

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DISERTAČNÍ PRÁCE

2020

Zuzana Blažková

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Využití bakterií *Thiobacillus denitrificans*
k odstranění dusičnanů z odpadních vod

Zuzana Blažková

Disertační práce

2020

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Institute of Environmental and Chemical Engineering

Nitrates removal from wastewater using bacteria *Thiobacillus denitrificans*

Zuzana Blažková

Dissertation Thesis

2020

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Zuzana Blažková

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé disertační práce doc. Ing. Jiřímu Čaklovi, CSc. za ochotu, čas a cenné rady, které mi poskytoval během studia a zejména při finalizaci výsledků pro sepsání předložené disertační práce.

Mé poděkování patří i Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D., který mi během studia poskytl mnoho rad a ochotně se mnou diskutoval dosažené výsledky.

Dále bych ráda poděkovala také kolektivu vyučujících a studentů na Ústavu environmentálního a chemického inženýrství Univerzity Pardubice a na Katedře biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice za všestrannou pomoc během mého studia.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a partnerovi, kteří mě po dobu studia morálně i materiálně podporovali.

ANOTACE

Práce je zaměřena na odstraňování dusičnanů z modelových odpadních vod metodou autotrofní denitrifikace bakteriemi *Thiobacillus denitrificans*. Jako elektronový donor je zde využita elementární síra. V teoretické části práce je popsán vliv zvýšených koncentrací dusičnanů ve vodách na různé složky ekosystému. Dále jsou shrnuty a porovnány metody odstraňování dusičnanů z vod, včetně metod biologických, kam patří heterotrofní a autotrofní denitrifikace. Stěžejní část je zaměřena na bakteriální kmen *Thiobacillus denitrificans* a mechanismy jeho působení při autotrofním čištění vod obsahujících dusičnany.

Experimenty byly zaměřeny na systematické studium odstraňování dusičnanů autotrofní denitrifikací z uměle připravovaných odpadních vod, které jsou chudé na obsah organických látek a zároveň v nich koncentrace dusičnanových iontů nepřesahuje hodnoty 100 mg.l^{-1} . První část experimentů se zabývala vsádkovým uspořádáním, kde byl k regulaci pH denitrifikačních procesů přidáván do reakčních směsí vápenc. Pozornost byla věnována studiu vlivu řady faktorů, jako je teplota, velikost použité frakce náplně, míchání, přídavek fosforu a trojmocného železa do reakční směsi. Druhá část experimentů byla zaměřena na dlouhodobé studium autotrofní denitrifikace v průtočné koloně, kde byla jako nehybná náplň použita pouze elementární síra. Kolona byla nepřetržitě provozována celkem 428 dní a byl do ní čerpán v různých fázích optimalizace procesu modelový pracovní roztok obsahující od 15 do 50 mg.l^{-1} dusičnanů.

Výsledky experimentů ukazují, že proces redukce lze s dostatečnou přesností charakterizovat jako reakci pseudo nultého řádu. Ta je typická pro systémy, v nichž je reakční prostředí, tedy aktivní povrch síry, plně nasycen reaktantem. Bylo experimentálně ověřeno, že hodnoty reakčních rychlostních konstant jsou závislé na velikosti částic použité náplně síry. Proces lépe probíhá v suspenzi s menšími částicemi síry. Z naměřených dat je patrný i pozitivní vliv vyšší intenzity míchání a vyšší teploty reakční směsi na rychlost redukce dusičnanů. Během odbourávání dusičnanů byly ve všech vsádkových testovaných reakčních směsích detekovány dusitanové ionty, jako meziprodukt studované reakce. Bylo prokázáno, že přítomnost sloučenin fosforu a trojmocného železa výrazně ovlivňuje míru hromadění dusitanů v reakční směsi. Během dlouhodobého testování byly nalezeny podmínky stabilního provozu kolony, při nichž nedochází k hromadění dusitanů. Přitom bylo dosaženo míry odstranění dusičnanů až $17,7 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

KLÍČOVÁ SLOVA

Autotrofní denitrifikace, odstraňování dusičnanů, *Thiobacillus denitrificans*, síra.

TITLE

Nitrates removal from wastewater using bacteria *Thiobacillus denitrificans*

ANNOTATION

The work is focused on the removal of nitrates from model waters using autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. Elemental sulfur was used as the electron donor. The theoretical part describes the effect of increased concentrations of nitrates in water on various components of the ecosystem. Furthermore, methods for removing nitrates from water are summarized and compared, including biological ones such as heterotrophic and autotrophic denitrification. The main part is focused on the bacteria *Thiobacillus denitrificans* and the mechanisms of its action in the autotrophic treatment of nitrate-containing waters.

The experiments were performed dealing with the systematic study of nitrate removal by autotrophic denitrification from laboratory prepared water samples, which were poor in the content of organic substances and at the same time in which the concentration of nitrate ions does not exceed 100 mg.l^{-1} . The first part of the experiments was carried out in a batch arrangement, where limestone was added to the reaction mixtures to control the pH of denitrification processes. The influence of a number of factors, such as temperature, the size of the feed fraction used, mixing and the addition of phosphorus and ferric iron to the reaction mixture was studied. The second part of the experiments was focused on a long-term study of autotrophic denitrification in a continuous arrangement, i.e. flow column, where only elemental sulfur was used as a fixed bed. The column was operated continuously for a total of 428 days and a model working solution containing from 15 to 50 mg.l^{-1} of nitrates was pumped into it in various phases of process optimization.

The results of the experiments show that the reduction process can be characterized with sufficient accuracy as a pseudo-zero order reaction, which is typical for systems in which the reaction medium, i.e. the active sulfur surface, is fully saturated with the reactant. It was experimentally verified that the values of the denitrification reaction rate constants depend on the particle size of the sulfur fraction used. The process proceeds better in a more dilute suspension, i.e. with smaller sulfur particles. The measured data also show the positive effect of higher stirring intensity and higher temperature of the reaction mixture on the rate of nitrate reduction. During the degradation of nitrates, nitrite ions were detected in all batch tested reaction mixtures as an intermediate of the studied decomposition reaction. The presence of phosphorus and ferric compounds has been shown to significantly affect the rate of nitrite

accumulation in the reaction mixture. During long-term testing, the conditions of stable operation of the column were found, under which nitrite formation does not occur. At the same time, a nitrate removal rate of up to $17,7 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ was achieved.

KEYWORDS

Autotrophic Denitrification, Nitrates Removal, *Thiobacillus denitrificans*, Sulfur.

OBSAH

1	ÚVOD.....	15
2	TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1	Dusičnanové ionty ve vodách	17
2.2	Metody odstraňování dusičnanů z vod.....	18
2.2.1	Fyzikálně-chemické metody	18
2.2.2	Chemické metody	20
2.2.3	Biologické metody	20
2.2.3.1	Heterotrofní denitrifikace.....	23
2.2.3.2	Autotrofní denitrifikace.....	24
2.2.3.3	Kombinovaná heterotrofní a autotrofní denitrifikace	29
2.3	Bakterie <i>Thiobacillus denitrificans</i>	30
2.4	Odstraňování dusičnanů bakteriemi <i>Thiobacillus denitrificans</i>	33
3	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	37
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
4.1	Použité chemikálie	38
4.2	Pracovní postupy	39
4.2.1	Kultivace mikroorganismů.....	39
4.2.2	Vsádkové experimenty.....	41
4.2.3	Experimenty v průtočné koloně	44
4.3	Analytické metody	47
4.3.1	Měření zákalu bakteriální suspenze	47
4.3.2	Identifikace bakterií <i>T. denitrificans</i>	48
4.3.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace dusičnanových iontů	49
4.3.4	Spektrofotometrické stanovení koncentrace dusitanových iontů.....	50
4.3.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace fosforečnanových iontů	52
4.3.6	Stanovení koncentrace dusičnanových, síranových a fosforečnanových iontů pomocí ... iontové chromatografie	53
4.3.7	Stanovení pH, oxidačně-redukčního potenciálu a rozpuštěného kyslíku	54
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	55
5.1	Vsádkové denitrifikační experimenty	55
5.1.1	Kontrolní směsi	55
5.1.2	Vliv fosforu na průběh autotrofní denitrifikace	61

5.1.3	Vliv železitých iontů na průběh autotrofní denitrifikace	69
5.1.4	Vliv velikosti částic a množství síry na průběh autotrofní denitrifikace	73
5.1.5	Vliv míchání reakční směsi na průběh autotrofní denitrifikace	76
5.1.6	Vliv teploty na průběh autotrofní denitrifikace.....	78
5.2	Denitrifikační procesy v průtočné koloně	83
6	ZÁVĚR	88
7	LITERÁRNÍ ZDROJE	90

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 1	Model enzymaticky katalyzovaných oxidačních drah síry a dalších vybraných thiosloučenin u bakterie <i>T. denitrificans</i>	31
Obr. 2	Znázornění Calvinova cyklu.....	32
Obr. 3	Detail dna kolony.....	45
Obr. 4	Technologické schéma průtočné kolony.....	45
Obr. 5	Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace dusičnanového dusíku.....	50
Obr. 6	Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace dusitanového dusíku v kyvetě s optickou drahou 1 cm.....	51
Obr. 7	Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace dusitanového dusíku v kyvetě s optickou drahou 4 cm.....	52
Obr. 8	Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace fosforečnanového aniontu.....	53
Obr. 9	Obsah dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách K1a, K2a a K3	56
Obr. 10	Obsah dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách K1a, K1b, K2a a K2b.....	58
Obr. 11	Vývoj koncentrace dusičnanů, dusitanů, celkového dusíku a rozpuštěného kyslíku v reakční nádobě K1a.	59
Obr. 12	Časové změny koncentrace dusitanů v kontrolních reakčních nádobách K1a, K2a a K3	60
Obr. 13	Změny obsahu celkového dusíku v kontrolních reakčních nádobách K1a (50 g S), K2a (100 g S), a K3 (200 g S).	60
Obr. 14	Distribuce fosforečnanu, hydrogen fosforečnanu a dihydrogen fosforečnanu vápenatého v závislosti na hodnotě pH.....	62
Obr. 15	Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s 50 g S	63
Obr. 16	Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci bez lag fáze v systémech s 50 g S	64
Obr. 17	Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách P1, P2, P3, P4, P5 a K1a	65
Obr. 18	Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech se 100 g S	66
Obr. 19	Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách P6, P7, P8 a K2a	67
Obr. 20	Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s různou koncentrací S a přídatkem P 1,0 mg.l ⁻¹	68

Obr. 21	Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách K1a, K2a, K3, P2, P7 a P9	69
Obr. 22	Vliv dávkovaného železa na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s přidavkem Fe^{3+}	70
Obr. 23	Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách s přidavkem Fe^{3+}	72
Obr. 24	Obsah dusičnanů a časové změny koncentrace dusitanů v reakčních systémech K4 a K12	73
Obr. 25	Obsah dusičnanů v míchaných a nemíchaných reakčních směsích K8 až K13.....	77
Obr. 26	Časové změny koncentrace dusitanů v míchaných a nemíchaných směsích K8 až K13.....	78
Obr. 27	Obsah dusičnanů v systémech s rozdílnou teplotou během autotrofní denitrifikace... ..	79
Obr. 28	Časové změny koncentrace dusitanů v systémech testovaných při různých teplotách.. ..	80
Obr. 29	Obsah dusičnanů během autotrofní denitrifikace v míchaných systémech při 33 °C.	81
Obr. 30	Časové změny koncentrace dusitanů v míchaných systémech při teplotě 33 °C.. ..	82
Obr. 31	Časový průběh základních parametrů autotrofního denitrifikačního procesu v průtočné koloně.....	84
Tab. 1	Účinnost odstranění NO_3^- vybranými metodami ⁴	18
Tab. 2	Bakteriální rody vyskytující se v aktivovaném kalu a obsahující denitrifikační druhy	21
Tab. 3	Anorganické látky využitelné pro redukci dusičnanů.....	25
Tab. 4	Autotrofní denitrifikace bakteriemi <i>T. denitrificans</i>	36
Tab. 5	Seznam použitých chemikálií	38
Tab. 6	Složení tekutého média S6 pro růst <i>T. denitrificans</i>	39
Tab. 7	Složení pevného média S8 pro růst <i>T. denitrificans</i>	40
Tab. 8	Složení masopeptonového agaru (MPA)	41
Tab. 9	Složení reakčních směsí s frakcí použité síry o střední velikosti částic 3,54 mm a vápence o střední velikosti částic 3,46 mm (1. série experimentů).....	42
Tab. 10	Složení reakčních směsí s frakcí použité síry o střední velikosti částic 167 μm a vápence o střední velikosti částic 2 μm (2. série experimentů).	43

Tab. 11	Popis technologického schématu průtočné kolony	46
Tab. 12	Koncentrace složek pracovního roztoku a rychlost jeho dávkování do průtočné kolony	47
Tab. 13	Odbourávání dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách	57
Tab. 14	Odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem fosforu pro 50 g S ..	64
Tab. 15	Odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem fosforu pro 100 g S a 200 g S	66
Tab. 16	Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem a bez přidavku fosforu	68
Tab. 17	Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem a bez přidavku železitých iontů	71
Tab. 18	Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech K4 a K12	75
Tab. 19	Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech připravených z demineralizované vody nebo vody z vodovodního řádu	75
Tab. 20	Porovnání odbourávání dusičnanů v míchaných (K11 až K13) a nemíchaných reakčních systémech (K8 až K10)	76
Tab. 21	Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s rozdílnou teplotou.....	79
Tab. 22	Porovnání odbourávání dusičnanů v míchaných reakčních systémech při teplotě 33 °C.	82

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
APAT	Adenosindifosfát sulfuryláza
APS	Adenylylsulfát
ATP	Adenosintrifosfát
HAD	Kombinace heterotrofní a autotrofní denitrifikace
N-NO ₂ ⁻	Dusitanový dusík
N-NO ₃ ⁻	Dusičnanový dusík
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotidfosfát – oxidovaná forma
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukováná forma
Nar	Nitrát reduktáza
Nir	Nitrit reduktáza
Nor	Reduktáza oxidu dusnatého
Nos	Reduktáza oxidu dusného
ORP	Oxidačně-redukční potenciál
PCR	Polymerázová řetězová reakce
P _i	Fosfát
PP _i	Pyrofosfát
RuBisCO	Ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza
UASB	Anaerobní reaktor s expandovanou vrstvou

1 ÚVOD

Dusík a jeho sloučeniny se v přírodě vyskytují ve značném množství. Nejčastěji se jedná o elementární dusík, který tvoří 78 % obj. atmosféry. Dusík je obsažen i ve struktuře některých minerálů. Zároveň je dusík, jako biogenní prvek, součástí živých organismů, a to zejména ve formě aminokyselin. Po odumření organismu se tyto látky dostávají do vody a půdy, kde jsou dále rozloženy a zpracovány metabolickými pochody mikroorganismů. V případě dusíku se jedná zejména o procesy fixace dusíku, nitrifikace a denitrifikace^{1,2}.

Fixovat dusík mohou mikroorganismy zejména z amoniaku a dusičnanů. Molekula atmosférického dusíku je k fixaci využitelná jen zřídka, neboť je chemicky téměř inertní. Z amoniaku je možné získat dusičnanové ionty procesem zvaným nitrifikace a dusík získáme opět z dusičnanových iontů denitrifikací¹.

Soulad přírodního koloběhu dusíku může být narušen v případě, kdy je jedna z jeho složek v převaze, tj. začne se hromadit a mohou se naplno projevit její nežádoucí vlivy. V současné době se v přírodě prokazatelně zvyšují koncentrace dusičnanových iontů, a to jak v odpadních a podzemních vodách, tak i v rezervoárech pitné vody. To je způsobeno hlavně užíváním dusíkatých hnojiv, zvyšováním počtu obyvatel na naší planetě a změnami jejich životního stylu, respektive jejich životní úrovně². S hromaděním dusičnanových iontů ve vodách se pak objevují problémy jako je nežádoucí nadměrná eutrofizace vod (která může vést až úhynu ryb a dalších vodních organismů), možný vznik methemoglobinémie (s tím spojené úmrtí kojenců a malých dětí) nebo zvýšená rizika vzniku různých druhů rakoviny u lidí³.

Pro odstraňování dusičnanů z vod existuje celá řada postupů. Jedná se zejména o metody fyzikálně-chemické, chemické a biologické. Každá metoda má svá specifika, tj. přednosti a nedostatky a její nasazení na řešení konkrétní situace musí předcházet pečlivá analýza zahrnující nejen technickou stránku realizovatelnosti, ale i ekonomickou rozvahu a posouzení dopadů na životní prostředí.

Odstraňování dusičnanů biologickými metodami je založeno na velmi specifické redukci dusičnanových iontů na elementární dusík⁵. Poprvé byl tento jev pozorován a pojmenován jako „denitrifikace“ v roce 1886 ve Francii¹. Tyto postupy postupně získaly na popularitě, neboť jsou obvykle ekonomicky výhodnější než konvenční fyzikálně-chemické metody. V současné době se biologické metody pro odstraňování dusičnanů využívají například ve většině čistíren odpadních vod, a to nejen v České republice. Procesy denitrifikace jsou zde jedním z dílčích procesů probíhajících v aktivovaném kalu. Přitom řada bakterií obsažených v aktivovaném kalu dokáže za anoxických podmínek využívat dusičnany jako elektronový

akceptor a produkovat přitom plynný dusík. Jako elektronové donory jsou při těchto metabolických dějích využívány jak anorganické (autotrofní denitrifikace), tak i organické látky (heterotrofní denitrifikace).

Za známější a využívanější biologickou denitrifikační metodu je považována heterotrofní denitrifikace. Zde je jako elektronový donor využíván organický substrát obvykle přítomný v odpadní vodě. Jestliže však chceme odstranit dusičnany z vod, které obsahují nízké množství organických látek, máme dvě možnosti. Buď do reakční směsi (zpracovávané vody) můžeme přidat organický substrát (většinou se jedná o metanol, etanol, či kyselinu octovou) a provést heterotrofní denitrifikaci. Zde ale hrozí riziko znečištění upravované vody sekundárním polutantem, neboť při odstraňování nízkých koncentrací dusičnanů musíme přidat organický substrát v nadbytku. Ve výsledku se tedy zbavíme nežádoucích dusičnanových iontů, ale část přidaného organického substrátu ve vodě zůstane. Další možností je autotrofní denitrifikace, u které obecně platí, že se sice jedná o proces zdlouhavější, ale v konečném výsledku se může jevit jako výrazně efektivnější. A to zejména z toho důvodu, že využití anorganického substrátu např. elementární síry jako elektronového donoru je levnější než metanol nebo kyselina octová. Zároveň autotrofně denitrifikační bakterie produkují méně kalu, čímž je tato technologie méně náročná na údržbu technologického zařízení, protože nedochází k jeho častému zanášení bakteriálním kalem⁶.

Jedním z potenciálně možných případů pro efektivní využití autotrofní denitrifikace je například odstraňování dusičnanů z důlních odpadních vod vzniklých po těžbě uranu. V České republice se například jedná o odpadní vody produkované při činnosti firmy Diamo s.p., odštěpný závod TÚU ve Stráži pod Ralskem. Konečné odpadní vody po řadě předchozích úprav obsahují 20 až 70 mg.l⁻¹ dusičnanů, avšak prakticky žádné organické znečištění. Z tohoto důvodu je běžná biologická heterotrofní denitrifikace prakticky neproveditelná. Tudíž se jeví jako zajímavé ověřit možnost využití jiné alternativy biologického odbourávání dusičnanů, a to bez potřeby dávkovat do odpadní vody externí organický substrát. Touto alternativou je například autotrofní denitrifikace.

V návaznosti na to je cílem této práce experimentální ověření možnosti odstraňování dusičnanů z odpadních vod s obsahem dusičnanů o koncentracích do 100 mg.l⁻¹ a s prakticky nulovým obsahem organických látek (vše modelové roztoky), s využitím autotrofní denitrifikace pomocí bakterií *Thiobacillus denitrificans*. Přitom se zaměřit na výhody a limitace procesu, jak z hlediska míry odstranění dusičnanů a technického provedení procesu, tak i z pohledu dopadu procesu na životní prostředí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Dusičnanové ionty ve vodách

Dusičnanové ionty jsou velice dobře rozpustné ve vodě a nezadržují se v půdě, což může vést k jejich velmi snadné migraci a tím ke znečišťování všech složek vodního ekosystému, včetně zdrojů pitné vody.

Přítomnost dusičnanů v pitné vodě může vést k vážným zdravotním problémům zejména proto, že se mohou v trávicím traktu živočichů přeměňovat na toxickejší dusíkaté látky, například dusitanů³. V literatuře^{4,5} se uvádí, že dusičnany obsažené ve vodách v koncentracích do 26 mg.l⁻¹ mají zanedbatelný vliv na lidské zdraví. Jakmile se však v pitné vodě pohybuje koncentrace dusičnanů v rozmezí od 26 do 50 mg.l⁻¹, je voda sice z hlediska konzumace považována stále za nezávadnou pro lidské zdraví, avšak jsou známy případy mírných chronických rizik pro malé děti. Zdravotní riziko se objevuje při koncentracích nad 90 mg.l⁻¹ dusičnanů ve vodě⁴. Ve Vyhlášce č. 70/2018 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb. kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, která platí pro Českou republiku, jsou maximální povolené hygienické limity pro obsah dusičnanů v pitné vodě 50 mg.l⁻¹ a 0,5 mg.l⁻¹ dusitanů⁷.

Dusičnanovým a dusitanovým iontům je přisuzováno několik zdravotních rizik. V první řadě se jedná o vznik methemoglobinémie (modrání kojenců), která je nebezpečná zejména pro děti do šesti měsíců věku a může skončit až smrtí^{4,8}. Dusičnanové ionty v lidském těle jako exogenní oxidanty mohou za zvýšené hladiny methemoglobinu v krvi. Ten vzniká oxidací dvojmocného železa (Fe²⁺) v hemoglobinu na trojmocné (Fe³⁺). V konečném důsledku pak methemoglobin ztrácí schopnost reverzibilní vazby kyslíku a může docházet k tkáňovým hypoxiím. Jako obrana existuje v těle redukční systém, který vrátí methemoglobin zpět na hemoglobin, avšak u novorozenců jsou tyto dráhy ještě nezralé. Navíc mají zvýšený podíl fetálního hemoglobinu, jehož oxidace z Fe²⁺ na Fe³⁺ je snazší⁹. Dále mohou dusičnany způsobovat vrozené vady u dětí a v posledních letech se daleko častěji objevují důkazy, že dusičnanové ionty mohou přispívat i ke vzniku různých druhů rakoviny^{4,10}.

Nutnost odstraňovat dusičnany z vod se netýká jen vod pitných. Důležitá je také kontrola ostatních druhů vod kvůli eutrofizaci vod způsobené lidskou činností. Jedná se o proces nadměrného obohacování vod živinami, jejichž majoritní část tvoří dusík a fosfor (resp. jejich sloučeniny). Následným efektem je masivní přemnožení drobných organismů, jako jsou například bakterie, čímž stoupá konzumace kyslíku ve vodě. Přemnožené organismy za nějaký čas odumírají. Zároveň některé druhy sinic a řas mohou produkovat toxické látky. Při

pozdějších rozkladných procesech velkého množství organismů se znovu spotřebovává vysoké množství kyslíku a mohou se opět produkovat toxické látky¹¹.

Nadměrnou eutrofizací může být výrazně zhoršená upravitelnost vody a vzhledem k tomu, že je zhruba 60 % zdrojů pitné vody v České republice získáváno z povrchových vodních ploch, je žádoucí efektivně, ekologicky a co nejlevněji odstraňovat nechtěné dusičnany z vod.

2.2 Metody odstraňování dusičnanů z vod

V současné době existuje několik metod, pomocí kterých je možné efektivně odstraňovat dusičnanové (případně i dusitanové) ionty z kontaminovaných vod. Tyto metody můžeme rozdělit do skupin podle mechanismu odstranění na fyzikálně-chemické, chemické a biologické. Základní rozsah účinnosti odstraňování dusičnanových iontů z vod jednotlivými metodami je uveden v následující tabulce (Tab. 1)⁴.

Tab. 1 Účinnost odstranění NO_3^- vybranými metodami⁴

Metody odstraňování NO_3^-		Účinnost odstranění NO_3^- [%]
Fyzikálně-chemické	Iontová výměna	80-99
	Elektrodialýza	30-99
	Reverzní osmóza	50-96
	Destilace	90-98
Chemické	Chemická redukce	70-95
Biologické	Denitrifikace	33-90

2.2.1 Fyzikálně-chemické metody

Mezi fyzikálně-chemické metody odstraňování dusičnanových iontů z vodných roztoků patří například procesy iontové výměny, destilace a membránové separace včetně elektrodialýzy. Tyto postupy často dokáží odstraňovat dusičnanové ionty z vody relativně účinně. Bohužel, jejich nevýhodou je produkce odpadů, které jsou obvykle ve formě vysoce koncentrovaných solných roztoků vyžadujících většinou jejich dodatečné zpracování⁴.

S ohledem na velikost a charakter odstraňovaných dusičnanových iontů je v posledních letech pozornost věnována studiu využití membránových separačních procesů, jako je elektrodialýza, reverzní osmóza a částečně i nanofiltrace. Ty vykazují únosné investiční a

provozní náklady a odpovídající míru odstranění dusičnanů, i přesto, že selektivita některých membrán pro dusičnanové ionty je, zejména pro zvažované tlakové membránové procesy, často nižší než vůči ostatním aniontům^{4,12,13,14,15,16}. Například, zatímco je rejekce reverzně osmotických membrán pro většinu kationtů a síranové nebo chloridové anionty vyšší než 99,9 % u dusičnanových aniontů dosahuje rejekce membrány nejčastěji hodnot v rozmezí 85 až 96 %. Tento nedostatek však lze řešit například využitím víceústupňové reverzní osmózy. Reverzní osmóza je dále vhodná zejména při snižování koncentrace dusičnanů ve vodách s vyššími koncentracemi síranů, které jsou obtížně zpracovatelné iontovou výměnou. Je to však neselektivní proces, kterým se odstraňuje z vody většina rozpuštěných látek. Vedle dusičnanů se tedy z vody odstraní i látky, které jsou například v pitné vodě žádoucí, jako je vápník a hořčík. Tento problém je řešen buď následnou remineralizací vody, nebo směšováním upravené vody (permeátu) s částí surové vody. Směšovací poměr je volen tak, aby upravená voda splňovala všechny požadavky na pitnou vodu uvedené ve Vyhlášce č.70/2018 Sb., včetně doporučených hodnot koncentrací vápníku a hořčíku.

I když údaje v převzaté Tab. 1 ukazují, že nejnižší účinnost při odstraňování dusičnanů vykazuje elektrodialýza, byla publikována řada studií^{17,18}, v nichž je dosažena účinnost elektrodialýzy až 99 %. Přitom, na rozdíl od reverzní osmózy, jsou dusičnany odstraňovány z nástríku rychleji a selektivněji než sírany nebo chloridy. Nejnovější zkušenosti tak ukazují, že membránové systémy jsou často jednodušší než iontově-výmenné nebo biotechnologické procesy, a to i přes to, že k jejich provozu jsou potřebná vysokotlaká čerpací zařízení (reverzní osmóza) nebo zdroj stejnosměrného elektrického proudu (elektrodialýza)¹⁹.

Při iontové výměně jsou dusičnany z vody odstraňovány standardními silně bazickými anexy s kvartérní trimethylamoniovou funkční skupinou, jejichž selektivita k aniontům stoupá v řadě $\text{HCO}_3^- < \text{Cl}^- < \text{NO}_3^- < \text{SO}_4^{2-}$. Z této řady je zřejmé, že iontová výměna není vhodná pro odstraňování dusičnanů z vod, které zároveň obsahují vyšší koncentrace síranů. Ty se zachytávají na ionexu přednostně, případně dusičnany vytěsňují. Iontová výměna je diskontinuální proces, což znamená, že po vysycení aktivních center ionexu anionty je nezbytná jeho regenerace. Nejlépe se k odstraňování dusičnanů osvědčila dvoustupňová regenerace, při níž byly dusičnany nejprve vytěsněny chloridem sodným, a následně byl ionex převeden do hydrogenuhličitanové formy²⁰. Při této variantě hodnoty doprovodných aniontů (chloridy, sírany) nepřesahovaly požadované koncentrace pro pitnou vodu. V literatuře jsou popsány i kombinované metody odstraňování dusičnanů z vod zahrnující iontovou výměnu a membránové separace²¹.

2.2.2 Chemické metody

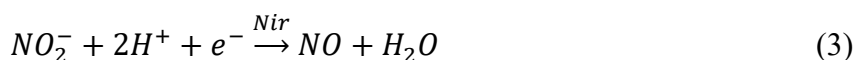
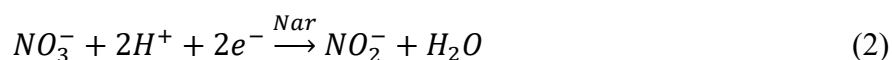
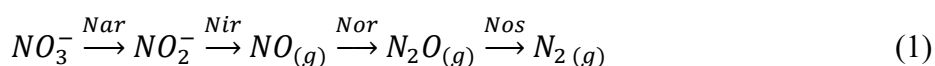
Jednou z možností, jak odstraňovat dusičnany z vod, je jejich redukce. Byla testována celá řada redukčních činidel dusičnanů, jako je hliník, železo, amoniak a některé organické látky. Většina těchto redukčních reakcí probíhá v silně alkalickém prostředí, za zvýšené teploty, tlaku či s použitím katalyzátoru nebo při současné kombinaci zmíněných parametrů.

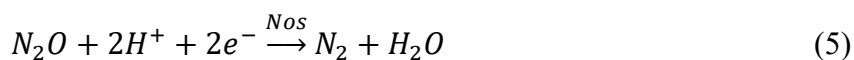
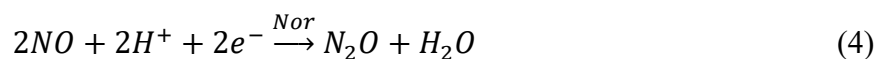
Produktem redukčních reakcí je pak různorodá směs dusíku, dusitanů, amoniaku a dalších látek, z nichž mnohé mají negativní vliv na životní prostředí^{3,4,22}. Například při úpravě pitných vod, chemická nebo elektrochemická redukce dusičnanů vede obvykle k nadměrné produkci amonných iontů, které se v pitné vodě hromadí. Totéž potvrzují i výsledky studia reakcí kovového železa s dusičnany v anoxickém prostředí, kde jsou dusičnany prakticky kvantitativně redukovány až na amonné ionty. Tyto procesy jsou tedy pro úpravu vlastností pitné vody nevhodné²³.

2.2.3 Biologické metody

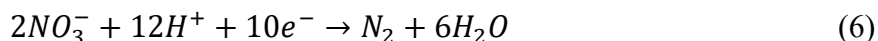
Obecně jsou biologické metody odstraňování nežádoucích dusičnanových iontů z vod založeny na metabolické enzymaticky katalyzované přeměně dusičnanů na dusitany, které jsou dále redukovány na oxidy dusíku a konečným produktem denitrifikace jsou molekuly plynného dusíku²⁴. Klíčovým faktorem při používání těchto metod je redukce dusičnanových iontů na dusitanové, které se mohou hromadit v systému a jsou v porovnání s dusičnany více toxické.

Rovnice (1) ukazuje schématický model kompletní redukce dusičnanových iontů do jeho konečné fáze – tvorby plynného dusíku^{24,25}. Řetězec reakcí probíhá z části v periplazmatickém a z části v cytoplazmatickém prostoru bakteriálních buněk, což dovoluje vznik protonmotivního napětí vedoucího k syntéze adenosintrifosfátu (ATP). Každá z reakcí je enzymaticky katalyzována specifickým enzymem. Přeměnu dusičnanových iontů na dusitanové ionty, tzv. nitrátovou respiraci (2) zajišťuje enzym nitrát reduktáza (Nar), redukcí dusitanových iontů (3) pak nitrit reduktáza (Nir) a konečně redukcí oxidů dusíku (4) a (5) na molekuly plynného dusíku reduktáza oxidu dusnatého (Nor) a dusného (Nos)²⁶.





Sumárně lze denitrifikaci zapsat následující rovnicí (6)²⁷:



Denitrifikační schopnosti má celá řada organismů zahrnující také houby a prvoky, avšak většinu z tohoto celku tvoří rozmanité druhy bakterií²⁴. Příklady bakteriálních druhů, které se vyskytují v aktivovaném kalu a které obsahují denitrifikační bakteriální kmeny, jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2)²⁴.

Tab. 2 *Bakteriální rody vyskytující se v aktivovaném kalu a obsahující denitrifikační druhy*²⁰

<i>Achromobacter</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Kingella</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Methanonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Neisseria</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Corinebacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Denitrobacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Glocononobacter</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Holobacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>

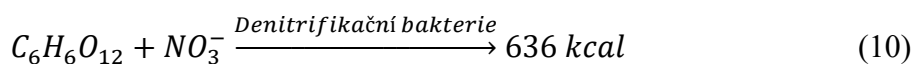
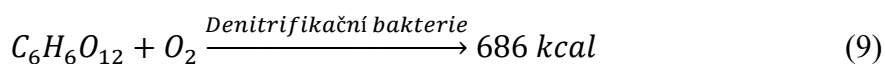
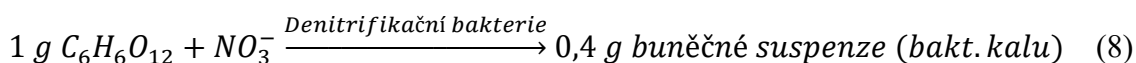
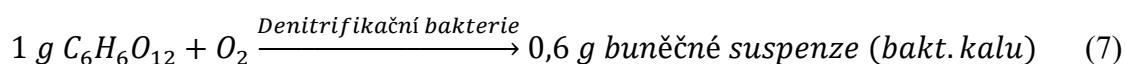
Biologická denitrifikace je respirační proces denitrifikačních bakterií, jichž většina spadá mezi fakultativní anaeroby. Tyto organismy se běžně vyskytují v různých typech vod a půd a mohou prosperovat jak v aerobním, tak anaerobním prostředí. Ne všechny denitrifikační

bakterie tvoří během denitrifikace všechny tři meziprodukty, některé mohou tvořit pouze jeden, dva či dokonce žádný z meziproduktů. Proto je denitrifikace považována za komplexní komunitní proces, kdy spolupracuje množství organismů na dokončení procesu, neboť některé organismy nemusí produkovat celou sadu potřebných enzymů k dokončení celé reakce²⁸.

