TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Intenzifikace bakteriálního růstu na nanovlákenných sítích s využitím externích magnetických polí

Diplomová práce

Studijní program: N3942 - Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T002 - Nanomateriály

Autor práce: Bc. Tomáš Janoušek

Vedoucí práce: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.

V Liberci 30. 04. 2019

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií

Intensification of bacterial growth on the nanofiber networks using external magnetic fields

Master thesis

Study programme: N3942 - Nanotechnology

Study branch: 3942T002 - Nanomaterials

Author: Bc. Tomáš Janoušek

Supervisor: Ing. Lucie Svobodová, Ph.D.

V Liberci 30. 04. 2019



Zadání diplomové práce

Intenzifikace bakteriálního růstu na nanovlákenných sítích s využitím externích magnetických polí

Jméno a příjmení: Osobní číslo: Studijní program: Studijní obor: Akademický rok:

Bc. Tomáš Janoušek M14000215 N3942 Nanotechnologie Nanomateriály Zadávající katedra: Ústav nových technologií a aplikované informatiky 2018/2019

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte odborné rešerše se zaměřením se na: využití nanotechnologií při čištění odpadních vod (především nanovlákna); teorie a charakterizace magnetického pole; možnosti využití magnetického pole v biologii (vliv na mikroorganismy). Zdrojem budou především aktuální vědecké články na Web of Science, ScienceDirect apod.

2. Na základě literární rešerše zvolte typ magnetického pole (intenzitu, frekvence aj.), volbu zdůvodněte. Navrhněte a sestavte laboratorní uspořádání testu s cílem intenzifikace růstu biofilmu na polymerních nanovlákenných nosičích. Proveďte měření fyzikálních parametrů magnetického pole (frekvence, doba působení, mágnetická indukce a další).

3. Nastudujte možnosti hodnocení vývoje biofilmu na nanovlákenných sítích (mikroskopické metody) a v průběhu experimentu provádějte sledování nosičů. Provozujte laboratorní model a vyhodnotte vliv magnetického pole na reálné mikroorganismy (především rychlost biodegradace). Identifikujte limitní stavy reaktorů (například maximální/minimální intenzifikace/restrikce bakteriálních populací).

4. V rámci diskuse vyhodnoťte vliv magnetického pole na bakteriální růst (bakteriální biofilm). Vyhodnoťte důležitost polymerních nanovlákenných nosičů v bioreaktoru a jejich vliv na růst bakteriálního biofilmu.

 Výsledky statisticky a graficky zpracujte. Proveďte diskusi výsledků s odbornou literaturou. Sepište závěry práce. Popište možné využití v reálné praxi.

Rozsah grafických prací: Rozsah pracovní zprávy: Forma zpracování práce: dle potřeby 40 – 50 stran tištěná/elektronická



Seznam odborné literatury:

 DIALLO, M., et al.: Nanotechnology Applications for Clean Water. William Andrew, 1st ed., ISBN-10: 0815515782, ISBN-13: 978-0815515784, 2009.
PAPAZOGLOU, E. S., PARTHASARATHY, A., BioNanotechnology. Morgan and Claypool Publishers, 1st ed., ISBN-10: 1598291386, ISBN-13: 978-1598291384, 2007.
HAÑKA, L: Teorie elektromagnetického pole, SNTL, ISBN 0450682, Praha 1975.
KATO, M.: Electromagnetics in Biology, Springer 2006, ISBN-13 978-4-431-27913-6.
SEDLÁK, B., STOLL, I.: Elektřina a magnetismus. Praha: ACADEMIA, 2002. ISBN 80-200-1004-1.

Vedouci práce:	Ing. Lucie Svobodová, Ph.D. Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Konzultant práce:	Ing. Tomáš Lederer, Ph.D. Ústav nových technologií a aplikované informatiky
Datum zadání práce:	20. března 2019
Předpokládaný termín odevzdání:	31. ledna 2020

L. S.

prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D. děkan Ing. Josef Novák, Ph.D. vedoucí ústavu

V Liberci 20. března 2019

Prohlášení

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

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

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

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím diplomové práce a konzultantem.

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

Datum

Podpis

Poděkování

Velice bych chtěl poděkovat za odborné vedení při práci v laboratoři, rady a poskytnuté vědomosti paní Ing. Lucii Svobodové Ph.D. a panu Ing. Tomáši Ledererovi Ph.D. Dále bych chtěl poděkovat zaměstnancům školy a studentům, se kterými jsem se setkal v laboratoři sanačních technologií ústavu NTI a laboratoři biotechnologií Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace TUL, za příjemné pracovní prostředí.

Abstrakt

Práce se zabývá využitím (elektro)magnetického pole a nanovlákenných nosičů biomasy v biologickém hybridním reaktoru. Hlavním cílem je intenzifikovat bakteriální růst a tvorbu biofilmu na nanovlákenných nosičích za pomoci magnetického pole. Vliv magnetického pole je sledován pomocí obrazové analýzy mikroskopických snímků nosiče, pořízených optickým a fluorescenčním mikroskopem; měřením koncentrací degradovaných substrátů a stanovením sušiny a proteinů bakteriální populace. Pro práci je využita bakterie *Rhodococcus erythropolis* adaptovaná na vyšší koncentrace fenolu. Experimenty byly provozovány jako semikontinuální průtokové bioreaktory se stejným typem nanovlákenného nosiče, kde byly porovnávány reaktory s různým typem magnetického pole oproti kontrolnímu reaktoru, který nebyl vystaven magnetickým polím.

Klíčová slova: nanovlákenný nosič, magnetické pole, frekvence 50 Hz, biodegradace, fenol, *Rhodococcus erythropolis*

Abstract

The thesis deals with the use of electromagnetic field and nanofibrous biomass carriers in the biological hybrid reactor. The main goal is to intensify bacterial growth and biofilm formation on nanofibrous media using a magnetic field. Magnetic effects are monitored by image analysis of images taken with an optical and fluorescence microscope. By measuring the concentrations of degraded substrates and determining the dry matter and proteins of the bacterial population. The *Rhodococcus erythropolis* bacterium adapted to phenol is used for the work. The experiments were run as semicontinuous flow bioreactors with the same type of nanofibrous carrier, where reactors with different types of magnetic fields were compared against a control reactor not exposed to magnetic fields.

Keywords: nanofibre carrier, magnetic field, frequency 50 Hz, biodegradation, phenol, rhodococcus erythropolis

Obsah

Úvod	
1.	Teoretická část – vypracované odborné rešerše13
1.1.	Bakterie Rhodococcus Erythropolis13
1.2.	Mikrobiální biofilm14
1.2.1.	Tvorba biofilmu14
1.2.2.	Látková výměna v biofilmu15
1.3.	Imobilizace biofilmu16
1.3.1.	Komerční nosiče biofilmu17
1.4.	Využití nanotechnologie při čištění odpadních vod17
1.4.1.	Nanovlákenné nosiče biofilmu19
1.5.	Elektromagnetické pole21
1.5.1.	Nízkofrekvenční elektromagnetická pole22
1.6.	Možnosti využití magnetického pole v biologii23
1.7.	Fenol
1.8.	Degradace fenolu pomocí Rhodococcus erythropolis25
1.9.	Vliv prostředí na biodegradaci26
1.9.1.	Abiotické faktory
1.9.2	Biologické faktory
2.	Cíle práce
3.	Materiály a metody
3.1.	Materiály
3.1.1.	Bakterie
3.1.2	Použité chemikálie
3.1.3	Použitý materiál / zařízení
3.1.4	Nanovlákenný nosič
3.1.5.	Modelový zásobní roztok30
3.2.	Metody
3.2.1.	Kyvetové testy
(CHSK
]	Fenoly
L	Amonné ionty
3.2.2.	Optická mikroskopie
]	Hodnocení biofilmu
3.2.3.	Hodnocení buněčné životaschopnosti

3.2.4.	Měření pH	34
3.2.5.	Měření měrné vodivosti – salinita	34
3.2.6.	Měření absorbance	34
3.2.7.	Stanovení proteinů	34
3.2.8.	Stanovení sušiny	35
3.2.9.	Měření intenzity magnetického pole	35
4.	Návrh a sestavení biologického hybridního reaktoru	36
4.1.	Magnetické pole v modelu	36
4.1.1.	Návrh magnetického pole v kontaktorech	36
4.1.2.	Realizace magnetického pole v kontaktorech	
4.2.	Laboratorní uspořádání experimentu	39
4.3.	Návrh systému měření	42
5.	Výsledky provozu laboratorního modelu a diskuze	44
5.1.	Degradace fenolu	44
5.2.	Vývoj absorbance	46
5.3.	Srovnání koncentrace amonných iontů s koncentrací fenolů	48
5.4.	Sledování hodnoty pH	48
5.5.	Životaschopnost bakteriální populace v suspenzi	51
5.6.	Vývoj bakteriálního biofilmu na nanovlákenném nosiči	53
5.7.	Analýza obrazu snímků z optické mikroskopie	56
6.	Identifikace limitních stavů biofilmových hybridních reaktorů	59
7.	Příklad uvedení do praxe	60
8.	Závěr	63
Sezna	am používané literatury a zdroje	65
Příloh	ıy	70
A Výj	počty chyb	70
B Sro	ovnání měrné vodivosti (salinity) a absorbance	71

Seznam ilustrací

Obrázek 1 Příklady mikrobiálních biofilmů, z leva biofilm na nanovlákenném nosiči	14
Obrázek 2 Tvorba biofilmu	15
Obrázek 3 Příklady imobilizovaného biofilmu na nanovlákenném nosiči[8]	16
Obrázek 4 AnoxKaldnes, komerční nosič biofilmu	17
Obrázek 5, ActiveCell komerční nosič biofilmu	17
Obrázek 6 Fluidní nanovlákenný nosič biofilmu, vyvinutý na Technické univerzitě v Liberci	20
Obrázek 7 Rámečky s nanovlákennou nití, vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci	20
Obrázek 8 Strukturní vzorec fenolu	24
Obrázek 9 Degradační řada fenolu	26
Obrázek 10 Rámečky s nanovlákennou nití, vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci	30
Obrázek 11 Příze s PU nanovlákny, SEM 500x zvětšené	30
Obrázek 12 Příze s PU nanovlákny 2, SEM 500x zvětšené	30
Obrázek 13 Originální fotografie nasnímaného nosiče	32
Obrázek 14 Vyhodnocený biofilm z HSV barevného prostoru	32
Obrázek 15 Grafické znázornění magnetického pole v modelu a kontaktoru	36
Obrázek 16 Simulace magnetického pole	37
Obrázek 17 Simulace magnetického pole v kontaktoru	38
Obrázek 18 Kontaktory – kolejnice s magnety a jejich uspořádáním	39
Obrázek 19 Nákres laboratorního modelu	41
Obrázek 20 Laboratorní model experimentu, reaktory s kolejnicovým kontaktorem	42
Obrázek 21 Schéma tělesa kontaktoru	61
Obrázek 22 Rám pro nanovlákenné jádrové příze	62

Seznam grafů

Graf 1 Průběžná koncentrace fenolu v reaktoru	45
Graf 2 Průběh degradace fenolu	45
Graf 3 Srovnání absorbance s koncentrací dávkovaného fenolu	46
Graf 4 Srovnání absorbance a degradovaného fenolu	47
Graf 5 Srovnání koncentrace NH4Cl s koncentrací dávkovaného fenolu	48
Graf 6 Srovnání pH s koncentrací fenolu	50
Graf 7 Srovnání měrné elektrické vodivosti (salinita) a absorbance	71
Graf 8 Srovnání množství živých suspendovaných bakterií v reaktoru ke kontrole	51
Graf 9 Srovnání živých suspendovaných bakterií ku degradovanému fenolu	52
Graf 10 Vyhodnocení živého biofilmu na vláknech v reaktoru ke kontrole	53

Graf 11 Srovnání poměru živého biofilmu a degradovaného fenolu	55
Graf 12 Porovnání plochy biofilmu na nosiči	57
Graf 13 Porovnání plochy biofilmu na nosiči k absorbanci	58

Seznam tabulek

Tabulka 1 Měřené parametry	43
Tabulka 2 Odběry vzorků	43
Tabulka 3 Hmotnost sušiny suspendovaných bakterií v reaktorech	52
Tabulka 4 Koncentrace proteinů v reaktorech	56

Seznam použitých termínů a zkratek

pheA1A2	enzym katalyzující reakci degradace fenolu
catA, catB, catC	enzymy štěpící jednotlivé meziprodukty v procesu degradace fenolu
РНН	fenol hydroxyláza
C1,2DO	catechol 1,2- dioxygenáza
MCL	muconate cycloisomeráza
MLI	muconolacton isomeráza
рН	potenciál vodíku
mT	militesla
mS/cm	milisiemens na centimetr
dtex	decitex – jednotka jemnosti příze (1g hmotnosti na 10km příze)
PVA	polyvinylalkohol
КТЈ	kolonie tvořící jednotky
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
PU	polyuretan

Úvod

Diplomová práce se zabývá vlivem elektromagnetického pole na bakterii *Rhodococcus Erythropolis* v biologickém hybridním reaktoru. Bakterie je schopná degradovat a rozkládat fenol a využít ho jako jediný zdroj uhlíku a energie, při laboratorní teplotě. Fenol patří mezi problematické polutanty životního prostředí.

Cílem práce je sledování degradace fenolu bakterií *Rhodococcus erythropolis*, za přítomnosti různých uspořádání magnetického pole. Magnetické pole ovlivňuje buněčnou membránu a přesun iontů skrze ni. Požadovaný účinek spočívá ve zlepšení degradace fenolu pomocí ovlivněných bakterií a zkoumání dlouhodobých účinků pole na bakterie. Cílem práce je také intenzifikovat schopnost bakterií kolonizovat nanovlákenné nosiče a tvořit na nich stabilní biofilm.

Tato práce přímo navazuje na mou předchozí bakalářskou práci, kde jsem se zabýval obdobnou otázkou ohledně magnetického pole a jeho účinků na tuto bakterii. Při studiu účinků magnetického pole v bakalářské práci jsem zjistil, že nestacionární pole má vliv na bakterii a při určité frekvenci a intenzitě má vliv pozitivní a při jiných zase negativní. V diplomové práci přímo navazuji na zjištěné druhy magnetických polí, se kterými dále pracuji a rozvíjím myšlenku užití statického magnetického pole v hybridním biologickém reaktoru. Především jde o snahu zjednodušit model reaktoru a snížit případné nároky na energii a zároveň finanční investice.

1. Teoretická část – vypracované odborné rešerše

1.1. Bakterie *Rhodococcus Erythropolis*

Bakterie rodu *Rhodococcus* lze najít v celém přírodním prostředí, například v půdě, hloubkových vrtech, povrchové vodě a mořských sedimentech. Rod *Rhodococcus* byl popsán v roce 1891, ale teprve nedávno došlo k rozsáhlému přeorganizování taxonomie celého rodu. Mnoho druhů bylo z rodu *Rhodococcus* vyřazeno, jiné k němu byly přesunuty z příbuzných rodů a další zástupci byli nově objeveni a popsáni. Tyto razantní úpravy byly umožněny díky moderním taxonomickým metodám. Klasické metody zařazení druhů na základě fyziologické podobnosti a chemického složení buněčné stěny byly doplněny metodami genetickými, mezi které patří určování míry příbuznosti na základě podobnosti RNA, nebo stanovení příbuznosti pomocí hybridizace DNA-DNA. Hlavními představiteli rodu jsou druhy *R. equi, R. fascians, R. erythropolis, R. rhodnii, a R. rhodochrous* [1]. V současné době je popsáno více než čtyřicet druhů rhodokoků. Společnou charakteristikou tohoto rodu je přítomnost mykolových kyselin v buněčné stěně [1].

Bakterie rodu Rhodococcus isou grampozitivní, nesporulující, aerobní, nepohyblivé a chemoorganotrofní organizmy. Vyznačují se vysokou aktivitou enzymů [2] a myceliálním růstem, v jehož pozdní fázi dochází k fragmentaci mycelia na tyčinkovité či kokovité útvary [1]. Prosperují dobře na standardních laboratorních půdách, za předpokladu, že nejsou adaptovány na konkrétní typ polutantu (například fenol). Bakterie adaptované na konkrétní typ polutantu (konkrétně například fenol) neprosperují na klasických půdách, jako je agar. Pro kultivaci je potřeba přidat do média nízkou koncentraci příslušného polutantu. Buněčná stěna rhodokoků je složena ze tří vrstev, vnitřní peptydoglykanové, střední arabinogalaktanové a vnější lipidové. Peptydoglykan je složený z Nacetylglukosaminu a N-glykolylmuramové kyseliny, D-alaninu, L-alaninu, D-glutamátu a kyseliny meso-diaminopimelové [1]. Běžné nasycené a nenasycené mastné kyseliny doprovází kyselina tuberkulostearová. Cukerné složky stěny tvoří D-arabinóza a D-galaktóza [1]. Fosfolipidy jsou zastoupeny kardiolipinem, fosfatydylethanolaminem, fosfatidylinositolem a fosfatidylinositol manosidem [1].

