

# **Sledování aerobních a anaerobních mikroorganismů v laboratorním bioreaktoru**

Bc. Jan Bienert

---

Diplomová práce  
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí  
akademický rok: 2007/2008

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jan BIENERT**  
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Sledování aerobních a anaerobních mikroorganismů  
v laboratorním bioreaktoru.**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na tvorbu a vlastnosti vloček aktivovaného kalu
  2. Provedte pokusy desintegrace vloček kalu mechanickým způsobem a účinek dokumentujte fotograficky a bakteriologicky
  3. Provedte mikroskopické zhodnocení morfologie vloček při provozu výukového bioreaktoru s ohledem na základní parametry jeho chodu
  4. Získané výsledky přehledně zpracujte, dokumentujte (foto)graficky i tabelárně, za pomoci běžného softwaru (Word, Excel)
-

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Přednostně vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**19. února 2008**

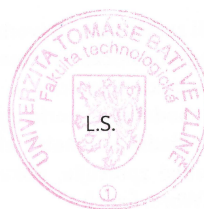
Termín odevzdání diplomové práce:

**16. května 2008**

Ve Zlíně dne 19. února 2008



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.  
*pověřený ředitel ústavu*

## **ABSTRAKT**

Tato práce byla zaměřena na sledování chování mikrobiálních vloček kalových suspenzí, aerobních i anaerobních. Byly sledovány různé vlivy na rozpad či tvorbu vloček a byly dokumentovány řadou fotografických snímků. Tyto byly využity pro pozdější posouzení použitelnosti digitální analýzy obrazu k objektivizaci mikroskopického hodnocení aktivovaných kalů.

Klíčová slova: vločka, aktivovaný kal, bakterie, digitální analýza

## **ABSTRACT**

This work was focused on monitoring of sludge suspension flocks, aerobic as well as anaerobic. We tracked various influences on disintegration or production of flocks. These influences were documents with series of photographic pictures. We used these photographic pictures for digital image analyse to objectification the microscopic classification of activated sludge.

Keywords: floc, activated sludge, bacteria, digital analyse

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, trpělivost, čas, který mi věnoval a za cenné rady, které mi pomohly dokončit tuto práci. Dále bych rád poděkoval Ing. Radku Sedlačikovi za pomoc a rady v průběhu diplomové práce. Taktéž bych rád poděkoval laborantkám paní Dagmar Libosvárové a Danuši Smejkalové za ochotu se kterou mi pomáhaly. Děkuji i Ing. Terezce Václavkové za poskytnutí pracovního místa a za trpělivost. V neposlední řadě patří mé obrovské díky rodičům za podporu při studiu na této škole.

„Život je pes a proto žít je psina.“

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>9</b>
<b>1 VÝZNAM VLOČEK AKTIVOVANÉHO KALU</b> .....	<b>10</b>
1.1 TVORBA VLOČEK.....	10
<b>2 SLOŽENÍ VLOČEK AK A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FLOKULACI</b> .....	<b>11</b>
2.1 FLOKULACE.....	11
<b>3 STABILITA VLOČEK AKTIVOVANÉHO KALU</b> .....	<b>12</b>
<b>4 MODERNÍ METODY STUDIA KALŮ A PROCESŮ V NICH PROBÍHAJÍCÍCH</b> .....	<b>13</b>
4.1 METODA FISH .....	13
4.2 HISTORIE METODY FISH .....	13
4.3 ZACHYCENÍ SIGNÁLU.....	14
4.4 MULTICOLOUR FISH .....	14
4.5 RŮZNÉ METODY FISH .....	15
4.5.1 FISH – mikroautoradiografie (FISH-MAR).....	15
4.5.2 Stabilní izotopické sondování .....	15
4.5.3 Izotopová pole .....	15
4.5.4 Mikroelektrody.....	15
4.6 PŘÍKLAD VYUŽITÍ FISH METODY.....	16
<b>5 DIGITÁLNÍ ANALÝZA OBRAZU</b> .....	<b>17</b>
6.1 OBRAZOVÁ ANALÝZA VLOČEK .....	17
<b>6 CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>19</b>
<b>II METODICKÁ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
<b>7 PRACOVNÍ POMŮCKY</b> .....	<b>21</b>
7.1 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, ŽIVNÁ MEDIA POUŽITÁ PŘI KULTIVACI BAKTERIÍ .....	21
7.1.1 Chemikálie .....	21
7.1.2 Roztoky .....	21
7.1.2.1 Biomédium.....	21
7.1.2.2 Fyziologický roztok .....	22
7.1.2.3 Roztok Hycolu E.....	22
7.1.3 Agarové živné médium .....	22
7.2 PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A DALŠÍ LABORATORNÍ POMŮCKY .....	23
7.2.1 Přístroje a zařízení.....	23
7.2.2 Laboratorní pomůcky .....	24
<b>8 PRACOVNÍ POSTUPY</b> .....	<b>25</b>
8.1 POSTUPY POUŽITÉ PRO DEZINTEGRACI VLOČEK KALU.....	25
8.1.1 Dezintegrace se skleněnými kuličkami .....	25

8.1.2	Dezintegrace homogenizací .....	25
8.1.3	Desetinné ředění vzorků kalů .....	25
8.1.4	Sterilizace v autoklávu SANOclav .....	25
8.1.5	Určení celkového počtu bakterií .....	26
8.1.6	Mikroskopické pozorování .....	26
8.2	POSTUPY POUŽITÉ PRO POKUS PROBÍHAJÍCÍ V DĚLÍCÍCH NÁLEVKÁCH .....	26
8.2.1	Dekantace kalu .....	26
8.2.2	Určení sušiny kalu pro nasazení pokusů (bioreaktor, dělicí nálevky) .....	26
8.2.3	Příprava biomédia .....	26
8.2.4	Centrifugace .....	27
8.2.5	Příprava dělicích nálevek a jejich sledování .....	27
8.3	PRVNÍ POKUS V BIOREAKTORU .....	27
8.4	DRUHÝ POKUS V BIOREAKTORU .....	28
8.5	PRVNÍ POKUS S ANAEROBNÍM KALEM .....	28
8.5.1	Gramovo barvení .....	28
8.6	DRUHÝ POKUS S ANAEROBNÍM KALEM .....	29
8.7	FOTOGRAFOVÁNÍ ODEBRANÝCH VZORKŮ .....	29
8.8	SPOJOVÁNÍ FOTOGRAFIÍ A JEJICH ZPRACOVÁNÍ .....	29
8.9	DIGITÁLNÍ ANALÝZA OBRAZU .....	29
<b>III</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>DEZINTEGRACE VLOČEK POKUS 1 .....</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>DEZINTEGRACE VLOČEK POKUS 2 .....</b>	<b>34</b>
<b>11</b>	<b>POKUS PROBÍHAJÍCÍ V DĚLÍCÍCH NÁLEVKÁCH .....</b>	<b>36</b>
11.1	SLEPÝ POKUS – BEZ PŘÍDAVKU SUBSTRÁTU .....	38
11.2	PŘÍDAVEK KOMPLETNÍHO SUBSTRÁTU PO TÝDNU HLADOVĚNÍ .....	40
11.3	PŘÍDAVEK NEKOMPLETNÍHO SUBSTRÁTU (ROZPUSTNÉHO ŠKROBU) PO TÝDNU HLADOVĚNÍ .....	41
<b>12</b>	<b>BIOREAKTOR POKUS 1 .....</b>	<b>45</b>
<b>13</b>	<b>BIOREAKTOR POKUS 2 .....</b>	<b>51</b>
<b>14</b>	<b>ANAEROBNÍ POKUS 1 .....</b>	<b>57</b>
<b>15</b>	<b>ANAEROBNÍ POKUS 2 .....</b>	<b>60</b>
<b>16</b>	<b>DIGITÁLNÍ ANALÝZA OBRAZU .....</b>	<b>64</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>75</b>

## ÚVOD

Jedním z faktorů ovlivňujících zdraví lidstva je čistota vody, již od dob minulých byl vždy větší počet osídlení tam, kde se vyskytovala čistá a nezávadná voda. Je zřejmé, že i v této době byla voda znečišťována, ale samo čistící schopnost vody si s tímto znečištěním dokázala poradit.

S postupem času se však lidstvo vyvíjelo a nečistoty vypouštěné do vod byly stále agresivnějšího charakteru. Samo čistící schopnost vody přestala stačit a vody se stala závadnější. Nástup průmyslové revoluce a tudíž i technického pokroku tak pro čistotu vody znamenal katastrofu, se kterou se lidstvo potýká do dnes.

Chtě nechtě bylo pro člověka nevyhnutelné se s tímto znečištěním vyrovnat. Vznikaly tak první „továrny“ zabývající se čištěním závadné vody tzv. čistírny odpadních vod.

Hlavní proces čištění odpadních vod probíhá v aktivačních nádržích, ty obsahují kašovitou suspenzi složenou zejména z vloček a z volně se vznášející masy z různých druhů organických i anorganických látek ať již závadných či nezávadných.

K odstranění těchto látek dochází díky bioflokulačním schopnostem bakteriální masy přítomné zejména ve vločkách aktivovaného kalu.

Je tak v zájmu člověka, aby tato bakteriální masa obsažená ve vločkách měla co nejlepší podmínky pro to, aby efektivita a tudíž i dokonalejší odstranění znečišťujících látek v odpadních vodách byly co nejvyšší.



## **I. LITERÁRNÍ REŠERŠE**

## 1 VÝZNAM VLOČEK AKTIVOVANÉHO KALU

Většina buněčné biomasy není volně suspendována v objemu kapaliny, ale je uspořádána ve vločkách.

Vločky jsou komplex struktur, který je tvořený z mikrovloček, ty obsahují metabolicky aktivní i zmrávající bakterie a jiné organismy, jejich složení a aktivita se mění se stářím kalu. Vločky drží pohromadě díky polymerní matici, jejíž chemické složení je různorodé, většinou složkou je však uváděno jako EPS – Extracellular Polymeric Substance – extracelulární polymerní látky. Extracelulární polymery jsou složeny z vysokomolekulárních bílkovin, polysacharidů, DNA, humusových látek. Velikost vloček je ovlivňována různými operačními podmínkami v čistírnách.

Dále vločky díky své struktuře dovolují kapalině proudit skrz jejich mikrostrukturu, tímto je zabezpečen přísun živin pro bakterie zachycené v této mikrostruktuře a dochází tak k odbourávání látek z prostředí. Díky tomuto proudění je uchována členitá struktura vloček, což umožňuje větší schopnost odstraňování látek z prostředí. [1].

### 1.1 Tvorba vloček

Formování vloček je ovlivněno různými bakteriálními kulturami, například různé mikrokolonie bakterií mají velmi odlišnou citlivost, některé z nich vločkují i za anaerobních podmínek [2]

Existují určité domněnky o tom, že velmi výraznou roli při formování vloček hrají důležitou roli bakteriální skupiny rodu Zooglea, významné pro tvorbu vloček jsou i vláknité mikroorganismy, které v menších množstvích zabezpečují pevnou skeletální mikrostrukturu pro jiné látky (např. EPS) a pro vlakotvorné bakterie. Ukazuje se totiž, že bakterie vstupující do reaktorů se adsorbují velmi rychle na vločky, takže vločky hrají velmi důležitou roli v odstraňování bakteriálních buněk a jiných částic materiálu ze směsné odpadní tekutiny [1].

## 2 SLOŽENÍ VLOČEK AK A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ FLOKULACI

Vločky aktivovaného kalu jsou složeny z množství složek, které jsou spolu s ostatními faktory odpovědné za jejich vlastnosti. Tyto vlastnosti souvisí jak s vlastnostmi kalu, tak s flokulací.[2]

Dominantními složkami aktivovaného kalu jsou extracelulární polymery, tyto polymery představují až 80% hmoty aktivovaného kalu. Hrají rozhodující roli při tvorbě vloček, usazování, flokulaci a odvodňování aktivovaného kalu. Extracelulární polymery taktéž prokázaly schopnost vázat těžké kovy, jsou klíčovými faktory způsobující redukci objemu, hmoty, aktivity a využití kalu [3].

### 2.1 Flokulace

Vlastnosti flokulace a usazování jsou rozhodující a mají vliv na celkový výkon čističky.

Částečky vzniklé při flokulačních procesech mají velmi často podobnou strukturu, to je důležité pro hustotu částic, ta se snižuje, zatímco jejich velikost roste. Tato vlastnost má velmi výrazný účinek při separačních procesech jako je sedimentace a filtrace.

Flokulace je ovlivňována jak chemickými (např. pH, dávka flokulantu ...) tak fyzikálními (např. teplota, doba flokulace, lokální hydrodynamické podmínky, intenzita míchání, ...) podmínkami.

Nevýhodou je, že pro dosažení potřebné účinnosti separace je ve většině případů nutné zvýšit dávky flokulantu, tím se celý proces výrazně prodraží. Cena flokulantu totiž tvoří podstatnou část vzniklých nákladů.

### 3 STABILITA VLOČEK AKTIVOVANÉHO KALU

Stabilita vloček aktivovaného kalu je důležitá pro separaci pevných a tekutých složek v čistírnách odpadních vod. Slabá stabilita vloček vede ke zvýšení zákalu na výtoku a tím ke zhoršení kvality odtoku. Biologické a fyzikálně chemické vlastnosti vloček pravděpodobně regulují flokulaci a odvodňování biomasy.

Struktura vloček je velmi důležitým faktorem pro jejich stabilitu, protože ovlivňuje pevno-tekutou separaci. Vločky aktivovaného kalu mají volnou strukturu, ve které jsou bakterie připevněny pomocí matrix složené z EPS. Přímé pozorování vnitřku vloček aktivovaného kalu ukazuje hojnou přítomnost EPS v amorfní formě, obklopující mikroorganismy ve většině vloček.

Pozorování EPS pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie také potvrzuje důležitost EPS při formaci struktury vloček. Tyto výsledky dokazují, že EPS hraje důležitou roli při údržbě struktury a mocnosti mikrobiálních částic. Kvantita a vlastnosti EPS složek se proto považuje za rozhodující pro stabilitu biomasy vloček. Nicméně zřetelná funkce na obsah a složení EPS pro stanovení stability vloček ještě nebyla dokumentována. Vazby mezi bakteriálními buňkami jsou následkem různých typů mezimolekulárních sil, jako jsou van der Waalsovi síly, elektrostatické síly, přemostění EPS prostřednictvím vícemocných kationtů, hydrofobních interakcí, polymerních spleť a jiných interakcí.

Nicméně je dostupných několik málo informací o vzájemné důležitosti těchto interakcí v regulaci stability vloček. Stabilita kalových vloček je také ovlivněna environmentálními podmínkami uvnitř bioreaktoru (intenzita míchání, provzdušňování apod.). EPS jsou složeny z několika různých vysokomolekulárních biopolymerů (jako jsou sacharidy, bílkoviny, nukleové kyseliny, humusové látky) ty obsahují mnoho funkčních skupin schopných účastnit se interakcí. Například zvýšení pH způsobuje ionizaci mnoha funkčních skupin (karboxylové skupiny obsažené v bílkovinách a sacharidech,), v mikrobiálních EPS. Toto vede k většímu odpuzování mezi buňkami a mezi EPS a buňkami, z toho důvodu slábne stabilita kalových vloček. Dvoumocné kationy, zejména vápenaté a hořečnaté, hrají důležitou roli v iontovém přemostování mezi EPS matrix a buňkami. Odstraněním těchto kationtů použitím chelatačních činidel (například EDTA) může dojít k destabilizaci vloček. Stabilita kalových vloček za různých environmentálních podmínek nám pomůže porozumět roli různých EPS na základě interakcí probíhajících ve vločkách aktivovaného kalu. [4]

## 4 MODERNÍ METODY STUDIA KALŮ A PROCESŮ V NICH PROBÍHAJÍCÍCH

Klasické metody mikroskopické (mikroskopie přímým světlem či fázově-kontrastní mikroskopie) a kultivační (kultivace mikrobiálních kultur na pevných živných půdách) jsou mnohdy pro studium mikroorganismů a mikrobiálních procesů nepoužitelné pro zjištění požadovaných informací, neboť jsou limitovány svou podstatou a malou citlivostí – mnohé mikroorganismy jsou uvedenými mikroskopickými technikami nerozlišitelné a na pevných živných půdách existují (do jisté míry) odlišné podmínky pro růst mikrobiálních kultur než v kalových suspensích. Proto jsou intenzívně vyvíjeny nové metody a techniky použitelné pro studium čistírenských mikrobiálních procesů a pro studium klíčových mikrobiálních činitelů. Dvěma významnými metoda z mnoha takových metod jsou FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) a analýza obrazu.

### 4.1 Metoda FISH

K identifikaci a stanovení celkového počtu bakterií v aktivovaném kalu existuje mnoho metod, ale každá z těchto metod má určité omezení.

Vláknité bakterie tradičně byly identifikované díky jejich struktuře. Bohužel, tento široce užívaný systém identifikace nerozlišuje různé organismy se stejnou strukturou a není tedy schopen rozeznat bakterie se strukturou proměnnou. Metoda FISH dovoluje identifikaci specifických bakterií nezávisle na jejich morfologii a proto, se používá jako nová technika ve výzkumu bakterií v aktivovaném kalu [5].

### 4.2 Historie metody FISH

Koncem šedesátých let bylo zjištěno, že hybridizaci nukleových kyselin lze úspěšně provádět i tehdy, je-li cílová nukleová kyselina obsažena ve strukturách cytologického preparátu, například v chromozómech (Pardue a Gal 1969). Tím byl položen základ zcela novému, přímému způsobu mapování genomů [6].

První značkou, která byla používána v sondách nukleových kyselin, byly izotopy ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ), jejichž výhodou je vysoká citlivost detekce, nevýhodou však nepřesně lokalizovaný signál na chromozómech. Posléze se přešlo na značení pomocí jednoduchých orga-

nických molekul a heteroduplexy DNA v chromozómech se detekovaly pomocí příslušných protilátek nebo jiných proteinových ligandů, konjugovaných s molekulami umožňujícími jejich vizualizaci v mikroskopu [6].

Nejprve to byly enzymy (peroxidáza, alkalická fosfatáza) přeměňující určitý substrát v barevný nerozpustný produkt. Pravou revoluci způsobilo však zavedení fluorescenčního značení, které se sebou přineslo řadu výhod (Jiang a Gil 1994), například výrazné zvýšení citlivosti nebo možnost užití více sond najednou. Fluorescenční značka (nejčastěji fluorescein, rhodamin nebo nověji např. cyaninová barviva) může být buďto přímo navázána k oligonukleotidu, a inkorporována do sondy NK (přímé značení, např. Reader et al. 1994) nebo může být konjugována k proteinovému ligandu proti biotinu nebo digoxigeninu. Podle toho, jaký zvolíme postup značení a detekce, bude procedura různě rychlá a citlivá. Přímé značení se používá tam, kde je žádoucí rychlost, ale není třeba vysoké citlivosti [6].

Při použití sondy značené biotinem, nebo digoxigeninem a následné detekci pomocí signálu pomocí protein-fluorescenčního konjugátu lze vhodně zvolenou kaskádou reakcí dosáhnout vysoké citlivosti [6].

### 4.3 Zachycení signálu

Způsobů zachycení signálů je celá řada. Např. fluorescenční značka je excitována světlem rtuťové výbojky o takové vlnové délce, kterou propustí příslušný filtr zabudovaný v mikroskopu. Emitovanou fluorescenci daného fluorochromu pak pozorujeme jako barevný signál (fluorescein - zelená fluorescence, rhodamin - červená fluorescence), DNA v chromozómech se barví látkou s odlišnou fluorescencí (DAPI - modrá, propidium jodid – červená) [6].

### 4.4 Multicolour FISH

Technika fluorescenční in situ hybridizace umožňuje detekovat polohu více různých DNA sond zároveň na jednom preparátu, pokud použijeme pro každou sondu jinou značku, např. fluorescein-dUTP a rhodamin-dUTP (přímé značení), nebo biotin a digoxigenin-dUTP s příslušně odlišnými detekčními systémy aplikovanými postupně (nepřímé značení). Tato metoda se nazývá multicolour FISH [6].

