

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin



Nitrifikační organismy a jejich úloha při biologickém čištění odpadních

vod

Bakalářská práce

Autor práce: Martin Molík

Školitel: Ing. Pavel Švehla, Ph.D.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně a použil jsem pouze podklady uvedené v seznamu použité literatury.

V Praze dne:

Obsah

1. Úvod	7
2. Dusík ve vodním prostředí	7
2. 1. Koloběh dusíku	8
2. 2. Hlavní nežádoucí účinky dusíku ve vodním prostředí	8
3. Aktivovaný kal	9
3. 1. Organismy oxidující organické látky na CO ₂	10
3. 2. Nitrifikační organismy v aktivovaném kalu	10
3. 3. Vláknité mikroorganismy nejčastěji zastoupené v aktivovaném kalu	10
3. 4. Prvoci nejčastěji přítomní v aktivovaném kalu	10
4. Nitrifikace	11
4. 1. Faktory ovlivňující nitrifikaci	11
4. 1. 1. Teplota	12
4. 1. 2. Hodnota pH	13
4. 1. 3. Přístup kyslíku	14
4. 1. 4. Doba zdržení aktivovaného kalu	15
4. 1. 5. Cílená akumulace dusitanů	16
4. 2. Nitritace	16
4. 2. 1. Amonia monooxygenáza	17
4. 2. 2. Hydroxylamin oxidoreduktáza	18
4. 3. Nitritační bakterie	18
4. 3. 1. Podmínky pro růst	19
4. 3. 2. Inhibice nitritace	20
4. 4. Nitratice	20
4. 5. Nitratační bakterie	21
4. 5. 1. Podmínky nitratační bakterie	22
4. 5. 2. Inhibice nitratace	23
5. Metody identifikace nitrifikačních organismů	24
5. 1. Fluorescenční in situ hybridizace FISH	24
5. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza (TGGE a DDGE)	25
5. 2. 1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	25

5. 2. 2. Elektroforéza	26
5. 3. Stanovení nitrifikačních bakterií pomocí MPN dle VINOGRADSKÉHO	26
6. Závěr	27

Abstrakt

Cílem práce bylo vypracovat rešerši na téma nitrifikační organismy a jejich využití v čištění odpadních.

Nitrifikační organismy, které mají důležité zastoupení v procesu čištění odpadních vod, jsou jedny z nejcitlivějších organismů zastoupených v aktivovaném kalu. Jejich aktivita je ovlivňována mnoha faktory na sobě nezávislými, ale i navzájem se prolínajícími. Faktory, které ovlivňují nitrifikaci, mohou být více či méně ovlivňovány způsobem řízení čistícího procesu i vnějšími vlivy (stupněm aerace, dobou zdržení aktivovaného kalu, koncentrací znečištění přitékajícím do aktivační nádrže, inhibiční účinky některých látek, teplota a pH). Samotná nitrifikace probíhá ve dvou stupních na sebe navazujících. První stupeň je nitritace a následný druhý nitratice. Za jednotlivé stupně jsou odpovědné různé skupiny mikroorganismů. Bakterie oxidující amoniakální dusík (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*) a bakterie oxidující dusitanový dusík (*Nitrobacter*, *Nitrospira*). Tyto bakterie se ještě dělí podle rychlosti jejich růstu, rychlosti oxidace látek obsahujících anorganický dusík a koncentrací substrátu potřebného pro jejich růst na K – strategy a R – strategy (z a nagl.). Z toho vyplývá jejich využití podle stupně zatížení aktivovaného kalu substrátem. V neposlední řadě je práce zaměřená také na identifikaci jednotlivých skupin a druhů bakterií účastnících se nitrifikace. Tyto metody jsou založeny na analýze metabolitů nitrifikačních organismů a znalosti jejich DNA.

Klíčová slova

Biologické čištění odpadních vod, aktivovaný kal, nitritační bakterie, nitratační bakterie, kinetika nitrifikace, PCR, FISH,

Abstrakt

The aim was to develop a research on the topic of nitrifying organisms and their use in wastewater treatment. Nitrifying organisms that have a significant presence in the wastewater treatment process, are among the most sensitive organisms represented in the activated sludge. Their activity is influenced by many factors independent of each other,

but mutually overlapping to. Factors that influence nitrification may be more or less influenced by management means the cleaning process and external factors (the degree of aeration, activated sludge retention time, concentration of pollutants influent into the activation tank, the inhibitory effects of certain substances, temperature and pH). The actual nitrification takes place in two consecutive stages. Oxidation of ammonia into nitrite and oxidation of these nitrites into nitrates. For each grade are different groups of microorganisms responsible. At first stage is responsible Ammonia oxidizing bacteria (Nitrosomonas, Nitrospira) and second nitrite oxidizing bacteria (Nitrobacter, Nitrospira). These bacteria are still divided by the speed of growth, rate of oxidation of inorganic compounds containing nitrogen and concentration of substrate necessary for their growth in the K - and R strategy. Hence, their use of the degree of loading of activated sludge substrate. Finally, this work is also focused on identifying the individual groups and species of bacteria involved in nitrification. These methods are based on an analysis of metabolites of nitrifying organisms and knowledge of their DNA.

Key words

Biological treatment of wastewater, activated sludge, ammonia-oxidizing bacteria, nitrite-oxidizing bacteria, nitrification kinetics, PCR, FISH,

Cíl práce:

Cílem práce bylo vypracovat rešerši o nitrifikačních organismech. Zpracovat a shrnout dostupné informace o využívání nitrifikačních bakterií při čištění odpadních vod, ideálních podmínek pro tyto bakterie a metody jejich identifikace

1. Úvod

Mezi látky znečišťující velkou mírou povrchové vody patří sloučeniny dusíku, fosforu a jejich komponenty. Ty se do vodního prostředí mohou dostávat ze splaškových a průmyslových odpadních vod. Nadměrné znečištění vod dusíkem a fosforem má mnoho negativních dopadů na životní prostředí. Mezi hlavní patří eutrofizace, snižování obsahu kyslíku ve vodě a toxický účinek některých forem dusíku.

Vzhledem k stálému nárůstu lidské populace a intenzifikace průmyslu je čištění odpadních vod nedostatečné. Proto se stále vyvíjejí nové metody odstraňování dusíku.

Nejperspektivnější metodou odstraňování dusíku z odpadních vod je z ekonomických důvodů biologická nitrifikace amonného dusíku na dusičnanový dusík a následná denitrifikace na plynný dusík. Při tomto postupu jsou vstupy na energii a chemikálie minimalizovány jen na čerpadla, která jsou potřeba na začátku čistící linky i pro ostatní stupně čištění odpadních vod, takže není potřeba je do nákladů počítat. Dalšími vstupy jsou aerační kompresory a v některých případech neutralizační látky. V této práci se budu zabývat popisem nitrifikačních organismů oxidujících amonný dusík na dusičnanový dusík, které jsou využívány k čištění odpadních vod.

2. Dusík ve vodním prostředí

Distribuce dusíku ve vodním prostředí je ovlivněná biologickými a chemickými procesy.

Dusík se ve vodním prostředí vyskytuje v mnoha formách a oxidačních stupních. Nejběžnější formy, ve kterých se vyskytuje, jsou elementární dusík, anorganicky vázaný dusík a organicky vázaný dusík.

Elementární dusík se do vodního prostředí dostává z atmosférického dusíku. Vzhledem k jeho inertní povaze nemá velký význam pro vodní ekosystémy.

Anorganicky vázaný dusík se vyskytuje ve vodě převážně jako amoniakální dusík, dusičnanový dusík a v menší míře dusitanový dusík. Formy anorganického dusíku jsou pro

problematiku čištění odpadních vod nejdůležitější, protože největší mírou škodlivě zasahují do ekosystémů.