Rhodococcus erythropolis je biologický činitel využívaný při čištění odpadních vod a významný je díky rychlému růstu a velkému metabolickému potenciálu [2]. Bakterie mají schopnost odbourávat (degradovat) širokou škálu organických polutantů, včetně obtížně odbouratelných (například aromatické uhlovodíky toluen, naftalen, anilín a fenol) [2]. Tato vlastnost je dána jejich pestrou buněčnou fyziologií [2]. Dokáže prosperovat v prostředí o teplotách v rozmezí 10 °C až 40 °C, vysoké salinitě (až 100 mS/cm) a přitom disponuje vysokou účinností biologické aktivity při čištění odpadní vody [3]. Tvoří velmi dobře stabilní biofilm, hlavně v prostředí s extrémními podmínkami, kde volná

bakteriální suspenze usedne na téměř jakýkoliv pevný povrch a vytvoří biofilm, ve kterém lépe odolává vnějším podmínkám [3].

1.2. Mikrobiální biofilm

Mikroorganismy žijící pohromadě v hydratované extracelulární matrix, adherované na libovolném povrchu, se nazývají biofilm [4]. Vyvíjí se téměř na všech površích v prostředí, výjimkou jsou prostředí s velmi extrémními podmínkami (teplota, pH, koncentrace polutantů atd.) a naopak velmi dobře vzniká na povrchu s vysokou pórovitostí. Většinou jsou tvořeny rozmanitou škálou bakterií; rozsáhlá přítomnost mikrobiálních biofilmů v přírodě naznačuje, že existence v určitém uskupení je výhodná a klíčová pro přežití v extrémním prostředí [4]. Fyzikální a chemický charakter biofilmu je to, co přispívá k rezistenci vůči vnějším podmínkám [4]. Vrstva stabilního biofilmu je většinou dostatečně silná pro pozorování pouhým okem [4].



Obrázek 1 Příklady mikrobiálních biofilmů, z leva biofilm na textilním vlákně s nanovlákenným pokryvem [8], uprostřed biofilm na plastovém povrchu [8], na pravé straně příklad rostoucího biofilmu volně v přírodě na kamenech [48]

1.2.1. Tvorba biofilmu

Bakterie v biofilmu vytvářejí vzájemnou agregací mikrokolonie obklopené polysacharidovou, nebo proteinovou substancí, kterou samy produkují [5]. Extracelulární polysacharidová (proteinová) substance tvoří přibližně 85 % objemu biofilmu a je protkaná rozsáhlou sítí mikrokanálků, které zajišťují proudění vody, plynů, distribuci živin a vylučování metabolitů [5]. Na rozdíl od planktonních forem mikroorganizmů, nebo volným suspendovaným bakteriím, mají bakterie rostoucí v biofilmu pozměněné fyziologické a fenotypové vlastnosti (odlišnou rychlost růstu, změny v expresi genů), snáze tak odolávají vlivům prostředí [5].



Obrázek 2 Tvorba biofilmu. I.a – fyzikální adheze bakterií, I.b – chemická adheze (proteiny), II. – tvorba extracelulární matrix, III. – uvolňování buněk do okolí a degradace extracelulární matrix [5]

Tvorba biofilmu je ovlivněna mnoha faktory, které přispívají ke stabilitě, nebo rozrušení extracelulární matrix [48]. Pro prvotní přichycení buněk k povrchu, jsou důležité její povrchové vlastnosti jako přítomnost bičíků, fimbrií (vláknité výrůstky) a přítomnost polysacharidů a bílkovin, které fungují jako lepidlo, pomocí kterého buňka přilne k povrchu [48]. Prvotní vazba na povrch je indukována signály z prostředí jako je koncentrace živin, pH, teplota, koncentrace kyslíku, salinita a koncentrace polutantů [4]. První fáze tvorby biofilmu (adsorpce na povrch) trvá pouze několik sekund a napomáhají jí bičíky, nebo fimbrie [4]. Tato fáze je ještě vratná. V druhé fázi, která nastává pouze několik minut po první, bakterie začnou s dělením a tvorbou jednovrstvé kolonie [4]. Dále dochází k produkci extracelulární polysacharidové substance (polysacharidy a enzymy) a samotné matrix, ve které spolu buňky komunikují pomocí chemických signálů [4]. Vytvořená extracelulární matrix drží buňky pohromadě a udržuje jejich strukturu [4]. Z okrajů vzniklého biofilmu se mohou uvolňovat planktonní (suspendované) buňky, které následně mohou kolonizovat další povrchy [4].

1.2.2. Látková výměna v biofilmu

Biofilm je protkaný vodními kanálky, jimiž proudí voda, která tak může difundovat do většiny objemu biofilmu. Voda difúzující biofilmem proudí z vnějšího prostředí skrze jeho povrch, který je tvořen množstvím kanálků a pórů a umožňuje tak transport hmoty z prostředí dovnitř, ven a uvnitř samotného biofilmu. Základním mechanizmem je molekulární difůze a její rychlost závisí na koncentraci rozpuštěných látek ve vodě a jejich molekulární hmotnosti, obecně se rychlost difůze pohybuje okolo 40 – 80 % rychlosti difůze v čisté vodě. Tento mechanizmus umožňuje přístup buněk uvnitř biofilmu ke kyslíku, živinám, zdroji uhlíku (polutanty – fenol) a zároveň odvádí nežádoucí látky a odpady z biofilmu ven. Matrice biofilmu je velmi heterogenní prostředí z pohledu jeho struktury a reakcím, které v něm probíhají. Síla biofilmu je důležitý parametr ovlivňující transport látek uvnitř, v reálných aplikací biofilmových reaktorů může síla biofilmu snadno přesáhnout 5 mm, což zapříčiní, že degradačních a oxidických procesů se neúčastní celá vrstva, ale jen ta, která je dostatečně penetrována

okysličenou vodou a rozpuštěnými látkami. Obecně uvažovaná tloušťka aktivního biofilmu se pohybuje okolo 0,15 mm. Výsledná síla biofilmu je ovlivněna mechanickým otěrem v prostředí (rychlost proudění kapalin a intenzitou aerace), samovolným uvolňováním planktonních buněk ze zralého biofilmu a látkovým zatížením. Silný biofilm bude více náchylný na mechanické vlivy okolí a lépe se odlupovat od povrchu a zároveň difůze bude probíhat hůře, než u tenké vrstvy [48].

1.3. Imobilizace biofilmu

Imobilizace bakteriální kultury je technika, při které dojde k omezení pohybu buněk, ale nezmění se jejich metabolická aktivita [7]. Imobilizací se vytvoří biofilm a jeho buňky mají oproti neimobilizovaným mnoho výhod, například manipulace s imobilizovanými buňkami je mnohem snazší, lze je lehce vyjmout z reaktoru a dále s nimi pracovat aniž by došlo k okamžitému poškození. Mikroorganismy lze imobilizací prostorově lokalizovat a zvýšit jejich odolnost vůči nepříznivým vnějším podmínkám [7]. Pro imobilizaci buněk existuje několik metod: adheze na povrch vhodného nosiče, zachycení buněk do nosiče, mikroenkapsulace a imobilizace bez účasti nosiče, kdy se buňky převedou pomocí flokulace nebo zesítění na agregáty s lepšími sedimentačními vlastnostmi (vločky) [20]. Mikroenkapsulace znamená obklopení několika buněk tenkou, polopropustnou membránou, díky čemuž vznikne jakási "vločka" [20]. Výběr vhodné metody imobilizace závisí na systému čištění odpadní vody [20].

Nosič biofilmu nesmí snižovat biokatalytickou aktivitu buněk, reagovat se substrátem, živinami ani s produkty, nesmí se rozpouštět a nejlépe by měl mít vysoký difuzní koeficient pro substrát, produkt i živiny [20]. Nutnou podmínkou pro všechny nosiče biofilmů využívaných při čištění odpadních vod je rezistence vůči biodegradaci a nezávadnost pro životní prostředí [20]. Stavba a růst biofilmu závisí na vlastnostech kolonizovaného povrchu, především na jeho pórovitosti a rozměrech pórů, ve kterých dochází k uchycení buňky [3]. Materiál s vysokou pórovitostí má vysoký měrný povrch, na kterém se může biofilm uchytit, tudíž celková adheze biofilmu k povrchu je vyšší a tím se zvýší jeho mechanická odolnost především proti odlupování, vlivem proudění kapaliny okolo biofilmu (tzv. střižné síly) [3].



Obrázek 3 Příklady imobilizovaného biofilmu na nanovlákenném nosiči [8]

1.3.1. Komerční nosiče biofilmu

Základní technologie komerčních biofilmových nosičů využívá polymerních výlisků [9]. Povrchy nosičů mají vhodný povrch pro růst organismů a tvorbu biofilmu [9]. Jedna z možných technik upoutávání bakterií na pohybujícím se nosiči je známá pod zkratkou MBBR (Moving bed biofilm reactors) [9]. Pohybující se nosič biofilmu v bioreaktoru je vyroben z malého drážkovaného materiálu, který má velkou styčnou plochu pro uchycení bakterií, což má za následek zvýšení koncentrace bakterií [9]. Názorným příkladem komerčních nosičů biofilmu jsou AnoxKaldnes (Veolia Water Technologies), ActiveCell (Headworks International Inc) atd. [21].





Obrázek 4 AnoxKaldnes, komerční nosič biofilmu[11]

Obrázek 5, ActiveCell komerční nosič biofilmu [10]

1.4. Využití nanotechnologie při čištění odpadních vod

Velmi častou metodou přípravy nanostruktur pro aplikace v oblasti čištění odpadních vod, je elektrospinnig, který je jednoduchý, efektivní a levný způsob vytvářející ultrajemná vlákna s použitím různých materiálů (např. polymerů, keramiky nebo dokonce kovů). Strukturu a prostorové uspořádání nanovláken lze snadno upravovat pro specifické aplikace. Příkladem jsou nanovlákenné membrány připravené z různých polymerů, které mohou odstranit mikronové částice z vodné fáze. Nanovlákna lze dotovat různými částicemi (TiO₂, keramické materiály) které mohou zlepšovat filtrační a čistící vlastnosti. Dále mohou být využity jako platforma pro konstrukci 3D struktur jako jsou membránové filtry, nebo nosiče biomasy. Nanovlákenné membrány jsou především zaměřené na vytváření synergického efektu, nebo multifunkce membrány (samočisticí efekty, antibakteriální vlastnosti atd.) [31].

Reaktory obsahující systém s fixním ložem se často používají pro zintenzivnění biologického čištění odpadních vod [36]. V těchto provozních jednotkách byla použita a testována řada různých nosičů biofilmů. Autoři práce zabývající se využitím nosičů biomasy využívající nanovláken (JURECSKA, Laura, at al. 2013) studovali čtyři nosiče, konkrétně tři typy polypropylenových vláken a polyesterové vlákno [36]. Vlákna se lišily průměrem (v rozmezí 58 µm, 56 µm, 33 µm a 22 µm) a povrchovým napětím (65,6 mN/m, 50,0 mN/m, 40,4 mN/m a 37,0 mN/m). Pozorovány byly vlastnosti nosiče z hlediska kolonizace a chemické stability. Z jejich výsledků vyplývá, že ideální nosič s nejvyšším obsahem biomasy byl vyroben z polypropylenových vláken, s průměrem vlákna 33 µm a velmi dobrý

je i nosič z polyesterových vláken [36]. Výsledky ukazují, že vysoký měrný povrch je pro rozvoj biofilmu velmi důležitý. Podobná práce (FELFÖLDI, Tamás, at al. 2014) zabývající se kolonizací nanovlákenných nosičů z polyesterových a polypropylenových vláken potvrzují předešlý výzkum (JURECSKA, Laura, at al. 2013). Kde také hrál významnou roli vysoký měrný povrch a jeho pórovitost [37]. Jiná studie (ZHAI, Siyuan, at al. 2017) se zabývá čištěním podzemní vody od dusičnanů a chromu; zde byl využit nanovlákenný nosič z polypropylenu; výhodou nosiče je jeho velký měrný povrch a vysoká pórovitost, díky čemuž je lépe kolonizován a vytváří se stabilní biofilm, který je schopný degradovat polutanty a čistit tak znečištěnou vodu [38].

V článku (SARIOGLU, Omer Faruk, at al. 2017) se objevují rozdíly v bakteriální imobilizaci a bioremediační výkonnosti v závislosti na morfologii a průměru vláken polysulfonu [39]; vlákna byla vyrobena s vyrovnanými, nebo náhodně orientovanými morfologiemi nebo i jako vlákna s tenčími a hrubšími průměry. Vlákna vykazující nejvyšší bakteriální imobilizaci (vybrané z široké škály vzorků), byla použita jako nosná matrice pro testování biodegradace methylenové modři. Bylo zjištěno, že náhodně orientovaná a tenčí vlákna jsou optimálním systémem pro bakteriální imobilizaci; tato vlákna mají potenciální využití při sanaci znečištěné vody [39].

Zajímavým přístupem v oblasti čištění odpadních vod, je výroba nanovláken z polyvinylalkoholu (PVA) ve kterých je enkapsulována bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (SARIOGLU, Omer Faruk, at al. 2017) a následné využití k biologickému čištění odpadní vody obsahující methylenovou modř [35]. Bakterie nejenže proces zvláknění přežijí, ale následně jsou schopné odstraňovat polutant z vody. Proces enkapsulace byl pozorován pomocí SEM a následná viabilita buněk byla pozorována pomocí fluorescenční mikroskopie pro potvrzení živých buněk. Celkově výsledky naznačují, že elektrospinnigem vytvořené nanovlákenné sítě jsou vhodnými platformami pro uchování živých bakteriálních buněk a mohou být použity přímo jako výchozí inokulum pro bioremediaci vodních systémů [35].

Na téma membrán je mnoho publikací, které uvádějí podobné informace, příkladem je studie (BJORGE, Decostere, et al. 2009), která se zabývá porovnáváním funkcionalizovaných membrán vytvořených pomocí elektrospinningu z nanovláken, kdy vlákna vytvořila homogenní vrstvu (membránu). Porovnány byly membrány zachytávající mikroorganizmy, membrány pro odstraňování suspendovaných pevných částic z vody (fungující jako mikrofiltrační jednotka) a ploché nanovlákenné membrány jako alternativa pro obyčejné ploché polymerní membrány (například membrány Kubota používané v membránovém bioreaktoru [51]). Mikrofiltrační membrány mají velikost pórů mezi 0,1 a 10 µm. Závěr studie je, že v případě funkcionalizovaných nanovlákenných membrán, je účinnost odstraňování mikroorganizmů mnohem vyšší, než u obyčejných membrán. To lze vysvětlit skutečností, kdy transmembránový tlak způsobuje u obyčejných membrán rozšiřování pórů a mikroorganizmy tak mohou přejít skrz membránu [32]. Ovšem při aplikaci v membránovém

bioreaktoru vykazují mnohem lepší vlastnosti již užívané komerční membrány, než nanovlákenné membrány. Problém u nanovlákenných membrán v bioreaktoru je zanášení mikroorganizmy a tudíž snižování průtoku v čase [32]. Další práce zabývající se využitím nanovláken (HOLKAR, Chandrakant at al. 2016) při čištění odpadních vod z textilního průmyslu, posuzuje vlastnosti membránových filtrů z nanovláken negativně z hlediska zanášení mikroorganizmy [33]. To je způsobeno vysokou pórovitostí nanovláken a jejich vysokým měrným povrchem. Tyto vlastnosti jsou ideální pro využití v této práci, kde je právě vyžadujeme. Práce pozitivně ovšem hodnotí možnosti funkcionalizace nanovláken [33]. Další možné využití nanovlákenných membrán (DE LA CUEVA BUENO, Patricia, at al. 2016) zkoušeli při čištění odpadní vody, která byla následně použita pro zavlažování polí [34]. Z výsledků jasně vyplývá, že filtrační vlastnosti nanovlákenných membrán jsou vynikající, pokud jde o odstranění mikročástic. Testované membrány byly schopny odstranit všechny mikročástice a tím odpadní vodu velmi dobře přečistit. Do přečištěné vody stačilo přidat pouze vhodná hnojiva a mohla být přímo použita na zavlažování [34].

