

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOSORPČNÍ SCHOPNOSTI TERMOFILNÍCH KULTUR

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

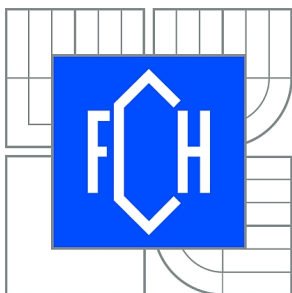
AUTHOR

Bc. MIROSLAVA ZICHOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

BIOSORPČNÍ SCHOPNOSTI TERMOFILNÍCH KULTUR

BIOSORPTION ABILITY OF THERMOPHILIC CULTURES

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. MIROSLAVA ZICHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0438/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Miroslava Zichová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

Název diplomové práce:

Biosorpční schopnosti termofilních kultur

Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) provedení několika kultur termofilních bakterií
- 3) vyhodnocení biosorpčních parametrů a vybraných bioinženýrských charakteristik
- 4) diskuze nad výsledky

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Miroslava Zichová
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce je studium biosorpce těžkých kovů mědi, olova a zinku termofilními bakteriemi rodu *Geobacillus* – *G. thermodenitrificans* CCM 2566 a *G. thermocatenulatus* CCM 2809. Biosorpce byla prováděna ve vsádkovém uspořádání s mícháním pro každý kov zvlášť. Zkoumán byl vliv pH, koncentrace biomasy a počáteční koncentrace kovu na sorpční kapacitu bakterií. U obou bakterií bylo pro biosorpci měďnatých iontů optimální pH 5, pro biosorpci olovnatých iontů pH 4 a zinečnatých pH 5. Sorpční kapacita obou bakterií byla vyšší při nižších koncentracích biomasy a zvyšovala se s rostoucí počáteční koncentrací kovu. Porovnáním sorpčních kapacit bylo zjištěno, že bakterie *G. thermocatenulatus* má větší sorpční potenciál než *G. thermodenitrificans*.

ABSTRACT

The aim of this master's thesis is to study the biosorption of heavy metals copper, lead and zinc on thermophilic bacteria of the genus *Geobacillus* – *G. thermodenitrificans* CCM 2566 and *G. thermocatenulatus* CCM 2809. Biosorption was carried out in a batch stirred system for each metal separately. The influence of pH, biomass concentration and initial metal concentration on sorption capacity of bacteria was investigated. For both bacteria the optimum biosorption pH values for copper, lead and zinc were 5; 4 and 5, respectively. Sorption capacity of both bacteria was higher at lower concentrations of biomass and increased with increasing initial metal concentration. The confrontation of sorption capacities showed that the bacterium *G. thermocatenulatus* has greater sorption potential than *G. thermodenitrificans*.

KLÍČOVÁ SLOVA

biosorpce, těžké kovy, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermocatenulatus*

KEYWORDS

biosorption, heavy metals, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus thermocatenulatus*

ZICHOVÁ, M. *Biosorpční schopnosti termofilních kultur*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 65 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Děkuji svému vedoucímu Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. a Ing. Petře Šupinové za všestrannou pomoc při realizaci této práce.

OBSAH

ÚVOD.....	8
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	9
1.1 Biosorpce.....	9
1.1.1 Mechanismy biosorpce.....	12
1.1.1.1 Iontová výměna a adsorpce	12
1.1.1.2 Tvorba komplexů, chelatace	13
1.1.2 Faktory ovlivňující biosorpci	13
1.1.2.1 pH.....	13
1.1.2.2 Teplota.....	14
1.1.2.3 Koncentrace a druh biomasy	14
1.1.2.4 Přítomnost dalších kovů	14
1.1.3 Rovnováha biosorpčního procesu	15
1.1.3.1 Sorpční modely	15
1.2 Těžké kovy	17
1.2.1 Zdroje znečištění vod těžkými kovy	17
1.2.1.1 Těžební průmysl a zpracování rud	17
1.2.1.2 Povrchové úpravy.....	18
1.2.1.3 Kožedělný průmysl	18
1.2.1.4 Spalování fosilních paliv.....	18
1.2.2 Charakteristiky vybraných těžkých kovů	19
1.2.2.1 Olovo	19
1.2.2.2 Měď	19
1.2.2.3 Zinek.....	19
1.3 Termofilní mikroorganismy	20
1.3.1 Obecná charakteristika	20
1.3.2 Výskyt	21
1.4 Přehled termofilních mikroorganismů	21
1.4.1 Archea	21
1.4.1.1 Hypertermofilní archea	21
1.4.1.2 Archea bez buněčné stěny	22
1.4.2 Termofilní bakterie.....	22
1.4.2.1 Rod Geobacillus	22
1.4.2.2 Rod Thermus	24
1.4.2.3 Rod Clostridium	24
1.4.2.4 Aktinomycety	24
1.4.3 Termofilní houby.....	25
1.5 Využití termofilních mikroorganismů.....	25
1.5.1 Kompostování	25
1.5.1.1 Průběh kompostování.....	25
1.5.1.2 Mikrobiální zastoupení.....	26
1.5.1.3 Faktory ovlivňující kompostování	27
1.5.2 Čištění odpadních vod.....	27