Organický dusík se ve vodním prostředí vyskytuje nejčastěji v bílkovinách organismů a jejich rozkladných produktů. Konečným produktem biologického rozkladu bílkovin je nejčastěji amoniakální dusík. Tímto způsobem se dusík obsažený v bílkovině stává anorganickým. (Buday 2002)

2. 1. Koloběh dusíku

Koloběh dusíku začíná plynným dusíkem v ovzduší N_2 . V atmosféře probíhají fotochemické reakce, při kterých vznikají oxidy dusíku. Ty se postupně oxidují na NO_2 , který reaguje se vzdušnou vlhkostí za vzniku HNO_3 . HNO_3 se dostává do půdy, kde vytváří dusičnany. Atmosférický dusík jsou schopné poutat také některé organismy a začlenit je do svých aminokyselin (fixace vzdušného dusíku). Díky této unikátní schopnosti bakterií, které umí fixovat dusík, s nimi mnoho jiných organismů vstoupilo do symbiotického svazku. Rostliny z půdy využívají dále dusičnany a amoniakální dusík na tvorbu vlastních aminokyselin a ty se začlení do potravního řetězce. Po odumření rostlin, živočichů a bakterií se organické látky obsažené v jejich tělech začínají mineralizovat. Na tom se podílejí saprofytní bakterie (ty mimo jiné rozkládají bílkoviny na aminokyseliny, z nichž se uvolňuje čpavek, který se dostává do prostředí. Ten využívají nitrifikační bakterie které amoniakální dusík oxidují na dusitany a dále na dusičnany. Dusičnanové anionty mohou být využity denitrifikačními bakteriemi, které je redukují znovu na plynný dusík, čímž se celý koloběh zakončuje. (Menšík, 2010)

2. 2. Hlavní nežádoucí účinky dusíku ve vodním prostředí:

Dusík umožňuje růst zelených organismů a podílí se na eutrofizaci.

Má vysokou spotřebu kyslíku na biochemickou oxidaci a při velkém nárůstu sinic a řas může ve stojatých vodách narušit kyslíkový režim.

Amoniak je značně toxický pro některé organismy, hlavně pro ryby. Jeho toxicita se projevuje hlavně při vyšších hodnotách pH kdy se vyskytuje v nedisociované formě.

Dusičnanový dusík, dusitanový dusík a sekundární a terciální aminy jsou prekurzory tvorby nitrosaminů, které jsou karcinogenní.

Dusičnany dostávající se do spodních vod, způsobují zvyšování oxidačně redukčního potenciálu vody a tím rozpouštění hornin a uvolňování těžkých kovů do spodních vod.

Vysoké koncentrace oxidů dusíku v pitné vodě mohou u malých dětí oxidovat dvojmocné hemové železo na trojmocné a tím zabraňovat přenosu kyslíku v těle a způsobit onemocnění zvané methemoglobinemie. (Buday 2002)

3. Aktivovaný kal

Biologické odstraňování dusíku se provádí v aktivačních nádržích. V těchto nádržích se zadržuje odpadní voda po dobu potřebnou k oxidaci organických látek a amonného dusíku. V aktivačních nádržích dochází ke zmnožení mnoha mikroorganismů a vzniku jejich složitých společenstev. Mikroorganismy se shlukují do suspenze vloček (klastřů), které jsou relativně chemicky a fyzikálně velmi kompaktní. Jsou spolu spojené extracelulárními sekrety na bázi polysacharidů a glykoproteinů. (Benáková 2007)

Název aktivovaný kal vznikl podle aktivních projevů při odstraňování organického znečištění z odpadní vody. K vypěstování aktivovaného kalu se využívá odpadní vody jako substrátu pro růst biomasy. Jejím zdržením a upravením podmínek (aerace) dojde ke zmnožení již přítomných mikroorganismů na vysokou úroveň, při které dochází k efektivnímu čištění odpadní vody. V některých případech se aktivační nádrže také naočkovávají aktivovaným kalem z jiných čistíren odpadních vod.

Biomasa je složená z velkého množství různých mikroorganismů podílejících se na čištění odpadních vod přímo, nepřímo, nebo vůbec. Jsou to bakterie odstraňující z odpadních vod organické látky, dusík, fosfor, různé vláknité mikroorganismy, houby, nebo provoci. (Chudoba et al., 1988)

3. 1. Organismy oxidující organické látky na CO₂

Mezi nejčastější zástupce mikroorganismů oxidujících organické látky v aktivovaném kalu bývají bakterie rodu *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Lophomonas*, *Acinetobacter*, *Alkaligenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*.

Jsou to heterotrofní organismy, které z odpadních vod odstraňují organické znečištění. (Chudoba et al., 1988)

3. 2. Nitrifikační organismy v aktivovaném kalu

Z nitrifikačních bakterií jsou to potom *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*. (Chudoba et al., 1988)

3. 3. Vlákňité mikroorganismy nejčastěji zastoupené v aktivovaném kalu

Mezi vláknité organismy zastoupené v aktivovaném kalu patří:

Sphaerotilus, *Leptomitus*, *Leucothrix*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*, *Microscilla*, *Nocardia*, *Flexibacter*, *Vitreoscilla*, *Geotrichum candidum*, *Lineola longa*, *Pelonema subtilissum*, *Spirulina albida*, *Haliscomenobacter hydrossis*, *Microthrix parvicella*, *Nostocoida limicola*
Tyto mikroorganismy nejsou v aktivovaném kalu příliš žádoucí z důvodu vláknitého bytění (snižování sedimentačních vlastností aktivovaného kalu). (Chudoba et al., 1988)

3. 4. Prvoci nejčastěji přítomní v aktivovaném kalu

Prvoci a vyšší mikrofauna v aktivovaném kalu nacházejí dost potravy jako predátoři. Přizpůsobují se různým podmínkám a mohou sloužit k odhadu stavu směsné kultury ostatních mikroorganismů. Jejich neběžnějšími zástupci jsou *Peritricha*, *Vorticella sp.* *Opercularia sp.* *Epistylis sp.* (Chudoba et al., 1988)

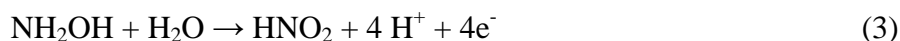
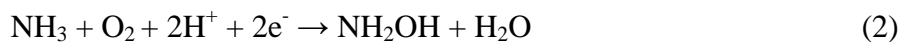
4. Nitrifikace

Nitrifikace je proces, který je významnou součástí koloběhu dusíku. Jde o reakci, ve které se oxiduje amonný dusík na dusičnanový dusík. Tato reakce je součástí přirozeného koloběhu dusíku a umožňuje využití dusíku dalšími organismy, které jej přeměňují na aminokyseliny nebo navracejí denitrifikací dusík zpět do atmosféry jako plynný dusík N₂. Přeměny amonného dusíku na dusičnan a následné denitrifikace na plynný dusík N₂ se využívá při čištění odpadních vod od znečištění anorganickým dusíkem.

Celý proces probíhá za aerobních podmínek a dá se zjednodušeně zapsat podle rovnice.

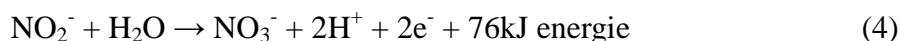


Ve skutečnosti je průběh téhle reakce rozdělen na dva stupně a probíhá za pomoci nitritačních a nitratačních bakterií. Nejprve je oxidován nitritačními bakteriemi amonný dusík na dusitanový dusík (nitritace)



(Chudoba et al., 1991)

a pak je následně oxidován dusitanový dusík na dusičnanový dusík (nitratice).