1.4.1. Nanovlákenné nosiče biofilmu

Nanovlákna jsou užívána pro jejich vysoký měrný povrch, bakteriím to umožňuje vysokou adhezivitu k povrchu nosiče, což v důsledku zjednodušuje imobilizaci bakterií, zejména v úvodních fázích kolonizace, případně také během náročných havarijních stavů. Nanovlákenná technologie umožňuje rychlejší zapracování nosiče a tím také zkrácení potřebné doby regenerace systému. Díky morfologii povrchu (velká pórovitost a malé rozměry pórů) je výsledná struktura biofilmu více stabilní, což reálně zajišťuje stabilnější biodegradaci. Biofilm na tomto nosiči má vyšší schopnost adaptace vůči extrémním podmínkám prostředí, a dokonce dochází ke snížení vlivu skokových změn podmínek v systému na stav biofilmu (jako extrémní teplota, salinita aj.)[49]. Nanovlákna a z nich připravené nanotextilie představují prudce se rozvíjející odvětví materiálového průmyslu, tyto kompozitní materiály mají velký aktivní povrch při nízké specifické hmotnosti a jsou velmi vhodné pro přípravu modifikovaných nosičů přirozených biofilmů cíleně připravených pro specificky znečištěné odpadní vody, ale i pro intenzifikaci klasických čistírenských technologií. Konstrukce nosičů biomasy je zcela zásadní pro dosažení maximální účinnosti čistírenských procesů, přičemž kromě speciálního tvaru jsou důležité materiálové charakteristiky nosičů [26].



Obrázek 6 Fluidní nanovlákenný nosič biofilmu, vyvinut na Technické univerzitě v Liberci [8]



Obrázek 7 Rámečky s nanovlákennou přízí, vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci [8]

Vývoj nanovlákenných nosičů probíhá již několik let. Nosič se skládá z jádrové příze, na kterou je nanesena vrstva nanovláken. První nosná příze byla z bavlny, ale kvůli své vysoké nasákavosti a tvarové nestálosti se brzy ukázala jako nevhodná. Náhradou se stala polypropylenová příze, která se díky své nízké denzitě a vysoké stálosti ukázala jako vhodnější Jádrová příze je vyrobena z polypropylenového vlákna Prolenvir CE (660 dtex, vzduchem tvarovaný). [2, 5, 50]

V současnosti (2019) klastr Nanoprogress ve spolupráci se svými členy pracuje na vývoji nových nosičů biomasy, kterého se autor diplomové práce osobně účastní. V rámci toho projektu jde například o přípravu nanovlákenných vrstev/materiálů, které jsou navinuty na nosnou, jádrovou přízi. Jádrová příze je tvořena polyesterovým hedvábím 1200 dtex, na které je přímo nanesena vrstva nanovláken. Nanovlákna jsou polyuretanová a technologií nanášení je AC elektrospinning. Zásadním problémem nanovlákenných materiálů nanášených na podkladní vrstvy je jejich adheze a následná dezintegrace vlivem okolního prostředí. V tomto případě je použita celá řada na sobě navazujících metod, které fixace nanovláken (autorem metody je autor DP), která zároveň stabilizuje nanovlákna, tudíž jsou mechanicky velmi odolné proti otěru a jiným vnějším vlivům. Dodatečné ovíjení fixační nití (díky zvýšené odolnosti) tak již není za potřebí a proces výroby se zjednodušuje.

Cílem těchto úprav je celkově zjednodušit a zlevnit přípravu základního materiálu pro nosiče biomasy, kterým je jádrová příze s nanovlákennou vrstvou a zároveň zvýšit její celkovou kvalitu. Kvalitní příze s nanovlákennou vrstvou dokáže vytvořit velmi stabilní a vhodné prostředí pro růst bakteriální biomasy, která je schopna se na nanovlákenném podkladu velmi snadno udržet a prosperovat, což má za následek zvýšení efektivity reaktoru a procesu odbourávání polutantů a jiných znečištění z odpadních vod. Dalším krokem je využití těchto materiálů pro fluidní, nebo fixované nosiče biomasy v čistírnách průmyslových a městských odpadních vod.

1.5. Elektromagnetické pole

Pro popis elektromagnetického pole se zavádějí čtyři základní vektorové veličiny (označeny tučně) [17].:

1. vektor intenzity elektrického poleE [V.m-1]

2. vektor magnetické indukce	B [C.m-2]
3. vektor elektrické indukce	D [A.m-1]
4. vektor intenzity magnetického pole	H [T]

V klasické elektrodynamice jsou tyto vektory (spolu s dalšími dvěma veličinami, proudovou hustotou *j* elektrických nábojů a objemovou hustotou volného elektrického náboje ρ) vázány Maxwellovými rovnicemi, na nichž je založena celá stavba klasické teorie elektromagnetismu [17].

Maxwellovy rovnice [17].:

$$rot\mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}$$
$$rot\mathbf{H} = \mathbf{j} + \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t}$$
$$div\mathbf{D} = \rho$$
$$div\mathbf{B} = 0$$

Kde [17].:

$$div = \frac{\partial}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial y} + \frac{\partial}{\partial z}$$
$$rot = \frac{\partial}{\partial y} - \frac{\partial}{\partial z}, \frac{\partial}{\partial z} - \frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial x} - \frac{\partial}{\partial y}$$

V materiálových prostředích s definovanou permitivitou ε , permeabilitou μ a měrnou vodivostí σ platí vztahy[17]:

$$\mathbf{D} = \varepsilon \mathbf{E}$$
$$\mathbf{H} = \frac{\mathbf{B}}{\mu}$$
$$\mathbf{j} = \sigma \mathbf{E}$$

přičemž pro elektricky a magneticky izotropní materiály jsou veličiny ε , μ a σ skaláry, pro materiály anizotropní představují tenzory. Poslední vztah je Ohmův zákon v diferenciálním tvaru [17].

Elektromagnetická pole je možno podle jejich časového průběhu rozdělit na:

a) statická

E či B se s časem nemění [15].

b) pulzní

Složka (nebo složky) vektoru elektrického a magnetického pole osciluje mezi nulovou a určitou hodnotou \mathbf{E}_{max} nebo \mathbf{B}_{max} [15].

c) sinusoidní

Vektory magnetického nebo elektrického pole se mění podle vztahů:

$$\mathbf{B} = \mathbf{B}_m \, \cos \omega t$$
$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_m \, \sin \omega t$$

kde \mathbf{E}_m , \mathbf{B}_m , jsou amplitudy elektrického a magnetického pole (maximální dosažené hodnoty v celém cyklu), $\omega = 2\pi f$ je úhlová frekvence. Velikost pole může být charakterizována pomocí velikosti efektivních hodnot indukcí a intenzit (Bef, Eef,...), které odpovídají střední hodnotě polí v každé půlperiodě [15].

1.5.1. Nízkofrekvenční elektromagnetická pole

Nízkofrekvenční pole mají vlnovou délku obecně dlouhou [15]. Příkladem pro 50 Hz je vlnová délka 6000 km a pro 500 Hz 600 km, což je výrazně vyšší délka, než rozměry exponovaných objektů (pokud jsou rozměry objektů přibližně stejné jako vlnová délka záření, dochází k absorpci energie záření) [15]. Stejně tak jsou pole charakteristická i velkou hloubkou průniku (pro 50 Hz je to 225 m) [15]. Nízkofrekvenční pole přenášejí minimum energie (energie kvanta E = h.f, $h = 6,63.10^{-34}$ J.s⁻¹ Planckova konstanta, tedy E je řádově rovna ~ 10^{-31} J). Oproti energii tepelného šumu, jež se pohybuje řádově v hodnotách kT (kde k = $1,38.10^{-23}$ J.K⁻¹ Boltzmannova konstanta, T absolutní teplota, a to je pro laboratorní teploty ~ 10^{-21} J) je energie elektromagnetického kvanta zanedbatelná [17]. Podobně je tomu i při srovnání s energií chemických vazeb, jež se pohybuje v hodnotách jednoho elektronvoltu ~ $1,6.10^{-19}$ J [17]. S živými organismy interagují nízkofrekvenční pole nepárově, to znamená, jako by působilo magnetické a elektrické pole nezávisle na sobě, každé zvlášť [17]. Díky tomuto charakteru nízkofrekvenčních polí a jejich nízkým energiím můžeme u nich používat názvu elektrická a magnetická pole [17].

1.6. Možnosti využití magnetického pole v biologii

V literatuře lze najít velké množství prací zabývajících se tematikou vlivu elektromagnetických polí na organismy. První práce s touto tématikou byla publikována již začátkem minulého století [47]. Elektromagnetická pole je možné z hlediska posuzování jejich bioefektů rozdělit několika způsoby. Jedná se buď o pole statická, nebo pulzní. Pulzní pole jsou dále členěna podle jejich frekvence. Nejčastěji zkoumanými poli jsou (elektro)magnetické 50 Hz (v zámoří 60 Hz) extrémně nízkofrekvenční pole. Dalšími významnými poli jsou pole mikrovlnná, a to při frekvencích (či v jejich blízkosti): 900, 1800, 1900 MHz (jsou to frekvence, na kterých pracují mobilní telefony druhé generace). Dále se zkoumají účinky polí o frekvenci 2450 MHz jakožto průmyslové frekvence (tzn. frekvence používaná např. u mikrovlnných trub, vysoušecích pecí apod.). V poslední době se však začínají používat i jiné frekvence v mikrovlnném pásmu, a to pro rozšiřující se wi-fi sítě, mobilní telefony třetí generace a jiná bezdrátová zařízení [15]. Pro tuto práci jsou nejvýznamnější studie v pásmu extrémně nízké frekvence pro magnetická pole.

Mikroorganismy patří k modelovým systémům pro zkoumání vlivu vnějšího prostředí, tedy i elektromagnetického pole. Studie s poli a různými bakteriálními kmeny, zejména *Escherichia coli*, zaznamenali stimulaci růstu, inhibici i růst beze změn. Jsou pozorovány rozdílné efekty, různých typů použitých elektromagnetických polí a jejich intenzit na viabilitu *Escherichia coli* [22].

Zájem o využití elektromagnetického pole roste, protože magnetické pole byly dříve zahrnuty jako škodlivé pro lidské zdraví, ale nedávno také jako stimulující pro biologické čištění odpadních vod [23]. I přes rozsáhlou literaturu (Chen a Li, 2008, Ji a kol., 2010, Tomska a Wolny, 2008, Yavuz A Celebi, 2000), stále chybí komplexní pohled týkající se mechanizmů a biologických účinků pole [23]. Magnetické pole může způsobit biologické změny a jsou hodnoceny jako slabé (< 1 mT), střední (1 mT až 1 T), silné (1 až 5 T) a ultra silné (> 5 T). Magnetický tok na zemském povrchu je považován za slabý, protože se pohybuje od 0,03 mT do 0,06 mT [23]. V orientaci diamagnetických anizotropních organických molekul, jako jsou membránové lipidy, je vliv slabého pole pozorován u eukaryotických modelových systémů, a obecně byla zkoumána změna propustnosti membránových iontových kanálů. V prokaryotických systémech slabé pole ovlivnilo růst bakterií, ale výsledky zůstaly neúplné [23]. Pole o intenzitě 450 mT inhibuje růst *Escherichia coli a Pseudomonas putida* během expozice, a také se inhibiční účinek zvyšuje s teplotou. Při optimální teplotě (28 °C) je mezi kontrolními vzorky a vzorky, které byly vystaveny poli, značný rozdíl v růstu a to až 50 % [23].

Účinky střídavého pole s frekvencí 50 Hz ovlivňují různé enzymatické procesy, jako je snížení sekrece inzulínu, která je stimulovaná glukózou. Různé typy bakterií jsou ovlivněny magnetickým polem s frekvencí 50 Hz a intenzitou 10 mT, například gram-negativní *Escherichia coli* a *Leclercia adecarboxylata* (tyčinkové bakterie) dosáhly přibližně 60 – 70 % čísla KTJ ve srovnání s kontrolním vzorkem. Pro gram-pozitivní *Paracocuccus denitrificans* a *Staphylococcus aureus* (sférické bakterie)

došlo přibližně k 20% snížení počtu KTJ. Oba typy použitých bakteriálních kmenů byly vystaveny působení pole po dobu 60 min [24].

Použití různých typů magnetických polí je nový technický přístup, který může být použit při biosyntéze bakteriální celulózy. Studie o využití magnetického pole pro tuto problematiku většinou počítaly s využitím stacionárního pole, zatímco biotechnologicky slibná myšlenka používat střídavé magnetické pole zůstává neprozkoumaná. Nicméně kvůli odlišným charakterům statického a střídavého pole, lze očekávat, že jejich účinky na mikroorganismy a látky, které produkují, budou také odlišné. Ve studii Fijałkowski, et al. 2015, využili střídavé pole o intenzitě 35 mT a frekvenci 50 Hz při biologické syntéze bakteriální celulózy. Bakteriální kmen pro produkci celulózy byl *Gluconacetobacter xylinus* a vlastnosti celulózy, produkované touto bakterií při aplikaci magnetického pole byly nezměněné. Růst kmene, jeho životaschopnost a schopnost syntetizovat celulózu byla o 20 % vyšší, než u bakterií, které nebyly vystaveny magnetickému poli [25].

1.7. Fenol

Vlastnosti:

Molární hmotnost	94,11 g/mol
Teplota tání	40,5 °C
Teplota varu	181,7 °C
Hustota	1,07 g/cm ³
Rozpustnost ve vodě	8,3 g/100 ml (20 °C)



Obrázek 8 Strukturní vzorec fenolu

Fenol neboli kyselina karbolová, je jedovatá bezbarvá krystalická pevná látka, sladkého dehtového zápachu, často označovaného jako "vůně nemocnice" [26]. Chemický vzorec fenolu je C_6H_5OH a jeho molekula obsahuje hydroxylovou funkční skupinu (-OH) vázanou na benzenové jádro, jde tedy o aromatickou sloučeninu [26].

Fenol se omezeně rozpouští ve vodě [26]. Za běžné teploty je voda s fenolem nemísitelná, oddělují se fáze roztoku vody ve fenolu (těžší) a roztoku fenolu ve vodě (lehčí) [26]. Při teplotách nad 68,8 °C je fenol s vodou mísitelný v každém poměru [26]. Molekula fenolu má mírnou tendenci odštěpovat iont H^+ z hydroxylové skupiny, čímž vzniká ve vodě velmi rozpustný fenoxidový (též fenolátový) anion $C_6H_5O^-$ [26]. V porovnání s alifatickými alkoholy je fenol mnohem kyselejší, dokonce ve vodném roztoku reaguje s NaOH za ztráty H^+ , kdežto alifatické alkoholy nikoli [26].

Fenoly a jejich deriváty jsou široce rozšířené přírodní látky, které jsou produkovány celou řadou rostlin, živočichů, ale i člověkem [26]. Právě tyto přirozené deriváty fenolu zapříčiňují chuť a barvu mnohých poživatin [26]. Fenoly připravené umělou cestou v továrnách a jejich deriváty mohou mít díky svým vlastnostem negativní vliv na životní prostředí [26]. Díky nízké těkavosti fenolu většina kontaminace směřuje do vody nebo půdy [26]. Nechlorované deriváty fenolu jsou v prostředí s dostačujícím provzdušněním a přístupem kyslíku rozkládány mikroorganismy na neškodné produkty [26]. Při nedostatku vzduchu, například ve skládkách, sedimentech či v podzemních vodách, jsou stabilnější a není jednoduché je odbourat, či zpracovat [26].

Fenoly jsou toxické jak pro vodní živočichy, tak i pro ostatní faunu obývající souš [26]. Velmi vysokým rizikem pro organizmy jsou deriváty fenolu, hlavně tedy chlorfenoly, které jsou bioakomulativní, vysoce stabilní a toxické [26]. Tyto deriváty mohou představovat vážná rizika v zamořených oblastech, i když nejsou příliš těkavé [26]. V některých studiích se objevují zprávy, že páry těchto derivátů mohou vytvářet spolu s dalšími polutanty škodlivý přízemní fotochemický smog [26]. Ten se vytváří při reakci par polutantů spolu s UV zářením, vznikají zde i volné radikály [26]. Tento smog ohrožuje zdraví obyvatelstva a zvířat, zemědělské plodiny a i některé stavební materiály, které může degradovat [26]. Kumulace v půdě je jen další špatnou vlastností, kterou tyto látky mají [26].

1.8. Degradace fenolu pomocí *Rhodococcus erythropolis*

Fenoly se dají odbourávat jak chemicky, tak biologicky (s pomocí bakterií) [26]. Ovšem velice efektivním a ekonomicky výhodným řešením pro jejich odstranění je právě využití mikroorganismů [26]. Schopnost některých mikroorganismů odbourávat, či využívat neobvyklé, často toxické, substráty je dána přítomností příslušných metabolických drah a enzymů [26].

