

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace produkce sulfidů pomocí síran redukujících bakterií

Bc. Eva Papáčková

Diplomová práce

2019

University of Pardubice
Faculty of chemical-technology

Optimization of sulphide production using sulphate-reducing bacteria

Bc. Eva Papáčková

Diploma Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Papáčková**
Osobní číslo: **C17448**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Optimalizace produkce sulfidů za použití bakterií
redukujících sírany**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na mikroorganismy schopné redukovat sírany na sulfidy. Na základě této rešerše navrhnete experimentální testování v laboratorních podmínkách ÚEnviChI.
2. Proveďte laboratorní testy zaměřené na sledování produkce sulfidů v závislosti na různých experimentálních podmínkách, jako je např. druh použitého nosiče mikroorganismů v koloně, průtok kapalného média kolonovým systémem atd. výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.


Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Peroutková**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

.....

Bc. Eva Papáčková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu Ing. Jirímu Palarčíkovi, Ph.D. za jeho odbornou pomoc, věnovaný čas a cenné rady, které mi pomohly při zpracování diplomové práce.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci produkce sulfidů za použití síran redukujících bakterií. Byl vybrán vhodný druh mikroorganismu a provedena optimalizace, která spočívala hlavně v nalezení nosiče biofilmu pro kolonové uspořádání při co nejvyšší produkci sulfidů. Experimenty prokázaly, že při použití bakterie *D. hydrogenophilus* lze dosáhnout nejlepších výsledků za použití akvaristického nosiče biofilmu. Naopak jako nevhodný se ukázal zeolit, na kterém nebyl nárůst biofilmu vůbec prokázán.

KLÍČOVÁ SLOVA

Síran redukující bakterie, metabolismus, biofilm, čištění odpadních vod, sulfidy,

TITLE

Optimization of sulphide production using sulphate-reducing bacteria

ANNOTATION

This thesis is focused on optimization of sulphide production using sulphate-reducing bacteria. A suitable type of microorganism was selected and an optimization was performed which consisted mainly in finding a biofilm carrier for a column arrangement with the highest possible production of sulfides. Experiments have shown that usage of *D. hydrogenophilus* can produce the best results by using an aquarium biofilm carrier. Conversely, zeolite was found to be unsuitable on which biofilm growth was not proven at all.

KEYWORDS

sulphate-reducing bacteria, metabolism, biofilm, wastewater treatment, sulphides

OBSAH

ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1 Koloběh síry.....	15
2 Základní charakteristika síran-redukujících bakterií.....	17
2.1 Klasifikace síran-redukujících bakterií	18
2.2 Morfologické vlastnosti.....	20
2.3 Růstové vlastnosti	20
2.4 Metabolismus.....	20
2.5 Bioenergetický mechanismus	21
2.5.1 Donory a akceptory elektronů.....	22
2.5.2 Mechanismus disimilační redukce síranů.....	22
2.6 Kultivace a izolace	23
2.7 Výskyt síran-redukujících bakterií.....	25
3 Biofilm a jeho význam u síran-redukujících bakterií.....	27
3.1 Vhodné nosiče pro biofilm SRB	28
4 Význam síran-redukujících bakterií.....	30
4.1 Odstraňování těžkých kovů z průmyslových odpadních vod.....	30
4.2 Odstraňování síranů z odpadních vod.....	31
4.3 Negativní projevy síran-redukujících bakterií	31
5 Zařízení pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací	33
5.1 Třístupňové uspořádání	33
6 Vybrané potencionální mikroorganismy	35
6.1 <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	35
6.2 <i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	36
6.3 <i>Desulfosporosinus auripigmenti</i>	37
6.4 <i>Desulfomicrobium baculatum</i>	38
6.5 <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	39
6.6 <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	40
6.7 <i>Thiobacillus denitrificans</i>	42
6.8 <i>Bacillus subtilis</i>	43
CÍL PRÁCE	45

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
7 Použitý materiál	46
8 Kultivační média a roztoky.....	48
9 Pracovní postupy.....	51
9.1 Příprava aerobní bakteriální kultury.....	51
9.2 Příprava anaerobní bakteriální kultury.....	51
9.3 Barvení dle Grama	52
9.4 Kultivace bakteriálního biofilmu	52
9.5 Průkaz bakteriálního biofilmu	53
9.6 Konstrukce dvoustupňového uspořádání kolonového systému	53
9.7 Stanovení sulfidů.....	54
9.8 Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku	55
9.9 Měření oxidačně-redukčního potenciálu	56
9.10 Měření pH.....	56
9.11 Měření průtoku.....	56
10 VÝSLEDKY A DISKUZE	57
10.1 První stupeň kolonového systému.....	57
10.1.1 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu <i>B. subtilis</i>	57
10.1.2 Stanovení parametrů kolony s <i>B. subtilis</i>	58
10.2 Druhý stupeň kolonového systému	58
10.2.1 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu <i>D. hydrogenophilus</i>	59
10.3 Stanovení parametrů bezprůtočného systému.....	60
10.3.1 stanovení parametrů bezprůtočného systému – akvaristický nosič Biomech.....	60
10.3.2 Stanovení parametrů bezprůtočného systému – nosič vápenec	61
10.3.3 Stanovení parametrů bezprůtočného systému – nosič pyrit	62
10.4 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s <i>B. subtilis</i>	63
10.4.1 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s <i>B. subtilis</i> – akvaristický nosič Biomech.....	64
10.4.2 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s <i>B. subtilis</i> – nosič vápenec	65
10.5 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s <i>B. subtilis</i>	66
10.5.1 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s <i>B. subtilis</i> – akvaristický nosič Biomech.....	67

10.5.2 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s *B. subtilis* – nosič vápenec 68

11	ZÁVĚR	69
12	ZDROJE.....	71
13	PŘÍLOHY	80

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 Koloběh síry	15
Obrázek 2 Dva možné způsoby redukce síranu na sulfid	23
Obrázek 3 Izolace síran-redukujících bakterií	25
Obrázek 4 Tvorba biofilmu	28
Obrázek 5 Třístupňový systém LITHIM	34
Obrázek 6 <i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	35
Obrázek 7 <i>Desulfobulbus mediterraneus</i>	36
Obrázek 8 <i>Desulfosporosinus auripigmenti</i>	37
Obrázek 9 <i>Desulfomicrobium baculatum</i>	38
Obrázek 10 <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	39
Obrázek 11 <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	41
Obrázek 12 <i>Thiobacillus denitrificans</i>	42
Obrázek 13 <i>Bacillus subtilis</i>	43
Obrázek 14 Anaerobní box	51
Obrázek 15 Sada kyvetového testu pro stanovení sulfidů	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Zkrácená forma současné klasifikace síran-redukujících bakterií.....	19
Tabulka 2 Seznam použitých přístrojů	46
Tabulka 3 Seznam použitých chemikálií.....	47
Tabulka 4 Složení S8 média	48
Tabulka 5 Složení modifikovaného Van Houten média.....	49
Tabulka 6 Složení zásobního roztoku solí	49
Tabulka 7 Složení masopeptonového bujónu a agaru	50
Tabulka 8 Složení živného média pro SRB.....	50
Tabulka 9 výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu <i>B. subtilis</i> s přípravkem Biofinder	57
Tabulka 10 První stupeň kolonového systému s <i>B. subtilis</i>	58
Tabulka 11 Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu <i>D. hydrogenophilus</i>	59
Tabulka 12 Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu <i>D. hydrogenophilus</i> s přípravkem Biofinder	59
Tabulka 13 Parametry bezprůtočného systému - akvaristický nosič Biomech	60
Tabulka 14 Parametry bezprůtočného systému - nosič vápenec	61
Tabulka 15 Parametry bezprůtočného systému - nosič pyrit.....	62
Tabulka 16 Parametry průtočného systému - nosič Biomech bez zapojení kolony s <i>B. subtilis</i>	64
Tabulka 17 Parametry průtočného systému - nosič vápenec bez zapojení kolony s <i>B. subtilis</i>	65
Tabulka 18 Parametry průtočného systému - akvaristický nosič Biomech, se zapojením kolony s <i>B. subtilis</i>	67
Tabulka 19 Parametry průtočného systému – nosič vápenec, se zapojením kolony s <i>B. subtilis</i>	68

SEZNAM ZKRATEK

APS – adenosinfosfosulfát

ATP – adenosintrifosfát

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

D. baculatum – *Desulfomicrobium baculatum*

D. desulfuricans – *Desulfovibrio desulfuricans*

D. hydrogenophilus – *Desulfobacter hydrogenophilus*

D. vulgaris – *Desulfovibrio vulgaris*

DNA – deoxyribonukleová kyselina

MIC – mikrobiální koroze

MPA – masopeptonový agar

MPB – masopeptonový bujón

NADH – nikotinamidadeninnukleotid

ORP – oxidačně-redukční potenciál

PCR – polymerázová řetězová reakce

RNA – ribonukleová kyselina

rRNA – ribozomální ribonukleová kyselina

SRB – síran redukující bakterie

T. denitrificans – *Thiobacillus denitrificans*

ÚVOD

V dnešní době produkuje lidstvo velké množství odpadních vod a jde tak o celosvětový problém. Aby mohla být voda znovu využita, je potřeba ji vyčistit od různých rozpustných i nerozpustných, biologicky nerozložitelných i rozložitelných látek. V posledních letech vzrůstá zájem především o biologické čištění vod, kterého se účastní různé druhy bakterií.

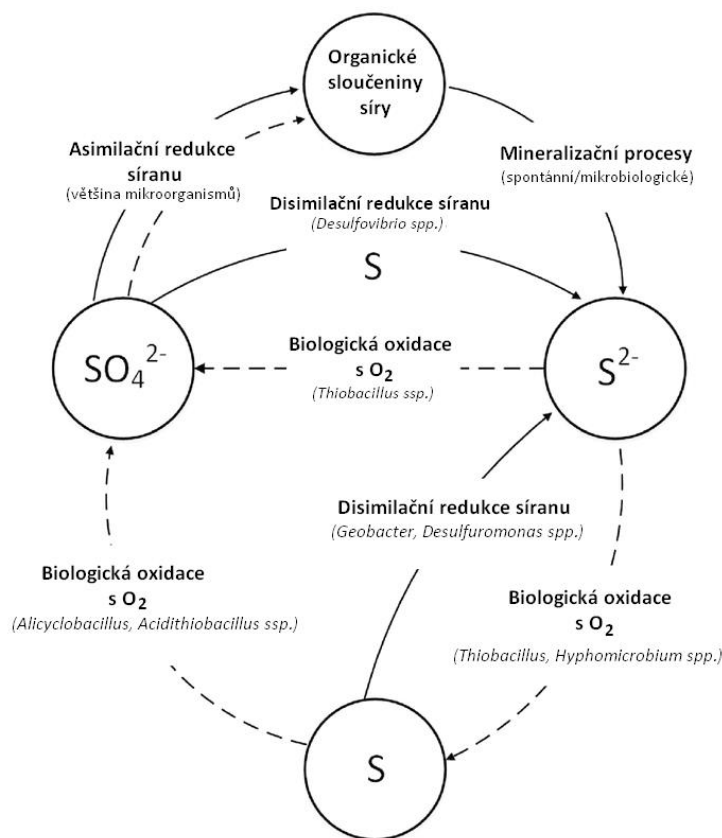
Síran redukující bakterie patří do skupiny anaerobních bakterií, které pro získání energie využívají redukci síranů. Ty zde hrají roli elektronového akceptoru a jako donor elektronů slouží buď organické látky, nebo vodík. Konečným produktem redukce je sirovodík. Svou mikrobiální činností jsou tyto bakterie schopny eliminovat negativní vlivy průmyslové výroby a zlepšit tak kvalitu životního prostředí především v oblasti vod. V dnešní době se tyto bakterie využívají především v biotechnologických procesech jako je odstraňování těžkých kovů z průmyslových odpadních vod a odstraňování síranů z odpadních vod.

Tato diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci produkce sulfidů pomocí síran redukujících bakterií, které se využívají ve druhém stupni kolonového zařízení sloužícího především k zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou immobilizací. V teoretické části je popsána základní charakteristika a význam síran redukujících bakterií. Dále jsou vytipovány a popsány vhodné mikroorganismy, které by mohly být potencionálně využity ve zjednodušeném dvoustupňovém systému kolonového zařízení. V experimentální části diplomové práce se prováděly laboratorní testy zaměřené na sledování produkce sulfidů v závislosti na různých experimentálních podmínkách.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Koloběh síry

Síra je nezbytným mikrobiogenním prvkem pro všechny formy života (mikroorganismy, rostliny, zvířata) a může se vyskytovat ve velkém množství oxidačních stavů. Pouze tři oxidační stavy jsou však hojně přítomny v přírodě, tj. -2 (pro sulfhydrid, sulfid), 0 (pro elementární síru) a +6 (pro sírany). Většina síry se vyskytuje v oceánech, v sedimentech a horninách ve formě síranů, především sádry (CaSO_4) a sulfidových minerálů, jako je pyrit (FeS_2). Také látky jako cystein a metionin obsahují velké množství síry. V přírodě cirkuluje síra trvale, protože je plynule oxidována nebo redukována chemickými a biologickými procesy. Cyklus síry je navíc úzce spojen s ostatními cykly prvků, jako jsou cykly uhlíku a dusíku [1].



Obrázek 1 Koloběh síry, upraveno dle [2]

Pro koloběh síry jsou charakteristické dva cykly. První rozšířený cyklus koloběhu síry zahrnuje vyšší organismy. Síru mohou využít pouze ve formě rozpustných síranů, které jsou využívány zelenými rostlinami. Ty pak cestou potravního řetězce transportují část síry do živočišných proteinů. Po odumření rostlin a živočichů dochází k hnilobnému rozkladu, na kterém se podílejí bakterie z rodů *Pseudomonas*, *Clostridium* apod. Dochází k uvolňování síry

z organických struktur ve formě sulfanu, který následně reaguje a vytváří sulfidy. Sulfidy jsou poté asimilovány bakteriemi nebo některými rostlinami. Sulfan je chemotrofními nebo fototrofními bakteriemi oxidován na elementární síru. Sulfidy jsou také oxidovány na elementární síru pomocí určitých bakterií, jako jsou např. *Thiobacillus ferrooxidans* a *Leptospirillum ferrooxidans*. Elementární síra je dále např. bakteriemi *Thiobacillus thiooxidans* oxidována na sírany. Následně jsou sírany redukovány síran-redukujícími bakteriemi na sulfidy. Elementární síra může být redukována na sulfidickou formu pomocí bakterií rodů *Desulfuromonas* či *Desulfuromicrobium* [3].

Disimilační redukce síranu se vyvíjela přibližně 3,5 miliardy let, což je dnes prokázáno stabilními izotopy síry. Síran-redukující bakterie (SRB) by měly být považovány za rodové mikroorganismy, které přispěly k primárnímu biogeochemickému cyklu síry, téměř hned poté, co se na naší planetě objevil život [4].

Mikrobiální společenství SRB, které se účastní zmíněné disimilační redukce síranu v cyklu síry, se nazývá **sulfuretum**. Naopak asimilační části se SRB neúčastní. Síranový iont se uvolňuje z okolní půdy a dochází k jeho rozptýlu na dno malých vodních systémů, kde dochází k jeho redukcii na sulfidy pomocí SRB. Následně, kdy se sulfidový iont dostane k povrchové vrstvě, dochází k jeho oxidaci na elementární síru nebo SO_4^{2-} . Celý cyklus dále pokračuje, pokud SO_4^{2-} difunduje opět na dno, kde se nachází zmíněné SRB. Jelikož má elementární síra nízkou rozpustnost ve vodě, dochází k jejímu vysrážení. Tento proces se projeví tak, že na vodní hladině vzniká žlutý povlak. Aktivita tohoto mikrobiálního společenství je základem mnoha procesů v přírodě [5].

2 Základní charakteristika síran-redukujících bakterií

Poprvé se písemně o existenci těchto bakterií zmínil v roce 1895 M. W. Beijerinck. Popsal je jako bakterie, které jsou schopné redukovat sírany za vzniku sulfidů a to bez přítomnosti kyslíku a nazval je *Spirillum desulfuricans* [6]. Sírany zde hrají roli akceptoru elektronů a jako donor elektronů slouží organické látky (laktát, acetát a další) nebo vodík. Konečným produktem redukce je H_2S . Jde o proces zvaný disimilační redukce sulfátu [7]. Později roku 1936 byl popsán rod *Desulfovibrio*, který se řadí mezi typickou a klasickou síran-redukující bakterii, a od 60. let minulého století se právě na tomto rodu studují různé metabolické procesy a funkce síran-redukujících bakterií v průběhu disimilačních procesů v anaerobních zónách půd a vod. Přesto že dané bakterie se odlišují morfologicky a každá má jiné nároky na substrát, jejich společnou vlastností je, že redukují sírany za anaerobních podmínek a označují se dodnes jako síran-redukující bakterie (SRB) [8].

SRB tvoří různorodou skupinu prokaryot, která přispívá k řadě základních funkcí v mnoha anaerobních prostředích. Kromě jejich zjevného významu pro cyklus síry hrají SRB roli také v globálním cyklu řady dalších prvků. Například v cyklu uhlíku tvoří součást mikrobiálních konsorcií, které zcela mineralizují organický uhlík v anaerobním prostředí. Polymerní materiály jsou nejprve depolymerovány a metabolizovány fermentativními mikroorganismy, výsledné produkty (organické kyseliny) a redukované plyny (například CO a H_2) jsou dále fermentovány nebo oxidovány jinými mikroby, včetně SRB. Ty jsou obzvláště aktivní v prostředí bohatém na sírany, kde právě účinně propojují již zmíněné cykly uhlíku a síry [9].

SRB jsou také důležitými regulátory různých procesů v mokřadních půdách, včetně rozkladu organické hmoty a přeměny látek v půdě, biodegradace chlorovaných aromatických polutantů v anaerobních půdách a sedimentech a metylace rtuti. Vzhledem k jejich významu a sanaci životního prostředí se za poslední roky o tyto bakterie zvyšuje zájem [8].

2.1 Klasifikace síran-redukujících bakterií

Prvotní klasifikace zahrnovala pouze dva rody *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum* a obsahovala minimum informací, o morfologii, tvorbě spor, enzymů a zbarvení dle Grama. Dnešní fylogenetická klasifikace je založená na analýze sekvence 16S rRNA. Kompletní přehled fylogeneze SRB je velmi důležitý pro jasnou definici rodů. Tato klasifikace má mnoho výhod. Poskytuje poznatky o evolučním původu SRB u vzdálenějších příbuzných druhů a usnadňuje rozvoj skupinově specifických fylogenetických sond a PCR primerů, které lze využít ve studiích zabývajících se ekologií. Sondy specificky zaměřené na všechny skupiny by velmi usnadnily pochopení role jednotlivých skupin v životním prostředí. Většina sond se prozatím zaměřuje na gram negativní mezofilní SRB [8].

Analýza sekvencí rRNA umožnila organizaci různých druhů SRB do čtyř odlišných skupin: gram negativní mezofilní SRB, gram pozitivní sporulující SRB, gram negativní termofilní SRB a gram negativní termofilní archea SRB [8]. Všechny čtyři uvedené skupiny jsou charakterizovány využitím sulfátu jako koncového elektronového akceptoru během anaerobního dýchání, což vede k tvorbě sulfanu, vysoce reaktivního a toxického konečného produktu [9]. Pro zařazení do určitého rodu se testují různé donory elektronů. Přiřazení jednotlivých druhů do příslušných skupin založených na analýze rRNA je v souladu s těmi, které byly získány tradiční taxonomií, i když existují výjimky. V příslušné tabulce (tabulka 1) jsou uvedeny nejdůležitější vlastnosti vybraných SRB: tvar buněk, pohyblivost, obsah guaninu a cytosinu v DNA, přítomnost desulfoviridinu a cytochromů a úplná a neúplná oxidace octanu [8]. Doposud bylo popsáno více než 60 rodů zahrnujících přes 220 druhů [10].