(Chudoba et al., 1991)

4. 1. Faktory ovlivňující nitrifikaci

V aktivovaném kalu jsou ze společenství bakterií v něm obsažených nejcitlivější právě nitrifikační bakterie. Růst nitrifikačních bakterií, které jsou autotrofní je oproti ostatním heterotrofním organismům velmi pomalý. Metabolismus nitrifikačních bakterií je poměrně složitý a má nízký energetický výtěžek. Jejich aktivita je ovlivněna mnoha faktory, jako je pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace substrátu a inhibičních účinků různých jiných látek, jako jsou těžké kovy, kyanidy, organické látky a

látky obsahující síru. (Buday 2002).

4. 1. 1. Teplota

Nitrifikační bakterie jsou výrazně citlivější na změnu teploty než organismy zastoupené v aktivovaném kalu. Změna rychlosti růstu bakterií při změně teploty je prakticky okamžitá. Teplotní závislost na rychlosti růstu pro jednotlivé biologické procesy se vyjadřuje podle Arrheinovy rovnice, ve které je hodnota daného kinetického parametru pro teplotu $K_{i,20}$ (20 °C) přepočítávána pomocí teplotních konstant θ_i z hodnoty kinetického parametru.

$$K_{i,T} = K_{i,20} \cdot \theta_i^{(T-20)} \quad (6)$$

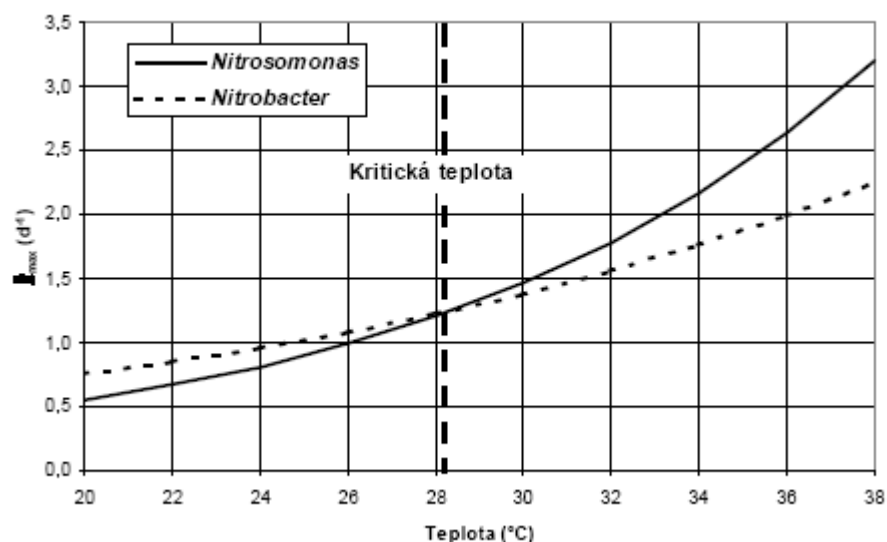
(Obr. 1.) Porovnání teplotních konstant citlivosti procesů probíhajících v přírodě podle (Henze et al., 2000)

Stupeň závislosti	θ_i	Proces (<i>i</i>)
žádná	1,00	Chemické srážení
nízká	1,04	Poly-P bakterie, hydrolýza
střední	1,07	Heterotrofní bakterie, fermentace
vysoká	1,12	Nitrifikační bakterie

Teplota pro optimální růst nitrifikačních organismů je udávána v rozmezí 20 – 40 °C.

Z grafu uvedeného v práci (Auterská et. al., 2006) je zřejmé, že při nižších teplotách převládá nitratace. Při dostatečném zadržení kalu v systému pro zpracování nitrifikace se koncentrace dusitanů snižuje na velmi nízké hodnoty. Při hodnotě 28 °C dochází na grafu ke křížení růstových kinetických rychlostí. Rychlost nitrifikace a nitratace je při této teplotě stejná. Nad teplotou 28 °C pak převládá první stupeň nitrifikace a může dojít k hromadění dusitanů. Tohoto případu využívá technologie SHARON, kde je cílem řízení nitrifikačního procesu hromadění dusitanů. (Buday, 2006)

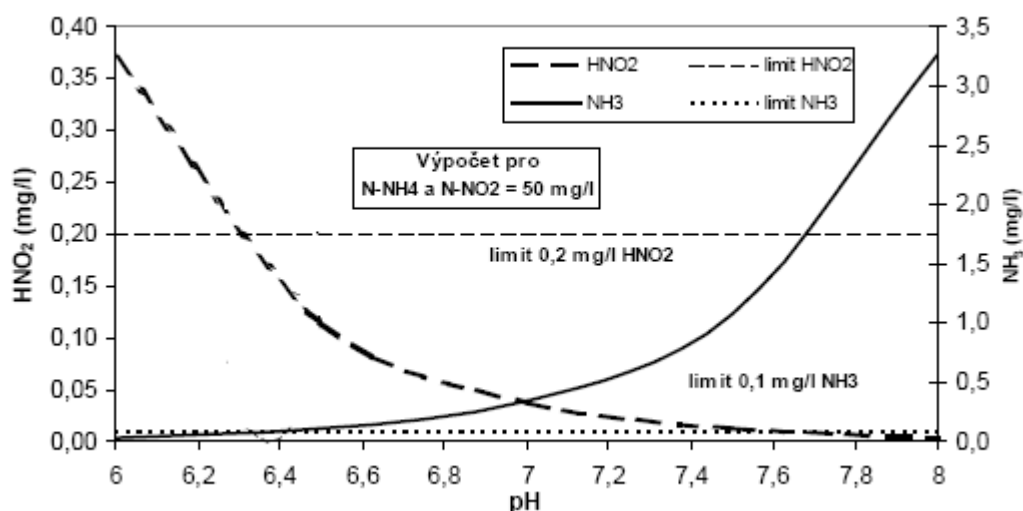
(Obr. 2.) Teplotní závislost maximálních specifických růstových rychlostí *Nitrosomonas* a *Nitrobacter* (Auterská et. Al., 2006)



4. 1. 2. Vliv pH na nitrifikaci

Pro bakterie rodu *Nitrosomonas* je optimální pH udáváno 8-8,6 a pro *Nitrobacter* 7,2-8,4. Ze stechiometrické rovnice (1) vyplývá, že při nitrifikaci dochází k poklesu pH. Pro nitrifikační organismy je tento pokles nepříznivý a pokles pH tak na celý proces nitrifikace působí inhibičně. Pokles alkality je na každých 7 mg oxidovaného amonného dusíku 1 mmol (Auterská et. Al., 2006). Hodnota pH má na nitrifikaci vliv i kvůli ovlivňování koncentrace neionizovaných forem substrátu. Při nižších hodnotách pH se totiž zvyšuje koncentrace amoniakálního dusíku jako zásady v ionizované formě, zatímco dusitany jako kyselina v neionizované a obráceně (viz obr. 3).

(obr. 3.) Graf závislosti koncentrace neionizovaných forem HNO_2 a NH_3 na pH při teplotě 25°C . (Auterská et. Al., 2006)



4. 1. 3. Přístup kyslíku

Biologická nitrifikace je aerobní proces a je ovlivňována vysokou měrou koncentrací rozpuštěného kyslíku potřebného na oxidaci amonného dusíku. Podle stechiometrické rovnice je na oxidaci jednoho gramu amonného dusíku potřeba $4,57 \text{ g O}_2$ (Chudoba et. al., 1991)

Podle (Auterská et. Al., 2006) je ve skutečnosti spotřeba kyslíku o něco nižší ($4,2\text{-}4,3 \text{ g O}_2$). Obecně však platí, že koncentrace rozpuštěného kyslíku neovlivňující proces nitrifikace závisí na dostupnosti kyslíku k nitrifikačním bakteriím. Jelikož se aktivovaný kal v odpadní vodě nachází ve vločkách o velikosti $50\text{-}500 \mu\text{m}$, kyslík se do nich dostává difúzí. Do určité nejnižší koncentrace kyslíku se tedy rychlost nitrifikace nemění. Jinými slovy se při zvyšování obsahu kyslíku v oblasti nad limitní hodnotou v odpadní vodě nezvyšuje rychlost nitrifikace. Záleží jen na velikosti povrchu vloček aktivovaného kalu.