Bakterie *Rhodococcus erythropolis* dokáže degradovat fenol, hydroxybenzoát, p-chlorfenol, anilin a další aromatické sloučeniny [12]. Jeho různé metabolické aktivity a některé jeho vlastnosti (např. odolnost vůči toxickým látkám a tvorba biofilmu) jsou užitečné pro průmyslové procesy [12]. Mnoho kmenů *Rhodococců* má schopnost degradovat různé toxické sloučeniny během jejich vývoje, ale rychlost a efektivnost odstranění těchto látek je většinou nízká, protože se u bakterií vyvíjí spíše adaptace pro dané životní prostředí, než účinnost degradace [12]. Účinnost degradace může být zlepšena pomocí fyziologického přizpůsobení, nebo pomocí genetického inženýrství [12].

Tým Ljuby Zídkové (Institut Mikrobiologie, AS ČR, Praha [12]) popsal cestu degradace fenolu pomocí bakterie *Rhodococcus erythropolis* (viz obr. 9) [12]. Fenol hydroxyláza (PHH) katalyzuje první aerobní katalýzu fenolu a představuje jeden z klíčových enzymů katabolické dráhy degradace fenolu pomocí *Rhodococcus erythropolis* [12]. Pro mnoho bakterií je PHH omezujícím enzymem pro rychlost fenolové katalýzy jelikož je hned na začátku reakce a tudíž rychlost katalýzy závisí na jeho

koncentraci [12]. Maximální účinnost degradace je vždy dosažena na konci exponenciální fáze růstu bakteriální kultury [12].



Obrázek 9 Degradační řada fenolu [12], enzymy katalyzující jednotlivé reakce: pheA1A2 (PHH – phenol hydroxylace), catA (C1,2DO – catechol 1,2- dioxygenase), catB (MCL – muconate cycloisomerase,) catC (MLI – muconolactone isomerase)

1.9. Vliv prostředí na biodegradaci

Růst a metabolická aktivita mikrobiálních organizmů a jejich biodegradačních schopností je v přirozeném prostředí ovlivňována celou řadou faktorů [14]. Prostředí, v kterém biodegradace probíhá je do značné míry variabilní a to vlivem dynamiky probíhajících procesů, které zpětně ovlivňují samotnou biodegradaci. Faktory prostředí tak značně ovlivňují celý proces biodegradace a mohou být abiotické a biologické [14].

1.9.1. Abiotické faktory

Mezi abiotické faktory patří teplota prostředí, ve kterém probíhá biodegradace, kdy za nízkých teplot probíhá velmi pomalu, či vůbec [14]. Pro fenol platí, že jeho biodegradace a využívání jako zdroje uhlíku probíhá v širokém rozmezí teplot [14]. Nízká teplota ovlivňuje především fyzikální stav a tím jeho dostupnost pro bakterie spojenou s poklesem rychlosti biodegradace [14]. Při vyšších teplotách naopak může dojít k nežádoucímu vytěkání fenolu do okolní atmosféry, což se projeví poklesem koncentrace, ale zároveň vysoká teplota inhibuje bakterie [14]. Alkalita a acidita prostředí hraje významnou roli při zpomalování degradace [19]. Biodegradace sice probíhá v širokém rozmezí pH 5 – 8, ale je značně ovlivněna [19]. Ke změnám pH prostředí dochází i při samotné biodegradaci, vznikajícími meziprodukty a produkty, kdy může dojít ke zpomalení až zastavení procesu [19].

Salinita snižuje rychlost biodegradace zvláště, pokud je velmi vysoká v řádech mS/cm, ve velmi zasolených prostředích může docházet až k inhibici bakterií a zastavení procesu [19]. Vysoká salinita rovněž nepříznivě ovlivňuje rozpustnost kyslíku ve vodě, kdy s rostoucí salinitou klesá rozpustnost kyslíku [19].

Všechny abiotické faktory mohou limitovat biodegradaci polutantů, jejich ovlivňování a optimalizace v průběhu procesu je značně náročná a nákladná [19]. Při biodegradačních procesech je velmi důležité sledování hodnot limitujících abiotických faktorů, což umožňuje případné odvracení či snížení nepříznivých abiotických podmínek a perzistenci polutantů [19].

1.9.2. Biologické faktory

K růstu bakterií jsou vyžadovány vedle zdroje uhlíku a energie, také jiné prvky a akceptory elektronů [19]. Akceptorem vodíku a elektronů pro aerobní mikroorganizmy je kyslík, akceptorem vodíku a elektronů pro anaerobní způsob oxidace organického polutantu může být nitrát, sulfát, CO₂, železité ionty nebo organické sloučeniny [19].

Některé bakterie vyžadují mimoto specifické růstové faktory, zejména aminokyseliny, vitamíny skupiny B, vitamíny rozpustné v tucích nebo jiné organické molekuly [19]. Nedostatek těchto látek v prostředí brání růstu mikroorganizmů a snižuje rychlost biodegradace organické uhlíkaté látky [19]. Růst mikroorganizmů musí být často stimulován přídavkem anorganických sloučenin dusíku a fosforu zejména v prostředích, kde je těchto prvků nedostatek (odpadní nebo spodní voda) [19]. Jako zdroj dusíku a fosforu mohou být využívány i složky samotného organického polutantu [19]. Dynamika množení a odumírání buněk, jejich konzumace predátory a parazity, vede za přirozených podmínek ke koloběhu těchto látek v prostředí a směřuje k navození rovnováhy vedoucí k cílené degradaci polutantu [19].

2. Cíle práce

Cílem práce je hodnocení účinků magnetického pole na biologické činitele (bakterie *Rhodococcus erythropolis*) poutané k nanovlákenným sítím (povrchům). V současné době je známo, že magnetické pole ovlivňuje biologický materiál, na který působí. Ovšem stále není zcela jasné, jaký má magnetické pole vliv na mikroorganismy, využívané při čištění odpadních vod a jakou roli zde mohou hrát nanovlákenné struktury (zda budou zastávat funkci ochrannou, podpůrnou, nebo naopak a v jaké míře). Cílem práce bude určit vliv stimulace magnetickým polem (využito bude několik variant mag. pole) na biologickou rozložitelnost fenolu v přítomnosti bakteriální populace *Rhodococcus erythropolis* za podpory nanovlákenného nosiče.

Přínosy diplomové práce budou dva:

(1) potvrzení či vyvrácení myšlenky použitelnosti magnetického pole jako stimulantu při aplikacích čištění odpadních vod;

(2) zhodnocení nanovlákenných struktur jako nosičů biomasy v závislosti na okolních podmínkách (především vliv magnetického pole apod.).

3. Materiály a metody

Veškeré práce a měření jsem prováděl sám, či pod dohledem vedoucího práce. U činností, které jsem sám neprováděl, jsou řádně popsání spoluautoři.

3.1. Materiály

3.1.1. Bakterie

V této diplomové práci byly používány bakterie, které jsou schopny přirozeně vytvářet biofilm a které jsou selektovány tak, že jejich aktivita degradovat široké spektrum polutantů je maximální. *Rhodococcus erythropolis*, přesněji kmen CCM 2595 IN byl selektována na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze, Ústav biotechnologie (původně Ústav kvasné chemie a bioinženýrství) a adaptován na fenol. Použitá bakteriální kultura byla mezi experimenty skladována ve vodné suspenzi v lednici.

3.1.2. Použité chemikálie

Fenol (Penta); Chlorid amonný (Penta); Hydrogenfosforečnan didraselný (Penta); Hydroxid sodný (Penta). Lowryho činidlo 1 (1 l destilované vody, 5,72 g hydroxid sodný, 28,62 g uhličitan sodný bezvodný); Lowryho činidlo 2 (1 l destilované vody, 14,22 g síran mědnatý pentahydrát); Lowryho činidlo 3 (1 l destilované vody, 28,52 g vinan draselno-sodný tetrahydrát); Folin-Ciocaulteuovo činidlo 2N (smíchané s destilovanou vodou v poměru 1:1)

3.1.3. Použitý materiál / zařízení

Silikonové hadičky (vnitřní/vnější průměr): 2/4 mm a 4/6 mm; Skleněný sedimentační kužel objemu 1 l; Skleněná kádinka objemu 5 l s přepadem na objemu 3 l (reaktor); Peristaltické čerpadlo Watson Marlow 323; Hlavy na peristaltické čerpadlo, jedno kanálová a pěti kanálová; Membránové dmychalo AirMac DB60; Soustava laboratorních držáků a příchytek a stojánků; Aerační ploché kameny s průměrem 10 cm; Alobal (pro oddělení reaktorů a ochrany okolí před znečištěním); Vialky objem 15 ml.

3.1.4. Nanovlákenný nosič

Základní vlákno je polypropylen Prolenvir CE (660 dtex, tvarovaný vzduchem), povlak se skládá z polyuretanových nanovláken Larithane 1083 (150 dtex, metoda electrospinning, průměr nanovláken je cca. 260 nm), vše je dvojitě obtočeno ochranným polyetylenovým vláknem (167 dtex, chrání vůči tření při zpracování a při následných aplikacích proti dezintegraci nanovláken). Specifický povrch výsledného útvaru (viz obr. 10 a 11) s polyuretanovými nanovlákny s hodnotou 50 dtex má pro daný návrh konstrukčního řešení pro fixní lože až tisíce m²/m³. Výslednou přízi je možno zpracovávat

textilními technologiemi ve formě sférických smotků (pro použití ve fluidním loži) nebo ve formě plošných útvarů (technologie proplétání s vloženým útkem, pro použití ve fixním loži) [49]. Jádrovou přízi s nanovlákennou vrstvou a fixačním ovinem, připravil Ing. Filip Sanetrník. Následné práce s přízí, příprava nosičů, jsem prováděl samostatně.

Příze byly namotány a tím také fixovány na nerezové rámečky o rozměrech 10 cm x 10 cm (viz Obrázek 7 Rámečky s nanovlákennou přízí, vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci [8]). Přízí je rámeček obepnut dokola (kolmo ke straně, jenž drží příslušnou niť) a na jedné straně spojen uzlem, takto jsou příze uvázány v celé ploše rámečku a zároveň jsou příze uvázány i v kolmém směru, tudíž celá struktura tvoří síť, ve které je distanc mezi přízemi vždy 1 cm. Rámečky lze spojovat do bloků, ve kterých jsou jednotlivé rámečky odděleny distanční trubičkou dlouhou cca 15 mm. Celkové rozměry bloku (nosiče biomasy) je zhruba 100 mm x 100 mm x 105 mm, se svým objemem cca 1 l, je plnění v reaktoru 22,22 % objemu. Výsledný blok je ponořen celým svým objemem do reaktoru a díky značné váze nerezových rámečků se drží u dna. Celková délka příze je 22,4 m [49].



Obrázek 10 Rámečky s nanovlákennou přízí, vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci [8]

SEM 500x zvětšené[8]

Obrázek 11 Příze s PU nanovlákny, Obrázek 12 Příze s PU nanovlákny 2, SEM 500x zvětšené[8]

Modelový zásobní roztok 3.1.5.

Modelový zásobní roztok byl využíván pro zásobení (nátok) laboratorního modelu (reaktorů), zdrojem uhlíku v podobě fenolu a živinami (makronutrieny chlorid amonný a hydrogenfosforečnan didraselný). Objem zásobního roztoku je vždy 5 l, koncentrace fenolu se upravovala podle fáze měření a pohybovala se v rozmezí 3 - 14 g/l, v závislosti na koncentraci fenolu se upravovala i koncentrace chloridu amonného v rozpětí 1 – 2 g/l a hydrogen fosforečnanu didraselného v rozpětí 0,3 – 0,6 g/l. Hodnota pH zásobního roztoku byla upravena v rozmezí pH 8 – 9, dle zvyšování koncentrace fenolu. Kontrola pH zásobního roztoku pomohla stabilizovat pH v reaktorech a minimalizovala nežádoucí výkyvy pH, které mají značný vliv na bakteriální populaci. Díky této kontrole nemuselo docházet k časté regulaci pH v reaktoru, vnějším zásahem obsluhy.

3.2. Metody

Veškeré práce a měření jsem prováděl sám, či pod dohledem vedoucího práce. U činností, které jsem sám neprováděl, jsou řádně popsání spoluautoři.

3.2.1. Kyvetové testy

CHSK

Metoda je založena na oxidaci organických látek obsažených ve vzorku vody dichromanem draselným v silně kyselém prostředí kyseliny sírové při dvouhodinovém varu. Oxidace organických látek je katalyzována stříbrnými ionty a probíhá v nadbytku dichromanu. Pro maskování chloridů, které by byly za podmínek stanovení oxidovány na Cl_2 a způsobovaly by při stanovení CHSK_{Cr} pozitivní chybu, se přidává síran rtuťnatý. Koncentrace chromitého iontu (vzniklého redukcí z dichromanu draselného, která je úměrná obsahu organických látek ve vzorku vody) se stanoví metodou absorpční spektrofotometrie. Pro měření byly použity kyvetové testy LCK 414 (5 – 60 mg/l O₂) od firmy Hach-Lange a spektrofotometr DR-6000 firmy Hach-Lange. [13]

Fenoly

Pro měření byly použity kyvetové testy LCK 345 (0,05 - 5,0 mg/l) od firmy Hach-Lange a spektrofotometr DR-6000 firmy Hach-Lange. Princip metody je založen na reakci vzorku s 4-nitroanilinem za vzniku žlutého komplexu. Zabarvení je vyhodnoceno spektrofotometrickým stanovením. Vzorek musí být před analýzou filtrován přes membránový filtr (odstranění případného zákalu), pH hodnoceného vzorku musí být upraveno do rozmezí 2 – 10, teplota vzorku a činidel musí být v rozmezí 15 – 25°C. [13]

Amonné ionty

Pro měření byly použity kyvetové testy LCK 304 (0,015 – 2,0 mg/l) od firmy Hach-Lange a spektrofotometr DR-6000 firmy Hach-Lange. Amonný ion reaguje při pH 12.6 s chlornanem a salicylanem za katalýzy nitroprusidu na indofenolovou modř. [13]

3.2.2. Optická mikroskopie

Snímky bakteriálních biofilmů na nosičích byly pořízeny digitálním systémem, který se skládal z mikroskopu Olympus BX51M, digitální jednooké zrcadlovky Olympus E-510 a počítačového softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3. Jelikož mikroskop disponuje velice malou hloubkou ostrosti, bylo využito komerčního softwaru QuickPHOTO MICRO 2.3 s přídavným modulem Deep Focus 3.1, který využívá efektivního algoritmu, jenž je schopen vytvářet snímky s extrémní hloubkou ostrosti,

což umožňuje získat jeden kompletně proostřený snímek nosiče. Jeden proostřený snímek se může skládat až ze 70 jednotlivých fotografií (počet fotografií na jeden snímek je závislý na tloušťce snímaného objektu). Rozlišení snímaných obrazů bylo nastaveno na nejvyšší možné, tj. 3648×2736 pixelů (9.98 megapixelů) a data byla ukládána ve formátu JPEG. Optické zvětšení $50 \times$ (případně $200 \times$) byly vybrány tak, aby ze vzorků mohly být získány všechny potřebné informace.

Hodnocení biofilmu

Zvoleny byly snímky z optické mikroskopie s následnou analýzou obrazu, díky čemuž je sledován růst bakteriální populace imobilizované na nosiči; hlavním vyhodnocovaným parametrem byl zvolen parametr "plošné zaplnění nosiče". Plošné zaplnění je jednoduše definováno jako poměr sledované oblasti (biofilm) vzhledem k celkové ploše (celý povrchu nosiče). Při hodnocení plošného zaplnění je často zanedbáván prostorový efekt nárůstu biofilmu, proto byl pro výpočty vyvinut a použit automatizovaný hodnotící algoritmus, který dokáže vyhodnocovat časový vývoj biofilmu včetně prostorového nárostu. Tento algoritmus vyvinula paní Ing. Lucie Svobodová Ph.D., která zároveň vyhodnotila mnou pořízené snímky z optického mikroskopu do formy základních dat, které jsem následně zpracoval pro další vyhodnocování a tvorbu grafů. [49]

Zvolenou metodou úpravy obrazu pro lepší charakterizaci bakteriálního biofilmu je převod originálního obrazu do barevného prostoru HSV, kde je využito jednotlivých vrstev HSV obrazu (Hue = odstín, barva; Saturation = saturace, nasycení; Value = hodnota). Pro selekci biofilmu v obraze je využito složky S (Saturation). Saturace představuje množství šedi v poměru k odstínu, měří se v procentech od 0 % (šedá) do 100 % (plně sytá barva). Hodnoty vyšší než 40 % sytosti lze označit za oblasti odpovídající bakteriálnímu biofilmu. Výsledný obraz, obsahující jen separovaný biofilm, je vstupním obrazem pro následné výpočty plošných a texturních parametrů obrazu [49].