Tabulka 1 Zkrácená forma současné klasifikace síran-redukujících bakterií, upraveno dle [11]

Rod	Morfologie	Bíčky	Obsah G ¹ a C ² v DNA (%)	Cytochromy	Oxidace organického substrátu
I. Gram negativní, mezofilní a nespornující SRB					
<i>Desulfovibrio</i>	vibrio	+	49-66	c ₁ , b, c	N ³
<i>Desulfomicrobium</i>	oválné/rovné tyčinky	±	52-67	b, c	N
<i>Desulfobulbus</i>	oválné/rovné tyčinky	±	59-60	b, c, c ₃	N
<i>Desulfobacter</i>	vibria	±	44-46	-	U ⁴
<i>Desulfobacterium</i>	oválné tyčinky	±	41-52	b, c	U
<i>Desulfococcus</i>	okrouhlé/oválné koky	±	46-57	b, c	U
<i>Desulfosarcina</i>	oválné tyčinky/koky v agregátech	±	51	b, c	U
<i>Desulfomonile</i>	rovné tyčinky	±	49	c ₃	U
<i>Desulfonema</i>	ohlebná vlákna	±	35-42	b, c	U
<i>Desulfomonas</i>	rovné tyčinky	-	66	c	N
II. Gram pozitivní, spornující, mezofilní a termofilní SRB					
<i>Desulfotomaculum</i>	rovné/zakřivené tyčinky	+	48-52	b, c	N+U
III. Gram negativní, termofilní a nespornující SRB					
<i>Thermodesulfobacterium</i>	vibria/rovné tyčinky	±	30-38	c ₁ , c	N
IV. Gram negativní, termofilní a nespornující Archaea SRB					
<i>Archaeoglobus</i>	koky	±	41-46	bez údajů	N

¹Guanin, ²Cytosin, ³Neúplná oxidace organického substrátu, ⁴Úplná oxidace organického substrátu

2.2 Morfologické vlastnosti

Z uvedené tabulky 1 vyplývá, že tvar jednotlivých buněk může být velice různorodý. Buňky mohou tvořit oválné nebo rovné tyčinky většího i menšího rozměru, koky, vibria či spirály nebo vlákna, často se můžou vyskytovat shromážděné do tzv. svazků či shluků. U některých je přítomný bičík, zajišťující pohyb. SRB mají také schopnost přilnout k inertním povrchům a vytvářet biofilmy [12]. Většina SRB se řadí mezi gram negativní, až na rod *Desulfotomaculum*, který je gram pozitivní a charakteristický tvorbou spor.

2.3 Růstové vlastnosti

Vzhledem k tomu, že SRB obývají extrémní prostředí naší planety, mohou růst v různých fyzikálně chemických podmínkách [13]. Někteří zástupci SRB jsou striktně anaerobní. Během posledních dvou desetiletí se ale zjistilo, že SRB nežijí pouze v anoxických prostředích, ale ve skutečnosti můžou tolerovat a dokonce využívat kyslík [14].

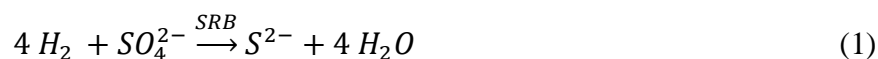
SRB jsou většinou mezofilní, ale také zahrnují některé termofilní a psychofilní druhy [15]. Mezofilní zástupci, například *Desulfovibria* mají optimální teplotu růstu 30 °C, ale mohou přežívat až do teploty 48 °C. Některé druhy, které žijí ve střevech, rostou při teplotě 37 °C. Naopak termofilní druhy rostou při teplotách 60 °C. Bylo však prokázáno, že i při teplotě 35 °C jsou schopny přežívat [16].

Vhodné pH pro růst se pohybuje od 6 do 8. Uvádí se, že většina SRB je inhibována, jakmile pH dosáhne hodnoty 5,5 [17]. Přítomnost SRB však byla zjištěna i v přírodních stanovištích s extrémními hodnotami pH, jako jsou kanalizace s kyselým dnem, kde se pH pohybuje okolo 2, nebo v jezeře, kde může být hodnota pH až 10 [13].

2.4 Metabolismus

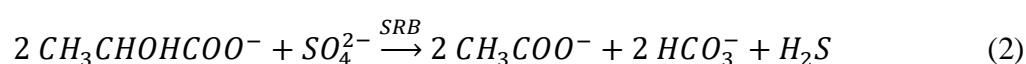
Za základní metabolický proces SRB je považována anaerobní redukce síranů. Jako donor elektronů se uplatňuje organický substrát (laktát, malát atd.) či plynný vodík. Akceptorem je síran. Na základě energetického zdroje SRB, s ohledem na anorganický nebo organický charakter, lze rozdělit anaerobní respiraci síranů na dva typy [5]:

- **Autotrofní redukce síranů** – energetickým zdrojem je plynný vodík a celá reakce probíhá v několika fázích. Celý proces lze shrnout rovnicí 1:

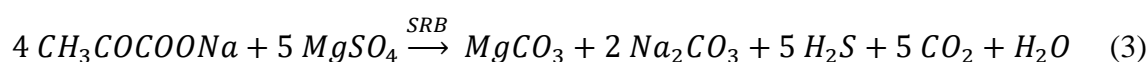


- **Heterotrofní redukce síranů** – tento proces probíhá oproti autotrofní redukci mnohem častěji. Zdrojem energie jsou jednoduché organické látky (laktát, fumarát, pyruvát, alkoholy). V závislosti na konečném produktu oxidace organických substrátů, lze tento proces rozdělit dále na neúplnou a úplnou oxidaci [5]:

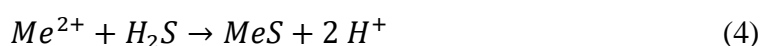
- **Neúplná heterotrofní oxidace organického substrátu** – tento typ popisuje rovnice 2, ve které je konečným produktem acetát a je uskutečňována například druhem *Desulfovibrio desulfuricans* [11]:



- **Úplná heterotrofní oxidace organického substrátu** – konečným produktem je CO_2 a H_2O a realizuje ji například druh *Desulfobacter postgatei* [5]. Tuto reakci popisuje rovnice 3:



V procesu anaerobní respirace síranů dochází k produkci velkého množství plynného sirovodíku, který velmi snadno reaguje ve vodném prostředí s kationty těžkých kovů (např. Fe^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) a vznikají tak málo rozpustné sulfidy kovů. Tuto reakci vyjadřuje rovnice 4 [5]:



SRB jsou schopné získávat energii i jinak, než procesem anaerobní respirace, a to bez existence síranů, kdy dochází k fermentaci etanolu či laktátu. Výsledným produktem je acetát, methan a vodík [11]. Tento metabolismus uvádí rovnice 5:



2.5 Bioenergetický mechanismus

Nejvíce biochemických a fyziologických výzkumů bylo prováděno především na rodu *Desulfovibrio*, protože jeho kultivace je rychlá a snadno se s ním manipuluje. Dále splňuje např. požadavek, aby adenosintrifosfát (ATP) redukoval sulfát. Nutná je přítomnost dvou klíčových cytoplazmatických enzymů, adenosinfosulfát (APS) a bissulfát reduktáza, zapojených do dráhy respirační redukce síranů a důležitá je i periplazmatická lokalizace některých hydrogenáz

a také množství cytochromů typu c. Disimilační redukce síranu u tohoto rodu je spojena s fosforylací, kdy dochází k přenosu elektronů [10].

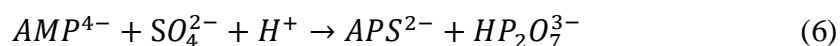
2.5.1 Donory a akceptory elektronů

Dnes už je známo, že SRB mohou využívat jako zdroj energie obrovské množství substrátů. Potencionálním donorem elektronů může být více než 100 sloučenin, včetně cukrů (fruktóza, glukóza), aminokyselin (glycin, serin, alanin), solí monokarboxylových kyselin (acetát, propionát, butyrát), dikarboxylových kyselin, alkoholů (metanol, etanol) a aromatických sloučenin (benzoát, fenol). SRB se řadí mezi organismy redukující největší počet různých terminálních akceptorů včetně organických sloučenin síry a dalších organických a anorganických sloučenin. Vzhledem k velkému množství akceptorů a donorů elektronů lze předpokládat, že jak ekologická tak metabolická funkce SRB má v přírodě velký význam [10].

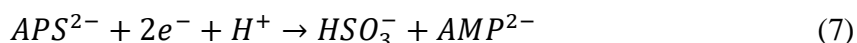
2.5.2 Mechanismus disimilační redukce síranů

Redukce síranů je intracelulární proces vyžadující aktivní transport síranu. Před samotnou redukcí musí být síran aktivován pomocí ATP sulfurylázou. Vznikne APS a pyrofosfát. Nutná je přítomnost vhodného zdroje uhlíku pro redukcí síranů vzhledem k tomu, že tvorba APS je endergonický děj. Mechanismy redukce jsou uvedeny v rovnicích 6-8. Obecně redukce síranu zahrnuje tři hlavní kroky [18]:

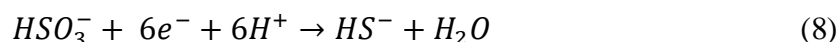
- **Aktivace sulfátu na adenosin-5'-fosfosulfát (APS)** - SRB nemůžou využívat síran jako donor elektronů pro růst přímou cestou, protože je síran termodynamicky stabilní oxidovaná forma síry a navíc standardní redoxní potenciál pro síran-siřičitan je -516 mV. Tato nízká hodnota nestačí na přímou redukcí pomocí pyruvátu nebo nikotinamidadenin dinukleotidu (NADH). Nejdříve tedy musí dojít k aktivaci sulfátu. Celá reakce je katalyzována ATP sulfurylázou [19].



- **Redukce APS na sulfát** – po aktivaci sulfátu se redoxní potenciál zvýší na -60 mV. Tím je umožněna redukce APS. Katalyzovaným enzymem je APS reduktáza [18].

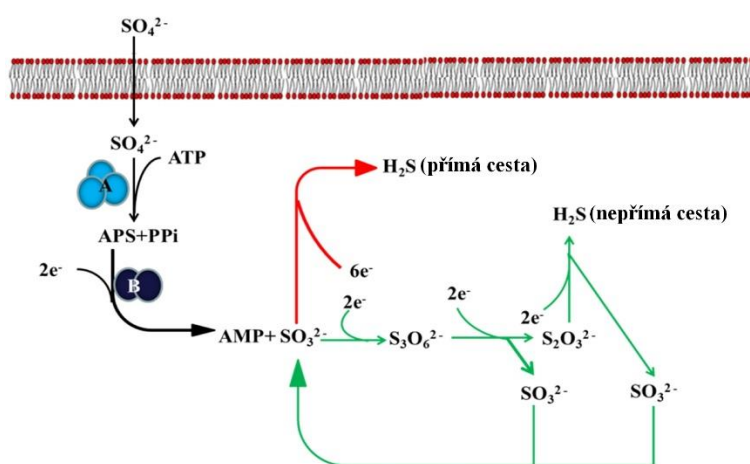


- **Redukce siřičitanu na sulfid** – k této reakci je zapotřebí celkem 6 elektronů a nevyžaduje přísun energie v podobě ATP [19].



Transportní systém elektronů

Elektrontransportní systém je považován za klíčový pro redukci síranů. Skládá se ze tří základních složek: primárních dehydrogenáz, přenašečů elektronů a terminálních reduktáz [11]. Tento systém určuje, jakým způsobem dochází k redukci na sulfidy. První způsob zahrnuje krok přes dva meziprodukty - trithionan a thiosíran, kdy se spotřebovávají 2 elektrony v každém kroku. Druhým způsobem je přímá redukce za tvorby sulfidu [18].



Obrázek 2 Dva možné způsoby redukce síranu na sulfid, upraveno dle [18]

2.6 Kultivace a izolace

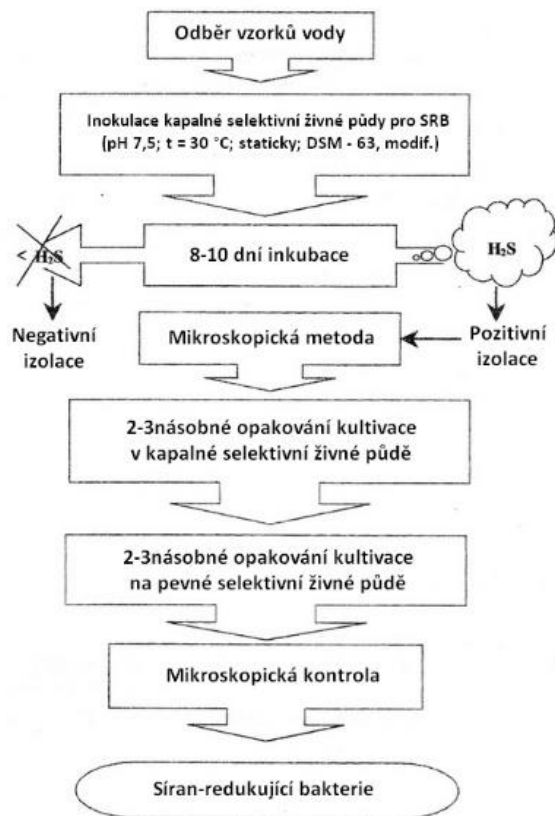
Pro kultivaci SRB se využívá několik různých typů živných půd. Často se využívá médium dle J. Postgate typu B, C, D, E, F, G, N, Baarovo médium, živná půda dle Widdela a Pfennika nebo DSM – 63, což je obdoba média Postgate typu B. Ta svým kvalitativním a kvantitativním zastoupením jednotlivých složek vytváří vhodné podmínky především pro růst rodů *Desulfovibrio* a *Desulfotomaculum*. Avšak žádná živná půda není univerzální vzhledem k rozmanitým vlastnostem SRB. Proto se využívá i různých modifikací. U většiny z nich se jako zdroj uhlíku uvádí laktát sodný a jako zdroj síranu pak síran sodný [3, 11].

Optimální živné médium by mělo obsahovat [3]:

- základní minerální látky (P, N, Mg, K, Ca)
- redukční činidla (Na_2S , thioglykolát sodný, kyselina askorbová)
- stopové prvky (Mn, Mo, Cu, Co, Se)
- NaCl (pro druhy vyžadující sůl)
- růstové faktory (kvasnicový extrakt, octan, vyšší mastné kyseliny)
- akceptory elektronů (sírany, siřičitany, thiosírany)
- zdroj energie a uhlíku (vodík, acetát, laktát, pyruvát, fumarát, glycerol atd.)

V laboratorních podmínkách je stanovena optimální růstová teplota mezi 30 až 37 °C v závislosti na konkrétním mikroorganismu. Vhodná doba pro pomnožení SRB v médiu je přibližně 7 dní. Avšak již během 2-3 dnů po inokulaci SRB do média se indikuje růst černým zbarvením média a zápachem po shnilém vejci v důsledku tvorby sirovodíku [20]. Pro lepší diagnózu se do média přidává právě železnatá sůl, která reaguje se sulfidem za vzniku černého precipitátu FeS. Ve výzkumu by tento precipitát mohl ovlivnit výsledky experimentů, proto se tato sůl někdy vynechává. Je třeba nutně myslet i na to, že vznikající H_2S během kultivace je pro tělo neurotoxický [16]. Dochází k poškození čichového a zrakovému nervu. Při koncentraci 200-280 mg/m³ dochází k paralyzaci čichových buněk a při koncentraci 2000 mg/m³ dochází k úmrtí do půl hodiny [21].

Izolace se provádí z vhodně odebraných vzorků vod či sedimentů a následná kultivace SRB by měla probíhat staticky při teplotě 30 až 37 °C a pH 7,5. Důraz se klade především na to, aby vše probíhalo za anaerobních podmínek (interní plyn, redukční činidla v médiu) [22].



Obrázek 3 Izolace síran-redukujících bakterií, upraveno dle [3]

Pro identifikaci konkrétního druhu SRB se využívají klasické mikroskopické metody – například barvením dle Grama lze určit tvar, velikost buněk a charakter buněčné stěny [3].

2.7 Výskyt síran-redukujících bakterií

Většina SRB se vyskytuje volně, ale některé mohou žít v konsorciích s jinými mikroorganismy, jako je například metanotrofní archea nebo i v bližším vztahu, například síru oxidující Gammaproteobakterie, která je v symbióze se SRB uvnitř mořského šneka *Olavius algarvensis* [13].

SRB jsou široce rozšířeny v anaerobním vodním a suchozemském prostředí, všude kde je přítomen síran. Na těchto místech dochází k mikrobiálnímu rozkladu organických látek rostlinného nebo živočišného původu. Prostředí, ve kterém bakterie vykazují vysokou metabolickou aktivitu, jsou snadno odhalitelná. O přítomnosti SRB svědčí černání vody a sedimentů vlivem srážení sulfidu železa a je cítit zápach po sirovodíku [7].

SRB byly detekovány nebo izolovány z [5, 13, 23]:

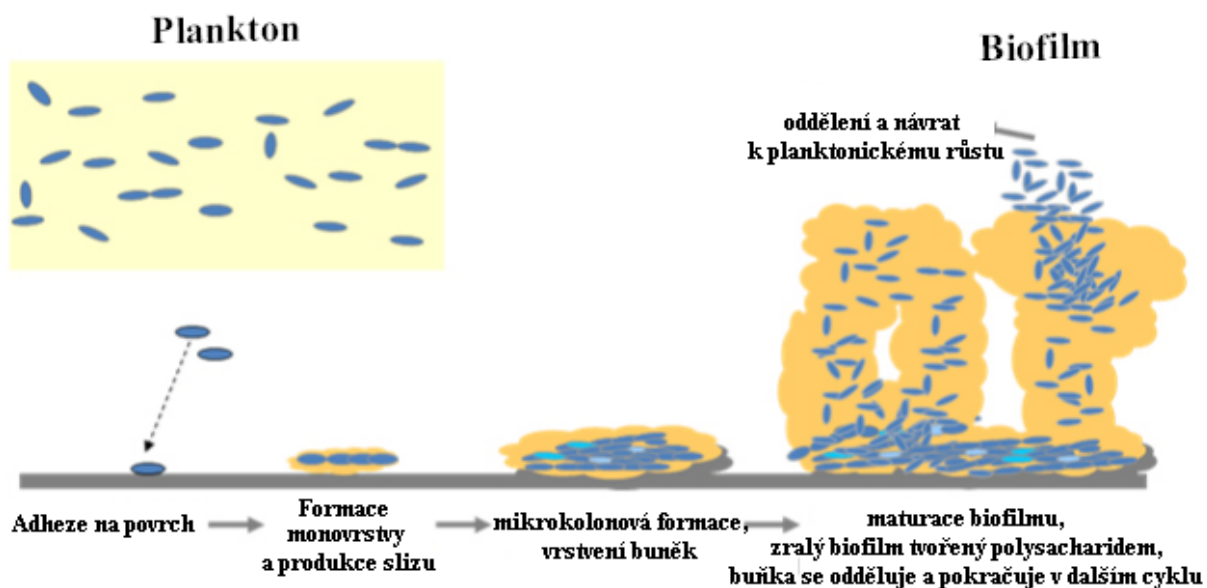
- půd
- mořských a sladkovodních sedimentů a kalů
- termálních a netermálních sirných pramenů
- rizosféry rostlin, rýžových polí, anaerobních čističek
- podzemních vod, průmyslových odpadních vod
- kyselých důlních drenáží
- hydrotermálních průduchů
- uhlovodíkových výpustí a bahenních vulkánů
- ložisek ropy a zemního plynu
- slaných mikrobiálních rohoží
- nádrží na naftu, mazacích olejů
- gastrointestinálního traktu člověka a zvířat

3 Biofilm a jeho význam u síran-redukujících bakterií

J. W. Costerton se jako jeden z prvních zabýval tvorbou biofilmů a popsal tak schopnost bakterií se přichytit na různé pevné povrchy, na kterých následně vytvářejí slizké a kluzké povlaky [24]. Existuje několik definicí biofilmu. Obecně jej lze charakterizovat jako společenství mikroorganismů, ve kterém se buňky navzájem drží na povrchu, obaleném v matrici extracelulární polymerní matrix, produkované samotnými bakteriemi. Jde o společenství mikrobiálních druhů s velice propracovanou organizační strukturou. Biofilm je tedy prakticky všude, kde je dostatečný přísun vody, živin a výměna plynů. Jeho tvorba může nastat jak na živém, tak i neživém povrchu. Mikroorganismy v biofilmu produkují extracelulární polymerní látky, jako jsou proteiny, DNA, polysacharidy a RNA. Kromě těchto látek produkují také vodu, která je zodpovědná za tok živin uvnitř biofilmové matrice [25].