Mezi bakterie, které dokáží za anoxických podmínek využívat dusičnany jako elektronový akceptor a produkovat plynný dusík, patří např. rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Alcaligenes* a *Thiobacillus*. Mezi nejlépe prozkoumané patří zástupci rodů *Pseudomonas* a *Paracoccus*^{4,24,31}.

V aerobním prostředí se terminálními akceptory elektronů při metabolických dějích denitrifikačních organismů stávají molekuly kyslíku. Za anoxických podmínek mohou tyto mikroorganismy využívat chemicky vázaný kyslík, tak jako je tomu u dusičnanového iontu, který pak slouží jako elektronový akceptor namísto molekul kyslíku a probíhá tzv. denitrifikace. Denitrifikační procesy mohou tedy probíhat pouze v prostředí bez volného molekulového kyslíku. V praxi to znamená, že ve vodě, ve které probíhá denitrifikace, je koncentrace rozpuštěného kyslíku do 0,5 mg.l⁻¹²⁹.

V situaci, kdy jsou denitrifikační bakterie přítomny v prostředí, ve kterém jsou obsaženy molekuly volného kyslíku a současně i dusičnany, se vždy primárně stane terminálním akceptorem elektronů volný kyslík. Při porovnání úlohy obou možných terminálních akceptorů elektronů při reakci se stejným substrátem je z energetického hlediska využití volného kyslíku pro bakteriální buňky výhodnější. Vše je ukázáno v rovnicích (7) až (10)²⁴. Důsledkem tohoto jevu je aktivace enzymatického aparátu využívajícího volný kyslík a deaktivace denitrifikačních enzymů při koncentracích rozpuštěného kyslíku nad 1,0 mg.l⁻¹ – volný molekulární kyslík slouží jako inhibitor denitrifikačních procesů^{2,30}.

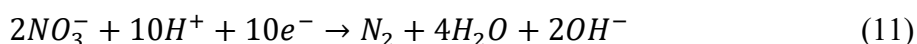


Jako elektronové donory při metabolických dějích jsou využívány jak anorganické (autotrofní denitrifikace), tak i organické látky (heterotrofní denitrifikace).

Dostupné jsou také studie zabývající se potenciostatickými bio-elektroreaktory. Jejich princip spočívá v podpoření mikrobiální aktivity vyvíjením katodového vodíku, který je sám o sobě silným redukčním činidlem dusičnanů. Při experimentech bylo dosaženo relativně vysokých proudů - až do 20 mA^{32,33,34}. Zároveň existují publikace o tom, že přítomný proud v živném roztoku stimuluje proliferaci (množení) buněk přítomných bakterií^{35,36}.

2.2.3.1 Heterotrofní denitrifikace

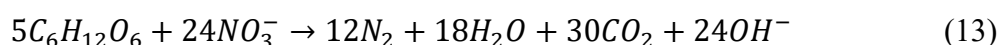
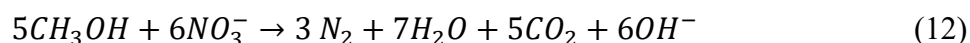
Heterotrofní denitrifikace využívá k redukci dusičnanů jako elektronové donory a současně jako zdroj uhlíku organické látky. Ty mohou být v čištěné vodě již přítomny (jedná se pak o tzv. interní zdroj, kterým mohou být odpadní vody z výroby cukru, sýrů a lihovin, přírodní rostlinné substráty jako rostlinné oleje či mléko, přírodní živočišné produkty apod.), nebo je nutné je do reakce přidat (externí zdroje). Obecný zápis heterotrofní denitrifikace je vyjádřen v následující rovnici (11)^{2,24,37}.



Externí zdroj organického uhlíku pro denitrifikační bakterie může tvořit celá řada látek²⁴. Mezi nejlepší redukční substráty pro denitrifikační bakterie patří jednoduché organické látky, jako je metanol, etanol, octan, glukosa atd. Organický substrát je pak bakteriálními buňkami oxidován na oxid uhličitý a využit v prvé řadě jako elektronový donor v elektronovém transportním řetězci a za druhé může být také využit jako zdroj uhlíku. Při optimálních podmínkách dávkování organického substrátu je možné dosáhnout odstraňování dusičnanových a dusitanových iontů až s 95% účinností a naopak při nedostatku substrátu může docházet k inhibici denitrifikace^{4,24,38}.

S dávkováním organického substrátu (zejména jeho nedostatkem nebo v kombinaci nedostatku substrátu s jinými faktory ovlivňujícími reakci) při heterotrofní denitrifikaci souvisí také rozdílná buněčná odezva v podobě změn exprese a aktivity denitrifikačních enzymů. V některých případech tak může docházet k nežádoucímu hromadění dusitanových iontů, které představují větší riziko než dusičnany a které mohou následně inhibovat celý proces³⁹. Bylo pozorováno, že při koncentraci nad 150 mg.l⁻¹ NO₂⁻ může docházet k inhibici heterotrofní denitrifikace při pH blízkém neutrálním hodnotám⁴⁰.

Jednotlivé organické substráty pro heterotrofně denitrifikační bakterie nejsou stejně účinné vzhledem k efektivitě denitrifikace a specifickým požadavkům těchto bakterií. Rozdílná stechiometrie oxidace glukosy a metanolu při denitrifikaci je například vyjádřena rovnicemi (12) a (13). Na první pohled se může glukóza jevit jako vhodnější substrát, ale před vstupem do metabolických dějů většiny denitrifikačních bakterií je nutná její specifická enzymatická konverze. Vyšší účinnosti denitrifikace bylo dosaženo například při použití směsi glukózy a acetátu v poměru 1:1^{4,41}. Při použití glukózy dochází k nejvýraznější akumulaci dusitanových iontů oproti ostatním běžně využívaným substrátům⁴². V současné době se nejvíce využívá jako externí zdroj metanol kvůli snadné cenové dostupnosti a také proto, že jeho oxidace je spojená s tvorbou menšího množství bakteriálního kalu²⁴.



Jak je z rovnic (11) až (13) patrné, při heterotrofní denitrifikaci se mezi vznikajícími produkty objevují také hydroxylové ionty. Ty reagují s rozpuštěným oxidem uhličitým za vzniku hydrogenuhličitanových iontů. Při procesu pak tedy může docházet k výraznému zvýšení hodnot pH okolního prostředí a následné inhibici denitrifikace, neboť pH může mít vliv jak na enzymatickou aktivitu a životaschopnost bakteriálních buněk, tak i na stupeň ionizace a buněčný transport molekul substrátu a nutrientů²⁴. Optimální rozmezí hodnot pH pro heterotrofní denitrifikaci se pohybuje od 7,0 do 9,0^{29,43}.

Také nízký poměr C/N může negativně ovlivňovat denitrifikaci tak, že může docházet k akumulaci oxidu dusného. Na vznikající množství tohoto oxidu má dále vliv retenční čas, typ organického substrátu a s tím související teplota (neboť při vyšších teplotách stoupají nároky na dávkování substrátu), nízké hodnoty pH a přítomnost molekulového kyslíku^{44,45,46}.

Jak již bylo zmíněno, heterotrofní denitrifikace je výrazně rychlejší než autotrofní, ale při špatném dávkování organického substrátu se může vyskytovat nežádoucí akumulace dusitanových iontů při nedostatku substrátu, či sekundární znečištění (vysoké hodnoty CHSK) v důsledku substrátového předávkování systému.

2.2.3.2 Autotrofní denitrifikace

Metoda autotrofní denitrifikace je založena na odstraňování dusičnanových iontů bakteriemi využívajícími ke své metabolické činnosti anorganické látky, tj. zapojení elektronů

získaných oxidací anorganických látek do elektronových transportních drah. Tyto procesy probíhají spontánně v půdě a v podzemních vodách a naopak prakticky chybí ve vodách povrchových, kde můžeme nalézt daleko vyšší koncentrace organických látek a dusičnany se zde odbourávají hlavně pomocí heterotrofní denitrifikace.

I přes to, že autotrofní denitrifikace patří k velice pomalým procesům odstraňování dusičnanů z vod, může být v některých případech použití této metody velice atraktivní. Oproti heterotrofní denitrifikaci není potřeba dodávat do systému dražší organický substrát²⁴. V některých případech dokonce nemusíme dávkovat vůbec žádný substrát, neboť znečištěná voda dusičnany (například z ropného, zbrojařského či farmaceutického průmyslu) může již obsahovat vhodné sírné sloučeniny⁴⁷. Navíc se bez přídavku organického substrátu snižuje riziko vzniku sekundárních polutantů a zvýšené hodnoty CHSK⁴⁸.

Tab. 3 *Anorganické látky využitelné pro redukci dusičnanů*

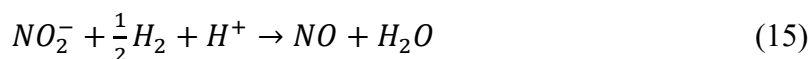
Reakce	Standardní potenciál [V]
$\text{Fe}^{3+} + \text{e}^{-} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	0,77
$\text{I}_2 + 2\text{e}^{-} \rightarrow 2\text{I}^{-}$	0,54
$\text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Cu}$	0,34
$\text{Cu}_{(\text{aq})}^{2+} + \text{e}^{-} \rightarrow \text{Cu}_{(\text{aq})}^{+}$	0,13
$2\text{H}^{+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{H}_2$	0,00
$\text{Pb}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Pb}$	-0,13
$2\text{SO}_4^{2-} + 19\text{H}^{+} + 16\text{e}^{-} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{HS}^{-} + 8\text{H}_2\text{O}$	-0,22
$\text{SO}_4^{2-} + 8\text{H}^{+} + 6\text{e}^{-} \rightarrow \text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	-0,33
$\text{Fe}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Fe}$	-0,44
$\text{Zn}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Zn}$	-0,76
$\text{Al}^{3+} + 3\text{e}^{-} \rightarrow \text{Al}$	-1,66
$\text{Mg}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Mg}$	-2,37
$\text{Na}^{+} + \text{e}^{-} \rightarrow \text{Na}$	-2,71
$\text{Ca}^{2+} + 2\text{e}^{-} \rightarrow \text{Ca}$	-2,87
$\text{K}^{+} + \text{e}^{-} \rightarrow \text{K}$	-2,93

K dalším výhodám autotrofní denitrifikace patří i skutečnost, že růstové vlastnosti buněk autotrofně denitrifikačních bakterií jsou mnohem menší než je tomu u heterotrofů, což vede k produkci menšího množství bakteriálního kalu. Souhrnně lze tedy konstatovat, že tato

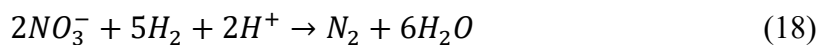
metoda může být vhodným řešením hlavně pro odstraňování dusičnanů z odpadních vod s nízkou organickou zátěží⁴⁹.

Jako substrát, resp. donory elektronů, využívají autotrofně denitrifikační bakterie anorganické látky – zejména se jedná o vodík, elementární síru a některé její sloučeniny (sulfan, pyrit, thiosíran apod.)⁵⁰. Přehled anorganických látek, které lze potenciálně využít při redukcí dusičnanů je uveden v Tab. 3 převzaté z literatury⁵¹.

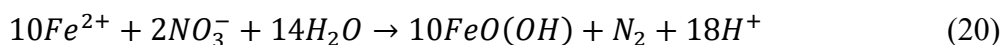
Jako výhodné se jeví zejména použití čistého vodíku, a to z důvodu, že se lze vyhnout případným sekundárním kontaminacím - vodík nezůstává v čištěné vodě a proces zůstává biologicky stabilní. Na druhé straně, komplikace nastávají při vlastní produkci vodíku a jeho skladování. Stechiometrie reakcí dusičnanové a dusitanové redukce a redukce vzniklých oxidů dusíku s vodíkem jako elektronovým donorem, je znázorněna v následujících rovnicích (14) - (17)^{3,4}:



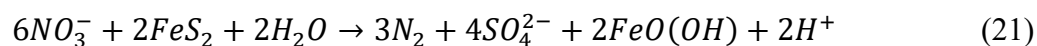
Celková stechiometrie těchto dílčích reakcí bude tedy vypadat následovně (18)^{3,4}:



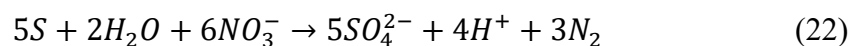
Jako anorganický elektronový donor k autotrofně denitrifikačním procesům lze použít také pyrit (disulfid železnatý). Reakce pak probíhají dle rovnic (19) a (20)⁵⁰:



Souhrnně pak tedy denitrifikace probíhá následovně podle rovnice (21)⁵⁰:

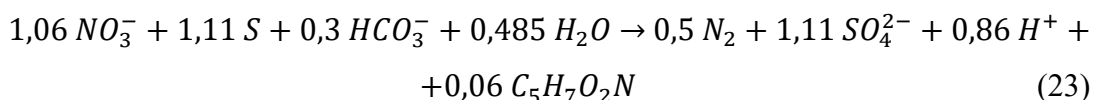


Dále je možné jako elektronového donoru použití elementární síry. Oxidace elementární síry při autotrofní denitrifikaci je znázorněna v rovnici (22)⁵²:

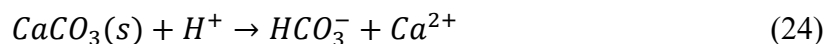


Během procesu vzniká značné množství H^+ iontů, přičemž dochází k okyselování okolního prostředí, což se ukázalo jako nežádoucí jev. Hodnoty pH totiž silně ovlivňují denitrifikační procesy. Optimální pH pro autotrofní denitrifikaci je v rozmezí hodnot od 6,5 - 7,5. Pokud se pH pohybuje mimo rozmezí hodnot 5,5 až 9 je denitrifikace zcela zastavena, ačkoliv bakteriální buňky mohou dále přežívat⁴⁰. K dlouhodobé realizaci autotrofní denitrifikace je tedy nutné přidávat do reakční směsi odpovídající alkalickou látku, či jiným způsobem ovlivňovat pH, aby nedocházelo k nežádoucím posunům z neutrální oblasti⁶.

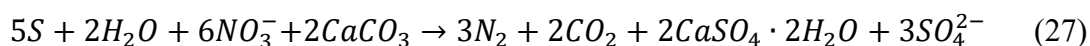
Mezi nejznámější a nejběžněji používané látky k těmto účelům patří hydrogenuhličitan sodný⁶. Jedná se o účinné pufrovací činidlo⁵³. Stechiometrická reakce autotrofní denitrifikace, kde je, jako elektronový donor, využita elementární síra a hydrogenuhličitan jako látka ovlivňující pH je zobrazena rovnicí (23)⁶:



Alternativou hydrogenuhličitanu sodného může být levnější vápenec (uhličitan vápenatý). Následující rovnice (24) - (26) ukazují odpovídající chemické reakce⁶:



Z daných rovnic (24) - (26) je patrné, že 1 mol vápence postačí na kompenzaci 2 mol H^+ iontů. Uvolněné vápenaté ionty pak reagují se vznikajícími síranovými ionty za vzniku nerozpustného síranu vápenatého. Při reakcích se dále uvolňuje oxid uhličitý, který může sloužit u chemolitoautotrofních bakterií rovněž jako zdroj uhlíku^{6,53}. Souhrnná rovnice pak vypadá následovně (27):



Nevýhodou použití vápence jako látky regulující pH při autotrofně denitrifikačních procesech je zvýšení tvrdosti vody a celkového obsahu dispergovaných pevných látek. Negativa tohoto postupu se mohou též projevit při čištění odpadní vody obsahující vysoké koncentrace dusičnanových iontů, kde se pro průběh denitrifikace může stát limitujícím faktorem nedostatečná rychlost rozpouštění vápence. Navíc vznikající sírany mohou pasivovat povrch vápence. Dalším problémem pak mohou být relativně vysoké koncentrace vznikajících síranů, zejména pak v oblastech, kde není možnost vypouštět například vyčištěnou vodu přímo do moře, kde se sírany běžně vyskytují v koncentraci přibližně $2,7 \text{ mg.l}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$ ^{54,55}.

V publikovaných pracích je poměr síry a vápence často uváděn jako 3:1. Při vyšších poměrech dochází ke snižování pH v důsledku nedostatku rozpouštějícího se vápence a denitrifikace může být tímto jevem posléze zcela inhibována⁵⁷. Z hlediska minimalizace objemu reaktoru však autoři⁶ uvádějí optimální objemový poměr dávkované síry a vápence do autotrofně denitrifikačního reaktoru přibližně 1:1.

Optimální teplota pro procesy autotrofní denitrifikace se pohybuje v rozmezí od 33 °C do 35 °C. Při teplotách nad 40 °C dochází k úplnému zastavení těchto procesů^{40,56}.

Dalším jevem, který je nutné sledovat z hlediska možného zpomalení či úplné inhibice denitrifikačních procesů, je koncentrace dusitanových iontů. Inhibice autotrofní denitrifikace dusitanovými ionty nastává při přítomnosti koncentrací nad $50 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_2^-$ (tj. přibližně $164 \text{ mg.l}^{-1} \text{ NO}_2^-$)^{40,56}. Nežádoucí hromadění dusitanů v systému má řadu příčin. Mohou být jednak důsledkem přítomnosti látek, které ovlivňují funkci komplikovaného enzymatického systému a jednak nevhodného nastavení provozních parametrů (tzv. přetížení) reaktoru. Dusitanové ionty se pak objevují ve výtoku čištěné vody a zároveň může být v odplynu detekován oxid dusný⁵⁵. Jedním z možných vysvětlení hromadění dusitanových iontů v reakční směsi může být příliš vysoká koncentrace rozpuštěného kyslíku. Enzym nitrát reduktáza je ze čtyř denitrifikačních enzymů nejméně náchylný na přítomnost kyslíku. Může tedy dojít k situaci, kdy se v systému nachází taková koncentrace kyslíku, která ještě dovoluje působení nitrát

reduktázy a produkci dusitanů, avšak kyslík svou přítomností zabraňuje dalším redukcím zprostředkovaným zbylými třemi enzymy⁵⁸. Autotrofně denitrifikační pochody mohou být negativně ovlivněny také vysokými koncentracemi vznikajících síranů, a to při koncentracích síranů vyšších než 2 g/l⁴⁰.

K neznámějším bakteriálním druhům, které mají denitrifikační vlastnosti, patří *Thiobacillus denitrificans* a *Thiomicrospira denitrificans*. Tyto dva druhy patří do skupiny chemolitoautotrofních bakterií, což znamená, že jsou tyto organismy zcela odkázány na anorganické látky – ty jsou pro ně jak redukční ekvivalenty k metabolickým elektronovým řetězcům, tak i zdroj uhlíku. Naproti tomu stojí bakteriální rody jako *Paracoccus denitrificans*, které dokážou využívat jako redukční ekvivalent zároveň organický i anorganický substrát⁵⁴.

2.2.3.3 Kombinovaná heterotrofní a autotrofní denitrifikace

Nedávné výzkumy ukázaly, že kombinace heterotrofní a autotrofní denitrifikace (HAD) je pro odstraňování dusičnanů z podzemních vod nejúčinnější. Důvodem je synergický vztah obou procesů^{59,60,61}.

V HAD systému je k vytvoření anaerobního prostředí ve vodě a k produkci vodíku použito železo ve formě Fe^0 . Prostředí s nízkou koncentrací rozpuštěného kyslíku je pak příznivé pro heterotrofní denitrifikační organismy, které využívají organický uhlík z celulózy jako zdroj uhlíku a jako donor elektronů pro degradaci dusičnanů, přičemž produkují CO_2 . Naproti tomu autotrofní organismy mohou takto vzniklý CO_2 použít jako zdroj uhlíku a H_2 jako elektronový donor k redukci dusičnanů při procesech autotrofní denitrifikace.

Ačkoliv jsou výsledky HAD procesů povzbudivé, stále se tento postup nepoužívá k sanaci dusičnanů *in situ* v podzemních vodách. HAD proces kombinovaný s použitím celulózových materiálů a Fe^0 se však jeví jako vhodný pro použití v propustných reaktivních bariérách, neboť celulózové materiály a Fe^0 se už dlouhodobě využívají právě k sanacím dusičnanů *in situ*^{59,62,63}.

Metody s využitím propustných reaktivních bariér patří mezi slibné technologie díky jejich relativní jednoduchosti a nízkým investičním a provozním nákladům s efektivnějším čištěním podzemních vod *in situ*. Nevýhodou je obtížnost řízení těchto procesů⁶⁴.

V publikovaných laboratorních pracích týkajících se HAD procesů se autoři zaměřovali hlavně na studium uplatnění různých dárců elektronů, znečišťujících látek a bakterií^{60,65}.

2.3 Bakterie *Thiobacillus denitrificans*

Bakterie *T. denitrificans* mají z environmentálního hlediska vysokou aplikační perspektivu. Mimo denitrifikační schopnosti se v první řadě jedná o odstraňování sírných sloučenin, jako jsou sulfidy a sulfan z kyselých plynů, zemního plynu, z odpadních průmyslových vod a podobně⁶⁶. Sublette a kol. testovali v devadesátých letech minulého století rovněž možnost využití bakterií *T. denitrificans* k anaerobnímu odstraňování sulfanu ze zemního plynu jak ve vsádkovém, tak v průtočném režimu. Sulfan je pro tento organismus inhibičním substrátem, nicméně při nižších koncentracích ho dovede *T. denitrificans* využít jako energetický zdroj a snížit tak jeho množství v zemním plynu na minimum (přibližně oxidace 4-5 mmol/l $\text{H}_2\text{S}\cdot\text{h}^{-1}$ vztaženo na g biomasy)^{67,68,69,70}. Další týmy autorů (Mora a kol., Solcia a kol., Fajardo a kol.) využily tyto bakterie k odstranění sulfanu z bioplynu a ze vzduchu či k simultánnímu odstraňování sulfidů a dusičnanů z takto kontaminovaných vod^{71,72,73}.

Bakteriální kmen *T. denitrificans* poprvé popsal nizozemský botanik a mikrobiolog Martinus Willem Beijerinck⁷⁴. Taxonomicky je bakteriální rod *Thiobacillus* řazen do třídy *Proteobacteria*, a konkrétně *T. denitrificans* do podtřídy *β -Proteobacteria*^{75,76,77}.

Jedná se o velice rozšířený organismus, který se vyskytuje převážně v půdě, blátě, ve sladkovodních i mořských sedimentech, v domácích i v průmyslových čistírnách odpadních vod a v septicích. Velikou výhodou je, že nepatří mezi patogenní ani toxické organismy⁷⁶.

Bakteriální buňky *T. denitrificans* se dle Grama barví negativně (červeně), mají tvar krátkých tyčinek s rozměry 0,5 x 1,0-3,0 μm a mohou se pohybovat pomocí polárně umístěného bičíku^{76,78}.

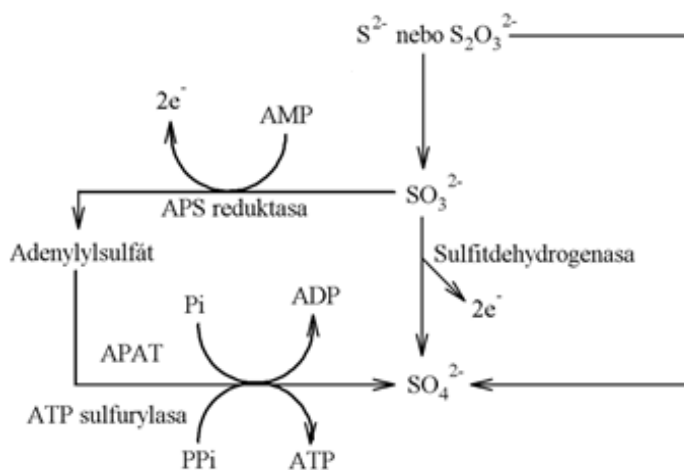
Buňky *T. denitrificans* se rozmnožují nepohlavně pomocí binárního dělení a genom mají ve tvaru jednoho kruhového chromozomu - jde o haploidní organismus^{78,79}. V genomu bylo identifikováno celkem 2 827 genů. Z tohoto celku 2 183 genů kóduje proteiny s již známou funkcí (zejména se jedná o proteiny s podílem na energetickém metabolismu, tvorbě buněčných obalů a transportu anorganických iontů). Zbýlých 644 genů kóduje proteiny, jejichž funkce zatím není známa⁷⁸.

Když Martinus Willem Beijerinck poprvé pozoroval a popsal bakterie *T. denitrificans*, pravděpodobně se mu nepodařilo vyizolovat čistou kulturu, neboť tento organismus přiřadil do skupiny heterotrofních bakterií, tedy bakterií schopných využívat organické látky. Později bylo prokázáno, že se jedná o organismus, jehož metabolismus je striktně chemolitoautotrofní (využívá pouze anorganické látky), fakultativně anaerobní a schopný denitrifikovat^{76,80}. V přírodě tyto metabolické pochody spojují biogeochemické cykly dusíku a síry^{81,82}.

T. denitrificans je schopen oxidovat (využívat jako zdroj energie) siřičitan (SO_3^{2-}), thiosíran ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), elementární síru (S^0), sulfidy (S^{2-} , zejména ve formě FeS_2) či tetrathionan ($\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$) a thiokyanatan (SCN^-)^{66,76,83,84,85}. Tyto substráty mohou využívat bakteriální buňky jak za aerobních, tak anaerobních podmínek, přičemž dochází k jejich oxidaci na síranové ionty (SO_4^{2-})^{67,76}. Během oxidačních reakcí se uvolňují elektrony, které reagují buď s molekulami volného kyslíku (aerobní prostředí) nebo s kyslíkem vázaným ve formě dusičnanů, dusitanů a oxidů dusíku (anoxické prostředí)^{76,79}.

Již několik let jsou studovány enzymy *T. denitrificans* zodpovědné za oxidaci síry a jejich vybraných sloučenin a vztah těchto enzymů s aerobními a anaerobními podmínkami prostředí, ve kterém bakterie žijí. Během aerobní oxidace síry a jejích anorganických redukovaných sloučenin hrají významnou roli enzymy, které se ovšem nijak nezapojují při anaerobní oxidaci těchto sloučenin^{86,87,88}.

Předpokládaný model drah pro oxidaci síry a některých thiosloučenin i s katalyzujícími enzymy je znázorněn na Obr. 1. V první dráze dochází k přímé oxidaci vybraných thiosloučenin na sírany. V druhé dráze se thiosloučeniny oxidují nejprve na siřičitany. Ty se dále oxidují na sírany dvěma enzymatickými cestami - přímo nebo nepřímo přes další meziprodukt adenylylsulfát⁸¹.

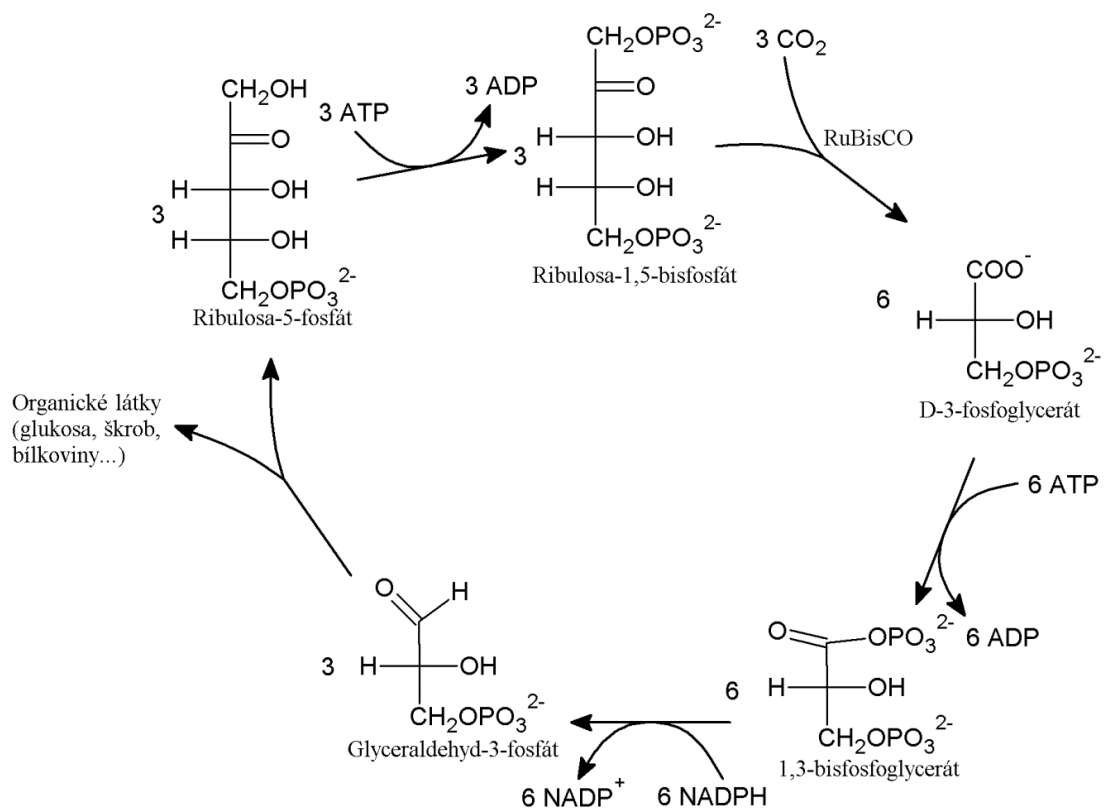


Obr. 1 Model enzymaticky katalyzovaných oxidačních drah síry a dalších vybraných thiosloučenin u bakterie *T. denitrificans*⁸¹

Energie vznikající procesy při oxidaci síry a vybraných thiosloučenin může být poté využita k asimilaci oxidu uhličitého či hydrogenuhličitanu sodného. Tyto látky mohou být též využity jako zdroj uhlíku⁷⁹.

Oxid uhličitý je do organismu fixován Calvinovým cyklem (Obr. 2) za pomoci enzymu ribulóza-1,5-bisfosfát karboxyláza/oxygenáza (RuBisCO) jak za aerobních, tak i za anaerobních podmínek⁸³. Existují dvě formy tohoto enzymu - RuBisCO I a II. Pokud se bakteriální buňka pohybuje v aerobním prostředí, dochází k exprimaci genů kódujících RuBisCO I a naopak při anaerobních podmínkách se exprimují geny zodpovědné za syntézu druhé formy enzymu RuBisCO II. Každá z forem má různou afinitu ke kyslíku a k oxidu uhličitému, čímž se může lišit účinnost utilizace oxidu uhličitého při aerobních a anaerobních podmínkách⁸¹.

Bakteriální buňky *T. denitrificans* dále obsahují bakteriální enzymy redukující dusičnanové a dusitanové ionty, jejichž koncentrace i aktivita souvisí s koncentrací rozpuštěného kyslíku v bakteriálním prostředí⁸⁷.



Obr. 2 Znárodnění Calvinova cyklu⁸⁹

Tyto dva enzymy (nitrát reduktáza a nitrit reduktáza) jsou v buňkách *T. denitrificans* detekovatelné i za aerobních podmínek s nízkým obsahem rozpuštěného kyslíku, avšak jejich koncentrace se výrazně mění (zvyšuje se) v anaerobním prostředí. Syntéza nitrát reduktázy je podmíněna přítomností dusičnanových iontů. Pokud je v anaerobním prostředí použit jako terminální akceptor elektronů v substrátu pouze dusitan, nitrát reduktáza v buňkách zůstává

v zanedbatelných koncentracích. Jakmile mají buňky *T. denitrificans* k dispozici kyslík, nedochází k redukci dusičnanových iontů – aktivity enzymů nitrát reduktázy a nitrit reduktázy jsou zanedbatelné v prostředí, ve kterém je přítomen rozpuštěný kyslík v koncentracích nad 127 $\mu\text{mol/l}$. Aktivita nitrát reduktázy se výrazně zvyšuje, jakmile hodnoty koncentrací rozpuštěného kyslíku klesnou pod 54 $\mu\text{mol/l}$ a nitrit reduktáza značně zvyšuje svou aktivitu při koncentracích rozpuštěného kyslíku do 91 $\mu\text{mol/l}$. Aktivita obou enzymů dosahuje maximálních hodnot ve zcela anoxickém prostředí^{86,87}.

Díky své enzymatické výbavě jsou bakterie *T. denitrificans* schopny žít jak v aerobním, tak anaerobním prostředí a zároveň se vždy přizpůsobit změně prostředí z aerobního na anaerobní a naopak, aniž by došlo k trvalé ztrátě denitrifikačních vlastností^{86,87}.

T. denitrificans roste na pevné půdě obsahující thiosíran, tetrathionan, thiokyanatan nebo elementární síru (aerobně), anaerobně současně i s dusičnany a po sedmi až deseti dnech tvoří drobné, čiré či lehce opaleskující kolonie, které mohou po čase zbělet vlivem síry⁷⁶. Aerobně ani anaerobně neroste na půdě obsahující organický substrát jako zdroj uhlíku, tj. etanol, acetát, butyrát, laktát, sukcinát, glycerol, manitol, glukosa, fruktosa, alanin, glutamát, kvasnice a autolyzát, bez přítomnosti thiosíranu nebo elementární síry. Aerobní podmínky růstu mohou být navozeny 5% CO_2 ve vzduchu a anaerobní 5% CO_2 v N_2 ⁸⁷. Mezi další nezbytné látky obsažené v živném médiu patří chlorid amonný a železo⁹⁰. Obecně je chlorid amonný využíván jako zdroj dusíku pro bakteriální buňky. V některých případech může být nahrazen dusičnanovými ionty⁷⁶.