## 4.5 Různé metody FISH

### 4.5.1 FISH – mikroautoradiografie (FISH-MAR)

Objevení FISH metody, umožňuje identifikaci a studium živých organismů v nekultivační metodou a zároveň současné stanovení mikroorganismů. Mikrobiální biomasa (například aktivovaný kal) se inkubuje s radioaktivně označeným substrátem, následně jsou členové společenství identifikováni metodou FISH. Paralelně včlenění radioaktivního substrátu do bakteriálních buněk se zobrazí na radioaktivně citlivé stříbrné emulzi, která je umístěna nad radioaktivně označenými buňkami a zpracovávána standardními fotografickými procedurami [7].

### 4.5.2 Stabilní izotopické sondování

Po kultivaci mikrobiální kultury se substrátem se stabilním izotopem je část DNA substrátu oddělena od původní DNA ostatních členů kultury centrifugováním. Totožnost označených mikrobů pak může být určena klonováním a řazením DNA. Upravený protokol pak umožňuje nahrazení RNA za DNA, které umožňuje mnohem kratší dobu inkubace v důsledku rychlejší RNA syntézy [7].

### 4.5.3 Izotopová pole

16S - rRNA je cíleným mikropolem, může obsahovat mnoho sond a tak umožnit současnou identifikaci vícero druhů společenstva. Pokud je biomasa inkubována se substrátem vydávajícím radioaktivní záření, část tohoto záření bude začleněna do nově syntetizované rRNA. Tato RNA pak může být extrahována a určena standardními metodami fluorescence. Hybridizace RNA pomocí mikropole umožňuje zhodnotit rozmanitost a aktivitu kultury pomocí fluorescence a radioaktivity [7].

### 4.5.4 Mikroelektrody

Mikroelektrody jsou schopny vyřešit chemický gradient v komplexním prostředí jako například ve vločkách aktivovaného kalu, nebo v biovrstvách. Dále mikroelektrody umožňují měřit mimo jiného i  $O_2$ ,  $H_2S$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$  a pH, mohou tak poskytnout cennou informaci o mikrobiální aktivitě v mikroheterogenním prostředí [7].

#### 4.6 Příklad využití FISH metody

Byly analyzovány 3 vzorky aktivovaného kalu z textilních továren za pomoci FISH metody použitím rRNA sond a fázově kontrastní mikroskopii. Pozornost byla zaměřena na zastoupení bakteriálních skupin v aktivaci a na charakteristiku vloček [8].

V aktivaci ČOV u továrny číslo jedna převládala podtřída B Proteobakterií a skupina Cytophaga Flavobacterium (33,3% a 31,0%) následovala gama podtřída proteobakterií (17,1%), dále grampozitivní bakterie s vysokým podílem C+G v DNA (Actinobacteria) (15,4%) a nakonec alfa podtřída proteobakterií (3,2%) [8].

Továrna dvě vykazovala podobný vzorec (32.7%, 31.8%, 17.5%, 16.4%, 1.6%) Zatímco v továrně 3 převládaly alfa a beta podtřídy proteobakterií (25.2%, 25.0%) a Cytophaga Flavobacterium (24.8%) následovaný gama podtřídou proteobakterií (13,6%) a kmenem Actinobacteria (11,4%) v nižších podílech [8].

Charakteristika vloček u továrny číslo jedna a dvě byla normální, v továrně číslo tři byly vločky rozptýlené a atypické.

Na závěr tak metoda FISH poskytla komplexní informace o bakteriálním složení aktivovaného kalu ve vzorcích. Složení bakteriálního společenství a jejich koncentrace společně s charakterizací vloček by mohly být některým z důvodů, které ovlivní efektivnost práce mezi těmito třemi textilními továrnami, z hlediska čištění odpadních vod [8].



## 5 DIGITÁLNÍ ANALÝZA OBRAZU

Charakteristika vloček aktivovaného kalu je důležitá nejen pro výzkum, ale i pro kontrolu postupů probíhajících každodenně v čistírnách odpadních vod. Mikroskopické sledování procesů v aktivovaném kalu je nejrychlejší užívanou metodikou při sledování biologické degradace kontaminantů přítomných v odpadní vodě, má však, jak již bylo uvedeno výše, jen omezenou vypovídací schopnost a navíc je zatížena subjektivním hodnocením pozorovatele. Vločky přítomné v aktivovaném kalu jsou nepochybně hlavní složkou tohoto systému a určují kvalitu čištění odpadní vody a tím celkovou účinnost čistíren odpadních vod [9].

Zkoumání vloček aktivovaného kalu se soustředí zejména na jejich strukturu, tvar, velikost, složení a rozložení mikroorganismů v jejich struktuře. Nedávno objevené analytické a mikroskopické metody analýzy vloček aktivovaného kalu umožňují bližší pohled na jejich strukturu a popis jejich hlavních parametrů. Cestou, jak poněkud eliminovat zmíněné subjektivní zkreslení skutečného vzhledu aktivovaného kalu (či jiných kalů) je digitální analýza obrazu [9].

### 6.1 Obrazová analýza vloček

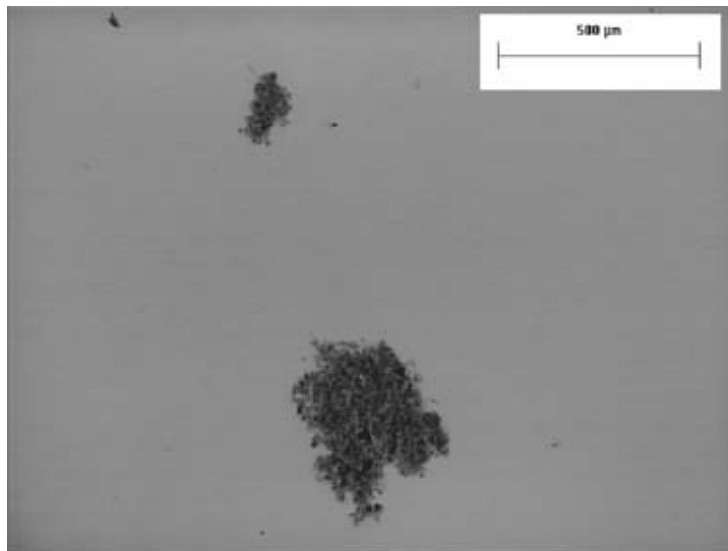
Obrazová analýza se používá k popisu mnoha různých biologických procesů se suspendovanými a imobilizovanými kulturami. Existuje několik typů softwaru určeného pro analýzu obrazu, jsou dodávány firmami, které distribuují mikroskopická zařízení. Existuje ale i několik volně dostupných programů schopných analýzy obrazu, příkladem je ImageJ vyvinutý ve spolupráci Research Services Branch of National Institute of Health (USA) a Digital image Analysis in Microbial Ecology of Vienna Ecology Centre ve Vídni.

Analýzu obrazu lze rozdělit do 4 kroků:

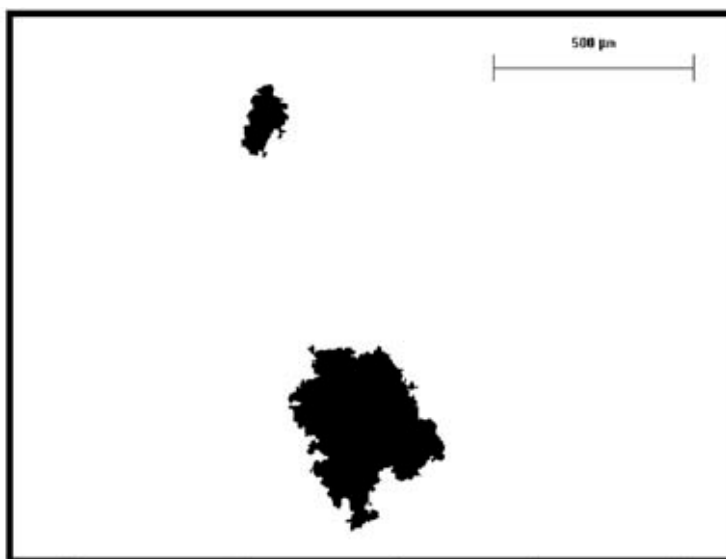
- 1) Příprava vzorku
- 2) Fotografování vzorku
- 3) Příprava k analýze obrazu
- 4) Vlastní analýza

Příprava obrazu je sled operací, které umožňují transformovat obraz do stavu, jež umožňuje analýzu objektů přítomných ve vzniklém obrazu. Lze tak analyzovat strukturu vloček (vločky pevné či slabé), jejich velikost či počet (nebo počet s určitou velikostí).

Zajímavá je kombinace metody FISH, metody 16S RNA a obrazové analýzy. Tato kombinace metod vedla k objevení určitého porozumění ve vztahu užitých procesů a příslušných mikroorganismů v biologických čistírnách odpadních vod [9].



*Obrázek 1: Před použitím softwaru*



*Obrázek 2: Obraz určený k analýze*

Mnohé testy ukazují, že některé typy digitální analýzy obrazu tak mohou být užitečné při objektivním posuzování a určování biomasy přítomné ve vzorku. Vzhledem ke skutečnosti, že schopnost usazování kalu závisí na struktuře, velikosti a počtu pevných vloček, pak má případná analýza obrazu přímý vztah k technologickým vlastnostem zkoumaného kalu. Z toho důvodu jsou v současné době hledány vztahy mezi morfologií vloček a indexem usazování biomasy [9].

## 6 CÍLE PRÁCE

Prvním cílem této práce je určit jaké množství bakterií se uvolní z vloček kalové suspenze při použití dvou různých metod dezintegrace.

Cílem následujícího pokusu prováděného v dělicích nálevkách a v bioreaktoru bylo prokázat, zda lze dosáhnout určitého srovnání mezi těmito dvěma způsoby provedení.

Cílem druhého pokusu v bioreaktoru bylo zjistit, jaký vliv bude mít externí zásah do průběhu právě probíhajícího pokusu z hlediska týdenního navýšení teploty na 45°C. pokus byl dále zaměřen na sledování celkového počtu psychrofilních a mezofilních bakterií.

Cílem pokusů s kalem anaerobním bylo sledování vývoje vloček a jejich velikosti za těchto podmínek.

Dalším cílem práce byla objektivizace vyhodnocování počtu vloček v kalové suspenzi za pomoci softwaru určeného k digitální analýze obrazu.

## **II. METODICKÁ ČÁST**

## 7 PRACOVNÍ POMŮCKY

### 7.1 Chemikálie, roztoky, živná media použitá při kultivaci bakterií

Pokud není uvedeno jinak jsou všechny chemikálie čistoty p.a. a byly dodány firmou LACHEMA Neratovice, ČR nebo PENTA, ČR.

#### 7.1.1 Chemikálie

$K_2HPO_4$  bylo naváženo 0,2 g na 1000 ml suspenze v bioreaktoru (děličkách)

$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  bylo naváženo 0,01g na 1000ml suspenze v bioreaktoru (děličkách)

$CaCl_2$  bylo naváženo 0,004g na 1000 ml suspenze v bioreaktoru (děličkách)

Kompletní substrát Hycol E (TANEX, Hrádek nad Nisou)

Rozpustný škrob

#### 7.1.2 Roztoky

##### 7.1.2.1 Biomédium

Biomedium bylo složeno z celkem šesti roztoků o tomto složení:

A) 22,5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  se rozpustilo v – 1000 ml destilované vody.

B) 27,5 g  $CaCl_2$  se rozpustilo v – 1000 ml destilované vody,

C) 0,25 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  se rozpustilo v – 1000 ml destilované vody,

D) 10,0 g  $(NH_4)_2SO_4$  se rozpustilo v – 1000 ml destilované vody,

E) fosfátový pufr (v 1000 ml destilované vody se rozpustilo):

$KH_2PO_4$ .....8,2g

$K_2HPO_4$ .....21,8g

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ .....44,7g

F) roztok stopových prvků (v 1000ml destilované vody byl rozpuštěno):

$H_3BO_3$ .....0,75g

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ .....3,00g

ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,10g
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O.....	0,50g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O.....	0,05g
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.....	0,1813g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O.....	0,05g
Biomedium bylo složeno dle následujícího dávkování (na 1000ml destilované vody):	
A, B, C, F .....	1ml
D.....	5ml
E.....	20ml

### 7.1.2.2 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8,5 g NaCl a následným rozpuštěním v 1000ml destilované vody, roztok byl dokonale promíchán a vysterilizován při teplotě 120°C po dobu 30 minut.

### 7.1.2.3 Roztok Hycolu E

Roztok kompletního substrátu Hycolu E byl připraven navážením 1 g Hycolu E a jeho následným rozpuštěním v 1000 ml destilované vody.

### 7.1.3 Agarové živné médium

Agar byl připraven navážením jeho složek a dokonalým rozpuštěním v určitém množství destilované vody. Agar byl sterilizován při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Po zhládnutí asi na 45°C byl rozlit do Petriho misek a ponechán ztuhnout.

Trypton-yeast extrakt agar (TYA agar)

TYA agar (Himedia, India) .....2,1g

(Složení: trypton 0,6g; kvasničný extrakt 0,3g; agar 1,2g)

Destilovaná voda.....100ml

## 7.2 Přístroje, zařízení a další laboratorní pomůcky

### 7.2.1 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Sartorius.....	SRN
Analyzátor uhlíku SCHIMADZU 5000A.....	AUD
Autokláv.....	SRN
Bioreaktor.....	CZ
Centrifuga Rotanta 460R.....	SRN
Fotoaparát Olympus.....	JAP
Homogenizátor Masticator (Biotech).....	CZ
ImageJ (software).....	USA
Laboratorná sušárna UM100.....	SRN
Laboratorní sušárna UM200 MEMME.....	SRN
Míchačka ELMAG MM4.....	CZ
Mikroskop Olympus (CX41RF).....	JAP
Mikroskopická podložní sklíčka s komůrkami Cyrus II, Meopta.....	CZ
Mikrovlnná trouba Moulinex.....	CZ
Peristaltická čerpadla S31.....	PL
Počítačka kolonií včetně lupy (Schütz) .....	SRN
Provzdušňovací motorek HP6000 ATMAN.....	SRN
Předvážky Scaltec SPB 41.....	SRN
Sušárna STE 31/II.....	CZ
Termostat Heraeus.....	SRN

**7.2.2 Laboratorní pomůcky**

Pipetmany (1 – 5 ml, 500  $\mu$ l, 100  $\mu$ l).....PL

Veškeré laboratorní sklo.....UIOŽP,FT,UTB



## 8 PRACOVNÍ POSTUPY

### 8.1 Postupy použité pro dezintegraci vloček kalu

#### 8.1.1 Dezintegrace se skleněnými kuličkami

Dezintegrace byla provedena v malé uzavřené lahvičce o objemu 100 ml. V lahvičce bylo 25 kusů skleněných kuliček a 50 ml kalu. V první fázi bylo s lahvičkou 10 minut třepáno, následovala mikroskopie vloček kalu a určení celkového počtu mikroorganismů. Po té následovalo 20 minutové třepání (celková doba třepání byla tedy 30 minut). Po uplynutí této doby byly opět odebrány vzorky pro mikroskopii a pro zjištění celkového počtu bakterií.

#### 8.1.2 Dezintegrace homogenizací

Dezintegrace byla provedena na přístroji Masticator. Do plastového sáčku bylo od-lito asi 200 ml kalu, sáček byl vložen do přístroje a přístroj byl spuštěn. Postup při mikroskopii a při určení celkového počtu bakterií odpovídal postupu za použití skleněných kuliček. V druhé fázi pokusu se postup lišil pouze dobou homogenizace, ta byla 30 minut a 150 minut, celková doba homogenizace byla tedy 180 minut.

#### 8.1.3 Desetinné ředění vzorků kalů

Ze skleněné lahvičky (resp. plastového sáčku) bylo odebráno 500  $\mu$ l kalu a umístěno do sterilní zkumavky s 4,5 ml fyziologického roztoku. Zkumavka byla protřepána a promíchána, ze zkumavky se odebralo 500  $\mu$ l suspenze a umístnila se do další zkumavky. Tento postup byl opakován cca 5 – 6 krát. Získala se tak řada ředění od  $10^{-1}$  až po  $10^{-5}$ .

#### 8.1.4 Sterilizace v autoklávu SANOclav

Sterilizace byla provedena v laboratorním autoklávu SANOclav LaM 3-20-MCS-J při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Takto byl sterilizován veškerý použitý živný agar a fyziologický roztok.

### 8.1.5 Určení celkového počtu bakterií

Na Petriho misky bylo napipetováno 100  $\mu$ l suspenze z vybraných zkumavek desetinného ředění, po té byly misky zality TYA agarem a nechaly se ztuhnout, a nechaly se kultivovat při laboratorní teplotě po dobu 5 - 7 dnů.

### 8.1.6 Mikroskopické pozorování

Proběhlo mikroskopické pozorování odebraných vzorků z jednotlivých fází probíhajícího pokusu, v každém vzorku byl spočítán počet vloček přesahujících rozměr 100x100 $\mu$ m, pozorování se konalo při zvětšení 200x.

## 8.2 Postupy použité pro pokus probíhající v dělicích nálevkách

### 8.2.1 Dekantace kalu

Pro každý pokus týkající se bioreaktoru, dělicích nálevek a dezintegračních testů byl vždy použit čerstvě dovezený kal z čistírny odpadních vod Malenovice. Vlastní dekantace probíhala následovně. Nejprve byl kal scezen přes dvě síta do dvou 10 litrových plastových kýblů. Následovalo asi 45 minutové odstání kalu a po té došlo ke slítí neusazené části kalu a vody. Po té se voda opět doplnila a kal se promíchal. Celý tento cyklus byl 3x opakován. Kal se následně přemístil do provzdušňované aparatury.

### 8.2.2 Určení sušiny kalu pro nasazení pokusů (bioreaktor, dělicí nálevky)

Byla určena sušina dekantovaného kalu z důvodů určení objemu kalu potřebného k centrifugaci. K rychlejšímu určení sušiny byla využita mikrovlnná trouba. Koncentrace sušiny kalu jak v děličkách, tak v bioreaktoru byla na počátku přibližně 2g/l.

### 8.2.3 Příprava biomédia

Pro veškeré pokusy bylo připraveno biomedium o složení popsáném v kapitole 7.1.2. Pro pokusy v bioreaktoru bylo připraveno celkem 8 litrů biomédia.

### 8.2.4 Centrifugace

Všechn kal byl centrifugován v 1000 ml nádobách v chlazené centrifuze za tohoto nastavení parametrů: otáčky 4000rpm, teplota 15°C, čas 10min. Centrifugace byla použita pro odstranění supernatantu z dekantovaného kalu.

### 8.2.5 Příprava dělicích nálevek a jejich sledování

Bylo použito celkem 6 dělicích nálevek, v každé dělicí nálevce bylo 1000ml bio-media rozmíchaného s odpovídajícím množstvím centrifugovaného kalu. Dvě dělicí nálevky (D1 a D2) sloužily jako slepé, kontrolní. Do dvou dělicích nálevek (D3 a D4) byl po týdnů hladovění přidán kompletní substrát složený z 0,5g Hycolu E a přísávek minerálních látek zmíněných v kapitole 7.1.1. Do posledních dvou dělicích nálevek (D5 a D6) byl po týdnů hladovění přidán roztok složený z 0,5g nekompletního substrátu rozpustného škrobu a minerálních látek zmíněných v kapitole 7.1.1. Z dělicích nálevek byly odebírány vzorky na určení sušiny, DOC (rozpuštěný organický uhlík) a mikroskopii. Počítány byly pouze vločky, jejichž rozměr přesahoval hodnotu 100 x 100  $\mu\text{m}$ . Vzorek odebraný na DOC byl filtrován, takto bylo postupováno při každém odběru vzorku na DOC. Dělicí nálevky byly neustále provzdušňovány provzdušňovacím motorkem. Z důvodů zachytávání podílu sušiny kalu na stěnách dělicích nálevek bylo pokaždě pozorování a odebrání vzorku na DOC a sušinu s děličkami zamícháno. Při mikroskopii byl použit systém panoramatického fotografování, kdy část fotografie se částečně překrývala s fotografií následující. Tento způsob fotografování byl zvolen z důvodu efektivnějšího vyhodnocení získaných fotografií.

