

Vybrané bakteriální polymery a jejich význam pro čištění odpadních vod

The importance of some bacterial
polymers for the treatment of
waste water

Eva Barošová

Bakalářská práce
2005



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Děkuji vedoucímu mé bakalářské práce, panu RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za podnětné a cenné rady a připomínky, za odborné vedení a za čas, který mi věnoval.

Prohlašuji, že jsem na celé bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně, 26. 05. 2005

.....

Eva Barošová

Abstrakt

Tato práce se zabývá bakteriálními polymery extracelulárními a intracelulárními. Jsou zde uvedeny jejich základní vlastnosti, složení, a také možnosti znázornění obou typů těchto polymerů v bakteriálních buňkách. V této práci je také popsán význam extracelulárních bakteriálních polymerů pro tvorbu vloček aktivovaného kalu a důsledek nadměrné tvorby kapsulárních polymerů při viskózním bytnění aktivovaného kalu. Je zde také zmínka o významu zásobních intracelulárních polymerů pro postupy mikrobiálního odstraňování fosforu z odpadních vod.

This work deals with extracellular and intracellular bacterial polymers. Their composition, basic properties and possibilities to stain both types of polymer in the bacterial cells are noted. The work also describes the importance of extracellular polymers for flocks creating of activated sludge and the importance of excessive production of capsular polymers during viscose activated sludge bulking. Also mentioned here is the importance of storage intracellular polymers for the process of microbial removal of phosphorus from waste water.

OBSAH

ÚVOD	6
1 BIOPOLYMERY	8
1.1 EXTRACELULÁRNÍ POLYMERY	10
1.1.1 Bakteriální polysacharidy	11
1.1.2 Bílkoviny	14
1.2 POLYMER BUNĚČNÉ STĚNY	15
1.3 INTRACELULÁRNÍ POLYMERY	16
1.3.1 Polyhydroxyalkanoáty - PHAs	16
1.3.2 Glykogen	17
1.3.3 Polyfosfáty	17
2 ZNÁZORNĚNÍ POLYMERŮ	18
2.1 BARVENÍ EXTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ	18
2.2 BARVENÍ INTRACELULÁRNÍCH POLYMERŮ	21
3 AKTIVOVANÝ KAL – JEHO SLOŽENÍ A VZNIK.....	25
4 VSKOZNÍ BYTNĚNÍ AKTIVOVANÉHO KALU	27
5 MIKROBIÁLNÍ ODSTRAŇOVÁNÍ FOSFORU	29
ZÁVĚR.....	31
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	33
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	35
SEZNAM OBRÁZKŮ	36

ÚVOD

Již od pradávna, tj. od bod existence *Homo sapiens sapiens* byl středem pozornosti člověka on sám. Jeho obživa, bydlení a přežití bylo to nejdůležitější. S vývojem tohoto prapředka docházelo i ke zvýšeným nárokům na uspokojení jeho potřeb. Nikdo si nelámal hlavu s budoucností a okolí, životní prostředí (ŽP), nebylo bráno v úvahu. S rozvojem společnosti začaly vznikat první manufaktury, které se postupem času vypracovaly až ve velké továrny. Ty se staly hlavním znečišťovatelem přírody. A nejen ty, i člověk jako osoba má podíl na tom, jak jeho prostředí vypadalo a vypadá. Až v pozdějších letech se objevily pokusy o snížení negativních dopadů na ŽP. Přes různé úspěchy i neúspěchy je dnes ŽP v mnoha zemích stavěno na první místo, i v ČR tomu není jinak. Neboť člověk si uvědomil, že takové prostředí, ve kterém se právě nachází, si utváří sám. Sám může za to, jestli bude jeho okolí krásné, zdravé a života schopné či jen šedé, zapáchající a neobyvatelné.

Nelze však jednoduše říci, která část biosféry (část Země, ve které člověk žije) je nejvíce a která nejméně poškozená.

Mezi jedny z hlavních znečištěných a poškozených zdrojů přírody patří voda. Jak již bylo naznačeno, jedním z největších znečišťovatelů je průmysl (chemický, metalurgický, papírenský atd.), dále také ve velké míře zemědělství a lidská společnost jako taková. Dnes je již možno vodu úspěšně různými technologiemi čistit a upravovat do znovu využitelné podoby. Existují různé postupy čištění, záleží to hlavně na charakteru znečištěné vody, tj. zda pochází z průmyslu a z jakého, či zda jde o vodu splaškovou. Zařízení, ve kterém probíhá čištění vod, se nazývá čistírna odpadních vod (ČOV). Zde dochází k velmi složitým technologickým postupům. Kde se nejprve provádí mechanické čištění, odstraňování nejhrubějších částic z vody. Pak následuje mnoho dalších různých postupů. Jedním z dnes nejpoužívanějších je tzv. biologické čištění. V této části čistírny dochází k čištění odpadní vody pomocí mikroorganismů, díky velmi intenzivnímu probublávání přiváděným vzduchem. Přítomná směs mikroorganismů se nazývá aktivovaný kal (AK). Někdy je odpadní voda tzv. naočkována, kdy část tohoto AK je dodána do čištěné vody ještě před začátkem provzdušňování. Přívod vzduchu zlepšuje a urychluje nárůst biomasy (mikroorganismů). Nakonec se takto vzniklý AK odstraňuje v další nádrži (dosazovací nádrži). Kal ve formě vloček (směs vločkotvorných a malého množství vláknitých

mikroorganismů) sedimentuje na dno nádrže díky gravitaci. Vyčištěná voda pak putuje do recipientu, případně dál do dalších částí čistírny.

Avšak i v ČOV se objevuje řada úskalí, se kterými si občas člověk neví rady. Některými z nich jsou viskózní a vláknité bytnění. Vláknité bytnění je děj, při kterém je vytvořeno nadměrné množství mikroorganismů tvořící dlouhá vlákna. Díky nim pak dochází k „roztrhání“ vloček nebo k nadnášení kalu a tak ke špatné sedimentaci AK. Viskózní bytnění je způsobeno nadměrnou produkcí extracelulárních polymerů (polymerů na povrchu buňky) mikroorganismů. Viskózní bytnění nijak zvlášť nezpůsobuje problémy při čištění vody, ale způsobuje komplikace při měření a kontrolách čistoty odpadní vody. Příčina tohoto jevu dosud není známa.

Protože jsou stále vyvíjeny nové a nové postupy výrob, je čištění odpadních vod také nuceno poznávat nové postupy odstraňování nežádoucích látek. Praktiky v ČOV nejsou omezené a musejí se přizpůsobovat rostoucím nárokům. Jsou tedy v neustálém rozvoji a je nutno jim věnovat velkou pozornost. Protože dominantními mikroorganismy čistírenských kalů jsou bakterie, je jim při studiu čistírenských procesů věnována mimořádná pozornost. Znalost jejich vlastností a schopností je nezbytná nejen pro pochopení řady pochodů při čištění odpadních vod, ale i pro rozšiřování možností jejich aplikace.

1 BIOPOLYMERY

V dnešní době je slovo polymer či plast běžně užíváno. Každý si dokáže pod tímto slovem představit určitý konkrétní výrobek. Biopolymery však takový věhlas zatím ještě nemají, neboť až v posledních letech začínají nabírat na slávě. Co tedy biopolymery jsou?

Biopolymery jsou vysokomolekulární sloučeniny produkované živými organismy a jsou více či méně biologicky rozložitelné. Molekulová hmotnost těchto látek se pohybuje v oblasti 10^4 až 10^7 Da. Makromolekula biopolymeru vzniká spojením velkého množství stále opakujících se jednotek jednoho typu látky, za současné tvorby velmi dlouhých lineárních či rozvětvených řetězců. Ty mohou v prostoru zaujímat velký počet různých konfigurací vyznačujících se různými vlastnostmi. Struktura biopolymerů je mnohem komplikovanější než struktura syntetických polymerů. Jednoduché makromolekuly s monotónní stavbou se v přírodě vyskytují jen ojediněle. Jedním z hlavních rozdílů od syntetických polymerů je přesnost ve struktuře. Přírodní polymery mají přesně definovanou délku řetězce, prostorové uspořádání a pravidelnou strukturu. Chemická výroba přírodních polymerů je teoreticky možná, avšak praktická příprava je velmi obtížná, neboť v živých organismech syntéza polymerních látek probíhá působením enzymů, které jsou přísně specifické [1].

Biopolymery organismů se dělí do několika skupin:

- polypreny (kaučuk, gutaperča)
- polysacharidy (př. škrob, chitin, celulóza)
- bílkoviny (př. kolagen, vlna, hedvábí, enzymy, hormony)
- nukleové kyseliny (DNA, RNA)

Mimo tyto 4 základní sloučeniny organického původu, se zařazují k biopolymerům také polyestery (polyhydroxyalkanoáty) organického charakteru a nakonec i anorganické polyfosfáty.

Další dělení biopolymerů je na tzv. globulární („klubkovité“) př. hemoglobin a fibrilární (vláknité) př. kolagen [1,2,3].

Přesto, že chemická stavba biopolymerů není na první pohled příliš komplikovaná, dochází kombinací jednotlivých monomerních jednotek k takové mnohotvárnosti a složitosti, jaká

neexistuje u žádných jiných sloučenin. Každá skupina látek o stejné obecné struktuře má obrovský počet různých uspořádání a také různých funkcí. Složité vlastnosti biopolymerů vyplývají z velikosti molekul a složitosti jejich stavby. S prodlužováním řetězce (více jak 50 atomů) dochází ke vzniku dalších nových vlastností, např. délka řetězce přímo ovlivňuje možnosti smršťování molekul, proměnlivou viskozitu roztoků, vznik interakcí mezi jednotlivými skupinami vázanými na různá místa řetězce atd. Nové vlastnosti jsou také dané charakterem pořadí různých základních stavebních jednotek.