1.5.2.1	Termofilní anaerobní čistírenské procesy	27
1.5.2.2	Termofilní aerobní čištění odpadních vod	28
1.5.2.3	Biosorpce těžkých kovů termofilními mikroorganismy.....	29
1.6	Analytické metody	30
1.6.1	Komplexometrie.....	30
1.6.1.1	Stanovení mědi	30
1.6.1.2	Stanovení olova	31
1.6.1.3	Stanovení zinku	31
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
2.1	Cíl práce	32
2.2	Použitý materiál, chemikálie a přístroje	32
2.2.1	Bakteriální kmeny	32
2.2.2	Chemikálie	32
2.2.2.1	Pro přípravu kultivačního média	32
2.2.2.2	Pro přípravu roztoků těžkých kovů	32
2.2.2.3	Pro komplexometrické stanovení	32
2.2.3	Přístroje	33
2.3	Použité metody	33
2.3.1	Kultivace bakterií	33
2.3.1.1	Kultivační médium	33
2.3.1.2	Kultivační podmínky	33
2.3.2	Stanovení růstových křivek	33
2.3.3	Kultivace biomasy ve fermentoru	33
2.3.3.1	Kultivace na odpadní syrovátce	34
2.3.4	Příprava biomasy na biosorpci	34
2.3.5	Příprava roztoků těžkých kovů	34
2.3.6	Biosorpční experimenty	34
2.3.6.1	Vliv pH	34
2.3.6.2	Vliv koncentrace biomasy	35
2.3.6.3	Vliv kultivace na syrovátce	35
2.3.6.4	Vliv koncentrace těžkých kovů	35
2.3.6.5	Použité výpočetní vztahy	35
2.3.7	Chelatometrické stanovení koncentrace těžkých kovů	36
2.3.7.1	Stanovení mědi	36
2.3.7.2	Stanovení olova	36
2.3.7.3	Stanovení zinku	36
2.3.7.4	Použité výpočetní vztahy	36
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
3.1	Růstové křivky	38
3.2	Optimalizace komplexometrických titrací	38
3.3	Biosorpční experimenty	39
3.3.1	Vliv pH	39
3.3.2	Vliv koncentrace biomasy	41
3.3.3	Vliv kultivace na syrovátce	46
3.3.4	Vliv koncentrace těžkých kovů	50

ZÁVĚR.....	54
SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	55
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	59
SEZNAM PŘÍLOH	60
PŘÍLOHY	61

ÚVOD

Každým rokem je různými průmyslovými odvětvími vyprodukováno obrovské množství odpadů, které obsahují těžké kovy. Ty se dostávají do životního prostředí, zejména vod, kde perzistují a působí toxicky. Proto je třeba tyto odpady před vypuštěním do životního prostředí těžkých kovů zbavit. Za tímto účelem bylo zavedeno několik technologií, převážně fyzikálních a chemických postupů, které se běžně používají ve velkém měřítku. Tyto konvenční metody jsou však značně drahé a v případě nízkých koncentrací kovů nejsou příliš efektivní. Velkým problémem je také z ekologického hlediska nepříznivý vznik odpadního toxického kalu, který je třeba buď uskladnit nebo zlikvidovat, což představuje další náklady [2].

Pozornost je proto směřována k hledání jednoduché, efektivní, levné a ekologické metody. Takovou metodou se zdá být biosorpce, která je založena na schopnosti různých biologických materiálů vázat kovy na svou buněčnou stěnu. Biosorpce je pasivní, není závislá na metabolismu buněk, a může být proto uskutečňována inaktivovanou či neživou biomasou. To je také jedna z výhod, protože odpadá nutnost udržovat podmínky pro růst [3].

Z hlediska biosorpčních schopností bylo testováno mnoho druhů biomas, vhodné biosorbenty s vysokými sorpčními potenciály byly nalezeny zejména mezi řasami, houbami, kvasinkami i bakteriemi. Co se týče bakterií, většina studií proběhla hlavně s mezofilními druhy, pouze několik výsledků bylo publikováno o biosorpčních schopnostech termofilních druhů. Termofilní mikroorganismy rostou při teplotách vyšších než 45 °C, k přežití v takových podmínkách jsou různě adaptovány, mimo jiné také zvýšeným obsahem fosfolipidů v buňce. Některá termální prostředí také často mívají vyšší koncentrace rozpuštěných kovů. Vlivem těchto faktorů mohou mít buněčnou stěnu různě uzpůsobenou, a proto i biosorpce těmito mikroorganismy se může kvantitativně i kvalitativně lišit od biosorpce mezofilními mikroorganismy [48, 49].

Cílem této práce je tedy přispět k rozšíření poznatků týkajících se biosorpčních schopností termofilních mikroorganismů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Biosorpce

Znečištění vod těžkými kovy a možné způsoby nápravy jsou předmětem zájmu již několik desetiletí. Těžké kovy se dnes běžně odstraňují fyzikálními a chemickými způsoby, mezi nejčastěji používané patří:

- chemické srážení, které je založeno na vzniku nerozpustných sloučenin vlivem koagulantů, které jsou následně odfiltrovány; je to sice levný a jednoduchý postup, ale vzniká při něm velké množství toxického odpadu,
- adsorpce na běžné sorbenty jako je aktivní uhlí,
- iontová výměna, kde kovové ionty jsou nahrazeny méně nebezpečnými ionty z pryskyřic; je to efektivní metoda, ale poměrně drahá,
- chemická oxidace a redukce, při které vznikají nerozpustné oxidy nebo kovy,
- mikro/nano/ultra filtrace a reverzní osmóza, kde jsou kovy separovány pod tlakem přes membránu (jednotlivé metody se liší ve velikosti pórů); jsou to drahé metody,
- elektrochemické čištění, velmi drahá technologie, která se hodí jen pro vysoké koncentrace kovů [1].

Tyto postupy však nejsou efektivní při odstraňování kovů z velmi zředěných roztoků a navíc při nich vzniká sekundární odpad, který je nutné dále zpracovat nebo uskladnit [2].