## 8.3 První pokus v bioreaktoru

Úkony, kterými bylo postupováno v těchto pokusech, se v základních principech příliš nelišily od pokusu probíhajícího v dělicích nálevkách. Proběhla dekantace kalu, určení sušiny dekantovaného kalu, centrifugace vypočteného množství kalu, mikroskopické pozorování a zpracování fotografií.

Biomedium pro tyto pokusy bylo použito v množství celkem 8 litrů. Po týdnů hladovění byl přidán substrát kompletního Hycolu E v koncentraci odpovídající 0,5 g/l spolu s minerálními látkami z kapitoly 7.1.1. Po dobu trvání pokusu byla teplota udržována na hodnotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

## 8.4 Druhý pokus v bioreaktoru

Druhý pokus se od pokusu prvního lišil zejména v diskontinuálním dávkování kompletního substrátu Hycolu E, o koncentraci 1g/l vždy tak, aby dávkování probíhalo alespoň hodinu denně. Po dobu prvního týdne pokusu byla teplota udržována na hodnotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , byla sledována sušina, charakter vloček, celkový počet bakterií, DOC. Druhý týden pokusu byla teplota v bioreaktoru navýšena na  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , byly přidány minerální látky dle kapitoly 7.1.1 a pokračovalo se v odebírání vzorků stejně jako v prvním týdnu pokusu.

V průběhu pokusu bylo regulováno pH pomocí roztoků připravených v průběhu anaerobních pokusů [10].

## 8.5 První pokus s anaerobním kalem

První pokus s anaerobním kalem byl nachystán s počáteční sušinou 9,161 g/l. První 73 hodin byla suspenze kalu ponechána bez přídavku substrátu a po uplynutí této doby bylo do bioreaktoru jednorázově nadávkováno 12 g glycerolu. První pokus s anaerobním kalem proběhl ještě před novým způsobem fotografování. Byly sledovány celkové počty vloček hledaného rozměru a byla pozorována struktura vloček. Na rozdíl od pokusů aerobních, pokusy anaerobní trvaly týden. Informace o vývoji sušiny a DOC byly získány z paralelně probíhající DP Martina Bartáka [10].

### 8.5.1 Gramovo barvení

Nefixovaný roztěr na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti ta se nechala působit po dobu asi 60 vteřin.

Poté bez oplachování byla barva slita, preparát byl překryt Lugolovým roztokem, působení proběhlo opět po dobu 60 vteřin.

Roztok byl slit, opláchnut opatrně destilovanou vodou a odbarvován v šikmé poloze etanolem tak dlouho, dokud odtékalo barvivo (po dobu 20 - 25 vteřin).

Nakonec byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou a ponechán oschnout vysoko nad plamenem. Preparát byl mikroskopován pomocí imerzního objektivu [11].

## 8.6 Druhý pokus s anaerobním kalem

Druhý pokus s anaerobním kalem proběhl podobně jako pokus první. Rozdílná byla počáteční hodnota sušiny suspenze kalu, ta byla 4,565 g/l. Suspenze kalu se ponechala 68,5 hodiny bez substrátu jako slepý pokus, po této době bylo k suspenzi kalu jednorázově nadávkováno 12 g glycerolu [10].

Opět proběhlo sledování sušiny, DOC a mikroskopování, tentokrát již upraveným způsobem fotografování.

## 8.7 Fotografování odebraných vzorků

V prvních fázích práce proběhlo fotografování odebraných vzorků náhodným výběrem míst na počítačí komůrce. Z důvodů rozšíření o digitální analýzu obrazu bylo později v průběhu prací fotografování upraveno, celkem bylo z jednoho vzorku pořízeno 16 fotografií systémem 4x4. Takto získané snímky byly dále zpracovávány.

## 8.8 Spojování fotografií a jejich zpracování

Ke spojování fotografií byl použit software dodávaný firmou Olympus (QuickPHOTO PRO 2.0). Výsledná fotografie zobrazovala asi 25 % celkové plochy počítačí komůrky Cyrus II. Fotografie byly dále zpracovány pomocí volně šiřitelného softwaru ImageJ, který umožnil přesné určení počtu vloček přesahující hledaný rozměr 100 x 100 $\mu$ m.

## 8.9 Digitální analýza obrazu

K digitální analýze obrazu byly použity již upravené fotografie. K vlastní analýze byl použit volně dostupný software ImageJ. Nejprve bylo nutné převést stávající systém zobrazení z RGB na 8 bitů. Dále bylo nastaveno měřítko v záložce Analyze – pod záložka Set Scale, pomocí funkce treshold, v záložce Image, pod záložka Adjust byly potlačeny nežádoucí jevy vzniklé při fotografování a při převodu na 8 bitový systém zobrazení. V analýze particles (záložka Analyze) byla nastavena plocha hledaných částic v mikrometrech čtverečních (10 000  $\mu$ m<sup>2</sup>) a byla spuštěna vlastní analýza obrazu. Počet vloček o hledaném rozměru se následně zobrazil v tabulce.

### **III. VÝSLEDKY A DISKUZE**

## 9 DEZINTEGRACE VLOČEK POKUS 1

V první části dezintegrace byl sledován vliv homogenizace (pomocí přístroje Masticator) nebo třepání se skleněnými kuličkami na vločky aktivovaného kalu a na celkový počet bakterií v suspensi. Cílem pokusu bylo objasnit, jakým způsobem se projeví jak třepání, tak homogenizace aktivovaného kalu na počet vloček a zejména na celkový počet bakterií, uvolněných z vloček. Záměrem bylo zjištění, zda je možno dosáhnout určité dezintegrace vloček pro následné kvantitativní mikrobiologické rozborů.

*Tabulka 1: Počty vloček ve vzorcích 1. pokusu dezintegrace*

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměr	Sm. odchylka
Původní kal	189	203	211	<b>201,0</b>	9,09
10 min homogenizace	68	73	76	<b>72,3</b>	3,30
30 min homogenizace	60	66	53	<b>59,7</b>	5,31
10 min třepání	85	83	95	<b>87,7</b>	5,25
30 min třepání	79	75	71	<b>75,0</b>	3,27

Z tabulky je patrné, že výraznější vliv na snížení počtu vloček hledaného rozměru (100 x 100 μm) má homogenizace s využitím přístroje Masticator. Třepání se skleněnými kuličkami vykazuje taktéž úbytek vloček o sledovaném rozměru, nicméně je fyzicky namáhavé a v praxi pravděpodobně neproveditelné.

Celkové počty bakterií byly sledovány na TYA agaru. Bylo dosaženo těchto výsledků:

*Tabulka 2: Celkový počet bakterií - pokus 1.*

	Miska 1	Miska 2	Průměr
Původní kal	$5,0 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	<b><math>6,0 \cdot 10^3</math></b>
10 min homogenizace	$2,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	<b><math>1,5 \cdot 10^4</math></b>
30 min homogenizace	$2,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	<b><math>2,5 \cdot 10^5</math></b>
10 min třepání	$1,7 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	<b><math>1,4 \cdot 10^4</math></b>
30 min třepání	$2,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	<b><math>2,5 \cdot 10^4</math></b>



*Obrázek 3: Nativní kal*



*Obrázek 4: 10 minut homogenizace*



*Obrázek 5: 30 minut homogenizace*



*Obrázek 6: 10 minut třepání*



*Obrázek 7: 30 minut třepání*

Z obrázků je patrné, že došlo k úbytku počtu vloček větších rozměrů. Tento úbytek je patrný zejména z výsledných obrázků získaných při homogenizaci aktivovaného kalu (Obr. 5, ve srovnání s obr. 3). Třepáním se skleněnými kuličkami se počet sledovaných



vloček také snížil, ale ne tak výrazně jako v případě homogenizace. U obou způsobů dezintegrace došlo k navýšení množství mezivločkové hmoty, přičemž výraznějších rozdílů bylo dosaženo homogenizací před třepáním se skleněnými kuličkami. Celkový počet bakterií v kalové suspensi, homogenizované v přístroji Masticator, byl přibližně 40x vyšší než v původním kalu, zatímco celkový počet bakterií získaných homogenizací kalu skleněným kuličkami byl pouze 4x vyšší. Lze tedy prokázat souvislost mezi dobou homogenizace a způsobem, jakým byla provedena.

## 10 DEZINTEGRACE VLOČEK POKUS 2

Druhá fáze dezintegrace vloček byla provedena pouze v homogenizátoru, na základě výsledků předchozího pokusu. Cíl byl podobný jako v první části dezintegrace, a to zjistit, jaký vliv bude mít prodloužená doba homogenizace (180 minut) na počet vloček a celkový počet bakterií v suspensi.

*Tabulka 3: Počty vloček ve vzorcích 2. pokusu dezintegrace*

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměr	Sm. odchylka
Původní kal	175	178	183	<b>178,7</b>	3,30
30 min homogenizace	84	92	81	<b>85,7</b>	4,64
180 min homogenizace	36	25	30	<b>30,3</b>	4,50

Celkové počty bakterií byly sledovány na TYA agaru. Bylo dosaženo těchto výsledků:

*Tabulka 4: Celkový počet bakterií – pokus 2*

	Miska 1	Miska 2	Průměr
Původní kal	$3,7 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	<b><math>3,4 \cdot 10^3</math></b>
30 min homogenizace	$2,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	<b><math>2,5 \cdot 10^4</math></b>
180 min homogenizace	$1,0 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$	<b><math>1,0 \cdot 10^5</math></b>



*Obrázek 8: Nativní kal*



*Obrázek 9: 30 minut homogenizace*



*Obrázek 10: 180 minut homogenizace*

V druhé části dezintegrace nebylo provedeno třepání se skleněnými kuličkami. Z obrázků je patrné, že došlo k mnohem výraznějšímu úbytku vloček sledovaného rozměru a k jejich roztržení. Velmi výrazně tak vzrostla hustota mezivločkové hmoty. Výsledky celkového počtu bakterií naznačují, že delší doba homogenizace má vliv na uvolnění vyššího počtu bakterií do suspence, neboť bylo zaznamenáno zvýšení celkového počtu bakterií z hodnoty  $3,4 \cdot 10^3$  na  $1 \cdot 10^5$ .

## 11 POKUS PROBÍHAJÍCÍ V DĚLÍCÍCH NÁLEVKÁCH

Tento pokus byl proveden z důvodů selhání hard disku bioreaktoru, byl využit jako srovnávací pokus s později konaným pokusem v již zmíněném bioreaktoru. Cílem bylo zjistit, jaký dopad bude mít týdenní hladovění kalu a po té jednorázové přidání kompletního substrátu (Hycolu E + minerální soli, bez dusíku) a nekompletního (rozpuštěného škrobu + minerální soli, bez dusíku) na tvar, velikost a počet vloček v kalové suspenzi.

Tabulka 5: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D1 a D2

Datum	D1	D1	Průměr	Sm. odchylka	D2	D2	Průměr	Sm. odchylka
4.3	78	74	<b>76,0</b>	2,00	69	76	<b>72,5</b>	3,50
7.3	104	110	<b>107,0</b>	3,00	98	93	<b>95,5</b>	2,50
10.3	99	106	<b>102,5</b>	3,50	93	99	<b>96,0</b>	3,00
11.3	107	100	<b>103,5</b>	3,50	90	96	<b>93,0</b>	3,00
12.3	99	105	<b>102,0</b>	3,00	105	113	<b>109,0</b>	4,00
13.3	99	90	<b>94,5</b>	4,50	83	90	<b>86,5</b>	3,50
14.3	101	108	<b>104,5</b>	3,50	90	97	<b>93,5</b>	3,50
17.3	101	93	<b>97,0</b>	4,00	89	97	<b>93,0</b>	4,00
18.3	92	103	<b>97,5</b>	5,50	88	83	<b>85,5</b>	2,50

Tabulka 6: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D3 a D4

Datum	D3	D3	Průměr	Sm. odchylka	D4	D4	Průměr	Sm. odchylka
4.3	70	77	<b>73,5</b>	3,50	77	82	<b>79,5</b>	2,50
7.3	102	106	<b>104,0</b>	2,00	94	98	<b>96,0</b>	2,00
10.3	90	95	<b>92,5</b>	2,50	89	95	<b>92,0</b>	3,00
11.3	116	125	<b>120,5</b>	4,50	117	120	<b>118,5</b>	1,50
12.3	145	139	<b>142,0</b>	3,00	133	134	<b>133,5</b>	0,50
13.3	137	133	<b>135,0</b>	2,00	123	134	<b>128,5</b>	5,50
14.3	144	159	<b>151,5</b>	7,50	137	149	<b>143,0</b>	6,00
17.3	155	142	<b>148,5</b>	6,50	155	159	<b>157,0</b>	2,00
18.3	155	163	<b>159,0</b>	4,00	175	178	<b>176,5</b>	1,50

Tabulka 7: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D5 a D6

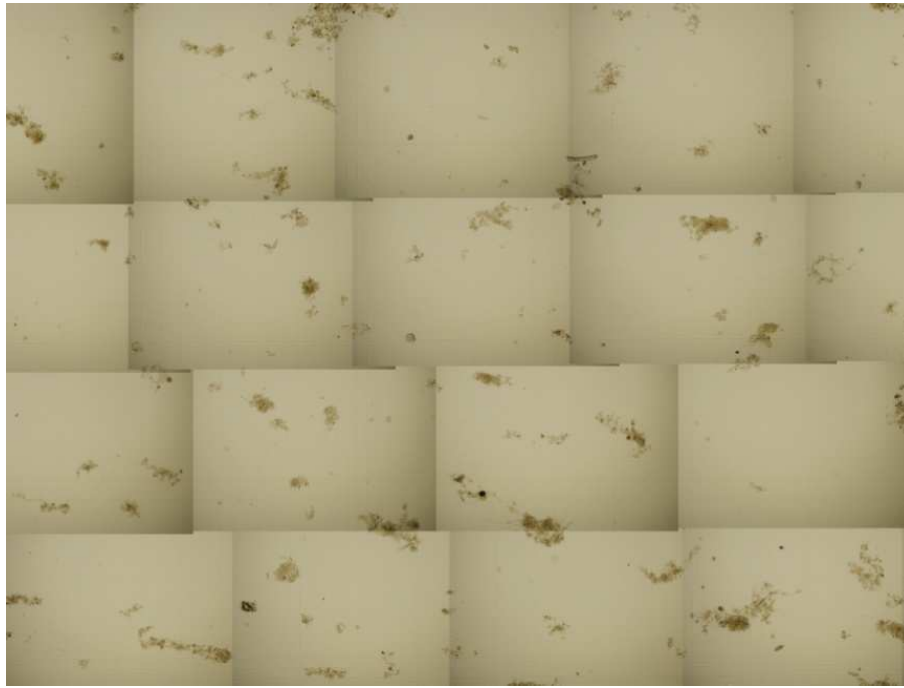
Datum	D5	D5	Průměr	Sm. odchylka	D6	D6	Průměr	Sm. odchylka
4.3	66	75	<b>70,5</b>	4,50	70	77	<b>73,5</b>	3,50
7.3	100	92	<b>96,0</b>	4,00	97	93	<b>95,0</b>	2,00
10.3	99	91	<b>95,0</b>	4,00	83	90	<b>86,5</b>	3,50
11.3	95	102	<b>98,5</b>	3,50	113	110	<b>111,5</b>	1,50
12.3	125	119	<b>122,0</b>	3,00	133	121	<b>127,0</b>	6,00
13.3	129	121	<b>125,0</b>	4,00	133	134	<b>133,5</b>	0,50
14.3	124	137	<b>130,5</b>	6,50	139	145	<b>142,0</b>	3,00
17.3	152	141	<b>146,5</b>	5,50	132	140	<b>136,0</b>	4,00
18.3	150	147	<b>148,5</b>	1,50	146	139	<b>142,5</b>	3,50

Tabulka 8: Sušina kalu v dělicích nálevkách

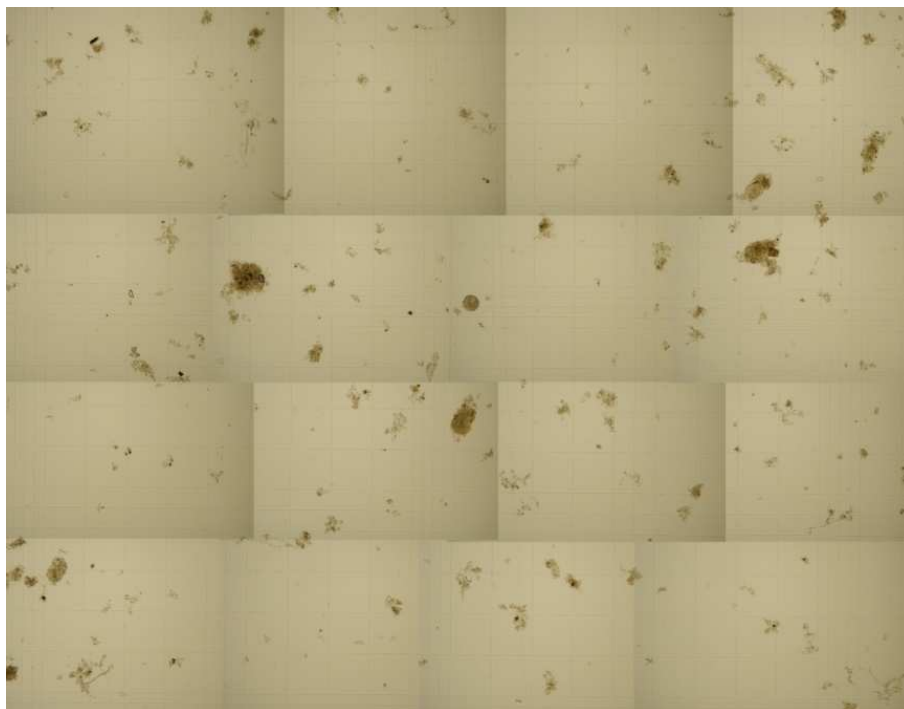
Datum	D1	D2	D3	D4	D5	D6
4.3.2008	1,77	1,9	1,85	1,91	1,85	1,93
10.3.2008	1,77	1,77	1,72	1,77	1,7	1,71
13.3.2008	1,96	1,67	2,04	2	1,79	1,78
18.3.2008	2,16	1,72	2,09	2,22	1,89	1,52

### 11.1 Slepý pokus – bez přídavku substrátu

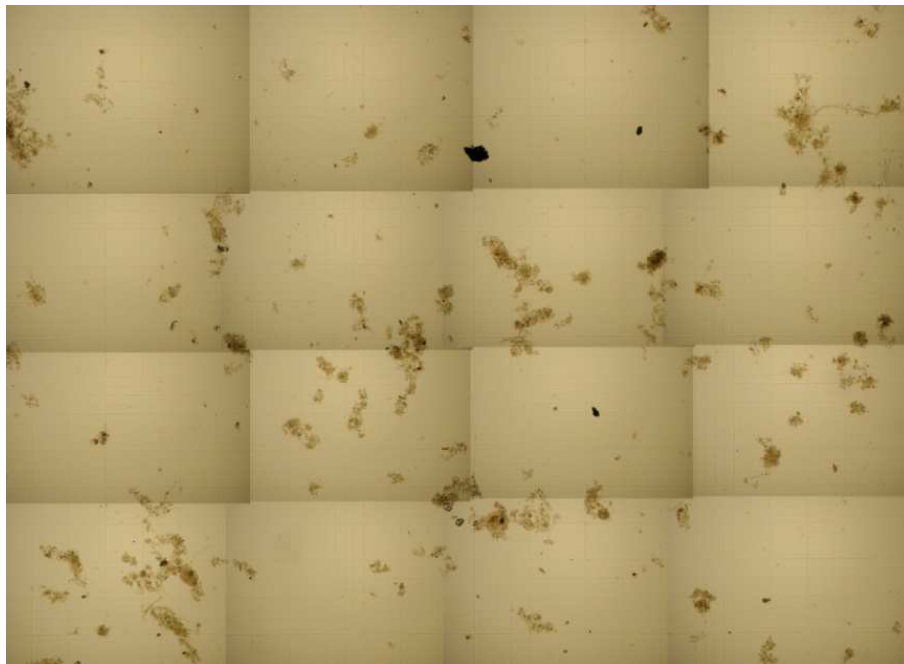
Sledování prvních dvou suspensí D1 a D2, ve kterých probíhal tzv. slepý pokus – trvalé hladovění.