Optimální teplota pro růst a prosperitu těchto bakterií se pohybuje v rozmezí od 28 do 32 °C, přičemž optimální hodnoty pH prostředí jsou v rozmezí od 6,8 do 7,4. Hodnoty pH během kultivace výrazně klesají⁷⁶.

Při aerobních podmínkách jsou limitujícím faktorem růstu redukované anorganické sloučeniny síry, kdežto limitujícím růstovým faktorem za anaerobních podmínek jsou dusičnany a dusitany^{83,87}.

2.4 Odstraňování dusičnanů bakteriemi *Thiobacillus denitrificans*

Technologií odstraňování dusičnanů z vod s využitím autotrofní denitrifikace se zabývala celá řada studií. Při testování tohoto procesu byl použit buď samotný kmen *T. denitrificans*, nebo se jednalo o konsorcium autotrofních organismů, jehož byl *T. denitrificans* součástí^{52,91,92}. Výhodou použití konsorcia organismů je beze sporu to, že následné zařízení není tak náchylné k budoucím kontaminacím, což znamená, že nároky na

aseptické podmínky provozu nejsou tak vysoké. Oproti tomu použití jednoho kmene může vytvořit jednodušší systém z hlediska popisu a testování možností optimalizace řízení procesu.

Proměnným parametrem při využití autotrofní denitrifikace bakterií *T. denitrificans* je také použití různých elektronových donorů. Nejčastěji se využívá elementární síra, thiosíran a pyrit^{50, 52, 67,92,93,95}. Všechny tyto látky se ukazují jako vhodné donory elektronů pro autotrofní denitrifikaci bakterií *T. denitrificans*. Při použití pyritu jako elektronového donoru je třeba dávat pozor na složení použité rudy, neboť může docházet k uvolňování nežádoucích stopových prvků (jako například Ni) do čištěné vody⁸⁴. Za zmínku také stojí fakt, že elementární síra, která má pevné skupenství a která je použita jako donor elektronů, skýtá navíc výhodu v tom, že její částice mohou tvořit náplň reaktoru a přímo se tak stát nosičem pro bakteriální buňky. Spolu se sírou se v některých případech přidává do reaktoru také vápenec kvůli regulaci pH, jak již bylo zmíněno výše. Nejčastěji se síra s vápencem dávkuje do reaktorů v poměru 1:1^{6,94,96,97,100}.

Autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans* byla z hlediska technického uspořádání testována jak ve vsádkovém, tak i v kontinuálním průtočném režimu.

Studium těchto procesů ve vsádkovém uspořádání probíhalo v jednoduchých vsádkových náplňových reaktorech nebo v suspenzních reakčních nádobách tvořených Erlenmayerovými baňkami vybavenými přívodem živin, U-trubicí pro odvod plynů, nebo v robustních nádobách s míchaným vnitřním obsahem, které byly rovněž opatřeny přívody živin a odvodu plynů^{6,50,92,98,99}.

Při průtočném režimu byla autotrofní denitrifikace sledována v náplňových reaktorech, reaktorech s pevným ložem, v reaktorech ve formě kontinuálně míchaných nádrží a v UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) reaktorech^{66,100,101,102,103}, označovaných též jako anaerobní reaktory s expandovanou vrstvou, ve kterých je kultivována složka přítomná ve formě kalového mraku kompaktních částic - granulí. Proces je založen na průtoku odpadní vody přes fluidní vrstvu granulátu (zde síra a vápenec) a následné separaci vyčištěné vody od granulátu a vzniklého plynného podílu (zde dusík nebo oxidy dusíku). Odpadní voda je rovnoměrně rozdělována nátokovým systémem, který se nachází nade dnem reaktoru. Separátor vyčištěné vody a granulátu je umístěn v horní části reaktoru.

Aplikace technologie autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans* byla testována s různými typy vod. V první řadě se jednalo o podzemní a povrchové vody kontaminované dusičnany, které pocházejí ze zemědělské činnosti. Dále se jednalo o průmyslové a komunální odpadní vody a v neposlední řadě také o pitné vody. Zde se předpokládá využití vyčištěné vody spíše pro zahrádkářské kolonie či mimoměstské oblasti s nízkým procentem zalidnění.

Společným znakem všech zpracovávaných vod je zvýšený obsah dusičnanů a nízký obsah organických látek^{48,50,57,66,98,99,104}.

Spolu s dusičnany jsou do reaktorů dodávány i další látky nezbytné pro správný růst a množení bakteriálních buněk. Buď se tyto látky uměle přidávají do čištěné vody před vstupem do reaktoru, nebo jsou dávkovány zvláště přímo do reaktoru, anebo mohou být již obsažené ve vodě, kterou chceme zbavit dusičnanů. Jedná se zejména o přítomnost fosforu, zdroje uhlíku (vápenec, hydrogenuhličitan apod.), zdroje dusíku (amoniak), stopových prvků atd. Koncentrace přidávaných látek je závislá na složení použitého mikrobiálního konsorcia a konkrétním složení upravované vody proudící denitrifikačními reaktory^{56,66}.

Ukazuje se například, že koncentrace dusitanového dusíku v rozmezí 36 až 60 mg.l⁻¹ (tj. 118-197 mg.l⁻¹ dusitanů) a koncentrace dusičnanového dusíku nad 660 mg.l⁻¹ (tedy 2,9 g.l⁻¹ dusičnanů) mohou způsobovat inhibici autotrofní denitrifikace při využití síry jako donoru elektronů^{40,56}. Fajardo a kol. pozorovali vyšší účinnost autotrofní denitrifikace se sulfidem jako donorem elektronů při 35 °C, než při dalších testovaných teplotách (25 a 30 °C)⁵⁶. Jiné studie uvádějí inhibiční účinek sulfidů při redukci oxidu dusného na plynný dusík (poslední krok denitrifikace)^{105,106}. Vysoká úroveň tvrdosti vody a existence sulfidů v odtoku ze zařízení také mohou být omezujícími faktory při denitrifikaci dusičnanů pomocí síry a vápence, neboť se může vytvářet sraženina sulfidu vápenatého na povrchu síry. Rovněž byl studován vliv přítomnosti různých biogenních prvků a dalších sloučenin na průběh autotrofního denitrifikačního procesu^{66,98}. Autoři (Straub a kol.) studovali schopnost autotrofní redukce dusičnanů v přítomnosti železa¹⁰⁷. Ukázali, že čisté kultury bakterií redukujících dusičnany mohou růst v anaerobních podmínkách se železem jako jediným donorem elektronů nebo jako člen směsi dárců elektronů. Vliv poměrů C/N a S/N na denitrifikační proces studovali autoři^{6,108}.

Konkrétní příklady použití autotrofní denitrifikace za přítomnosti bakterií *T. denitrificans* (ať už samostatně či jako součást skupiny mikroorganismů), kde je jako elektronový donor využita elementární síra nebo její směs s vápencem, jsou shrnuty v následující tabulce (Tab. 4) Data jsou upravena a doplněna dle literatury^{66,109}.

Tab. 4 Autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans*

Typ vody	Typ reaktoru	Náplň reaktoru	Počáteční koncentrace N-NO ₃ ⁻ [mg.l ⁻¹]	Míra odstranění NO ₃ ⁻ [mg N-NO ₃ ⁻ .l ⁻¹ . h ⁻¹]	Zbytková koncentrace N-NO ₃ ⁻ [mg.l ⁻¹]	Objem reaktoru [l]	Průřez reaktoru [cm ²]	Průtok [ml.min ⁻¹]	Zdroj
odpadní voda s vysokým obsahem solí	vsádkový míchaný	S	100,0	9,36 - 40,08	~ 0,00	0,25	-	-	Koenig, Liu ⁹²
odpadní voda s vysokým obsahem solí	průtočný náplňový	S/CaCO ₃	250,0	17,5	≤ 6,25	-	-	-	Gu et al. ¹¹⁰
odpadní voda s vysokým obsahem solí	průtočný náplňový	S	56,5	28,4	≤ 1,41	-	8,4	12,0	Zhao et al. ¹¹¹
odpadní voda s vysokým obsahem solí	průtočný míchaný	S	44,0	1,2	≤ 4,4	-	21,5	792,7 - 901,6	Zhao et al. ¹¹¹
podzemní voda	reaktivní bariéra	S/CaCO ₃ (3:1)	40,0 a 60,0	0,12	~ 0,00	-	7,0	1,0	Moon et al. ⁹⁴
podzemní voda	průtočný náplňový	S/CaCO ₃ (1:1)	101,6	12,5	~ 0,00	0,40	5,5	0,22	Sierra et al. ⁹⁶
uměle připravená podzemní voda	vsádkový míchaný	S/CaCO ₃ (1:1)	59,8	2,0	~ 0,00	0,13	-	-	Moon et al. ⁹⁷
uměle připravená odpadní voda	průtočný náplňový	S	149,1	6,1	~ 0,00	9,12	8,4	19,0 - 40,9	Koenig, Liu ⁹³
uměle připravená odpadní voda	vsádkový nemíchaný	S/CaCO ₃	108,4	8,8 až 46,8	~ 0,00	0,25	-	-	Liu, Koenig ⁶
uměle připravená odpadní voda	průtočný náplňový	S/CaCO ₃ (4:1)	59,8	20,8	≤ 30,00	11,61	8,6	11,33	Koenig, Liu ¹⁰⁰
uměle připravená odpadní voda	průtočný UASB	S	1490,5	62,5	≤ 150,00	0,90	10,0	0,235 - 0,628	Sánchez et al. ¹⁰³

3 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem experimentálního studia bude otestovat a stanovit technologické limity pro odstraňování dusičnanů z modelově připravených odpadních vod chudých na organické látky s obsahem dusičnanů do 100 mg.l^{-1} , a to procesem autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans*.

Série experimentů budou rozděleny do dvou částí. V první části bude pozornost věnována vsádkovým reaktorům, kde bude jako nosič pro bakteriální buňky použita elementární síra smíchaná s vápencem ve hmotnostním poměru 1:1. Síra bude využita jako elektronový donor a vápenec k regulaci pH. Důraz bude kladen na popis průběhu denitrifikačních procesů a jejich ovlivnění vybranými faktory jako je teplota, velikost použité frakce síry a vápence, míchání a přidavek fosforu a trojmocného železa v různých koncentracích do reakční směsi. Získané poznatky budou dále aplikovány při následujících průtočných experimentech.

Ve druhé části experimentální práce bude pozornost zaměřena na experimenty v průtočné koloně, kde bude jako náplň použita pouze elementární síra, která bude mít opět funkci elektronového donoru a nosiče bakteriálních buněk. Výsledky budou kriticky zhodnoceny včetně možnosti použití pro reálné vody znečištěné dusičnany.

Jako denitrifikační organismus bude pro potřeby všech experimentů použita monokultura bakterií *T. denitrificans* (DSM No. 12475) získaná z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných struktur.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Přehled použitých chemikálií je uveden v Tab. 5. Zároveň je zde uveden jejich dodavatel a čistota. Ve většině případů se jednalo o látky s čistotou p.a.

Tab. 5 Seznam použitých chemikálií

Název	Vzorec	Dodavatel	Čistota
4-aminobenzen-sulfonamid	$C_6H_8N_2O_2S$	Lach-Ner. s.r.o.	98 %
Demineralizovaná voda	H_2O	UPa	Vodivost ~ $10 \mu S.cm^{-1}$
Dihydrát citronanu trisodného	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Penta	p.a.
Dihydrát dichlorisokyanuratanu sodného	$C_3Cl_2N_3O_3Na \cdot 2H_2O$	Acros organics	98 %
Dihydrát molybdenanu sodného	$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	Lach-Ner. s.r.o.	p.a.
Dihydrogenfosforečnan draselný	KH_2PO_4	Lach-Ner. s.r.o.	p.a.
Dihydrogenfosforečnan sodný	NaH_2PO_4	Lach-Ner. s.r.o.	p.a.
Dusičnan draselný	KNO_3	Penta	p.a.
Dusičnan sodný	$NaNO_3$	Lach-Ner. s.r.o.	99 %
Dusitan sodný	$NaNO_2$	Lach-Ner. s.r.o.	99 %
Heptahydrát síranu hořečnatého	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Lachema	p. a.
Hydrogenfosforečnan sodný	Na_2HPO_4	Lach-Ner. s.r.o.	99 %
Hydrogenuhlíčan draselný	$KHCO_3$	Penta	p. a.
Hydrogenuhlíčan sodný	$NaHCO_3$	Penta	p. a.
Hydroxid sodný	$NaOH$	Penta	p. a.
Chlorid sodný	$NaCl$	Penta	p. a.
Chlorid vápenatý	$CaCl_2$	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Chlorid železitý	$FeCl_3$	Penta	p. a.
Kyselina askorbová	$C_6H_8O_6$	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Kyselina fosforečná	H_3PO_4	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Kyselina sírová	H_2SO_4	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
N-(1-naftyl)-1,2-diaminoethan dihydrochloridu	$C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2 \cdot 2HCl$	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Pentakyanonitrosylželezitan sodný	$Na_2[Fe(CN)_5NO]$	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Salicylan sodný	HOC_6H_4COONa	Penta	p. a.
Síra	S	Synthesia, a.s.	99 %
Síran amonný	$(NH_4)_2SO_4$	Lachema	p. a.

Název	Vzorec	Dodavatel	Čistota
Síran manganatý	MnSO ₄	Penta	p. a.
Thiosíran sodný	Na ₂ S ₂ O ₃	Lachema	p. a.
Vínan antimonylodraselný	K(SbO)C ₄ H ₄ O ₄ · ½H ₂ O	Lach-Ner. s.r.o.	p. a.
Uhličitan vápenatý	CaCO ₃	Lachema	p. a.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Kultivace mikroorganismů

Pro všechny experimenty popsané v této práci byl použit sbírkový kmen *Thiobacillus denitrificans* s označením DSM 12475, který byl zakoupen z Německé sbírky mikroorganismů a buněčných struktur (Leibniz Institute DSMZ, SRN). Dodaná kultura (v tekutém živném médiu) byla následně kultivována dle doporučených podmínek při 33 °C anaerobně (s využitím adsorbérů kyslíku) v tekutém médiu (za stálého míchání při 150 rpm) i na pevné půdě.

Tab. 6 Složení tekutého média S6 pro růst *T. denitrificans*

Sloučenina	c [g/l]
Na ₂ S ₂ O ₃	10,0
KH ₂ PO ₄	11,8
Na ₂ HPO ₄	1,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
CaCl ₂	0,03
FeCl ₃	0,02
MnSO ₄	0,02

Jako tekuté médium pro růst *T. denitrificans* bylo použito médium označované jako S6 médium⁹⁰. Složení tohoto média je uvedeno v Tab. 6. Po navážení a rozpouštění všech složek v demineralizované vodě bylo médium autoklávováno 15 minut při 121 °C. Kultivace *T. denitrificans* probíhala nejprve ve skleněných zkumavkách o objemu 10 ml, kam byl odpipetován 1 ml sterilního S6 média, ke kterému bylo přidáno 100 µl zásobní bakteriální suspenze *T. denitrificans*. Každý den bylo do zkumavky přidáno čerstvé sterilní živné médium S6 o objemu 1 ml. Jakmile bylo dosaženo celkového objemu kultivované suspenze 10 ml, další kultivace probíhala v 250ml Erlenmayerově baňce, přičemž bylo každých 7 dní přidáno čerstvé

médium. Rovněž byl každý týden měřen zákal bakteriální suspenze jako důkaz množení buněk. Celkový čas kultivace zásobní kultury pro vsádkové experimenty byl 28 dní.

Pevné médium pro růst *T. denitrificans* (označované jako S8 médium⁹⁰) bylo připraveno ze sloučenin uvedených v Tab. 7. Po navážení a rozpuštění všech složek v demineralizované vodě, bylo médium autoklávováno po dobu 15 minut při 121 °C a rozlito na sterilní plastové Petriho misky o průměru 10 cm. Bakterie *T. denitrificans* byly na této půdě kultivovány přibližně 10 dní při 33 °C, přičemž použité Petriho misky byly po celou dobu růstu bakterií přelepeny parafilmem, aby bylo zabráněno přílišnému vysychání média a snížilo se riziko kontaminace.

Tab. 7 Složení pevného média S8 pro růst *T. denitrificans*

Sloučenina	c [g/l]
Na ₂ S ₂ O ₃	10,0
KH ₂ PO ₄	1,8
Na ₂ HPO ₄	1,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
CaCl ₂	0,03
FeCl ₃	0,02
MnSO ₄	0,02
NaHCO ₃	0,5
KNO ₃	5,0
Agar	15,0

K rychlému ověření nepřítomnosti kontaminujících organismů byly připraveny další dvě pevné živné půdy. Jednalo se o univerzální živnou půdu s označením MPA (masopeptonový agar) ke kultivaci méně náročných organismů a R-2A pevnou půdu určenou pro mikroorganismy rostoucí v pitné vodě.

Pevná půda R-2A byla připravena navážení a rozpuštěním 18,12 g komerčně dodávané dehydratované směsi (R-2A Agar, HiMedia, Indie) do 1 l demineralizované vody. Směs byla autoklávována 15 minut při 121 °C a po zchladnutí rozlita na sterilních plastové Petriho misky.

Masopeptonový agar byl připraven smícháním chloridu sodného s vodou a dalšími komerčně dodávanými dehydratovanými přípravky, které byly rovněž zakoupeny u firmy HiMedia. Složení a navážky jsou uvedeny v Tab. 8. Po navážení všech komponent a jejich rozpuštění v demineralizované vodě (pH roztoku 7,2) byla směs autoklávována po dobu 15 minut při 121 °C a po zchladnutí rozlita na sterilní plastové Petriho misky.

Kultivace na těchto dvou půdách probíhala při laboratorní teplotě a zároveň v termostatu při 37 °C po dobu 7 dní, přičemž byl nárůst mikroorganismů na miskách kontrolován i během kultivace, a to po 24, 48 a 72 hodinách.

Tab. 8 Složení masopeptonového agaru

Sloučenina	c [g/l]
Masový extrakt	10
Pepton	5
NaCl	5
Agar	15

4.2.2 Vsádkové experimenty

Pro všechny experimenty ve vsádkovém režimu byly použity jako reakční nádoby lahve z čirého borosilikátového skla o objemu mírně přesahujícím 1 l se šroubovacím uzávěrem a polypropylenovým víčkem sterilizovatelné do 140 °C. Byla použita víčka s otvorem pro vložení silikonového septa (Fisher Scientific, spol. s r.o.). Experimenty sloužily ke sledování různých vlivů na redukci dusičnanových a dusitanových iontů bakteriemi *T. denitrificans*.

Jako nosič bakteriálních buněk a zároveň jako donor elektronů pro pochody bakterií *T. denitrificans* v reaktorech byla použita kusová síra, která byla získána od společnosti Synthesia, a. s., kde je využívána jako surovina pro výrobu kyseliny sírové. Před vlastními experimenty byla rozdrčena na požadovanou velikost. V první části vsádkových experimentů byla použita frakce o velikosti částic 2,5 - 5,0 mm (střední velikost částic 3,54 mm) a navážka činila 50, 100 nebo 200 g síry v reakční nádobě. Jednotlivé navážky jsou uvedeny v Tab. 9. Ve druhé části experimentů v reakčních nádobách byla použita nadrcená síra na prášek s velikostí frakce 140 - 200 µm (střední velikost částic 167 µm). V těchto nádobách byla navážka určena tak, aby povrch částic síry korespondoval s povrchem částic v nádobách se sírou s větší velikostí frakce. Navážky byly vypočteny ze vztahu:

$$\text{Měrný povrch} = \frac{6 \sum \frac{V_i}{d_i}}{\rho \cdot \sum V_i} \quad (28)$$

kde V_i je relativní objem ve třídě i s průměrem ve třídě d_i a ρ je hustota částic. Vypočítané navážky práškové síry jsou uvedeny v Tab. 10.

Rovněž byl do reakčních nádob přidáván kusový vápenec kvůli regulaci pH. Poměr hmotnosti dávkované síry a vápence do všech experimentálních nádob byl vždy 1:1. Tam, kde byla použita v reakční nádobě frakce síry s větší velikostí částic, byl dávkován vápenec s rozměry 3,0 - 4,0 mm (střední velikost částic 3,46 mm). V ostatních experimentech s menší velikostí frakce síry byl použit vápenec s velikostí částic 2 μm . Vše je shrnuto níže v Tab. 9 a Tab. 10. Každá reakční nádoba dále obsahovala 1 l sterilního roztoku dusičnanu sodného o koncentraci 100 mg.l^{-1} NO_3^- rozpuštěného buď v demineralizované nebo pitné vodě z vodovodního řádu a 1 ml bakteriální suspenze *T. denitrificans* v tekutém médiu S6 s optickou denzitou 0,17 McFarlandovy stupnice.

Tab. 9 Složení reakčních směsí s frakcí použité síry o střední velikosti částic 3,54 mm a vápence o střední velikosti částic 3,46 mm (1. série experimentů)

Označení	S (g)	CaCO ₃ (g)	P (mg.l ⁻¹)	Fe (mg.l ⁻¹)
K1a	50	50	-	-
K1b	50	50	-	-
K2a	100	100	-	-
K2b	100	100	-	-
K3	200	200	-	-
P1	50	50	0,5	-
P2	50	50	1,0	-
P3	50	50	1,5	-
P4	50	50	2,0	-
P5	50	50	3,0	-
P6	100	100	0,5	-
P7	100	100	1,0	-
P8	100	100	1,5	-
P9	200	200	1,0	-
Fe1	100	100	-	0,05
Fe2	100	100	-	0,1
Fe3	100	100	-	0,5
Fe4	100	100	-	1,0

Dalšími přidávanými složkami do reakčních nádob byly sloučeniny NaH_2PO_4 a FeCl_3 . Byl zkoumán vliv koncentrace těchto aditiv na průběh a rychlost redukce dusičnanových a dusitanových iontů. Použité koncentrace fosforu a železa jsou uvedeny v Tab. 9 a 10.

Příprava první série vsádkových experimentů, u nichž byla použita síra a vápenec s větší velikostí částic (frakce 2,5 – 5,0 mm, střední velikost částic 3,54 mm), probíhala tak, že po navážení síry a vápence do reakčních nádob bylo vše zalito 1 l sterilního roztoku dusičnanu sodného (přípraveného z demineralizované vody; autoklávovaného 15 min při 121 °C a ochlazeného na laboratorní teplotu; koncentrace 100 mg.l^{-1} dusičnanových iontů), uzavřeno plastovým víčkem se septem a ponecháno sterilizovat horkým vzduchem 48 hodin při 90 °C. Po vychladnutí na laboratorní teplotu bylo do každé reakční nádoby přidáno po 1 ml bakteriální suspenze s *T. denitrificans* a případně další roztoky obsahující NaH_2PO_4 nebo FeCl_3 . Pokud byly do reakčních nádob přidávány další látky, vždy se jednalo o sterilní roztoky autoklávované 15 min při 121 °C. Celkové složení reakčních směsí připravených v první sérii experimentů je shrnuto v Tab. 9.

Tab. 10 Složení reakčních směsí s frakcí použité síry o střední velikosti částic $167 \mu\text{m}$ a vápence o střední velikosti částic $2 \mu\text{m}$ (2. série experimentů). Zde K = pitná voda z řádu, D = demineralizovaná voda.

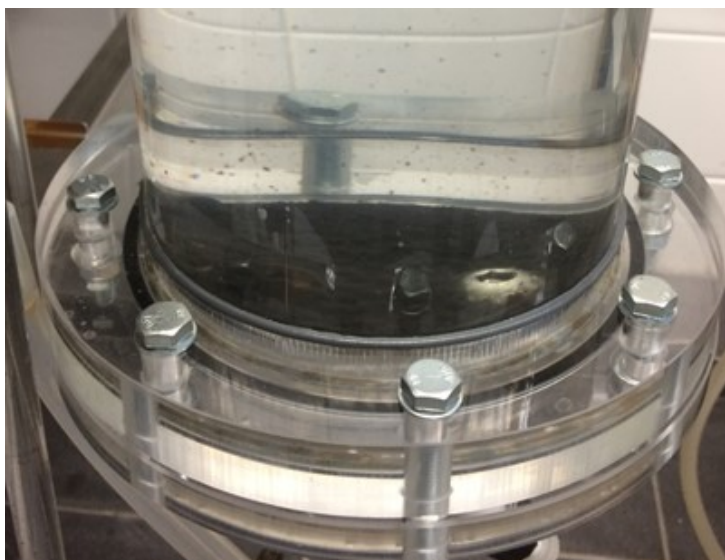
Označení	S [g]	CaCO_3 [g]	Voda	Třep. [150rpm]	T [°C]
K4	100	100	K	ano	22
K5	2,23	2,23	D	ano	22
K6	4,46	4,46	D	ano	22
K7	8,92	8,92	D	ano	22
K8	2,23	2,23	K	-	22
K9	4,46	4,46	K	-	22
K10	8,92	8,92	K	-	22
K11	2,23	2,23	K	ano	22
K12	4,46	4,46	K	ano	22
K13	8,92	8,92	K	ano	22
K14	2,23	2,23	K	-	33
K15	4,46	4,46	K	-	33
K16	8,92	8,92	K	-	33
K17	2,23	2,23	K	ano	33
K18	4,46	4,46	K	ano	33
K19	8,92	8,92	K	ano	33

Ve druhé sérii vsádkových experimentů byl postup přípravy reakční směsi odlišný. Do sterilních skleněných lahví byla navážena síra s vápencem, vše bylo uzavřeno víčkem se septem a necháno sterilizovat horkým vzduchem 48 hodin při teplotě 90 °C. Do první reakční nádoby této série byla použita síra s vápencem s větší velikostí částic (frakce 2,5 – 5,0 mm) a do všech ostatních síra s vápencem s menší velikostí částic (frakce 140 - 200 µm). Po vychladnutí na laboratorní teplotu bylo do každé reakční nádoby přidáno 9 ml sterilního roztoku dusičnanu sodného (autoklávovaného 15 min při 121 °C, koncentrace 100 mg.l⁻¹ dusičnanových iontů, příprava jak z demineralizované – *označení D*, tak i z pitné vody z řádu – *označení K*, viz Tab. 10) a 1 ml bakteriální suspenze *T. denitrificans*. Takto předpřipravené reakční směsi byly třepány (150 rpm) po dobu 3 dní. Poté bylo do všech nádob přidáno 90 ml sterilního roztoku dusičnanu sodného (koncentrace 100 mg.l⁻¹ dusičnanových iontů) a opět 1 ml bakteriální suspenze *T. denitrificans*. Po dalších třech dnech třepání bylo do reakčních nádob přidáno dalších 900 ml sterilního roztoku dusičnanu sodného, obsah byl promíchán a byly odebrány vzorky potřebné ke vstupním analýzám. Celkový obsah reakčních nádob připravených ve druhé sérii experimentů je shrnut v Tab. 10. Reakční nádoby, které mají v Tab. 10 ve sloupci pro třepání při 150 rpm uvedený výraz „ano“, byly třepány po celou dobu probíhajících experimentů. Jednalo se o reakční nádoby označené K4 až K7, K11 až K13 a K17 až K19.

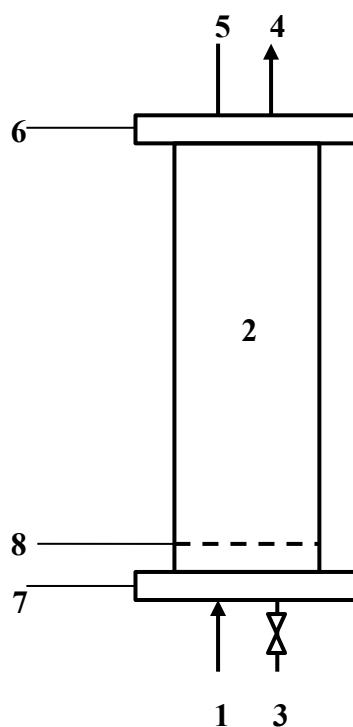
Připravené experimentální směsi sloužily ke studiu faktorů, jako je teplota (konkrétně laboratorní teplota 22 °C a teplota 33°C, což odpovídá horní mezi optimální teploty pro růst *T. denitrificans*), velikost použité frakce, míchání (při 150 rpm během celého experimentu a přidavek fosforu a trojmocného železa v různých koncentracích).

4.2.3 Experimenty v průtočné koloně

Pro experimenty v průtočném režimu byla použita kolona vyrobená z plexiskla. Jednalo se o trubku o průměru 150/140 mm, opatřenou přírubami, s činnou délkou kolony 670 mm a s volným objemem 10,3 l. Průtočný průřez kolony byl 153,9 cm². Příruby byly těsněny o-kroužky, přičemž příruba na válcové části (tloušťka 25 mm) byla přivařena svářecím PVC drátem. Spodní a vrchní příruba s drážkami pro o-kroužek byly z materiálu tloušťky 15 mm. Příruby byly spojeny vždy 8 šrouby (M10) na vrchní i spodní straně. Na spodní přírubě, uvnitř kolony, bylo umístěno na krátkých nožičkách (výška 20 mm) síto se 4mm oky, které plnilo funkci nosiče granulátu. Detail dna kolony je zobrazen na Obr. 3.



Obr. 3 *Detail dna kolony*



Obr. 4 *Technologické schéma průtočné kolony*

Průchodky v přírubách pro přívod kapaliny, zakončené olivkami, byly zhotoveny z obrobených nerezových šroubů M12. Dávkování do kolony bylo spodem, přepad vrchem. Navíc byla ve vrchní části kolony odvzdušňována hadičkou připojenou na skleněnou promývačku s demineralizovanou vodou. V blízkosti kolony byl umístěn plastový zásobník (o objemu 50 l) s dávkovaným roztokem do kolony. Doprava kapaliny do kolony byla zajištěna

dávkovacím membránovým čerpadlem (EMEC KCL Plus, I). Technologické schéma průtočné kolony je uvedeno na Obr. 4, přičemž legendu znázorňuje Tab. 11.

Tab. 11 *Popis technologického schématu průtočné kolony*

Číslo	Označení
1	Přívod roztoku živin čerpadlem ze zásobníku
2	Kolona obsahující pevný nosič bakterií
3	Výpust
4	Přepad roztoku prošlého kolonou
5	Odvzdušnění
6	Horní příruba
7	Spodní příruba
8	Síto

Do kolony byla vložena náplň obsahující sypanou drcenou síru (velikost frakce 5,0 až 8,0 mm) a bakterie *T. denitrificans*. Pro průtočné experimenty byl použit stejný sbírkový kmen *T. denitrificans* (DSM 12475, Německá sbírka mikroorganismů buněčných kultur - Leibniz Institute DSMZ, SRN), jako tomu bylo v případě vsádkového uspořádání testů. Dodaná kultura byla kultivována v tekutém médiu postupem popsáním v kapitole 1.6.1. Po 28 dnech kultivace a při dostatečném množství bakteriální suspenze byla do Erlenmayerovy baňky přidána drcená síra (autoklávována 15 minut při 121 °C) spolu s čerstvým živným médiem (médiem S6, složení viz Tab. 6) a tato směs byla ponechána ke kultivaci dle doporučených podmínek při 33 °C, anaerobně (s využitím adsorbérů kyslíku) a za stálého míchání (při 150 rpm). Každých 7 dní byla tekutá část směsi odčerpána a k síře byla následně přidána další drcená síra, čerstvá bakteriální suspenze a čerstvý živný roztok S6, až bylo napěstováno dostatečné množství bakterií se sírou potřebné pro naplnění průtočné kolony.

Kolona byla naplněna sírou s bateriemi *T. denitrificans* do výše 582 mm (objem pevné náplně byl 9 l) a náplň byla zalita čerstvým živným roztokem S6 na 7 dní. Poté byl zahájen experimentální provoz kolony tak, že byl do kolony čerpán pracovní roztok, čímž byl původní živný roztok postupně vymýván.

Experimenty v koloně byly provozovány po dobu celkem 428 dní, přičemž byl do kolony dávkován pracovní roztok obsahující dusičnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný (koncentrace 1 mg.l⁻¹ P-PO₄³⁻ po celou dobu experimentu), hydrogenuhlíčan sodný a hydrogenuhlíčan draselný. Koncentrace složek pracovního roztoku a rychlosti jeho dávkování do kolony jsou uvedeny v Tab. 12. Prvních 100 dní experimentu byl pracovní roztok

připravován z demineralizované vody. Posléze byl (až do ukončení provozu kolony) pracovní roztok připravován z pitné vody z vodovodního řádu Univerzity Pardubice.

Tab. 12 *Koncentrace složek pracovního roztoku a rychlost jeho dávkování do průtočné kolony*

Dny	cNO ³⁻ [mg.l ⁻¹]	Průtok [ml.min ⁻¹]	P-PO ₄ ³⁻ [mg.l ⁻¹]	cNaHCO ₃ [mg.l ⁻¹]	cKHCO ₃ [mg.l ⁻¹]
0 - 20	50	23,6	1,0	50	-
21 - 97	25	19,3	1,0	50	-
98 - 150	15	7,0	1,0	50	-
151 - 255	25	8,5	1,0	50	-
256 - 428	30	9,9	1,0	-	50

Během provozu modulu byly průběžně odebírány vzorky na vstupu i výstupu z kolony. Ve vstupních vzorcích pracovního roztoku byl pravidelně stanovován obsah dusičnanů a fosforu (dvakrát týdně). Ve vzorcích na výstupu z kolony byl ve stejných intervalech stanovován obsah dusičnanů, dusitanů, síranů, fosforu, rozpuštěného kyslíku, pH a oxidačně-redukčního potenciálu (ORP). Zároveň byl dopočítáván obsah celkového dusíku součtem dusičnanového a dusitanového dusíku.