Biologická soustava tvořená biopolymery se odlišuje od všech ostatních soustav především schopností replikace, adaptace a evoluce. Výjimečné vlastnosti biopolymerů jsou dány jen jejich makromolekulárním charakterem a složitostí molekulové stavby. Čím je molekulová struktura biopolymeru složitější, tím větší množství informací je schopen uložit nebo přenášet. Proto také polysacharidy, které mají monotónní strukturu, nemohou ukládat ani přenášet žádné informace. S narůstající molekulovou hmotností výjimečné vlastnosti biopolymerů tím více vynikají [1].

Biopolymery mají v přírodě významné nezastupitelné funkce – řídí a koordinují veškeré reakce probíhající v organismu (syntéza jednotlivých nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek, jejich přeměny a odbourávání), umožňují přenos života na další generaci, zachovávají specifitu určitého druhu organismu a umožňují také přizpůsobení organismu podmínkám, ve kterých existuje. Každá skupina biopolymerů má své určité vymezené funkce:

Nukleové kyseliny – nositelé biologické informace (genetický kód), což vede k syntéze bílkovin a dalších typů nukleových kyselin z nízkomolekulárních stavebních jednotek.

Bílkoviny – mají širokou škálu uplatnění př. katalytickou, stavební, regulační, obrannou, transportní, podpůrnou, ...

Polysacharidy – hlavní funkce je rezervní, neboť jde o sloučeniny s vysokým obsahem energie, a také funkce stavební

S rozpoznáváním struktur těchto látek se vytvořil nový vědní obor – molekulární biologie, jehož hlavním cílem je podrobné studium struktury biopolymerů. Neméně důležitý je také průmyslový význam studia biopolymerů. Na základě dokonalé znalosti struktury a chemických reakcí biopolymerních frakcí rostlinných a živočišných organismů je možno zdokonalovat technologii jejich zpracování a vlastnosti výrobků [1].

Mnoho biopolymerů se také nachází ve struktuře bakteriálních buněk. Na určitý typ bakteriálních polymerů se zaměřila tato bakalářská práce. Hlavním cílem však není jen určit typy těchto polymerů, ale také popsat jejich význam při čištění odpadních vod. Polymerní sloučeniny, obsažené ve struktuře bakterií, které jsou součástí aktivovaného kalu (AK), je možno rozdělit podle výskytu na tři hlavní skupiny:

extracelulární (kapsulární) polymery – polysacharidy, bílkoviny

polymer buněčné stěny – peptidoglykan (murein)

intracelulární (zásobní) polymery – polyhydroxyalkanoáty (PHAs), glykogen, polyfosfáty

1.1 Extracelulární polymery

Tato skupina biopolymerů se nachází na povrchu buněk některých bakteriálních druhů a vytváří zde spolu s dalšími látkami povrchovou ochrannou vrstvu – pouzdro (kapsuli) nebo sliz. U velké části bakterií, schopných tvořit tyto polymery, jsou tvořeny polysacharidy, u menší části bakterií bílkovinami. Mimo tyto dvě převažující složky se na stavbě pouzdra bakterií podílejí též v menší míře uronové kyseliny, zbytky kyseliny D- a L-glutamové a kyseliny hyaluronové.

Kapsulární (pouzderné) polysacharidy se vyskytují u bakterií, kde na povrchu buňky tvoří vrstvu. Tato vrstva má několik různých funkcí – chrání buňku před vnějšími vlivy (před vyschnutím, proti napadení), umožňuje přilnutí buňky k podkladu a též slouží jako zásobárna živin v době nouze. Každý druh bakterie má určité složení pouzdra či slizu. Jde hlavně o imunologicky specifické polymery, které díky svému rozdílnému a již zmiňovanému specifickému složení, umožňují identifikovat jednotlivé druhy mikroorganismů imunologickými metodami [4].

V závislosti na síle a konzistenci povrchové vrstvy obvykle rozlišujeme makrokapsuly, sliz a mikrokapsuly.

Makrokapsula má určitou ultrastrukturu a ostře ohraničený okraj, jež je dobře mikroskopicky pozorovatelný [2,5]. Tato kapsula (pouzdro) je pevně vázána kovalentní vazbou na povrch buněčné stěny, např. u rodu *Streptococcus* [6].

Sliz (slizové pouzdro) je lehce odstranitelný z povrchu buňky, je vylučován volně do prostředí a nemá ohraničený okraj, vyskytuje se např. u druhu *Leuconostoc mesenteroides*.

Mikrokapsula – je velmi tenká vrstva nad buněčnou stěnou o tloušťce přibližně 0,2 nm. Někdy je mylně považována za část buněčné stěny. Existenci mikropouzdra nelze rozeznat ani moderními metodami ani elektronovým mikroskopem. Lze ji dokázat pouze imunologicky [2,5].

Kmeny bakterií vytvářející makrokapsulu nebo sliz rostou na agarových živných půdách zpravidla v podobě hladkých mukosních kolonií. Tyto bakterie však mohou spontánně (mutací) přecházet na kmeny bez pouzder, vytvářející na stejných živných půdách kolonie drsného charakteru. Tento proces bývá provázen změnou některých biologických vlastností [2].

1.1.1 Bakteriální polysacharidy

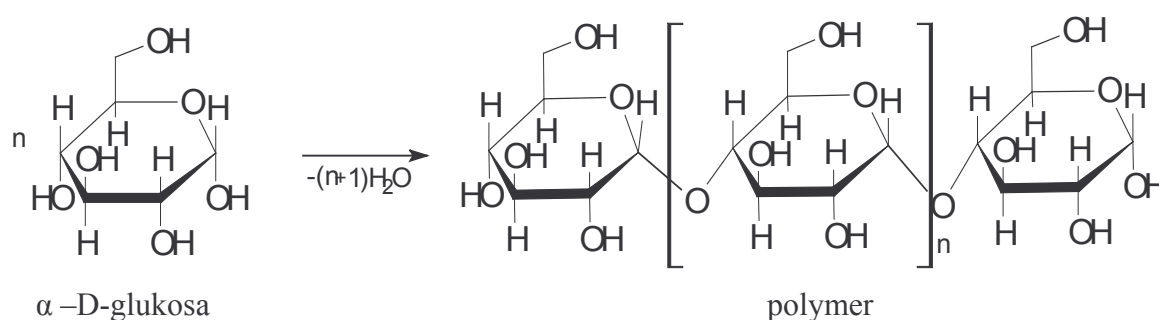
Polysacharidy jsou důležitou skupinou makromolekulárních sloučenin vyskytujících se v přírodě. Molekula je složena z několika set až tisíc monomerních jednotek spojených tzv. glykosidickou vazbou mezi uhlíkem C₁ jedné a jiným uhlíkem (obvykle C₄) druhé molekuly (viz obr. 1) Se vznikem této vazby se současně odštěpuje voda.

Dle počtu monomerních jednotek se sacharidy dělí na oligosacharidy, které jsou složené z max. 10-ti monosacharidových jednotek a polysacharidy obsahující více než 10 monosacharidových jednotek. U většiny bakteriálních polymerů je však počet monomerních jednotek daleko větší a jejich molekulová hmotnost je tak vyšší než $1 \cdot 10^6$ Da [1,2,7,4]. Z chemického hlediska jsou polysacharidy polyhydroxyaldehydy – aldosity nebo polyhydroxyketony – ketosity. Podle počtu uhlíků se jejich monomerní jednotky dělí na triosy, pentosy, hexosy, heptosy atd. Monosacharidy se většinou vyskytují v cyklické formě buď s pětičlenným kruhem, pak se nazývají pyranosy nebo s šestičlenným kruhem, furanosy [7].

Názvosloví polysacharidů se vyvíjelo dosti nejednotně a bylo často založeno na názvech zdrojů, ze kterých byl daný polysacharid izolován, např. dextran izolovaný z *Leuconostoc dextranicum*. Podle širší klasifikace založené již na chemické struktuře se polysacharidy dělí na homopolysacharidy, kdy řetězec polymeru je tvořen pouze jedním typem monomeru a heteropolysacharidy, kdy je řetězec tvořen několika různými cukry. Tvar řetězce polysacharidu je buď lineární nebo rozvětvený [4].

V polysacharidovém řetězci jsou jednotlivé monosacharidy vázány glykosidickou vazbou, jak již bylo uvedeno. Pro tuto vazbu se používá zkrácený zápis např. α -(1→6) což znamená, že poloacetálová hydroxylová skupina (tj. skupina –OH na C₁ uhlíku) je v poloze

α , tj. pod rovinou kruhu a čísla v závorce značí napojení glykosidické vazby – O – na C_1 na jedné a C_6 na druhé molekule [8]. Napojování jednotlivých monomerních jednotek je možné několika způsoby. Každý polysacharid je tedy specifický svým rozdílným napojením jednotlivých monomerů. U větvených řetězců se samozřejmě vyskytuje daleko větší množství vazeb, většinou v závislosti na stupni větvení, např. v dextranu je D-glukosa vázána vazbami α -(1 $\rightarrow$ 6), α -(1 $\rightarrow$ 3), někdy i dalšími, mannany z různých mikroorganismů mají vazby D-mannosy α -(1 $\rightarrow$ 2), α -(1 $\rightarrow$ 6), někdy α -(1 $\rightarrow$ 3) apod. [4].