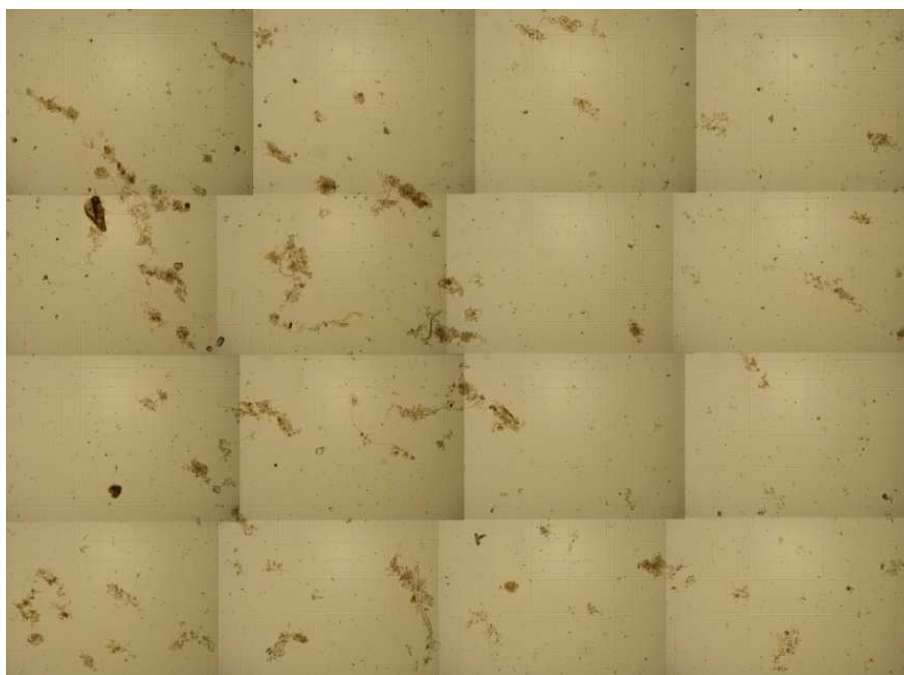
*Obrázek 11: Počátek pokusu (4.3.2008)*



*Obrázek 12: Třetí den (7.3.2008)*



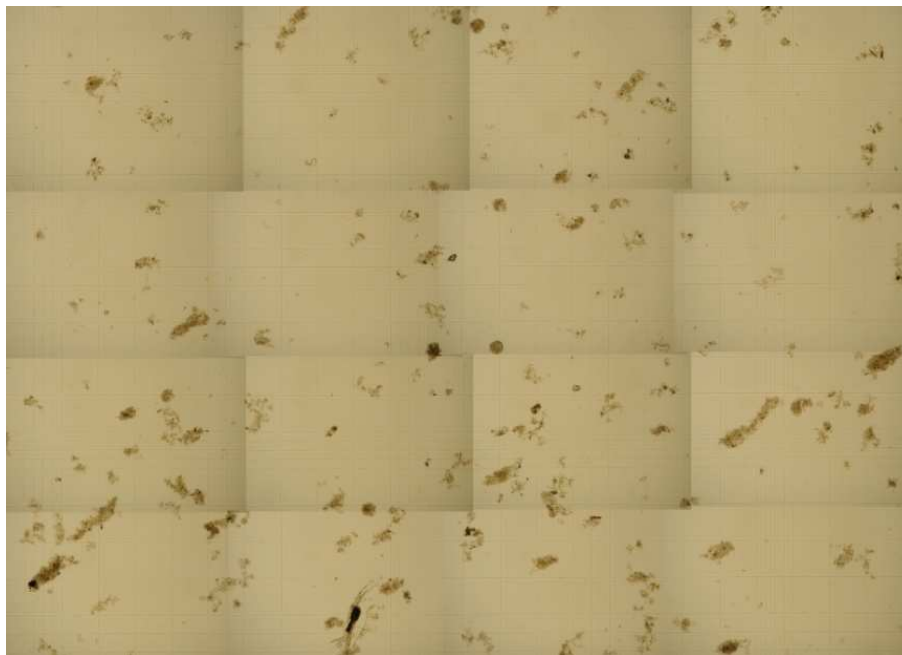
*Obrázek 13: Sedmý den (11.3.2008)*



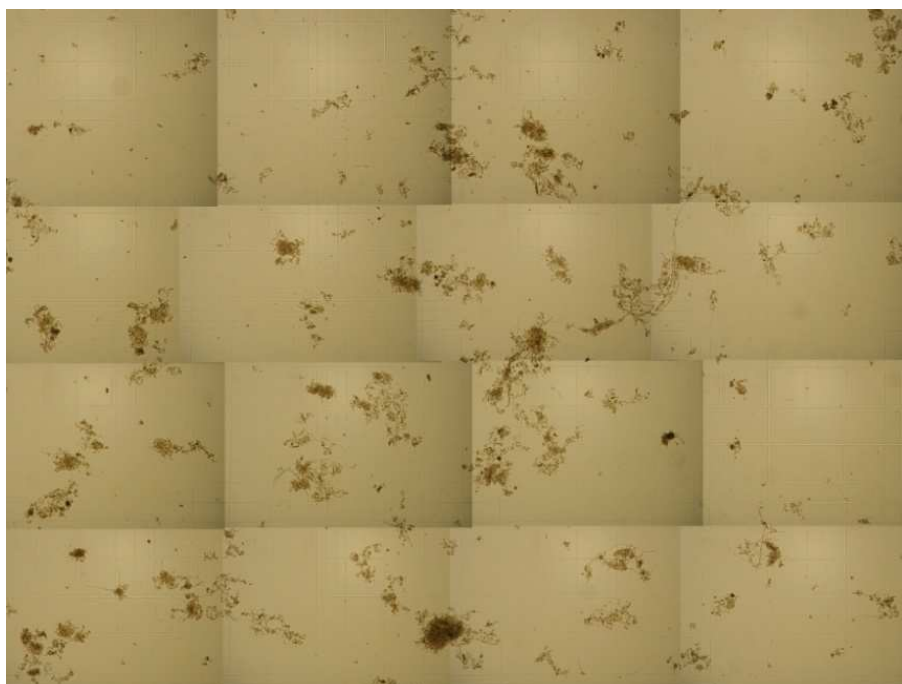
*Obrázek 14: Poslední den pozorování (18.3.2008)*

## 11.2 Přídavek kompletního substrátu po týdnu hladovění

Po týdnu hladovění byly do dělicích nálevek D3 a D4 nadávkovány látky dle postupu uvedeného výše i v kapitole 8.2.5. V průběhu prvního týdne sledování byl vývoj v těchto děličkách shodný se slepým pokusem. Po přidavku látek byly však zaznamenány rozdíly.

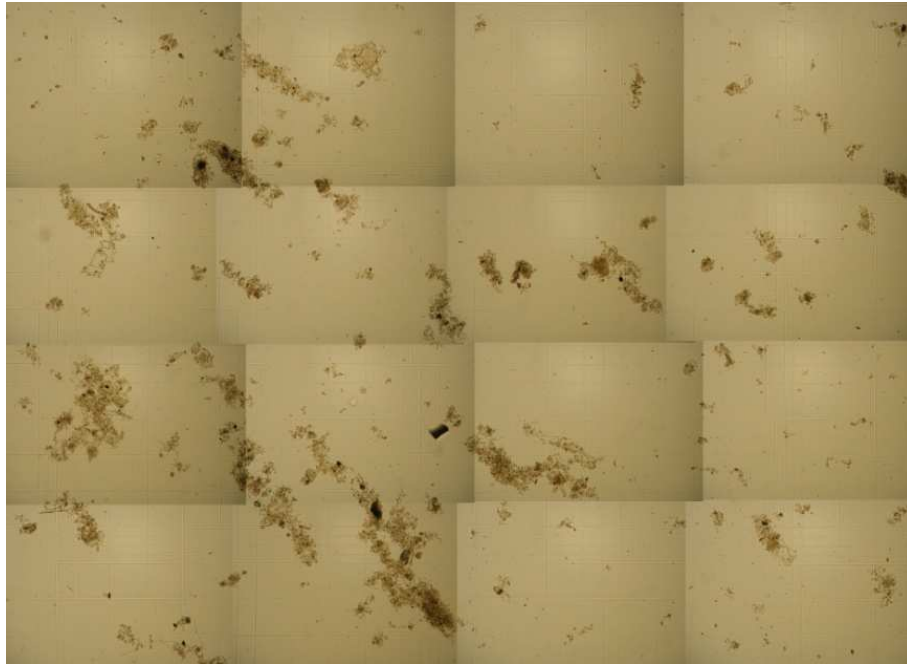


*Obrázek 15: Den po přidavku Hycolu E (12.3.2008)*



*Obrázek 16: Čtvrtý den po přidavku substrátu (14.3.2008)*





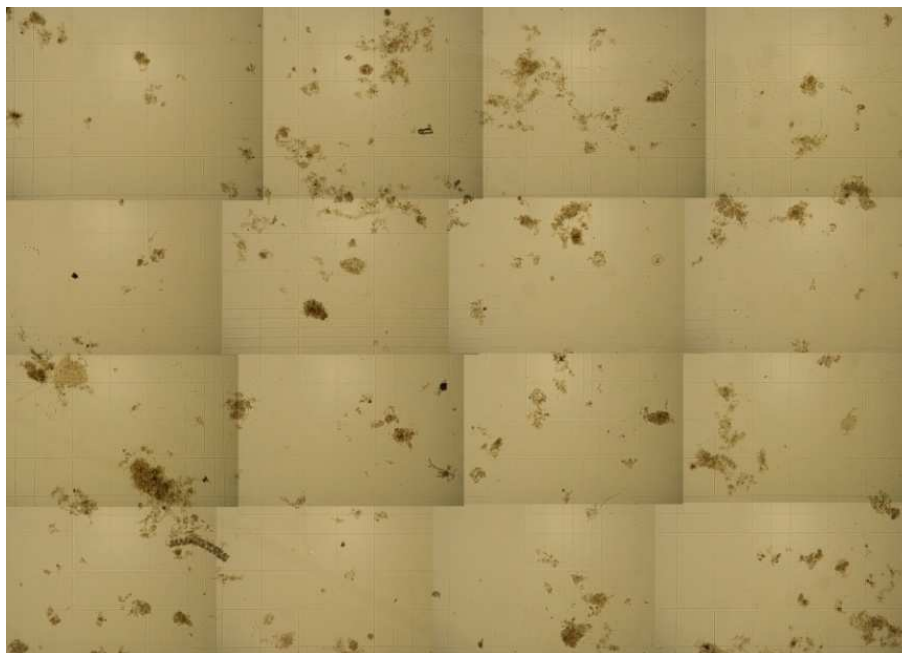
*Obrázek 17: Den poslední (18.3.2008)*

### **11.3 Přídavek nekompletního substrátu (rozpuštného škrobu) po týdnu hladovění**

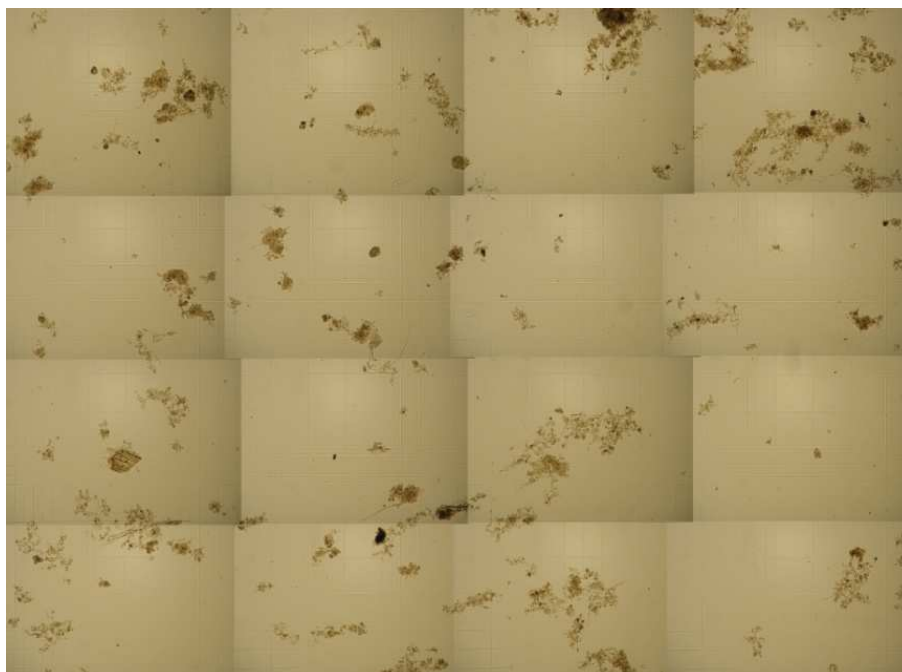
Zároveň s přidavkem kompletního substrátu Hycolu E (dělicí nálevky D3 a D4), byl do dělicích nálevek D5 a D6 přidán nekompletní substrát rozpuštného škrobu o koncentraci 0,5 g/l a minerální látky, dle postupu uvedeného v kapitole 8.2.5.



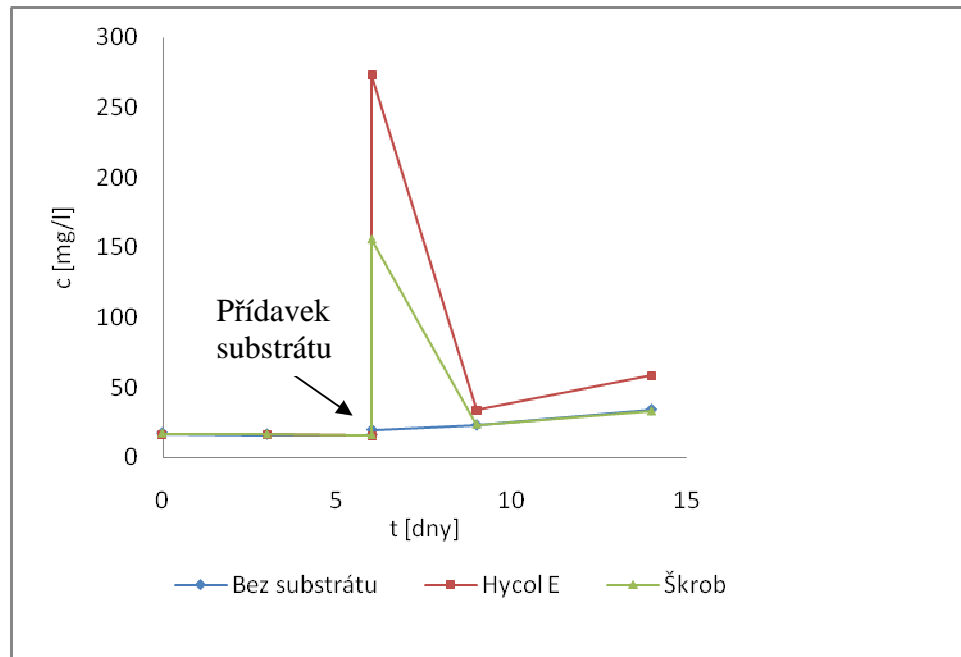
*Obrázek 18: Den po přidavku škrobu (12.3.2008)*



*Obrázek 19: Čtvrtý den po přidavku škrobu (14.3.2008)*



*Obrázek 20: Poslední den (18.3.2008)*



Obrázek 21: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu

Z tabulky č. V vyplývá, že vývoj kalových suspenzí, ve kterých probíhal slepý pokus (D1 + D2) byl po celou dobu pozorování rovnoměrný a počet vloček zůstával – s výjimkou prvního dne - víceméně konstantní. Nižší počet vloček první den pokusu následovaný zvýšením počtu od druhého dne byl nejspíše způsoben rozpadem vloček větších rozměrů.

V dělicích nálevkách D3 a D4 (Tabulka VI), do kterých byl po týdnu hladovění přidán kompletní substrát Hycol E se situace poněkud lišila. Počet vloček postupně po přidavku kompletního substrátu rostl, až dosáhl hodnot přibližně o 50% vloček na vzorek více. Vločky byly kompaktnější, dosáhly větších rozměrů, jejich okraje byly členitější. Znamenán byl i vyšší výskyt mikroorganismů jak přisedlých, tak plovoucích.

V dělicích nálevkách D5 a D6 (Tabulka VII) se situace pohledně počtu, tvaru, struktury i mikrobiálního oživení vyvíjela podobně jako v případě dělicích nálevek D3 a D4. Rozdíl byl patrný pouze v celkovém počtu vloček, který dosáhl nepatrně nižších hodnot, dosáhl zvýšení „jen“ o cca 40%.

Rozdíly mezi počty vloček i mezi stanovenými sušinami kalových suspenzí s kompletním a nekompletním substrátem zjevně souvisely s nepřítomností dusíku v nekompletním substrátu a ukázaly na význam kompletní výživy aktivovaného kalu pro bioflokulaci.

Průběh hodnot DOC ukázal úplné spotřebování obou použitých substrátů nejpozději třetí den po jejich nadávkování.

Současně je nutno dodat, že jistou komplikací celého pokusu se ukázalo zachytávání určitého podílu pevné fáze kalu na stěnách dělicích nálevek. Byť byl tento jev částečně omezován občasným mechanickým promícháváním celého objemu suspenzí, přesto mohl do jisté míry výsledky ovlivnit – pro uspořádání obdobných experimentů v budoucnosti bude tedy nutno tento jev ještě lépe eliminovat.

## 12 BIOREAKTOR POKUS 1

Cílem tohoto pokusu bylo dosáhnout určitého srovnání s pokusem probíhajícím v dělicích nálevkách. Byly sledovány stejné parametry jako v předchozím pokusu. Provedení se lišilo pouze ve vynechání přídavku rozpustného škrobu, do bioreaktoru byl po týdenním hladovění kalové suspence přidán pouze kompletní substrát Hycolu E o koncentraci 0,5 g/l a minerální látky dle kapitoly 7.1.1. Na rozdíl od pokusu probíhajícím v dělicích nálevkách, kdy byly dělicí nálevky pouze nekontrolovatelně provzdušňovány, byl tento pokus kontrolován jak z hlediska kontroly otáček, tak provzdušňování. Otáčky byly nejprve první den nastaveny na 60% (115 rpm), druhý den byly otáčky navýšeny na 80% (140 rpm) z důvodu zachytávání kalu na stěnách, sondách a dně bioreaktoru.