4.3 Analytické metody

Na počátku a v průběhu všech experimentů (obvykle každých 7 dní) byly odebírány vzorky kapalně reakční směsi. Odběr byl realizován sterilní injekční stříkačkou se sterilní 12 cm dlouhou jehlou, aniž by docházelo k otevření reakčních nádob.

V odebraných vzorcích byl následně stanoven obsah dusičnanových, dusitanových a v některých případech i fosforečnanových a síranových iontů. Dále bylo stanovováno pH, ORP a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Experimenty byly sledovány až do okamžiku, kdy byly koncentrace dusičnanů a dusitanů ve stanovovaných vzorcích sníženy na hodnoty blízké nule.

Ověřování přítomnosti bakterií *T. denitrificans* a nepřítomnosti možných kontaminujících mikroorganismů bylo provedeno vždy na začátku, v průběhu a na konci každého jednotlivého experimentu pomocí kultivačních a molekulárně biologických technik.

4.3.1 Měření zákalu bakteriální suspenze

Při kultivaci bakterií *T. denitrificans* v tekutém médiu byl průběžně měřen zákal suspenze pro ověření růstu bakteriálních buněk uvnitř živného roztoku. Vzorek bakteriální

suspenze o objemu 2 ml byl odlit do plastové zkumavky a změřen v denzitometru DEN-1B (BioSan, Lotyšsko) při vlnové délce 565 nm s udanými výsledky v jednotkách McFarlandovy zákalové stupnice.

4.3.2 Identifikace bakterií *T. denitrificans*

K potvrzení přítomnosti bakterií *T. denitrificans* byly využity molekulárně biologické metody. Měření byla provedena na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. K tomuto účelu byla využita metoda umožňující separaci DNA fragmentů na základě jejich mobility v prostředí se vzrůstajícím denaturačním gradientem - elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu.

Nejprve byla izolována DNA pomocí PowerSoil Kitu (Mobio) a poté byly provedeny 2 po sobě následující polymerázové řetězové reakce (PCR, z ang. *polymerase chain reaction*) s primery FD1, RD1 a 341F GC, 907R. Primer 341F GC obsahoval tzv. GC svorku. GC svorka je úsek nukleové kyseliny bohatý na GC páry (páry guanin-cytosin), které zabraňují denaturaci DNA a udrží ji tak v polyakrylamidovém gelu¹¹³. Po skončení PCR reakce byla provedena kontrola amplifikované DNA pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. DNA byla označena ethidium bromidem (ETB) a vizualizována pomocí UV záření.

Následně byla provedena denaturace, tedy rozrušení sekundární a terciální struktury nukleových kyselin. Při vystavení nukleových kyselin extrémním podmínkám (například vysoké teplotě, extrémnímu pH nebo přítomnosti denaturačního činidla) dochází k oddělení vodíkových můstků ve dvouřetězcové DNA (dsDNA); řetězce jsou od sebe odděleny a vytváří se dvě samostatná vlákna jednořetězcové DNA (ssDNA)¹¹². DNA fragmenty, které jsou bohatší na obsah guaninu a cytosinu, jsou stabilnější než fragmenty, které obsahují spíše adenin a thymin, a denaturují až po dosažení vyšší koncentrace denaturačního činidla. Vzniklá směs dsDNA fragmentů různých sekvencí je rozdělena pomocí elektroforézy v akrylamidovém gelu s lineárně vzrůstajícím gradientem denaturačních činidel. V akrylamidovém gelu se lépe pohybují dvouřetězcové DNA fragmenty, zatímco u denaturovaných ssDNA molekul dochází ke zpomalení nebo úplnému zastavení. DNA je tedy v gelu rozdělena na základě obsahu bází do tzv. bandů.

Denaturační gradientová gelová elektroforéza byla provedena s gradientem denaturačních činidel 30-70 %. Tento gradient poskytoval nejlepší výsledky z testovaných gradientů (např. gradienty 40-60, 40-80 %). Jako denaturační činidla byly použity urea a formamid a k polymeraci byl použit tetrametyletylendiamin (TEMED) a peroxodisíran amonný (APS). Při samotné elektroforéze bylo vloženo napětí 90 V a elektroforéza probíhala po dobu 16,5 hodin při 60 °C.

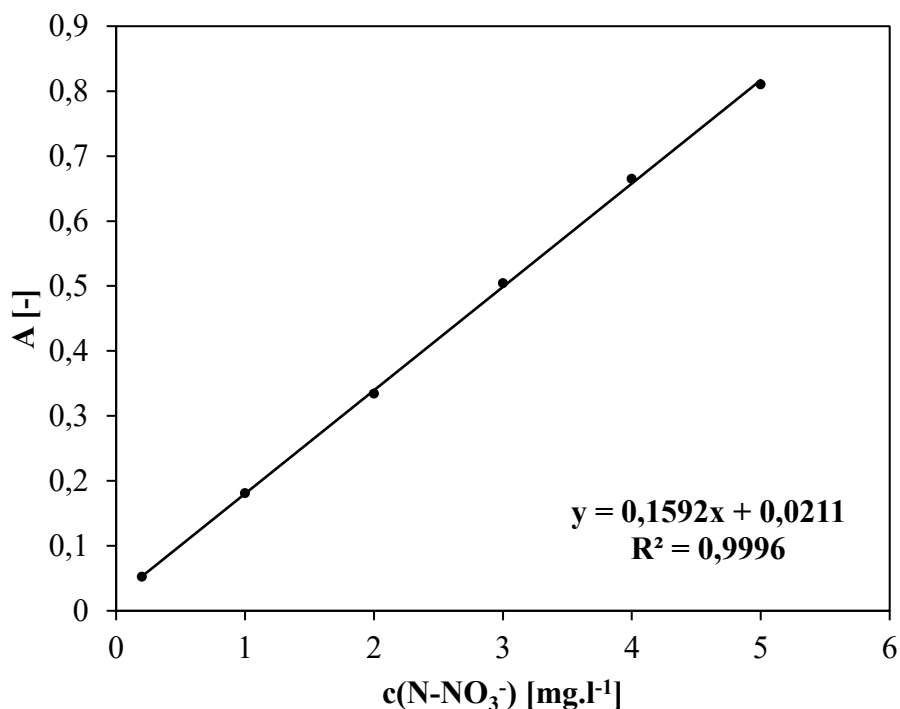
Následně byla DNA opět amplifikována pomocí PCR a purifikována. DNA obsažená v příslušných bandech byla vyříznuta, amplifikována pomocí primerů 341F bez GC svorky a 907R a purifikována kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid).

Nakonec byly připraveny sekvenační směsi, které byly zaslány na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly upraveny pomocí programu DNA Baser a Finch TV. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí databáze BLAST (National Library of Medicine).

4.3.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace dusičnanových iontů

Koncentrace dusičnanových iontů v reakční směsi byla určována pomocí přímého spektrofotometrického stanovení s kyselinou salicylovou. Jedná se o normovanou metodu ČSN ISO 7890-3 (75 7453) z roku 1994. V odpařovací porcelánové misce bylo do vzorku nebo do kalibračního roztoku o objemu 10 ml s obsahem dusičnanových iontů do 25 mg.l⁻¹ přidáno 200 µl 30% roztoku hydroxidu sodného pro zalkalizování a 1 ml 5% roztoku salicylanu sodného. Tato směs byla odpařena na vodní lázni do sucha a po zchladnutí misky na laboratorní teplotu byl celý odparek ovlhčen 1 ml koncentrované kyseliny sírové. Po desetiminutovém působení kyseliny sírové bylo do misky přidáno 20 ml demineralizované vody a 7 ml 30% hydroxidu sodného. Celá směs pak byla promíchána a po zchladnutí na laboratorní teplotu kvantitativně převedena a doplněna demineralizovanou vodou do 50 ml v odměrné baňce. Takto upravený vzorek se zbarvil žlutě nitroderiváty, které vznikly reakcí kyseliny dusičné (v kyselém prostředí kyseliny sírové) se salicylanem sodným a následným zalkalizováním roztoku. Intenzita žlutého zbarvení, která je přímo úměrná koncentraci dusičnanů ve vzorku, byla měřena při vlnové délce 415 nm v plastové kyvetě s optickou drahou 1 cm proti demineralizované vodě na jednopaprskovém spektrofotometru DR 6000 UV-VIS (Hach, SRN).

Koncentrace dusičnanů v jednotlivých vzorcích byla dále vyhodnocena z kalibrační přímkou (Obr. 5). K tomuto účelu byla připravena a proměřena řada šesti kalibračních roztoků s koncentracemi dusičnanového dusíku 0,2; 1; 2; 3; 4 a 5 mg.l⁻¹. Jednotlivé koncentrace byly získány ředěním zásobního roztoku dusičnanu sodného o koncentraci 100 mg.l⁻¹ dusičnanového dusíku.



Obr. 5 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace dusičnanového dusíku

4.3.4 Spektrofotometrické stanovení koncentrace dusitanových iontů

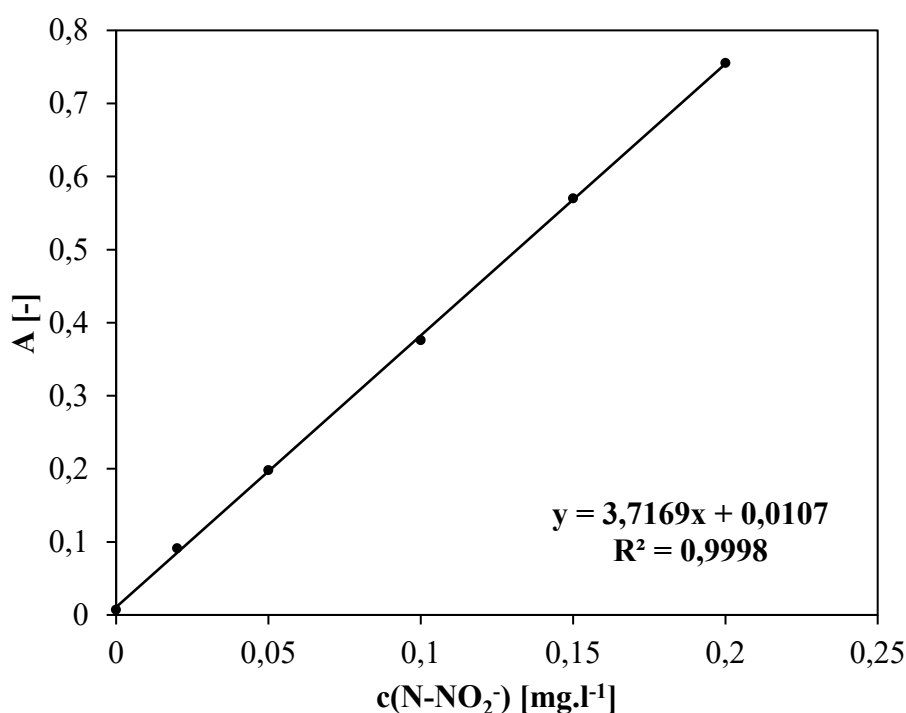
Při stanovení obsahu dusitanových iontů ve vzorku bylo využito normované metody na principu diazotace aromatických aminolátek kyselinou dusitou (z dusitanů v analyzovaném vzorku) v kyselém prostředí kyseliny fosforečné (při pH 1,9) za vzniku diazoniových solí reagujících s arylaminem na spektrofotometricky měřitelné azobarvivo - ČSN EN 26777 (75 7452).

Pro účely jednotlivých stanovení bylo připraveno vybarvovací činidlo - k 500 ml demineralizované vody v 1l odměrné baňce bylo přidáno 100 ml kyseliny fosforečné (s hustotou 1,7 g.ml⁻¹). Následně bylo v tomto roztoku rozpuštěno 40 g 4-aminobenzen-sulfonylamidu a 2 g N-(1-naftyl)-1,2-diaminoethan dihydrochloridu. Po rozpuštění obou látek v roztoku byl obsah odměrné baňky doplněn demineralizovanou vodou na 1 l, promíchán a přechováván v tmavé skleněné lahvi při teplotě od 2 do 5 °C po dobu maximálně jeden měsíc.

V 50ml odměrné baňce bylo smícháno 40 ml čirého vzorku nebo kalibračního roztoku s obsahem dusitanů do 0,8 mg.l⁻¹ s 1 ml vybarvovacího činidla a doplněno demineralizovanou vodou. Po 20 minutách bylo měřeno vzniklé červenofialové azobarvivo při vlnové délce 541 nm proti demineralizované vodě ve skleněné kyvetě s optickou drahou 1 nebo 4 cm v závislosti na intenzitě zbarvení.

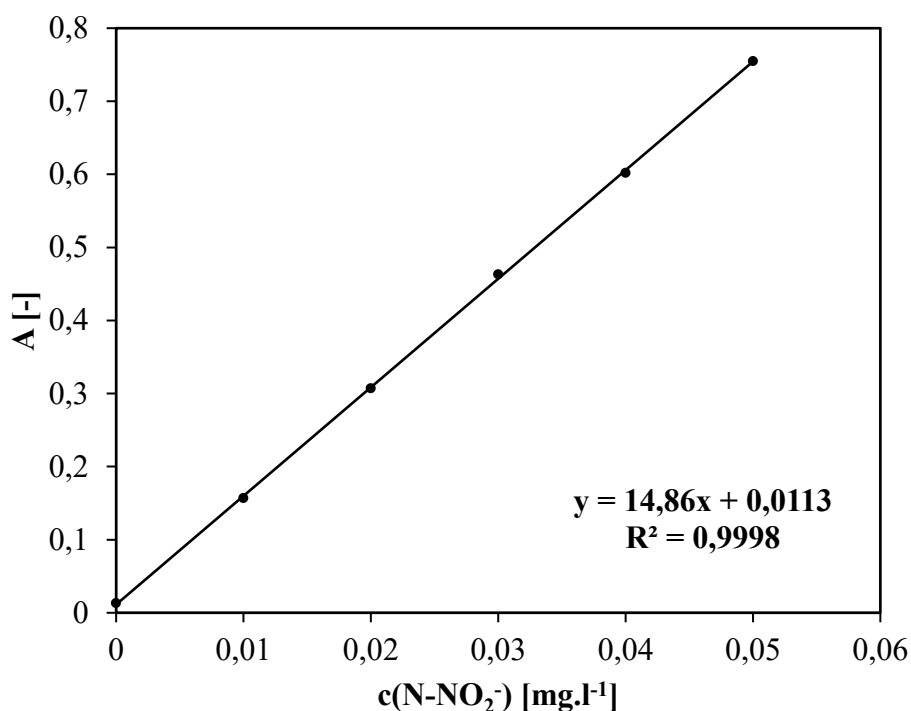
K měření byl využit jednopaprskový spektrofotometr DR 6000 UV-VIS (Hach, SRN) a hodnoty koncentrací dusitanových iontů v jednotlivých vzorcích byly vyhodnoceny z kalibrační přímky. K tomuto účelu byla připravena řada devíti kalibračních roztoků s rozsahem koncentrace od 0 do 0,25 mg.l⁻¹ dusitanového dusíku ředěním zásobního roztoku dusitanu sodného o koncentraci 100 mg.l⁻¹ dusitanového dusíku.

Pro určení první kalibrační přímky byly použity roztoky s koncentracemi dusitanového dusíku 0; 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 a 0,2 mg.l⁻¹, přičemž byly tyto roztoky proměřeny v 1 cm kyvetě. S využitím této kalibrační přímky (Obr. 6) byly následně určovány neznámé koncentrace dusitanů ve vzorcích s obsahem dusitanového dusíku od 0,05 do 0,2 mg.l⁻¹.



Obr. 6 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace dusitanového dusíku v kyvetě s optickou drahou 1 cm

Druhá kalibrační přímka (pro vzorky s obsahem dusitanového dusíku do 0,05 mg.l⁻¹) byla získána proměřením kalibračních roztoků s obsahem dusitanového dusíku 0; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 a 0,05 mg.l⁻¹ ve 4 cm kyvetě. Podle této kalibrační přímky (Obr. 7) byly následně určovány neznámé koncentrace dusitanů ve vzorcích s obsahem dusitanového dusíku od 0 do 0,05 mg.l⁻¹.



Obr. 7 Kalibrační přímka stanovení dusitanového dusíku v kyvetě s optickou drahou 4 cm

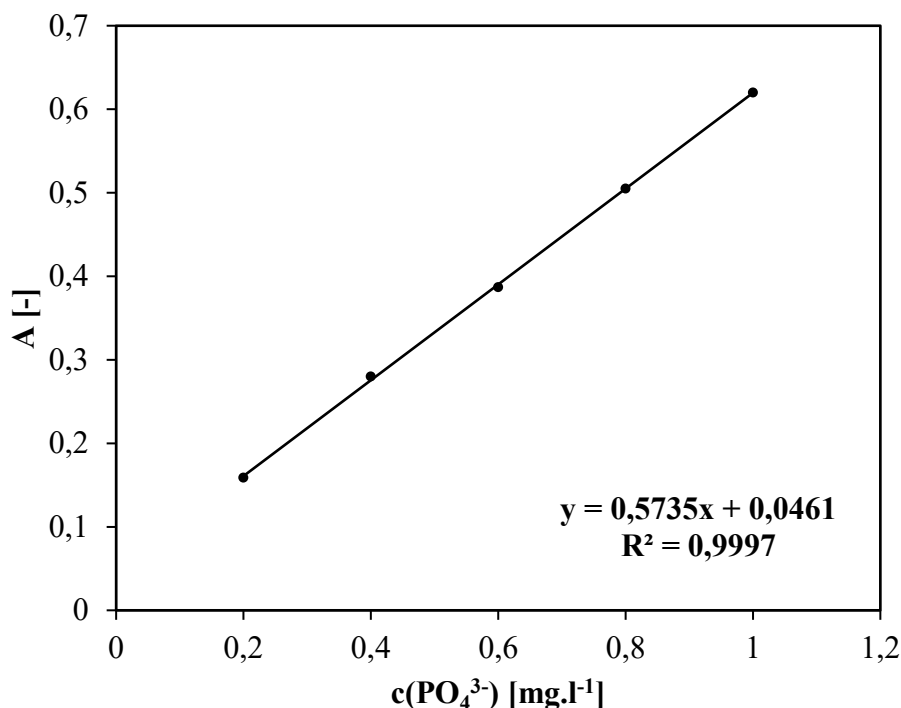
4.3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace fosforečnanových iontů

Stanovení obsahu fosforečnanových iontů bylo provedeno rovněž s využitím spektrofotometrické normované metody ČSN EN ISO 6878 (75 7465). Zde byla využita reakce fosforečnanových iontů v kyselém roztoku s obsahem iontů molybdenanu a antimonu za vzniku antimon-fosfomolybdenanového komplexu, který byl následně zredukován kyselinou askorbovou na intenzivně zbarvený komplex molybdenové modře.

K potřebám stanovení obsahu fosforečnanových iontů v jednotlivých vzorcích i kalibračních roztocích bylo připraveno směsné činidlo obsahující 25 ml 2,5M kyseliny sírové, 50 ml roztoku molybdenanu amonného (připraveného rozpuštěním 15 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml demineralizované vody), 25 ml vlnanu antimonylo-draselného (vzniklého rozpuštěním 0,68 g $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml demineralizované vody) a 50 ml kyseliny askorbové (připravené rozpuštěním 2,16 g kyseliny askorbové ve 100 ml demineralizované vody).

Obsah fosforečnanů v jednotlivých vzorcích a kalibračních roztocích byl stanovován ve 100ml Erlenmayerových baňkách, kam bylo odměřeno 50 ml vzorku s obsahem fosforečnanů do 1 mg.l^{-1} spolu s 5 ml směsného činidla. Po 15 minutách bylo vzniklé modré zbarvení měřeno proti demineralizované vodě na jednopaprskovém spektrofotometru

DR 6000 UV-VIS (Hach, SRN) při vlnové délce 690 nm ve skleněné kyvetě s optickou drahou 4 cm a jednotlivé výsledky byly vyhodnocovány z kalibrační přímky. Pro získání kalibrační přímky bylo připraveno a proměřeno pět kalibračních roztoků s rozsahem koncentrací fosforečnanového aniontu od 0,2 do 1 mg.l⁻¹ ředěním zásobního roztoku o koncentraci 500 mg.l⁻¹ fosforečnanů (KH₂PO₄, byl před vážením sušen 2 hodiny při 105 °C). Získaná kalibrační přímka je znázorněna na obr. 8.



Obr. 8 Kalibrační přímka stanovení koncentrace fosforečnanového aniontu

4.3.6 Stanovení koncentrace dusičnanových, síranových a fosforečnanových iontů pomocí iontové chromatografie

Ke stanovení dusičnanových, síranových a fosforečnanových iontů ve vzorcích z průtočné kolony byla využita iontová chromatografie s využitím stavebnicového chromatografu, jehož základem jsou díly firmy Shimadzu - chromatografická kolona (HEMA S 1000 Q-L, 150x3 mm, střední průměr částic 10 μm, Tessek), mobilní fáze (vodný roztok hydrogenuhličitanu a uhličitanu sodného s koncentrací každé složky 5 mmol/l, průtok 0,5 ml/min, jež byl zajišťován vysokotlakým čerpadlem LC-10AD, Shimadzu), vodivostní detektor CDD-6A (Shimadzu), potlačení vodivosti mobilní fáze na supresoru ERIS 1000 HP (Alltech), dávkovací ventil Rheodyne (pro nástřik 20 μl neředěného vzorku) a vyhodnocovací

software Clarity (DataApex), k čemuž byla použita metoda kalibrační přímky závislosti plochy chromatografických píků na koncentraci analytu.

Analýzy vzorků pomocí iontové chromatografie byly provedeny externě na pracovišti KAnT Univerzity Pardubice.

4.3.7 Stanovení pH, oxidačně-redukčního potenciálu a rozpuštěného kyslíku

Hodnoty pH byly měřeny potenciometricky pomocí kombinované elektrody, která byla připojená k přenosnému multimetru HQ 30d (Hach, SRN). Na stejném multifunkčním přístroji byly měřeny také hodnoty ORP, k čemuž byla využita příslušná ORP sonda (Hach, SRN). Hodnoty rozpuštěného kyslíku byly měřeny elektrochemicky s využitím membránové sondy Cyberscan DO 300 (Eutech Instruments, USA).

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vsádkové denitrifikační experimenty

Složení reakční směsi ve vsádkových experimentech připravených v první sérii bylo sledováno vždy od přidavku bakteriální suspenze do jednotlivých reakčních lahví. Ve druhé sérii vsádkových experimentů byla reakční směs analyzována až od závěrečného přidavku 900 ml roztoku dusičnanu sodného do reakční směsi.

Z každé vsádkové reakční nádoby byl nejprve odebrán počáteční vzorek a poté byly vzorky odebírány každých sedm dní. Ve vzorcích bylo stanovováno množství dusičnanových, dusitanových a případně fosforečnanových iontů. Celkový dusík byl dopočítán jako součet obsahu dusičnanového a dusitanového dusíku. Zároveň byly kontrolně měřeny hodnoty pH, oxidačně-redukčního potenciálu a obsah rozpuštěného kyslíku. Množství odebraného vzorku záviselo na množství prováděných analýz a na ředění vzorku během těchto analýz.

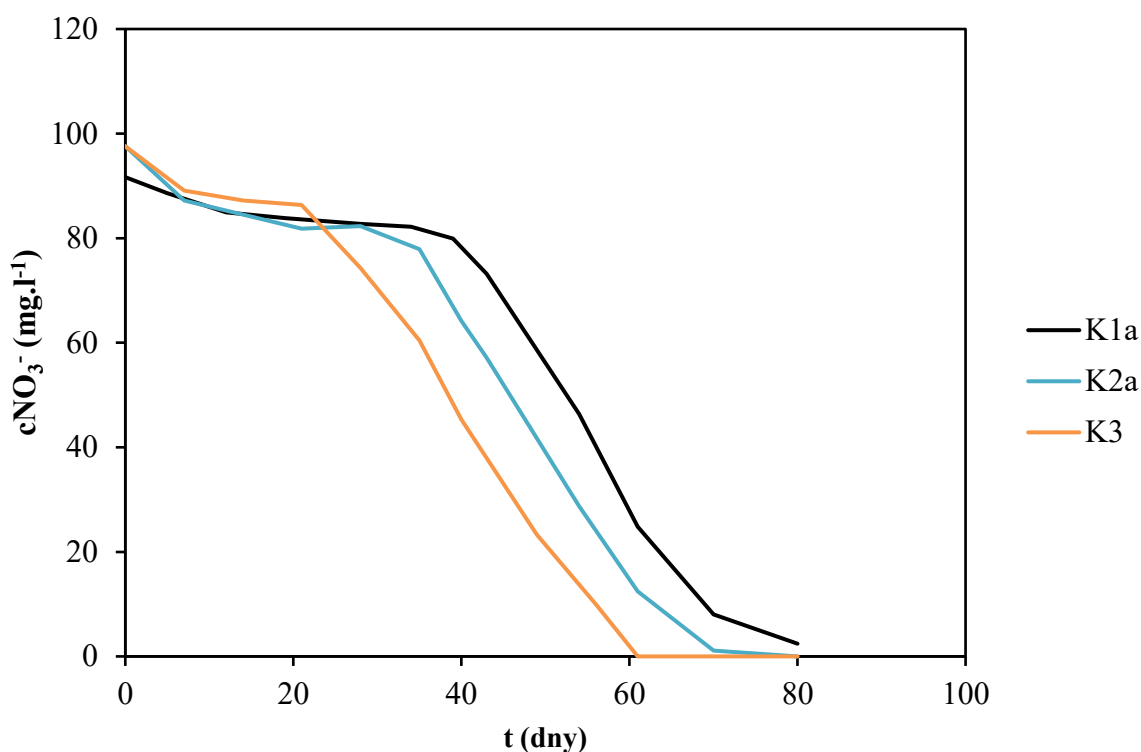
Z naměřených dat byly vyhodnoceny vlivy řady procesních faktorů na průběh autotrofní denitrifikace. Jednalo se o vliv teploty (22 a 33 °C), velikosti použité frakce, míchání reakční směsi (nemíchané nádoby oproti směsím, které byly po celou dobu experimentu míchány na třepače při 150 rpm) a vliv přidavku fosforu a trojmocného železa v různých koncentracích.

5.1.1 Kontrolní směsi

Nejprve byly popsány a vyhodnoceny procesy probíhající ve vsádkových reakčních nádobách označených jako K1a,b K2a,b a K3, které jsou dále označovány jako kontrolní reakční směsi, do nichž nebyla přidávána žádná aditiva. Všechny reakční nádoby obsahovaly síru a vápence v hmotnostním poměru 1:1 (velikost frakce síry 2,5 – 5,0 mm, střední velikost částic 3,54 mm a vápence 3,0 – 4,0 mm se střední velikostí částic 3,46 mm), 1 l sterilního roztoku dusičnanu sodného (koncentrace 100 mg.l⁻¹ dusičnanových iontů) a 1 ml bakteriální suspenze *T. denitrificans*. Reakční nádoby K1 obsahovaly po 50 g síry a vápence, nádoby K2 po 100 g síry a vápence a nádoba K3 po 200 g síry a vápence (viz Tab. 9).

Na Obr. 9 je zobrazen obsah dusičnanů ve všech reakčních nádobách v průběhu experimentu, který trval celkem 80 dní. V první náběhové fázi experimentu je patrný pozvolný úbytek koncentrace dusičnanových iontů ve všech reakčních směsích. To může být způsobeno dvěma faktory. První z nich je označován jako tzv. lag fáze, kdy dochází k přizpůsobování buněk mikroorganismů novému prostředí¹¹⁴. Druhým faktorem je přítomnost molekulárního kyslíku v reakční směsi. Na počátku všech experimentů byla v reakčních směsích naměřena koncentrace rozpuštěného kyslíku přibližně 5,9 mg.l⁻¹. Přítomnost kyslíku má jako terminální

akceptor elektronů při metabolických dějích *T. denitrificans* přednost před dusičnanovými ionty^{86,87}. K výrazné redukci dusičnanů za těchto podmínek tedy nedochází. Jakmile je však kyslík z reakční směsi vyčerpán a je splněna podmínka anoxického prostředí (koncentrace rozpuštěného kyslíku pod 0,5 mg.l⁻¹) a zároveň jsou bakteriální buňky adaptované na nové prostředí, dochází k významnější redukci dusičnanů, která pokračuje až do prakticky nulové hodnoty.



Obr. 9 Obsah dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách K1a (50 g S), K2a (100 g S) a K3 (200 g S)

Nejkratší náběhová fáze a tedy i nejrychleji započatá významnější redukce dusičnanů byla pozorována ve vsádkové reakční nádobě s označením K3, v níž bylo použito největší množství síry a vápence (po 200 g) a poté v nádobě K2a (po 100 g použité síry a vápence). Nejpomaleji tyto děje proběhly v nádobě K1a, kde bylo použito nejmenší množství síry a vápence (po 50 g). Z naměřených dat (viz též Tab. 13) tedy vyplývá, že na dobu adaptace bakteriálních buněk může mít vliv i množství použité náplně, tedy pro náplň o stejné střední velikosti částic, zprostředkovaně velikost reakčního povrchu. Koncentrace dusičnanů v reakčních systémech poklesla v rámci náběhové fáze o 15 až 22 %. Přitom doba náběhové fáze činila 34 až 51 % celkové doby experimentu. Doba odbourávání zbývajících

dusičnanových iontů po proběhnutí lag fáze byla blízká 40 dnům (Tab. 13). Téměř přímkový průběh poklesové části naměřené křivky (Obr. 9) naznačuje, že rychlost reakce nezávisí, s výjimkou extrémně nízkých koncentrací, na koncentraci dusičnanových iontů, což je typické pro reakce pseudonultého řádu popsané rovnicí

$$\frac{d(cNO_3^-)}{dt} = k \quad (29)$$

Hodnoty reakčních konstant k získané regresí experimentálních dat jsou též uvedeny v Tab. 13. Reakce nultého řádu jsou typické pro systémy, kde je reakční prostředí, v našem případě aktivní povrch síry, plně nasyceno reaktantem. Poločas reakce odbourání dusičnanových iontů $t_{1/2}$ pak lze stanovit z rovnice

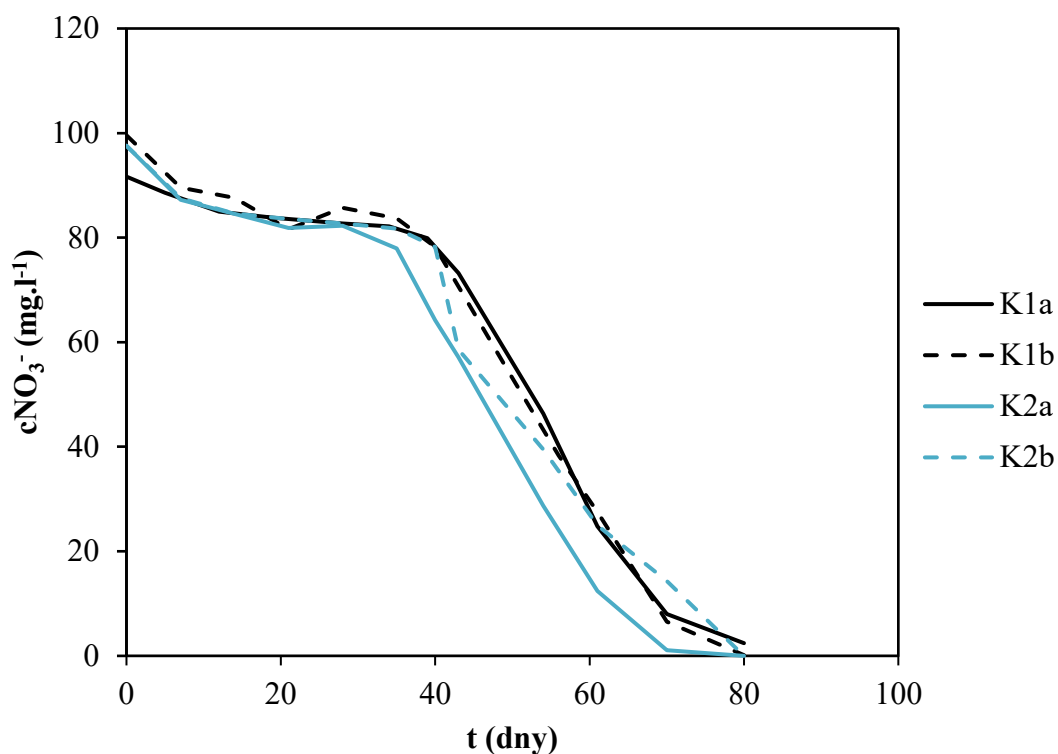
$$t_{1/2} = \frac{[cNO_3^-]_0}{2 \cdot |k|} \quad (30)$$

Kde index 0 značí počáteční koncentraci reakce nultého řádu, tj. na konci náběhové fáze.