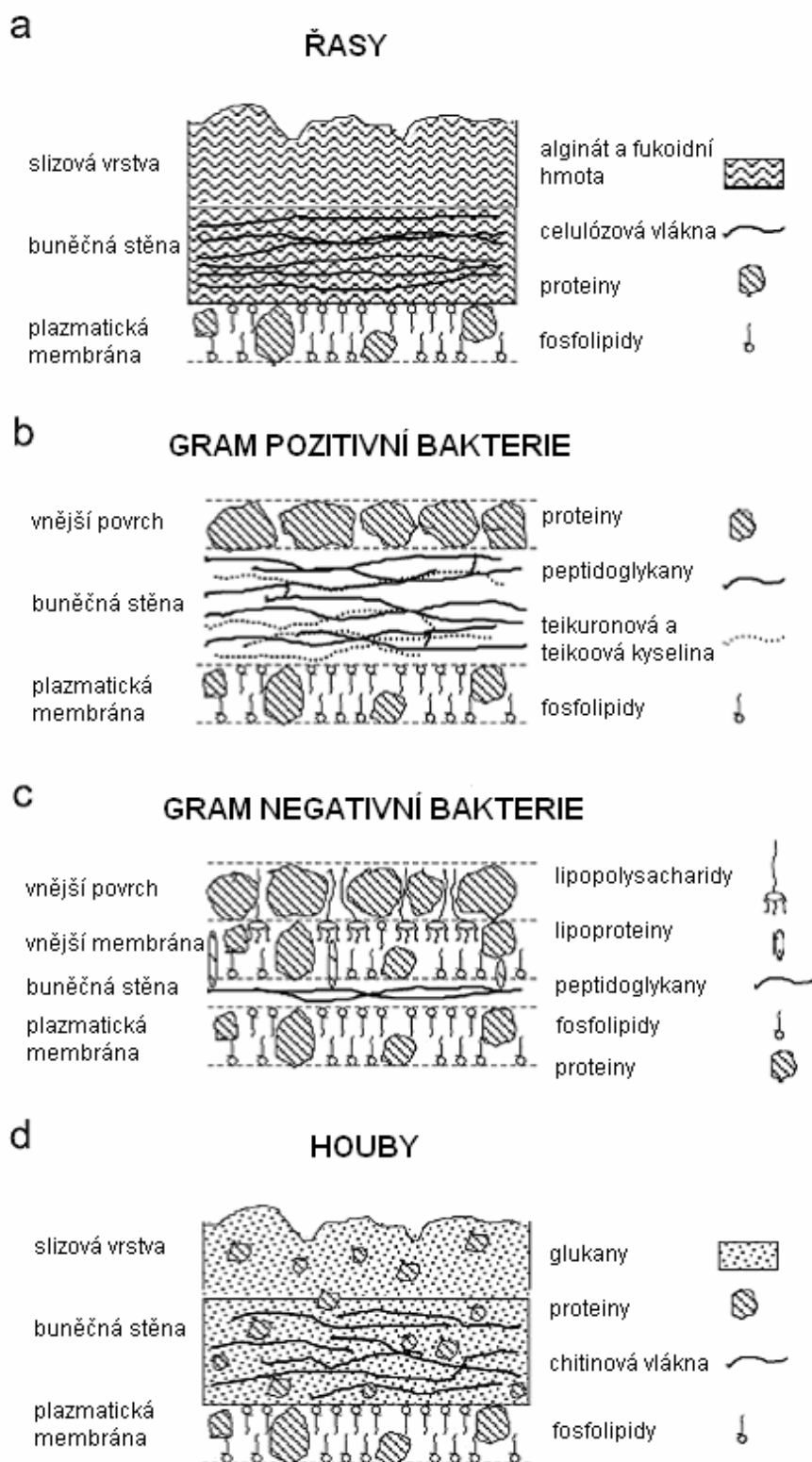
Biosorpce je schopnost některých druhů mikrobiální nebo rostlinné biomasy na sebe vázat kovy z vodního prostředí. Na rozdíl od mnohem komplexnějšího procesu bioakumulace založeném na aktivním metabolismu, biosorpce je pasivní, na metabolismu nezávislá a může být uskutečňována inaktivovanou či neživou biomasou [2, 3].

Hlavní výhody biosorpce oproti konvenčním metodám jsou tyto:

- nízká cena - použitím neživé biomasy odpadá nutnost dodávat živiny, biomasa může být navíc získána jako odpadní produkt některé průmyslové fermentace,
- vysoká efektivita a rychlost - proces trvá v řádech minut až hodin,
- minimalizace odpadu,
- možnost regenerace biosorbentu,
- možnost opětovného získání kovu - výhodné zejména při větší hodnotě a množství kovu,
- proces biosorpce není řízen buňkou, nevyskytují se problémy s metabolickými produkty, neživá biomasa také není náchylná k toxickým účinkům kovů. Biosorpce díky tomu také nemusí probíhat jen za podmínek vhodných pro živé buňky [2, 4].

Principem biosorpce jsou fyzikálně-chemické interakce mezi kovem a funkčními skupinami přítomnými na povrchu mikrobiální buňky. Složitá struktura buněčných stěn mikroorganismů naznačuje, že existuje mnoho možností sorpce kovu. Způsob biosorpce se bude lišit i mezi jednotlivými typy mikroorganismů, právě z důvodu rozdílných staveb buněčných stěn, jak lze vidět z Obr. 1. Řasy obsahují velké množství alginátu a fukoidinu, houby mají výraznou chitinovou vrstvu, grampozitivní bakterie mají zase silnou

peptidoglykanovou vrstvu (tvoří až 90 % buněčné stěny) s teikoovými a teikuronovými kyselinami. Gramnegativní bakterie mají naopak peptidoglykanovou vrstvu velmi tenkou (tvoří pouze 10 – 20 %) a neobsahují teikoové kyseliny. Nad touto vrstvou však mají ještě vnější membránu, která je složena z fosfolipidů, lipoproteinů a lipopolysacharidů [3, 5].



Obr. 1.: Schématické znázornění buněčných stěn řas, G⁺ a G⁻ bakterií a hub [3]

Všechny výše zmíněné biopolymery jsou vydatným zdrojem kovy vázajících funkčních skupin (Tab. 1). Nejvýznamnějšími funkčními skupinami jsou karboxylové, sulfátové, amidové, fosfátové a fosfodiesterové skupiny. Ne vždy však přítomnost těchto skupin zaručuje jejich dostupnost pro biosorpci, např. kvůli konformaci a sterickým zábranám [2, 6].