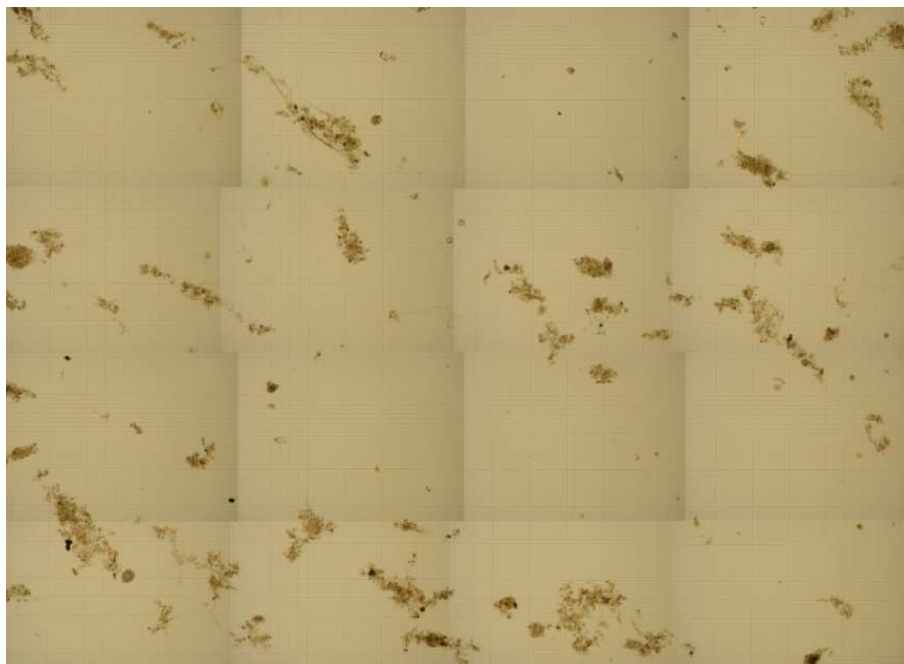
*Tabulka 9: Počet vloček kalu v bioreaktoru*

Datum	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Průměr	Odchylka
25.3.2008	97	86	89	<b>90,7</b>	<b>4,64</b>
28.3.2008	86	93	96	<b>91,7</b>	<b>4,19</b>
1.4.2008	94	83	89	<b>88,7</b>	<b>4,50</b>
2.4.2008	88	92	93	<b>91,0</b>	<b>2,16</b>
3.4.2008	100	95	97	<b>97,3</b>	<b>2,05</b>
4.4.2008	91	90	84	<b>88,3</b>	<b>3,09</b>
7.4.2008	77	80	85	<b>80,7</b>	<b>3,30</b>
8.4.2008	85	88	84	<b>85,7</b>	<b>1,70</b>

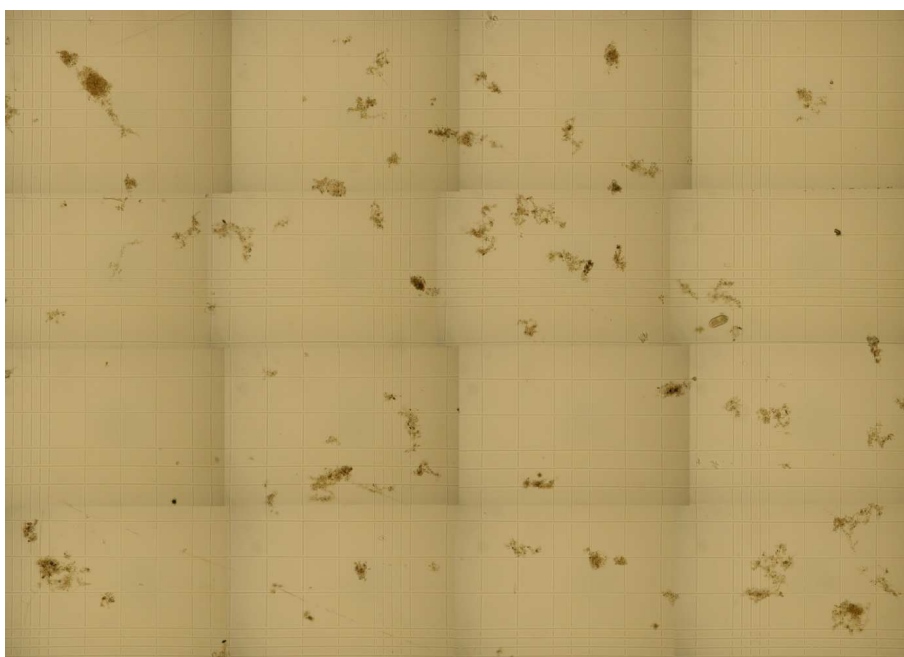
*Tabulka 10: Sušina kalu*

*v bioreaktoru*

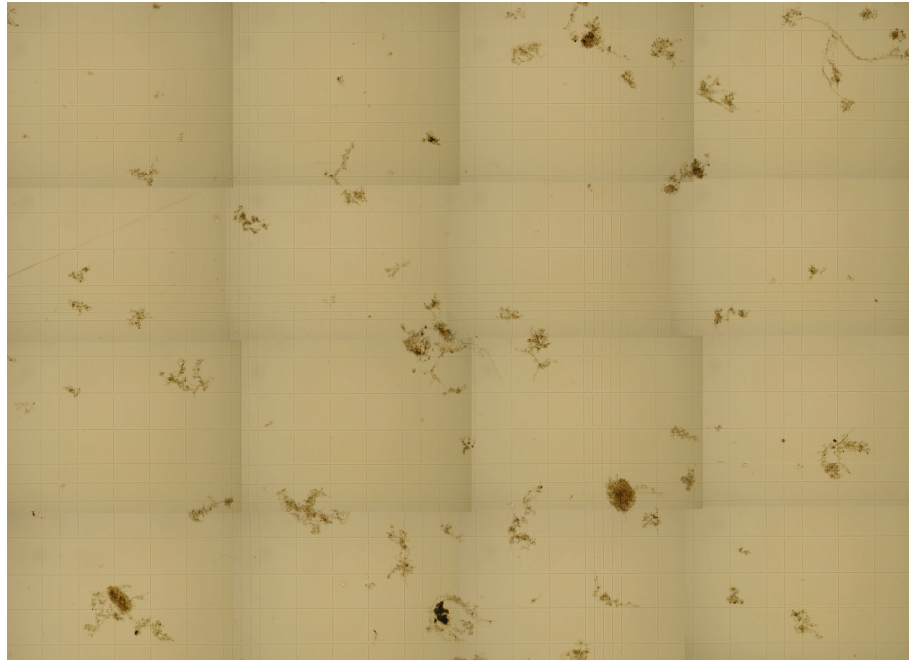
Datum	Sušina [mg/l]
25.3.2008	1,82
28.3.2008	1,48
1.4.2008	1,2
4.4.2008	1,14
8.4.2008	1,12



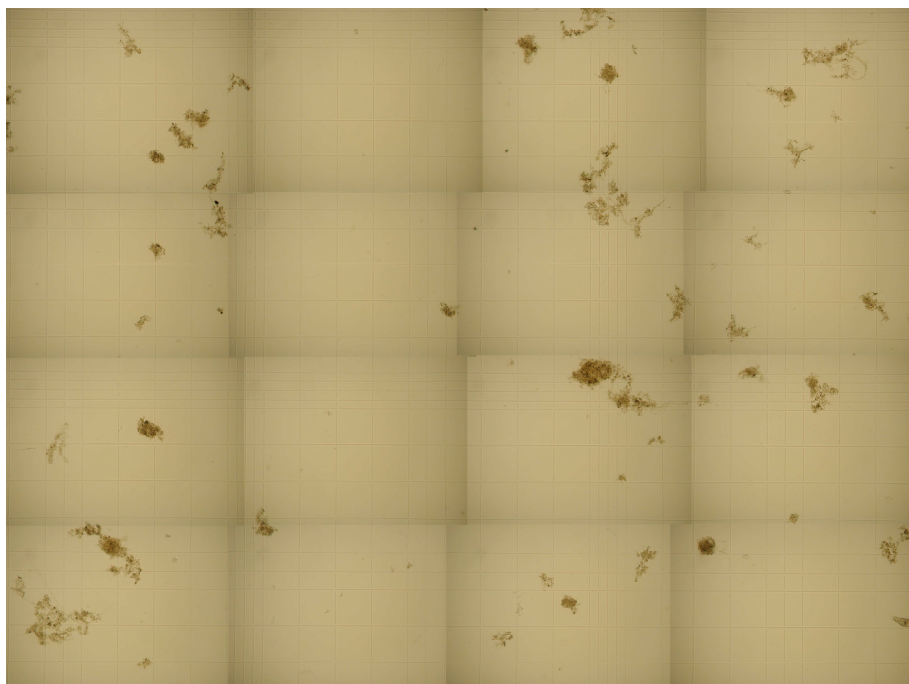
*Obrázek 22: Počátek pokusu (25.3.2008)*



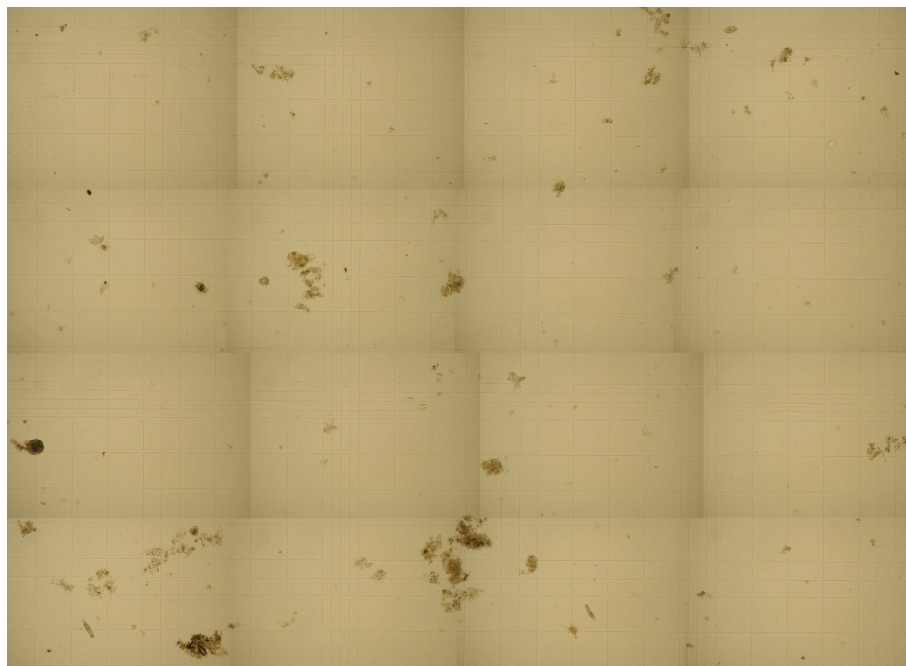
*Obrázek 23: Po čtyřech dnech (28.3.2008)*



*Obrázek 24: Po týdnu hladovění (1.4.2008)*

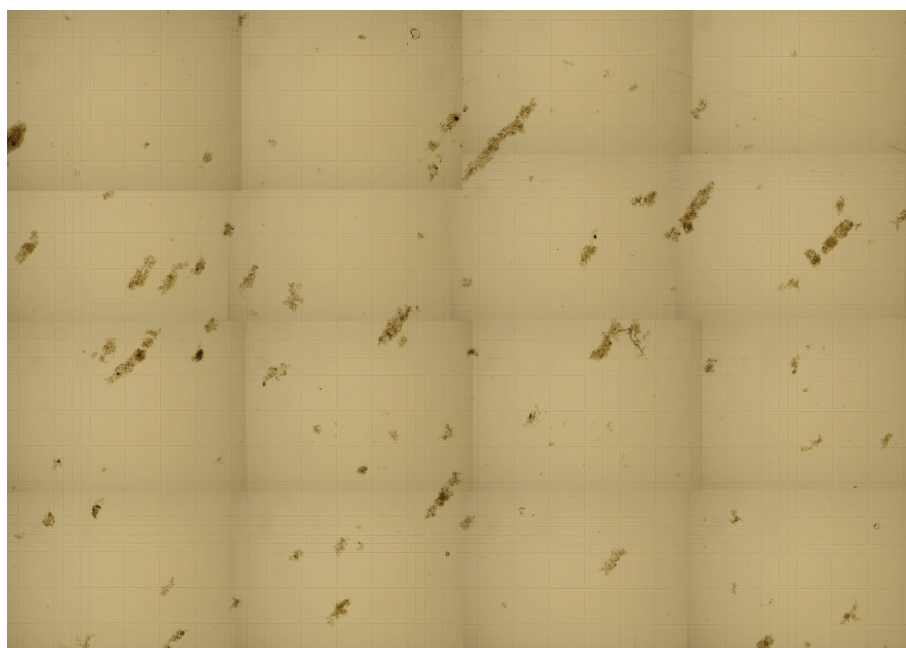


*Obrázek 25: Den po přidavku substrátu (2.4.2008)*



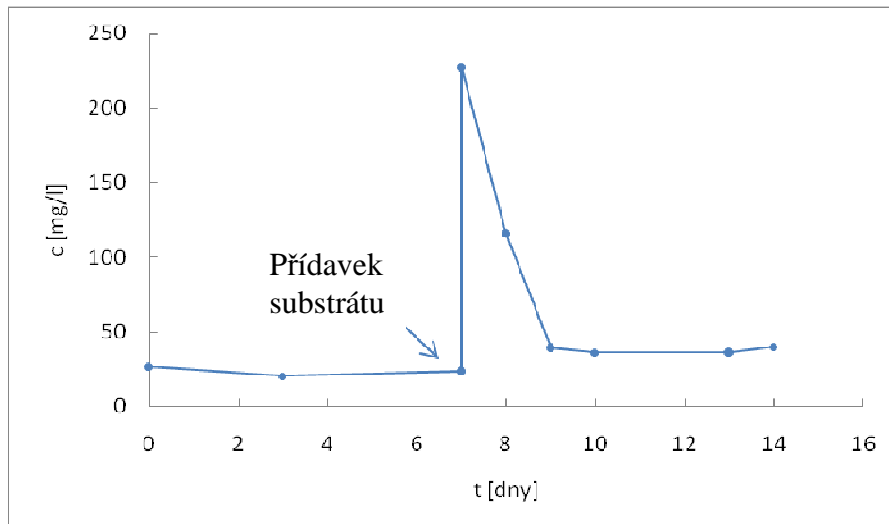
*Obrázek 26: Den před ukončením (7.4.2008)*

Obr. 25:

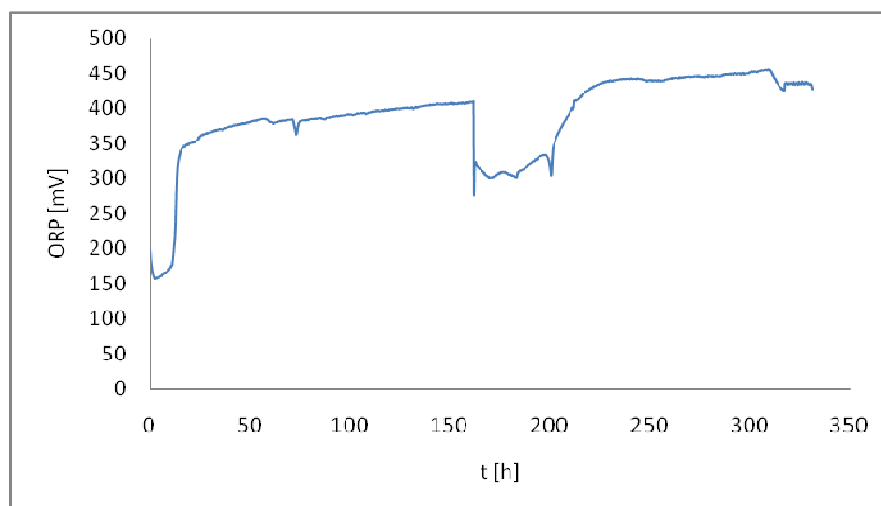


*Obrázek 27: Ukončení pokusu (8.4.2008)*





Obrázek 28: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu



Obrázek 29: Vývoj hodnot ORP v průběhu pokusu

Po předchozích problémech s hard diskem počítače bioreaktoru proběhl pokus bez komplikací. Cíle dosažení porovnání s pokusem probíhajícím v dělicích nálevkách však nebylo zcela dosaženo. Z tabulky sušiny (Tabulka X) je patrné, že došlo k jejímu výraznému poklesu, ten však byl zřejmě způsoben zejména zachytáváním kalu na stěnách bioreaktoru v počáteční fázi, kdy byly otáčky míchadla nastaveny na hodnotu uvedenou výše. Kromě toho, k ovlivnění hodnoty sušiny kalu také přispělo viditelné usedání kalu na dně bioreaktoru a rovněž na sondách umístěných v něm.

Důsledkem tohoto usazování byl i nižší počet vloček větších rozměrů v porovnání s pokusem probíhajícím v děličkách. Z tohoto důvodu nemohlo být provedeno předpoklá-

dané porovnání stavu vloček při hladovění a po přidavku substrátu v rozdílných mechanických podmínkách bioreaktoru a dělicích nálevek.

Vločky vyskytující se ve vzorcích byly podobného charakteru jako v předchozím pokusu, dosahovaly však menších rozměrů, jejich struktura byla otevřená, přemostování mezi jednotlivými vločkami nebylo zaznamenáno.

Mikrobiální oživení bylo v případě bioreaktoru podobné jako u dělicích nálevek, vyskytovaly se zde jak přisedlé tak plovoucí mikroorganismy v počtu srovnatelném s pozorováními uskutečněnými v dělicích nálevkách.

Obrázek 29 Dokazuje, že pokus probíhal po celou dobu skutečně v aerobních podmínkách, současně je dokumentován mírný pokles hodnoty ORP způsobený spotřebováváním kyslíku při utilizaci substrátu.

### 13 BIOREAKTOR POKUS 2

Základním cílem pokusu bylo posoudit vliv zvýšené teploty na tvorbu a charakter vloček a na strukturu bakteriálního oživení kalu – motivací byla simulace neodborného externího zásahu při regulaci bioreaktoru přes internetové rozhraní. Dalším cílem tohoto pokusu bylo dosáhnout jednak částečného srovnání s předchozími pokusy a jednak s pokusy s dezintegrací vloček a celkovým počtem bakterií.

Pokus trval 14 dní a po celou dobu byl dodáván substrát (viz níže). Prvních sedm dní byl reaktor provozován při teplotě  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  a byly stanoveny počty psychrofilních a mezofilních bakterií. Poté byla teplota navýšena na  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  po dobu dalších sedmi dnů. Opět byly stanoveny počty psychrofilních a mezofilních bakterií.

Sledována byla opět sušina kalu, dále i DOC. Bylo provedeno mikroskopování a stanoven celkový počet bakterií.

Příprava bioreaktoru se nijak nelišila od pokusu předchozího, jeho průběh však již odlišný byl. Na rozdíl od předchozích pokusů byla udržována hodnota pH na hranici  $7 \pm 0,5$ . Další odlišností bylo dávkování a koncentrace substrátu, ta byla 12,5 mg/l denně oproti dříve použitému jednorázovému dávkování 0,5 g/l. Substrát byl dodáván kontinuálně pomocí peristaltického čerpadla v množství 100 ml zásobního roztoku (o koncentraci 1 g/l) denně.