Tab. 13 Odbourávání dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách (k je reakční konstanta pseudonultého řádu)

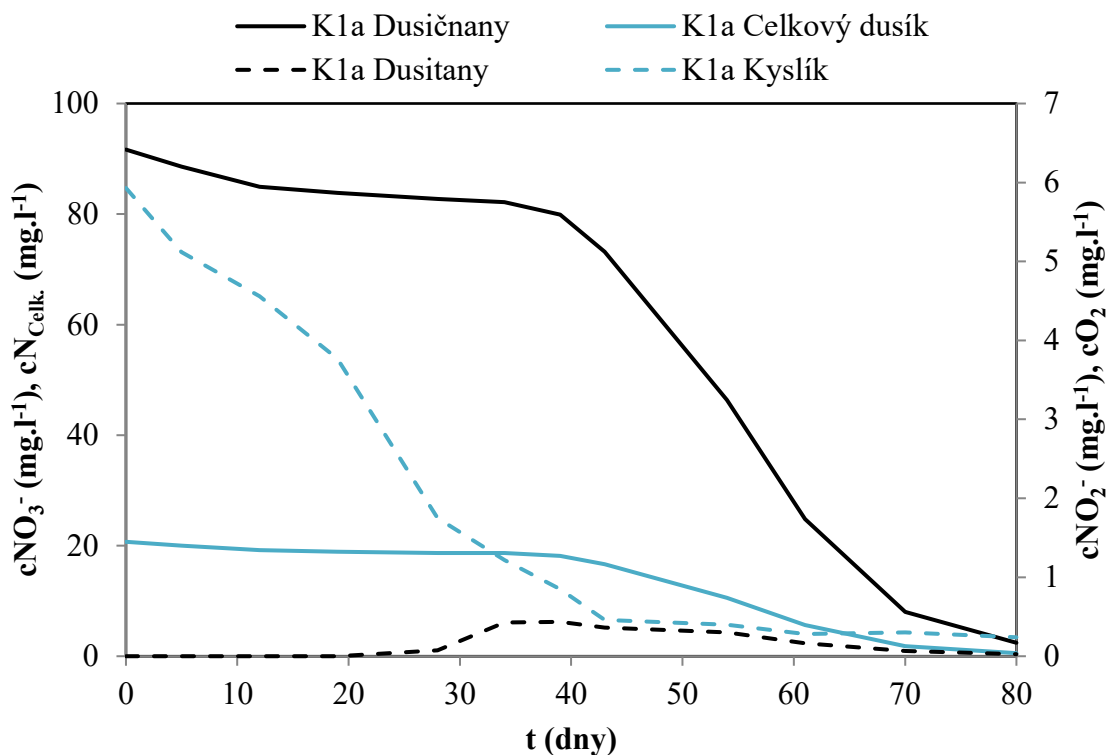
Reakční systém	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
	Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K1a	42	82	75	-1,88
K2a	35	73	78	-2,05
K3	21	61	86	-2,15

Kvůli ověření reprodukovatelnosti měření byly experimenty v reakčních nádobách K1 a K2 připraveny duplicitně (tj. dva reaktory označené K1a a K1b, resp. K2a a K2b se stejným počátečním složením). Na Obr. 10 je zobrazený obsah dusičnanů během experimentů v těchto čtyřech reaktorech. Z průběhu experimentů je zřejmá velmi dobrá reprodukovatelnost měření v reakčních nádobách K1a a K1b. Zdvojené měření v nádobách K2a a K2b vykazuje větší rozptyl experimentálních dat, nicméně potvrzuje výše zmíněné kvalitativní závěry.



Obr. 10 Obsah dusičnanů v kontrolních reakčních nádobách K1a (50 g S), K1b (50 g S), K2a (100 g S) a K2b (100 g S)

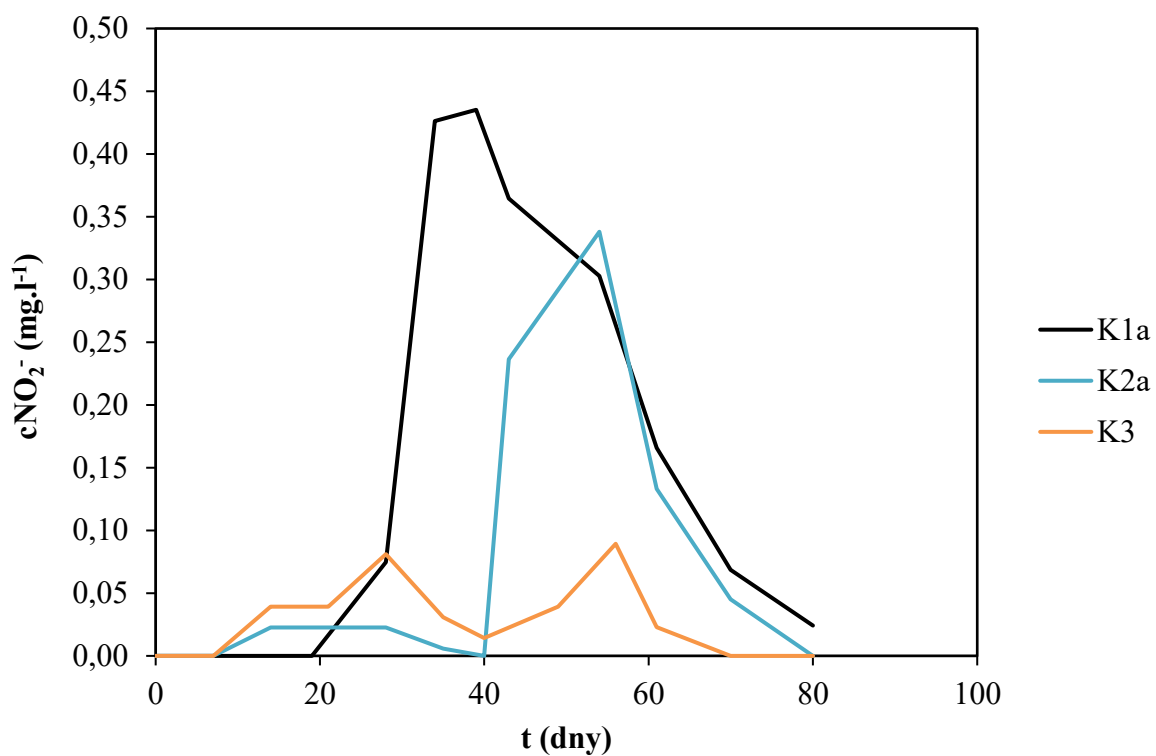
Typický průběh redukce dusičnanů je detailněji demonstrován na Obr. 11 pro systém K1a jako záznam koncentrace dusičnanů, dusitanů, celkového dusíku a obsahu rozpuštěného kyslíku během celého experimentu. Hodnoty celkového dusíku byly vypočteny jako součet koncentrace dusičnanového a dusitanového dusíku. Z obrázku je patrné, že v reakční směsi se v souvislosti s náběhem degradačního procesu začínají objevovat dusitanové ionty jako meziprodukt rozkladné reakce. Přitom koncentrace dusitanů nejprve pozvolna vzrůstá, pak dosahuje plochého maxima a v závěru experimentu se stejně jako koncentrace dusičnanových iontů blíží k nule. To znamená, že následná redukce dusitanů je pomalejší než primární redukce dusičnanů, a tak dochází k jejich nežádoucímu hromadění v reakčním systému. Je však třeba poznamenat, že koncentrace dusitanových iontů byla v průběhu celého procesu cca o dva řády nižší než koncentrace dusičnanových iontů.



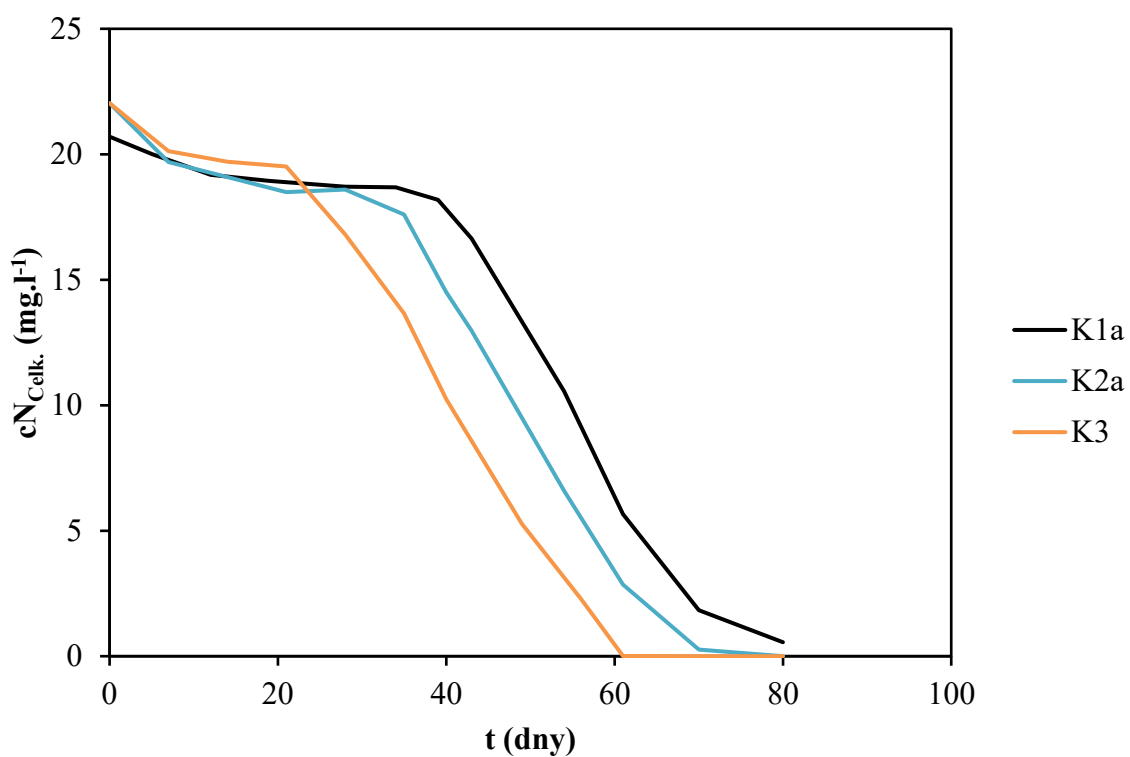
Obr. 11 Vývoj koncentrace dusičnanů, dusitanů, celkového dusíku a rozpuštěného kyslíku v reakční nádobě K1a (50 g S)

Koncentrace dusitanových iontů v jednotlivých reakčních systémech během celého experimentu je zobrazena na Obr. 12. Nejvyšší maximální koncentrace dusitanů byla stanovena v systému K1a. Tedy v případě, v němž byla použita nejmenší navážka síry a vápence (po 50 g). Nižší množství dusitanů bylo nahromaděno v lahvích K2a a K2b (reakční nádoby se sírou a vápencem po 100 g) a nejnižší maximální koncentrace dusitanů byla stanovena v reakční nádobě K3. Tato koncentrace dusitanových iontů nepřesáhla hodnotu $0,089 \text{ mg.l}^{-1}$, zatímco v reakční nádobě K1a byla maximální koncentrace nahromaděných dusitanů 4,5 krát vyšší a přesahovala hodnotu $0,400 \text{ mg.l}^{-1}$.

Změny koncentrace celkového dusíku při experimentech v kontrolních vsádkových reakčních nádobách jsou zobrazeny na Obr. 13. Z grafu je patrné, že kvalitativně jsou průběhy naměřených závislostí obdobné jako u časových změn koncentrací dusičnanů. Je tedy zřejmé, že koncentrace přebývajících meziproductů jsou velmi nízké a téměř neovlivňují celkovou bilanci dusíku. Na druhou stranu, s ohledem na vyšší potenciální toxicitu dusitanových iontů, mohou i tyto jejich nízké koncentrace limitovat případné průmyslové nasazení studovaného procesu.



Obr. 12 Časové změny koncentrace dusitanů v kontrolních reakčních nádobách K1a (50 g S), K2a (100 g S) a K3 (200 g S)



Obr. 13 Změny obsahu celkového dusíku v kontrolních reakčních nádobách K1a (50 g S), K2a (100 g S), a K3 (200 g S)

Během experimentů ve vsádkových reaktorech bylo rovněž pravidelně kontrolováno pH, neboť rozkladná reakce je provázena produkcí H^+ iontů (viz rovnice 22 až 27). Přitom při poklesu pH pod hodnotu 5,5 dochází k zastavení denitrifikačních procesů⁶. Experimenty prokázaly, že přidavek neutralizačního činidla - vápence v poměru 1:1 k množství síry je dostatečný. Hodnoty pH se pohybovaly během všech experimentů v rozmezí od 7,0 do 7,7.

5.1.2 Vliv fosforu na průběh autotrofní denitrifikace

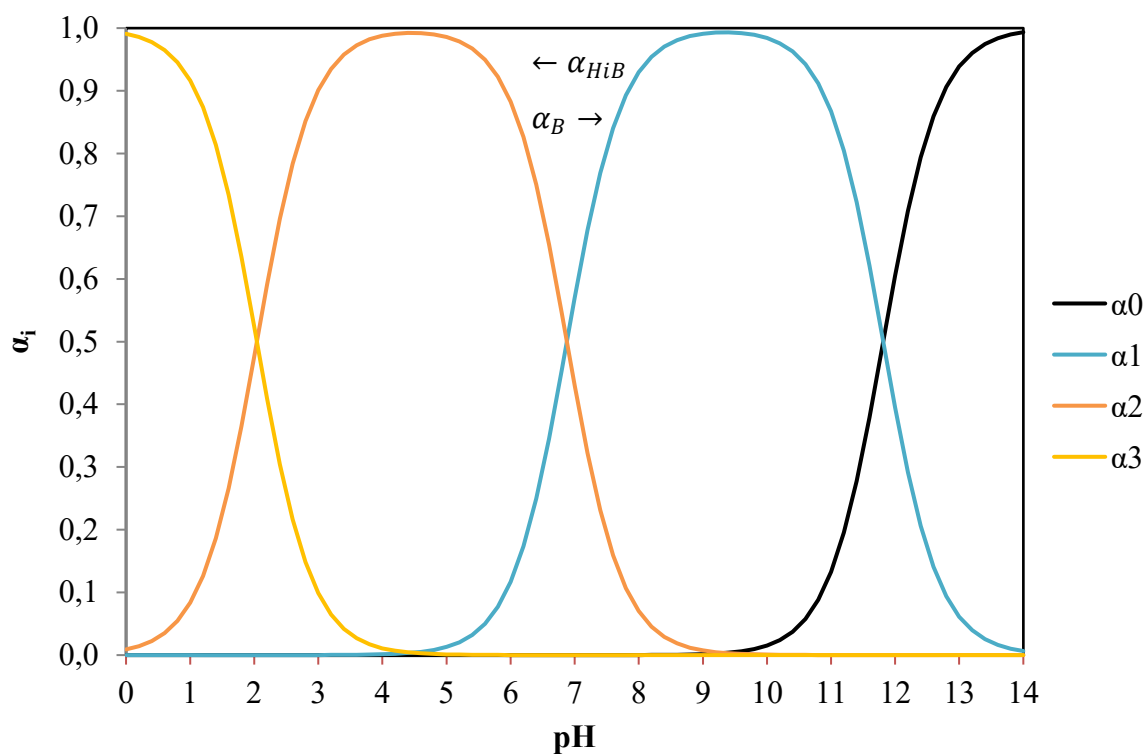
Fosfor je jedním z hlavních biogenních prvků a účastní se metabolicky významných dějů v živých buňkách. Například v tekutém médiu S6 doporučeném pro růst *T. denitrificans* je fosfor přítomen v koncentraci přibližně 3 g/l živného roztoku. V posledních letech se navíc, zejména v souvislosti s využíváním hnojiv a pracích prostředků, významně zvyšuje koncentrace fosforu téměř ve všech typech vod, které by mohly být autotrofní denitrifikací zpracovávány. Proto byl experimentálně studován vliv přídatků fosforu (ve formě NaH_2PO_4) na průběh autotrofní denitrifikační reakce.

Pro tuto sadu experimentů bylo připraveno celkem devět reakčních směsí označených P1 až P9 s navázkou síry a vápence po 50, 100 a 200 g (vždy v poměru 1:1) a různou počáteční koncentrací dihydrogen fosforečnanu sodného o koncentracích odpovídajících množství fosforu v rozmezí od 0,5 do 3,0 $mg.l^{-1}$. Složení reakčních směsí P1 až P9 je shrnuto v Tab. 9.

Kromě buněk a vlastního denitrifikačního procesu může přidavek fosforečnanových iontů ovlivňovat i neutralizační funkci přítomného uhličitanu vápenatého (vápence), a to tím, že by mohlo potenciálně docházet ke srážení fosforečnanu vápenatého na povrchu granulí vápence. Část volných vápenatých iontů se obvykle sráží jako síran vápenatý. Zastoupení jednotlivých forem fosforečnanu vápenatého v závislosti na hodnotě pH směsi je znázorněno na Obr. 14 převzatém ze zdroje¹¹⁵.

Doporučovaná hodnota pH pro optimální růst *T. denitrificans* je v rozmezí od 6,8 do 7,4. Během prováděných experimentů se pH pohybovalo v rozmezí hodnot 6,8 - 7,6. Z Obr. 14 je patrné, že při hodnotě pH 6,8 by mělo být v roztoku 45,5 % hydrogen fosforečnanu a 54,5 % dihydrogenfosforečnanu. Nejvyšší naměřená hodnota pH byla 7,6, při které je v roztoku přítomno 84,1 % hydrogen fosforečnanu a 15,9 % dihydrogen fosforečnanu. Fosforečnan, který je jako fosforečnan vápenatý ve vodě prakticky nerozpustný, se začíná tvořit až při pH 9,5, tedy při podmínkách mimo rozsah provedených experimentů. Dihydrogenfosforečnan vápenatý má za podmínek prováděných experimentů rozpustnost vysokou a rovnou téměř 20 g/l vody. Zároveň bude v roztoku přítomen i dihydrogen fosforečnan sodný (rozpustnost 600 g/l vody), resp. hydrogen fosforečnan sodný. Během všech prováděných experimentů nebylo pozorováno

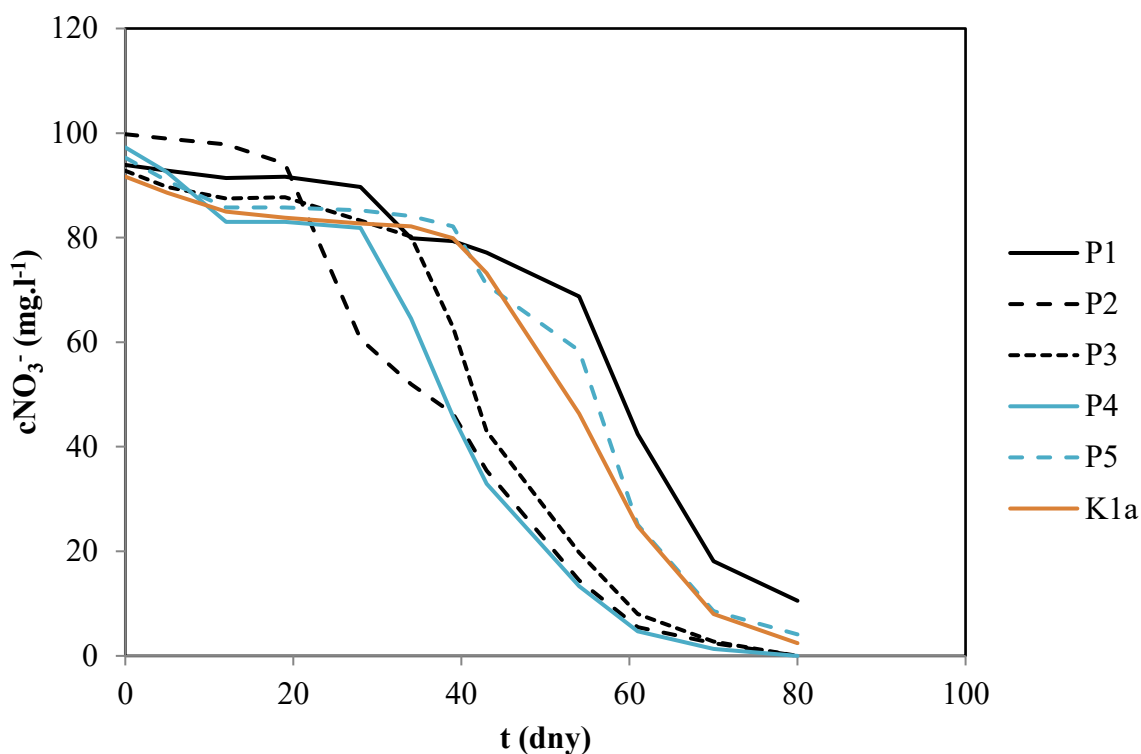
přerušení regulační úlohy vápence, protože nedošlo k nárůstu pH nad hodnotu 9,5. Případnou tvorbu nerozpustných fosforečnanů na povrchu vápence lze tedy zanedbat.



Obr. 14 Distribuce fosforečnanu, hydrogen fosforečnanu a dihydrogen fosforečnanu vápenatého v závislosti na hodnotě pH¹¹⁵ (trihydrogen – žlutá, dihydrogen – oranžová, hydrogen – modrá a fosforečnan – černá křivka)

Na Obr. 15 je zobrazen časový průběh koncentrace dusičnanových iontů v reakčních nádobách označených P1 až P5. Reakční směsi obsahovaly 50 g síry a na počátku experimentů se lišily pouze v množství nadávkovaného fosforu. Celkem byly tyto vsádkové reakce pozorovány po dobu 80 dní.

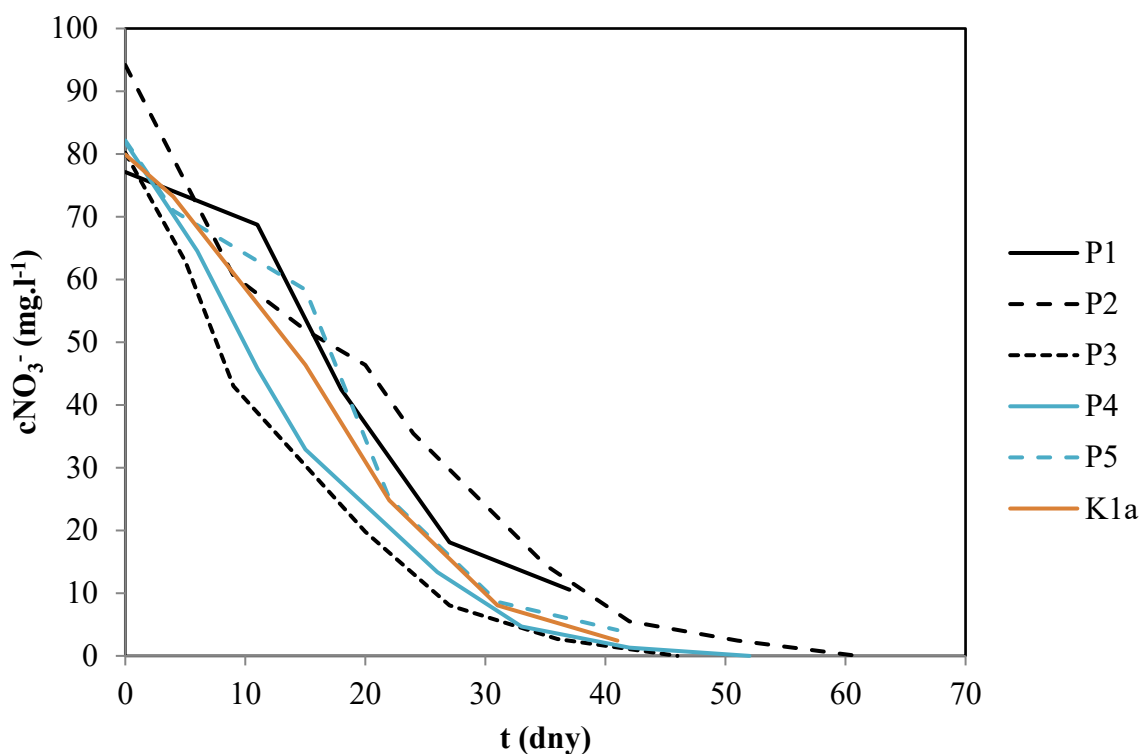
Délka náběhové fáze tvořila 24 až 54 % doby experimentu a bylo při ní odbouráno 6 až 23 % dusičnanů. Z naměřených dat (viz Obr. 15 a Tab. 14) však není patrný jednoznačný vliv obsahu přidaného fosforu na délku této náběhové fáze (viz též Tab. 14). Ukazuje se, že náhodné vlivy dané počátečním obsahem kyslíku v reakční směsi a adaptabilitou mikroorganismů na nové prostředí jsou výraznější než vliv množství fosforu přidaného do reakční směsi.



Obr. 15 Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s 50 g S. Zde P1 (0,5 mg.l⁻¹ P), P2 (1,0 mg.l⁻¹ P), P3 (1,5 mg.l⁻¹ P), P4 (2,0 mg.l⁻¹ P), P5 (3,0 mg.l⁻¹ P) a K1a (0 mg.l⁻¹ P)

Časový průběh poklesu koncentrace dusičnanů v reakční směsi ve fázi denitrifikace, tj. po odečtení náběhové fáze v jednotlivých reakčních systémech, je znázorněn na Obr. 16.

Typické parametry vyhodnocené z naměřených dat jsou shrnuty též v Tab. 14. Je patrné, že i průběh vlastní autotrofní denitrifikace charakterizovaný rychlostní konstantou k není systematicky ovlivňován množstvím fosforu v reakční směsi a k popisu chování systému lze ve všech případech použít střední hodnotu (medián) rychlostní konstanty $k = -1,708 \text{ mg.l}^{-1}\text{den}^{-1}$. Aritmetický průměr získaných rychlostních konstant k v Tab. 14 činí $-1,716 \text{ mg.l}^{-1}\text{den}^{-1}$, rozptyl je $0,014 \text{ mg.l}^{-1}\text{den}^{-1}$ a směrodatná odchylka je $0,116 \text{ mg.l}^{-1}\text{den}^{-1}$.



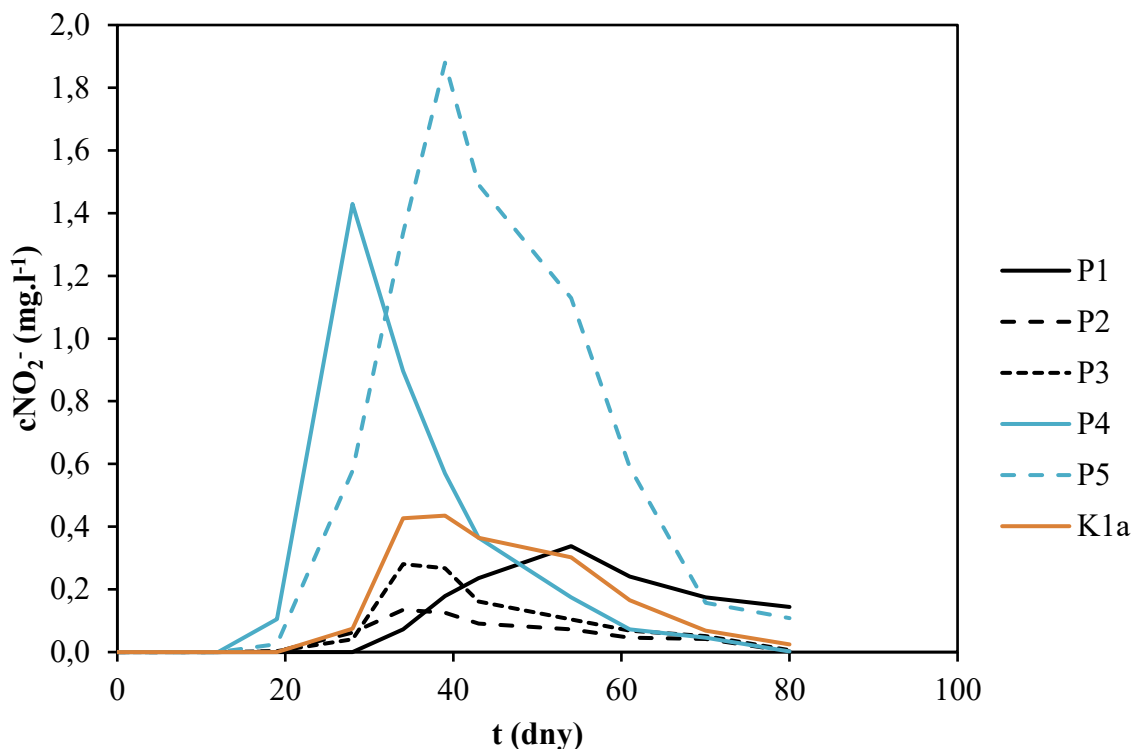
Obr. 16 Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci bez lag fáze v systémech s 50 g S. Zde P1 (0,5 mg.l⁻¹ P), P2 (1,0 mg.l⁻¹ P), P3 (1,5 mg.l⁻¹ P), P4 (2,0 mg.l⁻¹ P), P5 (3,0 mg.l⁻¹ P) a K1a (0 mg.l⁻¹ P)

Tab. 14 Odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem fosforu v systémech s 50 g S (*k* je reakční konstanta pseudonultého řádu)

Reakční systém	c P [mg.l ⁻¹]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	<i>k</i> [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K1a	0	42	82	75	-1,88
P1	0,5	43	93	77	-1,54
P2	1,0	19	76	94	-1,65
P3	1,5	34	77	80	-1,86
P4	2,0	28	73	82	-1,82
P5	3,0	39	87	82	-1,71

Vliv přidavku fosforu na změny koncentrace dusitanových iontů během experimentů v systémech P1 až P5 je zobrazen na Obr. 17. Stejně jako v kontrolních experimentech je patrné nežádoucí hromadění dusitanových iontů ve všech pěti testovaných směsích. Přitom až do koncentrace fosforu 1,5 mg.l⁻¹ jsou koncentrace dusitanů nízké a srovnatelné s kontrolní

experimentem K1a a nepřevyšují hodnotu $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Vysoké koncentrace nežádoucích dusitanů byly zaznamenány v reakčních směsích P4 a P5 ($2,0$ a $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ fosforu, kdy koncentrace dusitanů převyšují $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$).



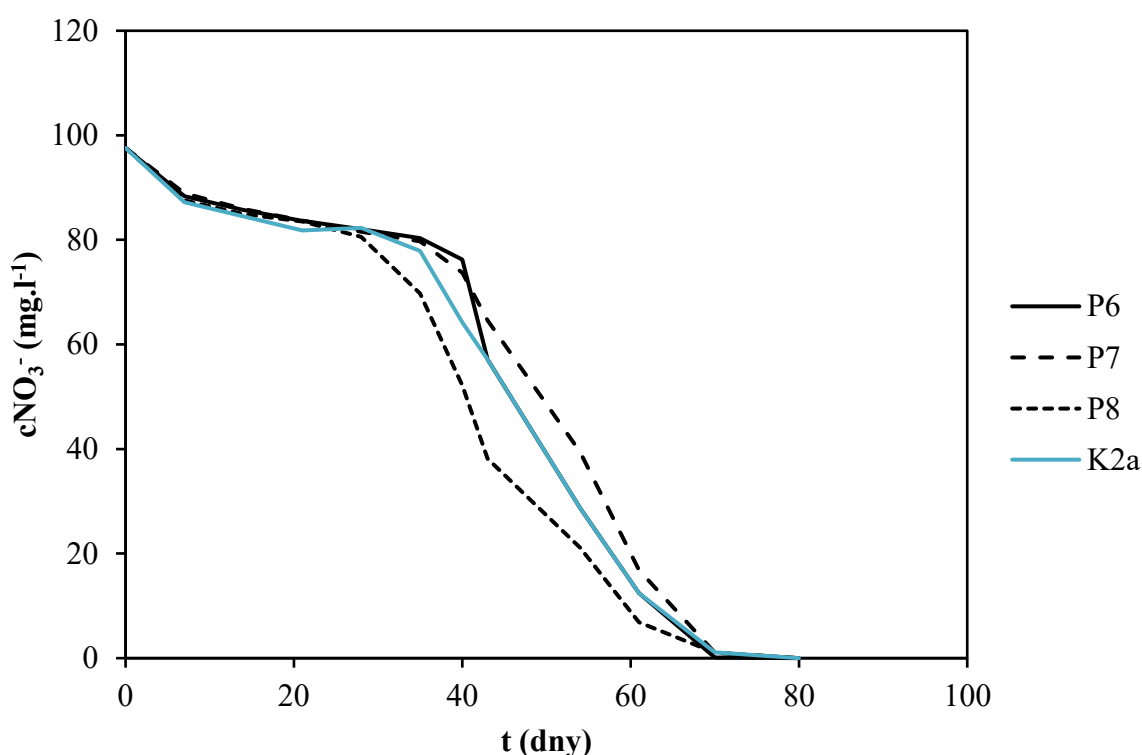
Obr. 17 Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách P1 ($0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ P), P2 ($1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ P), P3 ($1,5 \text{ mg.l}^{-1}$ P), P4 ($2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ P), P5 ($3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ P) a K1a (0 mg.l^{-1} P)

Další sada experimentů (P6 až P9) byla zaměřena na studium vlivu přídavku fosforu do systémů s vyšším množstvím síry v reakční směsi (100 a 200 g S). Reakční nádoby označené P6 až P8 obsahovaly po 100 g síry a vápence (opět v hmotnostním poměru $1:1$) a koncentrace přidaného fosforu byla na počátku experimentů v nádobě P6 $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, P7 $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a v reaktoru P8 $1,5 \text{ mg.l}^{-1}$. V reakční nádobě P9 bylo na počátku experimentu po 200 g síry a vápence (rovněž ve hmotnostním poměru $1:1$) a $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ fosforu.

Na Obr. 18 je zobrazen záznam koncentrace dusičnanů v průběhu experimentu (který trval rovněž 80 dní) v připravených reakčních nádobách P6 až P8. Ze záznamu není, stejně jako v systémech s 50 g S , patrný jednoznačný vliv přidané koncentrace fosforu na dobu náběhové fáze.