Mikroorganismy žijí v biofilmu z několika důvodů. Biofilm chrání bakterie proti nepříznivým vlivům prostředí oproti volně žijícím buňkám. Některé bakterie mohou přizpůsobit své metabolické procesy okolnímu prostředí a využít dostupné substráty pro ochranu před škodlivými podmínkami. Dále se zvyšuje odolnost bakterií vůči fyzikálním silám, působení kyslíkových radikálů a fagocytóze. Biofilm vytváří i lepší podmínky pro jejich množení [26]. Biofilm může mít pozitivní i negativní vliv na lidský organismus. Mikroorganismy ve formě biofilmu kolonizují lidský gastrointerstinální trakt a vytvářejí tak přirozenou ochranu sliznice před infekcí. Naopak biofilm může mít i patogenní účinek a představuje tak velký problém pro zdraví kvůli jeho odolnosti vůči antibiotikům a nemocem spojených s užíváním veřejných zdravotnických prostředků [26, 27].

K tvorbě biofilmu dochází nejdříve pomocí planktonických buněk, které přilnou k povrchu v důsledku Brownova pohybu nebo gravitačních sil. Pomocí motility (bičků) jsou bakterie schopné překonat elektrostatické a hydrodynamické síly. Tato fáze je reverzibilní a ovlivňuje ji celá řada faktorů (pH, teplota, iontová síla média), které umožňují, aby bakterie přilnuly k substrátu. V další fázi se tvoří vrstva buněk a začíná produkce extracelulárního slizu. Vznikají mikrobiální společenstva s vícevrstevnými buňkami uzavřenými v extra polymerní matrici. V této fázi se adheze stává nevratnou. Jakmile je dosažena požadovaná populace buňky, zralé mikrobiální buňky se oddělí, rozptýlí se do prostředí a celý proces tvorby se může znovu opakovat [28].



Obrázek 4 Tvorba biofilmu, upraveno dle [28]

Díky některým vlastnostem a funkcím jsou biofilmy tvořené bakteriemi využívány v průmyslu v oblasti životního prostředí a to konkrétně pro čistírny odpadních vod, kde se uplatňují v podobě biofilmových reaktorů pro druhý (biologický) stupeň čištění odpadní vody [29].

Imobilizace SRB v biofilmech poskytuje určitý stupeň ochrany bakterií proti expozici kyslíku. Bakterie tvořící biofilm nemohou být vyplaveny proudem vody. Biofilmové reaktory mohou také zvyšovat mikrobiální růst, neboť se předpokládá, že bakterie žijí přednostně v komunitách s povrchovou vazbou [30]. Přítomnost několika bakteriálních druhů SRB v biofilmech umožňuje využívat různé s organické a anorganické substráty a složení mikrobiální komunity ovlivňuje jak výkonost, tak stabilitu celkového biologického síran redukcujícího procesu [31].

3.1 Vhodné nosiče pro biofilm SRB

V současné době je již známo velké množství různých zařízení, které využívají přirozené schopnosti mikroorganismů imobilizovat se na nosiči. Jako náplně se používají materiály, jako jsou například různé druhy uhlí nebo zeolitů. Pomocí nosičů vhodných pro tvorbu biofilmů lze dosáhnout i vysoké účinnosti čištění odpadních vod. Pokud se použijí uhlíkové a minerální adsorbenty jako nosiče biomasy, tak tato účinnost ještě stoupá, protože

imobilizaci mikroorganismů na povrch sorbentu za vzniku biofilmu doprovází v těchto případech adsorpce nečistot z odpadní vody v pórech adsorbentu. Přes vrstvu materiálu náplně vzniká na jeho povrchu biofilm. Přítomnost těchto mikroorganismů indikuje uspokojivý stav biofilmu v náplni. U SRB jsou na povrchu biofilmu přítomny hlavně sírany a směrem k povrchu nosiče se zvyšují obsahy $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , nejspodněji S^{2-} [32].

Zeolit byl potvrzen jako účinný nosič pro SRB. Zeolity jsou krystalické hydratované hlinitokřemičitany. Skládají se z tetraedrů $[AlO_4]^{5-}$ $[SiO_4]^{4-}$, které jsou vzájemně spojeny přes atomy kyslíku. Kromě iontové výměny jsou zeolity právě schopny adsorbovat molekuly na svůj velký povrch, který je zvětšen díky kanálům a pórům. Mají vynikající fyzikální vlastnosti a nízkou cenu a dostupnost [33].

Dalším vhodným materiálem může být také křemičité sklo či slinuté sklo ve formě velikostně tříděné drti nebo tvarovaných částic, například to mohou být sintrované skleněné částice v podobě korálek [30, 34]. Využít se dají i různé akvaristické substráty ve formě porézních kuliček či kostiček vyrobených ze sintrovaného křemene. Velkým hitem je i použití polymerního bioaktivního nosiče pro růst biomasy. Výhodou těchto plastových nosičů je rychlá tvorba biofilmu, vysoká biologická aktivita, velký specifický povrch a dlouhá životnost [35].

4 Význam síran-redukujících bakterií

SRB se uplatňují v mnoha průmyslových a ekologických oblastech, na které mají významný ekonomický dopad. V důsledku metabolické produkce sirovodíku se účastní jak pozitivních, tak negativních procesů [13]. Biotechnologické procesy nacházejí uplatnění v některých odvětvích průmyslu. Velká pozornost je dnes věnována i minerálním biotechnologiím, kde dochází ke zpracování a úpravě minerálních surovin a odpadů působením mikroorganismů [22]. SRB se využívají nejvíce při odstraňování těžkých kovů z průmyslových odpadních vod, odstraňování síranových iontů, výrobě síry z odpadních vod a při odstraňování síry z ropy, benzínu a uhlí [5].

4.1 Odstraňování těžkých kovů z průmyslových odpadních vod

Odpadní voda obsahující těžké kovy vzniká v několika hlavních průmyslových zdrojích, a to v metalurgii, chemickém zpracování rud, pokovování a galvanizaci. Z tohoto důvodu je velmi závažnou hrozbou pro životní prostředí a působí toxicky i při nízkých koncentracích a bioakumulačním potenciálu. Odstraňování těžkých kovů je v posledních letech tedy často řešeným problémem. V porovnání s konvenčními fyzikálně-chemickými postupy je odstraňování těžkých kovů prostřednictvím biologické redukce síranů účinnou technikou pro úpravu a redukci těchto látek v odpadních vodách. Použití SRB přináší své výhody, mezi které patří vysoké odstraňování kovů při nízkém pH, stabilní kal, velmi nízké provozní náklady a minimální spotřeba energie [36].

Využívá se rozdílů v chemických vlastnostech síranů a sulfidů. Sírany kovů (Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Zn, Se, Pt) jsou oproti sulfidům vysoce rozpustné [37]. Dochází tedy k vysrážení kovů redukcí síranů a získané kovy pomohou být znovu využity. Aplikací SRB nedochází tedy jen k detoxikaci, ale i k znovuzískání kovových prvků [38].

4.2 Odstraňování síranů z odpadních vod

Sírany se vyskytují v podzemních a v povrchových vodách ve formě jednoduchého aniontu SO_4^{2-} . Kromě vlivu na chuť a možných projímacích účinků, nemají hygienický význam. Koncentrace síranů v povrchových vodách se řídí nařízením vlády ČR č. 82/1999 Sb., podle kterého se stanovují ukazatele a hodnoty přípustného stupně znečištění vod. Podle legislativy je maximální přípustná koncentrace síranů ve vodárenských tocích 200 mg/l a pro ostatní povrchové toky 300 mg/l [39].

Především v průmyslových odpadních vodách se musí pravidelně sledovat množství přítomných síranů, protože při vyšší koncentraci (nad 1000 mg/l) dochází k destrukci potrubí nebo betonových nádrží. Sírany mohou pocházet z kyseliny sírové, sádrovce, produktů desulfurizace uhlí a různých dalších znečišťujících odpadních látek z chemických, textilních, metalurgických a jiných provozů. Pomocí mikrobiální činnosti SRB lze sírany odstranit. Jedním z návrhů pro eliminaci síranů bylo sestavení účinného reaktoru za použití SRB *Desulfivibrio desulfuricans* a fotolitotrofních bakterií rodů *Chromatium* nebo *Chlorobium*, jejichž úkolem je oxidace nezreagovaného sulfanu na elementární síru [11].

K prvnímu reaktoru obsahujícím *Desulfivibrio desulfuricans* je přiváděna voda obsahující sírany. Při pH 6,5 a teplotě 30 °C dochází k redukci síranu na H_2S . Vzniklé sulfidy se hromadí u dna reaktoru, ze kterého se vypouštějí. Sirovodík je následně převeden do druhého reaktoru obsahujícího inertní plynný nosič s fotolitotrofními bakteriemi *Chlorobium thiosulfatophilum* nebo *Chromatium vinosum*. Nezreagovaný sirovodík je zachycen. Síra se roztaví v inertní atmosféře a filtrací je separována od biomasy, zatímco biomasa se převede do vyhřívací nádrže a živiny důležité pro množení bakterií se odvádějí zpět do systému [11].

4.3 Negativní projevy síran-redukujících bakterií

Mezi negativní vlivy SRB patří zejména koroze. Účinky koroze byly zaznamenány v případech, jako je rozsáhlá koroze vrtacích a čerpacích strojů a skladovacích nádrží. Koroze železných trubek a různých podpůrných lešení zvyšuje náklady v průmyslovém odvětví mnoha zemí. Chemická aktivita může přispět také ke korozi, ale až 15 % takových případů je přiřazováno bakteriálním účinkům neboli mikrobiální korozi (MIC). SRB nezpůsobují pouze korozi železa, ale je uváděna také jejich aktivita na oceli a nerezové oceli [40].

Biokorozi u betonového odpadního či kanalizačního potrubí také iniciují SRB. Bakterie rostou v sedimentech, na dně betonových trubek a vzniká sirovodík. Jakmile dosáhne produkce

sirovodíku aerobní zóny, síru oxidující bakterie produkují kyselinu sírovou, která postupně beton rozpouští [10, 40].

SRB hrají důležitou ekonomickou roli i v ropném průmyslu, což je důsledek jejich výskytu v okolí ložisek ropy. Tyto bakterie kontaminují ropu tím, že uvolňují sirovodík do ropných produktů. Tím dochází ke zvýšení obsahu síry v palivech [41].

Dokonce je uváděno, že SRB jsou zodpovědné za masivní úhyn ryb, rýžových plodin a úmrtí pracovníků v kanalizacích v důsledku otravy sirovodíkem. Lidé pracující v kanalizacích by měli proto používat odpovídající bezpečnostní pracovní postupy [40].

V důsledku produkce sulfidů železa v průmyslových procesech dochází k černání a zbarvení výrobků a také k jejich znehodnocení. Například v papírenství kontaminují SRB vodu a tím černá papír, který nelze pak využít [42].

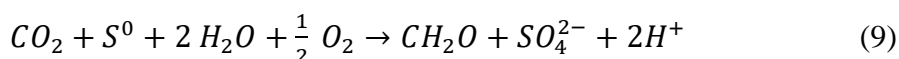
5 Zařízení pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací

Nejnámější případy procesů, kterými je možno imobilizovat srážením několik toxických kovů, jsou děje spojené právě s biologickou redukcí síranů, kdy vznikají srážedla, konkrétně ionty S^{2-} . SRB produkují ionty S^{2-} , které poté reagují s ionty kovů na sulfidy, obvykle nerozpustné ve vodě. Jelikož jsou SRB anaerobní bakterie, problémem u takového zařízení může být podmínka absence kyslíku v prostředí těchto mikroorganismů. Anaerobní podmínky zajišťují správnou funkci mikroorganismů, kdy pro kolonové uspořádání používáme bakterie, které jsou většinou striktně anaerobní. Nejčastější zařízení, jenž se uplatňuje v biologické extrakci kovů, je takové, jehož princip je založený na dvoustupňovém uspořádání. V prvním kroku dochází k uvolnění extrahovaného kovu z horninové matrice činností mikroorganismů, a v druhém kroku se tento kov vylučuje z vodné fáze biologickým srážením. Avšak většina tohoto uspořádání se zatím provádí pouze laboratorně a ve stavu techniky chybí metody imobilizace některých kovů (Pb, Zn, Ni, Cu, Hg, Ag) z průmyslových odpadních vod, které by byly více účinné s nízkými náklady [34].

5.1 Třístupňové uspořádání

Princip kolonového uspořádání je založen na kombinovatelnosti tří modulů se specifickými funkcemi. Těla modulů jsou vyplněna danými náplněmi, které slouží jako nosiče pro mikrobiální biomasu a biofilm, produkovaný bakteriemi, a zároveň slouží jako aktivní prvek v imobilizačních procesech. Toto zařízení využívané pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací obsahuje tedy celkem 3 moduly a to: sirný, sulfidový a imobilizační modul [34].

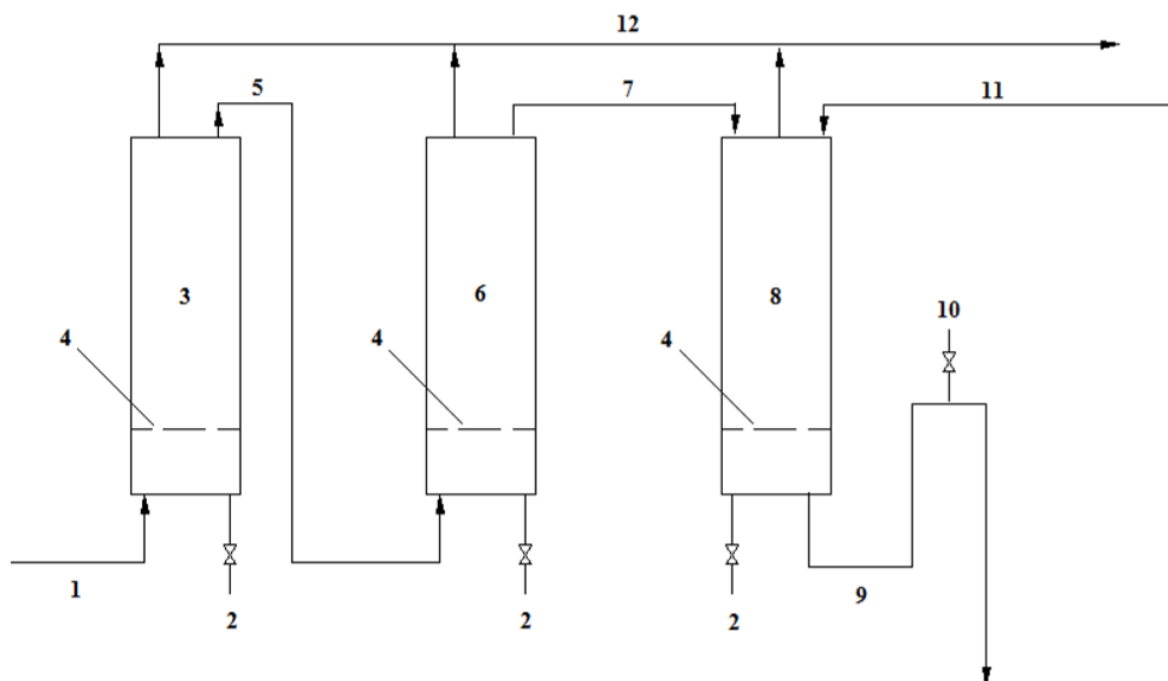
V prvním (sirném) modulu se vytváří optimální růstové podmínky pro síru oxidující bakterie, např. pro *Thiobacillus*. Kolona je naplněna nosičem obsahujícím síru. Náplň se skládá buď z elementární síry, nebo směsi elementární síry s dalším nosičem (hornina s pyritem). Nosič je pokrytý bakterií *Thiobacillus denitrificans*, která oxiduje elementární síru podle rovnice 9:



Tato bakterie produkuje síranové anionty. Do modulu je na vstupu přiváděn roztok živin, který může obsahovat např. fosforečnany, dusičnany a hydrogenuhličitan. Roztok síranových aniontů na výstupu je odváděn do sulfidového modulu [34].

Druhý (sulfidový) modul obsahuje nosič s ukotvenými síran-redukujícími bakteriemi např. *Desulfobacter hydrogenophilus*, *Desulfovibrio desulfuricans* či *Desulfovibrio vulgaris*. Náplň kolony může být buď drcený zeolit, nebo slinuté sklo z různě tvarovaných částic. SRB zde přeměňují sírany především na sulfidy. V tomto modulu může být regulováno pH. Bakterie jsou živěny síranovými anionty a vyprodukované látky se odvádějí do třetího modulu. Jak z prvního, tak druhého modulu se mohou odvádět metabolické plyny [34].

Ve třetím (imobilizačním) modulu dochází ke srážení kovů ze znečištěných vod. Neobsahuje náplň, nebo může být vyplněn inertním materiálem, který prodlužuje dobu kontaktu roztoku sulfidových aniontů s průmyslovou odpadní vodou. Tento modul sloužící k přečištění od iontů kovů nerozpustných ve vodě např. Pb, Zn, Cr, As. Tento modul je opatřen trubkou, která vede roztok sulfidových aniontů ze sulfidového modulu, dále přívodní trubkou, která přivádí vodu pro čištění a na výstupu je umístěna ve spodní polovině trubka pro odvod přečištěné vody, kalu a sraženin [34]. Podrobnější schéma třístupňového uspořádání je znázorněno na obrázku 5. V rámci této diplomové práce byl imobilizační modul vynechán.



Obrázek 5 Třístupňový systém LITHIM [43]

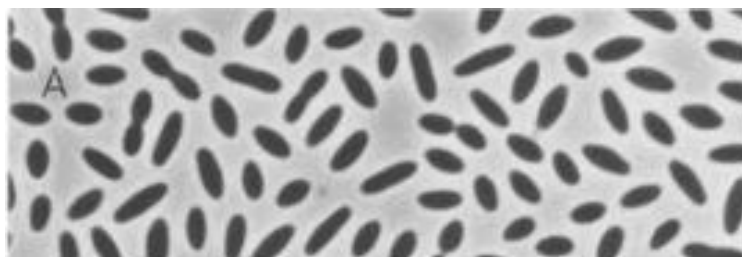
1 - přívod živin, 2 - výpusť, 3 - sírný modul, 4 - porézní přepážka, 5 - odvod síranů a metabolitů, 6 - sulfidový modul, 7 - odvod sulfidů, 8 - imobilizační modul, 9 - odvod přečištěné vody, 10 - odvzdušňovací ventil, 11 - přívod technologicky znečištěné vody, 12 - odtah plynů

6 Vybrané potencionální mikroorganismy

Pro správnou funkci biologického čištění zejména průmyslových odpadních vod je nutné vybrat vhodné mikroorganismy, jelikož se zapojují do podstatné části reakčních procesů a ovlivňují rozpustnost některých látek. Produkty jejich metabolismu se stávají srážecími činidly pro řadu iontů a také mohou mít vliv při převodu látek z jedné fáze do druhé. Uvedené bakterie by mohly být potencionálně využity buď v sírném modulu (pro síru oxidující bakterie), nebo v sulfidovém modulu (pro síran-redukující bakterie), v zařízení sloužícím k zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací [34].