Rychlost nitrifikace se mění jen při hodnotách obsahu kyslíku v odpadní vodě nižší než je 2mg/l, kdy začínají mít bakterie nedostatek kyslíku na plnou nitrifikaci. Při těchto nižších koncentracích může dojít ke hromadění dusitanů. (*Chudoba et. Al., 1991*)

4. 1. 4. Doba zdržení aktivovaného kalu

Jak bylo psáno výše, nitrifikační bakterie patří mezi pomalu rostoucí organismy. Jejich rychlost růstu je o jeden řád nižší než běžné heterotrofní mikroorganismy aktivovaného kalu. Proto, aby se dosáhlo účinné nitrifikace, musí být doba zdržení kalu dostatečně dlouhá, aby nedocházelo k vyplavování nitrifikačních bakterií. Nitrifikace tedy bude dosaženo, pokud specifická rychlost růstu nitrifikačních bakterií bude větší než rychlost odtahu aktivovaného kalu z aktivační nádrže. Za podmínek ustáleného stavu je specifická rychlost odtahu kalu rovna převrácené hodnotě stáří kalu a je dána zatížením kalu, koncentrací biomasy a aerací. U systému, kde jsou očekávány inhibiční faktory, je nutné zdržení kalu prodlužovat. To je možné zvětšením objemu aktivačních nádrží, nebo zachycováním biomasy na nosiči. (*Auterská et. Al., 2006*)

Při krátkém zdržení aktivovaného kalu se může začít hromadit dusitanový dusík z důvodu pomalejší rychlosti růstu biomasy nitratačních bakterií oproti nitrifikačním. To může nastat hlavně v čistírnách odpadních vod s postupným průtokem odpadní vody, ve kterých odpadní voda protéká průběžně aktivační nádrží a není vracena zpátky na začátek aktivačního procesu. (*Buday, 2002*).

Stanovení kinetických a stechiometrických parametrů nitrifikace je cílem intenzivního výzkumu už desítky let. Vzhledem k citlivosti nitrifikačních bakterií a potřebě odstraňovat z odpadních vod dusík jsou v podstatě rozhodující skupinou mikroorganismů při čištění odpadních vod. Kvantifikace hlavních parametrů byla realizována v různých podmínkách, proto se naměřené a publikované kinetické rychlosti v mnoha případech značně rozcházejí podle toho, zda byly měřeny u směsných, nebo čistých kultur, zda byly měřeny v laboratorních, nebo venkovních podmínkách, nebo zda byly získané z kultivace na uměle vytvořených, komunálních, nebo průmyslových odpadních vodách. (*Buday, 2002*).

4. 1. 5. Cílená akumulace dusitanů

Denitrifikační bakterie potřebují jako zdroj energie organický substrát, který oxidují za anoxických podmínek. Jako akceptor elektronů používají dusičnanový, nebo dusitanový dusík. Při způsobu řízení procesu čištění odpadních vod nitrifikace/denitrifikace je ale v části kde nitrifikace probíhá organický dusík vyčerpán za aerobních podmínek a pro denitrifikaci zbývá organického substrátu už jen malé množství. Organický substrát je tedy potřeba dodávat do anoxické nádrže pro efektivní průběh denitrifikace v podobě CH_3OH , který se přičítá do nákladů čištění odpadních vod. (Chudoba et. Al., 1991)

Cílená akumulace dusitanů je jedním z typů alternativního odstraňování dusíku. Smyslem akumulace dusitanů je snížit množství kyslíku potřebného na nitrifikaci a množství organického substrátu pro následnou denitrifikaci. V tomto způsobu čištění odpadních vod je proto snaha odstranění fáze nitratace a zároveň udržení stavu aktivovaného kalu tak, aby bylo dosaženo efektivní nitritace. Metody fungující na tomto principu jsou SBRN (Shortcut Biological Nitrogen Removal), CANON (Completely Autotrophic Nitrogen Removal) a SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite) (Vacková et. Al., 2011; Buday et. Al., 2012)

4. 2. Nitritace

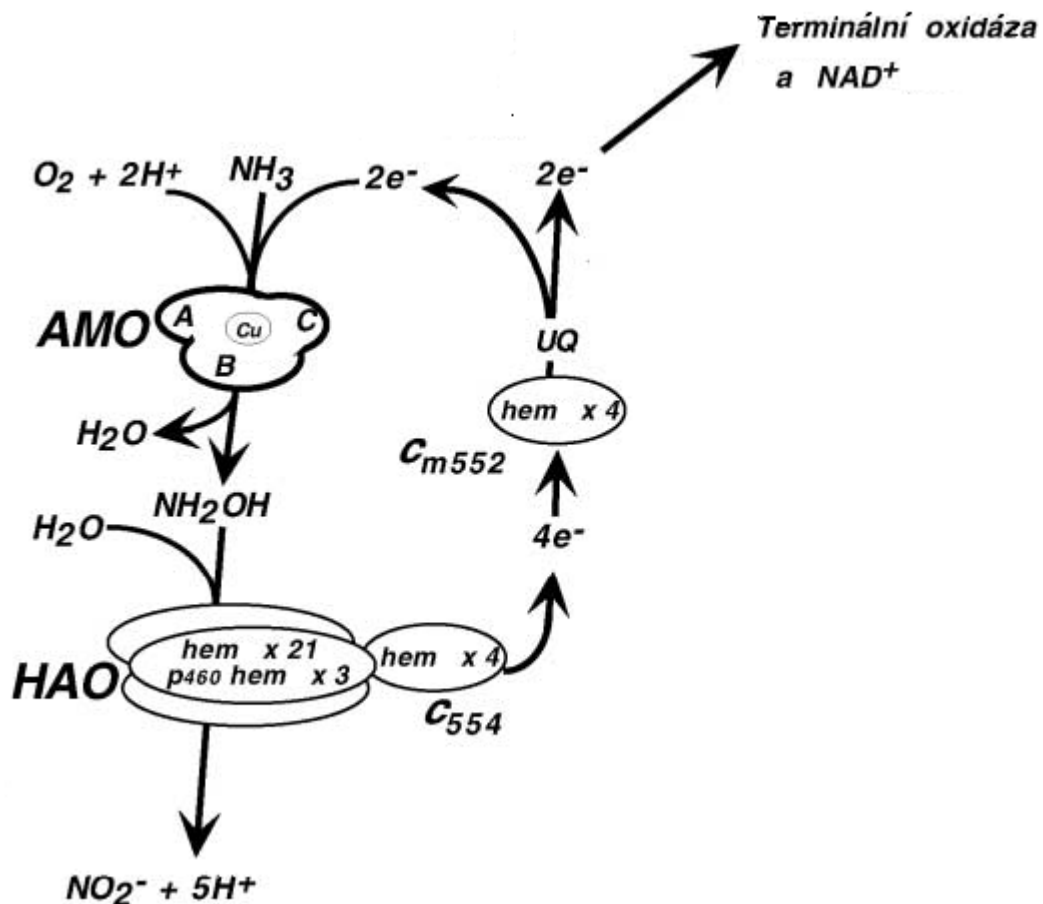
První krok nitrifikace je oxidace amonného dusíku na dusitanový dusík. Mikroorganismy schopné oxidovat amonný dusík na dusitanový dusík (nitritační bakterie) jsou chemolithoautotrofní gramnegativní proteobakterie beta a gama, ale také některé organismy patřící pod *archea*.