Tab. 15 Odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem fosforu; 100 g S (P6-P8) a 200 g S (P9) (k je reakční konstanta pseudo nultého řádu)

Reakční systém	c P [mg.l ⁻¹]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K2a	0	28	70	82	-1,95
P6	0,5	35	70	80	-2,29
P7	1,0	35	70	80	-2,29
P8	1,5	28	70	82	-1,95
P9	1,0	35	70	81	-2,31

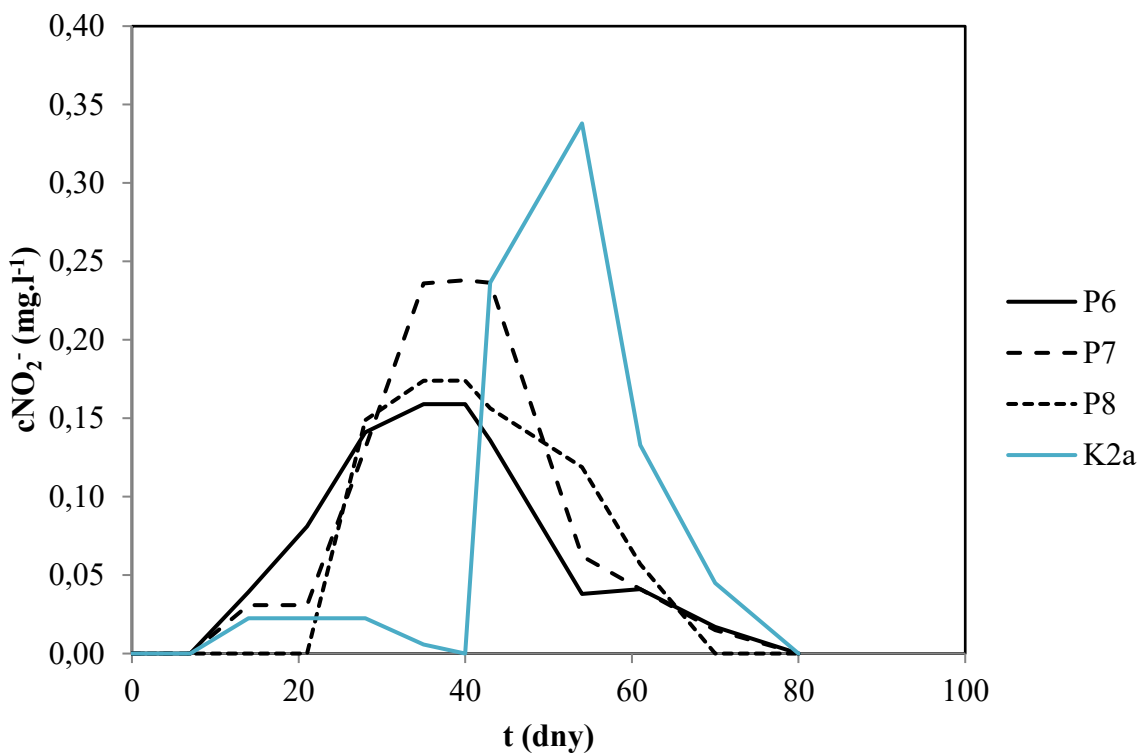


Obr. 18 Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech se 100 g S. Zde P6 (0,5 mg.l⁻¹ P), P7 (1,0 mg.l⁻¹ P), P8 (1,5 mg.l⁻¹ P) a K2a (0 mg.l⁻¹ P)

Z parametrů uvedených v Tab. 15 vyhodnocených z naměřených dat je patrné, že ani redukce dusičnanů není ovlivňována koncentrací fosforu, a to ve všech testovaných systémech s různou hmotností síry.

Oproti tomu, je patrný vliv přidaného fosforu na vznik a následnou redukci dusitanových iontů. Časový záznam koncentrace dusitanů během experimentu je zobrazen na Obr. 19. V reakčních nádobách označených P6 a P8 nepřekročily koncentrace dusitanů

hodnoty $0,179 \text{ mg.l}^{-1}$. V nádobě P7, který obsahoval na začátku experimentu $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ fosforu, byla nejvyšší naměřená hodnota koncentrace dusitanů $0,248 \text{ mg.l}^{-1}$.



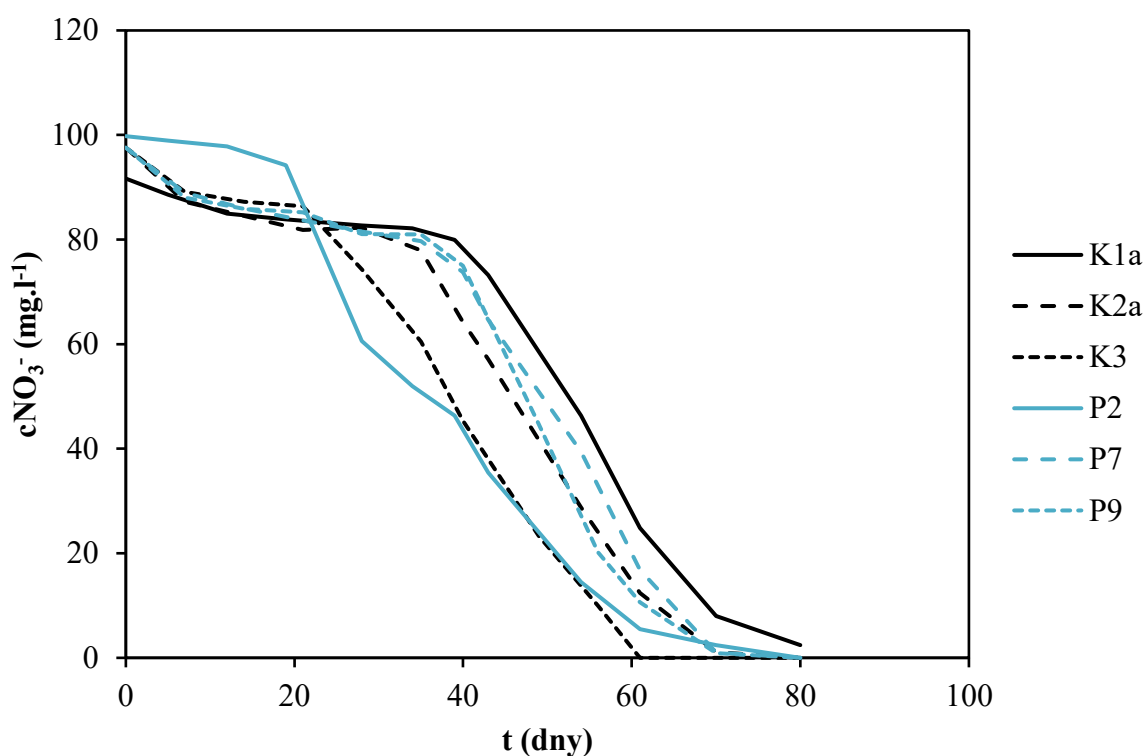
Obr. 19 Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách P6 ($0,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ P}$), P7 ($1,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ P}$), P8 ($1,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ P}$) a K2a ($0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ P}$)

Na Obr. 20 je zaznamenáno porovnání obsahu dusičnanů v reakčních nádobách K1a, K2a, K3, P2, P7 a P9 a na Obr. 21 porovnání změn obsahu dusitanů v týchž reakčních nádobách. Jedná se o systémy lišící se v navážce síry s vápencem (po 50, 100 nebo 200 g) a zároveň mají nádoby označené písmenem P navíc obsah fosforu $1,0 \text{ mg.l}^{-1}$ (viz Tab. 9). V Tab. 16 jsou pak uvedeny vyhodnocené parametry z naměřených hodnot v těchto reakčních nádobách. Jak je z obrázků patrné (Obr. 20 a 21), větší obsah síry průběh redukce dusičnanů, ani dusitanů nijak výrazně neovlivnil.

Experimenty zaměřené na studium vlivu fosforu na denitrifikační procesy ukázaly, že při jeho přidavku v koncentracích od $0,5$ do $3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ do testovaného systému není doba náběhová fáze nijak ovlivněna. Rovněž není nijak výrazně ovlivněno ani odbourávání dusičnanů.

Tab. 16 Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem a bez přidavku fosforu (k je reakční konstanta pseudonultého řádu)

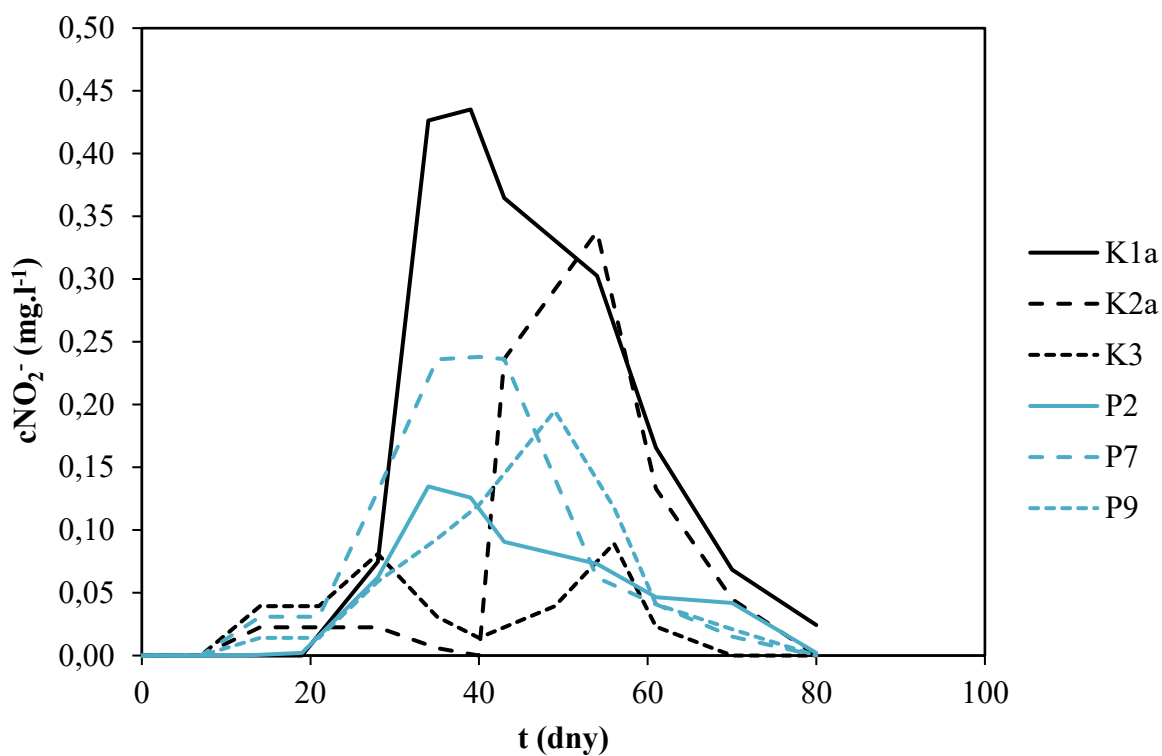
Reakční systém	c P [mg.l ⁻¹]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K1a	0	42	82	75	-1,88
P2	1,0	19	76	94	-1,65
K2a	0	28	70	82	-1,95
P7	1,0	35	70	80	-2,29
K3	0	21	61	86	-2,15
P9	1,0	35	70	81	-2,31



Obr. 20 Vliv dávkovaného fosforu na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s různou koncentrací S a s přidavkem P 1,0 mg.l⁻¹. Zde K1a (50 g S), K2a (100 g S), K3 (200 g S), P2 (50 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P), P7 (100 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P) a P9 (200 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P)

Naproti tomu se zdá být patrný vliv při odbourávání vznikajících dusitanů, a to při dávkování vyšších koncentrací fosforu – jakmile byla do systému s 50 g S dávkována koncentrace fosforu 2,0 a 3,0 mg.l⁻¹ (reakční nádoby P4 a P5), činily hodnoty naměřených koncentrací dusitanů v nádobě P4 1,429 mg.l⁻¹ a v nádobě P5 dokonce 1,880 mg.l⁻¹. Jedná se

o hodnoty, které překračují povolený limit pro obsah dusitanů v pitné vodě v České republice stanovený příslušnou vyhláškou⁷.



Obr. 21 Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách K1a (50 g S), K2a (100 g S), K3 (200 g S), P2 (50 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P), P7 (100 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P) a P9 (200 g S a 1,0 mg.l⁻¹ P)

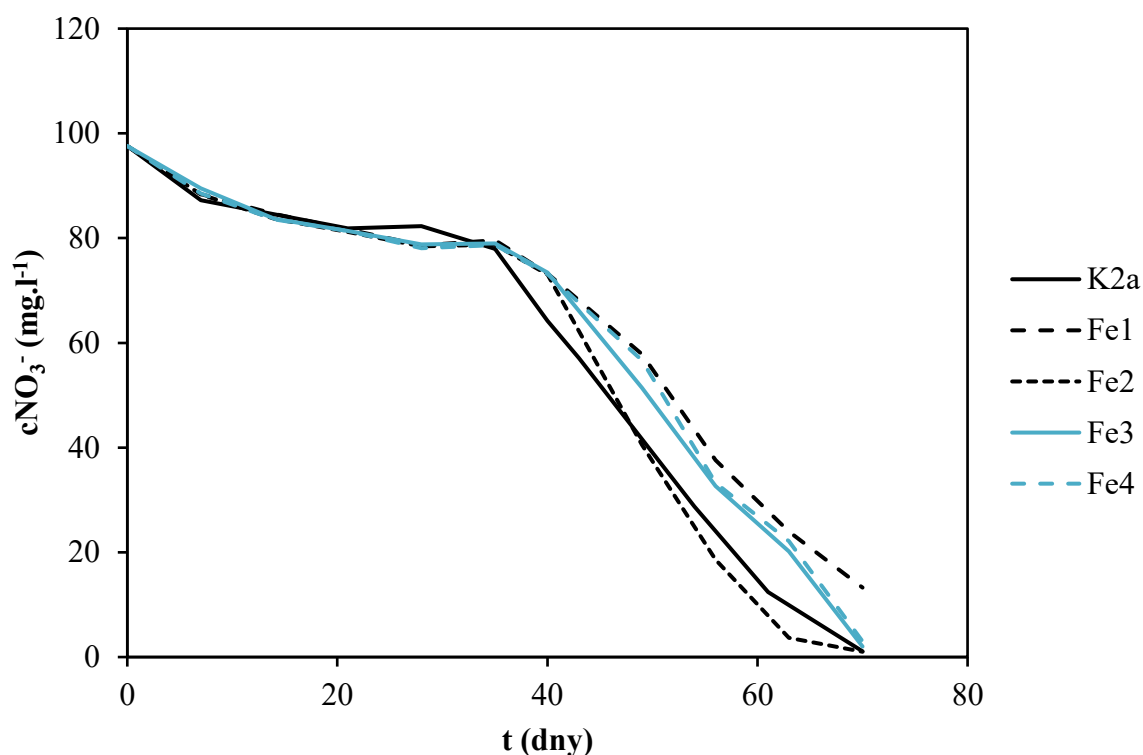
5.1.3 Vliv železitých iontů na průběh autotrofní denitrifikace

Železo patří mezi biogenní prvky, ale nevyskytuje se v živých organismech v takové míře, jako již zmiňovaný fosfor. Proto bývá často označováno jako stopový biogenní prvek. V autotrofních denitrifikačních systémech se může železo vyskytovat jako čistý kov, nebo dvojmocný, či trojmocný kationt.

Straub a kol. publikovali práci, ve které studovali autotrofní redukci dusičnanů v přítomnosti železnatých iontů¹⁰⁷. Prokázali, že čistá kultura bakterií redukujících dusičnany může růst v anaerobním prostředí obsahujícím železnaté ionty, které jsou buď jediným elektronovým donorem, nebo jedním ze skupiny elektronových donorů. Vliv Fe⁰ na kombinovaný proces heterotrofní a autotrofní denitrifikace byl popsán v kapitole 2.2.3.3. Železo je také součástí doporučených živných médií pro bakterie *T. denitrificans*. Ve formě

FeSO₄·7H₂O obsahují železo živná média k pěstování rodu *Thiobacillus* a ve formě FeCl₃ média pro růst konkrétně *T. denitrificans*.

Vyhláškou č. 70/2018 Sb. jsou v České republice povoleny maximální hygienické limity pro obsah železa v pitné vodě 0,2 mg.l⁻¹ ⁷. Rozpuštěné železo je přítomno v kyselých a neutrálních vodách bohatých na kyslík jako trojmocný kationt Fe³⁺. V řekách je možné najít železo v koncentraci obvykle mezi 0,5 a 1,0 mg.l⁻¹. Podzemní vody mohou obsahovat vyšší koncentrace, a to až do 100 mg.l⁻¹. Odpadní vody tedy mohou kromě vyšších koncentrací dusičnanových iontů obsahovat i zvýšené koncentrace Fe³⁺ iontů, proto je tato část experimentů zaměřena na studium vlivu přídavek železa ve formě FeCl₃ na průběh autotrofní denitrifikace. Byl studován ve čtyřech připravených reakčních směsích označených Fe1 až Fe4 po dobu 70 dní. Reakční nádoby obsahovaly po 100 g síry a vápence (v hmotnostním poměru 1:1) a různou počáteční koncentraci železa v rozmezí od 0,05 do 1,0 mg.l⁻¹. Složení jednotlivých reakčních systémů je shrnuto v Tab. 9.



Obr. 22 Vliv dávkovaného železa na změny koncentrace dusičnanů při autotrofní denitrifikaci v systémech s přídávkem Fe³⁺. Zde Fe1 (0,05 mg.l⁻¹ Fe³⁺), Fe2 (0,1 mg.l⁻¹ Fe³⁺), Fe3 (0,5 mg.l⁻¹ Fe³⁺), Fe4 (1,0 mg.l⁻¹ Fe³⁺) a K2a (0 mg.l⁻¹ Fe³⁺)

Na Obr. 22 jsou zobrazeny změny koncentrace dusičnanů ve všech reakčních nádobách obsahujících přidané Fe^{3+} ionty. Z obrázku není patrný přímý vliv koncentrace železitých iontů na délku náběhové fáze, která činila téměř polovinu doby trvání experimentu (tj. 35 dní) a při níž bylo odbouráno přibližně 19 % původně dávkovaných dusičnanů. Ukazuje se, že stejně jako u fosforu i v případě přidaného železa do systému jsou náhodné vlivy dané počátečním obsahem kyslíku v reakční směsi a adaptabilitou mikroorganismů na nové prostředí výraznější, než vliv množství Fe^{3+} iontů dávkovaných do reakční směsi. Po uplynutí náběhové fáze postupně dochází k odbourávání dusičnanů. V Tab. 17 jsou uvedeny parametry procesu vyhodnocené z naměřených hodnot koncentrací dusičnanů v jednotlivých reakčních systémech. Pro srovnání tabulka obsahuje i data pro systém K2a, v němž nejsou přidány žádné železité ionty.

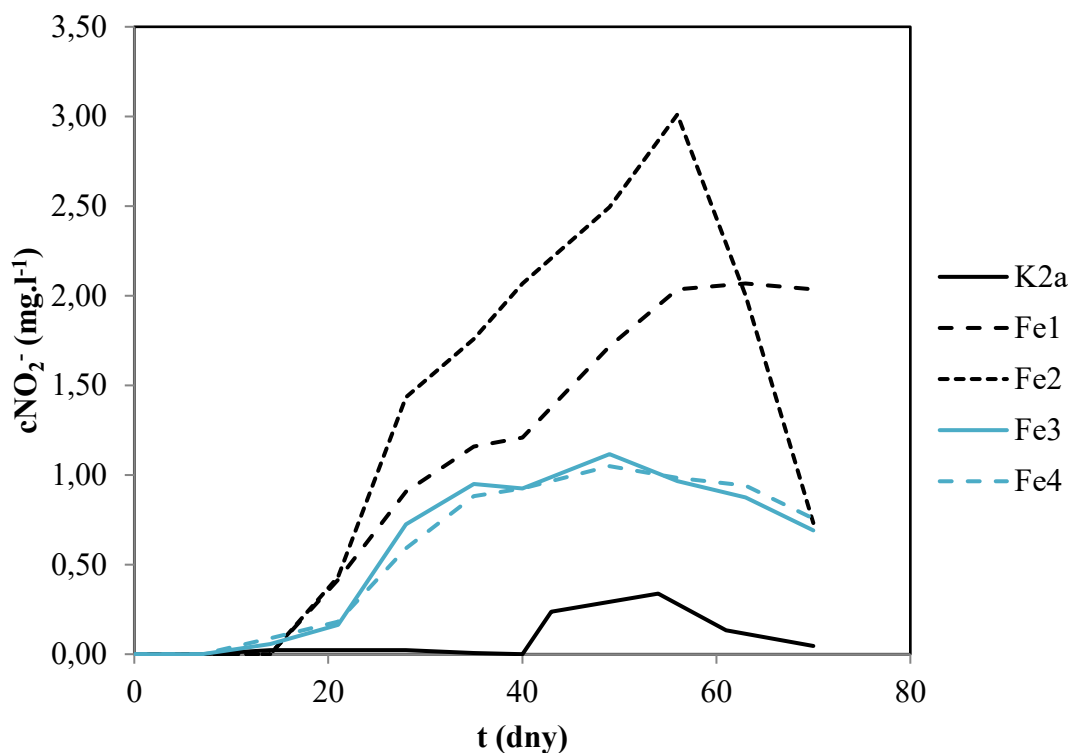
Tab. 17 Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s přidavkem a bez přidavku železitých iontů (k je reakční konstanta pseudonultého řádu)

Reakční systém	c Fe [mg.l ⁻¹]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K2a	0	28	70	82	-1,95
Fe1	0,05	35	77	80	-1,90
Fe2	0,1	35	70	79	-2,26
Fe3	0,5	35	71	79	-2,19
Fe4	1,0	35	71	79	-2,19

Obecně jsou procesy autotrofní denitrifikace pomalejší než heterotrofní denitrifikace. Absolutní hodnota stanovené reakční konstanty k (Tab. 17) byla nejvyšší v reakčním systému obsahujícím 0,1 mg.l⁻¹ železitých iontů a při dalším přidavku Fe^{3+} absolutní hodnota konstanty mírně klesla. Ve srovnání se systémem K2a přesto dochází k nárůstu absolutní hodnoty reakční konstanty o 12 až 16 %. To by mohlo značit pozitivní vliv přidavku železitých iontů na první krok denitrifikace – redukci dusičnanů.

Obr. 23 znázorňuje průběh koncentrace dusitanových iontů v reakční směsi. Z grafu je patrná zvýšená akumulace dusitanových iontů v přítomnosti železitých iontů. Nejvyšší koncentrace dusitanových iontů byla naměřena v systému Fe2, tedy v případě s nejvyšší rychlostí odbourávání dusičnanových iontů (viz Obr. 22). Naměřené koncentrace dusitanů v systému Fe2 překročily hodnotu 3 mg.l⁻¹, čímž výrazně převyšují limitní hodnotu povoleného obsahu dusitanů v pitné vodě dle příslušné vyhlášky České republiky⁷.

Z provedených experimentů je tedy patrné, že přítomností Fe^{3+} je ovlivňován zejména první krok denitrifikace. To znamená, že je urychlována redukce dusičnanů za vzniku dusitanů. Odbourávání vznikajících dusitanů však není s vysokou pravděpodobností přidavkem Fe^{3+} iontů ovlivňováno, takže výsledkem této soustavy následných reakcí je výše zmíněný nárůst akumulace dusitanových iontů v reakční směsi.



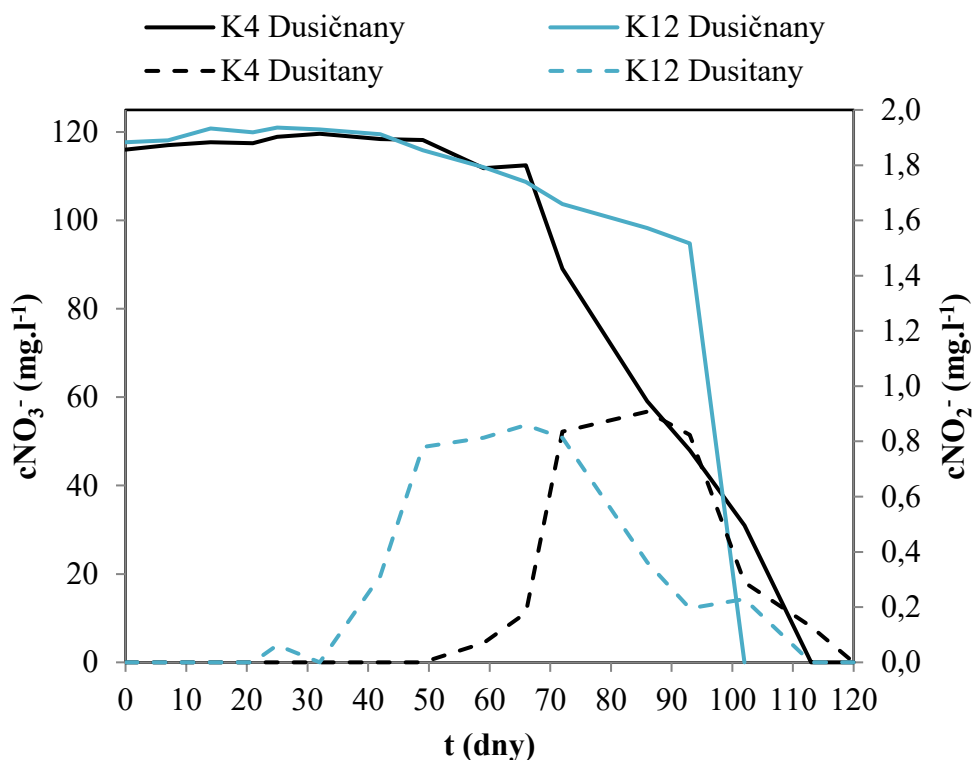
Obr. 23 Časové změny koncentrace dusitanů v reakčních nádobách s přidavkem Fe^{3+} . Zde Fe1 ($0,05 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$), Fe2 ($0,1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$), Fe3 ($0,5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$), Fe4 ($1,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$) a K2a ($0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Fe}^{3+}$)

I v tomto případě byl z naměřených dat obsahu dusičnanů a dusitanů dopočítán celkový obsah dusíku (jako součet dusičnanového a dusitanového dusíku). A i přes hromadění dusitanů v testovaných systémech v poměrně vysokých koncentracích měly hodnoty celkového dusíku během celého experimentu klesající charakter.

Výsledky provedených experimentů ukazují, že přidavek železitých iontů může mít vliv na procesy autotrofní denitrifikace bakterií *T. denitrificans* se sírou jako elektronovým donorem. Při koncentracích vyšších než $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ přidaných železitých iontů do systému dochází ke zvýšení rychlosti redukce dusičnanů. Zároveň však v reakční směsi dochází k nežádoucímu hromadění dusitanových iontů.

5.1.4 Vliv velikosti částic a množství síry na průběh autotrofní denitrifikace

V této sérii vsádkových experimentů byl nejprve testován vliv velikosti částic síry na průběh autotrofní denitrifikační reakce.



Obr. 24 Obsah dusičnanů a časové změny koncentrace dusitanů v reakčních systémech K4 (S se střední velikostí částic 3,54 mm) a K12 (S se střední velikostí částic 167 μm)

Použité směsi se lišily tím, že systém označený jako K4 obsahoval frakci síry o velikosti částic 2,5 – 5,0 mm a frakci vápence o velikosti částic 3,0 – 4,0 mm (obojí po 100 g), tedy stejnou jako v předchozích experimentech, zatímco systém K12 obsahoval frakci síry s částicemi od 140 do 200 μm (střední velikost částic 167 μm) a vápenec se střední velikostí částic 2 μm . Při experimentech byl zachován stejný hmotnostní poměr obou komponent (1:1). Navážka síry v systému K12 (4,46 g) přitom byla stanovena tak, aby celkový povrch částic síry byl v reakčním systému K12 stejný jako v systému K4. Celkové složení obou reakčních směsí je uvedeno v Tab. 9 a 10.

Experimentálně zjištěný průběh koncentrace dusičnanů a dusitanů v těchto dvou systémech je uveden na Obr. 24.

V reakční nádobě s frakcí o větší velikosti částic síry trvala náběhová fáze přibližně 55 % celkové doby experimentu. Během této fáze došlo k odbourání malého množství dusičnanů (cca 10 mg dusičnanů, což odpovídá 8,5 % původního množství). Poté následoval typický lineární pokles koncentrace dusičnanů až do její nulové hodnoty. V reakční směsi s menší velikostí částic síry lze náběhovou oblast rozdělit na dvě zřetelné části. V první části (po dobu cca 32 dní) se neodbourávaly žádné dusičnany, ani nevznikaly dusitanů. Poté je v druhé části patrný nárůst koncentrace dusitanů, dosažení jejího plochého maxima (42 až 79 den) a následný pokles koncentrace dusitanů na velmi nízké hodnoty (93 den). Celý tento časový úsek je provázen mírným lineárním poklesem koncentrace dusičnanů. Od 93 dne je pokles koncentrace dusičnanů v reakční směsi velmi strmý a během 9 dnů došlo k odbourání 81 % původního množství dusičnanů.

V Tab. 18 jsou uvedeny rychlosti odbourávání dusičnanů po skončení náběhové fáze v obou testovaných systémech. Z porovnání rychlostních konstant k pseudonultého řádu je zřejmé, že vyšší absolutní hodnota byla stanovena pro finální denitrifikaci v systému K12, tj. s frakcí o menší velikosti částic síry. To může být způsobeno tím, že při míchání reakčních nádob byly menší částice ve vzhledu v celém objemu roztoku dusičnanu sodného, přičemž při použití větších částic byl zahrnut také vliv vnější difúze. Použití frakce síry s menší velikostí částic, při zachování stejného povrchu částic, může být navíc výhodné i z hlediska nižší spotřeby síry a vápence a tím i jejich ceny.

Z Obr. 24 vyplývá, že i při použití jemnější frakce síry dochází k nežádoucímu hromadění dusitanových iontů v reakční směsi. V obou proměřovaných případech (K4 a K12) se hodnoty naměřených koncentrací dusitanových iontů dostaly nad povolenou mez v pitné vodě pro Českou republiku, tj. $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$, ale nepřekročily hodnotu 1 mg.l^{-1} .

V porovnání se srovnávacími experimenty z první série měření (viz kapitola 5.1.1) je při použití menších částic síry patrná vyšší rychlost odbourávání dusičnanů v závěrečné fázi a zároveň i vyšší koncentrace dusitanů hromaděných v reakční směsi. Srovnávací reakční systém K4 se svým složením příliš neliší od dříve diskutovaného systému K2a. Pouze je při přípravě nahrazena demineralizovaná voda pitnou vodou a mírně se odlišuje postup přípravy reakční směsi (viz kapitola 4.2.2). Ukazuje se, že rychlostní konstanty v těchto dvou systémech jsou si blízké.

Tab. 18 Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech K4 a K12

Reakční systém	S [mm]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K4	2,5 – 5,0	66	120	113	-2,40
K12	0,14 – 0,2	42 resp. 93	113	117 resp. 94,8	-0,84 resp. -10,5

Vliv pitné vody z řádu (Vodovody a kanalizace Pardubice) na průběh odbourávání byl testován v sadě experimentů označených jako K5 až K7 a K11 až K13.

První trojice reakčních směsí byla připravena z demineralizované vody a druhá trojice z vodovodního řádu. Každá trojice obsahovala navážku náplně síry a vápence v hmotnostním poměru 1:1 po 2,23, 4,46 a 8,92 g. Z naměřených dat je patrné (Tab. 19), že vliv přípravy směsi z demineralizované vody nebo vody z řádu není nijak statisticky významný. Nedošlo k ovlivnění doby náběhové fáze a ani nebyla nijak změněna rychlost odbourávání dusičnanů. Absolutní hodnoty rychlostních konstant odbourávání dusičnanů k jsou ve všech proměřovaných případech srovnatelné s průměrnou absolutní hodnotou 2,96 mg.l⁻¹den⁻¹. Tyto hodnoty jsou opět vyšší oproti absolutním hodnotám reakčních konstant z první série vsádkových experimentů. Zároveň byla pozorována i vyšší koncentrace dusitanů v reakční směsi, jejíž maximálně naměřená hodnota byla přibližně 1,1 mg.l⁻¹. Příčinou tohoto jevu může být výše diskutované použití frakce náplně s menší velikostí částic a současně i intenzivní míchání reakční směsi po celou dobu experimentu (blíže viz kapitola 5.1.5).