6.1 *Desulfobacter hydrogenophilus*

Desulfobacter hydrogenophilus patří do kmene *Proteobacteria*, třídy *Deltaproteobacteria*, čeledi *Desulfobacteraceae* a rodu *Desulfobacter*. Tento mikroorganismus poprvé objevil Friedrich Widdel v roce 1987. Právě tento striktně anaerobní druh je jedním, který se využívá u zařízení pro zachycení iontů kovů. Řadí se mezi gram negativní SRB a tvoří tyčinky s oválným protáhlým tvarem o délce 1-3 μm a šířce 1-1,3 μm . Netvoří desulfoviridin. Vyskytuje se jednotlivě nebo ve dvojicích. Netvoří spory a je nepohyblivý [44].



Obrázek 6 *Desulfobacter hydrogenophilus* [44]

Tento druh na rozdíl od jiných z rodu *Desulfobacter* je schopný fakultativní chemolithoautotrofie. Acetát je preferovaným obecným elektronovým dárcem a zdrojem uhlíku, a je zcela oxidován na CO_2 . *D. hydrogenophilus* však také využívá H_2 a roste autotrofně s CO_2 jako jediným zdrojem uhlíku. Jako koncové akceptory elektronů zde slouží síran, siřičitan nebo thiosíran, které se pak redukují na H_2S . Dále také může využívat jako zdroj uhlíku i jako donor elektronů, pyruvát nebo ethanol [45].

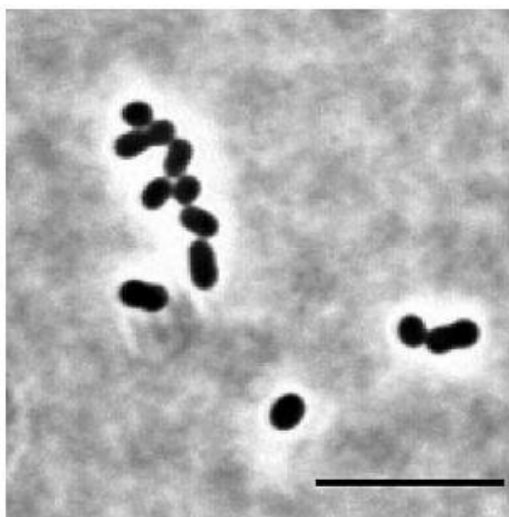
Namísto použití Calvinova cyklu nebo acetylové dráhy koenzymu A bylo zjištěno, že tento mikroorganismus obsahuje geny, které kódují unikátní cyklus reduktivní kyseliny

citronové a využívá se jako prostředek ke stanovení CO₂. Prostřednictvím tohoto cyklu probíhá fixace uhlíku. Tento jedinečný mechanismus umožňuje tak maximální růst v konkrétním prostředí [46]. *D. hydrogenophilus* se nejčastěji se vyskytuje v anoxických brakických nebo mořských sedimentech, sladkovodních usazeninách nebo v aktivovaném kalu [45].

Optimální teplotní rozsah pro růst je 28-34 °C, avšak byl zaznamenán růst i při 0 °C. Optimální rozsah pH se pohybuje mezi 6,5 až 7,4. Pro kultivaci se používají jednoduchá definovaná média obsahující sulfid jako redukční činidlo, například mořské médium s acetátem jako substrátem nebo minerální médium mořské typu se sníženým obsahem hydrogenuhličitanu a sulfidu. *D. hydrogenophilus* vyžaduje i přídavek vitamínů. Dále je nutné přidat více jak 7 g NaCl a 1 g MgCl₂ · 6H₂O na litr média [44, 45].

6.2 *Desulfobulbus mediterraneus*

Tuto síran redukující bakterii můžeme morfologicky popsat jako gram negativní, s vejčítým tvarem, šířkou 1,2-1,7 μm a délkou 1,4-3,2 μm. Jednotlivé buňky jsou pohyblivé. Řadí se mezi chemoorganotrofní organismy a je stejně jako *D. hydrogenophilus* striktně anaerobní. Obsahuje cytochromy typu b a c. Byl izolován ve Středozezemním moři z hlubinného sedimentu [47].



Obrázek 7 *Desulfobulbus mediterraneus* [47]

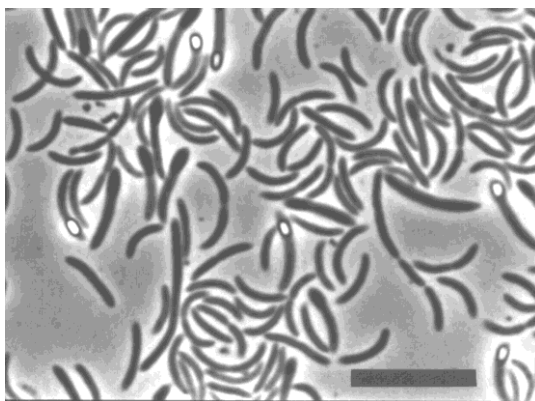
Desulfobulbus mediterraneus se biochemicky řadí mezi SRB s neúplnou oxidací substrátu. Organismus je schopen využívat propionát, pyruvát, laktát, sukcinát, fumarát, malát, alanin, primární alkoholy a mono- a disacharidy (glukóza, fruktóza aj.) jako donory elektronu,

zatímco sulfát, sulfit a thiosulfát jsou akceptory elektronu. Kyslík může být použit také jako akceptor elektronů, ale kmen není schopný růst v přítomnosti kyslíku [48].

Teplotní rozsah pro růst se pohybuje od 10 °C do 35 °C s optimální teplotou 25 °C. Roste v prostředí bohatém na NaCl (do 70 g) o pH v rozmezí mezi 6,3 až 8. Byla zaznamenána i tvorba biofilmu na skleněném sklíčku [47].

6.3 *Desulfosporosinus auripigmenti*

Desulfosporosinus auripigmenti je gram negativní SRB, která tvoří zahnuté tyčinky připomínající klobásu, někdy se jednotlivé tyčinky shlukují do delších řetězců. Průměr jednotlivých buněk je 0,4 µm a nemají bičík, tedy jsou nepohyblivé. Tato SRB tvoří oválné subterminální endospory. Díky sporám je schopná přežít v nepříznivých podmínkách i po delší dobu. Tento anaerob byl izolován ze sladkovodního sedimentu, kontaminovaného arsenem v USA. Původně byl klasifikován jako *Desulfotomaculum auripigmentum*. Fylogenetické a chemotaxonomické údaje naznačují, že *Desulfotomaculum auripigmentum* je blíže příbuzný druhům *Desulfosporosinus* než jakémukoli druhu *Desulfotomaculum* [49].



Obrázek 8 *Desulfosporosinus auripigmenti* [49]

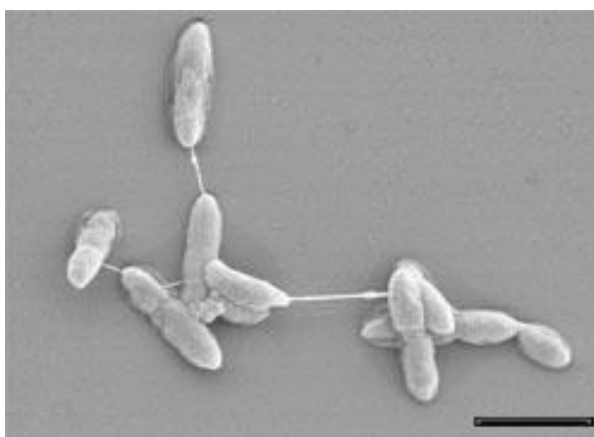
U této bakterie dochází opět k neúplné oxidaci substrátu. Síran a thiosíran se redukuje na sulfid v přítomnosti laktátu, nikoliv však v přítomnosti acetátu nebo fruktózy. Akceptory elektronu v přítomnosti laktátu jsou arsenát a fumarát. Podle studie z roku 2006 to mohou být i siřičitany, thiosírany, sírany a síra [50]. Jako dárci elektronu mohou být využity fumarát a malát. V přítomnosti síranů i laktát nebo glycerol [49, 50].

Optimální pH pro kultivaci je mezi 6,4 až 7. Jelikož se *Desulfosporosinus auripigmenti* řadí mezi mezofilní bakterie, vhodná teplota pro růst se pohybuje od 25 do 30 °C, nejlepší nárůst

byl pozorován při 28 °C. Pro kultivaci se využívá definovaného modifikovaného média dle Widdela, dále Postgate médium, původně navržené pro *Desulfovibrio* [51].

6.4 *Desulfomicrobium baculatum*

Desulfomicrobium baculatum je gram negativní SRB, která se pohybuje pomocí jednoho polárního bičíku. Jednotlivé buňky lze morfologicky klasifikovat jako krátké tyčinky se zaoblenými konci, dlouhé přibližně 1-2 µm a široké 0,6 µm, často se shlukujících do dvojic. Netvoří endospory. Isolována byla z vodou nasycené manganaté rudy a přirozeně se vyskytuje ve sladkovodních vodách a v brakických anoxických sedimentech [52].



Obrázek 9 *Desulfomicrobium baculatum* [53]

D. baculatum je striktně anaerobní bakterie a může mít buď respirační, nebo fermentační metabolismus. Jako akceptory elektronů se využívají sírany, siřičitany a thiosírany, které jsou redukovány na H₂S. Dusičnan se neredukuje. V přítomnosti síranu jsou pyruvát a laktát neúplně oxidovány na acetát a CO₂. Konečnými produkty jsou malát, fumarát a pyruvát a mohou být fermentovány pomocí sukcinátu a acetátu. *D. baculatum* je schopen využívat ethanol jako substrát. Použití ethanolu jako elektronového dárce závisí na tom, zda kultivační médium obsahuje stopové prvky a to buď wolfram, nebo molybden [53, 54]. Buňky obsahují cytochromy typu b a c. Především cytochrom c3 hraje roli při redukcí síry a vazbě přenosu elektronů na hydrogenázy. Tato bakterie obsahuje několik odlišných [NiFeSe] hydrogenáz, které se nacházejí v různých buněčných komorách [53].

Teplotní rozsah růstu se udává od 2 do 41 °C, optimální teplota pro kultivaci je 30 °C s pH 7 až 7,5. Pro svou kultivaci nevyžaduje přísun NaCl, ale jsou tolerovány koncentrace do 6% (m/V). Ani vitamíny nejsou pro růst nutné [53].

6.5 *Desulfovibrio desulfuricans*

Dalším mikroorganismem, který se řadí mezi SRB je *Desulfovibrio desulfuricans*. Někdy bývá označován jako *Desulfovibrio desulfuricans* ND32. Morfologicky jde o lehce zahnuté tyčinky o průměru přibližně 0,75 μm . Řadí se mezi gram negativní anaerobní bakterie. Je pohyblivý a produkuje bisulfát reduktázu, takzvaný desulfoviridin. Není schopný růstu po vystavení teplotě 90 °C po dobu 10 minut. Specializovaný je v tom, že má schopnost produkce methylrtuti (MeHg), což je pro lidi silný neurotoxin. Dále způsobuje značné riziko svými bioakumulačními schopnostmi v blízkosti míst potravinářských sítí po celém světě a vede k poškození ekosystémů [55].



Obrázek 10 *Desulfovibrio desulfuricans* [55]

Mimo jiné mají i spojitost s některými nemocemi gastrointestinálního traktu, kvůli jejich pomalému, nadměrnému růstu ve smíšených kulturách a obtížné identifikaci bývají často přehlíženy a jejich výskyt v lidských nemocech bývá podceňován [56].

D. desulfuricans je nekompletní oxidant s omezenou metabolickou flexibilitou. Nejsilnější růst byl pozorován během sulfátové respirace, kdy zdrojem uhlíku byl buď laktát, nebo pyruvát. Fermentační růst nastává na pyruvátu za nepřítomnosti síranu. Není schopen růst pouze na samostatném laktátu jako akceptoru elektronů, naopak je schopen využít fumarát nebo mravenčan během sulfátové respirace. Všechna média obsahující mravenčan zahrnují jako zdroj uhlíku i acetát, důležitý pro buněčnou syntézu. Využívá se především dobré schopnosti růstu pomocí fumarátu jako akceptoru elektronů, který brání sulfidové inhibici methylace rtuti, a pyruvátu jako elektronového dárce [55].

Tento kmen má vynikající schopnost přizpůsobit se okolnímu prostředí, zatímco udržuje optimální strukturu buněk pro příjem živin a umožňuje anaerobní produkci methylortuti. Běžně se vyskytuje v odpadních vodách, půdě, v oblastech ropných polí. Hojná naleziště jsou v anoxických místech půd a v sedimentech a to hlavně v mořích, kde se jim dobře daří díky vysoké koncentraci síranových iontů [55]. Jak už bylo zmíněno, nachází se i v zaživacím traktu zvířat a u lidí může způsobit vážné onemocnění [56].

D. desulfuricans je sice anaerob, ale navzdory tomu bylo zjištěno, že je schopen růstu v přítomnosti kyslíku za atmosférického tlaku. To je zapříčiněno oxidací pyruvátu na acetylkoenzym a také díky stabilní struktuře pyruvát-ferredoxin oxidoreduktáze [57]. *D. desulfuricans* je mezoofilní bakterie tolerující sůl. Optimální koncentrace NaCl pro jeho růst je cca 2 % (uvádí se i 0-3 %). Vhodné pH se pohybuje v rozmezí kolem 6,8-8,2. Největší růst byl pozorován při pH 7,8 s teplotou 32 °C [55].

Jako vhodné médium na kultivaci se používá tzv. Postgate médium B nebo C. Dalším využívaným médiem je modifikované Baarovo médium pro reduktory síranu nebo trypticový sójový agar. Sulfát však nemusí být nutný pro růst, protože bylo prokázáno, že může být pěstován v pyruvátovém prostředí bez sulfátu [58].

6.6 *Desulfovibrio vulgaris*

Desulfovibrio vulgaris má zahnuté tyčinky dlouhé přibližně okolo 1,6 μm , je pohyblivý s jediným polárním bičíkem. Tento anaerob tvoří desulfoviridin, ale netvoří spory [59]. Nejvyužívanějším kmenem, především pro výzkumy je *D. vulgaris* pocházející z oblasti Hildenborough ze Spojeného království, kde byl poprvé izolován v roce 1946 z hlíny. Slouží jako modelový organismus pro studium obecného energetického metabolismu SRB, dále pro pochopení dopadu na ekonomiku, včetně biokoroze kovové infrastruktury i bioremediace toxických kovových iontů [9].



Obrázek 11 *Desulfovibrio desulfuricans* [60]

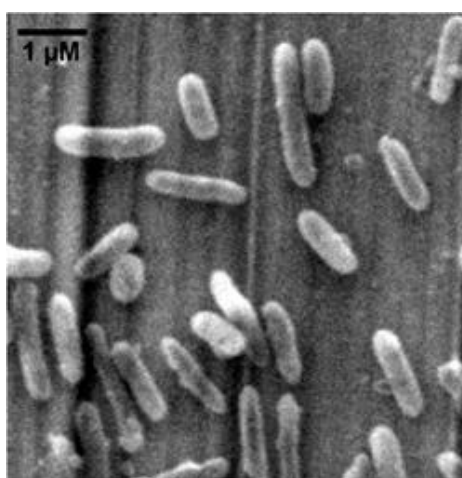
Jako zdroj uhlíku pro *D. vulgaris* Hildenborough slouží laktát/síran nebo jsou využívány i jiné zdroje, jako je pyruvát, formiát a některé primární alkoholy. *D. vulgaris* Hildenborough není schopen metabolizovat fumarát nebo malát, ale může fermentovat pyruvát v nepřítomnosti síranu, avšak ne příliš s velkým efektem, protože vzhledem k nekompletnímu cyklu kyseliny trikarboxylové jsou zdroje uhlíku oxidovány pouze na úroveň octanu [61]. Tato bakterie je unikátní v tom, že má schopnost snižovat vysoce rozpustný a toxický Cr (VI) na méně toxický a méně rozpustný Cr (III) [62].

Obecně se vyskytuje v anoxických podpovrchových plochách, jako jsou sedimenty a spodní vody, kde lze nalézt různé sloučeniny v důsledku mikrobiálního rozkladu organických materiálů pocházejících z rostlin nebo zvířat [61]. Dále se hojně vyskytuje v oblasti ropných polí, kde jeho metabolismus má velmi negativní důsledky pro ropný průmysl. Způsobuje například koroze vrtacích a čerpacích strojů nebo skladovacích nádrží [9].

D. vulgaris se řadí mezi mezofilní bakterie. Optimální teplota pro růst je 37°C, ale i nižší (33°C) s vhodným pH okolo 6,5 až 7,3. Může růst i v zásaditější nebo kyselejší oblasti při vhodně zvolených podmínkách. Ukázalo se, že má schopnost také růst při nízkých hladinách kyslíku [63]. Pro kultivaci se používá opět Postage médium [64].

6.7 *Thiobacillus denitrificans*

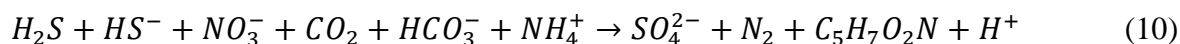
Thiobacillus denitrificans spadá do β -podtřídy Proteobakterií. Jednotlivé buňky lze morfologicky klasifikovat jako gram negativní krátké tyčinky, schopné pohybu pomocí polárního bičíku. Podobně jako *D. hydrogenophilus* je tento mikroorganismus schopen chemolithoautotrofie, na rozdíl od něj není striktně anaerobní, ale pouze fakultativně anaerobní. Vytváří čiré nebo slabě opalescentní kolonie na thiosulfátovém či dusičnanovém agaru. Optimální teplota pro růst se pohybuje mezi 28 – 32 °C s pH 6,8 – 7,4. *T. denitrificans* je v přírodě velice rozšířený. Vyskytuje se v půdách, blátě, sladkovodních i mořských sedimentech, odpadních vodách a kanalizacích především za anoxických podmínek [65].



Obrázek 12 *Thiobacillus denitrificans* [66]

Na rozdíl od předešlých uvedených SRB se řadí mezi síru oxidující bakterie. Může ovlivňovat cyklus uhlíku, síry, dusíku i železa v půdách, sedimentech a kontaminovaných podzemních vodách, kde se využívá jeho schopnosti přeměňovat toxické a rizikové látky na látky netoxické [66].

Růst *T. denitrificans* za anaerobních podmínek, kdy jako zdroj energie může posloužit sulfid a dusičnan je tedy koncovým akceptorem, nám vyjadřuje tato souhrnná rovnice:



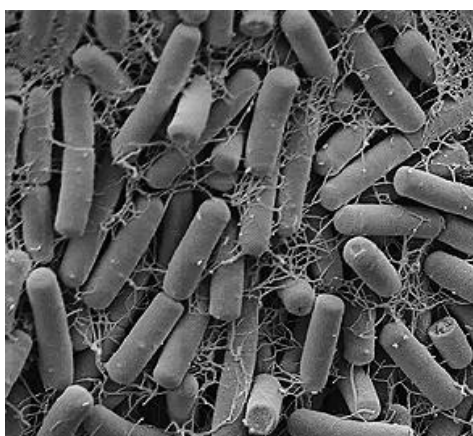
Jeho schopnost oxidovat Fe^{2+} v závislosti na dusičnanech při anaerobních podmínkách by mohla ovlivňovat transport kovů a radionuklidů v podpovrchové vrstvě, protože minerály, které jsou tvořeny oxidy železa (Fe^{3+}), mají schopnost absorbovat těžké kovy a radionuklidy, například uran [67].