*Tabulka 11: Počet vloček v bioreaktoru*

Datum	Vzorek 1	Vzorek 2	Průměr	Odchylka
21.4.2008	80	89	<b>85</b>	<b>4,50</b>
22.4.2008	92	84	<b>88</b>	<b>4,00</b>
23.4.2008	87	81	<b>84</b>	<b>3,00</b>
24.4.2008	81	75	<b>78</b>	<b>3,00</b>
25.4.2008	78	73	<b>76</b>	<b>2,50</b>
28.4.2008	83	85	<b>84</b>	<b>1,00</b>
29.4.2008	74	66	<b>70</b>	<b>4,00</b>
30.4.2008	59	65	<b>62</b>	<b>3,00</b>
3.5.2008	61	63	<b>62</b>	<b>1,00</b>
5.5.2008	51	56	<b>54</b>	<b>2,50</b>

Tabulka 12: Sušina

*kalu v bioreaktoru*

Datum	Sušina [mg/l]
21.4.2008	2,12
22.4.2008	1,96
24.4.2008	1,65
25.4.2008	1,48
28.4.2008	1,24
29.4.2008	1,14
1.5.2008	0,94
3.5.2008	0,94
5.5.2008	0,93

Tabulka 13: Celkový počet bakterií v

*prvním týdnu pokusu*

Pásma	miska 1	miska 2	Průměr
Mezofilní	$1,5 \cdot 10^6$	$1,60 \cdot 10^6$	$1,55 \cdot 10^6$
Psychrofilní	$2,1 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,95 \cdot 10^6$

Tabulka 14: Celkový počet bakterií

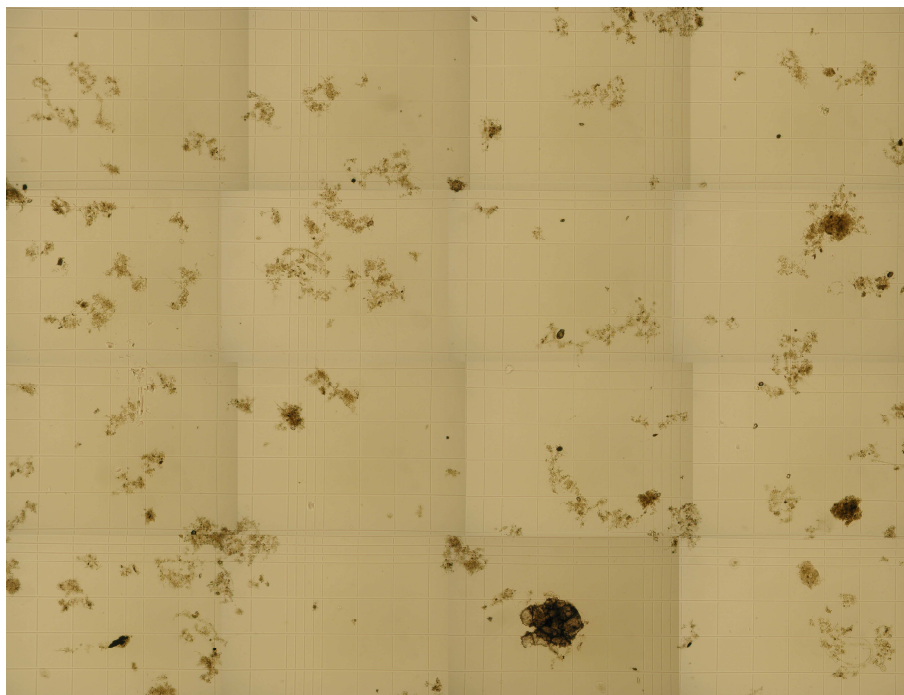
*před zvednutím teploty*

Pásma	miska 1	miska 2	Průměr
Mezofilní	$5,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$
Psychrofilní	$5,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$

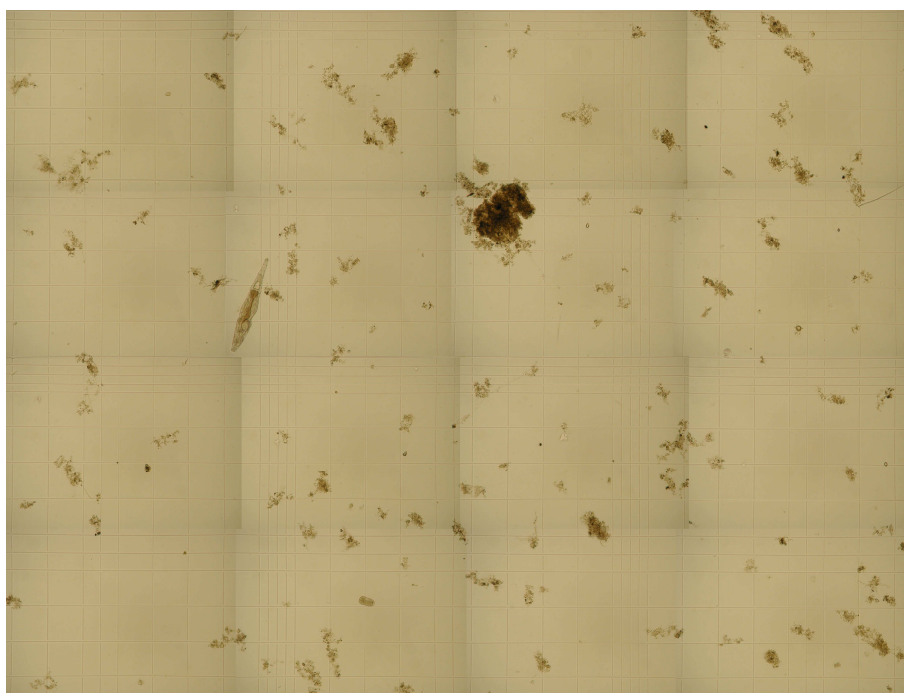
Tabulka 15: Celkový počet

*bakterií na konci pokusu*

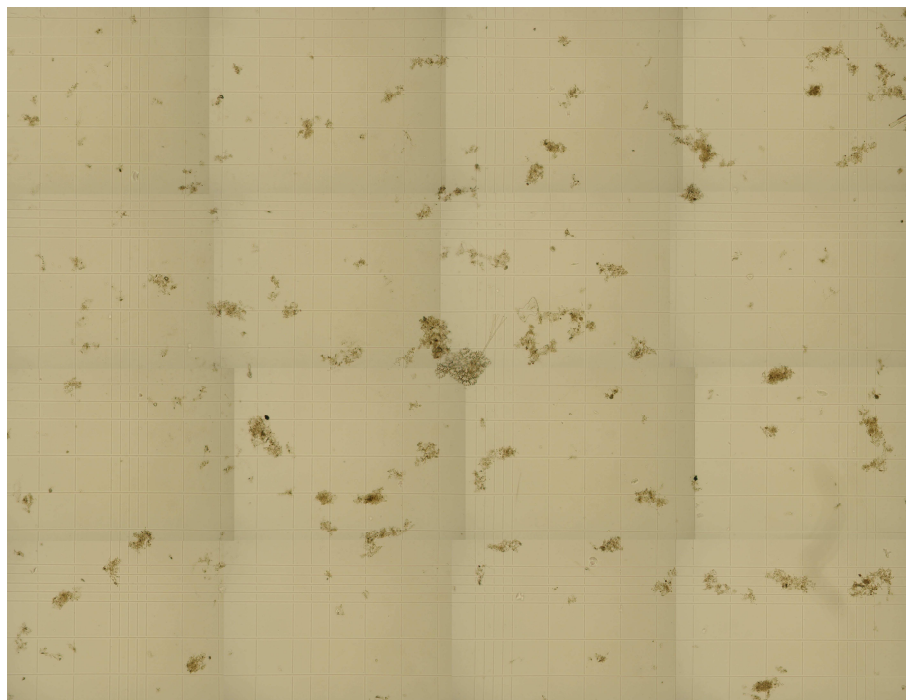
Pásma	miska 1	miska 2	Průměr
Mezofilní	$3,5 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7$	$3,4 \cdot 10^7$
Psychrofilní	$1,8 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$



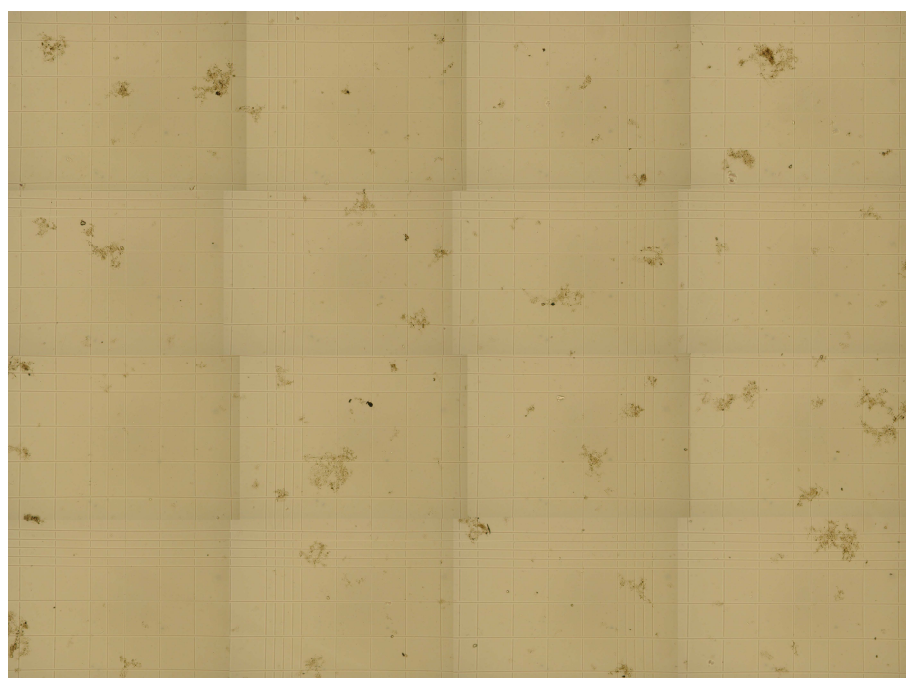
*Obrázek 30: Začátek pokusu (21.4.2008)*



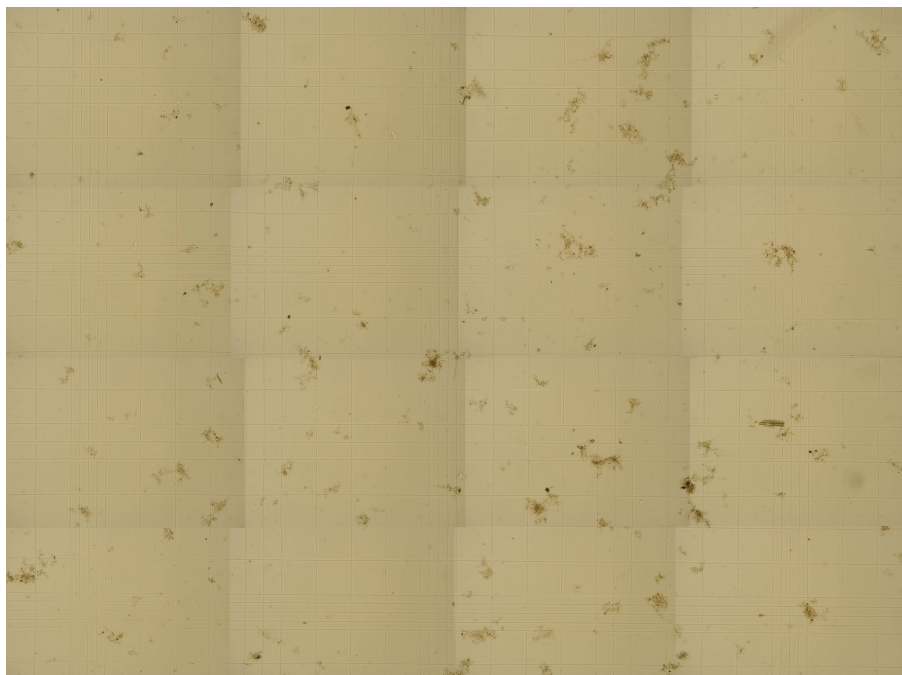
*Obrázek 31: Čtvrtý den pokusu (24.4.2008)*



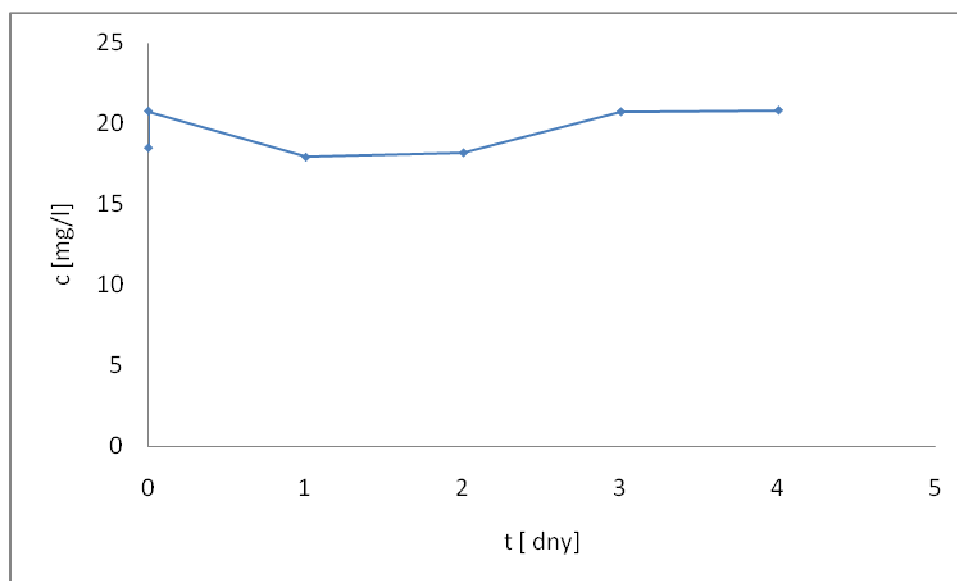
*Obrázek 32: Osmý den pozorování*



*Obrázek 33: Ze dne 3.5.2008*



Obrázek 34: Poslední den pozorování (5.5.2008)



Obrázek 35: Vývoj hodnot DOC v průběhu prvního týdne pokusu

Hned na počátku pokusu došlo k havárii provzdušňování, množství kyslíku tedy nebylo regulováno jako v případě předchozího pokusu v bioreaktoru, ale provzdušňování bylo vedeno přímo bez jakékoliv regulace. Vzhledem k této okolnosti se koncentrace kyslíku v průběhu pokusu pohybovala v rozmezí 6 – 7 mg/l. Průběh prvního týdne do zvednutí teploty proběhl dle očekávání, opět docházelo k usazování kalu, a proto klesala i jeho sušina, což je patrné z tabulky č. XII.

Po týdnu pravidelného dávkování substrátu došlo 27.4.2008 k havárii řídicího softwaru, z neznámých příčin bylo ukončeno měření dat ze sond a spuštěno mimořádné dávkování substrátu, a vzhledem ke skutečnosti, že nehoda byla zjištěna až další den ráno, do bioreaktoru byl nadávkován veškerý zbývající obsah zásobní lahve substrátu - tedy asi 1,3 litru.

I z tohoto důvodu jsou u tohoto pokusu graficky vyhodnoceny koncentrace DOC pouze v prvním týdnu provozu reaktoru, kde je dokumentováno rovnoměrné dávkování substrátu bez větších výkyvů.

V prvních dvou dnech pozorování struktura vloček odpovídala předchozím pokusům. V dalších dnech však došlo k poklesu počtu vloček větších rozměrů. Tento pokles byl způsoben opětovným usazováním kalu na stěnách, sondách a dně bioreaktoru. Výraznějších hodnot dosáhlo v tomto týdnu protozoální oživení, vyskytovalo se zde množství jak přisedlých, tak plovoucích mikroorganismů.

Pozorování po zvýšení teploty na 45°C prokázala značné změny uvnitř bioreaktoru, došlo k dalšímu rozpadání vloček, přičemž výskyt vloček větších rozměrů byl nepatrný, taktéž výrazně poklesly počty prvoků. Pokles jak vloček větších rozměrů, tak počtu mikroorganismů (i přes neplánované dodání velkého množství substrátu) byl jednoznačně způsoben zvýšením teploty, k tomuto závěru jsem dospěl díky srovnání s ostatními pokusy, kdy pokles počtu vloček byl sice patrný, ale protozoální oživení bylo stabilní.

Na počátku sledování i po týdnu provozu reaktoru při 20± 2°C byly celkové počty psychrofilních bakterií mírně vyšší než počty mezofilních (viz. Tab. XI). Na konci druhého týdne sledování (teplota 45 ± 2°C) byla zaznamenána opačná tendence, tedy mírná převaha celkového počtu mezofilních bakterií nad počty bakterií psychrofilních, viz. Tab. XIII.

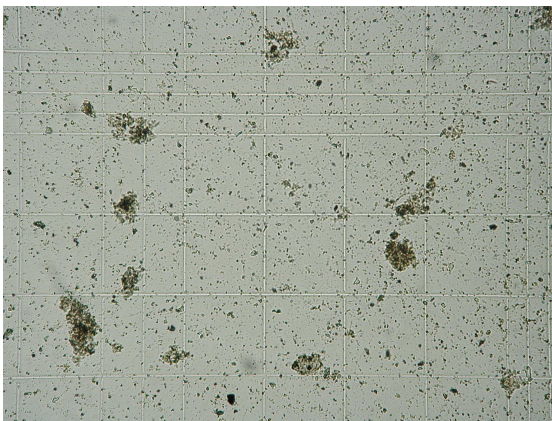


## 14 ANAEROBNÍ POKUS 1

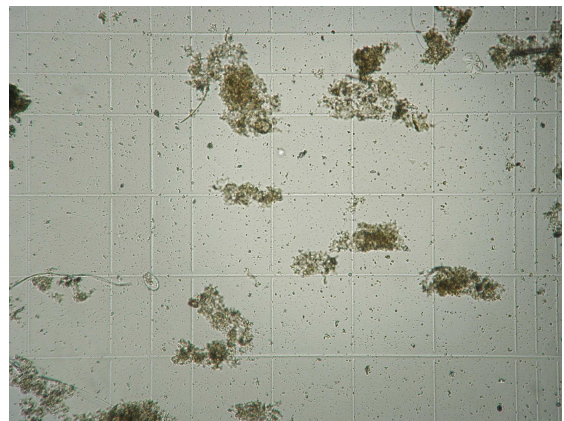
Anaerobní pokus trval na rozdíl od pokusů aerobních jeden týden. V průběhu pokusu byly sledovány počty vloček, DOC a sušina. Po 73 hodinách bylo do reaktoru nadávkováno 12 g glycerolu, koncentrace substrátu v bioreaktoru tedy byla 1,5 g/l [10]. Cílem tohoto pokusu bylo sledovat chování suspenze kalu z hlediska charakteru vloček, bylo provedeno i Gramovo barvení.

*Tabulka 16: Počet vloček v anaerobním kalu*

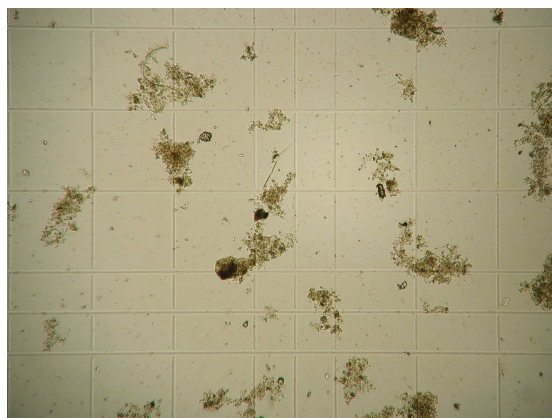
Datum	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	Průměr	Sm. odchylka
23.11.2007	103	97	91	97,0	4,90
27.11.2007	169	170	176	171,7	3,09
30.11.2007	150	157	162	156,3	4,92



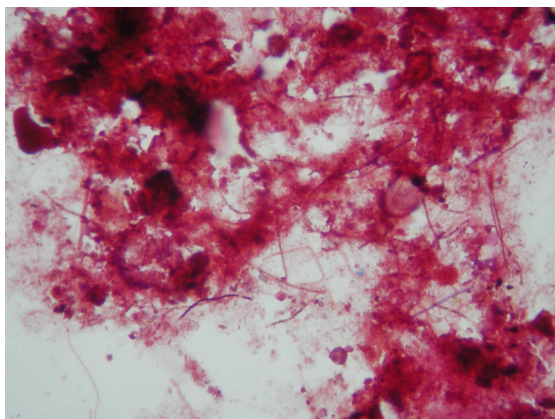
*Obrázek 36: Začátek pokusu (23.11.2007)*



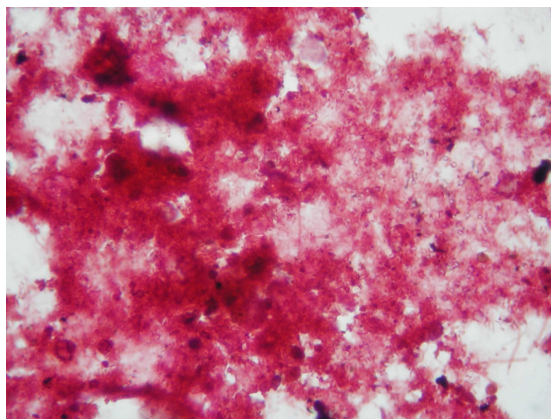
*Obrázek 37: Po pěti dnech (27.11.2007)*