Obr. 1. α -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidická vazba mezi glukosovými jednotkami [1]

V molekule polysacharidu se mohou vyskytovat mimo cukerné složky i jiné sloučeniny např. lipidy, oligopeptidy, bílkoviny, organické kyseliny. Bakteriální polysacharidy obsahují většinou karboxylové, fosfátové a sulfátové funkční skupiny. Tyto funkční skupiny dodávají takovým bakteriálním polysacharidům aniontový charakter. Jiné polysacharidy obsahují aminoskupiny ve své primární struktuře. Ty mohou být acetylované, sulfátované nebo některé zůstávají volné. V posledním případě propůjčují volné aminoskupiny polysacharidu kationtový charakter [4].

Polysacharidy jako takové velmi dobře hydratují a přítomné funkční skupiny k tomuto ději ještě více přispívají, což má za následek tvorbu vysoce viskózních roztoků. Za přítomnosti dvojmocných kationtů (Ca^{2+} , Mg^{2+}) se tvoří intra- i intermolekulární křížové vazby a dochází k precipitaci. Dochází k ní za podmínek, které snižují ionizaci funkčních skupin. Např. při zvýšení koncentrace vodíkových iontů v roztoku karboxylovaného polysacharidu (pod pH 3) je ionizace karboxylové skupiny potlačena, ztrácí asociovanou vodu a polysacharid precipituje. Polysacharidy se silně kyselými funkčními skupinami (např.

sulfátovou) jsou stabilní i v roztocích o nízkých pH, protože ionizace silně kyselých skupin není snížena.

Ve vodě se polysacharidy buď nerozpouštějí nebo tvoří koloidní roztok. Lineární polysacharidy jsou buď rozpustné velice málo, nebo zcela nerozpustné. Některé mohou být rozpuštěny dodáním tepelné energie nebo porušením vodíkových vazeb, např. silnými alkáliemi. Snížením teploty nebo neutralizací však většinou znovu precipitují. Větvené polysacharidy se rozpouštějí lépe, ale jejich roztok o stejné koncentraci má ve srovnání s lineárními nižší viskozitu. Lineární řetězce zaujmají totiž v roztoku větší objem než řetězce větvené, s celou řadou mezimolekulárních vazeb.

Obecně lze říci, že mikrobiální polysacharidy jsou látky, které reagují s jinými makromolekulami i malými molekulami. Protože náboj molekul sacharidů je zanedbatelný, tvorba vysokomolekulárních komplexů je podmíněna vodíkovými můstky, jejichž pevnost může být v rozmezí od slabých van der Waalsových sil až po kovalentní vazby. V pevném stavu jsou všechny polysacharidy v dezorganizovaném uspořádání a s mezimolekulárními vazbami jen z části využitými. Místa s volnými vazbami se mohou hydratovat. Velice pečlivě usušený polysacharid obsahuje za normální vlhkosti 8-10% vody. Roztoky některých polysacharidů jsou velmi viskosní a snadno přechází v gel [4,1].

Stanovení fyzikálně chemických parametrů polysacharidů naráží na celou řadu problémů. Mikrobiologa, biochemika, imunologa zajímají intermolekulární vztahy studované látky, organizace polymerů, funkční vlastnosti aj., především u žijících buněk. Izolačními technikami se poruší nejen slabé hydrofobní vazby, ale předpokládá se, že v některých případech dojde k porušení i vazeb kovalentních. Je tedy nutné při interpretaci dat počítat s tím, že izolovaný polysacharid nemusí mít stejné vlastnosti jako původní polysacharid, zabudovaný ve struktuře buňky. Dalším omezujícím faktorem je skutečnost, že velká část polysacharidů obsahuje polymery o nestejně molární hmotnosti, i když třeba o stejné struktuře a naopak, z biologických materiálů lze také někdy izolovat směsi polysacharidů o stejné nebo podobné molární hmotnosti, ale rozdílné primární struktuře [4].

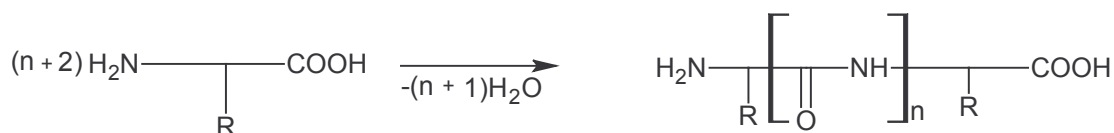
Struktura bakteriálních pouzder je natolik složitá, že dosud nebyly všechny dostatečně prozkoumány. Bylo zjištěno, že existuje několik různých typů polysacharidů vyskytujících se na povrchu buněk. Jednotlivé typy jsou rozdílné v různorodém zastoupení monosacharidů, jejich poměrech, či v přítomnosti dalších látek. Celková struktura byla zatím prozkoumána pouze u polysacharidů několika málo druhů bakterií, převážně patogenních. Např. u pneumokoka je zastoupení cukerných složek následující – D-glukosa,

L-fukosa, D-glukosamin a D-galaktouronová kyselina, detailní struktura však dosud není známa. Pouzdra *Escherichia coli* obsahují především D-galaktosu, dále D-glukosu, D-mannosu a L-fukosu. I u mnoha dalších bakterií by se našlo rozdílné složení kapsulárních polymerů [4].

Z těchto informací jde vidět, že struktura povrchové vrstvy bakterií, a nejen těch, není nikterak jednoduchá a je zapotřebí ještě velkého úsilí, času a trpělivosti, než člověk dokáže rozluštit onu záhadu stavby tolik využívaných a potřebných mikroorganismů.

1.1.2 Bílkoviny

Polysacharidový charakter pouzdra má převážná většina bakterií. Existují však také bakterie, které mají pouzderný materiál tvořen bílkoviny. Toto strukturní složení má však menší počet bakterií, např. rod *Bacillus* [2]. Z chemického hlediska jsou bílkoviny vysokomolekulární látky, složené z velkého počtu monomerních jednotek – aminokyselin (AMK). Většinou se jedná o 20 druhů AMK, zvaných kódované (standardní) aminokyseliny, neboť jejich umístění v proteinu je určeno genetickým kódem. AMK jsou substituční deriváty karboxylových kyselin obsahující aminoskupinu $-\text{NH}_2$. Spojením jednotlivých AMK kondenzací karboxylové skupiny a aminoskupiny za odštěpení vody vzniká tzv. peptidická (či peptidová) vazba (viz. obr. 2) [7].



Obr. 2. Znázornění peptidické vazby mezi aminokyselinami [1]

Na jednom konci je řetězec bílkoviny ukončen $-\text{NH}_2$ (amino) skupinou a na druhém $-\text{COOH}$ (karboxy) skupinou. Kromě peptidické vazby se u bílkovin vyskytuje také kovalentní disulfidická vazba a v malém procentu zastoupení i další vazby, např. esterová.

Polymery AMK jsou peptidy a proteiny (bílkoviny). Hranice mezi polypeptidy a proteiny není ostrá. Peptidy obsahují zpravidla méně než 50 aminokyselinových zbytků, bílkoviny více než 50, což odpovídá přibližně relativní molekulové hmotnosti větší než $6 \cdot 10^3$ Da. Obecně se peptidy označují dle počtu aminokyselinových zbytků jako dipeptidy se dvěma

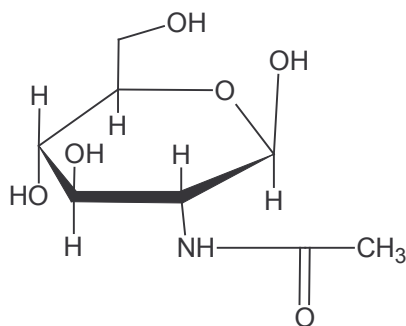
AMK-zbytky, tripeptidy se třemi atd. Jestliže není v peptidu vázáno více než 10 AMK-zbytků, jedná se o oligopeptidy, při vyšším počtu jde o polypeptidy.

Vzorce peptidů zapisujeme zkratkami AMK, které je tvoří. Zleva začínáme vždy AMK, která má volnou aminokyselinu (N-konec). Kratší oligopeptid můžeme pojmenovat názvem složeným z názvů jednotlivých AMK. Začneme od N-konce, kde zakončení -in v názvu AMK nahrazujeme zakončením -yl. Název poslední AMK ponecháme beze změny (např. alanylalanylglycin) [7,4].

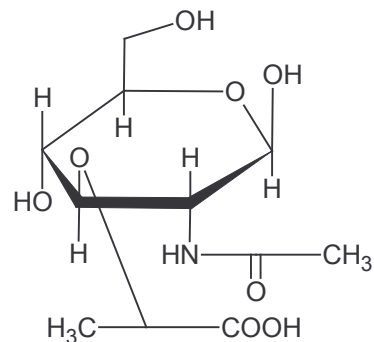
Každý organismus je rozdílný ve svých specifických bílkovinách, neboť každý bílkovinný řetězec má různé zastoupení aminokyselin. Jejich pořadí je dáno geneticky. Bílkoviny jsou klíčovými sloučeninami všech živých organismů včetně bakterií.