Tento mikroorganismus je také schopen autotrofní denitrifikace, čehož se využívá právě k odstranění dusičnanových a dusitanových iontů z kontaminovaných vod, které by jinak mohly způsobit například eutrofizaci vod a negativně tak ovlivnit životní prostředí. Negativní dopad mají dusičnanové ionty i na lidské zdraví, kde mohou způsobovat methemoglobinémii. energii získává oxidací elementární síry a dalších anorganických sírných sloučenin. Uvolněné elektrony se využijí za anoxických podmínek pro redukci dusičnanových nebo dusitanových iontů až na molekuly plynného dusíku za pomoci enzymatické katalýzy [68].

Tohoto principu se využívá také v případě již zmíněného kolonového systému, aby se vytvořilo požadované anaerobní prostředí. V první koloně *T. Denitrificans* produkuje síranové anionty a vytváří tak i vhodné podmínky pro *D. hydrogenophilus*, který je umístěn do druhé kolony. Uvolněné sírany se pak přeměňují na sulfidy [34].

6.8 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis patří mezi gram pozitivní bakterie, původně byl pojmenován jako *Vibrio subtilis*. Jednotlivé buňky jsou morfologicky klasifikovány jako tyčinky o délce 4 – 10 μm a průměru 0,25 – 1 μm [69]. Tento obligátně aerobní mikroorganismus je pohyblivý se schopností vytvářet vysoce rezistentní endospory, díky kterým může přežít drsné podmínky jako je UV záření, oxidační stres, vysoká teplota či vakuum. Jeho výskyt je všudypřítomný a snadno se přizpůsobuje v různých prostředích biosféry. Těžké je určit přímo skutečné prostředí, kde *Bacillus* narostl. Spory mohou být unášeny větrem a migrovat na dlouhé vzdálenosti a akumulovat se v jiném místě, ale běžně se vyskytuje nejčastěji v půdě [70]. V laboratorních podmínkách je schopen růst v teplotním rozmezí od 11 do 52 °C. Optimální teplota růstu je 37 °C při pH 7,5 [71].



Obrázek 13 *Bacillus subtilis* [72]

Tato bakterie není patogenní. Často se vyskytuje v gastrointestinálním traktu zvířat i lidí. Pro jeho probiotické vlastnosti se přidává do potravy za účelem zlepšení stravitelnosti, střevní mikroflóry a imunitní modulace [73].

Bacillus subtilis patří mezi nejvíce zkoumané bakterie a často slouží jako modelový organismus pro různé laboratorní studie i pro výzkum gram pozitivních bakterií. Populární je pro své vynikající fermentační vlastnosti, vysoké produktové výtěžky (20 – 25 g/l) bez toxických vedlejších produktů [74]. Dále je využíván v průmyslu pro jeho různorodou aplikaci. První jeho aplikace byla při výrobě japonského potravinářského výrobku složeného z fermentované sóji již o tisíc let dříve. Tato bakterie je velkým zdrojem užitečných enzymů a je schopna vylučovat velké množství proteinů do kultivačního média. Z toho důvodu je považován za jakousi buněčnou továrnu pro průmyslové enzymy a bioléčiva. V molekulární biologii se využívá pro přípravu rekombinantních proteinů [74, 75]. Také vykazuje antagonistické vlastnosti způsobené hlavně produkcí antifungálních antibiotik. V zemědělství se využívá jako fungicid, kdy houbovité organismy a plísně hynou v důsledku nedostatku živin díky jeho snadnému a rychlému růstu [76].

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na mikroorganismy, schopné redukovat sírany na sulfidy. Tyto bakterie se využívají v druhém sulfidovém modulu u zařízení sloužící k zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací. Cílem experimentální části bylo provést laboratorní testy s vybranými mikroorganismy zaměřené na produkci sulfidů v závislosti na různých experimentálních podmínkách a získané výsledky experimentů vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7 Použitý materiál

Použité mikroorganismy

Pro první stupeň kolonového systému byl použit referenční kmen *Bacillus subtilis* CCM 2216 pocházející z německé sbírky mikroorganismů DSMZ. Stejně tak byl použit pro optimalizaci druhého stupně kolonového systému *Desulfobacter hydrogenophilus* DSM 3380, taktéž z německé sbírky mikroorganismů DSMZ.

Pomůcky

Odměrné kádinky a válce různých objemů, Erlenmayerovy baňky, stříčky, pinzety, gumové zátky, lžičky, skleněné zkumavky (15 ml), plastové zkumavky (50, 15 ml), skleněné zásobní lahve různých objemů, mikropipety, pipety, špičky, Pasteurovy pipety, Petriho misky, jednorázové očkovací klíčky, krycí a podložní sklíčka, kahan, anaerobní box, sada na kyvetový test LCK 563, gumové hadice, kolony, kanystry různých objemů, plastové stojany.

Přístroje

V tabulce 2 je uveden seznam všech použitých přístrojů včetně jejich výrobců.

Tabulka 2 Seznam použitých přístrojů

Název	Výrobce
Analytické váhy	Kern ABJ
Autokláv	Systém VX-40
Čerpadlo	Envicomp, KNF SIMDOS
Horkovzdušný sterilizátor	Memmert
Chladnička	Electrolux
Mrazák	Gorenje
Mikroskop	Nikon Eclipse 80i s dig. Kamerou DSFI-1
Předvážky	Kern 440-49N
Spektrofotometr UV-VIS DR6000	Hach
Termostat	Memmert

Použité chemikálie a reagensie

V tabulce 3 je uveden seznam všech použitých chemikálií a reagensií.

Tabulka 3 Seznam použitých chemikálií

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

8 Kultivační média a roztoky

Fyziologický roztok

Do 1 litru destilované vody bylo přidáno 9 g NaCl. Takto připravený fyziologický roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a dále uchován v chladničce při teplotě 5 °C.

S8 médium

Dle složení uvedeného v tabulce 4 bylo naváženo celkem 28,77 g přípravku. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené médium bylo ponecháno v zásobní lahvi a uchováno v chladničce při teplotě 5 °C.

Tabulka 4 Složení S8 média

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

Modifikované Van Houten médium

Dle složení uvedeného v tabulce 5 bylo naváženo celkem 9,26 g přípravku. Následně bylo přidáno 5 ml zásobního roztoku thioglykolátu sodného a 100 ml zásobního roztoku solí, jehož složení je uvedeno v tabulce 6. Postup přípravy roztoku je totožný s přípravou média. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu

při 121 °C po dobu 15 minut. Takto připravené médium bylo ponecháno v zásobní lahvi a uchováváno v chladničce při teplotě 5 °C.

Tabulka 5 Složení modifikovaného Van Houten média

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

Tabulka 6 Složení zásobního roztoku solí

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

Masopeptonový bujón, masopeptonový agar

Příprava masopeptonového bujónu (MPB) a masopeptonového agaru (MPA) je téměř stejná a liší se pouze přítomností agarového prášku v případě MPA. Tabulka 7 je tedy společná pro oba druhy médií. Dle složení uvedeného v tabulce 7 bylo naváženo pro přípravu MPB celkem 20 g přípravku. To vše bylo převedeno do 1 litru destilované vody. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a takto připravené médium uchováno

v zásobní lahvi v chladničce při teplotě 5 °C. Pro přípravu MPA bylo naváženo celkem 40 g přípravku a převedeno do 1 litru destilované vody. Po úpravě pH výsledného roztoku na hodnotu přibližně 7,2 byl výsledný roztok sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Médium pro MPA bylo rozlito na sterilní plastové Petriho misky o tloušťce pohybující se v rozmezí 3 – 4 mm a takto připravené půdy byly uchovány v chladničce při teplotě 5 °C pro další manipulaci.

Tabulka 7 Složení masopeptonového bujónu a agaru

Složení	g/l
Masový extrakt	10
Pepton bakteriologický	5
NaCl	5
Agar (pro MPA)	20
Konečné pH (při 25 °C 7,2 ± 0,2)	

Živný roztok pro *Desulfobacter hydrogenophilus*

Pro životaschopnost SRB se do sulfidového modulu dávkuje při průtoku (65-109 ml/h) živný roztok, jehož složení je uvedeno v tabulce 8. Celkem bylo naváženo 9,28 g přípravku. Následně bylo přidáno 0,4 ml etanolu. To vše bylo převedeno do 1 litru kohoutkové vody. Takto připravený živný roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a poté uschován v chladničce při teplotě 5 °C.

Tabulka 8 Složení živného média pro SRB

Složení	g/l
CH ₃ COONa	2,306
NaCl	3
MgCl ₂ ·6H ₂ O	2
Na ₂ SO ₄	1,5
NaNO ₃	0,0274
KH ₂ PO ₄	0,45
Etanol	0,4 ml

9 Pracovní postupy

9.1 Příprava aerobní bakteriální kultury

Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury aerobního mikroorganismu *B. subtilis*, která byla uchována v kryozkumavce v mrazáku. Následně byla inkubována 24 hodin při 30 °C a přeočkována do nového média (MPA, MPB) a znovu inkubována za stejných podmínek. Takto připravená kultura byla uchována v chladničce při teplotě 5 °C pro pozdější manipulaci.

9.2 Příprava anaerobní bakteriální kultury

Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury anaerobního mikroorganismu *D. hydrogenophilus*, který byl uchován v kryozkumavce v mrazáku. Pro manipulaci s anaerobními mikroorganismy je nutné použít anaerobní box, který umožňuje pracovat za inertní atmosféry přísunem inertního N₂. Do média, příslušného pro daný mikroorganismus bylo napipetováno 100-200 µl bakteriální kultury v závislosti na celkovém objemu média. Následně byly zásobní láhve v boxu uzavřeny a inkubovány přibližně 7 – 10 dní při 30 °C. Poté byly připravené kultury ponechány v chladničce pro pozdější manipulaci.



Obrázek 14 Anaerobní box

9.3 Barvení dle Grama

Na podložním sklíčku byla v kapce fyziologického roztoku rozetřena bakteriální suspenze. Po zaschnutí byla kultura zafixována plamenem kahanu. Následně bylo provedeno barvení pomocí krystalové violeti po dobu 60 s. Barvivo bylo slito a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem po dobu 20 s a opláchnut alkoholem, poté i destilovanou vodou po dobu 5 s. Preparát byl dobarven safraninem po dobu 60 s a opláchnut destilovanou vodou po dobu 5 s a osušen. Takto připravený preparát byl pozorován pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i v režimu fázového kontrastu při celkovém zvětšení 1000x s imerzí.

9.4 Kultivace bakteriálního biofilmu

Pro kultivaci bakteriálního biofilmu bylo vybráno celkem 6 nosičů. Prvním nosičem byl zeolit, dále vápenec, plastové kroužky a akvaristické nosiče Substrat Pro a Biomech od firmy EHEIM. Všechny tyto nosiče byly také již testovány v předešlé diplomové práci pro optimalizaci prvního stupně kolového systému [43]. Posledním testovaným nosičem byl pyrit.

Jednotlivé nosiče byly nejdříve několikrát propláchnuty destilovanou vodou a zbaveny tak mechanických nečistot. Následně byly sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 145 °C po dobu 48 hod. Plastové kroužky byly sterilizovány při 80 °C po dobu 48 hod.

Do 100 ml uzavíratelné láhve bylo převedeno přibližně 80 ml média Van Houten, do kterého byla zaočkována bakteriální kultura *D. hydrogenophilus*. Celý tento postup probíhal v anaerobním boxu. Následně bylo médium s buněčnou kulturou inkubováno při 30 °C po dobu 7 – 10 dní. Stejný postup byl opakován i s bakteriální kulturou *Bacillus subtilis* s tím rozdílem, že jako médium bylo použito MPB, do kterého byla tato bakterie zaočkována a následně inkubována.

Pro otestování, zda *B. subtilis* popřípadě i *D. hydrogenophilus* je schopen na vybraných nosičích tvořit biofilm, byly do 50 ml plastových zkumavek asepticky převedeny předem promyté a vysterilizované nosiče. Obsah zkumavky byl doplněn 1:1 médiem s bakteriální suspenzí *B. subtilis* a čistým MPB (pro *D. hydrogenophilus* doplněno čistým Van Houten médiem) a zkumavky byly hermeticky uzavřeny a následně inkubovány. Po uplynutí 7 dní byl proveden průkaz biofilmu na jednotlivých nosičích.

9.5 Průkaz bakteriálního biofilmu

Pro průkaz bakteriálního biofilmu byl použit komerční přípravek Biofinder od španělského výrobce ITRAM HIGIENE, který se využívá běžně pro kontrolu hygieny v potravinářství a měl by detekovat biologickou aktivitu mikroorganismů přilnutých k povrchu. Tento oranžově zbarvený gelový přípravek se skládá z řady roztoků (chemické produkty a činidla), které v přítomnosti aktivních katalasy pozitivních mikroorganismů přemění peroxid vodíku na kyslík a vodu, což se projeví vznikem bublinek a pěny. Po nanesení přípravku lze pozorovat výsledek již během pár vteřin, při negativním nálezu nedochází k žádným změnám [77].

Pro průkaz biofilmu bylo z plastových zkumavek odebráno pinzetou několik vzorků jednotlivých nosičů. Nosiče byly následně několikrát opláchnuty destilovanou vodou a položeny na sterilní Petriho misku, kde na ně byl aplikován přípravek Biofinder. Po 5 minutách působení byly vizuálně odečteny výsledky.

9.6 Konstrukce dvoustupňového uspořádání kolonového systému

Pro zjednodušení byl třístupňový systém poupraven a zjednodušen tak, že první kolona (sirný modul) a druhá kolona (sulfidový modul) byly ponechány, zatímco poslední kolona (imobilizační modul) je pro optimalizaci produkce sulfidů nepotřebná a byla vynechána. Místo třístupňového bylo ponecháno tedy dvojstupňové uspořádání.

Celý systém se skládá ze skleněných kolon, které jsou mezi sebou propojeny gumovými hadičkami, které přivádí a odvádí živný roztok s médiem do zásobního barelu. Všechny součásti kolon byly před použitím vysterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 145 °C po dobu 48 hod. Plastové barely, hadice i skleněné kolony byly propláchnuty denaturovaným lihem a následně vysvíceny baktericidní UV lampou. Jednotlivé skleněné spoje byly před konstrukcí promazány vazelinou. Po průkazu biofilmu byly vybrány celkem 4 vhodné náplně nosičů do kolon a to pyrit, vápenec, akvaristický nosič Biomech a zeolit. Jednotlivé nosiče byly před použitím propláchnuty destilovanou vodou a sterilizovány. Každý nosič byl nasypán do jedné kolony. Do každé kolony bylo dále nalito médium Van Houten obsahující *D. hydrogenophilus* a čisté médium Van houten s poměrem 1:1. Postupně se přecházelo z média na živný roztok. Kolony byly poté obaleny alobalem, aby nedošlo k destrukci bakterií při vysvícení místnosti UV lampou. Dále byly sestaveny dvě kolony stejným postupem obsahující akvaristický nosič s imobilizovanou bakterií *Bacillus subtilis*, které byly následně zality MPB.

První fáze se skládala ze čtyř kolon plněných vápencem, zeolitem, pyritem a akvaristickým nosičem (viz příloha). Po odebrání vzorků z kolon byly vždy doplněny novým živným roztokem pro SRB. Takto byly kolony ponechány při laboratorní teplotě přibližně tři měsíce pro kultivaci biofilmu a následnou produkci sulfidů. Kolona se zeolitem byla po čase odstraněna z důvodu nedostatečné kultivace biofilmu *D. hydrogenophilus*. Kolona s pyritem byla ponechána v tomto stavu až do konce testování.

V další fázi testování bylo ke koloně obsahující vápenec a akvaristický nosič připojeno čerpadlo, díky kterému se mohl řídit průtok živného roztoku kolonami. Spodem byly přiváděny živiny pomocí gumových hadiček a horem odváděny do sběrného barelu.

V poslední fázi ke koloně s vápencem a koloně s akvaristickým nosičem byly připojeny přes gumové hadičky 2 kolony obsahující imobilizovaný *B. subtilis* na akvaristickém nosiči. Fotodokumentace tohoto dvoustupňového uspořádání je uvedena v příloze. První dvě kolony s *B. subtilis* vytvářejí vhodné anaerobní podmínky pro bakterii *D. hydrogenophilus* imobilizovanou na nosičích v dalších kolonách. Přes zapojené čerpadlo byl nejdříve čerpán do kolon MPB, který byl nejdříve ředěn postupně destilovanou vodou, až se následně přešlo na živný roztok pro SRB. Opět bylo médium i živný roztok přiváděn ze spodní části a odváděn z horní části do sběrného barelu.

9.7 Stanovení sulfidů

Pro stanovení sulfidů byl využit komerčně dostupný kyvetový test LCK 653 od německé firmy HACH s rozsahem měření 0,1 – 2 mg/l S²⁻. Tato sada zajišťuje maximální přesnost a efektivitu při měření, snadnou a bezpečnou manipulaci. Balení obsahuje měrné kyvety s čárovým kódem, reagentie a návod. Princip testu je založen na reakci Dimethyl-p-fenylendiaminu se sirovodíkem za vzniku meziproduktové sloučeniny, která se mění na leukomethylenovou modř a ta se oxiduje na methylenovou modř pomocí železitých iontů [78].



Obrázek 15 Sada kyvetového testu pro stanovení sulfidů [79]

Pro stanovení koncentrace sulfidů byl postup následující. Z každé kolony obsahující jiný druh nosiče s biofilmem tvořeným *D. hydrogenophilus* bylo odebráno 15 ml vzorku do plastové zkumavky. Ze zkumavky byly pipetovány 4 ml do měrné kyvety. Následně bylo do kyvety pipetováno 0,2 ml reagentie. Kyvety byly uzavřeny, několikrát protřepány a následně inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě. Po uplynulé době byly vzorky proměřeny na spektrofotometru HACH DR 6000 při vlnové délce 665 nm. Množství sulfidů vyprodukovaných SRB se stanovovalo nejdříve pouze z jednotlivých kolon obsažených anaerobní bakterii. V další fázi se stanovovaly sulfidy po zapojení čerpadla při různém průtoku živného média pro SRB. V poslední fázi čerpadlo čerpalo nejdříve MPB, později živný roztok pro SRB. Obě média nejdříve procházela kolonou s *B. subtilis* a následně přes kolony naplněné vápencem a akvaristickým nosičem obsahující biofilm *D. hydrogenophilus*, ze kterých byly odebírány vzorky pro stanovení sulfidů.

9.8 Měření koncentrace rozpuštěného kyslíku

Z kolony bylo odpuštěno 15 ml vzorku do plastové zkumavky. Po stanovení sulfidů se ze zbytku vzorku (přibližně 10 ml) stanovovala koncentrace rozpuštěného kyslíku. Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla měřena pomocí standardní optické kyslíkové elektrody LDO, která funguje na principu luminiscenčního zhášení. Před měřením byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a osušena. Následně se elektroda připojila k digitálnímu multimetru HQ30D. Vzorek byl přelit do čisté kádinky, do které po zapnutí přístroje byla umístěna elektroda, a spustilo se měření. Po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota koncentrace rozpuštěného kyslíku v mg/l.

9.9 Měření oxidačně-redukčního potenciálu

Z kolony bylo odpuštěno 15 ml vzorku do plastové zkumavky. Hodnota ORP byla měřena standardní plnitelnou ORP argentochloridovou elektrodou s keramickým solným můstkem. Před měřením byla elektroda opláchnuta destilovanou vodou a osušena. Po připojení elektrody k digitálnímu multimetru HQ30D byla dále elektroda umístěna do kádinky, do které byl umístěn vzorek. Po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota ORP v mV.

9.10 Měření pH

Z kolony bylo odpuštěno 15 ml vzorku do plastové zkumavky. Hodnota pH byla měřena standardní gelovou pH elektrodou. Elektroda byla před měřením opláchnuta destilovanou vodou a osušena. Poté byla elektroda připojena k digitálnímu multimetru HQ30D. Po vyzvání přístroje byla elektroda umístěna do kádinky se vzorkem a spuštěno měření. Po ustálení rovnováhy byla odečtena hodnota pH.

