachate and its performance with respect to different oxygen conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 15 62–68.

Yang, Q., Peng, Y., Liu, X., Zeng, W., Mino, T., Satoh, H. 2007. Nitrogen removal via nitrite from municipal wastewater at low temperatures using real-time control to optimize nitrifying communities. *Environmental Science Technology*. 41 8159-64.