Obrázek 13 Originální fotografie nasnímaného nosiče

Obrázek 14 Vyhodnocený biofilm z HSV barevného prostoru

Pro určení imobilizovaného biofilmu byl využit naprogramovaný automatizovaný kód. Černé zbarvení v obraze odpovídá pozadí, což bylo zajištěno snímáním objektu v temném poli. Světlé odstíny bílé až šedé odpovídají povrchu nosiče. Odstíny žluté až hnědé odpovídají mikrobiálnímu biofilmu, kde odstín je způsoben přirozeným zbarvením biofilmu (závislé na použité mikrobiální kultuře). Poměrem

plochy biofilmu na podkladovém nosiči, bylo vypočteno procentuální zaplnění (obsazenost povrchu nosiče biofilmem), rostoucí plocha biofilmu v čase odpovídá grafu kolonizace nanovlákenného nosiče [49].

Odběr vzorku byl proveden tak, že se z rámečku odstřihla příze o délce 20 cm, tato se následně namotala na mikroskopové sklíčko a upevnila pomocí izolepy. Vzorek je nutné nechat mírně zaschnout tak, aby se na snímcích neodráželo světlo od povrchu biofilmu. Na takto připraveném vzorku bylo vybráno celkem šest míst, které nejlépe charakterizovali daný vzorek, a byly vyfoceny. Z fotografií byla provedena analýza obrazu a výsledné hodnoty jsou průměrem těchto šesti snímků.

3.2.3. Hodnocení buněčné životaschopnosti

LIVE/DEAD BacLightTM kit se používá pro sledování a hodnocení životaschopnosti populací bakterií a hodnocení funkce membránové integrity buněk [40]. Buňky s narušenou membránou, které jsou považovány za mrtvé nebo umírající se zbarví červeně, zatímco buňky s neporušenou membránou se zbarví zeleně. Vzorky byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2 s kamerou AxioCamICc1, s fluorescenční lampou Colibri.2. Nastavení odpovídalo filtru 62 HE B/G/HR, tj. vlnovým délkám 365 nm, 470 nm a 590 nm. Fluorescenční metoda LIVE/DEAD BacLightTM kit byla použita jako metoda pro kontrolu a vyhodnocení poměru živých a mrtvých bakterií, vlivu zátěže reaktoru vysokou koncentrací fenolu a stanovení stavu bakteriální kultury v reaktoru.

Metoda hodnocení byla vytvořena dle (Lewandowski Z., 2007, Wu Q., 2008 a Gonzalez RC., 2007). Z fotografií byl zjištěn počet zeleně zbarvených buněk (živých) a červeně zbarvených buněk (mrtvých), a to nejprve na základě rozdělení barevného obrazu do jednotlivých barevných složek R(red)-G(green)-B(blue) (https://cs.wikipedia.org/wiki/RGB), a poté zvlášť v každé separované vrstvě RxGxB byl na základě využití jednoduché funkce "bwboundaries" (funkce pro hledání vnitřních kontur) spočten počet objektů v dané vrstvě. Dále byla použita funkce "regionprops" pro získání informací o jednotlivých oblastech (objektech/buňkách). Díky těmto výpočtům zvlášť v každé vrstvě RxGxB lze určit počet červených/zelených objektů (tj. vrstvu B(blue) lze zanedbat). (The Mathworks) Finálně bylo vypočteno procentuální zastoupení životaschopných buněk (tj. kolik procent buněk bylo zelených z celkového počtu buněk). Celkový počet buněk = počet zelených buněk + počet červených buněk. Vyhodnocení provedla paní Ing. Lucie Svobodová Ph.D. (vedoucí práce), která připravila základní data z mnou pořízených snímků z fluorescenčního mikroskopu, které jsem následně zpracoval pro další vyhodnocování a přípravu grafů. [49].

Odběr vzorku probíhal vždy z každého reaktoru zvlášť. Pro měření byla využita standardní mikroskopická podložní a krycí sklíčka pro mikroskopování. Pro hodnocení upoutané bakteriální biomasy pomocí metody Live/Dead byl vždy odebrán vzorek mokré příze přímo z reaktoru o délce

3 cm. Pro hodnocení bakteriální suspenze byl odebrán Objem nefiltrovaný vzorek přímo z reaktoru (5 μl), dále k němu bylo přidáno fluorescenční činidlo o objemu 3 μl a následně byl vzorek přikryt sklíčkem a ponechán ve tmě po dobu 15 min. Dále byl vzorek vyhodnocován na mikroskopu ZEISS Axio Imager.M2.

3.2.4. Měření pH

Pro měření pH v prostředí bioreaktorů byla užita kombinovaná skleněná elektroda WTW SenTix®.

3.2.5. Měření měrné vodivosti – salinita

Pro měření měrné vodivosti v prostředí bioreaktorů byla užita elektroda WTW TetraCon 325.

3.2.6. Měření absorbance

Absorbance (optická denzita) odráží stav bakteriálního růstu v roztoku. Rychlost růstu bakterií a jejich reakci na změny v prostředí lze pozorovat zakalením roztoku. Stanovení zákalu (množství bakterií) bylo stanovováno pomocí spektrofotometru DR-6000 firmy Hach-Lange. Při spektrofotometrii se měří množství absorbovaného světla zakaleným roztokem. Měření koncentrace bakterií bylo prováděno při vlnové délce 420 nm oproti nulovacímu roztoku tvořenému destilovanou vodou, měření bylo prováděno pomocí skleněné kyvety o délce 1 cm.

3.2.7. Stanovení proteinů

Pro stanovení proteinů byly použity Lowryho činidla 1-3 (viz kapitola 3.1.2) a Folin-Ciocaulteuovo činidlo. Lowryho činidlo 0 připravíme smícháním Lowryho činidel 1,2 a 3 v poměru 100:1:1.

Postup pro stanovení proteinů z vláken:

Do malé vialky o objemu 15 ml se odměří 10 cm vlákna, přidá 5 ml destilované vody, protřepe a vloží na 60 minut do ultrazvuku při teplotě 60 °C. Po 60 minutách se vzorek vyjme z ultrazvuku, přidá se k němu 7 ml Lowryho činidla 0, promíchá a nechá inkubovat po dobu 10 minut. Následně se přidá 1 ml Folin-Ciocaulteuova činidla a promíchá. Vzorek se nechá inkubovat po dobu 30 minut při 25 °C. Takto připravený vzorek se měří na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm. Koncentrace proteinů mg/m nitě se vypočítá z absorbance pomocí rovnice:

$$C = \frac{(absorbance - 0.0247) \times 10}{0.0045}$$

Postup pro stanovení proteinů z roztoku:

Do malé vialky o objemu 15 ml se přidá 5 ml roztoku (vzorku) a vloží na 60 minut do ultrazvuku při teplotě 60 °C. Po 60 minutách se vzorek vyjme z ultrazvuku, přidá se k němu 7 ml Lowryho činidla 0, promíchá a nechá inkubovat po dobu 10 minut. Následně se přidá 1 ml Folin-Ciocaulteuova činidla

a promíchá. Vzorek se nechá inkubovat po dobu 30 minut při 25 °C. Takto připravený vzorek se měří na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm.

3.2.8. Stanovení sušiny

Stanovení sušiny spočívalo v odběru 10 ml suspenze z reaktoru, která byla přefiltrována přes membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Filtr byl před filtrací převařen v destilované vodě, poté byl třikrát propláchnut destilovanou vodou. Poté byl sušen při teplotě 105 °C po dobu tří hodin. Takto připravený filtr byl zvážen na 4 desetinná místa a následně použit pro filtraci. Po přefiltrování vzorku (10 ml suspenze) byl filtr (a retentát) odebrán a sušen při teplotě 105 °C po dobu tří hodin, po sušení byl filtr ihned zvážen na stejné váze. Ze získaných hodnot se vypočítá jednoduchý rozdíl hmotností a výsledkem je hmotnost [g] sušiny na 10 ml suspenze. Výsledná hodnota se přepočítá na hmotnost sušiny na jeden litr [g/l].

3.2.9. Měření intenzity magnetického pole

Pro měření magnetického pole byl využit gaussmetr GM08 Hand Held Gaussmeter s automatickým a ručním nastavením pro měření intenzity magnetického pole s rozsahem 0 až 3 T. Gaussmetr je kromě intenzity schopný určit směr toku magnetického pole. Měření je založeno na principu feromagnetické sondy. Miniaturní elektrická cívka s magneticky velmi měkkým materiálem malého průřezu (plíšek) je napájena proudem o kmitočtu 2 kHz. Z důvodu nelineární magnetické charakteristiky se ve vinutí cívky generuje indukované napětí, které je snímáno fázově citlivým zesilovačem. Amplituda signálu je přímo úměrná intenzitě magnetického pole. Předpoklady směru toku magnetického pole a jeho intenzity (viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) v kontaktoru byly pomocí gausmetru ověřeny a potvrzeny.

4. Návrh a sestavení biologického hybridního reaktoru s využitím externích magnetických polí

4.1. Magnetické pole v modelu

Kontaktor s magnetickým polem, využitý v laboratorním modelu vznikl ve spolupráci Ing. Martina Truhláře, Ph.D. a Ing. Lucie Svobodové, Ph.D.

4.1.1. Návrh magnetického pole v kontaktorech

Generátor nestacionárního pole, který byl využit pro generování magnetického pole pro experimenty v mé bakalářské práci, je velmi náročný na elektrickou energii, což je pro reálné aplikace nevhodné a nekomerční. Bylo tedy potřeba najít způsob jak simulovat toto pole, ale snížit energetické nároky. Vhodným řešením je využití permanentních neodymových magnetů s konkrétní intenzitou magnetického pole. Předpokladem je sestavení magnetů do matice tak, aby se směr toku magnetického pole mezi nimi měnil. Zvolili jsme seskupení magnetů do párů, vzdálených od sebe 2 cm až 4 cm, kde byly magnety postaveny za sebou, směr toku magnetického pole byl stejnosměrný. Jednotlivé páry byly umístěny vedle sebe a směr toku magnetického pole jednotlivých párů byl otočen o 180°.



Obrázek 15 Grafické znázornění magnetického pole v modelu a kontaktoru, na levé straně simulace nestacionárního/střídavého pole, na pravé straně simulace jednosměrného/statického pole

Samozřejmě magnetické pole není úplně rovnoběžné a směr jeho toku je značně ovlivňován okolními magnety [17]. Skutečná simulace toku magnetického pole je značně složitější a zde vycházíme
z jednoduchého předpokladu směru pole, na jehož základě byl sestaven kontaktor, využívaný v laboratorním modelu, viz následující Obrázek 16. [17].

Před samotným sestavením kontaktoru provedl Ing. Martin Truhlář, Ph.D. simulace toků a intenzity magnetických polí v matici tvořené neodymovými magnety. Pro simulaci byl využit simulátor COMSOL. Simulace toků jsem následně doplnil o obrazovou ilustraci uspořádání permanentních magnetů a směru toku jejich magnetického pole.



Obrázek 16 Simulace magnetického pole. (obrázek je tvořen simulací magnetického pole a dokreslenou ilustrací magnetů).

V obrázku jsou znázorněny magnety pomocí černého obrysu se světle šedým a tmavě šedým vybarvením, dále je znázorněna simulace toku magnetického pole pomocí červených šipek a jeho intenzita pomocí barevné škály znázorněné na pravé straně s rozsahem 8,9046 x 10⁻³ T až 0,9925 T. Směr toků magnetického pole magnetů A1 a A2 jsou stejnosměrné, B1 a B2 taktéž. Směry toků magnetického pole magnetů A1, A2 a magnetů B1, B2 jsou k sobě otočeny o 180° (znázorněno červenou šipkou na horní straně magnetu). Ze simulace je zřejmé, že tok magnetického pole přechází nejen ve směru toku pole magnetů z A1 do A2 respektive z B2 do B1, ale stáčí se také z A1 magnetu do vedle ležícího magnetu B1 (respektive z B2 do A2). Nejsilnější intenzita magnetického pole je právě na rozhraní vedle sebe ležících magnetů.

Podle této simulace lze tvar toku magnetického pole mezi magnety využít pro simulaci nestacionárního pole. Magnety se umístí na dvě rovnoběžné kolejnice v párech tak, že magnety z páru

budou ležet naproti sobě, každý na jedné kolejnici. Mezi tyto kolejnice s magnety, se vloží hadička, skrze níže bude čerpán roztok s bakteriemi. Díky různým směrům toku magnetického pole a rychlosti proudění roztoku, lze simulovat nestacionární magnetické pole s různou frekvencí, která je dána právě rychlosti protékání roztoku hadičkou. Magnetické pole v kontaktoru pak bude vypadat jak je uvedeno na obrázku 17. V tomto obrázku je rozšířená simulace na čtyři páry magnetů a průběh magnetického pole mezi nimi. Na obrázku jsou znázorněny magnety pomocí černého obrysu se světle šedým a tmavě šedým vybarvením, dále je znázorněna simulace toku magnetického pole pomocí červených šipek a malých černých šipek a jeho intenzita pomocí barevné škály znázorněné na pravé straně s rozsahem 8,9046 x 10⁻³ T až 0,9925 T. Při návrhu kontaktoru, který bude simulovat nestacionární magnetické pole, jsme vycházeli právě z těchto simulací a předpokladů chování magnetického pole v okolí permanentního nedymového magnetu.



Obrázek 17 Simulace magnetického pole v kontaktoru. (obrázek je tvořen simulací magnetického pole a dokreslenou ilustrací magnetů, barevná škála s rozsahem od modré 8,9046 x 10⁻³ T až do červené 0,9925 T).

4.1.2. Realizace magnetického pole v kontaktorech

Magnetické pole v kontaktoru je generováno pomocí soustavy permanentních neodymových magnetů, uspořádaných do matice. Tyto magnety byly nalepeny na hliníkovou, respektive kovovou konstrukci. Hliníková konstrukce byla zvolena pro slabé magnetické pole do 50 mT, kovová konstrukce pak pro silné neodymové magnety, které dokázaly vytvořit pole o intenzitě až 500 mT. Velikost jednoho magnetu je 10 x 10 x 5 mm, v jedné řadě je jich 100 kusů. Magnety jsou uspořádány do matice (viz Obrázek 15) a tvoří tak kolejnicové uspořádání – kontaktor (viz Obrázek 18**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Kontaktor je tvořen dvěma kolejnicemi, délka každé kolejnice je 1 m a rozteč mezi kolejnicemi je variabilní, čímž může být přesně nastavována intenzita magnetického pole mezi

magnety (kolejemi). Uprostřed kontaktoru je umístěna hadička s vnitřním průměrem 1,6 mm, kterou je pumpována bakteriální suspenze z reaktoru. Měněním rychlosti průtoku je simulována frekvence změny magnetického pole (pro střídavé kontaktory/pole), čím vyšší rychlost průtoku je, tím vyšší frekvence změny pole nastane. Samotný kontaktor sestrojil Ing. Martin Truhlář Ph.D. na základě společného návrhu, s finálním sestavením a instalací jsem pomáhal. Následné další používání a provozování bylo mou prací.

Kontaktory jsou pojmenovány:

- SP 400 ... pro kovový kontaktor s intenzitou magnetického pole 400 mT a střídavým směrem pole.
- SP 025 ... pro kontaktor se střídavým směrem pole a intenzitou 25 mT
- JP 025 ... pro kontaktor s jednosměrným polem a intenzitou 25 mT

Rychlost průtoku bakteriální suspenze kontaktorem je vypočítána na 50 Hz, což činí 1 ml/s (výpočet viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Pole mezi dvěma magnety v páru, kde je umístěna hadička, je homogenní, samozřejmě jeho intenzita klesá s kvadrátem vzdálenosti, pole mezi jednotlivými páry je nehomogenní.



Obrázek 18 Kontaktory – kolejnice s magnety a jejich uspořádáním, z vrchu kovové kolejnice se silným polem, uprostřed nestacionární/střídavé pole a dole kolejnice s jednosměrným polem

4.2. Laboratorní uspořádání experimentu

Průtokový kolejnicový reaktor má objem 4,5 l. 3,3 l připadá na samotný reaktor s nosiči biomasy a 1,2 l připadá na sedimentační kužel a kontaktor. Reaktor je neustále intenzivně míchán pomocí aerace. Pro zkoncentrování přečerpávané bakteriální suspenze (skrze kontaktor), byl do modelu instalován sedimentační kužel. Ten sloužil k sedimentaci suspendovaných bakterií, které pak byly ze dna kužele nasávány čerpadlem a čerpány skrz kontaktor zpět do reaktoru. Umístění sedimentačního kužele v modelu vycházelo z předpokladu, že v něm dojde ke zklidnění a za koncentrování roztoku přitékajícího z reaktoru přepadem.