9.11 Měření průtoku

Průtok kolonami byl zajištěn pomocí čerpadla, na kterém se nastavila konkrétní hodnota průtoku. Byl měřen objem proteklého média či živného roztoku za jednotku času ve druhé a třetí fázi kolonového systému a to tak, že do plastových zkumavek byl odváděn vzorek hadičkami pomocí čerpadla z jedné kolony, která obsahovala vápenec a z druhé kolony, která byla naplněna akvaristickým nosičem. Aby byl zajištěn stejný čas průtoku oběma kolonami, hadičky, kterými přitékal živný roztok, byly přiškrceny podle potřeby. Průtok se měřil pro zajištění dostatečného množství živného roztoku a média dávkovaného do kolon. Výsledný naměřený objem byl přepočítán na 1/24hod.

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1 První stupeň kolonového systému

Vzhledem k přechozím experimentům prvního stupně biologické imobilizace byl původní *T. denitrificans* pro své nedostatečné účinky nahrazen *B. subtilis*, u kterého dochází k rychlejšímu pomnožení a jeho nároky na kultivaci jsou daleko nižší. Před samotným sestavením prvního stupně (sirného modulu) kolonového systému, obsahujícího daný nosič a biofilm bakterie *B. subtilis*, musela být tato bakterie pomnožena. Do uzavíratelné 11 láhve bylo převedeno potřebné množství MPB a do něj rozetřena bakteriální kultura. Následovala inkubace a poté byl ověřen růst biofilmu.

10.1.1 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu *B. subtilis*

Pro ověření růstu biofilmu *B. subtilis* na jednotlivých nosičích byl použit přípravek Biofinder, který se aplikoval na nosič s bakteriálním biofilmem. Po 5 minutách působení přípravku byly vizuálně odečteny výsledky, které jsou shrnuty v tabulce 9.

Tabulka 9 výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu *B. subtilis* s přípravkem Biofinder

	Zeolit	Vápenec	Pyrit	Biomech
Kontrola (nosič)	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	++

Pro vyloučení falešné pozitivivity nosičů byly před experimenty testovány samotné sterilní nosiče, které byly umístěny na sterilní Petriho misky. Následně na ně byl aplikován přípravek Biofinder a po 5 minutách byl vizuálně odečten výsledek. Při negativní reakci (kontrola) nedošlo k žádné reakci (bez pění a bublinek). Tím byla vyloučena falešná pozitivita nosičů.

Většina nosičů prokázala pozitivní reakci na biofilm. Nejvíce pozitivní se ukázal akvaristický nosič Biomech, čemuž odpovídalo i nadměrné pění. Pyrit vykazoval o něco menší reakci prokázanou tvorbou bublinek plynu. Stejně tak u vápence došlo pouze k mírné pozitivní reakci na rozdíl od zeolitu, u kterého tento test vyšel zcela negativní. Po vyhodnocení tedy vyplývá, že pro imobilizaci bakterie *B. subtilis* na inertní nosič pro první stupeň kolonového systému je nejvhodnější použít akvaristický nosič Biomech. Toto zjištění koresponduje s údaji v literatuře [43].

10.1.2 Stanovení parametrů kolony s *B. subtilis*

Po následné inkubaci a ověření růstu byly sestrojeny dvě stejné kolony, do kterých byl umístěn sterilní akvaristický nosič Biomech. Obě kolony byly následně doplněny MPB obsahující kulturu *B. subtilis*. Takto se kolony ponechaly ke kultivaci biofilmu. Po necelém měsíci se ke kolonám připojilo čerpadlo, které čerpalo nejdříve MPB do celého průtočného systému (přes nosič a vápenec s kultivovaným *D. hydrogenophilus*). Postupně se přecházelo z MPB na živný roztok. Při každém odběru vzorků z kolon byly stanovovány jednotlivé parametry a to konkrétně průtok média kolonami, koncentrace kyslíku, oxidačně-redukční potenciál a hodnota pH.

Tabulka 10 První stupeň kolonového systému s *B. subtilis*

Biomech	Parametry			
	Doba provozu kolony (dny)	Průtok (l/24h)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)
1	3,312	1,8	-259,3	7,65
2	4,896	0,83	-298,6	7,57
5	6	0,15	-318,9	7,83
6	7,2	0,24	-311,1	7,51
8	7,56	4,71	-198,5	7,71

První stupeň systému slouží především k tomu, aby došlo ke zbavení se kyslíku, kdy kvůli jeho vyšším hodnotám nefunguje metabolismus striktně anaerobní SRB *D. hydrogenophilus* ve druhém stupni správně. Jak vyplývá z tabulky 10, s provozní dobou kolony klesala postupně koncentrace kyslíku, avšak jakmile byl k *B. subtilis* do kolony přiváděn místo MPB živný roztok pro *D. hydrogenophilus* (6. den po odběru vzorků), bakterie nebyla schopná využít přítomné látky a její metabolismus přestal fungovat. Hodnota pH se pohybovala v neutrální oblasti. S narůstajícím oxidačně-redukčním potenciálem do zápornějších hodnot se snižovala hodnota kyslíku.

10.2 Druhý stupeň kolonového systému

Před samotným sestavením druhého stupně (sulfidového modulu) kolonového systému, obsahujícího daný nosič a biofilm bakterie *D. hydrogenophilus*, musela být tato bakterie pomnožena. Do uzavíratelné 1l láhve bylo převedeno potřebné množství Van Houten média a do něj rozetřena bakteriální kultura. Následovala inkubace a poté byl ověřen růst biofilmu. Po vyhodnocení průkazu biofilmu byly následně sestrojeny 4 kolony. První kolona byla naplněna zeolitem, druhá pyritem, třetí obsahovala akvaristický nosič Biomech a čtvrtá vápenec. Všechny kolony byly doplněny 1:1 čistým médiem Van Houten a médiem s kultivovaným *D.*

hydrogenophilus. Po kultivaci biofilmu v kolonách z nich byly odebírány vzorky pro stanovení koncentrace sulfidů, množství rozpuštěného kyslíku, ORP a hodnoty pH. Jednotlivé parametry byly stanovovány i po zapojení prvního stupně (kolona s *B. subtilis*) před tento druhý stupeň a vyhodnoceny.

10.2.1 Vyhodnocení průkazu bakteriálního biofilmu *D. hydrogenophilus*

Přípravek Biofinder se dá použít pouze pro aerobní či fakultativně anaerobní bakterie. Protože *D. hydrogenophilus* se řadí mezi striktně anaerobní bakterie, bylo před samotným experimentem s přípravkem pro testování biofilmu odděleno menší množství nosičů, opláchnuto fyziologickým roztokem a přendáno do dalších uzavíratelných plastových zkumavek obsahujících kultivační médium. Po 14 dnech inkubace byl vizuálně ověřen stupeň zákalu a černání, který poukazoval na přítomnost a pomnožení *D. Hydrogenophilus*. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 11 Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu *D. hydrogenophilus*

	Zeolit	Vápenec	Pyrit	Plast	Biomech	Substrat Pro
Stupeň zákalu a černání	-	+	+	-	++	++

Největší stupeň zákalu média poskytovaly akvaristické nosiče Biomech a Substrat Pro, které vykazovaly kolem svých povrchů také projevy černání. U vápence a pyritu došlo pouze k lehkému zákalu. Zeolit a plast nevykazoval ani zákal ani černání.

Dále byl průkaz biofilmu proveden pomocí přípravku Biofinder, který se aplikoval na nosič s bakteriálním biofilmem tvořeným *D. hydrogenophilus*. Po 5 minutách působení přípravku byly vizuálně odečteny výsledky, které jsou shrnuty v tabulce 12. V příloze je uveden příklad pozitivního a negativního biofilmu na nosičích. Před experimenty byla vyloučena opět falešná pozitivita nosičů.

Tabulka 12 Výsledky hodnocení průkazu bakteriálního biofilmu *D. hydrogenophilus* s přípravkem Biofinder

	Zeolit	Vápenec	Pyrit	Plast	Biomech	Substrat Pro
Kontrola (nosič)	-	-	-	-	-	-
<i>D.hydrogenophilus</i>	-	++	++	-	+++	+++

Přestože by anaerobní bakterie *D. hydrogenophilus* neměla po aplikaci přípravku Biofinder vykazovat žádnou reakci, bylo pozorováno intenzivní pění a tvorba bublinek u akvaristických nosičů Substrat Pro a Biomech. Jedná se o vysoce porézní slinuté sklo a keramické tělíka s velkým specifickým povrchem (450 ml/l). Oba tyto nosiče mají velmi dobrou biologickou redukční schopnost, podporují uchycení bakterií a jsou abrazivně odolné, lehké a mají dlouhou životnost [80]. Pozitivní reakce menšího rozsahu se projevila u vápenec. Pyrit také vykazoval známky tvorby bublinek plynu. Plastové kroužky nevykazovaly pozitivní reakci, stejně tak i Zeolit byl na testování biofilmu negativní. Pozitivní reakce u některých nosičů byla pravděpodobně nikoliv vlivem *D. hydrogenophilus*, ale vlivem kontaminace jiným, aerobním organismem.

Na základě těchto dvou testů byly vybrány celkem 4 nosiče pro imobilizaci bakterií na inertní nosič pro druhý stupeň kolonového systému. Jedná o akvaristický nosič Biomech, který vykazoval nejlepší výsledky, dále pyrit, vápenec a pro srovnání zeolit, který v obou testech vyšel negativní, ale byl jako nosič použit v původním kolonovém systému LITHIM [34].

10.3 Stanovení parametrů bezprůtočného systému

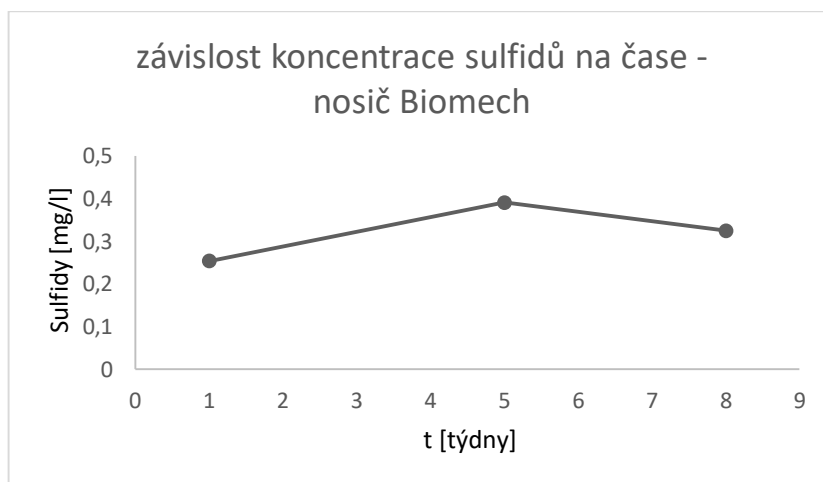
Po kultivaci biofilmu *D. hydrogenophilus* v jednotlivých kolonách obsahujících vápenec, akvaristický nosič Biomech, pyrit a zeolit, byly průběžně odebírány vzorky z každé kolony pro stanovení koncentrace sulfidů, množství rozpuštěného kyslíku, oxidačně-redukčního potenciálu a hodnoty pH. U kolony obsahující zeolit bylo zhodnoceno, že tvorba biofilmu *D. hydrogenophilus* není dostatečná, kdy na nosiči nedocházelo k žádným projevům černání (viz příloha). Nedostatečná kultivace biofilmu byla potvrzena i nedostatečnou schopností redukce síranů na sulfidy, kdy byly opakovaně naměřeny nulové hodnoty sulfidů. Z těchto důvodů byla kolona obsahující zeolit zrušena a lze konstatovat, že tento typ nosiče není pro mikroorganismus *D. hydrogenophilus* vhodný.

10.3.1 stanovení parametrů bezprůtočného systému – akvaristický nosič Biomech

Tabulka 13 Parametry bezprůtočného systému - akvaristický nosič Biomech

Biomech	Parametry			
	Sulfidy (mg/l)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)	pH
Doba provozu kolony (týdny)				
1	0,254	1,90	-264,2	7,22
5	0,391	1,17	-285,3	7,49
8	0,325	1,25	-255,5	7,38

Měření parametrů u kolony s akvaristickým nosičem probíhalo pouze třikrát, jak je uveden v tabulce 13. Hodnota oxidačně-redukčního potenciálu se pohybovala okolo -270 mV a hodnota pH okolo 7,3. Z grafu 1 vyplývá, že hodnoty sulfidů neklesly pod 0,2 mg/l a zároveň nepřekročily hranici 0,4 mg/l. Po prvním týdnu provozu kolony koncentrace sulfidů vzrůstala. Po 8 týdnech se hodnota sulfidů pohybovala podobně jako u 5. týdne.



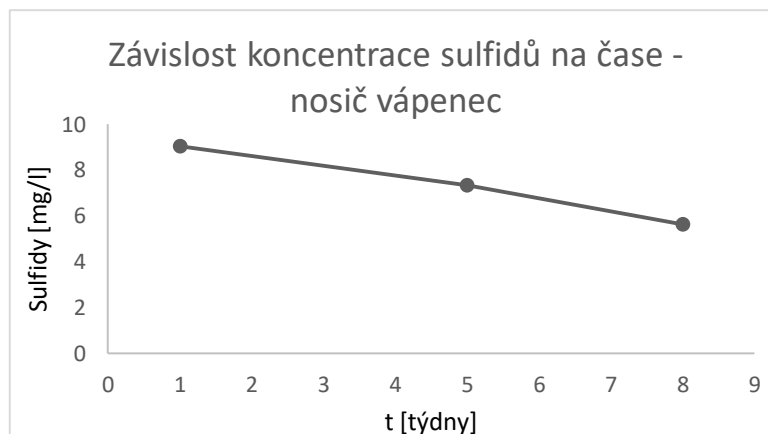
Graf 1 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič Biomech (bezprůtočný systém)

10.3.2 Stanovení parametrů bezprůtočného systému – nosič vápenec

Tabulka 14 Parametry bezprůtočného systému - nosič vápenec

vápenec Doba provozu kolony (týdny)	Parametry			
	Sulfidy (mg/l)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)	pH
1	9,05	2,15	-289,9	7,53
5	7,35	1,85	-278,5	7,14
8	5,65	1,39	-255,3	7,47

Stejně jako u kolony s akvaristickým nosičem i u kolony plněné vápencem měření probíhalo 8 týdnů. V porovnání s předchozí kolonou koncentrace sulfidů u kolony s vápencem je několikanásobně vyšší. Hodnota v 1. týdnu začíná na 9,05 mg/l. S dobou provozu kolony postupně jejich koncentrace rovnoměrně klesá, jak je vidět v grafu 2. Hodnoty ORP a pH jsou podobné s hodnotami ORP a pH akvaristického nosiče.



Graf 2 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič vápenec (bezprůtočný systém)

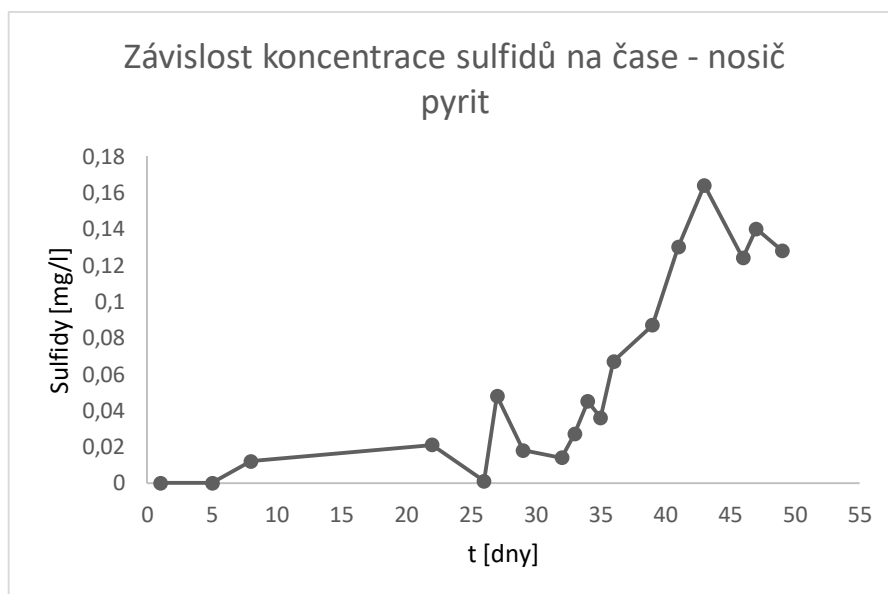
10.3.3 Stanovení parametrů bezprůtočného systému – nosič pyrit

Tabulka 15 Parametry bezprůtočného systému - nosič pyrit

Pyrit Doba provozu kolony (dny)	Parametry			
	Sulfidy (mg/l)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)	pH
1	0	3,98	-248,5	8,39
5	0	3,58	-225,4	8,17
8	0,012	3,25	-258,7	8,06
22	0,021	2,95	-248,2	8,30
26	0,001	3,02	-239,8	7,99
27	0,048	2,98	-225,4	8,15
29	0,018	2,89	-230,2	8,29
32	0,014	2,95	-228,9	8,19
33	0,027	2,91	-231,5	7,89
34	0,045	2,54	-261,2	8,39
35	0,036	2,50	-254,1	8,21
36	0,067	2,85	-275,2	7,99
39	0,087	2,74	-264,0	8,09
41	0,13	3,01	-238,4	7,92
43	0,164	2,56	-245,2	8,18
46	0,124	3,66	-218,5	8,29
47	0,14	2,82	-210,2	8,22
49	0,128	2,66	-231,0	8,14

Kolona obsahující pyrit a kultivovaný biofilm *D. hydrogenophilus* byla v porovnání s kolonami s vápencem a akvaristickým nosičem byla v provozu po celou dobu pouze v bezprůtočném režimu. Jednotlivé naměřené parametry jsou uvedeny v tabulce 15. Vzhledem k tomu, že při průkazu biofilmu pyrit vykazoval pouze slabší reakce, dalo se očekávat, že i

hodnoty sulfidů budou sniženy. Z těchto důvodů zůstala kolona pouze v první fázi bez napojení na čerpadlo. Jak vyplývá z grafu 3, byla sledována závislost koncentrace sulfidů na čase. V prvních dnech byly hodnoty sulfidů téměř nulové, nejspíše z důvodu snížené kultivace. Proto se koncentrace sulfidů stanovovaly po kratších časových úsecích až od 20. dne. Zhruba v polovině provozu kolony začaly hodnoty sulfidů stoupat až do 43. dne. Občasné snížení hodnot sulfidů je způsobeno přítomností většího množství kyslíku, který se do kolony pravděpodobně dostal při doplňování nového živného roztoku. Zvýšený obsah kyslíku pak způsobil odumírání mikroorganismu. Hodnoty sulfidů jsou tím vyšší, čím nižší je koncentrace rozpuštěného kyslíku. Nejvyšší hodnota sulfidů (0,164 mg/l) byla naměřena 43. den s odpovídající nejnižší koncentrací kyslíku (2,56 mg/l). U tohoto nosiče se hodnoty pH pohybovaly spíše v alkalické oblasti (okolo hodnoty 8). Hodnoty ORP jsou nižší než dané hodnoty u nosiče pyritu a akvaristického nosiče.