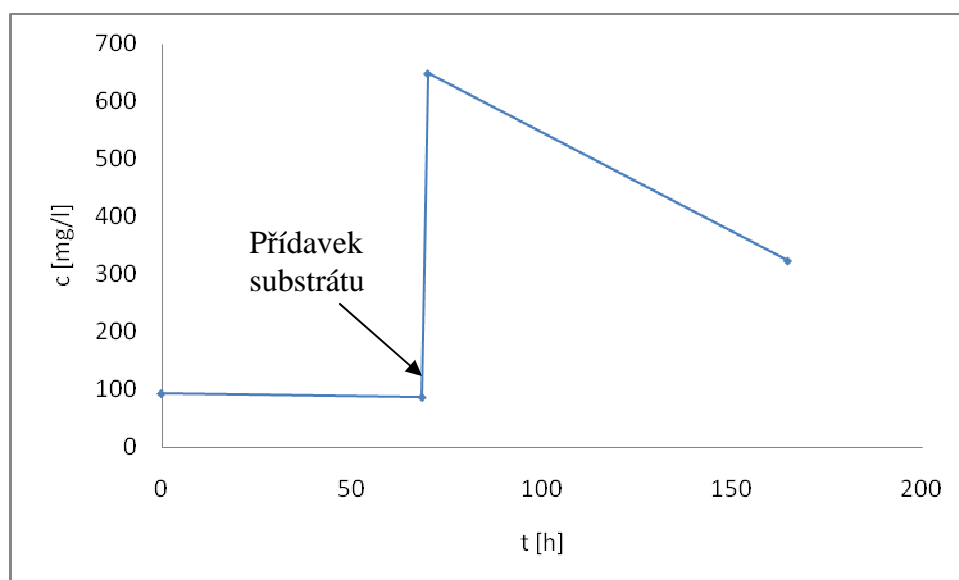
*Obrázek 38: Na konci pokusu*



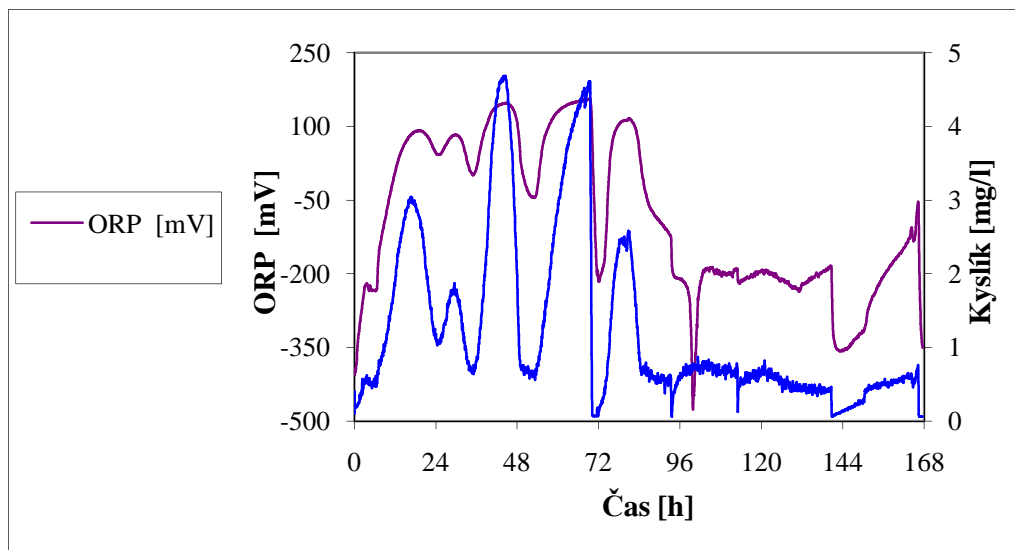
Obrázek 39: Gramovo barvení (23.11.07)



Obrázek 40: Gramovo barvení (30.11.07)



Obrázek 41: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu



Obrázek 42: Vývoj hodnot Oxidačně redukčního potenciálu v průběhu pokusu [10]

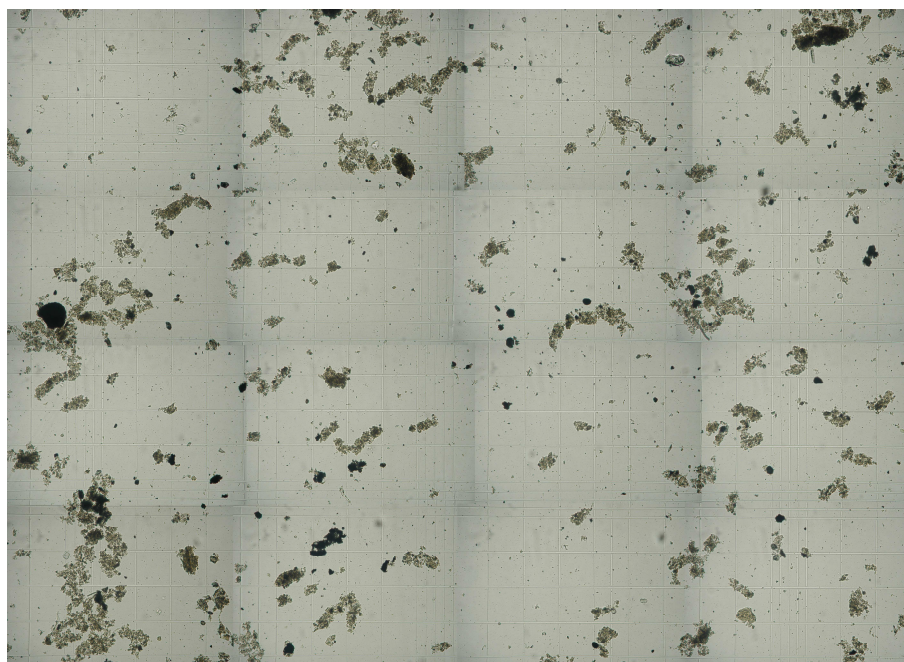
Velmi výrazným rozdílem ve srovnání s pokusy s aerobním kalem byla sušina kalu v bioreaktoru, na počátku pokusu byla hodnota sušiny 9,16 g/l, na konci pokusu byla sušina 6,44 g/l. V kalu bylo v první den pozorování zaznamenáno vysoké množství nevyvločkové hmoty, v dalších dnech, jak je z fotografií patrné, došlo k úbytku nevyvločkové hmoty, a tudíž narostl i počet vloček sledovaného rozměru 100 x 100  $\mu\text{m}$ . Tento nárůst byl nejspíše způsoben přidavkem substrátu glycerolu a ukázal na bioflokulační schopnost použitého kalu za daných experimentálních podmínek (včetně průběhu hodnot ORP). Z pozorování a fotografií Gramova barvení vyplynula jasná převaha mikroorganismů gramnegativních nad grampozitivními.

## 15 ANAEROBNÍ POKUS 2

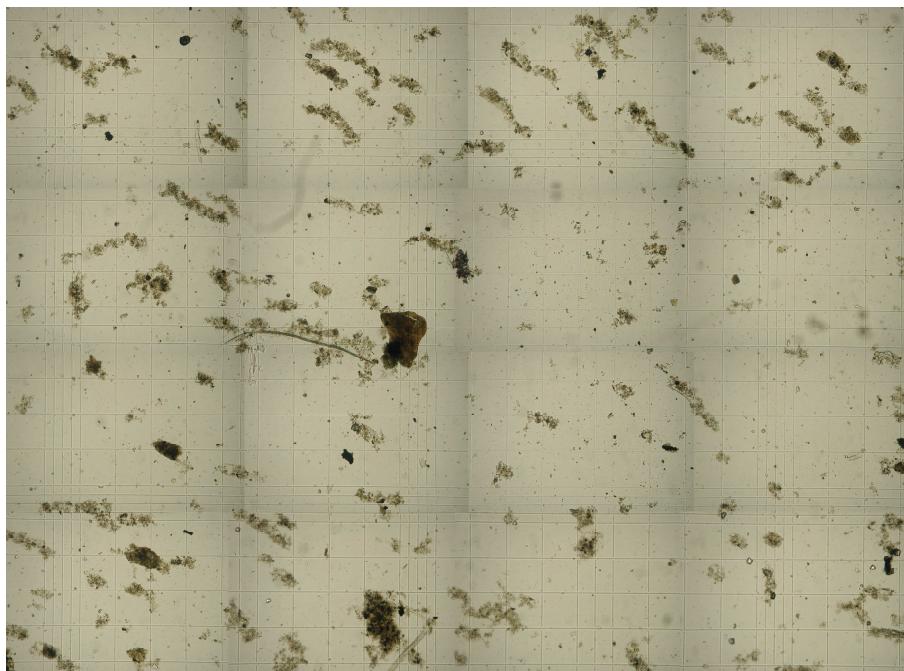
Anaerobní pokus trval na rozdíl od pokusů aerobních jeden týden. V průběhu pokusu byly sledovány počty vloček, sušina a DOC. Pokus probíhal podobně jako předcházející. Substrát se do suspenze kalu přidal po 68,5 hodinách v množství 12 g glycerolu. Koncentrace glycerolu v bioreaktoru tedy byla opět 1,5 g/l [10].

*Tabulka 17: Počet vloček v anaerobním kalu 2*

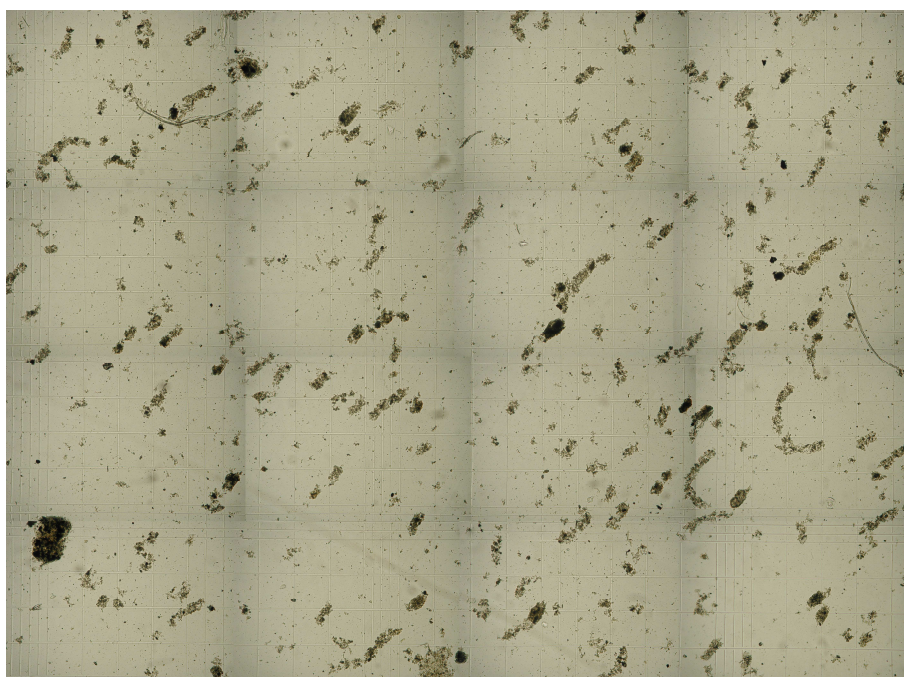
Datum	vzorek 1	vzorek 2	průměr	odchylka
11.4.2008	145	160	152,5	7,50
14.4.2008	131	125	128	3,00
16.4.2008	110	115	112,5	2,50
17.4.2008	100	107	103,5	3,50
18.4.2008	95	104	99,5	4,50



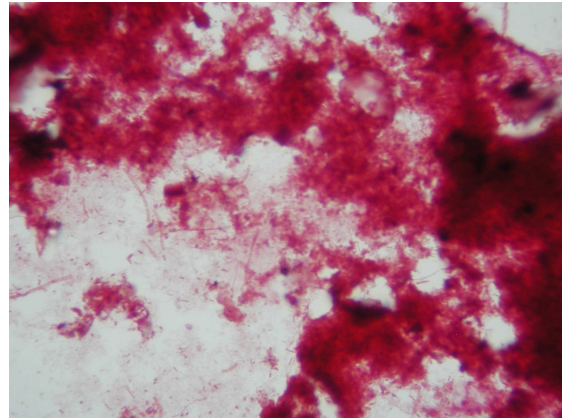
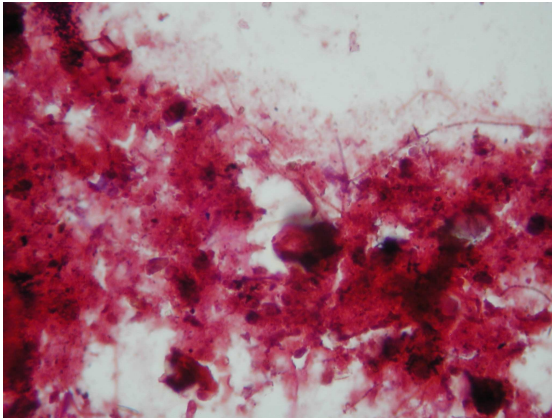
*Obrázek 43: Začátek pokusu (11.4.2008)*



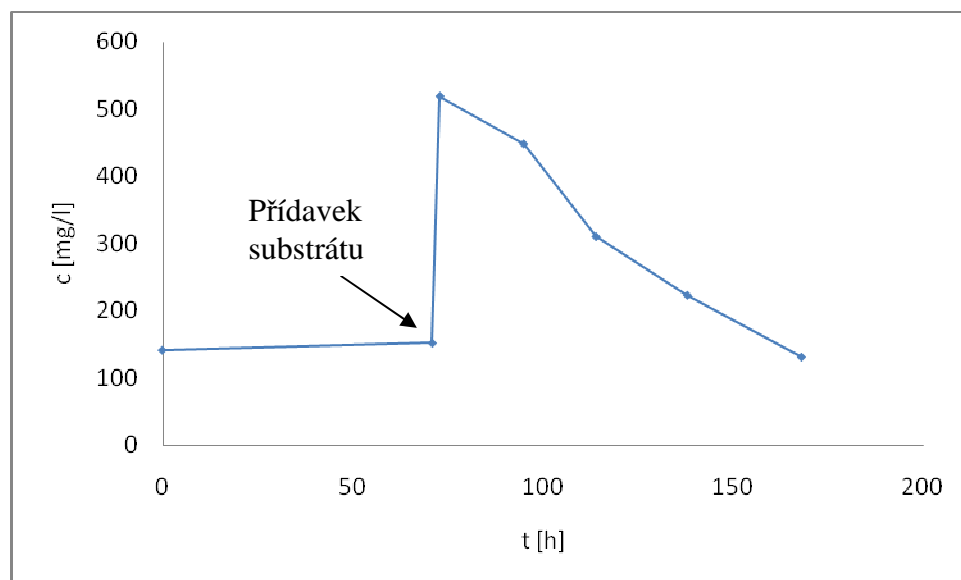
*Obrázek 44: Po čtyřech dnech (14.4.2008)*



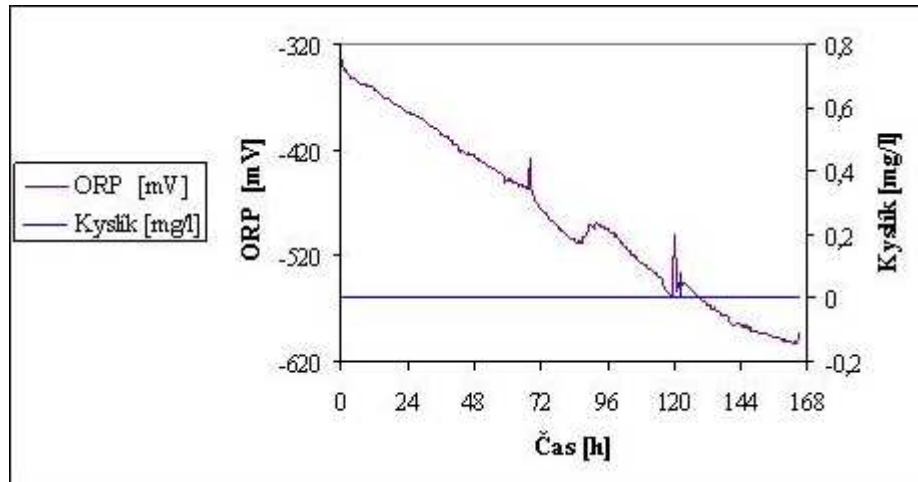
*Obrázek 45: Na konci pokusu (18.4.2008)*



Obrázek 46: Gramovo barvení (11.4.2008)    Obrázek 47: Gramovo barvení (18.4.2008)



Obrázek 48: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu



Obrázek 49: Vývoj hodnot ORP v průběhu pokusu [10]

Ve srovnání s prvním anaerobním pokusem byla sušina suspenze kalu na počátku 4,56 g/l a na konci 4,07 g/l. Na rozdíl od prvního pokusu byla velikost vloček nižší, ale jejich počet byl vyšší. Jejich počet však na rozdíl od předcházejícího pokusu trvale klesal, což mohlo být způsobeno jednak odlišnou koncentrací sušiny kalu, jednak i mírnou odlišností podmínek (zejména průběh ORP), a případně i odlišností vzorku kalu.

## 16 DIGITÁLNÍ ANALÝZA OBRAZU

Cílem tohoto zpracování fotografií bylo objektivizovat subjektivní pozorování v počítačící komůrce. Touto metodou bylo postupováno pouze v pokusech s bioreaktorem 1,2, dále v druhém anaerobním pokusu a v pokusu v dělicích nálevkách.

*Tabulka 18: Srovnání počtu vloček v bioreaktoru*

Bioreaktor 1 – počty vloček			Bioreaktor 2 – počty vloček			Anaerobní pokus 2 – počty vloček		
Datum	Manuální Počítání	Digitální analýza	Datum	Manuální Počítání	Digitální analýza	Datum	Manuální Počítání	Digitální analýza
25.3	90,7	<b>68</b>	21.4	84,5	<b>84</b>	11.4	152,5	<b>96</b>
28.3	91,7	<b>72</b>	22.4	88,0	<b>56</b>	14.4	128,0	<b>80</b>
1.4	88,7	<b>60</b>	23.4	84,0	<b>64</b>	16.4	112,5	<b>76</b>
2.4	91,0	<b>64</b>	24.4	78,0	<b>64</b>	17.4	103,5	<b>72</b>
3.4	97,3	<b>64</b>	25.4	75,5	<b>56</b>	18.4	99,5	<b>56</b>
4.4	88,3	<b>60</b>	28.4	84,0	<b>60</b>			
7.4	80,7	<b>56</b>	29.4	70,0	<b>56</b>			
8.4	85,7	<b>72</b>	30.4	62,0	<b>56</b>			
			3.5	62,0	<b>48</b>			
			5.5	53,5	<b>36</b>			

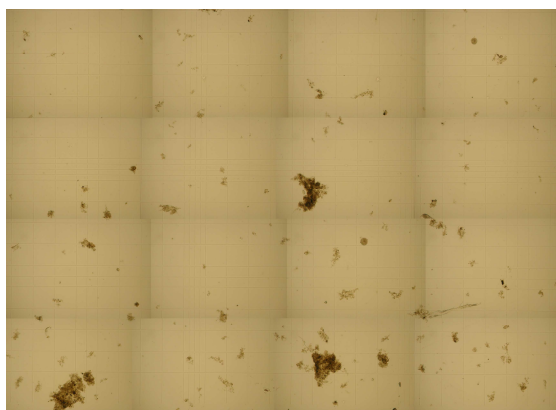
*Tabulka 19: Srovnání počtu vloček v dělicích nálevkách D1 – D3*

D1			D2			D3		
Datum	Manuální Počítání	Digitální analýza	Datum	Počítání	Manuální Počítání	Datum	Počítání	Manuální Počítání
4.3	76,0	56	4.3	72,5	48	4.3	73,5	60
7.3	107,0	68	7.3	95,5	60	7.3	104,0	68
10.3	102,5	68	10.3	96,0	64	10.3	92,5	68
11.3	103,5	72	11.3	93,0	72	11.3	120,5	80
12.3	102,0	80	12.3	109,0	72	12.3	142,0	88
13.3	94,5	76	13.3	86,5	68	13.3	135,0	88
14.3	104,5	60	14.3	93,5	68	14.3	151,5	92
17.3	97,0	72	17.3	93,0	56	17.3	148,5	88
18.3	97,5	76	18.3	85,5	52	18.3	159,0	92