Díky sedimentačnímu kuželi, ze kterého se odebírá pomocí čerpadla pouze koncentrovaný sediment bakteriální populace, je snížen objem roztoku, který se přečerpává. Roztok ze sedimentačního kužele, protéká hadičkou (kontaktorem) o průměru 1,6 mm rychlostí 0,5 m/s zpět do reaktoru s nosiči. Doba zdržení v kontaktoru je 2 vteřiny. Průtok Q je stanoven rovnicí:

$$Q = \frac{\pi r^2 * l}{t}$$

Kde π je matematická konstanta, r je poloměr kontaktoru (hadičky) v cm, l je délka kontaktoru v cm a t je čas v sekundách. Podle výpočtu je průtok 1 ml/s což simuluje 50 Hz, neboli změnu vektoru magnetického pole 50x za vteřinu. Jelikož je průtok kontaktorem vázán na průřez hadičky a požadovanou frekvenci, je pro přečerpávání co největšího množství bakteriální populace vhodné její za koncentrování. Předpoklad je, že zkoncentrováním bakteriální populace dosáhneme ovlivnění většího počtu suspendovaných bakterií v reaktoru. Průměr hadičky byl volen dle simulace magnetického pole tak, aby v průřezu hadičky bylo pole co nejvíce homogenní. Když zvolíme větší průměr hadičky, dosáhneme sice většího průtoku, ale magnetické pole uprostřed hadičky bude slabší, než na okrajích hadičky, které jsou magnetům nejblíže.

Dále model obsahuje zásobník se vstupním roztokem fenolu a živin (modelovou vodou), který je umístěn na magnetické míchačce a neustálým mícháním homogenizován. Nátok je regulován pomocí peristaltického čerpadla a nastaven na 450 ml za 24 h. Koncentrace živin a fenolu byla postupně zvyšována dle kapitoly 5.



Obrázek 19 Nákres laboratorního modelu

Popis nákresu laboratorního modelu:

Nepopsané oranžové šipky, umístěné podél čar (symbolizujících hadičky), značí směr toku média uvnitř potrubí.

1) Nátok zásobního roztoku fenolu z barelu, dávkování je řízeno peristaltickým čerpadlem.

2) Hnací peristaltické čerpadlo, které čerpá bakteriální suspenzi skrze kontaktor s magnety.

Kolejnicový kontaktor s magnety simulující střídavé magnetické pole (pro SP 025, JP 025 a SP 400 jsou voleny různé kontaktory s definovanými vlastnostmi (viz. 4.1 Magnetické pole v modelu).

4) Aerátor (membránové dmychadlo) zásobující reaktor vzduchem (5 l/min).

- 5) Sedimentační kužel, ze kterého je odebírána zkoncentrovaná bakteriální suspenze.
- 6) Reaktor s nanovlákennými nosiči.



Obrázek 20 Laboratorní model experimentu, reaktory s kolejnicovým kontaktorem

Testování reaktorů s nosičem a bez nosiče nebylo potřeba, jelikož bylo prováděno v jiných prací prováděných v laboratoři biotechnologií, kde byla prováděna tato diplomová práce, a bylo zjištěno, že reaktory s nosiči jsou efektivnější než reaktory bez nosičů, což podporují i jiné dostupné vědecké práce. Stěžejní pro tuto práci bylo porovnat vliv magnetického pole na růst biofilmu, proto byla přítomnost nosiče v reaktoru nezbytná.

4.3. Návrh systému měření

Veškeré práce a měření jsem prováděl sám, či pod dohledem vedoucího práce. U činností, které jsem sám neprováděl, jsou řádně popsání spoluautoři.

Pro sledování a vyhodnocování stavu reaktoru a vlivu magnetického pole na bakteriální populaci bylo potřebné měřit různé parametry, jako například spotřebu fenolu, který byl využit jako hlavní zdroj uhlíku, chlorid amonný jako živiny, dále pH, vodivost (salinitu), absorbanci roztoku a další. Aby bylo možné lépe posoudit a vyhodnotit vliv magnetického pole, byl zvolen postup sledování reaktoru po dobu 28 dní. V rámci experimentu byly měřeny následující parametry s časovým rozvržením dle Tabulky 1.

Tabulka 1 Měřené	parametry
------------------	-----------

Den měření	Měřené parametry				
Pondělí	Fenoly, Amonné ionty, CHSK, pH, Vodivost, Absorbance				
Úterý	Fenoly, pH, Vodivost, Absorbance, Nitráty NO ₂ a NO ₃ ,				
Středa	Fenoly, pH, Vodivost, Absorbance, respirace-cela				
Čtvrtek	Kinetika-(5 bodů pro: Fenol, pH, Vodivost, Absorbance), CHSK, Amonné ionty, sušina a ztráta žíháním z vody				
Pátek	Fenoly, pH, Vodivost, Absorbance, KTJ, Respirometr, zvýšení				
1 utox	koncentrace nátoku (odpoledne)				

Dále pak bylo potřeba odebírat vzorky nosičů biomasy pro studium biofilmu a roztoku suspenze z reaktoru. Vzorky byly využity pro měření sušiny, koncentrace proteinů, metodu Live-dead a obrazovou analýzu biofilmu na nosiči. Rozpis odebíraných vzorků je znázorněn v následující tabulce.

Tabulka 2 Odběry vzorků

Odběry příze – nosičů biomasy a suspenze (vody) z reaktoru								
Den odběru	0. den počátek	2. den	4. den	7. den	10. den	14. den	21. den	28. den

Pro potřeby diplomové práce byly využity pouze data z měření koncentrace fenolů, amonných iontů, proteinů, pH, vodivosti, absorbance, sušiny, metody Live-dead a obrazové analýzy biofilmu z nosičů. Další měřené parametry a kinetika jsou využity pro výzkumné účely laboratoře Biotechnologií (Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, Technická Univerzita v Liberci), kde byly experimenty a práce prováděny.

5. Výsledky provozu laboratorního modelu a diskuze vlivu magnetického pole na reálné mikroorganismy

Veškeré práce a měření jsem prováděl sám, či pod dohledem vedoucího práce. U činností, které jsem sám neprováděl, jsou řádně popsání spoluautoři.

Tento experiment navazuje na mou předchozí bakalářskou práci a následný (s tímto experimentem téměř totožný) experiment, který byl hlavně pilotní, kde bylo úkolem zjistit funkčnost laboratorního modelu, chování biofilmových reaktorů a otestovat veškerá zařízení a měření. Podmínky experimentu byly téměř totožné s předchozím experimentem a byl ještě jednou zopakován, výsledné hodnocení vychází tedy ze tří opakování. Jediným rozdílem je, že oproti pilotnímu měření, přibyl k dalším měření ještě reaktor SP 400, což znamená biofilmový reaktor s kontaktorem ve střídavém magnetickém poli o intenzitě 400 mT. Kontrola je reaktor bez magnetických polí a obsahuje totožný nanovlákenný nosič jako reaktory ostatní. Reaktor JP 025 je reaktor s kontaktorem s jednosměrným magnetickým polem o intenzitě 25 mT a reaktor SP 025 se střídavým polem o intenzitě 25 mT. Reaktory byly postupně zatěžovány zvyšováním koncentrace fenolu, při konstantní době zdržení 10 dní. Všechna naměřená data byla experimentálně potvrzena opakovaným měřením.

5.1. Degradace fenolu

Jedním z hlavních faktorů, pomocí kterých byl určován vliv magnetického pole na bakteriální populaci (biofilm na nanovlákenném nosiči a suspendované bakterie v reaktoru) bylo sledování biologické rozložitelnosti fenolu. Fenol je v celém experimentu použit jako jediný zdroj uhlíku. Měřením jeho rozložitelností a následným porovnáním s životaschopností bakteriální populace, lze velmi dobře určit aktivitu bakteriální populace.

Koncentrace fenolů byla měřena pomocí kyvetových testů. Průběžně naměřená koncentrace fenolů v reaktorech byla po dobu 500 hodin naprosto minimální (v grafu 1 znázorněno barevnými liniemi) a to i při průběžném zvyšování koncentrace dávkovaného fenolu (v grafu 1 znázorněno jako sloupcový graf). Lze usoudit, že bakteriální populace byla aktivní a neměla problém zpracovávat fenol (zbytkový fenol v reaktoru je téměř nulový). Změna nastala až se zvýšením koncentrace dávkovaného fenolu na úroveň 900 mg/l. Při této koncentraci začal mít kontrolní reaktor problém se zpracováním a nastal postupný nárůst koncentrace nezpracovaného fenolu v reaktoru. Tento nárůst je dán přiblížením k limitní hranici zpracování fenolu bakteriemi, která je okolo 1,0 g/l [26]. Při dalším zvýšení dávkovaného fenolu na 1400 mg/l přestal kontrolní reaktor odstraňovat fenol a koncentrace nezpracovaného fenolu dále narůstala až nad rozsah měření. Po cca 100 hodinách zatížení reaktorů fenolem o koncentraci 1400 mg/l (tj. 700 hodina experimentu) skokově narostla koncentrace nezpracovaného fenolu i u vzorku JP 025 a SP 400 ovšem v dalším časovém intervalu začala

koncentrace postupně klesat, což je nejspíš zapříčiněno adaptací a zároveň nárůstem bakteriální populace na nanovlákenném nosiči (uvedeno dále). Obdobně je tomu i u vzorku SP 025, u toho ovšem došlo ke skokovému nárůstu o zhruba 50 hodin déle.





Graf 1 Průběžná koncentrace fenolu v reaktoru

Graf 2 Průběh degradace fenolu

Z grafu 2 průběhu degradace fenolu, kde je porovnán dávkovaný fenol s fenolem degradovaným je dobře vidět, že kontrolní reaktor nebyl dostatečně efektivní vzhledem k ostatním reaktorům, efektivita procesu a tedy i rychlost degradace byla mnohem nižší. Záporné hodnoty znamenají, že v reaktoru zůstává fenol místo toho aby byl zpracován (akumuluje se). Tento výsledek dává najevo, že

magnetické pole má značný vliv na bakteriální populaci, zvláště při vysokém zatížení reaktoru fenolem.

5.2. Vývoj absorbance

Absorbance v průběhu experimentu kopíruje růst vstupní koncentrace fenolu až do doby vyššího zatížení reaktorů (600 hodin), kdy dochází ke zpomalení růstu. Počáteční absorbance je u všech reaktorů stejná a její hodnota byla 0,411. Na počátku experimentu byl roztok bakteriální populace namíchán a homogenizován a rozdělen do všech reaktorů stejně. Tímto se dosáhlo stejného množství organizmů a stejného počátečního stavu.



Graf 3 Srovnání absorbance s koncentrací dávkovaného fenolu

V první fázi experimentu dochází k růstu především suspendovaných bakterií. Při vyšším zatížení má bakteriální populace tendenci usedat na povrch nanovlákenných nosičů, kde vytváří biofilm. Nárůst biofilmu je patrný jak z obrazové analýzy, tak z měření sušiny a proteinů viz kapitoly 515.5, 5.6 a 5.7. V důsledku vysoké koncentrace fenolu dochází k mírnému poklesu absorbance především u kontrolního reaktoru a reaktoru SP 400 v závěru testu (700 hodin). Reaktor SP 025 nevykazoval výrazné změny a udržoval absorbanci od počátku zvýšeného zatížení okolo hodnoty 2. Absorbance u reaktoru JP 025 rostla konstantním tempem a nedocházelo zde k výrazným změnám z čehož lze vyvodit závěr, že magnetické pole má nepochybně pozitivní vliv.



Graf 4 Srovnání absorbance a degradovaného fenolu

5.3. Srovnání koncentrace amonných iontů s koncentrací fenolů

Jako zdroj dusíku byl využit chlorid amonný v přebytku. Se zvyšující se koncentrací dávkovaného fenolu se zvyšovala i koncentrace dávkovaného chloridu amonného, tak aby nemohlo dojít ke ztrátě zdroje dusíku. Nedostatečná koncentrace dusíku by měla za následek inhibici bakteriální populace a ovlivnění experimentu. Rostoucí koncentrace amonných iontů naměřených po 570 hodině experimentu v kontrolním reaktoru, je způsobena jednak jeho přebytkem, ale hlavně tím, že prostředí s vysokou koncentrací fenolů inhibovalo růst bakteriální populace. Stále rostoucí koncentrace fenolu měla za následek hynutí bakteriální populace místo jejího růstu, kterým by se chlorid amonný spotřebovával. Obdobné zvýšení koncentrace amonných iontů lze pozorovat i v ostatních vzorcích, ovšem až od 670 hodiny a dále. Míra zvýšení není tak značná a jde tedy spíš o zvýšení důsledkem přebytku.



Graf 5 Srovnání koncentrace NH₄Cl s koncentrací dávkovaného fenolu

5.4. Sledování hodnoty pH

Sledování hodnoty pH je důležité, protože náhlé, skokové změny narušují optimální podmínky biodegradace a inhibují bakteriální populaci. V průběhu biodegradace polutantů (fenolu) hodnota pH výrazně klesá, to je zřejmě dáno změnou oxidačního stavu produktů biodegradačního procesu polutantu a dalších zbylých látek viz 1.8 Degradace fenolu pomocí *Rhodococcus erythropolis*. Z přiloženého obrázku: Obrázek 9 Degradační řada fenolu [12], enzymy katalyzující jednotlivé reakce: pheA1A2 (PHH – phenol hydroxylace), catA (C1,2DO – catechol 1,2- dioxygenase), catB (MCL – muconate cycloisomerase,) catC (MLI – muconolactone isomerase), je zřetelné, že některé meziprodukty biologického rozkladu jsou značně kyselé. Klesající tendence pH je výraznější s vyšším

látkovým zatížením reaktoru. Čím více polutantů je oxidováno, tím větší a rychlejší jsou změny pH. Ve sledovaném modelu bylo náhlým a kontinuálním změnám pH zamezeno tím, že byla upravena hodnota pH zásobního roztoku (nátok), do oblasti zásadité, což pH reaktoru do značné míry stabilizovalo v rozmezí 6 – 7,5. Bohužel i tak docházelo k výkyvům hodnoty pH a musela být ručně vyrovnána přidáním roztoku hydroxidu sodného na požadovaných pH 7,5. k výrazným výkyvům docházelo především při zvýšení koncentrace fenolu v zásobním roztoku, tedy zvýšením látkového zatížení z nátoku viz následující grafy.



Graf 6 Srovnání pH s koncentrací fenolu

5.5. Životaschopnost bakteriální populace v suspenzi

Metoda hodnocení buněčné životaschopnosti (Live/Dead) je důležitým doplňkem hodnocení aktivity bakteriální populace. Díky této metodě jsme schopni určit procentuální poměr živých bakterií v celé populaci. Měření sušiny udává informaci pouze o celkové hmotnosti živých i mrtvých bakterií a nikoliv informaci o životaschopnosti (viabilitě) buněk.



Graf 7 Srovnání množství živých suspendovaných bakterií v reaktoru ke kontrole

Na grafu 8 je zobrazeno procento živých bakterií vztažených ke kontrole, kdy kontrola v časovém průběhu byla vždy 100 % a k ní se přepočítávaly ostatní reaktory, respektive živé bakterie ve vzorku. Z měření vyplývá, že po 24 hodinách bylo v reaktoru SP 400 3x více živých bakterií z celku než u kontroly. Což naznačuje pozitivní vliv magnetického pole pro růst bakterií už při krátkodobé expozici. V časovém úseku se však množství živých bakterií v reaktorech SP 025, SP 400 a JP 025 skokově měnilo až do hodnoty, kdy v reaktorech bylo jen 30 % živých bakterií oproti kontrole. To znamená, že v kontrolním reaktoru bylo o 70 % více bakterií, které se podíleli na degradaci fenolu. Jelikož byl fenol dávkován ve stejném množství pro všechny reaktory a následně zcela spotřebován, lze usoudit, že suspendované bakterie vystavené magnetickému poli jsou více rezistentní vůči vysokým koncentracím fenolu.



Graf 8 Srovnání živých suspendovaných bakterií ku degradovanému fenolu

Časový průběh	Sušina [g/l]				
[h]	Kontrola	JP 025	SP 025	SP 400	
72	0,43	0,48	0,48	0,46	
408	0,23	0,43	0,58	0,85	
504	0,30	0,51	0,67	1,15	
576	1,40	1,76	2,25	2,46	
672	1,29	2,57	2,89	2,48	

Tabulka 3 Hmotnost sušiny suspendovaných bakterií v reaktorech

Tabulka zobrazuje hmotnost sušiny suspendovaných bakterií v reaktoru. Graf 8 zobrazuje srovnání živých bakterií (z celkového množství reaktoru, v každém zvlášť), a degradovaný fenol v reaktorech. Z grafu a tabulky vývoje sušiny (stanoveno ze suspenze) je patrné, že při vysokém zatížení kontrolního reaktoru fenolem, nestává značný úhyn bakteriální populace v kontrolním reaktoru, což se projeví ve snížení množství degradovaného fenolu. Obdobný průběh lze pozorovat i u reaktoru SP 400, kde je sice sušina 2,48 g/l a pouze 38,65 % bakterií je živých, ale degradují stejné množství fenolu jako kontrola. Reaktor JP 025 a SP 025 dokázali odolat zvýšené zátěži mnohem lépe, kdy z celkového množství buněk bylo 89 % respektive 83 % živých a reaktor JP 025 dokonce spotřebovával téměř všechen dávkovaný fenol. V dalším pokračování experimentu reaktor kontrola byl celkově neaktivní a koncentrace fenolu v reaktoru narostla nad hranici rozsahu měření 3600 mg/l, tudíž lze předpokládat celkový úhyn. Ostatní reaktory dokázali zátěži odolat lépe a reaktory SP 025 a SP 400 po 48 hodinové adaptaci na vyšší zátěž znovu zvýšily aktivitu, viz graf 2, kap. 5.1 Degradace fenolu.