Tab. 19 Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech připravených z demineralizované vody nebo vody z vodovodního řádu

Reakční nádoba	Voda	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K5	demi	72	113	116	-2,83
K6	demi	59	102	116	-2,70
K7	demi	66	102	108	-3,00
K11	z řádu	66	100	105	-3,09
K12	z řádu	66	102	109	-3,03
K13	z řádu	66	102	111	-3,08

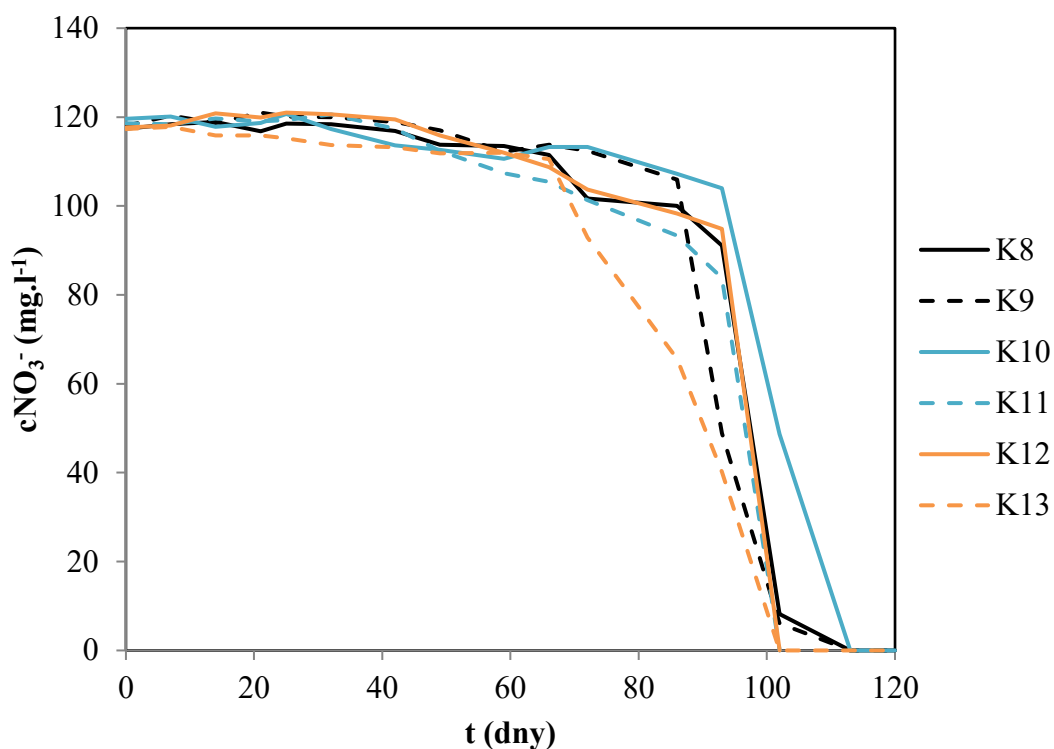
5.1.5 Vliv míchání reakční směsi na průběh autotrofní denitrifikace

Dalším sledovaným parametrem autotrofní denitrifikace byl vliv míchání reakčních směsí na průběh procesu. Míchání bylo realizováno umístěním vybraných reakčních nádob na laboratorní třepačku. K tomuto účelu bylo připraveno šest vsádkových reakčních směsí s označením K8 až K13. První trojice reakčních směsí (K8 až K10) byla ponechána v klidové poloze, tj. bez trvalého míchání (vsádka byla promíchávána pouze jedenkrát týdně, a to před odběrem vzorků, aby se homogenizoval obsah v celé reakční nádobě). Druhá trojice reakčních směsí (K11 až K13) byla umístěna na třepačku. Přitom byly tyto směsi míchány po celou dobu experimentů při 150 rpm. Experiment trval celkem 120 dní. Každá studovaná trojice obsahovala navážku náplně síry a vápence v hmotnostním poměru 1:1; jednotlivé směsi obsahovaly 2,23 g, 4,46 g, respektive 8,92 g síry. Základní procesní data vyhodnocená z experimentálně naměřených hodnot jsou uvedena v Tab. 20. Z uvedených hodnot je patrné, že míchání reakční směsi má na rychlost redukce dusičnanů pozitivní vliv, neboť absolutní hodnoty rychlostních konstant jsou při intenzivním míchání vyšší. Tento jev je s vysokou pravděpodobností způsoben lepší dostupností dusičnanových iontů pro buňky mikroorganismů při intenzivním promíchávání reakční směsi.

Průběhy časové závislosti koncentrace dusičnanů v reakční směsi jsou pro studované reakční systémy znázorněny na Obr. 25. Délka náběhové fáze byla ve všech šesti systémech téměř stejná a činila 55 až 60 % doby experimentu, tj. 66 až 72 dní. Během této fáze bylo odbouráno okolo 8 mg dusičnanů (přibližně 7 % počáteční koncentrace dusičnanových iontů).

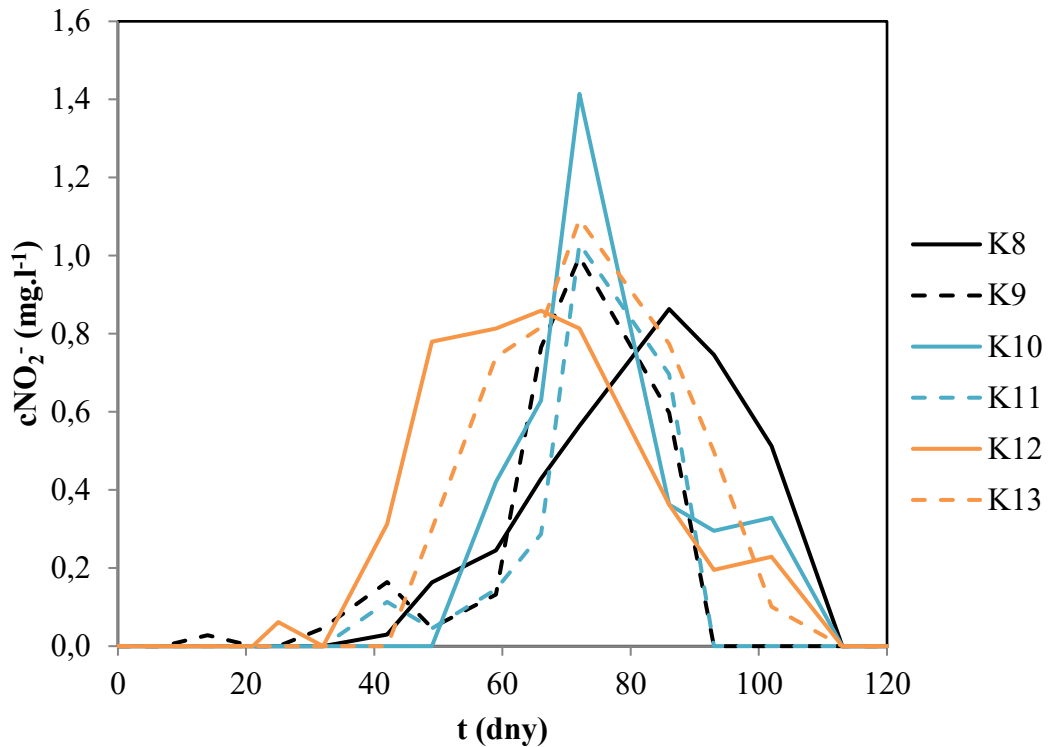
Tab. 20 Porovnání odbourávání dusičnanů v míchaných (K11 až K13) a nemíchaných reakčních systémech (K8 až K10)

Reakční nádoba	150 rpm	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběhové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběhové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K8	ne	66	113	112	-2,38
K9	ne	72	113	112	-2,73
K10	ne	72	113	113	-2,77
K11	ano	66	100	105	-3,09
K12	ano	66	102	109	-3,03
K13	ano	66	102	111	-3,08



Obr. 25 Obsah dusičnanů v míchaných a nemíchaných reakčních směsích K8 až K13. Zde K8 (nemícháno, 2,23 g S), K9 (nemícháno, 4,46 g S), K10 (nemícháno, 8,92 g S), K11 (mícháno, 2,23 g S), K12 (mícháno, 4,46 g S) a K13 (mícháno, 8,92 g S)

Na Obr. 26 jsou zaznamenány změny koncentrace dusitanových iontů v reakční směsi během celého experimentu. Ve všech šesti sledovaných směsích bylo detekováno nežádoucí hromadění dusitanů s maximy od 0,9 do 1,4 mg.l⁻¹. Důvodem může být dříve diskutované zvýšení rychlosti odbourávání dusičnanů a tím rychlejší vznik dusitanů jako důsledek použití frakce náplně o menší velikosti částic.

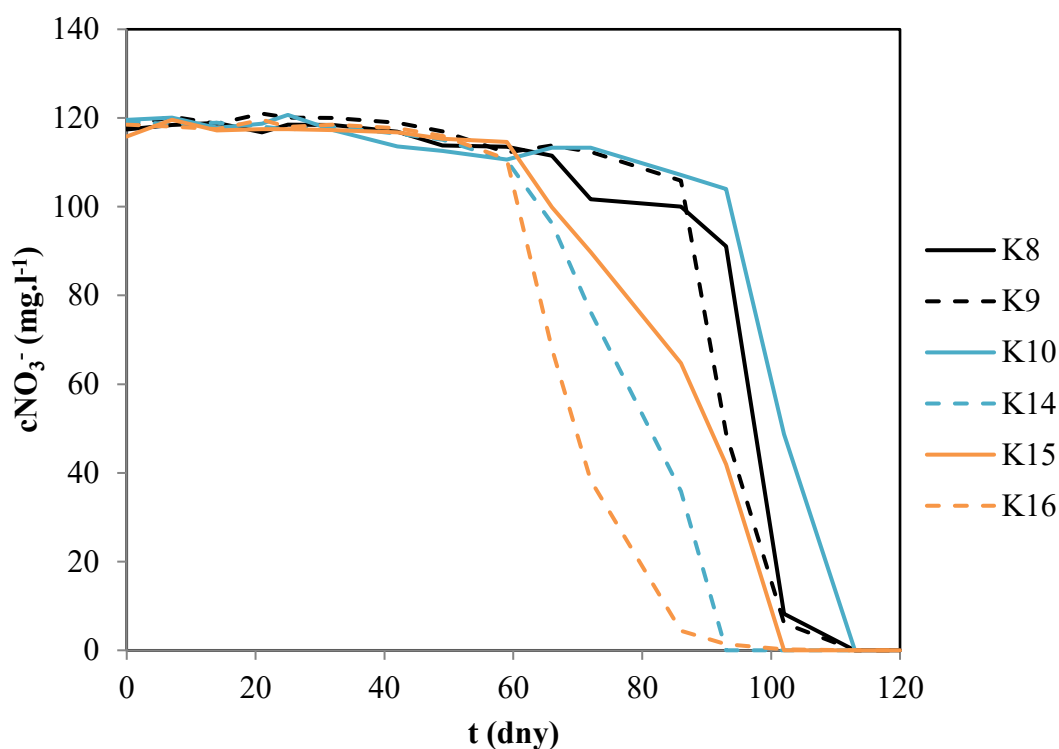


Obr. 26 Časové změny koncentrace dusitanů v míchaných a nemíchaných směsích K8 až K13. Zde K8 (nemícháno, 2,23 g S), K9 (nemícháno, 4,46 g S), K10 (nemícháno, 8,92 g S), K11 (mícháno, 2,23 g S), K12 (mícháno, 4,46 g S) a K13 (mícháno, 8,92 g S)

5.1.6 Vliv teploty na průběh autotrofní denitrifikace

Autotrofní denitrifikace, stejně jako všechny mikrobiologické procesy je ovlivňována teplotou reakční směsi. Literatura uvádí optimální teplotu růstu bakterií *T. denitrificans* v rozmezí od 28 do 32 °C a pro autotrofní denitrifikaci od 33 do 35 °C^{40,56,76}. Pro studium vlivu teploty na autotrofní denitrifikaci bylo připraveno šest vsádkových reakčních směsí. Trojice reakčních směsí označených K8 až K10 (navážka síry a vápence po 2,23, 4,46 a 8,92 g) byla ponechána při laboratorní teplotě (22 °C) a druhá trojice (K14 až K16) se stejnými navážkami síry a vápence byla testována při 33 °C. Detailní složení všech šesti testovaných systémů je uvedeno v Tab. 10.

Obr. 27 ukazuje časový záznam koncentrace dusičnanů v těchto šesti připravených směsích. Ve všech třech směsích testovaných při vyšší teplotě činila doba náběhové fáze 59 dní, tedy 49 % celkové délky experimentu (120 dní) a bylo během ní odbouráno průměrně 5 % nadávkovaných dusičnanů (6 mg). Doba náběhové fáze v systémech sledovaných při nižší laboratorní teplotě byla delší a dosahovala až 60 % z celkové doby experimentu.

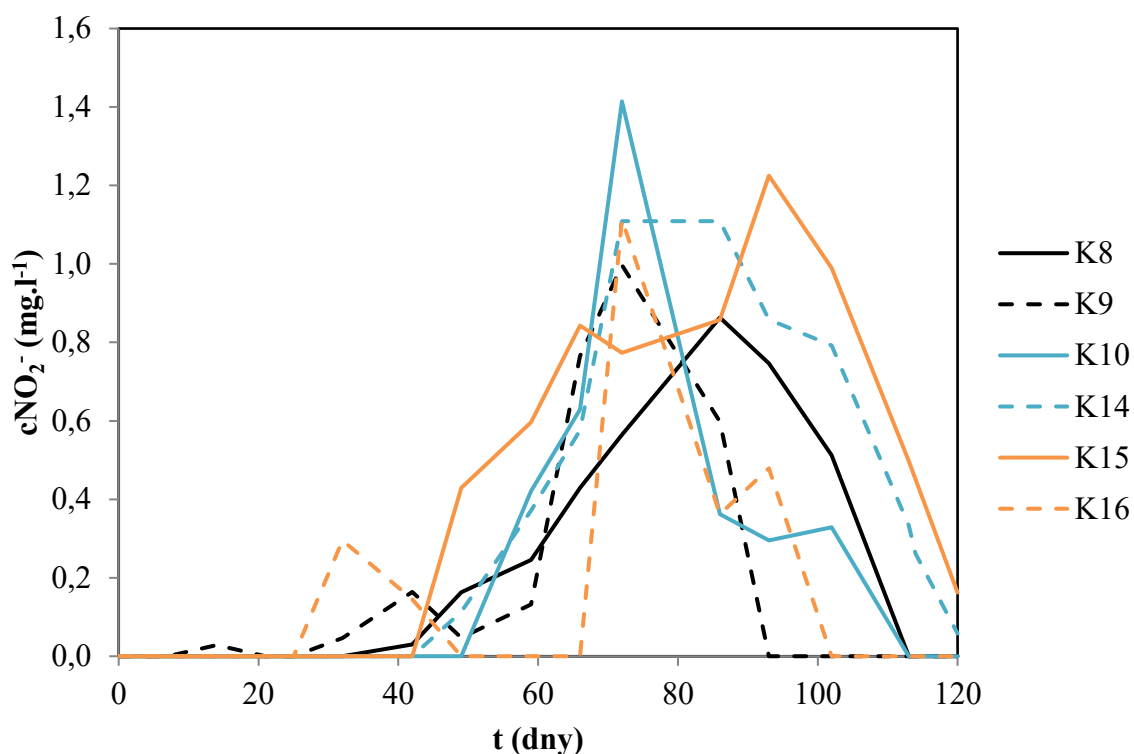


Obr. 27 Obsah dusičnanů v systémech s rozdílnou teplotou během autotrofní denitrifikace. Zde K8 (22 °C, 2,23 g S), K9 (22 °C, 4,46 g S), K10 (22 °C, 8,92 g S), K14 (33 °C, 2,23 g S), K15 (33 °C, 4,46 g S) a K16 (33 °C, 8,92 g S)

Tab. 21 Porovnání odbourávání dusičnanů v reakčních systémech s rozdílnou teplotou.

Reakční nádoba	T [°C]	Časové údaje [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběžové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
		Konec náběžové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K8	22	66	113	112	-2,38
K9	22	72	113	112	-2,73
K10	22	72	113	113	-2,77
K14	33	59	93	110	-3,24
K15	33	59	102	118	-2,74
K16	33	59	93	111	-3,26

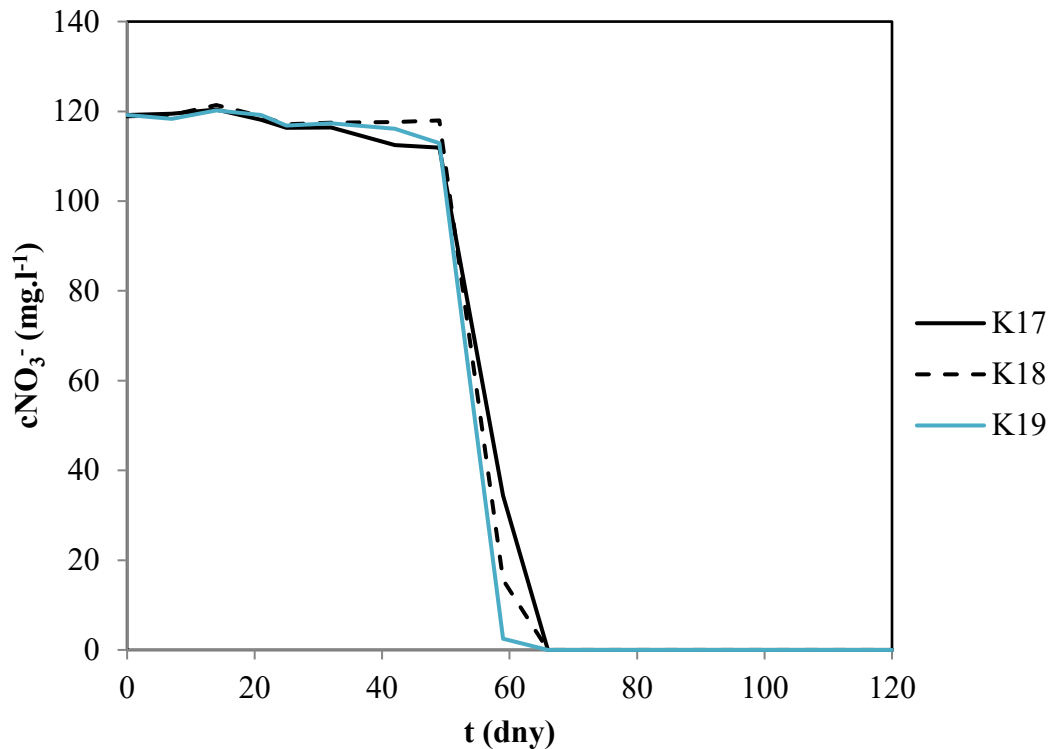
Rovněž rychlost odbourávání dusičnanů byla vyšší v systémech s vyšší teplotou, což je demonstrováno v Tab. 21 hodnotami rychlostních konstant vyhodnocenými z naměřených dat. Ve směsích testovaných při 22 °C byla stanovena rychlostní konstanta k odbourávání dusičnanů na průměrnou hodnotu -2,63 mg.l⁻¹den⁻¹ a ve směsích při 33 °C na -3,08 mg.l⁻¹den⁻¹.



Obr. 28 Časové změny koncentrace dusitanů v systémech testovaných při různých teplotách. Zde K8 (22 °C, 2,23 g S), K9 (22 °C, 4,46 g S), K10 (22 °C, 8,92 g S), K14 (33 °C, 2,23 g S), K15 (33 °C, 4,46 g S) a K16 (33 °C, 8,92 g S)

Na Obr. 28 je zobrazen záznam koncentrace dusitanů během celého experimentu v reakčních směsích K8 až K10 a K14 až K16. I zde platí, že vyšší rychlost odbourávání dusičnanů (způsobená použitou velikostí frakce a u nádob K14 až K16 i vyšší reakční teplotou) měla pravděpodobně vliv na vyšší nahromaděný obsah dusitanů během experimentu, protože rychlost odbourávání dusitanů zřejmě teplotou ovlivněna nebyla. Ve sledovaných směsích dosahovaly nejvyšší koncentrace dusitanů od 0,9 do 1,4 mg.l⁻¹.

Poslední sada vsádkových experimentů byla zaměřena na studium vlivu zvýšené teploty (33 °C) při současném míchání směsi. K tomuto účelu byly připraveny tři reakční směsi označené K17 až K19. Lišily se od sebe množstvím použité náplně – K17 po 2,23 g, K18 po 4,46 g a K19 po 8,92 g síry a vápence. Opět byl tedy zachován hmotnostní poměr 1:1; konkrétní složení reakčních směsí je uvedeno v Tab. 10. Všechny tři reakční nádoby byly po celou dobu experimentu, který trval 120 dní, míchány na třepačce při 150 rpm a byly umístěny v termostatu při 33 °C.



Obr. 29 Obsah dusičnanů během autotrofní denitrifikace v míchaných systémech při 33 °C. Zde K17 (2,23 g S), K18 (4,46 g S) a K19 (8,92 g S)

Ve všech třech testovaných směsích byla pozorována nejkratší náběhová fáze (Obr. 29) v porovnání se všemi vsádkovými experimenty v druhé sérii. Náběhová fáze trvala 49 dní, tedy 41 % doby experimentu. Po uplynutí náběhové fáze byly dusičnany odbourány nejvyšší pozorovanou rychlostí ze všech provedených vsádkových experimentů. Průměrná hodnota rychlostní konstanty k činila $-6,73 \text{ mg.l}^{-1}\text{den}^{-1}$, tedy skoro dvojnásobek doposud vyhodnocených hodnot v dříve popsáných experimentech (Tab. 22).

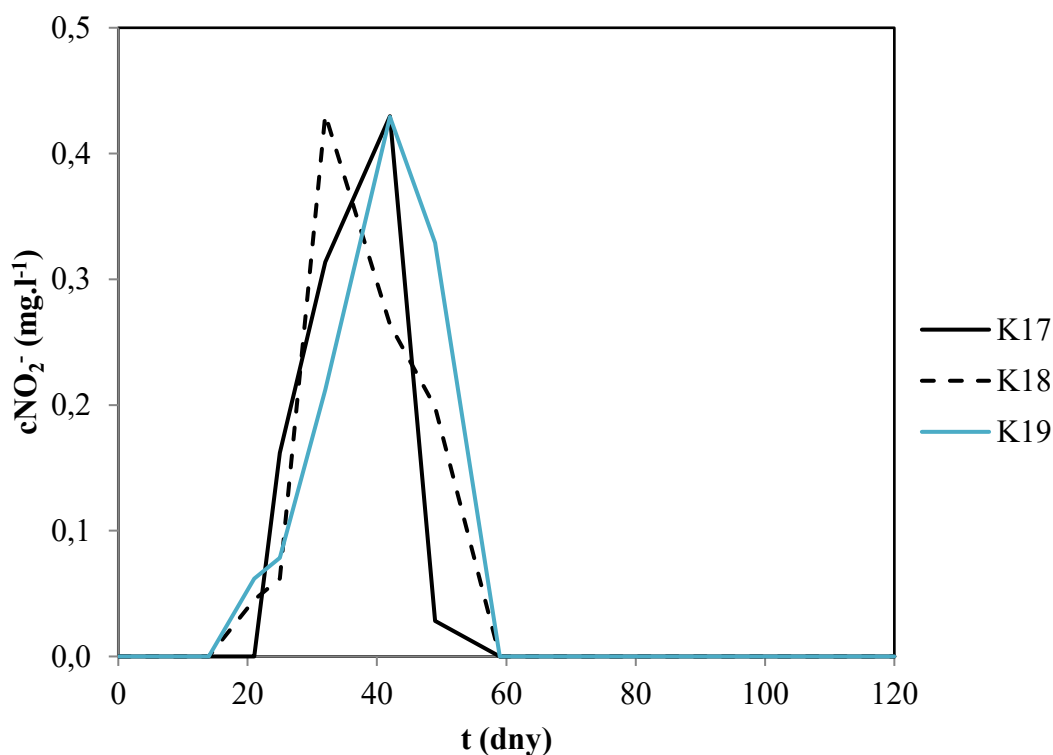
Žádoucím efektem spojení vyšší teploty a intenzivního míchání bylo rovněž rychlejší odbourávání dusitanů, neboť jejich koncentrace v reakční směsi nebyla tak vysoká jako v ostatních případech naměřených ve druhé sérii experimentů. Hodnoty koncentrace dusitanů v testovaných směsích K17 až K19 (Obr. 30) nepřekročily hodnotu $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (tedy hodnotu stanovenou jako limitní pro obsah dusitanů v pitné vodě v České republice).

Experimenty provedené ve druhé sérii ukázaly možnosti zvýšení rychlosti autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans* vlivem velikosti frakce použité náplně, mícháním a teploty. Při použití frakce náplně o menší velikosti částic, která slouží zároveň jako substrát pro bakteriální buňky, je tato náplň při zachování totožné velikosti povrchu lépe dostupná pro jednotlivé buňky. Zároveň je potřeba nižší navážka, která je ekonomicky výhodnější.

Intenzivní míchání reakční směsi, stejně tak jako vyšší teplota (33 °C) se jeví rovněž jako urychlující faktory redukce dusičnanů při autotrofní denitrifikaci bakteriemi *T. denitrificans*. Navíc při jejich současném využití dochází i k rychlejšímu odbourávání dusitanových iontů z reakční směsi, které se v systému sice i nadále hromadí, jejich koncentrace však nepřesáhne 0,5 mg.l⁻¹.

Tab. 22 Porovnání odbourávání dusičnanů v míchaných reakčních systémech při teplotě 33 °C.

Reakční nádoba	Časové údaje, [dny]		c NO ₃ ⁻ na konci náběžové fáze [mg.l ⁻¹]	k [mg.l ⁻¹ den ⁻¹]
	Konec náběžové fáze	Odbourání 99 % NO ₃ ⁻		
K17	49	66	112	-6,59
K18	49	66	118	-6,94
K19	49	66	113	-6,65



Obr. 30 Časové změny koncentrace dusitanů v míchaných systémech při teplotě 33 °C. Zde K17 (2,23 g S), K18 (4,46 g S) a K19 (8,92 g S)

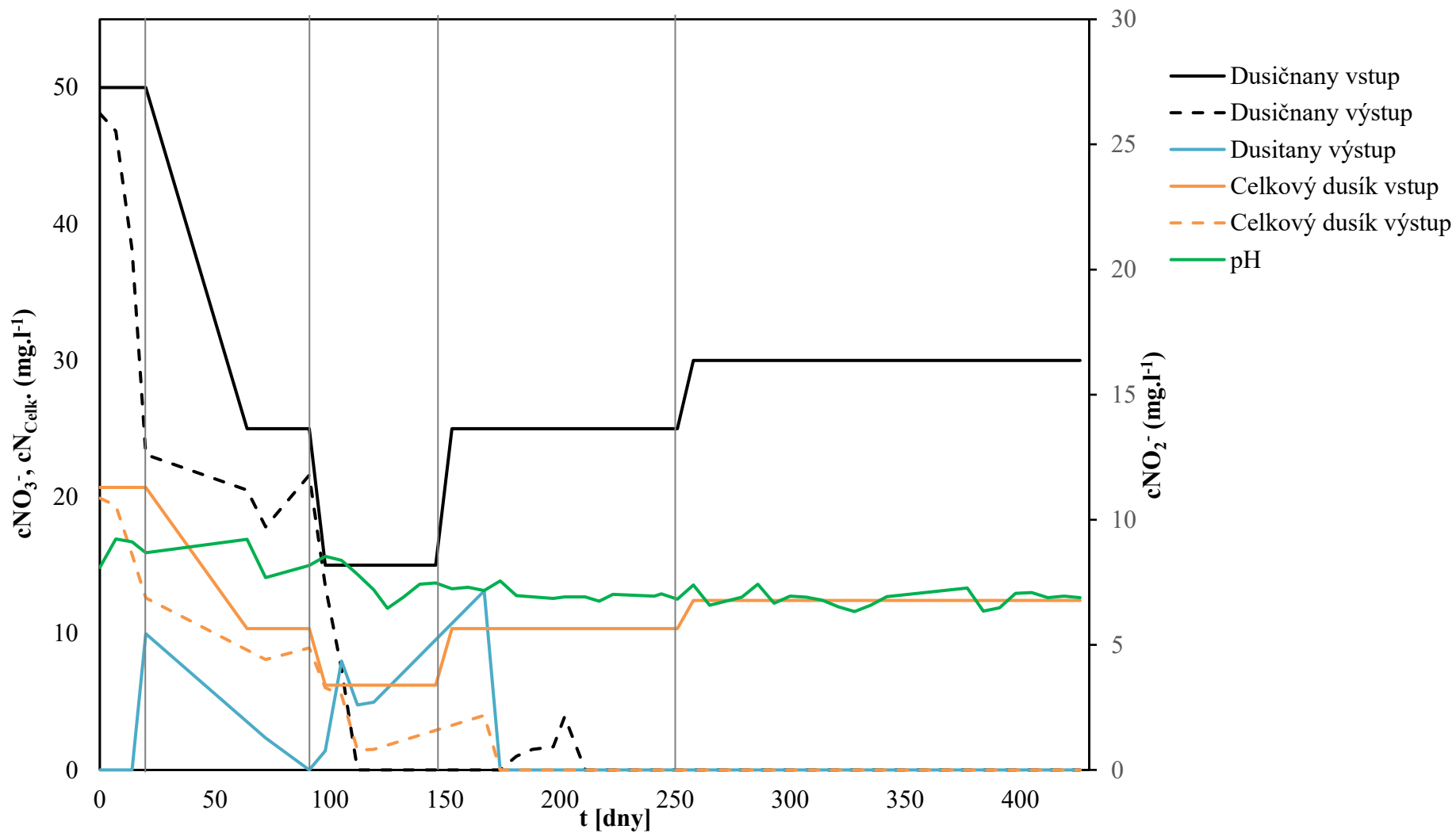
5.2 Denitrifikační procesy v průtočné koloně

Experimenty v průtočné koloně probíhaly celkem 428 dní. Podrobný popis experimentálního zařízení i pracovní postup jsou popsány v kapitole 4.2.3. Prvních 100 dní experimentu byl do kolony čerpán pracovní roztok připravený z demineralizované vody. V dalších dnech experimentu až do jeho ukončení byl pracovní roztok připravován z pitné vody z vodovodního řádu Univerzity Pardubice. Koncentrace jednotlivých složek pracovního roztoku a rychlost jeho dávkování do kolony jsou uvedeny v Tab. 12. S ohledem na dlouhodobý charakter byly experimenty prováděny při laboratorní teplotě (22 °C) a pro zajištění odpovídajícího hydraulického odporu vrstvy částic byla použita frakce částic o větší velikosti. Nebyly tedy přímo použity optimální podmínky stanovené v rámci předchozích vsádkových experimentů.

Na vstupu do kolony byly měřeny parametry koncentrace dusičnanů a fosforu kvůli kontrole správného dávkování. Dále byly měřeny hodnoty pH, koncentrací rozpuštěného kyslíku a ORP. Výstupními měřenými parametry byly koncentrace dusičnanů, dusitanů, síranů, rozpuštěného kyslíku, pH a ORP. Dále byl také dopočítáván obsah celkového dusíku, a to součtem dusičnanového a dusitanového dusíku. Průběh denitrifikačních procesů ve sledované průtočné koloně je zobrazen na Obr. 31.

V prvních dvaceti dnech experimentu byl do kolony čerpán pracovní roztok s počáteční koncentrací 50 mg.l⁻¹ dusičnanů průtokem 23,6 ml.min⁻¹; kolonou tedy procházelo 70,8 mg NO₃⁻.h⁻¹. Během těchto dvaceti dní se koncentrace dusičnanů na výstupu z kolony postupně snižovala. Nejnižší výstupní hodnoty koncentrace dusičnanů bylo dosaženo na konci sledovaného časového intervalu, a to 23,1 mg.l⁻¹, tj. 46 % vstupní hodnoty koncentrace dusičnanů a odstraněno bylo tedy přibližně 38,1 mg NO₃⁻.h⁻¹. Naopak hodnoty obsahu dusitanů postupně stoupaly a dostaly se až k hodnotě blízké 10 mg.l⁻¹.

V pracovním roztoku byly rovněž měřeny hodnoty ORP (počáteční 142,4 mV) a koncentrace rozpuštěného kyslíku (počáteční 7,9 mg.l⁻¹). Po 20 dnech hodnoty ORP klesly na 100 mV a obsah rozpuštěného kyslíku na 7,0 mg.l⁻¹. Přesto, jak ukázaly vsádkové testy, byly stanovené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku pro autotrofní denitrifikaci příliš vysoké. To mohlo být způsobeno kombinací několika vlivů, především vysoké vstupní koncentrace dusičnanů do systému, příliš vysokým průtokem či stále ještě trvající adaptací mikroorganismů na nové prostředí, čímž byl bezpochyby přechod z prostředí živného roztoku s nadbytkem všech potřebných látek k prosperitě organismů do pracovního roztoku, tj. na živiny chudšího prostředí.



Obr. 31 Časový průběh základních parametrů autotrofního denitrifikačního procesu v průtočné koloně

Proto byl od 21. dne realizace experimentů v průtočné koloně snížen vstupní obsah dusičnanů na 25 mg.l^{-1} a to až do 97. dne experimentu. Zároveň byl snížen také průtok pracovního roztoku do kolony na $19,3 \text{ ml.min}^{-1}$. Do kolony bylo tedy dávkováno $29,0 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$. Se snížením koncentrace dusičnanů na vstupu se snížily i výstupní koncentrace až k hodnotám $13,5 \text{ mg.l}^{-1}$, tj. na 54 % vstupního obsahu dusičnanů ($15,6 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$). K požadovanému zvýšení účinnosti odstraňování dusičnanů z pracovního roztoku tedy nedošlo, ale došlo ke snížení obsahu dusitanů ve výstupu, jejichž hodnoty koncentrací se pohybovaly těsně nad 1 mg.l^{-1} . Zároveň mírně poklesly i měřené hodnoty ORP na výstupu (okolo 80 mV) a obsahu rozpuštěného kyslíku (pod 4 mg.l^{-1}).

Pro další měření v průtočné koloně (98. až 150. den experimentu) byl opět snížen vstupní obsah dusičnanů (na 15 mg.l^{-1}) a zároveň i průtok kolonou na 7 ml.min^{-1} . Kolonou tedy procházelo $6,3 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$. V tomto případě došlo k úplnému odbourání dusičnanových iontů až k prakticky nulovým hodnotám na výstupu. Hodnoty koncentrace dusitanových iontů na výstupu byly však stále vysoké – pohybovaly se v průměru okolo 4 mg.l^{-1} a ke konci tohoto období dosahovaly hodnot téměř 10 mg.l^{-1} . Hodnoty ORP na výstupu z kolony však klesly až pod 40 mV . A došlo zároveň i ke snížení hodnot rozpuštěného kyslíku pod 3 mg.l^{-1} . Právě pokles hodnot těchto dvou parametrů ve výstupním roztoku byl pozitivní, neboť může indikovat kombinaci vyšší míry přizpůsobení se bakteriálních buněk novým podmínkám a zároveň i vyšší míru jejich množení. Pro ověření tohoto jevu bylo v následujícím testovaném období (151. až 255. den experimentu) do kolony dávkováno 25 mg.l^{-1} dusičnanů a pracovní roztok byl čerpán s průtokem $8,5 \text{ ml.min}^{-1}$.

Sumárně je z vyobrazeného průběhu celého experimentu (Obr. 31) patrné, že zhruba prvních 170 dní experimentu se provoz kolony a v ní probíhající procesy mikroorganismů ustalovaly (včetně jejich adaptace a množení). Po této době již bylo dosaženo prakticky kompletního odstranění dávkovaných dusičnanů. Zároveň nevznikaly dusitany a jejich výstupní koncentrace byla pod limitem detekce měření.