Tab. 1: Hlavní funkční skupiny uplatňující se při biosorpci [3]

Funkční skupina	vzorec	pK _a	ligand	výskyt
Hydroxyl	–OH	9,5–13	O	PS, KU, SPS, AK
Karbonyl	>C=O	-	O	peptidová vazba
Karboxyl	$\begin{array}{c} \text{–C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1,7–4,7	O	KU, AK
Sulfhydryl	–SH	8,3-10,8	S	AK
Sulfát	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{–S=O} \\ \\ \text{O} \end{array}$	1,3	O	SPS
Thioether	>S	-	S	AK
Amin	–NH ₂	8–11	N	chitosan, AK
Sekundární amin	>NH	13	N	chitosan, PG, peptidová vazba
Amid	$\begin{array}{c} \text{–C=O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	-	N	AK
Imin	=NH	11,6–12,6	N	AK
Imidazol	$\begin{array}{c} \text{–C–N–H} \\ \quad >\text{CH} \\ \text{H–C–N} \end{array}$	6,0	N	AK
Fosfát	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{–P=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	6,1–6,8	O	fosfolipidy
Fosfodiester	$\begin{array}{c} >\text{P=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	1,5	O	KT, LPS

PS – polysacharidy, KU – kyselina uronová, SPS – sulfátované polysacharidy, AK – aminokyseliny, PG – peptidoglykan, KT – kyselina teikoová, LPS - lipopolysacharidy

1.1.1 Mechanismy biosorpce

Vazba kovů při biosorpci je umožněna několika různými mechanismy jako je iontová výměna, fyzikální adsorpce, tvorba komplexů, chelatace, mikroprecipitace nebo zachycení v kapilárách matrice buněčné stěny. Fungují nezávisle na sobě a k celkové sorpci kovu dochází jejich kombinací. Zastoupení jednotlivých mechanismů se kvantitativně i kvalitativně liší podle použitého mikrobiálního druhu, původem biomasy a použitým postupem [6].

1.1.1.1 Iontová výměna a adsorpce

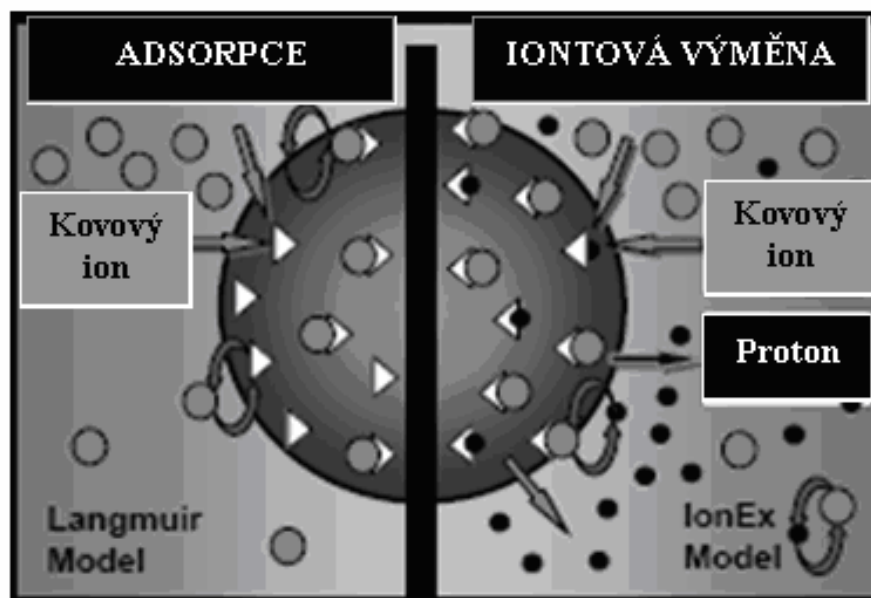
Iontová výměna je důležitou představou o biosorpci, protože pomocí ní lze vysvětlit mnoho poznatků získaných během experimentů. Na rozdíl od adsorpce (Obr. 2), která předpokládá, že všechna vazebná místa na sorbentu jsou volná a ihned přístupná sorbatu z roztoku, jak popisuje rovnice (1), je iontově-výměnný model založen na principu vyjádřeném rovnicí (2):



kde B^- je volné vazebné místo, M^+ kovový kation a BM je adsorbovaný kov vázaný na sorbent,



kde vazebné místo B je obsazeno protonem H , který se účastní iontové výměny s kovovým kationem M^+ . Stechiometrie neodpovídá případu, kdy se sorbuje dvoumocný kovový kation, a musí se tak uvolnit dva protony [7].



Obr. 2.: Rozdíl mezi adsorpcí a iontovou výměnou [8]

Iontová výměna však biosorpci také nepopisuje zcela přesně, a to z toho důvodu, že počítá s konstantním počtem volných vazebných míst, což neplatí pro systémy s měnícím se pH. Míra elektrostatické přitažlivosti při biosorpci je závislá na typu a množství vazebných míst v biomase a na tom, zda jsou tato místa ionizována nebo obsazena protonem či nějakým

jiným iontem. To má zase souvislost s pH a pK_a jednotlivých funkčních skupin. Aminoskupiny jsou v protonované formě kladně nabitě a v deprotonované jsou neutrální. Karboxylové, sulfátové a fosfátové skupiny jsou neutrální v protonovaném stavu a v deprotonovaném jsou negativně nabitě, což způsobuje přitahování kovových kationů [7].