Nitritační bakterie mohou jako substrát využívat amoniak a získávat tak energii z oxidace nedisociovaného amoniaku (Buday 2002). Konečným akceptorem elektronu je tedy kyslík, který bakterie potřebují na oxidaci nedisociovaného amoniaku. Nitritační bakterie jsou tedy aerobní organismy. Jako zdroj uhlíku pro svůj růst využívají anorganický uhlík CO_2 , ale v některých případech mohou využívat i organické sloučeniny. (Buday 2002; Arp. et. Al., 2002; McCarty 1999).

Samotná nitritace je rozdělena na dvě části podle enzymů katalyzujících obě reakce. Na první části se účastní Ammonia monooxygenasa, která katalyzuje reakci oxidace NH_3 na NH_2OH a na druhé se účastní Hydroxylamin Oxidoreduktáza, která katalyzuje následnou

oxidaci NH_2OH na NO_2^- . (Arp. et al., 2002) Při oxidaci NH_3 na NH_2OH se jeden přijatý kyslík z O_2 využije na hydroxylamin a ten druhý se zabudovává do molekuly H_2O . Na tuto reakci je potřeba dodat $2e^-$. Tato část reakce je tedy endotermická, proto potřebují bakterie na tuto reakci dodat energii. Vzniklý NH_2OH je proto velmi důležitý meziproduct, který je relativně stabilní látkou a právě až její oxidací bakterie získá $4e^-$. Ty potom putují do cytochromu C_{m552} , kde se rozdělí na $2e^-$, které jdou do první reakce a zbylé dva $2e^-$ se využijí na biosyntézu a tvorbu ATP. (Arp. et. Al., 2002; Buday 2002).

(Obr. 4.) Schéma biochemických procesů oxidace nedisociovaného amonného dusíku. (Arp. et. Al., 2002)



4. 2. 1. Ammonia monooxygenasa

Ammonia monooxygenasa je membránově vázaný enzym lokalizovaný na vnitřní straně membrány. Skládá se ze tří polypeptidů Amo A, Amo B a Amo C. Může oxidovat

veliké množství látek. Kromě vazby amoniaku oxiduje také látky obsahující vazby C=C na epoxidy a C-H na příslušné alkoholy a sulfidy na oxidy síry. Jako substrát mohou sloužit pro *Ammonia monoxygenasa* i halogenové uhlovodíky, což se dá využít při dekontaminaci prostředí těmito látkami. Velmi podobnou strukturu jako *ammonia moxygenasa* má enzym v angličtině označený jako *particulate methane monoxygenasa*, kterým katalyzují methanotrofní bakterie oxidaci metanu. Je kódován podobnými geny a má stejnou podjednotkovou strukturu. Může využívat také široké spektrum substrátů. Proto mohou methanotrofní bakterie oxidovat amoniak a u nitrifikačních bakterií bylo prokázáno, že mohou asimilovat některé organické látky.

(McCarty 1999; Arp. *et al.*, 2002)

4. 2. 2. Hydroxylamin Oxidoreduktáza

Hydroxylamin oxidoreduktáza je enzym lokalizovaný v periplazmě. Strukturou se jedná o homotrimer, tedy komplex složený ze tří totožných proteinů. Ty jsou složené z osmi hemů. Jeden z hemů p540 je v tomto komplexu zajímavý tím, že vytváří na enzymu aktivní místo.

(Arp. *et al.*, 2002)

4. 3. Nitritační bakterie

Bakterie schopné oxidovat amonný dusík na dusitanový dusík jsou:

Nitrosomonas, *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosogloea* (Chudoba *et al.*, 1991).

Zatímco za archeí byl popsán a izolován pouze jeden druh.

Nitrosopumilus maritimus (Ambrožová 2004)

Z tohoto množství bakterií byly v problematice čištění odpadních vod popisovány jen bakterie rodu *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* a *Nitrospira*.

Zastoupení těchto bakterií se v různých aktivovaných kalcích může měnit podle způsobu jejich řízení. Nejčastější rozdělení je podle vhodné koncentrace substrátu pro bakterie a podle rychlosti jejich růstu. Podle těchto parametrů se nitritační bakterie dají rozlišovat na

R-strategy bakterie, což jsou klasické nitritační bakterie *Nitrosomonas*, které jsou také nejčastěji popisované. Z nitritačních bakterií jsou právě nitrosomonas ty rychleji rostoucí bakterie na vysokých koncentracích substrátu. Díky tomu mají schopnost poměrně rychle odstraňovat amonné znečištění.

Naopak **K-strategy** bakterie jako jsou *Nitrospira* rostou pomalu, ale zas mohou přežít delší dobu hladovění díky menší rychlosti růstu a menším nárokům na koncentraci substrátu. Mají tedy výhodu při čištění odpadních vod s nízkým zatížením amonným dusíkem, nebo při kolísání jeho zatížení.

(Dytczak 2008)

4. 3. 1. Podmínky pro růst

Nitritační bakterie snášejí nejlépe pH v rozmezí 8-8,6 (Buday 2002). Tedy lehce zásadité. Koncentrace amoniakálního dusíku v nedisociované formě se při změnách pH mění podle rovnice:



Jako substrát pro nitritační bakterie byl potvrzen právě nedisociovaný amoniak, což vyplynulo z pozorování čistých kultur *Nitrosomonas*. (Buday 2002).

Z rovnice číslo 2, viz kapitola 4. vyplývá, že v průběhu nitritace dochází k okyselování substrátu a tím ke zvyšování koncentrace ionizovaných forem amoniakálního dusíku. Při řízení procesu nitritace je proto vhodné vyrovnávat pH přidáváním neutralizačního činidla (např. CaO) (Chudoba et. Al., 1991)

Hodnoty nasycení nitrifikačních bakterií substrátem se nejčastěji udávají jako Half-saturation constant (konstanta polovičního nasycení enzymu), což je takové množství substrátu, při kterém reakce probíhá poloviční rychlostí. Množství substrátu při polovičním nasycení enzymu pro *Nitrospira* se pohybuje okolo $K_s = 0,08 - 0,15 \text{ mg NH}_3 / \text{L}$ a u *Nitrosomonas* $K_s = 0,17 - 0,27 \text{ mg NH}_3 / \text{L}$. U množství kyslíku potřebného na nitritaci je to $K_o = 0,51 \text{ mg O}_2 / \text{L}$ pro *Nitrosomonas*. (Dytczak 2008)

4. 3. 2. Inhibice nitritace

Všeobecně platí, že nitritační bakterie jsou citlivější než ty nitratační. Je to způsobeno tím, že oproti bakteriím oxidující dusitanový dusík mají složitější enzymatický systém, který oxiduje dusík z oxidačního čísla $-III$ na $+III$. Této reakce se účastní více enzymů a má i více meziproductů. Jak bylo výše popsáno, enzym amonia monooxygenasa je schopen oxidovat mnohem více látek než jen amonný dusík. Jeho fungování je ovšem závislé na dodávce redukčních ekvivalentů, které jsou dodávány z oxidace NH_2OH na NO_2^- . V případě kdy jako substrát amonia monooxygenase slouží jiná látka oxidovatelná tímto enzymem než amonný dusík, nemůže probíhat následná reakce, která by dodala potřebné elektrony a fungování tohoto enzymu je inhibováno. Proto je pro nitritační bakterie vždy potřebná oxidace amonného dusíku. Jako alternativní substrát enzym hydroxylamin oxidoreduktáza může využívat také hydrazin, který by v případě využití jiného substrátu než amonného dusíku pro amonia monooxygenázu mohl dodávat elektrony. Látky působící jako alternativní substráty na amonia monooxygenázu se tedy dají označit jako inhibitory nitritace. (*McCarty 1999*).