1.2 Polymer bakteriální buněčné stěny

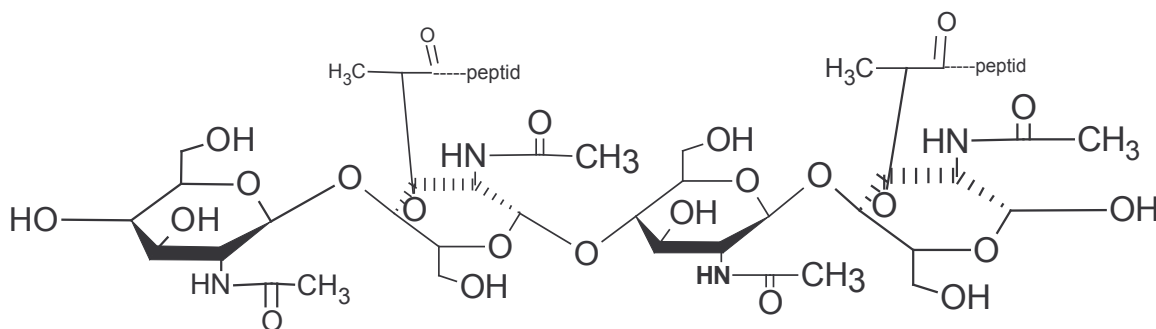
Přesto, že buněčná stěna není extracelulární polymer, její složení je natolik specifické, že jej zde uvádím. Bakteriální buněčné stěny jsou složeny z několika typů sloučenin, oporným materiálem je však vždy heteropolysacharid peptidoglykan, zvaný murein. Jeho základní jednotkou je disacharid složený z N-acetylglukosaminu (viz obr. 3) a N-acetylmuramové kyseliny (viz. obr. 4). Tato murámová kyselina je D-glukosamin, která má na hydroxylu v poloze 3 navázanou kyselinu mléčnou. Disacharidové jednotky se vážou na polysacharid β -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou (viz. obr. 5) [8]. Polysacharidické řetězce jsou vzájemně příčně propojeny krátkými peptidickými můstky, takže peptidoglykan má trojrozměrnou strukturu a poskytuje bakteriálním buňkám dostatečnou oporu.



Obr. 3. N-acetylglukosamin [8]



Obr. 4. β -N-acetylmurámová kyselina [8]



Obr. 5. Glykosidická vazba β -(1 $\rightarrow$ 4) mezi N-acetylglukosaminem a kys.
N-acetylmurámovou [8]

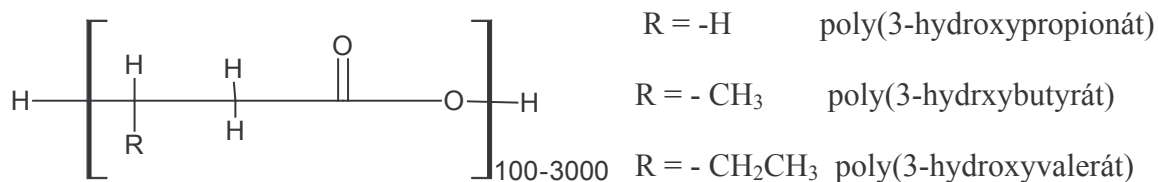
1.3 Intracelulární polymery

Intracelulární zásobní polymery jsou látky, které se nachází uvnitř buněk bakterií a slouží jako zásobárna ať již energie tak i různých důležitých prvků. Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou polyhydroxyalkanoáty (PHAs), glykogen a anorganické polyfosfáty.

1.3.1 Polyhydroxyalkanoáty - PHAs

PHAs jsou biologicky rozložitelné látky produkované bakteriemi. Za určitých podmínek některé bakterie produkují až 80% PHAs na suchou váhu mikroorganismů [9].

Nejčastějším zástupcem PHAs u bakterií je poly- β -hydroxybutyrát (PHB, poly- β -hydroxymáselná kyselina), dále jsou to již v menší míře např. poly(3-hydroxypropionát), poly(3-hydroxyvalerát) a některé další (viz. obr.6).



Obr. 6. Obecná struktura PHAs + některé typy [9]

Nejhojněji vyskytující se PHB se v buňkách bakterií nachází v dlouhém řetězci. Tato kyselina je v buňkách přítomna v granulích v krystalické podobě. Jednotlivé granule mají průměr 100-800 nm, jsou obalené jednovrstevnou membránou a složené z 98% PHB a 2% bílkovin a lipidů. Ke vzniku této sloučeniny potřebuje bakterie hlavně dostatečný přísun sacharidů nebo jiných uhlíkatých zdrojů. PHB plní v buňce úlohu zásobárny energie a uhlíku [2].

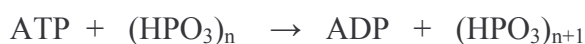
Jistou zajímavostí je, že se v dnešní době začínají PHAs používat jako náhrada za syntetické termoplasty, proti kterým mají značnou výhodu v jejich úplné biologické rozložitelnosti. Navíc, protože si lidský organismus dokáže sám syntetizovat některé PHAs, jsou tyto sloučeniny vhodné i jako materiál pro farmaceutický průmysl [9], jelikož nezpůsobují nepříznivé reakce organismu.

1.3.2 Glykogen

Glykogen se v bakteriálních buňkách nachází ve formě polyglykozidových granulí v cytoplazmě. Jedná se o rozvětvený polymer podobný amylopektinu. Tyto granule existují jak s jednovrstevnou membránou na povrchu tak i bez ní. Neohraňované granule mají průměr 20-100 nm, ohraničené granule mají průměr 160 – 300 nm. Tyto granule se nachází převážně u bakterií rostoucích v prostředí s dostatkem uhlíku, ale s omezeným přístupem dusíku. Polyglykozidové granule jsou v buňce přítomné jako zásobárna energie [2] a uhlíku.

1.3.3 Polyfosfáty

Polyfosfáty jsou anorganické sloučeniny, které se nachází uvnitř některých bakteriálních buněk, jak již bylo uvedeno v kapitole 1.3. Nachází se volně v cytoplazmě ve formě granulí převážně kulovitého tvaru o průměru 48 nm až 1 μm. Jde o dlouhé řetězce Na-polymetafosfátu. Granule jsou umístěné v blízkosti bakteriálního jádra. Tyto sloučeniny vznikají hlavně při nedostatku některých živin, např. síry. Při změně podmínek se mohou stát zdrojem fosforu. Polyfosfáty vznikají účinkem katalyzátoru polyfosfatkinázy při reakci znázorněné na obrázku 7.



Obr. 7. Vznik anorganických polyfosfátů působením ATP [2]

Energetická hodnota těchto polyfosfátů má však druhotný význam [2].

2 ZNÁZORNĚNÍ POLYMERŮ

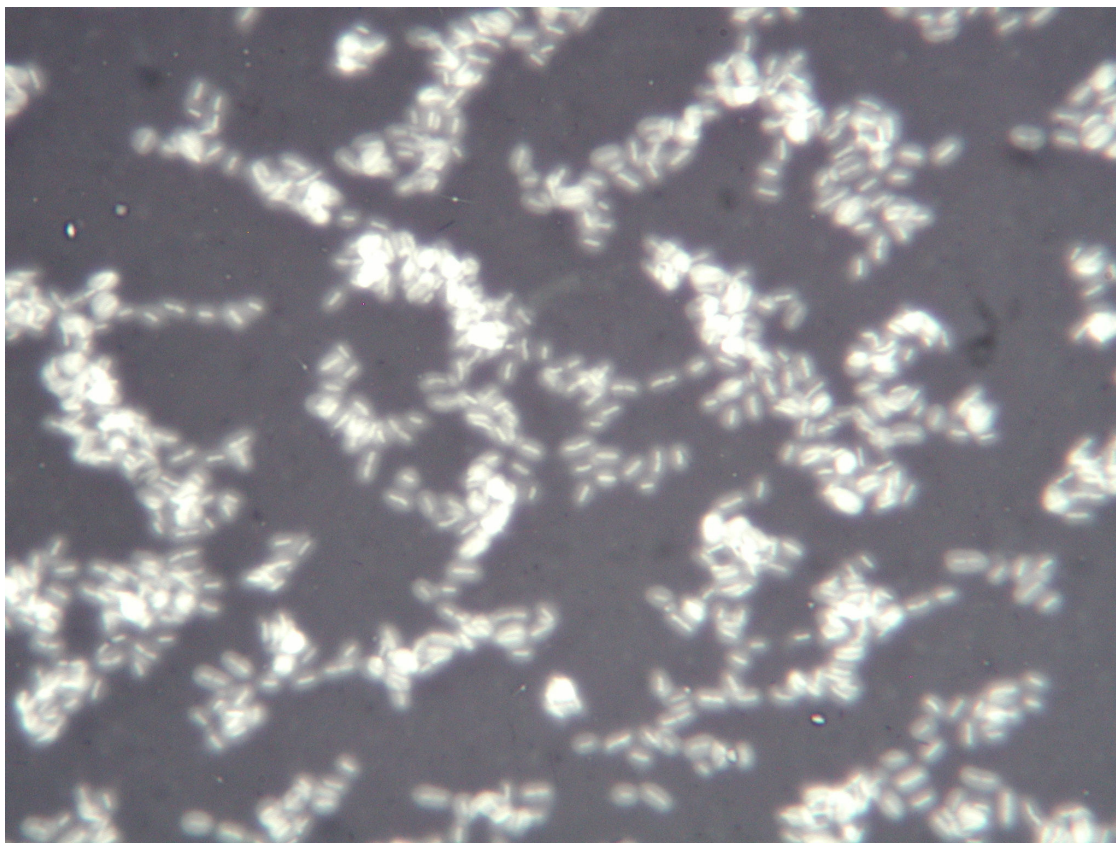
Buňky bakterií jsou složeny z velkého množství různých organických a anorganických látek včetně polymerů. Každý polymer má svůj úkol a své specifické složení. Jednotlivé druhy mikroorganismů (bakterií) se liší zastoupením a strukturou typů polymerních látek. Díky tomu je možné některé druhy identifikovat. Jedním ze způsobů, jak dokázat přítomnost daných polymerů, je jejich barvení. Podle toho, jaký polymer chceme znázornit, se používá určitý typ a také postup barvení.