5.6. Vývoj bakteriálního biofilmu na nanovlákenném nosiči

Vývoj bakteriálního biofilmu byl sledován také pomocí metody hodnocení buněčné životaschopnosti (Live/Dead) a měřením koncentrace proteinů získaných z biofilmu na vláknech. Pro měření pomocí metody Live/Dead byl vždy odebrán vzorek mokré příze přímo z reaktoru o délce 3 cm, který byl zpracován dle kapitoly 3.2.3 Metody hodnocení buněčné životaschopnosti. Měření koncentrace proteinů bylo prováděno z příze o délce 10 cm a koncentrace byla stanovena dle kapitoly 3.2.7 Stanovení proteinů.



Graf 9 Vyhodnocení živého biofilmu na vláknech v reaktoru ke kontrole

Poměr živého biofilmu a jeho vývoj kopíroval vývoj suspendovaných bakterií. Podobně jako u suspendovaných bakterií v reaktoru SP 400 došlo v první fázi ke značnému růstu. Zjevně díky nízké vstupní koncentraci fenolu, došlo k následnému uhynutí rychle narostlého biofilmu a následné stabilizaci růstu. Tuto skutečnost by bylo vhodné lépe prozkoumat, jelikož by se dala využít pro rychlé zapracování nosičů biomasy. Potenciál využití by tak byl značný, především v průmyslu a při odstraňování náhlých krizových stavů při biologickém čištění odpadních vod (nečekaný nárůst koncentrace škodlivých látek nebo zvýšení objemu vstupních vod).

Srovnání poměru živého biofilmu z celku a degradovaného fenolu dává informaci o reakci bakteriální populace v biofilmu na prostředí. Při porovnání s tabulkou koncentrace proteinů níže, lze říci, že reaktor SP 400 měl téměř konstantní růst po celou dobu testu (viz tabulka 2), který kopíroval zvyšující se zátěž reaktoru fenolem. Procento živých bakterií v biofilmu ovšem nikdy nepřesáhlo 50 % z celku, přesto reaktor snadno zpracovával dávkovaný fenol, což bude zásluhou především suspendovaných bakterií, kde procento živých buněk bylo vysoké stejně jako jejich množství. Potvrzuje to i následná reakce na zvýšení zatížení fenolem, kterou je pokles živé části biofilmu pod 20 %. Náhlý pokles

procentuálního zastoupení živé části biofilmu u reaktoru SP 025 a kontroly bude dán vhodným prostředím v reaktoru, kdy bakterie neměly potřebu tvořit biofilm a zůstaly tak suspendované v reaktoru. Postupný nárůst je pak dán běžným vývojem biofilmu a pokles je reakcí na zvýšení zátěže reaktoru fenolem.



Graf 10 Srovnání poměru živého biofilmu a degradovaného fenolu

Velmi konstantním růstem se projevil reaktor JP 025, kdy zpočátku došlo ke značnému růstu, ale nejspíše díky nedostatečnému dávkování fenolu došlo mezi hodinou 72 – 168 ke ztrátě biofilmu a snížení procenta živých bakterií. S následným zvyšováním koncentrace dávkovaného fenolu došlo k rychlému nárůstu biofilmu i s vysokým procentem živých bakterií. Při limitním zatížení reaktorů, reagovaly reaktory kontrola a JP 025 snížením živé části biofilmu, ovšem reaktory se střídavým polem SP 025 a SP 400 reagovaly zvýšením.

Obecně z výsledků vyplývá velmi pružná reakce biofilmů z hlediska procentuálního zastoupení živých bakterií u reaktorů kontrola a SP 025, stabilnější průběh u reaktoru SP 400, naopak velmi stálým vývojem u reaktoru JP 025. Z hlediska celkového růstu biofilmu včetně mrtvé části je vývoj poměrně stálý u všech reaktorů. Skokové zvýšení naměřené koncentrace proteinů je dané hlavně změnou prostředí, kdy bakterie přešli k vývoji biofilmu kvůli zvýšení zátěže reaktoru fenolem. Suspenzní prostředí se tak stalo nepříznivým a pro bakteriální populaci je tvorba biofilmu výhodnější. Pro stálou degradaci fenolu je potřeba aktivní a živý biofilm, který byl pozorován u vzorku JP 025 a SP 400.

Časový průběh	Koncentrace proteinů [mg/m] příze					
[h]	kontrola	JP 025	SP 025	SP 400		
24	80,67	138,44	71,78	116,22		
72	69,56	82,89	176,22	151,78		
168	169,56	62,89	247,33	160,67		
240	194,00	265,11	234,00	134,00		
504	307,33	276,22	967,33	329,56		
672	452,67	531,78	876,22	454,00		

Tabulka 4 Koncentrace proteinů v reaktorech

5.7. Analýza obrazu snímků z optické mikroskopie

Obrazová analýza plochy biofilmu na nosiči potvrzuje výsledky z měření absorbance, kdy s poklesem absorbance, narůstá plocha biofilmu na nosiči u reaktorů ovlivněných magnetickým polem a zároveň potvrzuje úbytek suspendované bakteriální populace, včetně biofilmu u kontrolního vzorku vlivem vysoké koncentrace fenolů. Následující graf 12 zobrazuje růst biofilmu, respektive velikost obsazené plochy biofilmem vůči dávkovanému fenolu. Z grafu je patrné, že vysoké koncentrace fenolu mají značný vliv na úbytek biofilmu v kontrolním reaktoru a růst u reaktorů ostatních.

Biofilm v reaktorech s magnetickým polem odolává vyšší koncentraci fenolu mnohem lépe, než biofilm neovlivněný (v kontrolním vzorku). Z této skutečnosti vyplývá, že bakterie zůstane magnetickým polem ovlivněna dlouhodobě a způsobené účinky pole přetrvají, i když bakterie už není v magnetickém poli. V reaktoru žádné magnetické pole umístěné není (magnetické pole je umístěno v kontaktoru), a tudíž nemůže ovlivňovat rostoucí biofilm. Možná by se dalo uvažovat nad možností, že se účinky magnetického pole, tedy změny, které pole vyvolává, přenesli i na generace nových bakterií, vzniklých z generace, která byla ovlivněna magnetickým polem, ale tato skutečnost není potvrzena a je pouhou myšlenkou na základě experimentálních dat, důkaz by vyžadoval další sadu měření a testů, které by tuto skutečnost prokázaly (jako i využití molekulárně genetických analýz, které by prokázaly změnu RNA apod.).



Graf 11 Porovnání plochy biofilmu na nosiči

V tomto grafu je dobře vidět, jak vysoká koncentrace fenolu v reaktoru negativně působí na bakterie, které nebyly ovlivněny magnetickým polem a dochází k jejich úhynu, respektive poklesu absorbance a razantnímu úbytku biofilmu na nosičích v kontrolním reaktoru. Naměřená data absorbance, optického hodnocení biofilmu, měřené koncentrace fenolu a fluorescenční mikroskopie si navzájem odpovídají.



Graf 12 Porovnání plochy biofilmu na nosiči k absorbanci

6. Identifikace a diskuze limitních stavů biofilmových hybridních reaktorů

Identifikace limitních stavů vychází z pozorování chování reaktoru při vysokých koncentracích fenolu. Z měření vyplývá, že bakteriální populace neovlivněná magnetickým polem je schopna zpracovávat efektivně fenol do koncentrace 900 mg/l/den a době zdržení 10 dní, při zvýšení zátěže na 1400 mg/l/den dochází dle výsledků k selhávání reaktoru a k postupnému úhynu bakteriální populace. Bakteriální populace ovlivněná magnetickým polem je schopná zpracovávat fenol i při zátěži 1400 mg/l/den (doba zdržení 10 dní), což je navýšení maximální zatížitelnosti reaktoru o zhruba 16 %, při zachování objemu a doby zdržení. Tato skutečnost platí především pro reaktory se střídavým magnetickým polem o intenzitě 25 mT a 400 mT, statické magnetické pole (ve stejném uspořádání reaktoru) nevykazuje výrazný pozitivní vliv na bakteriální populaci.

Z výsledků vyplývá, že minimální doba působení magnetického pole na bakterie by měla být dva dny, ovšem nanovlákenné nosiče vyžadují alespoň 14 dní pro zapracování, tudíž ovlivnění magnetickým polem je rychlé a dá se využít pro zvýšení aktivity bakteriální suspenze. Nanovlákenný nosič pak lze dobře využít pro následnou stabilizaci reaktoru, tedy prostřednictvím vzniku a udržení více stabilního biofilmu na površích.

Optimální průtok kontaktorem pro tento experiment činil 1 ml/s, který při daném průměru hadičky a sestavení kontaktoru simuloval požadovaných 50 Hz. Průtok lze zvýšit zvětšením průměru hadičky, ovšem musí se současně zvýšit intenzita magnetického pole, tak aby v průřezu byla zachována požadovaná intenzita. Při velkých průměrech je velmi obtížné dosáhnout homogenity magnetického pole, jelikož jeho intenzita klesá s kvadrátem vzdálenosti, což má za následek velkou intenzitu na okrajích hadičky a nízkou v jejím středu.

V tomto experimentu bylo dosaženo průtoku 3,6 l/h, což znamená, že celý objem reaktoru byl přečerpán kontaktorem zhruba 19x za 24h. Z výsledků vyplývá, že pro ovlivnění suspendované bakteriální populace je tento volený objem reaktoru a průtok kontaktorem dostačující.

7. Příklad uvedení do praxe

Příklad uvedení do praxe uvedu bez nákladů na pořízení celého řešení, jelikož zhotovení potřebných nádrží, včetně potřebných úprav pro chemickou odolnost a cenu práce neumím odhadnout, to přísluší specializované firmě. Náklady na pořízení čerpadel, potřebných konstrukčních materiálů, magnetů a pořízení fixních nanovlákenných nosičů biomasy, včetně práce mohu jen hrubě odhadnout z dostupných cen na internetu. Zaměřil jsem se tedy jen na kontaktor a nosič biomasy.

Pro příklad uvedení hybridního reaktoru v praxi jsem vycházel z daných objemů, průtoků a intenzit magnetického pole v experimentech. Vzhledem k tomu, že bylo ověřeno, že zapracované bioreaktory s magnetickým polem a nanovlákennými nosiči vydrží vyšší zátěž, tedy koncentraci polutantů okolo 1400 mg/l/den, není nutné vstupní odpadní vodu výrazně rozřeďovat.

Jako vstupní parametry budeme uvažovat odpadní vodu kontaminovanou zbytkovým fenolem z výroby o celkovém objemu 4,5 m³/den, celková zátěž fenolem 4,5 kg/den (koncentrace fenolů 1000 mg/l/den). Další organické látky nebudeme uvažovat.

Objem celého bioreaktoru, včetně sedimentační nádrže, při zachování doby zdržení 10 dní, bude 45 m³. Sedimentační nádrže bude mít objem 10 m³ a samotný bioreaktor 35 m³. Objem fixních nanovlákenných nosičů biomasy bude 22 % tedy 7,7 m³. Objem kontaktoru bude vzhledem k objemu celkové sestavy zanedbatelný.

Průtok kontaktorem při zachování experimentálních parametrů přečerpání celkového objemu soustavy 19x za den (v reálných podmínkách spíše nereálné), musí být přečerpáno 855 m³/den, což nelze aplikovat na laboratorní průřez hadiček a jejich průtok. Je potřeba průměr hadic v kontaktoru značně zvětšit a s tím je potřeba pořídit i silnější stacionární neodymové magnety s intenzitou magnetického pole 1 T. Tato skutečnost povede k tomu, že magnetické pole v průřezu hadičky již nebude tak homogenní jako v případně menšího průřezu. Pro návrh magnetického pole jsem vybral neodymové magnety s rozměry 4 x 1 x 1 cm, s intenzitou magnetického pole zhruba 1 T. Takto silné magnety lze umístit po stranách hadice s větším průměrem s tím, že uprostřed bude stále dostatečně silné magnetické pole. Z výpočtu vyplývá, že je za potřebí přečerpat 9,9 l/s, tento objem je lepší rozdělit do deseti kontaktorů, kdy každý bude mít zvolený průtok 0,99 l/s, při rychlosti proudění 0,5 m/s (viz výpočet kap. 4.2), vychází průměr potřebné hadice na 5 cm a délky 100 cm. U takto silné hadice je při simulaci magnetického pole potřeba počítat i s tloušťkou stěny hadice 0,8cm, neodymový magnet tak bude potřeba umístit zhruba centimetr od stěny hadice, aby bylo docíleno požadované intenzity magnetického pole, ovšem magnetické pole je třeba proměřit gaussmetrem a optimální vzdálenost nastavit dle měření.

Kontaktor bude mít tedy uspořádání délky 100 cm s průřezy hadic 5 cm, neodymové magnety budou podél hadic, na každé straně 100 ks a hadice budou umístěny vedle sebe, čímž budou využity vnitřní magnety z obou stran. Místo potřebných 2000 magnetů na celé těleso kontaktoru (200 na každý jednotlivý kontaktor) bude zapotřebí 1100 ks neodymových magnetů, vznikne tak výsledné uspořádání:



180 cm

Obrázek 21 Schéma tělesa kontaktoru, modré šipky znázorňují směr toku, modré čáry znázorňují hadice, černé čáry znázorňují magnety (uspořádání magnetů bude dle Obrázek 15 Grafické znázornění magnetického pole v modelu a kontaktoru, na levé straně simulace nestacionárního/střídavého pole, na pravé straně simulace jednosměrného/statického pole

Takto zvolené uspořádání by mělo navázat na simulaci z laboratorního experimentu v reálné praxi. Náklady na pořízení neodymových magnetů při současné ceně jsou 66 000 Kč, čerpadla s odpovídajícím výkonem stojí okolo 35 000 Kč, dále je potřeba započítat konstrukční profily (v délce 35 m) 35 000 Kč, hadice a rozdělovače (14 m hadice s průměrem 5 cm, rozdělovač z PE trubek) 30 000 Kč a další příslušenství a práci, náklady na pořízení kontaktoru mohou být okolo 250 000 Kč.

Přibližné náklady na pořízení nosičů biomasy lze odhadnout ze současné ceny kilometru jádrové příze s ovinem z nanovláken, kterou vyrábí klastr Nanoprogress, z.s. a ceny nerezového materiálu potřebného na ukotvení. Cena za km příze je 780 Kč, potřeba bude (dle 3.1.4) 177 km příze, tedy 138 000 Kč. Dále nerezové profily, budeme uvažovat nerezové rámečky tvaru čtverce se stranou 2 m, vyztužené uprostřed. Počet rámečků bude 116, celková délka nerezových profilů (20 x 2 mm) bude 1392 m, pak je potřeba započítat další konstrukční prvky pro uchycení jednotlivých rámečků. Při ceně 55 Kč/m bude přibližná cena nerezového materiálu 90 000 Kč. S náročnou prací svařování dílů a namotáváním jádrové příze se cena nanovlákenných nosičů biomasy může pohybovat okolo 450 000 Kč. Odhady jsou založeny na dostupných cenách materiálů.



Obrázek 22 Rám pro nanovlákenné jádrové příze

Celkové náklady na pořízení potřebného vybavení jsou samozřejmě daleko vyšší, jelikož se jedná o novost a výrobu na zakázku, prováděcí firma si tedy bude účtovat více, jde tedy pouze o příklad.

8. Závěr

Účelem této práce bylo prozkoumat a využít vlivu magnetického pole na bakterie v hybridním bioreaktoru. Pozorovány byly účinky pole na suspendované bakterie v roztoku reaktoru, ale i dlouhodobé účinky na bakterie, tvořící biofilm na nosičích. Práce staví na základech předešlých experimentů, kde byly zjištěny účinky různých magnetických polí na bakterii *Rhodococcus erythropolis* a zde jsme se zabýval již pouze vytipovaným polem o frekvenci 50 Hz.