Jako inhibitory byly prokázány také organické látky obsahující síru, které se řadí mezi nejvýznamnější inhibitory nitritace. Jsou to například thiomocovina a alythiomocovina. (*Buday 2002*). Pravděpodobně je to způsobeno tím, že se tyto látky vážou na měď, která je kofaktorem amonia monooxygenasy (*Arp. et al., 2002*). V případě přítomnosti chelačních činidel schopných vázat měď bývá amonia monooxygenáza inhibována. Toho se využívá při stanovení biologické spotřeby kyslíku (BSK_5) v odpadní vodě, aby nebyl výsledek ovlivňován právě nitrifikací. (*McCarty 1999*)

Mezi silné inhibitory nitritace patří také organické N-heterocyklické látky (př. Nitrapyrin). Mechanismus jejich účinku však dosud není znám. (*McCarty 1999*).

4. 4. Nitratace

Za druhý krok nitrifikace jsou odpovědné bakterie označované jako nitratační (NAB).

Nejčastější bakterie schopné provádět nitrataci, patří do skupin alfa, delta a gama

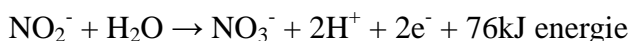
proteobakterií a také Nitrospira. Stejně jako nitritační bakterie jsou nitratační také chemolithoautotrofní.

Pro svůj růst jako zdroj uhlíku využívají CO₂. Energií na jeho redukci pak získávají z oxidace NO₂⁻.

Stejně jako u nitritačních bakterií byl u některých nitratačních bakteriích dokázán růst s využitím organického substrátu jako zdroje uhlíku (*Buday 2002*).

Nitratace je relativně jednoduchá reakce, při které nevznikají žádné významné meziprodukty a při níž dochází k přesunu jen 2e⁻. Je katalyzována enzymem nitritoxidoreduktázou.

Probíhá podle reakce:



(Chudoba et al., 1991)

Při této reakci se uvolňují dva elektrony, které jsou transportovány k terminální oxidáze a zabudovány do ATP. Ta je potom využita na biosyntetické reakce a fixaci CO₂. Výtěžek energie je při nitrataci o hodně menší než při nitritaci. Zefektivnění zisku energie tímto způsobem je tedy dáno velikým množstvím nitritoxidoreduktázy, až 30%.

Nitritoxidoreduktáza je stejně jako Ammonia monooxygenasa u nitritačních bakterií membránově vázaný enzym, který se vyskytuje na vnitřní straně membrány. (*Spieck et al., 1996*)

4. 5. Nitratační bakterie

Bakterií schopných oxidovat dusitanový dusík je mnoho. Jsou to například: *Nitrobacter* a *Nitrocystis*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* a *Nitrospira*,

Při využití těchto bakterií k čištění odpadních vod jsou však nejběžnější a nejvíce popisované jen bakterie *Nitrobacter* a *Nitrospira*.

Nitrobacter byly dříve popisovány jako reprezentativní nitratační bakterie, protože byly považovány za nejběžnější se vyskytující v aktivovaných kalcích. Novější práce se ale začaly zaměřovat také na bakterie *Nitrospira*, které jsou v některých podmínkách nejvíce

zastoupené nitratační bakterie v aktivovaných kalech.

Bakterie *Nitrospira* a *Nitrobacter* mají porovnatelné potřeby na pH prostředí, které je uváděno jako optimální v rozmezí 7,2-8,4 (Buday 2002) nebo užší 8,0-8,3 (Blackburne 2007). Stejně také nároky na teplotu, která je nejvhodnější mezi 15-30 °C a nasycení kyslíkem K_o ($0,54 \pm 0,14$ mg/l). (Blackburne 2007)

Nitrospira bývá často v pracích metodou in situ analyzována jako dominantní dusitanový dusík oxidující bakterie v aktivovaných kalech čistíren odpadních vod. (Benáková 2007) Důvod proč tomu tak je, bývá vysvětlován vyšší schopností vázat dusitanový dusík než *Nitrobacter*. *Nitrospira* má tedy výhodu oproti *Nitrobacter* při získávání dusitanového dusíku a to hlavně v případě jeho nedostatku. *Nitrospira* se tedy řadí mezi K-strategy a *Nitrobacter* mezi R-strategy. Teoreticky by relativní velikost populace *Nitrospira* měla být větší než *Nitrobacter* v případě nízké koncentrace dusitanového dusíku a obráceně. V práci (Burrell et al 1998) byla však nalezena jako dominantní dusitanový dusík oxidující bakterie *Nitrospira* i při vysokých koncentracích okolo 100 mg NO_2^-/l což by znamenalo, že *Nitrospira* dokáže lépe než *Nitrobacter* vázat dusitanový dusík i ve vysokých koncentracích. Aktivita dusitanový dusík oxidujících bakterií může být ovlivněna hlavně inhibitory jako je nedisociovaný amoniak a kyselina dusitá. (Blackburne 2007)

4. 5. 1. Podmínky pro růst

Na rozdíl od nitritačních bakterií, které využívají jako substrát nedisociovanou formu amoniakálního dusíku, potřebují nitratační bakterie na svůj růst právě disociovanou formu dusitanového dusíku. Proto stejně jako nitritační bakterie mají ideální pH substrátu pro svůj růst spíše zásadité.

Rovnováhu popisuje reakce:



(Buday 2002).

V práci (Blackburne 2007) je konstanta polovičního nasycení enzymu substrátem (NO_2^-)

pro *Nitrobacter* udávána jako $K_s = 1,2 - 1,3$ mg/L a pro *Nitrospira* je $K_s = 0,9$ mg/L. Konstanta pro poloviční nasycení kyslíkem je potom u *Nitrobacter* $K_o = 0,43$ mg/L a $0,54$ mg/L pro *Nitrospira*. V práci (Dytczak 2008) jsou tyto hodnoty udávány jako $K_s = 0,11 - 0,50$ mg/L a $K_o = 0,47$ mg/L pro *Nitrospira*, a pro *Nitrobacter* $K_s = 1,49$ mg/L a $K_o = 0,17 - 4,32$ mg/L. Z obou prací vyplývá, že *Nitrobacter* zvládá vyšší koncentrace substrátu zpracovávat v kratším čase.

4. 5. 2. Inhibice nitratace

Vysoké koncentrace substrátu mohou inhibovat nitrataci. Inhibice substrátem velmi souvisí s pH. Zatímco vyšší koncentrace disociovaného dusitanového dusíku bakterie snáší celkem dobře (až 10 mgNO₂⁻/l), nedisociovaná forma HNO₂ má na nitratační bakterie velmi silný inhibiční účinek, kdy inhibice nastává už při koncentraci méně než $0,03$ mg HNO₂/l. Bakterie *Nitrospira* jsou na obsah kyseliny dusité obecně ještě citlivější a tak mohou účinně konkurovat *Nitrobacter* jen při jejích nižších koncentracích (vyšších hodnotách pH). Velmi vysoký inhibiční účinek má na nitratační bakterie také volný amoniak. V práci (Philips et al., 2002) je popsána inhibice u *Nitrobacter* u koncentrací volného amoniaku od $0,02 - 0,82$ mgNH₃/l, ale podle práce (Blackburne 2007) tato inhibice nastává až u vyšších koncentrací. V kanalizačních systémech, kde při pomalém toku odpadních vod nedochází k příliš velkému okysličování odpadní vody, probíhají spíše anoxické procesy. Proto jsou koncentrace amonného dusíku do čistírny přitékající odpadní vody podstatně vyšší. K oxidaci dusitanového dusíku mohou tedy nitratační bakterie nastoupit až po snížení této koncentrace nitritačními bakteriemi. Proto je také možné nitratační bakterie vyplavit při krátké době zdržení aktivovaného kalu v aktivační nádrži a tím zvýšit koncentrace dusitanového dusíku v odtoku. (Buday 2002)