Graf 3 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič pyrit (bezprůtočný systém)

10.4 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s *B. subtilis*

Po vyhodnocení průkazu biofilmu na jednotlivých nosičích a stanovení koncentrace sulfidů v první fázi kolonového systému byla vybrána do průtočného systému kolona obsahující akvaristický nosič Biomech a kolona obsahující nosič vápenec. Pomocí čerpadla byly přiváděny živiny pro růst SRB v kolonách. Opět byly průběžně odebírány vzorky z každé kolony pro stanovení koncentrace sulfidů, množství rozpuštěného kyslíku, oxidačně-

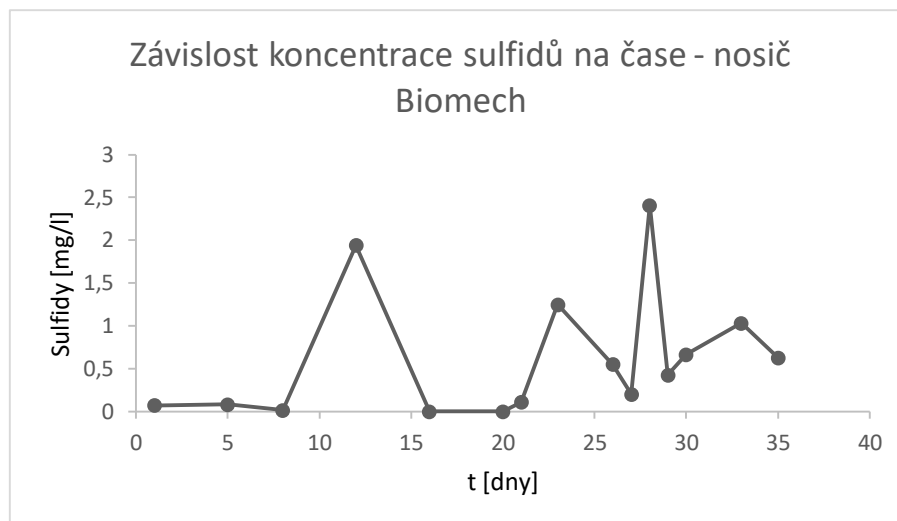
redukčního potenciálu a hodnoty pH a také byl měřen průtok živného roztoku kolonami pro zajištění dostatečného množství živin pro růst a správné fungování metabolismu *D. hydrogenophilus*.

10.4.1 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s *B. subtilis* – akvaristický nosič Biomech

Tabulka 16 Parametry průtočného systému - nosič Biomech bez zapojení kolony s *B. subtilis*

Biomech	Parametry				
	Doba provozu kolony (dny)	Sulfidy (mg/l)	Průtok (l/24h)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)
1	0,07	-	3,85	-238,5	7,62
5	0,081	1,008	3,58	-245,2	7,22
8	0,014	-	3,25	-255,9	7,12
12	1,94	0,768	2,95	-238,5	7,93
16	0	0,288	3,02	-239,8	7,21
20	0	0,24	2,98	-245,4	7,11
21	0,108	4,608	2,89	-239,2	6,98
23	1,25	8,064	2,95	-228,9	6,95
26	0,547	1,152	3,51	-211,8	7,05
27	0,202	5,76	3,54	-261,2	7,15
28	2,41	8,64	2,98	-254,1	7,25
29	0,426	7,488	2,75	-275,2	7,31
30	0,666	9,72	2,89	-264,0	6,89
33	1,03	3,312	3,51	-238,4	7,14
35	0,629	1,872	3,7	-245,2	7,35

Z tabulky 16 vyplývá, že průtočný systém v této fázi byl v provozu celkem 35 dní. V porovnání s bezprůtočným systémem vykazoval akvaristický nosič u druhé fáze po zapojení čerpadla o něco nižší hodnoty sulfidů na začátku. Hodnoty koncentrace sulfidů se pohybovaly v rozmezí od nuly do 2,41 mg/l. Jak je vidět v grafu 4, u 12. dne náhle došlo k výraznému zestupu koncentrace sulfidů. Ihned na to koncentrace opět poklesla až do záporných hodnot. Po 20. dni koncentrace opět začala stoupat. Nejvyšší hodnoty sulfidů byly naměřeny v období po 21. dni průtočného uspořádání (nejvyšší hodnoty byla stanovena 28. den). Jak je z hodnot patrné, byl systém v tomto období schopen produkovat sulfidy v dostatečném množství i při průtoku kolem 7-8 l/24h. Snížené koncentrace sulfidů opět korelovaly se zvýšenou koncentrací rozpuštěného kyslíku, kdy hodnoty koncentrace kyslíku byly tedy příliš vysoké na to, aby došlo k dostatečné redukci síranů na sulfidy. Hodnoty pH se pohybovaly v neutrální oblasti. Po celou dobu měření se hodnoty ORP pohybovaly okolo -250 mV. Nebyl zjištěn vliv ORP na množství produkce sulfidů.



Graf 4 Zavislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič Biomech (průtočný systém bez kolony s *B. subtilis*)

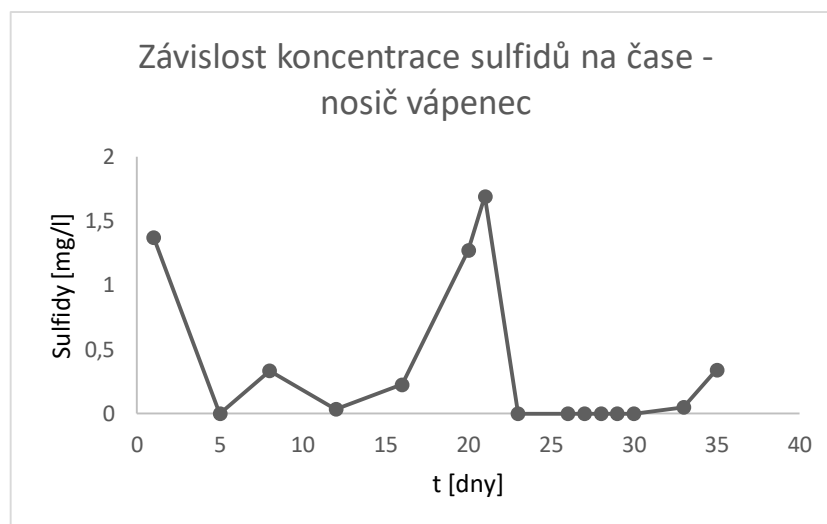
10.4.2 Stanovení parametrů průtočného systému bez zapojení kolony s *B. subtilis* – nosič vápenc

Tabulka 17 Parametry průtočného systému - nosič vápenc bez zapojení kolony s *B. subtilis*

vápenc	Parametry				
Doba provozu kolony (dny)	Sulfidy (mg/l)	Průtok (l/24h)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)	pH
1	1,37	-	3,98	-228,9	7,29
5	0	0,576	3,78	-255,9	7,42
8	0,334	-	3,45	-239,8	7,15
12	0,036	1,008	3,55	-258,9	7,31
16	0,227	3,24	3,12	-219,7	7,15
20	1,27	2,64	2,88	-225,9	7,21
21	1,69	3,744	2,95	-239,2	7,45
23	0	2,592	2,78	-238,1	7,02
26	0	2,88	3,31	-221,8	7,25
27	0	10,08	3,58	-211,2	6,98
28	0	7,56	3,48	-254,1	7,35
29	0	6,336	2,75	-235,8	7,41
30	0	6,84	2,89	-237,0	7,09
33	0,051	1,44	3,51	-238,4	7,19
35	0,341	1,872	4,28	-245,2	7,25

Stejně jako u akvaristického nosiče i kolona s vápencem v tomto průtočném uspořádání byla v provozu celkem 35 dní. Dle tabulky 17 se hodnoty sulfidů se pohybovaly v rozmezí od nuly do 1,69 mg/l. Oproti předešlému akvaristickému nosiči hodnoty sulfidů u kolony s vápencem nejdříve klesaly z 1,37 mg/l k nulovým hodnotám. Z grafu 5 vyplývá, že k největšímu nárůstu koncentrace došlo od 12. do 21. dne. Následně došlo k výraznému poklesu

koncentrace sulfidů, což souvisí s výrazným navýšením průtoku živného roztoku kolonou. Od 27. dne se hodnoty koncentrace sulfidů ustálily okolo 0. Po snížení průtoku na hodnotu 1,872 l/24h se hodnoty sulfidů opět zvýšily. Při porovnání hodnot sulfidů u kolony plněné vápencem a akvaristickým nosičem v tomto průtočném systému, vychází lépe kolona obsahující akvaristický nosič, kde byly naměřeny vyšší koncentrace sulfidů. Hodnoty ORP a pH jsou velmi podobné jako předchozího nosiče. Avšak u vápence se pohybuje pH přibližně o půl stupně níž (pH okolo 7).



Graf 5 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič vápenec (průtočný systém bez kolony s *B. subtilis*)

10.5 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s *B. subtilis*

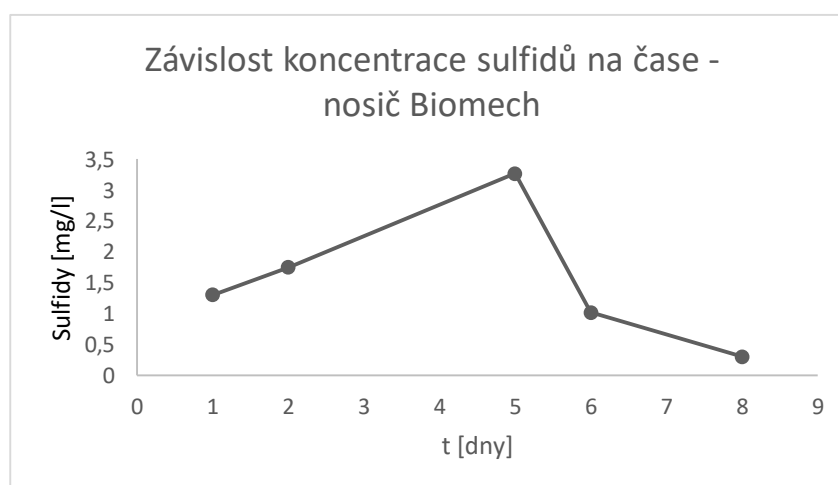
Pro dvoustupňové uspořádání se ke koloně naplněné akvaristickým nosičem a vápencem s kultivovaným biofilmem *D. hydrogenophilus* připojily dvě kolony naplněné akvaristickým nosičem s kultivovaným biofilmem *B. subtilis*. Pomocí čerpadla byly přiváděny živiny pro *B. subtilis* (MPB) a postupně se přecházelo na živný roztok pro SRB. Opět byly průběžně odebírány vzorky z obou kolon pro stanovení koncentrace sulfidů, množství uvolněného kyslíku, oxidačně-redukčního potenciálu a hodnoty pH a také byl měřen průtok MPB a živného roztoku kolonami pro zajištění dostatečného množství živin pro růst *D. hydrogenophilus* a *B. subtilis*.

10.5.1 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s *B. subtilis* – akvaristický nosič Biomech

Tabulka 18 Parametry průtočného systému - akvaristický nosič Biomech, se zapojením kolony s *B. subtilis*

Biomech	Parametry				
	Doba provozu kolony (dny)	Sulfidy (mg/l)	Průtok (l/24h)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)
1	1,3	3,312	1,8	-285,1	7,21
2	1,75	4,896	0,83	-298,2	7,50
5	3,27	6	0,15	-324,1	7,67
6	1,015	7,2	0,24	-315,2	7,95
8	0,3	7,56	4,71	-254,1	7,61

Tato poslední fáze trvala 8 dní a celkem bylo provedeno 5 měření dle tabulky 18. V grafu 6 můžeme vidět, že koncentrace sulfidů po zapojení prvního stupně a čerpadla začínala na 1,3 mg/l. Čím déle byl tento systém v provozu, tím více docházelo ke snižování koncentrace sulfidů. Při nejnižší koncentraci kyslíku (0,15 mg/l) a průtoku 6 l/24h se hodnota sulfidů zvýšila na 3,27 mg/l. Nejnižší hodnoty sulfidů neklesly (kromě posledního odběru) pod 1 mg/l. Při navyšování průtoku docházelo k postupnému poklesu sulfidů. K tomuto jevu dochází z důvodu, že *B. subtilis* nedokáže tolerovat přechod z MPB na živný roztok, jehož živiny nedokáže využít pro svůj metabolismus, což dokazují i hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku, které postupně stouply až na 4,71 mg/l. Při této koncentraci nejsou schopny SRB účinně redukovat sírany na sulfidy. Zpomaluje se metabolismus jak bakterie *B. subtilis* tak i *D. hydrogenophilus* a buňky postupně přestávají redukovat přítomné sírany na sulfidy. V této fázi hodnoty ORP překročily hodnotu -300 mV. Hodnota pH se pohybovala okolo 7,5.



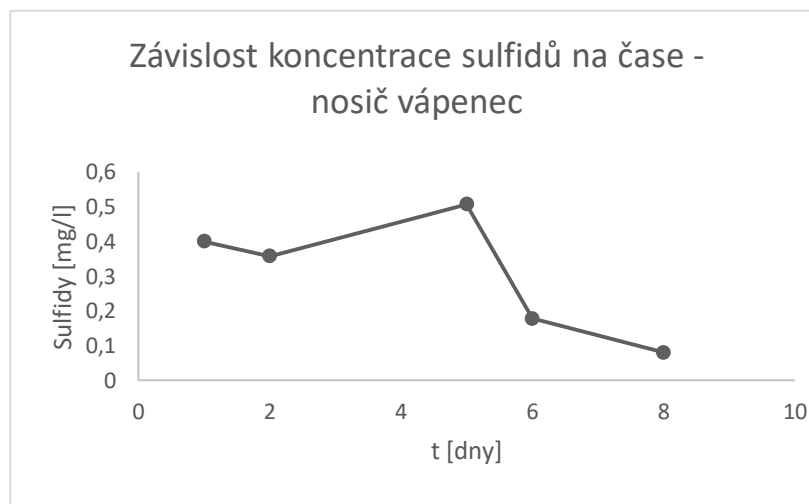
Graf 6 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič Biomech (průtočný systém s kolonou s *B. subtilis*)

10.5.2 Stanovení parametrů průtočného systému po zapojení kolony s *B. subtilis* – nosič vápenec

Tabulka 19 Parametry průtočného systému – nosič vápenec, se zapojením kolony s *B. subtilis*

vápenec	Parametry				
Doba provozu kolony (dny)	Sulfidy (mg/l)	Průtok (l/24h)	Kyslík (mg/l)	ORP (mV)	pH
1	0,4	3,024	5,84	-232,1	7,25
2	0,357	2,592	0,12	-308,9	7,54
5	0,507	1,92	0,14	-315,8	7,32
6	0,178	7,56	1,46	-259,4	7,16
8	0,08	9,36	5,39	-221,5	7,49

Stejně jako u předchozí kolony trvala tato fáze také 8 dní s tím rozdílem, že v druhém stupni byla zapojena kolona obsahující vápenec s kultivovaným biofilmem *D. hydrogenophilus*. Oproti akvaristickému nosiči jsou uvedené hodnoty koncentrace sulfidů a rozpuštěného kyslíku v tabulce 19 nižší. V grafu 7 můžeme vidět závislost koncentrace sulfidů na čase pro toto uspořádání. Koncentrace rozpuštěného kyslíku opět stoupá až na hodnotu 5,39 mg/l. Pravděpodobně nedochází k dostatečné výživě *B. subtilis* živným roztokem, a tím dochází opět ke zpomalení jeho metabolismu a k postupnému odumírání buněk. V porovnání s akvaristickým nosičem jsou hodnoty pH a ORP přibližně stejné.



Graf 7 Závislost koncentrace sulfidů na čase pro nosič vápenec (průtočný systém s kolonou s *B. subtilis*)

11 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla zpracována literární rešerše zaměřená na problematiku mikroorganismů schopných produkovat v rámci svých pochodů sulfidy, které jsou potenciaálně dále využitelné např. pro srážení kovů z odpadních vod. Na základě této rešerše a dostupnosti mikroorganismů na pracovišti ÚEnviChI byl pro experimentální práci zvolen *D. hydrogenophilus*.

V rámci experimentální práce byl tento zvolený mikroorganismus za vhodných podmínek kultivován. Pro zvolení vhodného nosiče biofilmu byly provedeny laboratorní experimenty se šesti různými typy materiálů - zeolitem, vápencem, pyritem, plastovými nosiči a dvěma typy akvaristických nosičů s názvy Biomech a Substrat Pro. Jako nejvhodnější se na základě provedených experimentů ukázaly oba akvaristické nosiče se stejnou mírou tvorby biofilmu bakterie *D. hydrogenophilus*. Biofilm byl prokázán také na nosičích z vápence a pyritu, na plastových nosičích a zeolitu se biofilm nevytvořil. Pro kolonové testy byly jako nosiče zvoleny jeden ze zástupců akvaristických nosičů (Biomech) a dále pak vápenec a pyrit. Na nich byla tvorba biofilmu sice horší, ale jsou cenově dostupnější.

Další část práce již byla zaměřena na kolonové experimenty s výše uvedenými nosiči. V první fázi byly kolony ponechány v neprůtočném režimu. Prokázala se nízká účinnost tvorby sulfidů v koloně, kde byl jako nosič biofilmu použit pyrit. Z tohoto důvodu byly do další fáze testování, tj. do průtočného režimu, použity pouze zbylé nosiče Biomech a vápenec.

V průtočném systému bez zapojení prvního stupně nebyla u vápence produkce sulfidů tak účinná jako u akvaristického nosiče Biomech. S tím souvisel i průtok média oběma kolonami, kdy u vápence byl pozorován vyšší odpor průtoku média než u akvaristického nosiče.

Poslední fáze průtočného režimu zahrnovala připojení dvou kolon obsahujících akvaristický nosič Biomech s kultivovaným biofilmem *B. subtilis*. Po zapojení prvního stupně došlo v obou případech (vápeneč i Biomech) ke zlepšení produkce sulfidů. Avšak po přechodu z MPB na živný roztok určený především pro výživu SRB, došlo u obou nosičů k poklesu koncentrace sulfidů. Následkem přechodu na jiné médium nebyl *B. subtilis* schopen plně využívat živiny pro svůj metabolismus, došlo ke zvýšení koncentrace rozpuštěného kyslíku na vstupu do druhé kolony s SRB, které následně nebyly schopné dostatečně redukovat sírany na sulfidy. Pokles sulfidů tedy souvisel s hodnotami rozpuštěného kyslíku, kdy se zvyšující koncentrací kyslíku koncentrace sulfidů klesala.

Jedním ze sledovaných parametrů byla také hodnota pH. Hodnota pH se pohybovala jak v bezprůtočném, tak i v průtočném režimu téměř u všech nosičů v neutrální oblasti. V bezprůtočném režimu u nosiče pyritu se hodnota pH pohybovala více v alkalické oblasti. Přibližně o půl stupně byla vyšší než u vápence a akvaristického nosiče Biomech.

Při sledování hodnot oxidačně-redukčního potenciálu bylo prokázáno, že u bezprůtočného tak i průtočného zapojení kolonového systému se hodnota oxidačně-redukčního potenciálu pohybovala v anaerobní oblasti. Nejnižší hodnota ORP (-324,1 mV) byla naměřena u kolony s akvaristickým nosičem Biomech v průtočném režimu po připojení prvního stupně. Obecně platí, že čím více se ORP pohyboval v zápornějších hodnotách, tím nižší byl obsah rozpuštěného kyslíku ve vzorcích a tím došlo k vyšší produkci sulfidů.

Posledním sledovaným parametrem byla koncentrace rozpuštěného kyslíku. Čím více se koncentrace kyslíku přibližovaly k nulovým hodnotám, tím byla produkce sulfidů účinnější. Nejnižší hodnoty rozpuštěného kyslíku byly naměřeny v poslední fázi kolonového systému po zapojení prvního stupně. U obou nosičů (Biomech, vápenec) se hodnoty blížily nule.

Po shrnutí všech výše uvedených poznatků, můžeme konstatovat, že v kolonovém systému LITHIM druhého stupně (sulfidový modul) lze nejlépe nahradit původní nosič zeolit akvaristickým nosičem Biomech. I přes jeho vyšší pořizovací náklady tento akvaristický nosič s velkým specifickým povrchem má daleko lepší výsledky a také dostatečnou životnost a není nutná jeho častá obměna v kolonovém systému.