2.1 Barvení extracelulárních polymerů

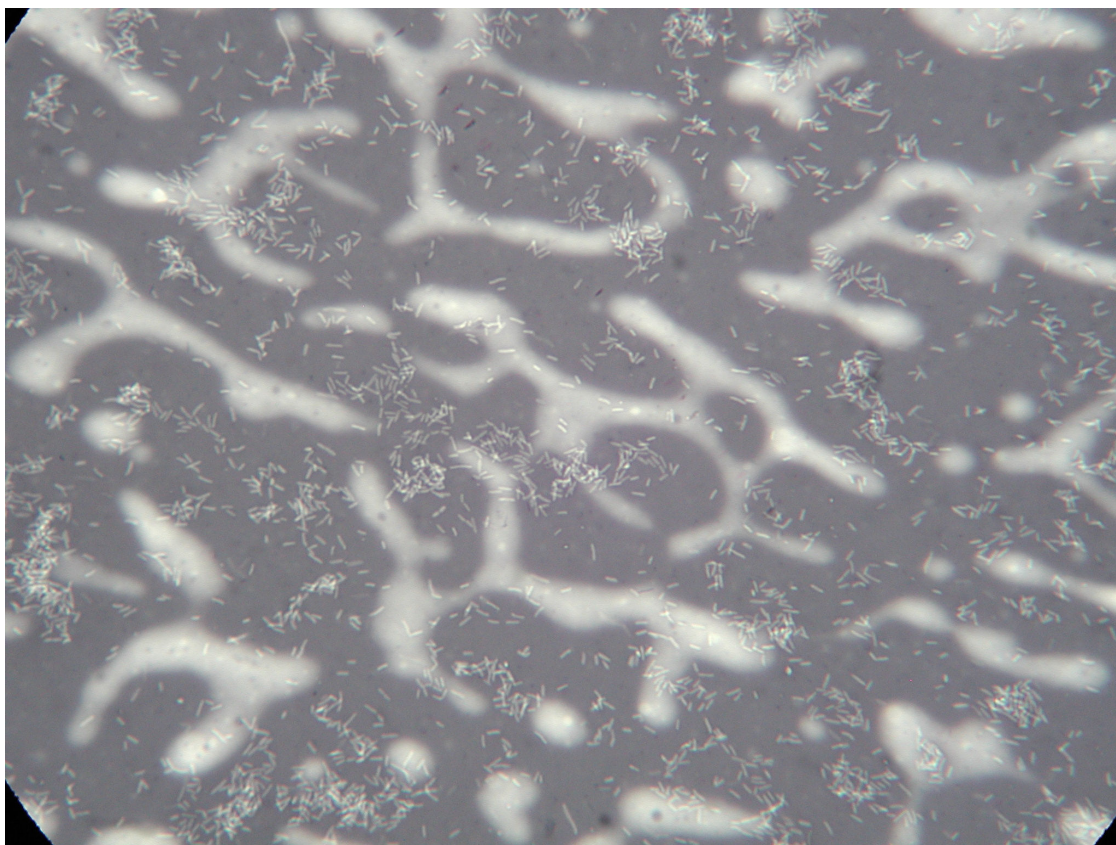
Existuje mnoho typů kapsulí. Záleží na tom, o jaký druh bakterie se jedná. Velkým problémem je barvení buněk tak, aby je bylo možné snadno od kapsulí rozlišit, aby kapsule nebyly zabarveny [10]. Existují dvě hlavní metody barvení kapsulí. Pozitivní, kde se barví přímo kapsule a negativní, kde se barví okolí buněk a kapsule zůstávají nezabarvené, neboť buňky nepřijímají do své struktury použité kontrastní barvivo [10,11].

Negativní barvení

Jednou z možností negativního barvení je použití koloidního roztoku Kongo červeně, která má v kyselé oblasti (pH 3) modrou barvu, nevniká do buňky mikroorganismu a zabarví pouze pozadí. V některých případech se místo Kongo červeně používá tuž nebo nigrosin [11]. Betina [11] uvádí několik dalších způsobů negativního barvení. Výsledný preparát barvený Kongo červení znázorní bakteriální buňky jako bezbarvé oblasti na modrém pozadí, zatímco pouzderý materiál je znázorněn světle modře. Při negativním barvení nigrosinem je pozadí černošedé, pouzdra bakterií jsou světle šedá a buňky jsou bílé, nezabarvené (viz. obr. 8). V případě přítomnosti extracelulárních polymerů charakteru slizů, jsou tyto oblasti znázorněny jako světle šedé šmouhy (viz. obr.9).



Obr. 8. Znázornění bakteriálního pouzdra negativním barvením – nigrosinem



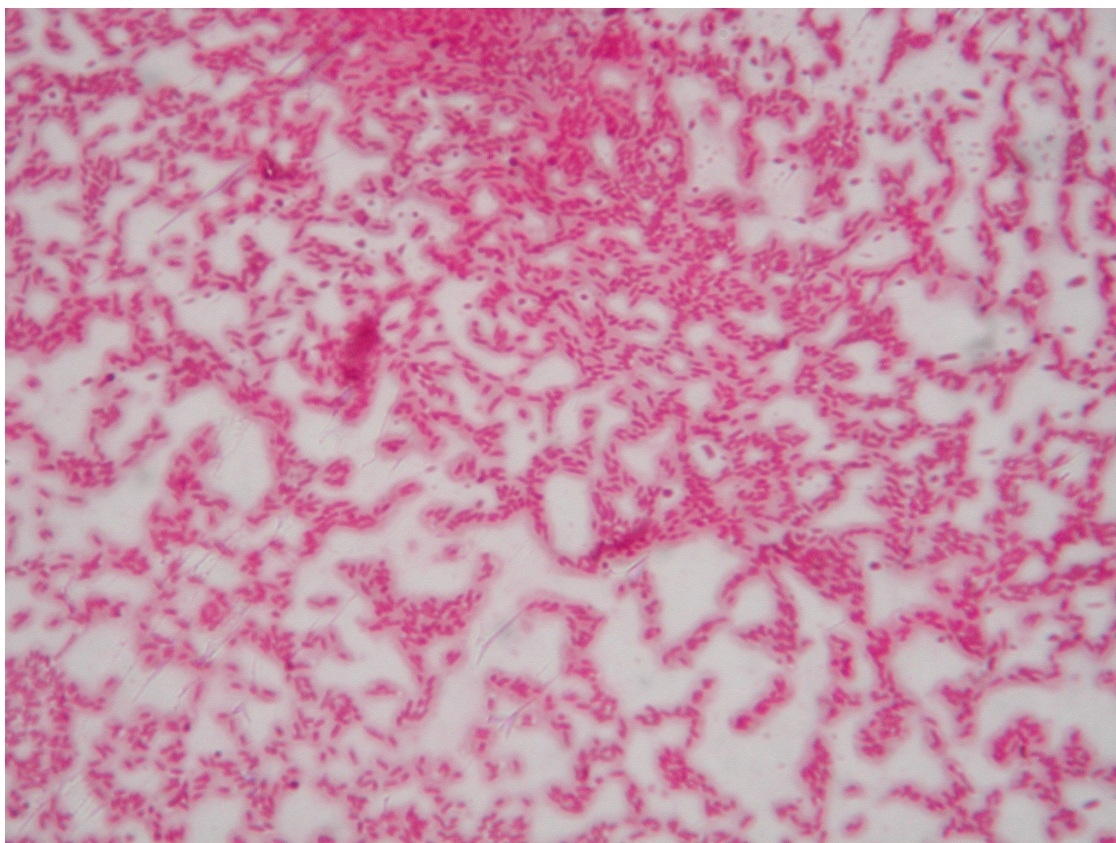
Obr. 9. Znázornění slizovitého charakteru extracelulárního polymeru negativním barvením

Pozitivní barvení

Při pozitivním barvení dochází k zabarvení kapsulí jednou barvou a druhou odlišnou barvou se zabarví zbytek buňky. Häusler [10] a Betina [11] uvádějí několik možných postupů a typů barvení. Každý typ barvení má svůj způsob provedení a také jiné znázornění pouzder a buněk. Jedno z nejznámějších barvení je barvení dle **Hisse**:

Jedná se o jednu z nejvhodnějších metod pozitivního barvení kapsulí. Můžeme sami u určitého druhu bakterií i experimentovat s podmínkami barvení, zejména s diferencováním stupně zabarvení při použití CuSO_4 . U patogenních bakterií je nejvhodnější pěstovat bakterie přímo v séru. Pokud to není z různých důvodů možné, připravíme v séru alespoň bakteriální suspenzi a zhotovíme nátěr. Preparát usušíme na vzduchu

a fixujeme plamenem. Potom přelijeme jedním ze dvou barvicích roztoků – 0,15-0,30% vodný roztok rosanilinu (bazický fuchsin); 0,05-0,10% vodný roztok crystalviolet (gentianviolet) a zahříváme nad plamenem, dokud nevystupují z preparátu páry. Operace trvá několik sekund. Potom opláchneme přímo 20% CuSO_4 , osušíme a pozorujeme. Na správně obarveném preparátu vidíme světle modré nebo světle růžové kapsule a tmavě purpurové buňky (viz. obr. 10) [10].



Obr. 10. Znázornění pouzdra barvením dle Hisse

2.2 Barvení intracelulárních polymerů

U intracelulárních polymerů se provádí pouze pozitivní barvení. Z důvodů zaměření bakalářské práce je zde uvedeno jen barevné zobrazení anorganických polyfosfátů a PHB.