Mezi látky inhibující větší mírou nitrataci než nitritaci patří látky běžně dostupné na čistírnách odpadních vod. Kromě sloučenin dusíku jsou to látky průmyslového původu jako chlorečnany, kyanatany, azidy, hydrazin, anilin, fenol a o-kresol. Nitratační bakterie také inhibuje 1,2-dichlorbenzen, 1,2,4-trichlorbenzen, cyklohexan, nitrobenzaldehyd a N-methyl anilin. Toxické působení převážně na bakterie oxidující dusitany mohou mít také některé těžké kovy. Například nikl, chrom, olovo, zinek a kadmium. Jejich využití na cílenou inhibici nitratačních bakterií je vzhledem k jejich složité rozložitelnosti a ceně vhodné spíše pro laboratorní experimenty. (Vacková et. al., 2011)

5. Metody analýzy populací nitrifikačních bakterií

Analýza nitrifikačních bakterií v aktivovaném kalu nemá mnoho možností. Kvůli velmi pomalému růstu nitrifikačních bakterií není možné tyto bakterie kultivovat, protože jsou přerůstány jinými rychleji rostoucími organismy. Ani metodou imunofluorescenční techniky není možno tyto bakterie identifikovat, protože jsou obalené extracelulárními sekrety, přes které se protilátky nedostanou k příslušným antigenům. (Szwerinski et al., 1985)

5. 1. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato metoda umožňuje detekovat jednotlivé druhy, eventuelně skupiny organismů a selektivně zobrazit a identifikovat bakterie ve vzorku aktivovaného kalu. Výhodou metody FISH je přesnost a zároveň i její rychlost ve srovnání s kultivačními metodami, kdy výsledky stanovení jsou už do druhého dne. Nevýhodou této metody jsou vysoké náklady na pořízení fluorescenčního mikroskopu a genových sond. Tato metoda je založena na znalosti struktury DNA. Princip metody FISH je navázání genové sondy na specifickou část DNA kódující ribozomální RNA, které je specifická pro určitý druh nebo skupinu bakterií, nebo je specifická pro skupinu bakterií se stejnými vlastnostmi. Např. schopnost nitritace nebo nitratace. Na genové sondě je navázána fluorescenční barva, kterou je možné detekovat fluorescenčním mikroskopem. Ve fluorescenčním mikroskopu je barva pomocí laseru o konkrétní vlnové délce uvedena do excitovaného stavu. Při jejím návratu do původního stavu vyzáří barva světlo o nižší vlnové délce než je to excitační (emise). Toto světlo pak prochází přes bariérový filtr, který nepropustí světlo excitační, ale pouze to emisní.[11]

K navázání sondy na bakterie je nejprve potřeba vzorek zafixovat paraformaldehydem, nebo etanolem kvůli snadnějšímu průchodu genové sondy přes buněčnou stěnu, následná dehydratace vzorku a hybridizace s genovými sondami. Hybridizace se provádí při teplotě 46 °C po dobu dvou hodin. Před analýzou se vzorek ještě musí promýt, aby se zbavil nenavázaných sond.

Na obarvení a analýzu bakterií lze použít i více specifických sond v jednom vzorku. K jejich rozlišení je potřeba použít barvy o různé emisní vlnové délce. (Benáková 2007)

5. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforéza (TGGE a DDGE)

Další metoda identifikace zastoupení mikrobiologického složení v aktivovaném kalu je založena stejně jako FISH na znalosti DNA konkrétních mikroorganismů. Spočívá v namnožení určité části DNA (PCR) a její následné identifikaci elektroforézou.

5. 2. 1. PCR

Namnožení DNA se provádí pomocí enzymu DNA-polymeráza (Taq polymeráza), který byl izolován z bakterie *Thermus aquaticus*. Prvním krokem je rozrušení vodíkových vazeb na DNA. Tím se oba řetězce oddělí. Tento krok probíhá při teplotě 94 – 96 °C. Druhým krokem PCR je navázání primerů specifických pro konkrétní sekvenci DNA, kterou obsahují námi zkoumané bakterie. Pro navázání primerů se vzorek ochladí na 50 – 65 °C. Takto označené úseky DNA jsou při třetím kroku replikovány Taq polymerázou při teplotě 72 °C. Tím končí celý cyklus a jeho výsledkem je dvojnásobné množství cílové DNA. Celý cyklus se proto opakuje. Za 30 cyklů je tedy teoreticky možno získat až miliardu kopií. (Dobešová 2011)

Kvantifikace zastoupení sledovaných mikroorganismů je možná metodou real-time PCR, kde je během jednotlivých sekvencí sledován přírůstek DNA. Podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a je možné ho detekovat ve speciálních termocyklerech. Metoda je založena na pozorování přírůstku fluorescence. Čím vyšší přírůstek, tím je ve vzorku větší zastoupení sledovaného genu. (Mičuda 2006)

5. 2. 2. Elektroforéza

Metoda elektroforézy je založena na snížení elektroforetické mobility částečně denaturované dvoušroubovice DNA v polyakrylamidovém gelu s obsahem lineárního denaturačního gradientu DNA (směs močoviny a formamidu) nebo lineárního teplotního gradientu. Molekuly s různou sekvencí DNA se chovají různě a jsou denaturovány v jiný okamžik. Touto metodou lze určit diverzitu populace mikroorganismů ve vzorku.

Pro elektroforézu je potřeba připravit gel. Ten se připravuje z agarózy a TAE pufru. Gel se zahřeje na teplotu 500 °C po dobu tří minut a nechá se vychladnout. Po přidání ethylbromidu se nechá zatuhnout v těle aparatury pro elektroforézu. Po zatuhnutí se do jamek vzniklých na gelu z přiloženého hřebínku napipetují vzorky spolu s markrem ukazujícím počet bází pro srovnání. Gel se potom vloží do aparatury pro elektroforézu, zalije se TAE pufrem a elektroforéza se spustí. Po čase kdy se denaturuje DNA, se vyhodnotí vzdálenosti jednotlivých vzorků se skupinami mikroorganismů. (*Dobešová 2011*)

5. 3. Stanovení nitrifikačních bakterií pomocí MPN dle VINOGRADSKÉHO

Jak již bylo zmíněno, kultivační metody jsou oproti metodě FISH velmi zdlouhavé a nepřesné. Nitrifikační bakterie jako lithoautotrofní organismy rostou oproti ostatním bakteriím velmi pomalu. Z tohoto důvodu dochází při kultivaci nitrifikačních bakterií na pevných agarech k přerůstání jinými rychleji rostoucími organismy. Kultivace se proto provádí na tekutém mediu.

Touto metodou je možno zjistit pouze přítomnost jedné skupiny nitrifikačních bakterií na úrovni nitritace/nitratice. Metoda se provádí kultivací mikroorganismů ze vzorku v mediu dle Vinogradského. To se skládá z 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g K_2HPO_4 , 2 g NaCl, 0,05 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a jedním litrem destilované vody. Toto médium se převede do třech Erlenmayerových baněk o ředěních 10ml, 1ml, a 0,1ml a napipetuje se k němu vzorek. Vzorek se v tomto mediu kultivuje 16-21 dní při teplotě 27°C.