1.1.1.2 Tvorba komplexů, chelatace

Komplex je polyatomická sloučenina tvořená z jednoho nebo více centrálních atomů (obvykle kovového kationu) obklopených ligandy, které jsou na ně vázány. Ligandy se rozlišují podle počtu skupin, kterými jsou schopny se vázat na kov. Jednovazné ligandy se váží pouze přes jednu koordinační skupinu a obvykle tvoří ve vodě rozpustné iontové komplexy. Více vazné ligandy obsahují více než jednu vazebnou skupinu. Pokud se takový ligand váže na jediný centrální kov, označuje se jako chelatační činidlo a komplexy se pak nazývají cheláty, kde kovový ion je uzavřen v cyklu. Většina chelátových ligandů obsahuje tři nejdůležitější donory, a to dusík, kyslík a síru [7].

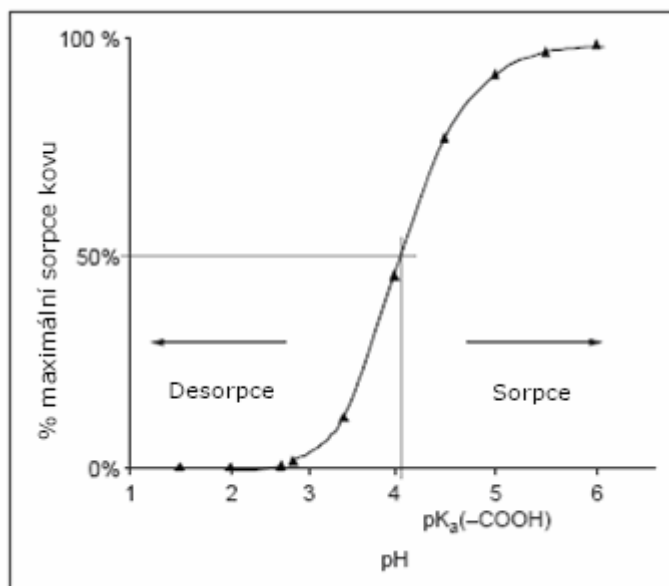
Na biosorpci kovů tedy lze pohlížet jako na tvorbu komplexů z daného kovu a více vazného ligandu, který se vyskytuje na buněčném povrchu. Vazba různých kovových iontů na biomateriály s různými funkčními skupinami závisí na elektronegativitě, ionizačním a redoxním potenciálu a poloměru daných kovových iontů. Bylo zjištěno, že elektronegativnější kovový ion je k povrchu přitahován silněji [7].

1.1.2 Faktory ovlivňující biosorpci

Jak již bylo uvedeno, biosorpce nemusí probíhat za podmínek vhodných pro živé buňky, teoreticky by se mrtvá biomasa mohla použít v jakémkoli prostředí, avšak samotný proces je ovlivňován několika faktory, které mohou mít významný vliv na sorpční kapacitu sorbentu nebo rychlost sorpce a je tedy nutné je brát v potaz. Biosorpce je ovlivněna zejména pH, koncentrací a druhem biomasy, přítomností dalších kovů, teplotou a počáteční koncentrací kovu [4].

1.1.2.1 pH

Vodíkový exponent je zřejmě nejvýznamnějším faktorem biosorpce. Ovlivňuje rozpustnost kovů, ionizaci funkčních skupin buněčných stěn biomasy a kompetitivnost kovů. V závislosti na pH se mění dostupnost volných vazebných míst. Při nižší hodnotě pH jsou tato místa částečně protonovaná, což znemožňuje přístup kladně nabitých kovových iontů. Při dostatečně nízkém pH jsou protonovaná všechna vazebná místa, a dochází tak k úplné desorpci navázaných kovových iontů, čehož se využívá při regeneraci biosorbentu. Na druhou stranu, extrémní hodnoty pH mohou poškodit strukturu biosorbentu. Buňky se deformují a dochází ke snížení sorpční kapacity. Při vyšším pH se zase významně snižuje rozpustnost kovů, vznikají hydroxidy kovů, které se srážejí a znesnadňují tak biosorpci. Pro většinu kovů se ukázalo jako nejvhodnější rozmezí pH 3 – 6 (Obr. 3.) [4, 7, 9].



Obr. 3.: Závislost biosorpce na pH roztoku [9]

1.1.2.2 Teplota

Teplota ovlivňuje stabilitu kovu v roztoku, konfiguraci buněčné stěny nebo stabilitu komplexu buňky s navázaným kovem. Obecně má však teplota mnohem menší vliv než ostatní faktory, zejména pokud se pohybuje mezi 20 – 35 °C. Biosorpce některých kovů (uranu, mědi) dokonce může probíhat bez omezení v širokém teplotním intervalu [4, 7].

1.1.2.3 Koncentrace a druh biomasy

Velké množství druhů biomasy bylo studováno z hlediska svých biosorpčních vlastností – řasy, bakteriální biomasa, biomasa hub i rostlin. Bylo zjištěno, že vliv má nejen druh, ale i růstové podmínky (kultivační médium), fyziologický stav a věk biomasy. Pokud jde o koncentraci biomasy, jeví se použití vysoké koncentrace nepříliš efektivní, naopak při nižších koncentracích dochází k vyššímu specifickému příjmu kovu [4, 7].

1.1.2.4 Přítomnost dalších kovů

Biosorpce jednoho druhu kovu může být snížena, případně dokonce znemožněna jiným druhem kovu přítomným v roztoku. Míra inhibice biosorpce daného kovu závisí na síle, kterou se jednotlivé kovy váží na biomasu. Obecně platí, že lehké kovy (alkalické a kovy alkalických zemin) se váží slaběji než těžké kovy nebo radioaktivní prvky. Proto přítomnost lehkých kovů příliš neovlivňuje sorpci kovů těžkých. Mezi samotnými těžkými kovy se slabě váže zinek, který je proto více ovlivňován jinými kovy [7].