Během celého experimentu bylo také pravidelně měřeno pH. Ve vstupním (pracovním) roztoku bylo stanoveno pH s hodnotou $8,07$. Na výstupu se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí od $6,33$ do $9,23$ (nejnižší a nejvyšší naměřená hodnota, viz Obr. 31). Aritmetický průměr měřených hodnot pH činil $7,0$, rozptyl $0,531$ a směrodatná odchylka byla stanovena na $0,729$.

Ve snaze zjistit optimální vstupní koncentraci dusičnanů a průtok, byla v páté a poslední etapě testování, která začala 256. den a trvala až do 428. dne, koncentrace dusičnanových iontů v pracovním (vstupním) roztoku zvýšena na 30 mg.l^{-1} a průtok navýšen na $9,9 \text{ ml.min}^{-1}$. Z Obr. 31 je zřejmé, že i za těchto podmínek nebyly ve výstupu z kolony detekovány žádné

zbytkové koncentrace dusičnanů ani dusitanů. Ukazuje se tedy, že pro dané experimentální uspořádání a použitou mikrobiální kulturu je pro úplné odstranění dusičnanů bez produkce dusitanů vhodná vstupní koncentrace dusičnanů 30 mg.l^{-1} při průtoku $9,9 \text{ ml.min}^{-1}$, tj. při mimovrstvové rychlosti protékající vody $0,643 \text{ mm.min}^{-1}$. Přitom se zpracovávalo $17,8 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$.

Po celou dobu experimentů v koloně byl ve výstupu z kolony měřen také obsah síranů. Síraný vznikají během denitrifikačních procesů vlivem oxidace síry a jejich obsah v pitné vodě je rovněž omezen vyhláškou č. 70/2018 Sb. do maximální výše obsahu 250 mg.l^{-1} síranů. V pitné vodě z vodovodního řádu Univerzity Pardubice, ze které byl připravován pracovní roztok, bylo naměřeno $133,8 \text{ mg.l}^{-1}$ obsažených síranů. Na výstupu z kolony byla nejvyšší naměřená koncentrace síranů $237,7 \text{ mg.l}^{-1}$, tedy pod hranicí maximálního povoleného limitu síranů, který je stanovený platnou vyhláškou pro Českou republiku.

Během celé doby probíhajícího experimentu byl několikrát odebrán vzorek nehybné náplně s mikroorganismy, který byl předán do laboratoře Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, kde byla pomocí molekulárně biologických metod potvrzena přítomnost bakterií *T. denitrificans*.

Pomocí provozované kolony a jejího testovaného nastavení bylo tedy možné odstranit až $17,8 \text{ mg NO}_3^- \cdot \text{h}^{-1}$ (s obsahem 30 mg.l^{-1} dusičnanů v pracovním roztoku a průtoku $9,9 \text{ ml.min}^{-1}$), tedy přibližně $4 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. V porovnání s autory zabývajícími se danou problematikou (Tab. 4) tak bylo dosaženo vyšší míry v odstraňování dusičnanů, než je uvedeno v publikacích autorů Moon a kol.⁹⁴ (míra odstranění $0,12 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) a Zhao a kol.¹¹¹ (míra odstranění $1,2 \text{ mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), ale nižší míry odstranění než u některých dalších prací autorů uvedených v Tab. 4 (od $6,1$ do $62,5 \text{ N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Je však třeba konstatovat, že při časové náročnosti experimentů nebylo možné detailně proměřit všechny kombinace procesních parametrů. Stanovené „optimální provozní podmínky“ tedy nemusí být globálním optimem procesu, ale může se jednat pouze o lokální optimum předurčené teplotou procesu, velikostí částic síry, použitou bakteriální kulturou i hydrodynamikou toku vrstvou náplně. Studium těchto parametrů je zároveň základním směrem dalšího studia tohoto procesu.

Obecně lze na základě provedených dlouhodobých experimentů konstatovat, že je studovaná metoda odstraňování dusičnanů z vod s využitím autotrofních bakterií *T. denitrificans* pomalejší než alternativní využití heterotrofních organismů. Výsledky však ukazují, že při odstraňování nízkých koncentrací dusičnanů z vod by zvolení metody autotrofní denitrifikace mohlo být výhodnější, neboť je možné odstraňovat dusičnany až na nulové hodnoty koncentrací, aniž by docházelo k uvolňování toxičtějších dusitanů nebo nadměrné

tvorbě síranů. Zároveň je anorganický substrát (zde síra) levnější než organický substrát, který je potřeba dodávat heterotrofním organismům.

6 ZÁVĚR

Cílem této experimentální práce bylo systematické studium odstraňování dusičnanů z uměle připravovaných odpadních vod, které jsou chudé na obsah organických látek a zároveň v nich koncentrace dusičnanových iontů nepřesahuje hodnoty 100 mg.l^{-1} , a to procesem autotrofní denitrifikace bakteriemi *T. denitrificans*. Veškeré realizované experimenty lze rozdělit do dvou částí.

V první části byla pozornost věnována vsádkovým experimentům, které sloužily k popisu průběhu dílčích procesů souvisejících s autotrofní denitrifikací. Celkem bylo připraveno 34 vsádkových reakčních nádob, jejichž náplň a tedy i nosič bakteriálních buněk a donor elektronů tvořila kusová síra s různou velikostí částic. Rovněž byl do reakčních nádob přidáván drcený vápenec kvůli regulaci hodnot pH. Experimenty prokázaly, že přídavek neutralizačního činidla - vápence v hmotnostním poměru 1:1 k množství síry je dostatečný pro udržení pH v rozmezí od 7,0 do 7,7. Ve všech testovaných reakčních směsích byla v počátečním stadiu procesu nejprve pozorována tzv. lag fáze, při níž docházelo pouze k nepatrnému úbytku dusičnanů vlivem přizpůsobování bakteriálních buněk novému prostředí a přítomnosti molekulárního kyslíku ve směsi. Doba lag fáze se pohybovala od 34 % do 51 % doby experimentů a bylo při ní odbouráno 15 % až 22 % dávkovaných dusičnanů. Poté následovala intenzivní redukce dusičnanů až prakticky k jejich nulovým hodnotám.

Absolutní hodnota rychlostní konstanty vyhodnocená pro jednotlivé experimenty se pohybovala v rozmezí od $1,54$ do $10,5 \text{ mg.l}^{-1}.\text{den}^{-1}$. Přitom nejvyšší hodnoty, tedy nejvyšší rychlost odbourávání dusičnanů, byly stanoveny pro systémy s intenzivním mícháním kombinované s většími částicemi a teplotou 33°C , nebo menšími částicemi při nižší teplotě 25°C .

Bylo experimentálně pozorováno, že následná redukce vznikajících dusitanů je obvykle pomalejší než primární redukce dusičnanů, a dochází tak k jejich nežádoucímu hromadění v reakčním systému. V závislosti na studovaném systému se maximální koncentrace dusitanových aniontů v reakční směsi pohybovala v rozmezí od $0,09$ do 3 mg.l^{-1} . Výsledky experimentů ukázaly, že při koncentracích fosforu v reakční směsi vyšší než 2 mg.l^{-1} byly hodnoty naměřených koncentrací dusitanů v reakční směsi vyšší než 1 mg.l^{-1} . Ještě výraznější vliv měla přítomnost železitých iontů v reakční směsi, kde již jejich koncentrace $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ přispěla k tvorbě dusitanových aniontů o koncentraci 1 mg.l^{-1} , respektive 3 mg.l^{-1} při koncentraci železitých iontů 1 mg.l^{-1} . Získané poznatky ukazují, že přítomností Fe^{3+} je urychlována redukce dusičnanů (reakční konstanta cca $-2,14 \text{ mg.l}^{-1}.\text{den}^{-1}$) za vzniku dusitanů.

Odbourávání vznikajících dusitanů však není s vysokou pravděpodobností přidavkem Fe^{3+} iontů ovlivňováno. Výsledkem je nárůst akumulace dusitanových iontů v reakční směsi.

Druhá část experimentů byla zaměřena na dlouhodobé laboratorní ověření provozu průtočné náplňové autotrofní denitrifikační kolony. Jako náplň byla použita elementární síra, jejíž částice byly nosičem a donorem elektronů pro bakterie *T. denitrificans*. Kolona byla provozována celkem 428 dní a byl do ní čerpán modelový pracovní roztok obsahující od 15 do 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ dusičnanů. Během prvních 170 dní experimentů docházelo ke stabilizaci kolony (adaptace bakteriálních buněk na nové prostředí, snižování vstupní koncentrace dusičnanů, snižování průtoku vstupního roztoku a snižování ORP a koncentrace rozpuštěného kyslíku ve výstupním roztoku) a po této době bylo dosaženo míry odstranění až 4 $\text{mg N-NO}_3^- \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Obecně lze na základě provedených experimentů konstatovat, že se potvrdilo, že je studovaná metoda odstraňování dusičnanů z vod s využitím autotrofních bakterií *T. denitrificans* pomalejší než alternativní využití heterotrofních organismů. Avšak při odstraňování nízkých koncentrací dusičnanů z vod by zvolení metody autotrofní denitrifikace mohlo být výhodnější, neboť je možné odstraňovat dusičnany až na nulové hodnoty koncentrací, aniž by docházelo k uvolňování toxičtějších dusitanů. Zároveň je anorganický substrát (zde síra) levnější než organický substrát, který je potřeba dodávat heterotrofním organismům.

7 LITERÁRNÍ ZDROJE

- ¹ Muck A.: Základy strukturní anorganické chemie. Academie, Praha, 2006. ISBN 80-200-1326-1.
- ² Gerardi M. H.: Nitrification and denitrification in the activated sludge process. John Wiley and Sons, Inc., New York, 2002. ISBN 978-0-471-06508-1.
- ³ Archana, Sharma S. K., Sobti R. C.: Nitrate removal from Ground water: A Review. E-Journal of Chemistry 9 (4), 2012, str. 1667 - 1675.
- ⁴ Koltuniewicz A. B., Drioli E.: Membranes in clean technology. Volume 1. Wiley, Weinheim, 2008. ISBN 978-3-527-32007-3.
- ⁵ Ward M. H., Jones R. R., Brender J. D., De Kok T. M., Weyer P. J., Nolan B. T., Villanueva C. M., Van Breda S. G.: Drinking water nitrate and human health: An Updated review. International Journal of Environmental Research and Public Health 15 (7), 2018, str. 1557 – 1587.
- ⁶ Liu L. H., Koenig A.: Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: batch experiments. Process Biochemistry 37, 2002, str. 885 - 893.
- ⁷ Vyhláška č. 70/2018 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů.
- ⁸ Wright R. O., Lewander J., Woolf A. D.: Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. Annals of Emergency Medicine 34, 1999, str. 645 - 656.
- ⁹ Brunning-Fann C. S., Kaneene J. B.: The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review. Veterinary and Human Toxicology 35 (6), 1993, str. 521 - 538.
- ¹⁰ Gulis G., Czompolyova M., Cerhan J. R.: An Ecologic Study of Nitrate in Municipal Drinking Water and Cancer Incidence in Trnava District, Slovakia. Environmental Research 88, 2002, str. 182 – 187.
- ¹¹ Smith V. H., Tilman G. D., Nekola J. C.: Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs of freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. Environmental Pollution 100, 1999, str. 179 - 196.
- ¹² Palatý Z.: Membránové procesy. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, 2012. ISBN 978-80-7080-808-5.
- ¹³ Van der Bruggen B., Everaert K., Wilms D., Vandecasteele C.: Application of nanofiltration for removal of pesticides, nitrate and harness from ground water: rejection

- properties and economic evaluation. *Journal of Membrane Science* 193, 2001, str. 239 - 248.
- ¹⁴ Kemperman A. J. B., Rolevink H. H. M., van den Boomgaard Th., Strathmann H.: Hollow-fiber-supported liquid membranes with improved stability for nitrate removal. *Separation and Purification Technology* 12, 1997, str. 119 - 134.
- ¹⁵ Jingjing B., Changsheng P., Huizhen X., Abou-Shady A.: Removal of nitrate from groundwater using the technology of electrodialysis and electrodeionization. *Desalination and Water Treatment* 34, 2011, str. 394 - 401.
- ¹⁶ Schaetzel P., Amang D. N., Nguyen Q. T.: Batch ion-exchange dialysis to extract nitrate from drinking water: a simplified ion transport model for the best membrane selection. *Desalination* 164, 2004, str. 261 - 268.
- ¹⁷ Hrbáčová P., Heviánková S., Chromíková J., Thomas J.: Electrodialysis process to reduce the concentration of nitrates in waters. *Inzynieria Mineralna*, 2017, str. 125 – 130.
- ¹⁸ Belkada F. D., Kitous O., Drouiche N., Aoudj S., Bouchelaghem O., Abdi N., Grib H., Mameri N.: Electrodialysis for fluoride and nitrate removal from synthesized photovoltaic industry wastewater. *Separation and Purification Technology* 204, 2018, str. 108 – 115.
- ¹⁹ Mushtaq S. F., Ganaie M. Y., Mir F. Q.: Review on removal of ionic impurities (arsenic, iron, fluorides and nitrates) using electrodialysis. *Journal of Basic and Applied Engineering Research* 5/6, 2018, str. 479 – 483.
- ²⁰ Jelínek, L., Parschova, H., Matějka, Z., Paidar, M., Bouzek, K.: A combination of ion exchange and electrochemical reduction for nitrate removal from drinking water, Part I: Nitrate removal using a selective anion exchanger in the bicarbonate form with reuse of the regenerant solution, *Water Environment Research* 76, 2004, str. 2686 – 2690.
- ²¹ Jelínek L., Parschová H., Paidar M., Mištová E.: *Desalinační a separační metody v úpravě vody*, 1. vydání. VŠCHT Praha, Praha, 2009. str. 129, ISBN 978-80-7080-705-7.
- ²² Fanning J. C.: The chemical reduction of nitrate in aqueous solution. *Coordination Chemistry Reviews* 199, 2000, 159 - 179.
- ²³ Janda V.: Odstraňování anorganických sloučenin dusíku při úpravě pitné vody. *Sborník konference Pitná voda 2008*, W&ET Team, České Budějovice, 2008. str. 177-188, ISBN 978-80-254-2034-8.
- ²⁴ Gerardi M. H.: *Wastewater bacteria*. John Wiley and Sons, Inc., New York, 2006. ISBN 978-0-471-20691-0

- ²⁵ Beschkov V., Velizarov S., Agathos S. N., Lukova V.: Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal* 17, 2004, str. 141 - 145.
- ²⁶ Xu X., Chen C., Wang A., Yu H., Zhou X., Guo H., Yuan Y., Lee D. J., Zhou J., Ren N.: Bioreactor performance and functional gene analysis of microbial community in a limited-oxygen fed bioreactor for co-reduction of sulfate and nitrate with high organic input. *Journal of Hazardous Materials* 278, 2014, str. 250 - 257.
- ²⁷ Malý J., Malá J.: *Chemie a technologie vody*. Brno: Noel 2000 s.r.o., 1996. ISBN 80-86020-13-4.
- ²⁸ Wallenstein M. D., Myrold D. D., Firestone M., Voytek M.: Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. *Ecological Applications* 16 (6), 2006, str. 2143 - 2152.
- ²⁹ Seitzinger S., Harrison J. A., Bohlke J. K., Bouwman A. F., Lowrance R., Peterson B., Tobias C., Van Drecht G.: Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis. *Ecological Applications* 16 (6), 2006, str. 2064 - 2090.
- ³⁰ Yang X., Wang S., Zhou L. Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. *Bioresource Technology* 104, 2012, str. 65 – 72.
- ³¹ Wang J.-H., Baltzis B. C., Lewandowski L. A.: Fundamental denitrification kinetic studies with *Pseudomonas denitrificans*, *Biotechnology and Bioengineering* 47, 1995, str. 26 - 41.
- ³² Flora J. R. V., Suidan M. T., Islam S., Biswas P., Sakakibara Y.: Numerical modeling of a biofilm-electrode reactor used for enhanced denitrification. *Water Science and Technology* 29 (10-11), 1994, str. 517 - 524.
- ³³ Feleke Z., Sakakibara Y.: Nitrate and pesticide removal by a combined bioelectrochemical/adsorption process, *Water Science and Technology* 43(11), 2001, str. 25 - 33.
- ³⁴ Islam S., Suidan M. T.: Electrolytic denitrification: long term performance and effect of current intensity, *Water Research* 32 (2), 1998, str. 528 - 536.
- ³⁵ Hönesa I., Pospischila A., Berg H.: Electrostimulation of proliferation of the denitrifying bacterium *Pseudomonas stutzeri*, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 44 (2), 1998, str. 275 – 277.
- ³⁶ Beschkov V., Velizarov S., Agathos S. N., Lukova V.: Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochemical Engineering Journal* 17, 2004, str. 141 - 145.

- ³⁷ Vidal S., Rocha C., Galvao H.: A comparison of organic and inorganic carbon controls over biological denitrification in aquaria. *Chemosphere* 48, 2002, str. 445-451.
- ³⁸ Wasik E., Bohdziewicz J., Błaszczak M.: Removal of nitrates from ground water by a hybrid process of biological denitrification and microfiltration membrane. *Process Biochemistry* 37, 2001, str. 57 – 64.
- ³⁹ Adav S. S., Lee D. J., Lai J. Y.: Enhanced biological denitrification of high concentration of nitrite with supplementary carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 2010, str. 773 – 778.
- ⁴⁰ Oh S.-E., Kim K.-S., Choi H.-C., Cho J., Kim I. S.: Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying bacteria. *Water Science and Technology* 42 (3-4), 2000, str. 59 - 68.
- ⁴¹ Kargi F., Uygur A.: Effect of carbon source on biological nutrient removal in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology* 89, 2003, str. 89 – 93.
- ⁴² Ge S., Peng Y., Wang S., Lu C., Cao X., Zhu Y.: Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: The effects of carbon sources and COD/NO₃-N. *Bioresource Technology* 114, 2012, str. 137 – 143.
- ⁴³ Glass C., Silverstein J.: Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* 32 (3), 1998, str 831 – 839.
- ⁴⁴ Chiu Y.-C., Chung M.-S. Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51, 2003, str. 43 – 49.
- ⁴⁵ Ni B.-J., Rusalleda M., Pellicer-Nacher C., Smets B. F.: Modeling nitrous oxide production during biological nitrogen removal via nitrification and denitrification: extensions to the general ASM models. *Environmental Science and Technology* 45, 2011, str. 7768 – 7776.
- ⁴⁶ Pan Y., Ye L., Ni B.-J., Yuan Z.: Effect of pH on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Water research* 46, 2012, str. 4832 – 4840.
- ⁴⁷ Xu G., Peng J., Feng C., Fang F., Chen S., Xu Y., Wang X.: Evaluation of simultaneous autotrophic and heterotrophic denitrification processes and bacterial community structure analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2015, str. 1 – 9.
- ⁴⁸ Liu H., Jiang W., Wan D., Qu J.: Study of a combined heterotrophic and sulfur autotrophic denitrification technology for removal of nitrate in water. *Journal of Hazardous Materials* 169, 2009, str. 23 – 28.

- ⁴⁹ Zhou W., Sun Y., Wu B., Zhang Y., Huang M., Miyanaga T., Zhang Z.: Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur - limestone. *Journal of Environmental Sciences* 23 (11), 2011, str. 1761 – 1769.
- ⁵⁰ Torrentó C., Cama J., Urmeneta J., Otero N., Soler A.: Denitrification of groundwater with pyrite and *Thiobacillus denitrificans*. *Chemical Geology* 278, 2010, str. 80 – 91.
- ⁵¹ Zhu I., Getting T.: A review of nitrate reduction using inorganic materials. *Environmental Technology Reviews* 1 (1), 2012, str. 46–58.
- ⁵² Soares M. I. M.: Denitrification of groundwater with elemental sulfur. *Water Research* 36, 2002, str. 1392 - 1395.
- ⁵³ Sun Y., Nemati M.: Evaluation of sulfur - based autotrophic denitrification and nitrification for biological removal of nitrate and nitrite from contaminated waters. *Bioresource Technology* 114, 2012, str. 207 – 216.
- ⁵⁴ Oh S. E., Yoo Y. B., Young J. C., Kim I. S.: Effect of organics on sulfur - utilizing autotrophic denitrification under mixotrophic conditions. *Journal of Biotechnology* 92, 2001, str. 1 – 8.
- ⁵⁵ Koenig A., Liu L. H.: Microbial aspects of autotrophic denitrification of wastewaters. *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology - Molecular Technology, Nutrient Removal, Sludge Reduction, and Environmental Health (1st Edition)*. Elsevier. 2001, str. 217 - 226. ISBN 978-0-444-50563-7.
- ⁵⁶ Fajardo C., Mora M., Fernández I., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Méndez R.: Cross effect of temperature, pH, and free ammonia on autotrophic denitrification process with sulphide as electron donor. *Chemosphere* 97, 2014, str. 10 - 15.
- ⁵⁷ Zhang T. C., Lampe D. G.: Sulfur:limestone autothropic denitrification processes for treatment of nitrate – contaminated water: batch experiments. *Water Research* 33, 1999, str. 599 – 608.
- ⁵⁸ Arbiv R., Rijn J.: Performance of a treatment system for inorganic nitrogen removal in intensive aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 14, 1995, str. 189 – 203.
- ⁵⁹ Rocca C.D., Belgiorno V., Meric S.: Heterotrophic/autotrophic denitrification (HAD) of drinking water: prospective use for permeable reactive barrier. *Desalination* 210, 2007, str. 194 – 204.
- ⁶⁰ Huang G., Huang Y., Hu H., Fei L., Ying Z., Deng R.: Remediation of nitrate-nitrogen contaminated groundwater using a pilot-scale two-layer heterotrophic-autotrophic denitrification permeable reactive barrier with spongy iron/pine bark. *Chemosphere* 130, 2015, str. 8 – 16.

- ⁶¹ Wang Z., Wang Q., Li R., Zhang Z.: Nitrate-contaminated water remediation supported by solid organic carbon and ZVI-combined system. *Water Air and Soil Pollution* 226 (3), 2015, str. 1- 10.
- ⁶² Schipper L.A., Robertson W.D., Gold A.J., Dan B.J., Cameron S.C.: Denitrifying bioreactors-an approach for reducing nitrate loads to receiving waters. *Ecological Engineering* 36 (11), 2010, str. 1532–1543.
- ⁶³ Schmidt C.A., Clark M.W.: Efficacy of a denitrification wall to treat continuously high nitrate loads. *Ecological Engineering* 42, 2012, str. 203–211.
- ⁶⁴ Wang J., Chu L.: 2016. Biological nitrate removal from water and wastewater by solidphase denitrification process. *Biotechnology Advances* 34 (6), 2016, str. 1103–1112.
- ⁶⁵ Li R., Feng C., Hu W., Xi B., Chen N., Zhao B., Liu Y., Hao C., Pu J.: Woodchip-sulfur based heterotrophic and autotrophic denitrification (WSHAD) process for nitrate contaminated water remediation. *Water Research* 89,2016, 171–179.
- ⁶⁶ Shao, M., Zhang, T., Fang, H. H.: Sulfur-driven autotrophic denitrification: diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, str. 1027 – 1042.
- ⁶⁷ Sublette, K. L.: Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 1987, str. 690 – 695.
- ⁶⁸ Sublette K. L., Sylvester N. D.: Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 1987, str. 249 – 257.
- ⁶⁹ Sublette K. L., Sylvester N. D.: Oxidation of hydrogen sulfide by continuous cultures of *Thiobacillus denitrificans*. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 1987, str. 753 – 758.
- ⁷⁰ Sublette K. L., Sylvester N. D.: Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 1987, str. 759 – 761.
- ⁷¹ Mora M., Guisasola A., Gamisans X., Gabriel D.: Examining thiosulfate-driven autotrophic denitrification through respirometry. *Chemosphere* 113, 2017, str. 1- 8.
- ⁷² Solcia R.B., Ramírez M., Fernández M., Cantero D., Bevilaqua D.: Hydrogen sulfide removal from air by biotrickling filter using open-pore polyurethane foam as a carrier. *Biochemical Engineering Journal* 84, 2014, str. 1 - 8.
- ⁷³ Fajardo C., Mosquera-Corral A., Campos J. L., Méndez R.: Autotrophic denitrification with sulphide in a sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Management* 113, 2012, str. 552 - 556.

- ⁷⁴ Beijerinck, M. W.: Phénomènes de réduction produits par les microbes, *Archives Néerlandaises des Sciences Series* 2(9), 1904, str. 131 – 159.
- ⁷⁵ McDonald I. R., Kelly D. P., Murrell J. C., Wood A. P.: Taxonomic relationships of *Thiobacillus halophilus*, *T. aquaesulis* and other species of *Thiobacillus* as determined using 16S rDNA sequencing. *Archives of Microbiology* 166, 1997, str. 394 – 398.
- ⁷⁶ Kelly D. P., Wood A. P.: Confirmation of *Thiobacillus denitrificans* as a species of the genus *Thiobacillus*, in the β -subclass of the *Proteobacteria*, with strain NCIMB 9548 as the type strain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2000, str. 547 – 550.
- ⁷⁷ Haaijer S. C. M., Van der Welle M. E. W., Schmid M. C., Lamers L. P. M., Jetten M. S. M., Op den Camp H. J. M.: Evidence for the involvement of betaproteobacterial *Thiobacilli* in the nitrate-dependent oxidation of iron sulfide minerals. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 2006, str. 439 - 448.
- ⁷⁸ Kaspar, I. I.; Enyart, J. I.: Concrete pipe for the new millennium. Svazek 1368. ASTM International, USA, 2000. ISBN 0-08031-2621-2.
- ⁷⁹ Beller, H. R.; Letain, T. E.; Chakicherla, A.; Kane, S. R.; Legler, T. C.; Coleman, M. A.: Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thiosulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions. *Journal of Bacteriology* 188, 2006, str. 7005 – 7015.
- ⁸⁰ Kelly, D. P.; Wood, A. P.: Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 2000, str. 511 – 516.
- ⁸¹ Beller, H. R.; Chain, P. S. G.; Letain, T. E.; Chakicherla, A.; Larimer, F. W.; Richardson, P. M.; Coleman, M. A.; Wood, A. P.; Kelly, D. P.: The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Journal of Bacteriology* 188, 2006, str. 1473 – 1488.
- ⁸² Beller, H. R.: Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U (IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2005, str. 2170 – 2174.
- ⁸³ P. Justin, D. P. Kelly: Growth kinetics of *Thiobacillus denitrificans* in anaerobic and aerobic chemostat culture. *Journal of General Microbiology* 107, 1978, str. 123 – 130.

- ⁸⁴ Torrentó C., Urmeneta J., Otero N., Soler A., Vinas M., Cama J.: Enhanced denitrification in groundwater and sediments from a nitrate-contaminated aquifer after addition of pyrite. *Chemical Geology* 287, 2011, str. 90 - 101.
- ⁸⁵ Bosch J., Lee K.-Y., Jordan G., Kim K.-W., Meckenstock R. U.: Anaerobic, nitrate dependent oxidation of pyrite nanoparticles by *Thiobacillus denitrificans*. *Environmental Science and Technology* 46, 2012, str. 2095 – 2101.
- ⁸⁶ Sawhney V., Nicholas D. J. D.: Sulfide-linked nitrite reductase from *Thiobacillus denitrificans* with cytochrome oxidase activity: Purification and properties. *Journal of General Microbiology* 106, 1978, str. 119 - 128.
- ⁸⁷ P. Justin, D. P. Kelly: Metabolic changes in *Thiobacillus denitrificans* accompanying the transition from aerobic to anaerobic growth in continuous chemostat culture. *Journal of General Microbiology* 107, 1978, str. 131 – 137.
- ⁸⁸ Watanabe T., Kojima H., Fukui M.: Complete genomes of freshwater sulfur oxidizers *Sulfuricella denitrificans* skB26 and *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H: Genetic insights into the sulfur oxidation pathway of Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 37, 2014, str. 387 - 395.
- ⁸⁹ Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biologie, Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Espero Publishing, s. r. o., Ústí nad Labem, 2005. ISBN 80-902906-2-0.
- ⁹⁰ Atlas, R. M.: *Handbook of media for Environmental microbiology*. 2. vydání. CRC Press, USA, 2005. ISBN 0-8493-3560-4.
- ⁹¹ Zeng H., Zhang T. C.: Evaluation of kinetic parameters of a sulfur-limestone autotrophic denitrification biofilm process. *Water Research* 39, 2005, str. 4941 - 4952.
- ⁹² Koenig A., Liu L.: Autotrophic denitrification of high-salinity wastewater using elemental sulfur: Batch tests. *Water Environment Research* 76, 2004, str. 37 - 46.
- ⁹³ Koenig A., Liu L.: Kinetic model of autotrophic denitrification in sulfur packed-bed reactors. *Water Research* 35, 2001, str. 1969 - 1978.
- ⁹⁴ Moon H. S., Ahn K.-H., Lee S., Nam K., Kim J. Y.: Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. *Environmental Pollution* 129, 2004, str. 499 - 507.
- ⁹⁵ Chung J., Amin K., Kim S., Yoon S., Kwon K., Bae W.: Autotrophic denitrification of nitrate and nitrite using thiosulfate as an electron donor. *Water Research* 58, 2014, str. 169 - 178.

- ⁹⁶ Sierra-Alvarez R., Beristain-Cardoso R., Salazar M., Gómez J., Razo-Flores E., Field J. A.: Chemolithotrophic denitrification with elemental sulfur for groundwater treatment. *Water Research* 41, 2007, str. 1253 - 1262.
- ⁹⁷ Moon H. S., Chang S. W., Nam K., Choe J., Kim J. Y.: Effect of reactive media composition and co-contaminants on sulfur-based autotrophic denitrification. *Environmental Pollution* 144, 2006, str. 802 - 807.
- ⁹⁸ Manconi I., Carucci A., Lens P.: Combined removal of sulfur compounds and nitrate by autotrophic denitrification in bioaugmented activated sludge system. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 2007, str. 551 - 560.
- ⁹⁹ Zhang Z., Lei Z., He X., Zhang Z., Yang Y., Sugiura N.: Nitrate removal by *Thiobacillus denitrificans* immobilized of poly(vinylalcohol) carriers. *Journal of Hazardous Materials* 163, 2009, str. 1090 - 1095.
- ¹⁰⁰ Koenig A., Liu L.: Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification: Continuous flow experiments in pilot-scale packed bed reactors. *Journal of Biotechnology* 99, 2002, str. 161 - 171.
- ¹⁰¹ Beristain-Cardoso R., Gómez J., Méndez-Pampín R.: Sulfide and ammonium oxidation, acetate mineralization by denitrification in multipurpose UASB reactor. *Bioresource Technology* 102, 2011, str. 2549 - 2554.
- ¹⁰² Montalvo S., Huilínir C., Gálvez D., Roca N., Guerrero L.: Autotrophic denitrification with sulfide as electron donor: Effect of zeolite, organic matter and temperature in batch and continuous UASB reactors. *International Biodeterioration and Biodegradation* 108, 2016, str. 158 – 165.
- ¹⁰³ Sánchez I., Fernández N., Amils R., Sanz J. L.: Assessment of the addition of *Thiobacillus denitrificans* and *Thiomicrospira denitrificans* to chemolithoautotrophic denitrifying bioreactors. *International Microbiology* 11, 2008, str. 179 - 184.
- ¹⁰⁴ Della Roca C., Belgiorno V., Meric S.: Innovative heterotrophic/autotrophic denitrification (HAD) of drinking water: Effect of ZVI on nitrate removal. *Proceedings of the 9th International Conference on Environmental Science and Technology, Rhodes island, Greece, 2005*, str. 265 – 270.
- ¹⁰⁵ Sorensen, J., Tiedje, J. M., Firestone, R. B.: Inhibition by sulfide of nitric and nitrous-oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*, *Applied Environmental Microbiology* 39, 1980, 105 - 108.
- ¹⁰⁶ Knowles, R.: Denitrification, *Microbiological Reviews* 46, 1982, 43.

- ¹⁰⁷ Straub K. L., Benz M., Schink B., Widdel F., Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron, *Applied Environmental Microbiology* 62/4, 1999, str. 1458-1460.
- ¹⁰⁸ Dolejs, P., Paclik, L., Maca, J., Pokorna, D., Zabranska, J., Bartacek, J.: Effect of S/N ratio on sulfide removal by autotrophic denitrification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 2014, str. 2383 - 2392.
- ¹⁰⁹ Mingfei S.: Autotrophic denitrification in nitrate-induced marine sediment remediation. Ph.D. Thesis, The University of Hong Kong, 2009.
- ¹¹⁰ Gu J. D., Qiu W., Koenig A., Fan Y., Choi E., Yun Z.: Removal of high NO_3^- concentrations in saline water through autotrophic denitrification by the bacterium *Thiobacillus denitrificans* strain MP. *Water Science and Technology* 49, 2004, str. 105 - 112.
- ¹¹¹ Zhao Z., Qiu W., Koenig A., Fan X., Gu J. D.: Nitrate removal from saline water using autotrophic denitrification by the bacterium *Thiobacillus denitrificans* MP-1. *Environmental Technology* 25, 2004, str. 1201 - 1210.
- ¹¹² Creighton T. E.: *Encyclopedia of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc, 1999.
- ¹¹³ Patrinos G. P., Ansorge W. J.: *Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future*. Molecular Diagnostics, 2nd Edition, 2010, str. 1-11.
- ¹¹⁴ Rolfe M. D., Rice C. J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A. D. S., Alston M., Stringer M. F., Betts R. P., Baranyi J., Peck M. W., Hinton J. C. D.: Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* 194/3, 2012, str. 686-701.
- ¹¹⁵ Gutzreeware I. G. R.: Freeware for pH and acid-base equilibrium calculations and for simulation and analysis of Potentiometric Titration Curves – CurTiPot. http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html [citováno dne 5.3.2020]