Během kultivace se jedenkrát denně kontroluje obsah dusitanového a dusičnanového dusíku. Tím je možno sledovat namnožení konkrétní skupiny nitrifikačních bakterií. Přítomnost dusitanového dusíku se zjišťuje Griessovým činidlem (před použitím se

smíchají roztoky A a B v poměru 1:1. Roztok A se skládá z 1 g kyseliny sulfanilové, která se rozpustí v 75 ml destilované vody a přidá se 25 ml ledové kyseliny octové. Roztok B se skládá z 0,3 g α -naftylaminu, který se povaří v 70 ml destilované vody, přefiltruje se a nakonec se přidá 30 ml ledové kyseliny octové). Roztok obsahující dusitanový dusík se zbarví do červena. Přítomnost dusičnanového dusíku se zjišťuje roztokem 0,02 g brucinu ve 100 ml kyseliny sírové. Roztok se při pozitivním výsledku zbarvuje do purpurově červené. Vyhodnocení se poté provádí statisticky metodou statistickou metodou MPN. (Ambrožová 2004)

6. Závěr:

Vzhledem k mnoha negativním důsledkům znečištění povrchových vod dusíkem je potřeba stále zdokonalovat metody jeho odstraňování. Nejperspektivnější metodou odstraňování dusíku z odpadních vod je z finančních důvodů metoda biologické nitrifikace/denitrifikace. Nitrifikační organismy jsou proto nezastupitelné při odstraňování znečištění odpadních vod. Pro efektivní odstraňování dusíkatých sloučenin je potřeba udržovat podmínky v aktivovaném kalu na takové úrovni, která je pro tyto bakterie a pro čisticí proces únosná. Také je důležité si uvědomit, že pro konkrétní nitrifikační bakterie jsou potřeba konkrétní podmínky. Proto je vhodné udržovat podmínky takové, které jsou únosné pro vyhovující bakteriální složení aktivovaného kalu. Pro zefektivnění čisticího procesu je tedy potřeba se věnovat podrobnějšímu studiu nitrifikačních bakterií a jejich potřeb.

Zdroje:

1. AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.
2. AUTERSKÁ, P. a L. NOVÁK. Problematika biologického čištění vysokozátěžových kafilerních vod s vysokým obsahem NH₄ pomocí aktivačního procesu. In: [Http://odour.webnode.cz/news/cov-kafilerie](http://odour.webnode.cz/news/cov-kafilerie) [online]. 2010. [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <<http://odour.webnode.cz/news/cov-kafilerie>>.
3. BENÁKOVÁ A. ,KRHŮTKOVÁ O. a WANNER J. Identifikace nitrifikačních bakterií pomocí fluorescenční in situ hybridizace. *Slovak: časopis oboru vodovodů a kanalizací*. 2007, roč. 2007, 5-7, s.101-103. ISSN 1210-3039
4. BUDAY, M. NÉMETH P. a ANDRÁŠIOVÁ A. Eliminácia druhého stupňa nitrifikácie na ČOV Duslo a.s. Šála. *Vodní hospodářství: specializovaný vědeckotechnický časopis pro projektování, realizaci a plánování ve vodním hospodářství a souvisejících oborech životního prostředí*. Praha: Vodní hospodářství, 2012, roč. 62, č. 2, s. 76. ISSN 1211-0760.
5. Biogeochemické koloběhy. [Http://www.uel.cz/](http://www.uel.cz/) [online]. 19. 11. 2010 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: http://www.uel.cz/download/Cviceni_4_listopad_kolobeby_2010.pdf
6. BLACKBURNE, R., Vel M. VADIVELU, Zhiguo YUAN a Jürg KELLER. Kinetic characterisation of an enriched Nitospira culture with comparison to Nitrobacter. *Water research*. [online], 2007, 41(14), s. 3033-3042. [cit. 2012-04-07]. ISSN 0043-1354.
7. BUDAY, J. *Intenzifikácia procesov odstraňovania dusíka z odpadových vôd -*

substrátová a produktová inhibícia nitrifikácie. 1. vyd. Bratislava: Výskumný ústav vodného hospodárstva, 2002. 92 s. Práce a štúdie; č. 144. ISBN 80-89062-06-7.

8. DAIMS, H., U. PURKHOLD, L. BJERRUM, E. ARNOLD, P. A. WILDERER a M. WAGNER. Nitrification in sequencing biofilm bath reactors. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 2001, 43, s. 9-18. ISSN 0273-1223.

9. Department of pharmacology. *Http://www.lfhk.cuni.cz* [online]. 2011 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>>.

10. DOBEŠOVÁ, T. *Využití PCR pro studium mikrobiologických biodegradačních procesů*. Zlín, 2011. Dostupné z: <https://dspace.knihovna.utb.cz/bitstream/handle/10563/16413/dobe%C5%A1ov%C3%A1_2011_dp.pdf?sequence=1>. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství a životního prostředí.

11. DYTČZAK, Magdalena A, Kathleen L. LONDRY a Jan A. OLESZKIEWICZ. Activated sludge operational regime has significant impact on the type of nitrifying community and its nitrification rates. *Water research*. [online], 2008, 42(8-9), s. 2320-2328. [cit. 2012-04-07]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313540800002X>>.

12. Fluorescenční mikroskopie. *Http://www.vscht.cz* [online]. 2009 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/homepage/partneri/pristroje/mikroskop>

13. McCARTY, G. W. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biology and fertility of*

soils. 1999, 29, s. 1-9. ISSN 0178-2762.

14. MENŠÍK, L. Biogeochemické koloběhy. [Http://www.uel.cz/](http://www.uel.cz/) [online]. Mendelova univerzita v Brně, 19. 11. 2010 [cit. 2012-04-12]. Dostupné z: http://www.uel.cz/download/Cviceni_4_listopad_kolobehy_2010.pdf

15. HENZE ..., Ed. by IWA Task Group on Mathematical Modelling for Design and Operation of Biological Wastewater Tr. *Activated sludge models ASM1, ASM2, ASM2d and ASM3*. Reprint. London: IWA Publ, 2002. ISBN 19-002-2224-8.

16. CHUDOBA, J, GRAU, P2 a WANNER, J. *Bytění aktivovaného kalu*. Praha: Min. les. a vodního hosp. ČSR, 1988. 60 s. Návod, pokyny a doporučení pro aplikaci výsledků vyřešených úkolů TR v oboru vodovodů a kanalizací; 59.

17. CHUDOBA, J., WANNER, J. a DOHÁNYOS, M. *Biologické čištění odpadních vod: vysokošk. příručka pro vys. školy chemickotechnologické*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991. 465 s. Ochrana životního prostředí. ISBN 80-03-00611-2.

18. Ikuo Tsushima, Tomonori Kindaichi, Satoshi Okabe, Quantification of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in enrichment cultures by real-time PCR, *Water Research*, Volume 41, Issue 4, February 2007, Pages 785-794, ISSN 0043-1354, 10.1016/j.watres.2006.11.024.

19. MIČUDA, S., L. FUKSA, E. BUČÁKOVÁ, J. CERMANOVÁ a V. GERŠL. Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii: real-time PCR. In: [Http://www.lfhk.cuni.cz](http://www.lfhk.cuni.cz) [online]. 2006 [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/real-PCR.htm>.

20. ŘÍHOVÁ, AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. 252 s. ISBN 978-80-7080-676-0.

21. SPIECK, E., S. MÜLLER, A. ENGEL, E. MANDELKOW, H. PATEL a E. BOCK. Two-dimensional structure of membrane-bound nitrite oxidoreductase from nitrobacter hamburgensis. *Journal of Structural Biology*. [online], 1996, 117 (2), s. 117-123. [cit. 2012-04-07]. ISSN 1047-8477. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/science?>>

22. SZWERINSKI, Heidrun, Suse GAISER a Dieter BARTKE. Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors. *Applied microbiology and biotechnology*. 1985, 21 (1-2), s. 125-128. ISSN 0175-7598.

Wastewater treatment: biological and chemical processes. 3rd ed. Berlin: Springer, 2002, 430 s. ISBN 35-404-2228-5.

23. VACKOVÁ, L., D. VEJMELKOVÁ a J. WANNER. Metody inhibice druhého stupně nitrifikace. *Vodní hospodářství: specializovaný vědeckotechnický časopis pro projektování, realizaci a plánování ve vodním hospodářství a souvisejících oborech životního prostředí*. Praha: Vodní hospodářství, 2011, roč. 61, č. 9, s. 368-371. ISSN 1211-0760.