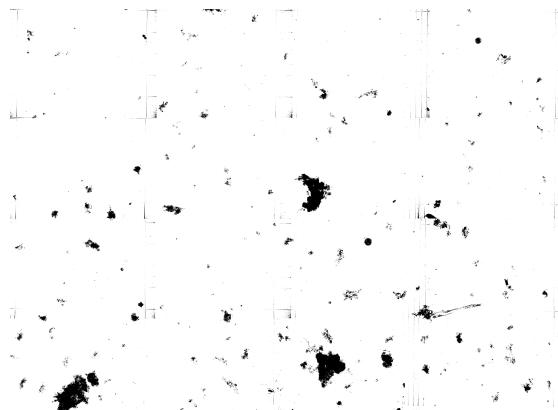


Tabulka 20: Srovnání počtu vloček v dělicích nálevkách D4 – D6

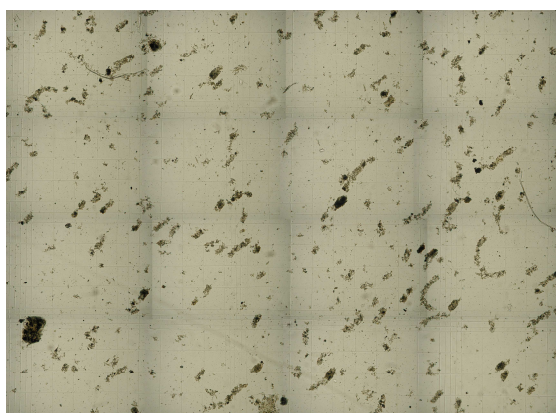
D4			D5			D6		
Datum	Počítání	Digitální analýza	Datum	Počítání	Digitální analýza	Datum	Počítání	Digitální analýza
4.3	79,5	56	4.3	70,5	52	4.3	73,5	60
7.3	96,0	64	7.3	96,0	60	7.3	95,0	68
10.3	92,0	68	10.3	95,0	64	10.3	86,5	68
11.3	118,5	68	11.3	98,5	64	11.3	111,5	72
12.3	133,5	80	12.3	122,0	80	12.3	127,0	76
13.3	128,5	80	13.3	125,0	76	13.3	133,5	76
14.3	143,0	88	14.3	130,5	88	14.3	142,0	84
17.3	157,0	104	17.3	146,5	92	17.3	136,0	88
18.3	176,5	112	18.3	148,5	100	18.3	142,5	96



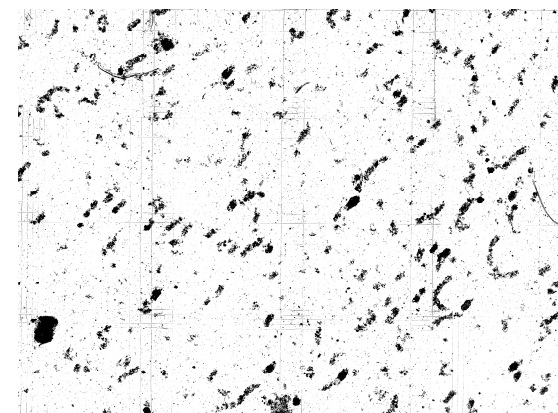
Obrázek 50: Původní fotografie



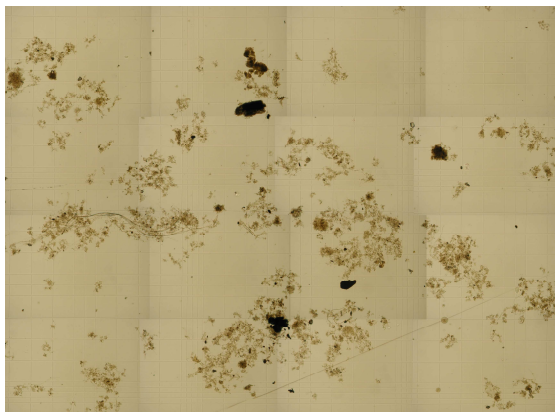
Obrázek 51: Upravená fotografie



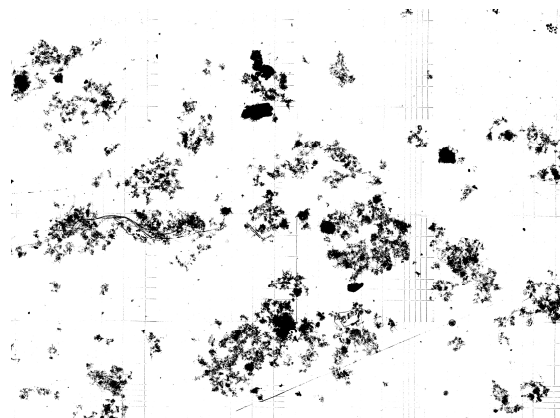
Obrázek 52: Původní fotografie



Obrázek 53: Upravená fotografie



Obrázek 54: Původní fotografie



Obrázek 55: Upravená fotografie

Z tabulky je patrné, že rozdíly mezi objektivním počítáním (software) a subjektivním počítáním vloček v počítačící komůrce existují. Značných rozdílů v počtu vloček hledaného rozměru  $100 \times 100 \mu\text{m}$  mezi oběma způsoby vyhodnocování bylo zjištěno v případech většího výskytu vloček menších rozměrů. To je pravděpodobně dáno tím, že je v případě pozorování v mikroskopu je velmi obtížné subjektivně odhadovat, zda počítaná vločka dosahuje skutečně požadovaných rozměrů. Uvedené rozdíly mezi objektivním a subjektivním vyhodnocováním v některých případech dosahovaly až cca 50%. Naopak, byť v ojedinělých případech, kdy vločky dosahovaly výrazně větších rozměrů než stanovených  $100 \times 100 \mu\text{m}$ , a jejich počet nebyl příliš vysoký, pak se subjektivní a objektivní vyhodnocení téměř shodovaly (první den pokusu Bioreaktor 2 – viz tabulka 18).

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium charakteru vloček a mikroorganismů kalových suspenzí, za podmínek experimentů laboratorních i v bioreaktoru.

V dezintegračních pokusech bylo hlavním cílem zjistit, jaké množství bakterií se uvolní z vloček kalové suspenze, za použití různých metod dezintegrace a jaký bude její vliv na množství a charakter vloček. Výsledky ukázaly, že největší množství bakterií se z vloček uvolní v případě využití desintegrace suspenze v přístroji Masticator a to po dobu 180 minut. Desintegrace se skleněnými kuličkami nedosahovala takových účinků jako výše uvedený postup.

Cílem pokusu prováděného v dělicích nálevkách a v prvním pokusu v bioreaktoru bylo dosáhnout určitého srovnání mezi těmito dvěma odlišnými způsoby provedení co do počtu, charakteru a časového vývoje vloček. Cíle bylo dosaženo pouze částečně, srovnání z hlediska porovnání počtu vloček nebylo možné z důvodů usazování kalu v bioreaktoru, díky němuž došlo k výraznému poklesu sušiny kalu. Nicméně pokus v dělicích nálevkách ukázal na význam kompletního substrátu na bioflokulaci probíhající v aktivovaném kalu.

Cílem druhého pokusu v bioreaktoru bylo zjistit, jaký vliv bude mít externí zásah do průběhu probíhajícího pokusu a to z hlediska několikadenního navýšení teploty na 45°C. Dále byl pokus zaměřen na sledování celkového počtu psychrofilních a mezofilních bakterií. Bylo zjištěno, že rozdíl mezi těmito počty bakterií těchto teplotních pásem byl i za odlišných teplotních podmínek překvapivě malý. Vliv zvýšené teploty se však na velikost a zejména strukturu vloček ukázal jako významný.

Cílem provedení pokusů s anaerobním kalem bylo sledování vývoje vloček za bezkyslíkatých podmínek a jejich velikosti. Orientačně bylo také posouzeno zastoupení gram-pozitivních a gramnegativních bakterií. Ze získaných výsledků vyplynulo, že za jistých podmínek může dojít i v anaerobním kalu k vyvločkování biomasy po přidavku substrátu, avšak tyto podmínky souvisely jednak s hodnotou sušiny použitého vzorku a jednak s nepříliš optimálními kyslíkovými poměry. Za podmínek dostatečně nízkého oxidačně redukčního potenciálu a nižší hodnotě sušiny však v jiném pokusu k této bioflokulaci nedošlo a proto by bylo vhodné tyto faktory v dalším studiu podrobněji ověřit.

Zcela odlišnou částí práce bylo využití digitální analýzy obrazu k objektivizaci vyhodnocování počtu vloček o určitém rozměru (100 x 100 μm) ve vzorcích a tak k posouzení vlivu subjektivního („lidského“) činitele. Bylo zjištěno, že počet vloček zjiště-

ný při subjektivním počítání a digitální analýzou je výrazně odlišný zejména v případech výskytu většího počtu vloček s rozměry pohybujícími se kolem stanovené hodnoty. Získané výsledky tohoto porovnání tak ukázaly na velký přínos v potenciálním využití digitální analýzy obrazu kalových suspensí, zejména u aktivovaných kalů, kde mikroskopické hodnocení velikosti či tvaru vloček má kontrolní technologický význam.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] SEVIOUR, R.J., BLACKALL, L.L.: The microbiology of activated sludge.  
Kluwer Academic Publishers 1999, Dordrecht, Boston, London
- [2] ATER SCIENCE AND TECHNOLOGY 49 (10): 51-58 2004: Nielsen PH, Thomsen TR,: Bacterial composition of activated sludge - importance for floc and sludge Properties
- [3] JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES-CHINA 18 (3): 420-427 2006: Yu T, Lei Z, Sun DZ,: Functions and behaviors of activated sludge extracellular polymeric substances (EPS)
- [4] Guo-Ping Sheng,Han-Qing Yu,Xiao-Yan Li: Stability of Sludge Flocs Under Shear Conditions: Roles of Extracellular Polymeric Substances (EPS)
- [5] Hug,T., Gujer, W., Siegrist, H.: EAWAG, Swiss Federal Institute for Aquatic Science and Technology: Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence in situ hybridization and epifluorescence microscopy. Received 14 September 2004; revised 5 July 2005; accepted 8 July 2005. Available online 19 August 2005.
- [6] Bůžek, J. Fluorescenční in situ hybridizace. Symposium o metodách používaných v Česku a na Slovensku při studiu rostlin. Vranovská Ves u Znojma 3 – 6 listopadu 1997 str.70 - 74
- [7] Daims,H., Taylor,M.W., Wagner, M: Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. Department of Microbial Ecology, University of Vienna, Althanstrasse 14, A-1090 Vienna, Austria
- [8] Aktan S, Salih BA: ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY 27 (1): 63-69 JAN 2006: Fluorescent in situ hybridization (FISH) for the detection of bacterial community in activated sludge from textile factories

- 
- [9] Liwarska-Bizukojc, E.: Department of Environmental Engineering, Technical University of Lodz: Application of image analysis techniques in activated sludge wastewater treatment processes: *Biotechnology Letters* (2005) 27: 1427–1433
- [10] Barták, M: Využití fermentoru při anaerobním rozkladu organických látek; diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, rok 2008
- [11] Häusler, J.: Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod II; Praha: Ministerstvo životního prostředí, Zemědělské vydavatelství Brázda 1991 ISBN 80-85308-01-3

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

EPS	Extracelular polymeric substance
DNA	Kyselina Deoxyribonukleová
EDTA	Ethylendiamintetraacetát tetrasodný
FISH	Fluorescence in situ hybridization
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
rRNA	Ribozomální RNA
ČOV	Čistírna odpadních vod
(C+G)	Pár Cytosin + Guanin
TYA	Trypton-yeast agar
ORP	Oxidačně – redukční potenciál
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
FT	Fakulta technologická
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
UTB	Univerzita Tomáše Bati
rpm	Revolutions per minute (otáčky za minutu)

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1: Před použitím softwaru</i> .....	18
<i>Obrázek 2: Obraz určený k analýze</i> .....	18
<i>Obrázek 3: Nativní kal    Obrázek 4: 10 minut homogenizace</i> .....	32
<i>Obrázek 5: 30 minut homogenizace    Obrázek 6: 10 minut třepání</i> .....	32
<i>Obrázek 7: 30 minut třepání</i> .....	32
<i>Obrázek 8: Nativní kal    Obrázek 9: 30 minut homogenizace</i> .....	34
<i>Obrázek 10: 180 minut homogenizace</i> .....	35
<i>Obrázek 11: Počátek pokusu (4.3.2008)</i> .....	38
<i>Obrázek 12: Třetí den (7.3.2008)</i> .....	38
<i>Obrázek 13: Sedmý den (11.3.2008)</i> .....	39
<i>Obrázek 14: Poslední den pozorování (18.3.2008)</i> .....	39
<i>Obrázek 15: Den po přidavku Hycolu E (12.3.2008)</i> .....	40
<i>Obrázek 16: Čtvrtý den po přidavku substrátu (14.3.2008)</i> .....	40
<i>Obrázek 17: Den poslední (18.3.2008)</i> .....	41
<i>Obrázek 18: Den po přidavku škrobu (12.3.2008)</i> .....	41
<i>Obrázek 19: Čtvrtý den po přidavku škrobu (14.3.2008)</i> .....	42
<i>Obrázek 20: Poslední den (18.3.2008)</i> .....	42
<i>Obrázek 21: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu</i> .....	43
<i>Obrázek 22: Počátek pokusu (25.3.2008)</i> .....	46
<i>Obrázek 23: Po čtyřech dnech (28.3.2008)</i> .....	46
<i>Obrázek 24: Po týdnu hladovění (1.4.2008)</i> .....	47
<i>Obrázek 25: Den po přidavku substrátu (2.4.2008)</i> .....	47
<i>Obrázek 26: Den před ukončením (7.4.2008)</i> .....	48
<i>Obrázek 27: Ukončení pokusu (8.4.2008)</i> .....	48
<i>Obrázek 28: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu</i> .....	49
<i>Obrázek 29: Vývoj hodnot ORP v průběhu pokusu</i> .....	49
<i>Obrázek 30: Začátek pokusu (21.4.2008)</i> .....	53
<i>Obrázek 31: Čtvrtý den pokusu (24.4.2008)</i> .....	53
<i>Obrázek 32: Osmý den pozorování</i> .....	54
<i>Obrázek 33: Ze dne 3.5.2008</i> .....	54
<i>Obrázek 34: Poslední den pozorování (5.5.2008)</i> .....	55



<i>Obrázek 35: Vývoj hodnot DOC v průběhu prvního týdne pokusu .....</i>	<i>55</i>
<i>Obrázek 36: Začátek pokusu (23.11.2007) Obrázek 37: Po pěti dnech (27.11.2007).....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 38: Na konci pokusu .....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 39: Gramovo barvení (23.11.07) Obrázek 40: Gramovo barvení (30.11.07).....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 41: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu.....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 42: Vývoj hodnot Oxidačně redukčního potenciálu v průběhu .....</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 43: Začátek pokusu (11.4.2008) .....</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 44: Po čtyřech dnech (14.4.2008) .....</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 45: Na konci pokusu (18.4.2008) .....</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 46: Gramovo barvení (11.4.2008)      Obrázek 47: Gramovo barvení (18.4.2008) .....</i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 48: Vývoj hodnot DOC v průběhu pokusu.....</i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 49: Vývoj hodnot ORP v průběhu pokusu [10].....</i>	<i>63</i>
<i>Obrázek 50: Původní fotografie    Obrázek 51: Upravená fotografie .....</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 52: Původní fotografie    Obrázek 53: Upravená fotografie .....</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 54: Původní fotografie    Obrázek 55: Upravená fotografie .....</i>	<i>66</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1: Počty vloček ve vzorcích 1. pokusu dezintegrace .....</i>	31
<i>Tabulka 2: Celkový počet bakterií - pokus 1. ....</i>	31
<i>Tabulka 3: Počty vloček ve vzorcích 2. pokusu dezintegrace .....</i>	34
<i>Tabulka 4: Celkový počet bakterií – pokus 2 .....</i>	34
<i>Tabulka 5: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D1 a D2 .....</i>	36
<i>Tabulka 6: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D3 a D4 .....</i>	36
<i>Tabulka 7: Počty vloček zjištěné v dělicích nálevkách D5 a D6 .....</i>	37
<i>Tabulka 8: Sušina kalu v dělicích nálevkách .....</i>	37
<i>Tabulka 9: Počet vloček kalu v bioreaktoru .....</i>	45
<i>Tabulka 10: Sušina kalu v bioreaktoru .....</i>	45
<i>Tabulka 11: Počet vloček v bioreaktoru .....</i>	51
<i>Tabulka 12: Sušinakalu v bioreaktoru .....</i>	52
<i>Tabulka 13: Celkový počet bakterií vprvním týdnu pokusu .....</i>	52
<i>Tabulka 14: Celkový počet bakterií před zvednutím teploty .....</i>	52
<i>Tabulka 15: Celkový počet na konci pokusu .....</i>	52
<i>Tabulka 16: Počet vloček v anaerobním kalu .....</i>	57
<i>Tabulka 17: Počet vloček v anaerobním kalu 2 .....</i>	60
<i>Tabulka 18: Srovnání počtu vloček v bioreaktoru .....</i>	64
<i>Tabulka 19: Srovnání počtu vloček v dělicích nálevkách D1 – D3 .....</i>	64
<i>Tabulka 20: Srovnání počtu vloček v dělicích nálevkách D4 – D6 .....</i>	65

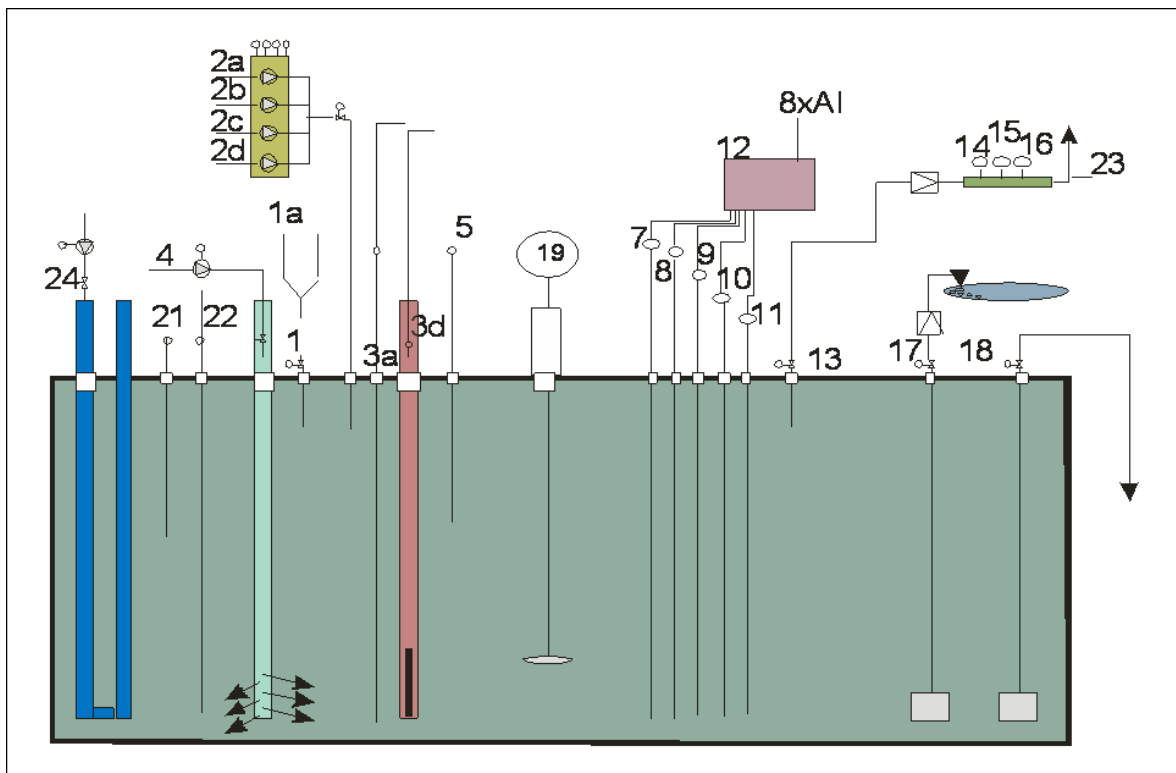
## **SEZNAM PŘÍLOH**

PI - Fotografie Bioreaktoru využitého v diplomové práci

PII – Schéma bioreaktoru použitého v diplomové práci [10]



*PI – Fotografie bioreaktoru využitého v diplomové práci*



*P II - Schéma bioreaktoru použitého v diplomové práci. 24 - chlazení průtokem, 21 - sonda pro měření relativního tlaku, 22 - sonda pro měření výšky hladiny, 2a/2b/2c/2d - ventily pro dávkování peristaltickými čerpadly, 3d - ohřev topným tělesem, 19 - motor na míchání, 7 - sonda pro měření vodivosti, 8 - sonda pro měření pH, 9 - sonda pro měření obsahu rozpuštěného kyslíku, 10 - sonda pro měření ORP, 11 - sonda pro měření turbidity, 12 - lokální vyhodnocovací jednotka SC1000, 13 - ventil pro odběr plynné fáze, 14 - sonda pro měření produkce  $CO_2$ , 15 - sonda pro měření produkce  $CH_4$ , 17 - ventil pro odběr kapalné fáze [10].*