1.1.3 Rovnováha biosorpčního procesu

Biosorpce probíhá v systému pevné fáze (sorbet – biologický materiál) a kapalné fáze (obvykle voda) obsahující rozpuštěnou látku, která se má sorbovat (sorbat – kovové ionty). Sorbat je díky afinitě přitahován a vázán na sorbet výše zmíněnými mechanismy. Proces pokračuje až do ustavení rovnováhy mezi množstvím navázaného sorbatu a jeho zůstatkem v roztoku. Míra afinity k sorbatu rozhoduje o jeho distribuci v pevné a kapalné fázi [8].

Kvalita sorbetu je posuzována na základě množství sorbatu, které je sorbetem zachyceno a které zůstane navázáno. Pro tento účel byla zavedena veličina sorpční kapacita biosorbetu (q) vyjádřená jako množství sorbatu vázaného jednotkou pevné fáze (hmotnosti či objemu). Výpočet sorpční kapacity je založen na materiálové bilanci sorpčního systému:

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{S}, \quad (3)$$

kde V je objem roztoku obsahující kov, C_i je výchozí koncentrace a C_f konečná (rovnovážná) koncentrace kovu v roztoku a S je množství přidávaného biosorbetu (hmotnost sušiny biosorbetu). Použití hmotnosti „mokré biomasy“ není vhodné, pokud není uveden přesný přepočet hmotnosti za mokra na hmotnost sušiny. Různé druhy biomas obsahují různé množství vlhkosti, jak vnitrobuněčné, tak zachycené v prostoru mezi buňkami. Proto je vhodné uvádět např. podmínky centrifugace, aby porovnání kvality sorbetu bylo co nejpresnější [8].

1.1.3.1 Sorpční modely

Pro využití biosorpce v průmyslovém měřítku je nezbytné studium rovnováhy systému kov – biosorbet a její matematické znázornění. Protože je sorpce proces exotermní a sorpční výkon se může měnit v závislosti na teplotě, je základním požadavkem pro zavedení modelu sorpce konstantní teplota během celého procesu. Závislost mezi sorpční kapacitou (q) a rovnovážnou koncentrací kovu zbylého v roztoku (C_f) za konstantní teploty se nazývá sorpční izoterma. Nejčastěji se pro popis biosorpce používají adsorpční izotermy Langmuira a Freundlicha, kteří studovali adsorpci na aktivním uhlí již na počátku 20. století [8].

Langmuirova sorpční izoterma

Langmuirova izoterma je založena na předpokladu, že síly vynaložené chemicky nenasycenými povrchy atomů (tzn. vazebná místa) nepůsobí dál, než je průměr jedné sorbované molekuly, takže sorpce je pouze jednovrstvá. Dále předpokládá pevný počet vazebných míst se stejnou afinitou k sorbatu a pouze jeden sorbat v roztoku [8].

Langmuirova izoterma má hyperbolický tvar:

$$q = q_{\max} \frac{bC_f}{1 + bC_f}, \quad (4)$$

kde $q_{\max}$ je maximální sorpční kapacita za daných podmínek a může být také interpretována jako celkový počet vazebných míst, která jsou dostupná pro biosorpci, zatímco q je počet vazebných míst, která jsou opravdu obsazena sorbatem při koncentraci C_f . Konstanta b souvisí s afinitou mezi sorbetem a kovem [8].

Freundlichova sorpční izoterma

Dalším modelem jednovrstvé adsorpce je Freundlichova izoterma, která je empirické povahy a je interpretována jako sorpce na místa s rozdílnou afinitou. Předpokládá, že nejdříve jsou obsazena silněji vázající místa a s rostoucím počtem obsazených míst vazebná síla klesá. Freundlichova izoterma tedy předpokládá log-normální rozdělení afinity a má exponenciální tvar:

$$q = k C_f^{(1/n)}, \quad (5)$$

kde k a n jsou Freundlichovy empirické konstanty.

Tento model neuvádí konečnou sorpční kapacitu sorbentu, a proto může být použita jen při nízkých a středních koncentracích [8].

Brunauer-Emmett-Tellerův model

Brunauer-Emmett-Tellerova izoterma (BET) je ve skutečnosti rozšířená a tedy obecněji aplikovatelná Langmuirova izoterma, protože znázorňuje skutečnou vícevrstvou adsorpci. BET model předpokládá, že na povrchu se tvoří vrstvy adsorbovaných částic a pro jednotlivé vrstvy platí Langmuirův vztah. Dále předpokládá, že daná vrstva nemusí být kompletně dotvořena dříve, než se začnou vytvářet vrstvy následné. BET izoterma je zjednodušeně vyjádřena rovnicí:

$$q = \frac{BQC_f}{(C_s - C_f)[1 + (B-1)(C_f / C_s)]}, \quad (6)$$

kde C_s je saturační konstanta rozpuštěné látky, B je konstanta vztahující se k energii interakce s povrchem a Q je počet molů rozpuštěné látky adsorbované na jednotku hmotnosti sorbentu a tvořící kompletní monovrstvu na jeho povrchu [8].

Iontově-výměnná izoterma

Přestože předešlé modely jsou používány nejčastěji, nejsou vždy vhodné k modelaci procesu biosorpce. Za hlavní mechanismus biosorpce je považována iontová výměna, proto je v některých případech vhodnější využít model založený na iontově-výměnném principu. Iontově-výměnný model představuje reálnější znázornění procesu, je komplexnější, ačkoliv ani tento model stále neobjasňuje přesně interakce mezi kovem a biosorbentem. Je vyjádřen rovnicemi:

$$q_A = \frac{Z}{\left(1 + \frac{C_{fB}}{K_{AB} \cdot C_{fA}}\right)} \quad (7)$$

$$q_B = \frac{Z}{\left(1 + \frac{C_{fA}}{K_{AB} \cdot C_{fB}}\right)}, \quad (8)$$

kde symboly A a B reprezentují kov a druhý ion v systému, K_{AB} je rovnovážná konstanta iontově-výměnné reakce a Z je celkový počet vazebných míst na biosorbentu [9, 10].