Polyfosfáty

Polyfosfáty jsou rezervní látky mikroorganismů. Barví se bazickými modrými barvivou fialově - odtud pochází jejich starší název metachromatická granula. Toto pojmenování bylo odvozeno od vlastností několika měsíců až 1 rok starého roztoku metylenové modři, tzv. polychromní metylenové modři. Ta má právě k těmto polyfosfátovým granulím velkou afinitu a zabarvuje je fialově. Polyfosfátové granule jsou přítomny u četných specifických vodních mikroorganismů, pro něž jsou důležitým taxonomickým znakem [10].

Häusler [10] uvádí ve své knize několik různých metod zobrazování těchto polyfosfátů. Tato barvení mají společný znak ve zbarvení granulí - jsou zabarveny buď červeně nebo modře a jsou snadno mikroskopicky detekovatelné.

Jedním z nejznámějších barvení polyfosfátů je tzv. **Neisserovo** barevní, kde aktivní reagentem je kationická methylenová modř, která selektivně vázaná na anionická místa polymerního polyfosfátového řetězce dává typickou barevnou reakci. Uvedený postup slouží k detekci, tzv. poly-P bakterií, přítomných v některých typech aktivovaných kalů, a rovněž se používá při identifikaci vláknitých mikroorganismů.

Příprava barvicích roztoků:

Barvicí roztoky je třeba připravovat čerstvé po 3 - 6 měsících a před použitím zfiltrovat.

Roztok 1 - A: Methylenová modř – 0,1g; 95% ethanol – 5 ml; ledová kyselina octová – 5 ml a destilovaná voda – 100 ml

B: Krystalová violet (10% roztok v 95% ethanolu) – 3,3 ml; 95% ethanol – 3,7 ml a destilovaná voda – 100 ml

Před použitím připravujeme vždy čerstvý roztok smícháním 2 dílů roztoku A a 1 dílu roztoku B.

Roztok 2: Bismarckova hněď (1% vodný roztok) – 33,3 ml nebo Chrysoidin Y (1% vodný roztok) a destilovaná voda – 66,7 ml

Příprava barveného preparátu:

Na podložní mikroskopické sklo připravíme roztěr vzorku a necháme na vzduchu dobře zaschnout (nefixujeme teplem). Roztěr převrstvíme roztokem 1 (30 sekund), opláchneme vodou, převrstvíme roztokem 2 (1 minuta), dobře opláchneme vodou a necháme zaschnout na vzduchu. Mikroskopujeme bez krycího sklíčka s přidavkem imersního oleje v přímém světle při zvětšení 1000x [12].

V dobře zhotoveném preparátu lze u velkých bakteriálních buněk pozorovat fialově zbarvená granula (viz. obr. 11), v případě menších buněk jsou obvykle zbarveny celé.

PHB

Pro samotné zobrazení PHB je uvedeno pouze barvení **Sudanskou černí**. Toto barvení umožňuje znázornění zásobního polymeru PHB, který by jinak nebyl viditelný světelným mikroskopem. Přítomnost či absence těchto granulí je indikátorem pro rozdělení a identifikaci bakterií přítomných v AK. Nutno dodat, že Sudanská čern však není specifická pro PHB, ale barví všechny lipofilní složky v buňkách.

Příprava barvicích roztoků:

Roztok 1: Sudanská čern (IV) – 0,3g a 60% ethanol – 100 ml

Roztok 2: Safranin O – 0,5g rozpuštěný ve 100 ml destilované vody

Příprava barveného preparátu:

Na podložní mikroskopické sklo připravíme roztěr vzorku a necháme na vzduchu dobře zaschnout (nefixujeme teplem). Roztěr převrstvíme roztokem 1 (10 minut), necháme zaschnout, opláchneme vodou, převrstvíme roztokem 2 (10 sekund), dobře opláchneme vodou a necháme zaschnout na vzduchu. Mikroskopujeme bez krycího sklíčka s přidavkem imersního oleje v přímém světle při zvětšení 400-1000x. Modré až černé granule PHB (lipofilní složka) jsou znázorněny v bezbarvém nebo lehce zabarveném pozadí [12].



Obr. 11. Znázornění polyfosfátových granulí Neisserovým barvením (bakterie rodu *Spirillum*)

Souběžné barvení PHB a polyfosfátů

Protože Sudanská čern není specifická pro barvení PHB a v některých bakteriálních buňkách mohou být přítomny také poly-P granule, byl nalezen nový způsob zobrazení poly-P granulí a PHB vedle sebe. Používá se zde methylenová modř na stanovení poly-P granulí a Nilská modř A jako specifické barvivo pro PHB. Metoda je však náročnější a vyžaduje použití fluorescenční mikroskopie.

Příprava barvicích roztoků:

Roztok 1: 1% vodný roztok Nilské modři A

Roztok 2: 8% vodný roztok kyseliny octové

Roztok3: Methylenová modř – 0,1g; 95% ethanol – 5 ml; ledová kyselina octová – 5 ml
a destilovaná voda – 100 ml

Roztok 4: jód – 1g ; jodid draselný – 2g a destilovaná voda – 300 ml

Příprava barveného preparátu:

Na podložní mikroskopické sklo připravíme roztěr vzorku a zafixujeme teplem. Roztěr převrstvíme roztokem 1 při 55°C (10 minut) a poté 1 minutu umýváme roztokem 2. Poté převrstvíme roztokem 3 (1 minuta) a nakonec opláchneme roztokem 4. Nabarvený vzorek poté překryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem. PHB se jeví jako světle fluoreskující granule. Poly-P granule je možné vidět ve světlém poli při mikroskopii v přímém světle jako černé granule [12].

Tato metoda je výhodná pro specifitější stanovení PHB než pomocí Sudanské černi. U této metody mohou být obě látky (poly-P granule a PHB granule) současně znázorněny v buňkách kalu [12].

3 AKTIVOVANÝ KAL – JEHO SLOŽENÍ A VZNIK

Jak již bylo naznačeno v úvodu, je tato práce zaměřena na biologické čištění odpadních vod (v širším slova smyslu). Jde o procesy, které v dnešní čistírenské oblasti dominují díky své ekonomické nenáročnosti a příbuznosti přirozeným samočisticím procesům. Základním principem jsou procesy probíhající na úrovni mikrobiálních buněk, přičemž převládajícími mikroorganismy jsou bakterie. V těchto procesech se ovšem vyskytují mikroorganismy všech úrovní a druhů [13,14].

Směsná kultura bakterií se nazývá aktivovaný kal (AK). Na rozdíl od čistých kultur, ve kterých jsou jednotlivé bakterie většinou volně pohyblivé, se bakterie v AK vyskytují převážně ve formě vloček. Kromě různých druhů bakterií mohou být v AK přítomny v menším množství také houby, plísňe a kvasinky. V menší míře jsou také přítomny vláknité mikroorganismy, které když z jakýchkoliv důvodů převládnu, způsobují značné technologické problémy, projevující se špatnými usazovacími a zahušťovacími vlastnostmi kalu. Z vyšších organismů jsou pravidelnou součástí AK různá protozoa, vířníci, hlístice aj. [13,15]. Prvoci slouží často jako indikátorové organismy pro odhad stavu AK. Názory na jejich funkci v AK se postupem doby měnily. Nakonec bylo experimentálně prokázáno, že výrazně snižují obsah volně pohyblivých bakterií ve vyčištěné vodě a tím přispívají k jejich vyčištění. V AK jsou přítomny proto, že v něm nacházejí bohatou potravu [15].

Kvalitativní i kvantitativní složení AK závisí hlavně na složení substrátu, na němž byl daný kal vypěstován, a na hodnotách technologických parametrů během kultivace (na době zdržení, zatížení a stáří kalu). AK se liší od většiny čistých kultur mikroorganismů také tím, že je schopen se oddělovat od kapalné fáze prostou sedimentací. Dobrá flokulace a sedimentace vloček kalu je jednou z nejcennějších vlastností této přirozené směsné kultury. Tato technologicky důležitá vlastnost je výslednicí mnoha faktorů daných charakterem čištěné odpadní vody a technologickými parametry procesu [15].

Tvorba vloček není bezpodmínečně nutná pro účinné odstranění rozpuštěných látek z čištěné odpadní vody. Je však naprosto nutná pro získání čirého odtoku vyčištěné odpadní vody a dostatečně zahuštěného recirkulovaného kalu [15].

Mechanismy bioflokulace (vyvločkování) a faktory, které ji ovlivňují, se zabývalo mnoho autorů. Někteří uvádí, že bioflokulace je způsobena snížením elektrického náboje pod kritickou hladinu, čímž je umožněno buňkám se spojovat během pohybu. V současné době je nejpropracovanější teorie spojování buněk pomocí extracelulárních polymerů. Přitom se

nevylučuje ani určitý význam snížení povrchového náboje. Tato teorie předpokládá, že bioflokulace je následek interakce mezi přirozeně produkovánými vysokomolekulárními polymery a bakteriálními buňkami takovým způsobem, že polysacharidy (popřípadě bílkoviny) spojují a vážou jednotlivé buňky do agregátů - vloček, schopných se oddělovat od kapalně fáze sedimentací [15].