Z výsledků vyplývá, že magnetické pole má vliv na bakterie a tyto výsledky korespondují s daty, které vyhodnotili kolegové z Masarykovy university v Brně (Petr Klapetek, Lukáš Fojt, Luděk Strašák, Vladimír Vetterl). V minulosti a současnosti nejčastěji zkoumanou frekvencí pole je 50 Hz, o kterém je sepsáno mnoho článků pro různé bakterie, a které se jeví jako nejúčinnější z hlediska efektů, které vyvolává (DESJOBERT, H., et al. 1995, JIA, H. Li. Et al. 2014, NAFZIGER, J., et al. 1993, ETRINI, C., et al. 1997, NAKASONO, S., et al. 2000, TOMSKA, A., WOLNY, L., 2008, MONA H. I., et al. 2013, FOJT, L., et al. 2009 a další). Zkoumaný vliv na bakterii *Rhodococcus erythropolis* je pozitivní při 50 Hz a intenzitě magnetického pole okolo 25 mT. Bakterie vystavená tomuto poli lépe odolává vysokým koncentracím fenolu až do hodnoty 1,4 g/l při zachování vysoké buněčné aktivity. Testy prokázaly také zhruba dvakrát vyšší účinnost degradace fenolu, než u kontrolního reaktoru.

Z výsledků vyplývá, že využití magnetického pole a zároveň nanovlákenného nosiče dává vysokou reakční flexibilitu reaktoru na změny v koncentraci fenolu, kdy se bakteriální populace adaptuje na změnu prostředí v řádu desítek hodin.

Porovnáním stavu/chování biofilmu v reaktorech s/bez magnetického pole (zejména hodnocení vývoje biofilmu na nosiči a jeho viabilita), lze dospět k závěru, že bakterie ovlivněné magnetickým polem mají za důsledek rovnoměrný nárůst biofilmu a vykazují zvýšenou adaptaci na podmínky prostředí, bez skokových změn, na rozdíl od reaktoru kontrolního.

Výše uvedených výhod se dá využít například v oblasti čištění průmyslových odpadních vod, zvláště tam, kde dochází kde značným výkyvům koncentrace polutantů a pro iniciaci růstu pomalu rostoucích bakterií na těžce rozložitelných substrátech. Vhodným příkladem může být otestování vlivu magnetického pole na bakterie při odbourávání anilínu, který je odpadem v lučebních závodech Draslovka Kolín a zhodnotit efektivitu. Dalším možným využitím může být teoretické zvýšení efektivity při procesu odbourání chloraminů v chemičce Bochemie. Další zajímavou myšlenkou je využití magnetického pole při stimulaci mikroorganizmů produkující požadované buněčné produkty, například stimulace *Gluconacetobacter xylinus*, kde bylo pozorováno zvýšení produkce celulózy [25].

Nanovlákenné nosiče jsou nedílnou součástí tohoto experimentu, jelikož poskytují podklad pro růst biofilmu. Jak je známo biofilm může růst na rozmanitých površích, ale nanovlákenné jádrové příze

poskytují pórovitý povrch se specifickým průměrem pórů, který značně zvyšuje adhezi a stabilitu biofilmu. Stabilní biofilm pak lépe odolává vnějším nepříznivým vlivům, jako jsou například skokové změny pH, teploty, salinity a koncentrace polutantů.

Seznam používané literatury a zdroje

[1] GOODFELLOW, M. Genus Rhodoccocus. In: Williams, S.T., Sharp, M.E., Holt, J.G. (eds.): Bergey's Manual of Systematic Bakteriology. Baltimore, 1989 2333-2339.

[2] *Rhodococuus erythropolis*, MicrobeWiki [online], 2017, [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Rhodococcus

[3] KŘIKLAVOVÁ, L. Vývoj nanovlákenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur. Liberec, 2013. Disertační. TECHNICKÁ UNIVERZITA LIBEREC. Vedoucí práce Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

[4] SHARMA A. M. "*Biofilms: Microbes and Disease*." The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases 12, (2008):, no. 6 526–30.

[5] SINGH, R., et al. *Biofilms: implication in bioremediation*, TRENDS MICROBIOL, (2006): 14 (9): 389-397. [cit. 2017-04-24].

[6] KŘIKLAVOVÁ, L. Vývoj nanovlákenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur. Liberec, 2013. Autoreferát disertační práce. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI. Vedoucí práce Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

[7] SONG S. H., S. et al. Novel hybrid immobilization of microorganisms and its applications to biological denitrification. Enzyme and Microbial Technology. (2005). Vol. 37, 567–573

[8] Vlastní obrazová dokumentace z laboratoře.

[9] Biowatertechnology a.s., [cit. 2017-04-24] Dostupné z: http://www.biowatertechnology.com/

[10] ActiveCell, *Mbbr / ifas wastewater treatment*. [cit. 2016-04-19]. Původní obrázek ve formátu
JPEG. Dostupné z: http://www.headworksinternational.com/userfiles/file/HW%20BIO
%20Literature/ActiveCell%20Brochure%20WEB%20LTR.pdf

[11] AnoxKaldnes, N*utrient recovery waste not, want not*. [cit. 2016-04-19]. Původní obrázek ve formátu JPEG. Dostupné z:http://www.waterworld.com/articles/wwi/print/volume-26/issue-5/regional-spotlight/north-america-caribbean/nutrient-recovery-waste-not-want-not.html

[12] ZÍDKOVÁ a spol. "Biodegradation of Phenol Using Recombinant Plasmid-Carrying Rhodococcus Erythropolis Strains." *International Biodeterioration & Biodegradation* 84 (October 2013): 179–84. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.017.

[13] Hach-Lange, Technická dokumentace dodávaná výrobcem kyvetových testů

[14] DEMNEROVÁ, K. *Biotechnologie životního prostředí*, Praha, 2000. VŠCHT Praha,Vysokoškolský učební text [cit. 2017-04-27]. ISBN: 80-7080-376-2

[15] FOJT, L. Působení elektromagnetických polí na biologické systémy. Brno, 2007. Disertační práce. MASARIKOVA UNIVERZITA. Vedoucí práce prof. RNDr. Vladimír Vetterl, DrSc.

[16] DVOŘÁKOVÁ Helena. Biodegradacní metody zneškodnování ropných kontaminací. Brno, 2010. Diplomová práce. MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. Vedoucí práce doc. Ing. Rudolf Rybář, CSc.

[17] HAŇKA, L. *Teorie magnetického pole*. Praha 1975. Učebnice pro elektrotechnické fakulty. Č.j. 13829/73-30

[18] VODRÁŽKA, Z. Biochemie. Praha: Academia 2007. ISBN 978-80-200-0600-4.

[19] HORÁKOVÁ, D. *Bioremediace*. Brno 2006. MASARYKOVA UNIVERZITA, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE. Učební skripta.

[20] JEN, A. C., et al. Hydrogels for cell immobilization. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 50, 357-364. [cit. 2017-05-05]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<357::AID-BIT2>3.0.CO;2-K

[21] Biowater Technology AS [online]. [cit. 2017]. Dostupné z www.biowatertechnology.com

[22] FOJT, L, a spol. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria Escherichia coli, Leclercia adecarboxylata and Staphylococcus aureus. Bioelectrochemistry [online]. 2004, 63(1-2), 337-341 [cit. 2017-04-27]. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2003.11.010. ISSN 15675394.

[23] FILIPIČ, J., et al. *Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria Escherichia coli and Pseudomonas putida*. Bioresource Technology [online].
2012, 120, 225-232 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.06.023. ISSN 09608524.

[24] FOJT, L., et al. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. Micron [online].2009, 40(8), 918-922 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.micron.2009.06.009. ISSN 09684328.

[25] FIJAŁKOWSKI, K., et al. *Modification of bacterial cellulose through exposure to the rotating magnetic field*. Carbohydrate Polymers [online]. 2015, 133, 52-60 [cit. 2017-04-28]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.07.011. ISSN 01448617.

[26] JANOUŠEK, T. Možnosti kombinace nanotechnologie a fyzikálních polí v biologickém hybridním reaktoru. Liberec, 2014. Bakalářská. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI. Vedoucí práce Ing. Lucie Křiklavová, Ph.D. [27] Chen, H., Li, X., *Effect of static magnetic field on synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by activated sludge*. Bioresour Technol [online]. 2008, 99, 5538–5544. [cit. 2017-05-04].

[28] JI, Yulan et al. *Enhancement of biological treatment of wastewater by magnetic field*. Bioresource Technology [online]. 2010, 101(22), 8535-8540 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.094. ISSN 09608524.

[29] TOMSKA, A., WOLNY, L., Enhancement of biological wastewater treatment by magnetic field exposure. Desalination [online]. 2008, 222(1-3), 368-373 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.144. ISSN 00119164

[30] YAVUZ, H., SERDAR S. *Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment*. Enzyme and Microbial Technology [online]. 2000, 26(1), 22-27 [cit. 2017-05-04]. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00121-0. ISSN 01410229.

[31] QU, X., et al. *Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment*. Water Research [online]. 2013, 47(12), 3931-3946 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.watres.2012.09.058. ISSN 00431354.

[32] BJORGE, D., et al. *Performance assessment of electrospun nanofibers for filter applications*. Desalination [online]. 2009, 249(3), 942-948 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.desal.2009.06.064. ISSN 00119164.

[33] HOLKAR, C., et al. A critical review on textile wastewater treatments: Possible approaches. Journal of Environmental Management [online]. 2016, 182, 351-366 [cit. 2017-05-03].
DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.07.090. ISSN 03014797.

[34] DE LA CUEVA BUENO, P., et al. *Nanotechnology for sustainable wastewater treatment and use for agricultural production: A comparative long-term study*. Water Research [online]. 2017, 110, 66-73 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.watres.2016.11.060. ISSN 00431354.

[35] SARIOGLU, O. F., et al. *Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces [online]. 2017, 152, 245-251 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.034. ISSN 09277765.

[36] JURECSKA, Laura, et al. *Intensification of wastewater treatment with polymer fiber-based biofilm carriers*. Microchemical Journal [online]. 2013, 107, 108-114 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.microc.2012.05.028. ISSN 0026265x.

[37]LEWANDOWSKI Z, BEYENAL H. *Fundamentals of Biofilm Research*. CRC/Taylor&Francis; 2007. Second edition. ISBN 9781466559592.

[38]WU Q, et al. *Microscope Image Processing*. *1 edition*. *Amsterdam*; Boston: Academic Press; 2008. ISBN: 978-0-12-372578-3

[39]GONZALEZ RC., WOODS RE. *Digital Image Processing*. 3 edition. Upper Saddle River, N.J: Prentice Hall; 2007. ISBN 0-13-168728-x 978-0-13-168728-8

[40] LIVE/DEAD® *Bac*Light[™] Bacterial Viability Kit, for microscopy [cit. 2017]. Dostupné z https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7007

[41] NAKASONO, S., et al. A 50 Hz, 14 mT magnetic field is not mutagenic or co-mutagenic in bacterial mutation assays. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis [online]. 2000, 471(1-2), 127-134 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/S1383-5718(00)00118-2. ISSN 13835718.

[42] ETRINI, C., et al. *Tumor necrosis factor α and interferon γ production by human peripheral blood mononuclear cells exposed in vitro to sinusoidal 50 Hz magnetic fields*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics [online]. 1997, 44(1), 121-125 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/S0302-4598(97)00039-1. ISSN 03024598.

[43] NAFZIGER, J., et al. *DNA mutations and 50 Hz electromagnetic fields*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics [online]. 1993, 30, 133-141 [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1016/0302-4598(93)80071-2. ISSN 03024598.

[44] JIA, H. Li. Et al. *Combined Effects of 50 Hz Magnetic Field and Magnetic Nanoparticles on the Proliferation and Apoptosis of PC12 Cells*. Biochemical and Environmental Sciences [online]. 2014, [cit. 2017-05-07]. DOI: 10.3967/bes2014.022

[45] DESJOBERT, H., et al. *Effects of 50 Hz magnetic fields on C-myc transcript levels in nonsynchronized and synchronized human cells*. Bioelectromagnetics [online]. 1995, 16(5), 277-283
[cit. 2017-05-07]. DOI: 10.1002/bem.2250160502. ISSN 0197-8462

[46] MONA H. I., et al. 50 Hz Frequency Magnetic Field Effects On Pseudomonas Aeruginosa And Bacillus Subtilis Bacteria. Journal of Applied Physics [online]. 2013, [cit. 2017-05-07]. ISSN 2278-4861

[47] ROTKOVSKÁ, D., Vliv mikrovlnného záření na krvetvorbu a radiační odolnost RTG ozářených myší. Brno, 1978. Kandidátská disertační práce. BIOFYSIKÁLNÍ ÚSTAV ČSAV.

[48] SANDLE T. *Bacterial Adhesion: An Introduction*, Institute of validation technology [online].
2013, [cit. 2017-05-07]. Dostupné z: http://www.ivtnetwork.com/article/bacterial-adhesion-introduction

[49] KŘIKLAVOVÁ L., Technologický návrh biofilmového reaktoru s nanovlákenným nosičem pro čištění průmyslových odpadních vod. Liberec. 2009. diplomová práce. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERECI. Vedoucí práce Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.

[50] KORTUSOVÁ D., Studium vlivu tvaru nanovlákenného nosiče na účinnost biodegradačního procesu v hybridním bioreaktoru. Liberec. 2012. bakalářská práce. TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI. Vedoucí práce Ing. Lucie Křiklavová

[51] Kubota Membrane. [cit. 2017-04-24]. Dostupné z: https://www.kubota-mbr.com/en

Přílohy

A Výpočty chyb

Statistický soubor o n – hodnotách získáme různým měřením. Pravděpodobná hodnota výskytu dat se určí aritmetickým průměrem:

$$\bar{\mathbf{x}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} \mathbf{x}_i = \frac{\mathbf{x}_1 + \mathbf{x}_2 + \dots + \mathbf{x}_n}{n}$$

Pro výpočet chyb následuje další krok, a to je výpočet střední kvadratické chyby aritmetického průměru:

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}}$$

Při strojovém zpracování dat se spíše využívá výběrovou směrodatnou odchylku (jednoho měření), kterou obsahuje ve volbě většina statistických programů:

$$\sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} = \sqrt{n} \cdot \sigma_{\bar{x}}$$

Chyba nepřímého měření se vztahuje na takové veličiny, které přímo neměříme, ale jsou spočteny z naměřených hodnot dle různých matematických (fyzikálních vztahů). Naměřené veličiny jsou zatíženy vlastní chybou (chyba přímého měření), hodnota z nich následně vypočtená tedy bude také zatížena chybou a to takovou, že bude záviset na naměřených veličinách.

Určujeme-li hodnotu veličiny X, závislou na N veličinách q_1, q_2, \dots, q_N s odchylkami $\sigma_{q_1}, \sigma_{q_2}, \dots, \sigma_{q_N}$, kterou lze zapsat jako $X = f(q_1, q_2, \dots, q_N)$, její chybu lze spočíst z parciálních derivací:

$$\sigma_{\rm X} = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial q_1} \cdot \sigma_{q_1}\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial q_2} \cdot \sigma_{q_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\partial f}{\partial q_N} \cdot \sigma_{q_N}\right)^2}$$



B Srovnání měrné vodivosti (salinity) a absorbance

Graf 13 Srovnání měrné elektrické vodivosti (salinita) a absorbance

S rostoucí salinitou se prostředí stává pro bakterie více nepříznivé v důsledku zvyšování osmotického tlaku působícího na buněčnou membránu, což má za následek vyšší prostup rozpuštěných látek a zároveň polutantů do buňky. Dále klesá rozpustnost kyslíku ve vodě a celkově může dojít až k inhibici bakterií.

Experiment probíhal s mírně zasoleným prostředím, počáteční salinita (měrná elektrická vodivost) byla 4,5 mS/cm a v průběhu experimentu se zvyšovala v některých případech až na téměř dvojnásobek. Značný výpar způsobený teplotou okolo 30 °C a vcelku intenzivní aerací, zajišťoval odvod přebytečné vody z reaktoru, a tudíž vstupní zásobní roztok nebyl nijak dosolen. Zvýšená salinita vstupního roztoku by způsobila značné zasolování reaktoru. Zvyšování salinity v experimentu je tedy způsobeno postupným zvyšováním rozpuštěných iontových látek, které jsou součástí metabolické aktivity bakteriální populace (biofilmu a suspendovaných bakterií). Z grafu vyplývá, že salinita kopírovala zvyšování absorbance.

Z důvodu značného výparu okolo 168 hodiny, muselo být do všech reaktorů dolito 500 ml odstáté vody, což způsobilo pokles salinity i pokles absorbance a tím došlo i ke skoku v grafech. Další značné poklesy salinity jsou taktéž způsobeny dorovnáním hladiny reaktoru, kvůli výparu.