12 ZDROJE

- [1] DAR, S. A. *Diversity and Activity of Sulfate-reducing bacteria in Sulfidogenic Wastewater Treatment Reactors*. 2007. PhD Thesis. TU Delft, Delft University of Technology.
- [2] HUBER, B., HERZOG B., DREWES J., et al. Characterization of sulfur oxidizing bacteria related to biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters. *BMC microbiology*, 2016, 16.1: 153.
- [3] LUPTÁKOVÁ, A., KUŠNIEROVÁ, M., FEČKO, P. *Minerálne biotechnológie II.: Sulfuretum v prírode a v priemysle*. Vysoká škola báňská-Technická univerzita, Hornicko-geologická fakulta, 2002.
- [4] BARTON, L., HAMILTON, A. *Sulphate-reducing Bacteria: environmental and engineered systems*. Cambridge University Press, 2007. ISBN: 9780511541490.
- [5] LUPTAKOVA, A. Importance of sulphate-reducing bacteria in environment. *Nova Biotechnologica*, 2007, 7.1.
- [6] BEIJERINCK, M. W. Ueber die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlensäure als Kohlenstoffquelle ernähren können. *Centralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt II*, 1904, 11: 592-599.
- [7] PFENNIG, N., WIDDEL, F., TRÜPER, H. G. The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In: *The prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1981. p. 926-940.
- [8] CASTRO, H. F, WILLIAMS, N. H., OGAM, A. Phylogeny of Sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 2000: 31(1): 1-9.
- [9] HEIDELBERG, J. F., SESHADRI R., HAVEMAN S. A. et al. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Nature Biotechnology* 2004, 22(5): 554-9.

- [10] BARTON, L., FAUQUE, G. D. Biochemistry, physiology and biotechnology of sulfate-reducing bacteria. *Advances in applied microbiology*, 2009, 68: 41-98.
- [11] FEČKO, P., KUŠNIEROVÁ, M., ČÁBLÍK, V., PEČTOVÁ, I. *Environmentální biotechnologie*. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava, 2004.
- [12] COUTINHO, C., MAGALHÃES, F. C., ARAÚJO-JORGE, T. C. Ultrastructure of sulphidogenic biofilms rich in sulphate-reducing bacteria causing corrosion in the offshore oil extraction platforms off Brazil's atlantic coast. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1994, 40.3: 227-241.
- [13] MUYZER, G., STAMS, A. J. M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2008, 6: 441-54.
- [14] BAUMGARTNER, L. K., REID, R. P., DUPRAZ C. et al. Sulfate reducing bacteria in microbial mats: changing paradigms, new discoveries. *Sedimentary Geology*, 2006, 185.3-4: 131-145.
- [15] SÁNCHEZ-ANDREA, I., STAMS, A. J. M., HEDRICH, S. et al. Desulfosporosinus acididurans sp. nov.: an acidophilic sulfate-reducing bacterium isolated from acidic sediments. *Extremophiles*, 2015, 19.1: 39-47.
- [16] POSTGATE, J. R. The sulphate-reducing bacteria. New York, NY, *Cambridge University Press*, 1984, 208s.
- [17] ZHANG, M., WANG, H. Organic wastes as carbon sources to promote sulfate reducing bacterial activity for biological remediation of acid mine drainage. *Minerals Engineering*, 2014, 69: 81-90.
- [18] LI, X., LAN, S., ZHU, Z. et al. The bioenergetics mechanisms and applications of sulfate-reducing bacteria in remediation of pollutants in drainage: A review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2018, 158: 162-170.

- [19] RABUS, R., HANSEN, T. A., WIDDEL, F. Dissimilatory sulfate-and sulfur-reducing prokaryotes. In: *The prokaryotes*. Springer, New York, NY, 2006. p. 659-768.
- [20] ISMAIL, M., YAHAYA, N., BAKAR, A. A. et al. Cultivation of sulphate reducing bacteria in different media. *Malaysian Journal of Civil Engineering*, 2014, 26.3.
- [21] RACEK, J. Oxid uhelnatý a sirovodík (sulfan) – vznik, metabolismus, význam pro organismus. *Labor Aktuell* 2012, 4.
- [22] LUPTÁKOVÁ, A., KUŠNIEROVÁ, M. Odstraňovanie ťažkých kovov a sulfátov z odpadových vôd pomocou sulfát-redukujúcich baktérií. *Acta Montanistica Slovaca*, 2000, 5.3.
- [23] HUSSAIN, A., HASAN, A., JAVID, A. et al. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. *3 Biotech* 2016, 6.2: 119.
- [24] COSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K. J. How bacteria stick. *Scientific American*, 1978, 238:86-95.
- [25] JAMAL, M., TASNEEM, U., HUSSAIN, T. et al. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 4.3: 1-15.
- [26] JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*, 2004, 236.2: 163-173.
- [27] KVASNIČKOVÁ, E., PALDRYCHOVÁ, M., MAŽÁTKOVÁ, O., MASÁK, J. Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické listy*, 2016, 110.7: 485-490.
- [28] VASUDEVAN, R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 2014, 1.3: 00014.
- [29] BAUDIŠOVÁ, D., MIKEŠ, J. Biofilmy v čistírenství. *Mikrobiální biofilmy*, 2011, 234-239.

- [30] MCMAHON, J. L. *Development of a sulfate reducing packed bed bioreactor for use in a sustainable hydrogen production process*. Queen's University, Canada, 2007. PhD Thesis.
- [31] D'ACUNTO, B., ESPOSITO, G., FRUNZO, L., PIROZII, F. Dynamic modeling of sulfate reducing biofilms. *Computers & Mathematics with Applications*, 2011, 62.6: 2601-2608.
- [32] SIROTKIN, A. S., KIRILINA, T. V., SEMJONOVA, J. N., CHALILOVA, A. A. *Biofiltrace odpadních vod*. Univerzita J. E. Purkyně, Fakulta životního prostředí. Ústí nad Labem 2014. ISBN 978-80-7414-857-6.
- [33] DOBEŠOVÁ, A: *Syntetické zeolity a jejich iontovýměnné vlastnosti pro vybrané ionty*. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati: Fakulta technologická, 2017.
- [34] SLEZÁK, M., PALARČÍK, J., SLEHOVÁ, E., BLAŽKOVÁ, Z. *Zařízení pro zachycení iontů kovů ze znečištěných vod biologickou imobilizací*. Česká republika. 2016-32637. Zapsáno 27. 09. 2016.
- [35] BORKAR, R. P.; GULHANE, M. L.; KOTANGALE, A. J. Moving bed biofilm reactor – a new perspective in wastewater treatment. *Journal of Environmental Science. Toxicology and Food Technology*, 2013, 6.6: 15-21.
- [36] KIRAN, G., PKSHIRAJAN, K., DAS, G. Heavy metal removal by sulfate reduction using anaerobic sludge biomass from a wastewater treatment plant. *Research Gate* [online]. 2014 [online]. 2014 [cit. 19-02-27]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/276270934_Heavy_metal_removal_by_sulfate_reduction_using_anaerobic_sludge_biomass_from_a_wastewater_treatment_plant
- [37] LLOYD, J. R., MABBETT, A. N., WILLIAMS, D. R. et al. Metal reduction by sulphate-reducing bacteria: physiological diversity and metal specificity. *Hydrometallurgy*, 2001, 59.2-3: 327-337.
- [38] DOS SANTOS VENCESLAU, Sofia Cristina. *Electron transfer chains in sulfate reducing bacteria*. 2011. PhD Thesis. Universidade NOVA de Lisboa (Portugal).

- [39] *Nariadení vlády, kterým se stanoví ukazatele a hodnoty přípustného stupně znečištění vod.* In: Sbíрка zákonů. Praha, 1999, ročník 1999, 82/1999 Sb.
- [40] JAVAHERDASHTI, R. Impact of sulphate-reducing bacteria on the performance of engineering materials. *Applied microbiology and biotechnology*, 2011, 91.6: 1507.
- [41] POSTGATE, J. *Mikróby a my*, Praha, Pyramída, 1982.
- [42] ODOM, J. M. Industrial and environmental activities of sulfate-reducing bacteria. In: *The sulfate-reducing bacteria: Contemporary perspectives*. Springer, New York, NY, 1993. p. 189-210.
- [43] ŘEHÁK, Z.: Diplomová práce. *Optimalizace prvního stupně kolonového systému LITHIM*. Univerzita Pardubice: Fakulta chemicko-technologická, 2018.
- [44] WIDDEL, F. New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing *Desulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov. *Archives of microbiology*, 1987, 148.4: 286-291.
- [45] KUEVER, J., RAINEY, F. A., WIDDEL, F. *Desulfobacter*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2015, 1-6.
- [46] SCHAUDER, R., WIDDEL, F., FUCHS, G. Carbon assimilation pathways in sulfate-reducing bacteria II. Enzymes of a reductive citric acid cycle in the autotrophic *Desulfobacter hydrogenophilus*. *Archives of Microbiology*, 1987, 148.3: 218-225.
- [47] SASS, A., RÜTTERS H., CYPIONKA, H., SASS, H. *Desulfobulbus mediterraneus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium growing on mono-and disaccharides. *Archives of Microbiology*, 2002, 177.6: 468-474.
- [48] SUZUKI, D., UEKI, A., AMAISHI, A. et al. *Desulfobulbus japonicus* sp. nov., a novel Gram-negative propionate-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2007, 57.4: 849-855.

- [49] STACKEBRANDT, E., SCHUMANN, P., SCHULLER, E. et al. Reclassification of *Desulfotomaculum auripigmentum* as *Desulfosporosinus auripigmenti* corrig., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2003, 53.5: 1439-1443.
- [50] RAMAMOORTHY, S., SASS, H., LANGNER, H. et al. *Desulfosporosinus lacus* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2006, 56.12: 2729-2736.
- [51] VATSURINA, A., BADRUTDINOVA, D., SCHUMMAN, P. et al. *Desulfosporosinus hippei* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium isolated from permafrost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2008, 58.5: 1228-1232.
- [52] ROZANOVA, E. P., NAZINA, T. N., GALUSHKO, A. S. Isolation of a new genus of sulfate-reducing bacteria and description of a new species of this genus, *Desulfomicrobium apsheronum* gen. nov., sp. nov. *Microbiology (Mikrobiologiya)*, 1988, 57.5: 514-520.
- [53] COPELAND, A., LAPIDUS, A., SPRING, S. et al. Complete genome sequence of *Desulfomicrobium baculatum* type strain (XT). *Standards in genomic sciences*, 2009, 1.1: 29.
- [54] WATANABE, M., KOJIMA, H., FUKUI, M. *Desulfoplanes formicivorans* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a blackish meromictic lake, and emended description of the family Desulfomicrobiaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2015, 65.6: 1902-1907.
- [55] GILMOUR, C. C., ELIAS, D. A., KUCKEN, A. M. et al. The sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* ND132 as a model for understanding bacterial mercury methylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, AEM. 02993-10.
- [56] GOLDSTEIN, E. J. C, CITRON, D. M., PERAINO, V. A. et al. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of clinical microbiology*, 2003, 41.6: 2752-2754.

- [57] LOBO, S. A. L, MELO, A. M. P., CARITA, J. N. et al. The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS letters*, 2007, 581.3: 433-436.
- [58] IVERSON, W. P. Growth of *Desulfovibrio* on the surface of agar media. *Applied mikrobiology*, 1966, 14.4: 529-534.
- [59] BARTON, Larry L.; TOMEI, Francisco A. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: *Sulfate-reducing bacteria*. Springer, Boston, MA, 1995. p. 1-32.
- [60] GILBERT, D. New Tools at DOE's Genomics Jamboree. *The Berkeley Lab View Archive* [online]. 2004 [cit. 2018-11-16]. Dostupné z: <https://www2.lbl.gov/Publications/Currents/Archive/Apr-30-2004.html#menu>
- [61] SANTANA, M., MEDNANSKY, C. M. The adaptive genome of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *FEMS microbiology letters*, 2006, 260.2: 127-133.
- [62] LOVLEY, Derek R.; PHILLIPS, Elizabeth JP. Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60.2: 726-728.
- [63] RAMEL, F., BRASSEUR, G., PIEULLE, L. et al. Growth of the obligate anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under continuous low oxygen concentration sparging: impact of the membrane-bound oxygen reductases. *PloS one*, 2015, 10.4: e0123455.
- [64] BERNARDEZ, L. A., DE ANDRADE LIMA, L. R. P. Improved method for enumerating sulfate-reducing bacteria using optical density. *MethodsX*, 2015, 2: 249-255.
- [65] KELLY, D. P., WOOD, A. P. Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the beta-subclass of the Proteobacteria, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2000, 50.2: 547-550.

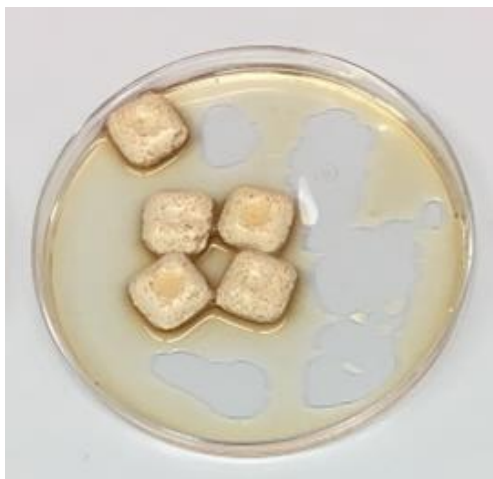
- [66] BELLER, H. R., CHAIN, P. S. G., LETAIN, T. E. et al. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Journal of bacteriology*, 2006, 188.4: 1473-1488.
- [67] BELLER, H. R., ZHOU, P., LEGLER, T. C. et al. Genome-enabled studies of anaerobic, nitrate-dependent iron oxidation in the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 249.
- [68] BLAŽKOVÁ, Z., TROUSIL, V., SLEHOVÁ, E. et al. autotrofní denitrifikace bakterií *thiobacillus denitrificans* v průtočném zařízení—pilotní testy. *Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice 2016*.
- [69] ALLEN, C. S., LOO, J. F. C, YU, S. et al. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98.2: 855-862.
- [70] EARL, A. M., LOSICK, R., KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in microbiology*, 2008, 16.6: 269-275.
- [71] BUDDE, I., STEIL, L., SCHARF, C. et al. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology*, 2006, 152.3: 831-853.
- [72] Space Microbiology Research Group - *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 2019-03-25]. Dostupné z: <https://www.dlr.de/me/en/desktopdefault.aspx/tabid-10858/>
- [73] BERNARDEAU, M., LEHTINEN, M. J., FORSSTEN, S. D. et al. Importance of the gastrointestinal life cycle of *Bacillus* for probiotic functionality. *Journal of food science and technology*, 2017, 54.8: 2570-2584.
- [74] VAN DIJL, J., HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12.3.

- [75] ZWEERS, J. C., BARÁK, I., BECHER, D. et al. Towards the development of *Bacillus subtilis* as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. *Microbial cell factories*, 2008, 7.1: 10.
- [76] ISLAM, M. R., JEONG, Y. T., LEE Y. S. et al. Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 2012, 40.1: 59-65.
- [77] Biofinder - biofilm remove [online]. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://biofilmremove.com/en/detection/>
- [78] LCK 653 [online]. [cit. 2019-03-23]. Dostupné z: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:JZE4_LjwUSQJ:https://cz.hach.com/asset-get.download.jsa%3Fid%3D25593618460+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz
- [79] Sulphide cuvette test 0.1-2.0 mg/L S₂- [online]. [cit. 2019-04-10]. Dostupné z: <https://uk.hach.com/sulphide-cuvette-test-0-1-2-0-mg-l-s-sup-2-sup/product?id=26370291516>
- [80] Filtrační hmoty. Substrat Pro [online]. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <http://eheim.cz/substratpro.htm>

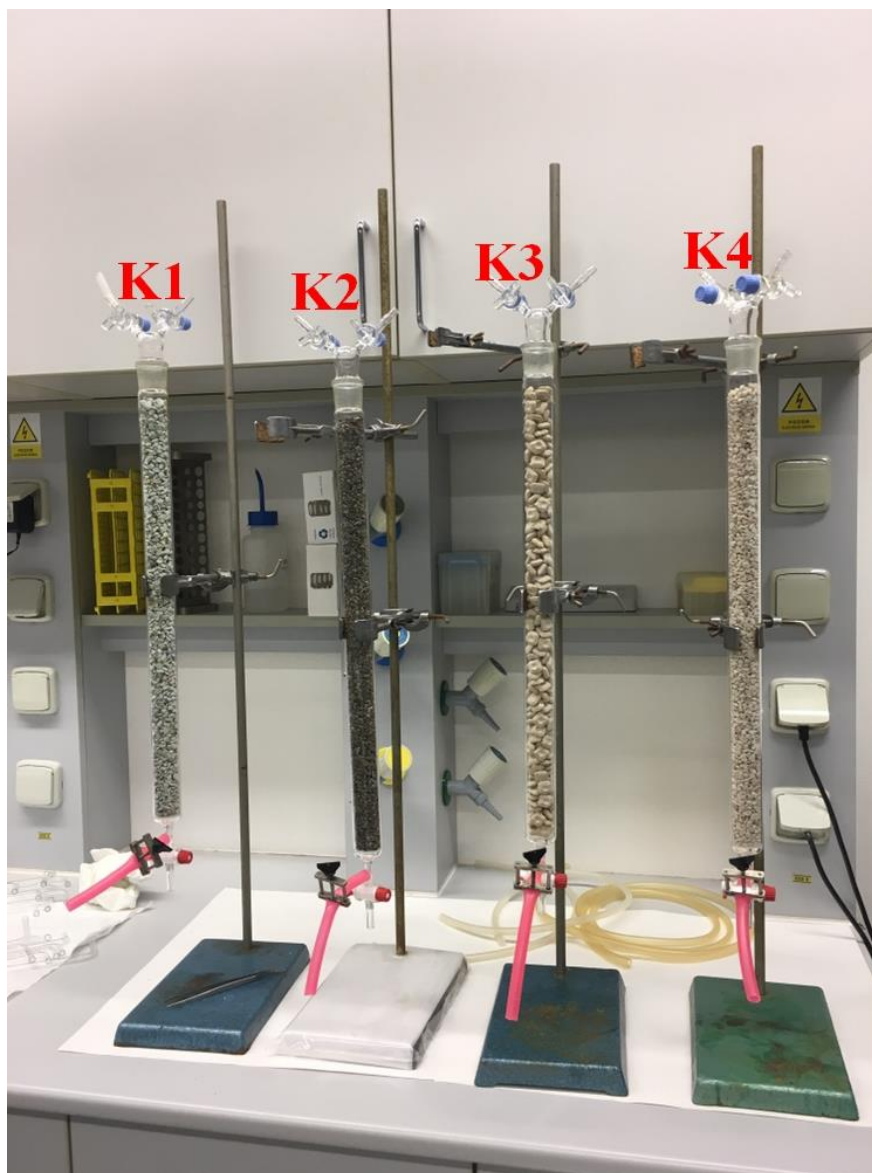
13 PŘÍLOHY



Příloha 1 Pozitivní průkaz nosiče pyritu s *D. hydrogenophilus*



Příloha 2 Negativní průkaz akvaristického nosiče Biomech s *D. hydrogenophilus*



Příloha 3 První fáze konstrukce kolonového systému, K1: kolona se zeolitem, K2: kolona s pyritem, K3: kolona s akvaristickým nosičem, K4: kolona s vápencem



Příloha 4 Poslední fáze kolonového systému (dvoustupňové uspořádání), K1,2: kolony s akvaristickým nosičem Biomech a *B. subtilis*, K3: kolona s vápencem a *D. hydrogenophilus* K4: kolona s akvaristickým nosičem a *D. hydrogenophilus*



Příloha 5 Nedostatečná kultivace biofilmu *D. hydrogenophilus* u kolony plněné zeolitem