1.2 Těžké kovy

Definice těžkých kovů není v literatuře zcela jednoznačná. Nejčastěji se posuzují podle atomové hmotnosti nebo hustoty, v tomto případě se mezi těžké kovy řadí kovy s hustotou vyšší než 5 g/cm^3 . V poslední době se začal tento pojem užívat obecně pro kovy a polokovy s potenciálními toxickými účinky na životní prostředí [11].

Většina těžkých kovů jsou tedy přechodné prvky s neúplně obsazenými d-orbitaly, které umožňují vznik kovových kationů. Tyto kovové kationy mají důležitou funkci jako tzv. stopové prvky, které se podílejí na fyziologických pochodech v buňce. Ve vyšších koncentracích stopových prvků a substitucí neesenciálními těžkými kovy však tvoří nespecifické komplexní sloučeniny, které mají toxické účinky. Příčinou toxicity těžkých kovů je vazba na -SH, -COOH a -NH₂ skupiny biomolekul (zejména bílkovin), které tím mění svou strukturu a funkci. Ionty těžkých kovů také mohou katalyzovat reakce, při kterých vznikají volné radikály způsobující oxidativní stres a následné poškození DNA, a dalším nepříznivým jevem je kompetice s esenciálními kovy, které nahrazují v tkáních [12, 13, 14].

Kovy mohou být ve vodném prostředí rozpuštěny jako volné hydratované ionty nebo mohou tvořit iontové komplexy s anorganickými ligandy (např. s OH⁻, Cl⁻ a CO₃²⁻) nebo s organickými ligandy (např. s aminy, huminovými a fulvinovými kyselinami a proteiny). Znalosti o tom, v jaké fyzikální či chemické formě se kov vyskytuje, jsou klíčové pro pochopení a předvídání chování kovu a jeho dopadu na životní prostředí. Chemická speciace kovu závisí na jeho oxidačním stavu, na interakcích s ostatními složkami prostředí a na dalších parametrech jako je pH, redoxní potenciál, iontová síla a salinita. Změny těchto veličin mohou způsobit transformaci chemické formy kovu a změnit tak jeho dostupnost a toxicitu [7].

Nejvýznamnější těžké kovy lze na základě toxicity rozdělit do několika skupin. Skupina Sn, Ce, Ga, Zr a Th nemá žádný vliv na organismy díky nízké rozpustnosti; Fe, Mo a Mn jsou důležité stopové prvky s nízkou toxicitou; Zn, Ni, Cu, V, Co, W a Cr jsou také nezbytné stopové prvky, ale s již vyšší toxicitou a do poslední skupiny lze zařadit As, Ag, Sb, Cd, Hg, Pb a U, které nemají v organismu žádnou prospěšnou funkci a jsou toxické i při velmi nízkých koncentracích [12].

1.2.1 Zdroje znečištění vod těžkými kovy

Při posuzování znečištění je třeba rozlišovat mezi přirozenými zdroji těžkých kovů a antropogenními zdroji. Kovy z minerálů a hornin jsou obvykle neškodné, potenciálně toxickými se stávají rozpuštěním ve vodě. Do vody se mohou dostat zvětráváním hornin, vyluhováním půd a sopečnou činností. Naproti tomu lidskou činností dosahuje koncentrace těžkých kovů vysokých hodnot, které mohou být nebezpečné pro zdraví. Těžké kovy jsou uvolňovány nejvíce při těžbě a zpracovávání rud, při spalování fosilních paliv, povrchovou úpravou kovů a kožedělným průmyslem [7, 13].

1.2.1.1 Těžební průmysl a zpracování rud

Největším a nejzávažnějším problémem hornické činnosti je vznik kyselých důlních vod. Kyselé důlní vody vznikají při oxidaci sulfidických rud. Když jsou tyto rudy (nejčastěji pyrit)

vystaveny působení vody a působením oxidujících bakterií (př. *Thiobacillus ferrooxidans*), dochází k přeměně na sírany a mobilizaci kovů. Vzniklé vody jsou silně kyselé a obsahují velké množství těžkých kovů. Pokud nejsou zachytávány a zpracovány, mohou kontaminovat podzemní vody a místní vodní toky. Kyselé důlní vody mohou dále působit na další minerály a rozpouštět těžké kovy jako je olovo, měď, kadmium, zinek a nikl, které jsou zde přítomny v malých množstvích [13].

Při zpracovávání rud (např. při výrobě oceli, ale i slitin) vzniká pevný odpad s vysokým obsahem těžkých kovů, který je považován za poměrně inertní. Nebezpečná je však produkce emisí, jejichž odstranění není zcela efektivní, takže jsou uvolňovány do ovzduší i s těžkými kovy a dále vznik odpadních vod, které také obsahují vysoké koncentrace kovů [13].

1.2.1.2 Povrchové úpravy

Povrchové úpravy spočívají v různých chemických a fyzikálních postupech, které mění povrch produktu nebo zlepšují jejich vzhled, zvyšují odolnost proti korozi nebo připravují povrch pro další úkony. Hlavní úpravy povrchů se provádí galvanickým pokovováním, bezproudým pokovováním, anodickou oxidací, chromováním, tvrzením v kyanidu a kalením. Povrchová úprava se týká zejména kovů, ale může být použita i u jiných materiálů. Provádí se nejčastěji u automobilových součástí (př. nárazníky), ocelových plátů, elektrických spotřebičů, elektroniky, vodovodních armatur či klenotů. Odpadní vody z tohoto průmyslu se dělí do tří kategorií, kterými jsou koncentrovaná odpadní lázeň, promývací voda obsahující srážející se substance (mýdla, tuky, soli kovů) a zředěná splašková voda. Tyto odpadní vody mohou obsahovat ionty Ni, Cr, Cu, Zn, Sn, Cd, Au, Ag, Pb, Fe i další kovové ionty [13].