Bylo zjištěno, že bakterie žijící v přirozeném prostředí, a tedy i v aktivačních nádržích, mají na svém povrchu velké množství ven vyčnívajících vzájemně propletených polysacharidových nebo glykoproteinových vláken vytvářejících kolem buňky nebo skupiny buněk obal. Tento obal má v AK významnou roli při tvorbě vloček i zoogleí a tím i při bioflokulaci, neboť bakteriální buňka se poutá na jinou buňku díky interakci svých polysacharidových vláken s polysacharidovými vlákny druhé buňky [15]. Také jednou z příčin tvorby vloček kalu je to, že extracelulární polymer polysacharidu má vysokou afinitu k vodě, kdy některé z terminálních skupin dávají předpoklad pro vznik vodíkových můstků [13].

Jak již bylo několikrát uvedeno, bakterie v AK produkují na povrchu svých buněk extracelulární polymery ať již ve formě kapsulí či slizů. Nezáleží až tak na charakteru vyprodukovaného polysacharidu, ale hlavně na jeho nezastupitelných vlastnostech při tvorbě vloček. Kdyby nedocházelo k tomuto ději (tvorbě vloček), nedocházelo by ani k samovolné sedimentaci AK a tedy k bezproblémovému vyčištění odpadní vody. Nastaly by tak obrovské technologické problémy, které by určitě měly nemalý ekonomický dopad na provoz ČOV. Přirozená schopnost produkce extracelulárních bakteriálních polymerů je hojně a s oblibou využívána. I přes to se objevují snahy o další možné způsoby čištění odpadních vod, avšak zatím bez významných úspěchů.

4 VISKOZNÍ BYTNĚNÍ AKTIVOVANÉHO KALU

Extracelulární polymery mají významnou schopnost tvorby vloček, jak již bylo uvedeno. Na druhé straně dojde-li však k nadměrné produkci těchto látek, má to negativní dopad. Zvýšený obsah extracelulárních polymerů má za následek horší sedimentační vlastnosti AK kultivovaného kontinuálně, neboť v sobě tyto polysacharidy vážou značné množství vody a jsou viskosní. AK tak získá charakter „želé“, špatně se zahušťuje a odvodňuje a při provzdušňování silně pění [16].

Většinou se usazovací a zahušťovací vlastnosti AK posuzují dle kalového indexu (KI), tj. objem v ml, který zaujímá 1g sušiny kalu po půlhodinové sedimentaci. Dle velikosti KI lze kaly rozdělit do tří kategorií:

normální kal – $KI < 100$ ml/g

lehký kal – $KI = 100 - 200$ ml/g

zbytnělý kal – $KI > 200$ ml/g

Je tedy zřejmé, že čím vyšší KI, tím je rychlost sedimentace kalu nižší [15]. V praxi se hodnoty KI zjišťují zejména v případech vláknitého bytnění, nicméně ke zvyšování KI může docházet i v případech viskosního bytnění.

Příčiny nadměrné tvorby extracelulárních polymerů nejsou dosud jednoznačně objasněné. Wanner a kolektiv [16] se domnívají, že je tento děj způsoben nedostatkem některých nutrientů, působením některých toxických látek či příliš velkým koncentračním gradientem v aktivačním systému. Naproti tomu Seviour a Blackall [12] připisují tuto negativní vlastnost odpadním vodám v čistírnách průmyslových odpadních vod s nedostatkem dusíku či fosforu.

Tento negativní děj nebyl doposud do detailu prozkoumán a popsán. Neexistuje tedy mnoho publikací, které by popisovaly důvody vzniku tohoto děje (vlastnosti).

Tímto problémem jsem se proto částečně zabývala a výsledky uvedla v literatuře [17]. Na ČOV ve Fryštáku byl objeven výskyt viskosního bytnění AK. Z odebraného vzorku bylo izolováno 11 kultur různého charakteru (G+, G-, tyčinky i koky). Tyto kultury byly kultivovány na pevných agarech, a barvicími metodami byla u 9-ti kultur ověřena tvorba extracelulárních polymerů a pouze u dvou kultur byla tato schopnost vyvrácena. Také byl prokázán charakter těchto polymerů. Z oněch 9-ti kultur mělo 5 pouzderný charakter polymeru a 4 slizovitý charakter. Bylo také zjištěno, že 2 druhy bakterií potřebují k tvorbě

těchto látek přítomnost sacharidů a zbývajících 7 druhů produkovaly extracelulární polymery bez ohledu na přítomnost sacharidů. Všechny kultury, s prokázanou tvorbou polysacharidů, byly naočkovány do tekutých živných médií a byl pozorován jejich růst. Při mikroskopickém pozorování bylo zjištěno, že pouze jedna kultura, identifikovaná jako *Agrobacterium radiobacter*, byla schopná tvořit extracelulární polymery za těchto podmínek a byla tedy pravděpodobně původcem viskosního bytnění.

Lze však soudit, že se na viskosním bytnění kalu mohly podílet i ostatní kultury, pokud by pro ně jako podklad mohly sloužit vločky AK.

Jak již bylo řečeno, viskosní bytnění není do dnešní doby zcela prozkoumáno, a protože je takto zbytnělý AK špatně oddělitelný od čištěné vody a obaluje technologická zařízení a měřicí přístroje, je potřeba věnovat mu větší pozornost.

5 MIKROBIÁLNÍ ODSTRAŇOVÁNÍ FOSFORU

Přítomnost fosforu v odpadních vodách, převážně městských, je negativním jevem, neboť způsobuje tzv. eutrofizaci vod, tj. nadměrnou tvorbu sinic v nádržích nebo zelených rostlin na hladině vodních toků.

Z odpadních vod lze fosfor odstranit fyzikálně-chemickými metodami nebo metodami biologickými.

Fyzikálně-chemické metody jsou založeny na tvorbě nerozpustných fosforečnanů vápenatých, hlinitých a železitých [15]. Avšak určitou nevýhodou tohoto způsobu je potřeba dodání chemikálií, která je spojena se vznikem anorganických kalů a také s nutností zpracování těchto kalů.

Při biologickém čištění není potřeba dodávat do odpadní vody žádné chemikálie. Biologické odstraňování fosforu je založeno na přítomnosti určitých typů mikroorganismů, tzv. poly-P bakterií (PP-bakterií) v aktivovaném kalu, které mají schopnost ukládat do svých buněk polyfosfáty jako zásobu energie a fosforu. Jde o tzv. akumulaci (zakoncentrování) fosforu do kalů.

V praxi může docházet při biologickém odstraňování fosforu i k paralelnímu odstraňování fosfátů srážením. Odhaduje se, že v čistírnách s biologickým odstraňováním fosforu se srážení může podílet na výsledném efektu až jednou třetinou.

Samotný princip metody biologické je dvoustupňový. V prvním stupni je odpadní voda s obsahem organických látek a fosforu přiváděna do nádrže, kde je smíchána s vratným aktivovaným kalem a ponechána cca 1 hodinu v anaerobních podmínkách, tj. bez přítomnosti kyslíku. Za těchto podmínek dochází činností PP-bakterií k odstraňování určitých organických látek z vody. Tyto sloučeniny bakterie uloží jako rezervní látku do své vnitřní struktury ve formě PHB. energii potřebnou pro aktivní membránový transport do buněk bakterie získávají hydrolýzou akumulovaných polyfosfátů z předchozího cyklu čištění. Charakteristickým jevem využívaným ke kinetickému sledování tohoto procesu je vylučování orthofosfátů do okolní kapaliny [15,12].

Po této první fázi musí být směsná kultura kultivovaná po dostatečnou dobu v aerobních podmínkách (za přístupu kyslíku) - druhá fáze. V těchto podmínkách slouží buňkám nahromaděný polymer PHB (vzniklý v předešlém stupni) jako zdroj organického uhlíku pro syntézu buněčné hmoty PP-bakterií a zároveň jako zdroj energie pro syntézu polyfosfátů. PP bakterie zde využívají jak fosfáty uvolněné v anaerobních podmínkách, tak i fosfáty z odpadní vody. Naakumulované polyfosfáty jsou pak odstraňovány

s přebytným aktivovaným kalem. Část tohoto kalu je také dodávána ve formě vratného kalu do anaerobní nádrže, kde se již nahromaděné polyfosfáty využijí jako zdroj energie pro další syntézu PHB.

PP-bakteriím však do určité míry konkurují tzv. G bakterie, které v anaerobní části biologického odstraňování fosforu odebírají z odpadní vody také nižší mastné kyseliny, avšak ne pro syntézu PHB, ale na tvorbu glykogenu. Tyto bakterie pak již ale v aerobní části neodebírají z odpadní vody fosfor. Negativně tedy ovlivňují odstraňování fosforu z odpadních vod tím, že snižují množství přítomných mastných kyselin v odpadní vodě PP-bakteriím, a ty pak mají menší množství oněch organických látek na tvorbu PHB.

Souhrnně lze tedy říci, že v aktivační nádrži pro zvýšené biologické odstraňování fosforu musí být splněny následující podmínky:

1. V systému musí být vhodně dimenzována anaerobní zóna, ve které dochází k tvorbě nižších mastných kyselin, depolymeraci polyfosfátů na orthofosfáty a syntéze zásobní PHB v buňkách PP-bakterií.
2. Za anaerobní zónou musí následovat aerobní zóna, ve které dochází v buňkách PP-bakterií k depolymeraci a oxidaci PHB a k tvorbě polyfosfátů.
3. Fosfor se ze systému musí odvádět s přebytným kalem z aerobní zóny [15,12].

Z předchozího popisu metody tedy vyplývá, že při biologickém odstraňování fosforu je nezbytně nutná přítomnost intracelulárních zásobních biopolymerů – PHB v PP-bakteriích. Nejen protože jsou tyto sloučeniny zdrojem energie a uhlíku, ale také díky svým specifickým vlastnostem mohou zaujímat při biologickém odstraňování fosforu důležitou a nenahraditelnou roli.

ZÁVĚR

Tato práce se zabývá určitými typy bakteriálních polymerů a jejich významem pro čištění odpadních vod.

Bakteriální buňky obsahují velké množství různorodých polymerů. Tyto polymery se dají rozdělit do několika skupin podle různých hledisek. Jedno z nich je dělení polymerů z hlediska jejich umístění v buňkách, tedy na polymery extracelulární a intracelulární (polymery na povrchu a uvnitř buňky). Vnější polymery jsou převážně složeny z polysacharidů a méně často ze sloučenin bílkovinných. Tyto polymery mohou podle své struktury zaujímat buď pouzderný nebo slizový charakter. Polymery na povrchu buněk mají několik funkcí – ochrannou, adhezní a někdy i zásobní. Polymery uvnitř buňky mají většinou tvar granulí a jejich hlavním úkolem je zásoba energie a uhlíku. Mezi zástupce těchto intracelulárních polymerů patří glykogen, kyselina poly- β -hydroxymáselná a polyfosfáty. Extra i intracelulární polymery lze v buňkách znázornit a tím i dokázat řadou barvicích postupů připravených vzorků bakterií.

Bakteriální buňky se nachází v mnoha různých oblastech životního prostředí. Ve velké míře se vyskytují v aktivovaném kalu v čistírnách odpadních vod, kde slouží jako velmi dobří rozkladači nežádoucích organických látek v biologických částech čistíren. Přítomnost těchto bakterií je velmi důležitá a hlavně jejich schopnost tvořit vločky je klíčová pro technologický průběh procesu, především pro dobrou oddělitelnost biomasy (kalu) od čištěné vody. Zmíněná schopnost tvořit vločky je ve významné míře možná díky schopnosti některých druhů bakterií tvořit extracelulární polymery. Tyto mají funkci tmelu, neboť slepují buňky bakterií a dalších částí odpadních vod do již zmíněných vloček.

Na druhou stranu, v některých fázích čištění, může docházet k nadměrné tvorbě extracelulárních polymerů a tím ke značným technologickým obtížím. Jde o tzv. viskózní bytnění, při kterém dochází ke „slizovatění“ aktivovaného kalu. Tento kal pak způsobuje značné technologické problémy, neboť může docházet ke špatnému oddělování aktivovaného kalu od čištěné vody. Bohužel tento děj nebyl do dnešní doby prozkoumán natolik, aby technologové věděli, co jej způsobuje a jak mu předcházet.

Kromě těchto pochodů může také docházet k odstraňování fosforu z odpadních vod. Tento zdoluhavý a náročný proces probíhá také v biologických částech čistíren. Na tomto ději mají hlavní zásluhu některé bakterie a to zvláště přítomnost jejich zásobních intracelulárních polymerů, konkrétně PHB a polyfosfátů. Podstatou tohoto procesu je

zvýšená akumulace fosforu ve formě polyfosfátů v buňkách zmíněných bakterií. Současně tak tím dochází i k odstraňování fosforu z čištěné vody. PHB má přitom funkci zásobní a umožňuje tak bakteriálním buňkám energeticky náročnou akumulaci fosforu.

Je tedy patrné, že mikroorganismy a převážně bakterie jsou velmi dobrými pomocníky v technologii čištění odpadních vod, k čemuž výrazně přispívá jejich schopnost tvorby některých polymerů. Tvorba bakteriálních polymerů je velmi pozitivním dějem v různých procesech, avšak může docházet také i k nadměrné tvorbě těchto látek. Je tedy potřebné neustále se věnovat a studovat chování bakteriálních buněk.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1) KLÁSEK, Antonín: Nauka o polymerech II: Biopolymery. 1. vyd., Praha: SNTL, 1980. 115 s.
- 2) ROSYPAL, Stanislav: Obecná biologie. 1. vyd., Praha: SPN, 1981. 752 s.
- 3) VODRÁŽKA, Zdeněk: Biochemie 1. 1. vyd., Praha: Academia, 1992. 180 s. ISBN: 80-200-9439-4.
- 4) CUDLÍN, Josef: Vybrané metody v mikrobiologii. 1. vyd., Praha: Academia, 1981. 492 s.
- 5) OTTOVÁ, Vlasta a kol.: Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody. 2. přeprac. vyd., Praha: VŠCHT, 1991. 120 s. ISBN: 80-7080-136-0.
- 6) SUTHERLAND, Ian W.: Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. International Dairy Journal. Elsevier, 2001. roč. 11, s. 663-674.
- 7) KLOUDA, Pavel: Základy biochemie. 1. vyd., Ostrava: Pavel Klouda, 2000. 155 s. ISBN: 80-86369-00-5.
- 8) DOSTÁL, J., KAPLANA, P. a kol.: Lékařská biochemie II. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2003. 224 s. ISBN: 80-210-2731-2.
- 9) BĚHAL, Vladislav. Odborné příspěvky: Polyhydroxyalkonáty-biodegradabilní plasty. Biopropect 1998, roč. 8, č. 1, s. 1-3.
- 10) HÄUSLER, Jiří: Mikrobiologické metody kontroly jakosti vod II. 1. vyd., Praha: BRÁZDA, 1991. 296 s. ISBN: 80-85368-01-3.
- 11) BETINA, Vladimír a kol.: Mikrobiologické laboratorné metody. 1. vyd., Bratislava: ALFA, 1988. 544 s.
- 12) SEVIOUR, R. J., BLACKALL, L. L.: The microbiology of activated sludge. 1. st., Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1999. 424 s. ISBN: 0-412-79380-6.
- 13) KUPEC, Jan: Zpracování odpadních vod a čistírenských kalů. 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, 2002. 123 s. ISBN: 80-7318-058-8.

- 14) RŮŽIČKA, Jan: Mikrobiologie pro technology životního prostředí. 1. vyd., Zlín: VUT v Brně, FT ve Zlíně, 1999. 124 s. ISBN: 80-214-1374-3.
- 15) CHUDOBA, Jan a kol.: Biologické čištění odpadních vod. 1. vyd. Praha: SNTL, 1991. 465 s. ISBN: 80-03-00611-2.
- 16) WANNER, Jiří a kol.: Biologická kontrola čištění odpadních vod. 1. vyd. Praha: Asociace čistírenských expertů ČR, 2000. 78 s. ISBN: 80-238-5456-9.
- 17) BAROŠOVÁ, Eva: Růstové a metabolické vlastnosti vybraných mikroorganismů izolovaných z aktivovaného kalu s viskózním bytněním. Studentská vědecká práce. Zlín: UTB ve Zlíně, 2004. 25 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	- aktivovaný kal
AMK	- aminokyseliny
ČOV	- čistírna(y) odpadních vod
G+	- gram pozitivní
G-	- gram negativní
KI	- kalový index
PHAs	- polyhydroxyalkanoáty
PHB	- kyselina poly- β -hydroxymáselná, poly- β -hydroxybutyrát
PP-bakterie	- poly-P bakterie
ŽP	- životní prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 α -(1→4) glykosidická vazba mezi glukosovými jednotkami [1]	12
Obr. 2 Znázornění peptidické vazby mezi aminokyselinami [1]	124
Obr. 3 N-acetylglukosamin[8]	15
Obr. 4 β -N-acetylmurámová kyselina [8]	125
Obr. 5 Glykosidická vazba β -(1→4) mezi N-acetylglukosaminem a kys. N-acetylmurámovou [8]	16
Obr. 6 Obecná struktura PHAs + některé typy [9]	16
Obr. 7 Vznik anorganických polyfosfátů působením ATP [2]	17
Obr. 8 Znázornění bakteriálního pouzdra negativním barvením – nigrosinem	19
Obr. 9 Znázornění slizovitého charakteru extracelulárního polymeru negativním barvením	19
Obr. 10 Znázornění pouzdra barvením dle Hisse	20
Obr. 11 Znázornění polyfosfátových granulí Neisserovým barvením (bakterie rodu <i>Spirillum</i>)	23

EVIDENČNÍ LIST BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Místo uložení práce: Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Autor práce: Barošová Eva
Název práce česky: Vybrané bakteriální polymery a jejich význam pro čištění odpadních vod anglicky: The importance of some bacterial polymers for the treatment of waste water
Vedoucí práce: RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
Vysoká škola (název a adresa): Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Mostní 5139, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení práce: 2005
Počet stran, obrázků, tabulek: 37 stran, 11 obrázků
Předmětová hesla: česky: bakteriální polymery, odpadní voda, aktivovaný kal, viskózní bytnění, anglicky: bacterial polymers, waste water, activated sludge, slime bulking,
Souhrn česky: Tato práce se zabývá bakteriálními polymery extracelulárními a intracelulárními, jejich složením a základními vlastnostmi a dále možností znázornění obou typů těchto polymerů. Tato práce také obsahuje význam extracelulárních polymerů pro tvorbu vloček aktivovaného kalu a význam nadměrné tvorby kapsulárních polymerů při viskózním bytnění aktivovaného kalu. Je zde také zmínka o významu zásobních intracelulárních polymerů pro postupy mikrobiálního odstraňování fosforu z odpadních vod.
anglicky: This work deals with extracellular and intracellular bacterial polymers. Their composition, basic properties and possibilities to stain both types of polymer are noted. The work also describes the importance of extracellular polymers for flocks formation in activated sludge and the importance of excessive creation of capsular polymers during viscose bulking of activated sludge. Also the importance of storage intracellular polymers for the process of microbial phosphorus removal from waste water is mentioned here.