1.2.1.3 Kožedělný průmysl

Surové kůže mají schopnost absorbovat trísloviny a další chemické látky, které je chrání před rozkladem, zvyšují odolnost vůči vlhkosti a udržují je pružné a pevné. Činění kůží je v podstatě reakce kolagenových vláken s tríslovinami, chromem, hliníkem nebo jinými činidly. Nejčastěji se používá trojmocný chrom (ve formě chromité soli) a rostlinné trísloviny získané z kůry určitých druhů stromů. Dalšími používanými činidly jsou hlinité soli, syntetické trísloviny, formaldehyd, glutaraldehyd a těžké oleje. Při činění kůží jsou produkovány odpadní vody s obsahem chromu, který při vyšších koncentracích může být toxický pro životní prostředí [13].

1.2.1.4 Spalování fosilních paliv

Velké množství odpadu obsahující těžké kovy produkují uhelné elektrárny. Uhlí obsahuje kovy, které pokud nejsou spáleny, končí v plynném a pevném odpadu i v odpadních vodách. Uhlí také obsahuje malé množství uranu, thoria, případně i dalších radioaktivních izotopů. Přestože jsou těžké kovy a radioaktivní prvky obsaženy jen v malých množstvích jako nečistoty, spalováním obrovského množství uhlí může způsobit uvolnění již významného množství těchto látek. Nebezpečná je zejména přítomnost stopových množství rtuti, která se při spalování uvolňuje [13].

1.2.2 Charakteristiky vybraných těžkých kovů

1.2.2.1 Olovo

Olovo je nejběžnějším těžkým kovem, vyskytuje se v oxidačních stavech Pb^0 , Pb^{2+} , Pb^{4+} . Využívá se na výrobu baterií, barviv, slitin a v automobilovém průmyslu. Jeho toxicita spočívá v kompetici s Ca^{2+} (ukládání v kostní tkáni) a Fe^{2+} a ve vazbě na -SH skupiny bílkovin. Olovo je kumulativní jed, nebezpečný zejména pro děti a těhotné ženy (resp. plody). Poškozuje vážně centrální nervový systém, dochází k poruše krvetvorby. Příznakem akutní otravy je malátnost, nervozita, podrážděnost, bolesti hlavy, halucinace, ztráta paměti a svalový třes. Karcinogenita olova byla zkoumána mnoha studiemi, ale nebyla s určitostí prokázána, proto je olovo klasifikováno jako potenciální karcinogen. V neznečištěných vodách je koncentrace olova relativně nízká z důvodu malé rozpustnosti sloučenin olova a obvykle není pro člověka hlavním expozičním zdrojem. Olovo je toxické pro zooplankton a u ryb dochází po akutní intoxikaci k poškození žáber a následně k úhynu udušením [13, 15, 16].

1.2.2.2 Měď

Měď se vyskytuje v oxidačních stavech Cu^+ a Cu^{2+} . Používá se při výrobě elektrických vodičů a do slitin, vyrábí se z ní elektromagnety, integrované obvody a plechy odolné proti korozi a je součástí preparátů proti nadměrnému rozvoji řas a sinic. Měď je esenciálním prvkem, je nezbytná pro růst a vývoj kostí, pojivových tkání, mozku a srdce. Uplatňuje se při tvorbě hemoglobinu a některých enzymů a při metabolismu železa. Také je důležitá pro správné využití vitamínu C. U dětí může její nedostatek způsobit fyzickou a duševní retardaci. Ve vyšších koncentracích je však měď toxická a zvláště toxická je pro vodní organismy. Toxicita je založena na vzniku hydroperoxidových radikálů a na interakci s buněčnými membránami. U lidí způsobuje žaludeční a střevní potíže, poškození jater a ledvin a anemii. Některé sloučeniny mědi mohou dráždit kůži a způsobovat záněty [12, 17].

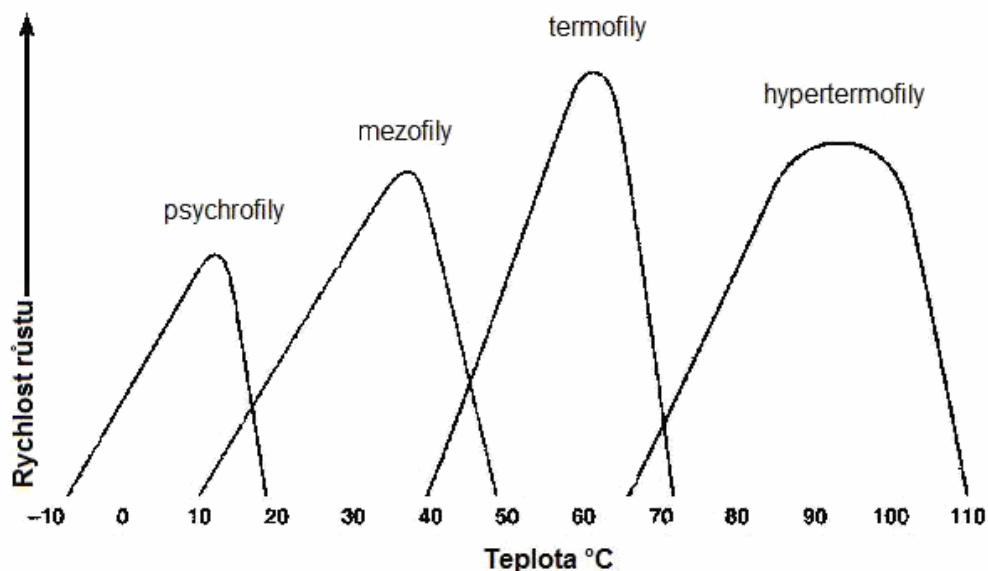
1.2.2.3 Zinek

Zinek se ve sloučeninách vyskytuje v oxidačním stavu Zn^{2+} . Patří mezi průmyslově nejvíce vyráběné kovy, používá se na povrchovou úpravu plechů, výrobu slitin (mosaz), různých kovových součástek, oxid zinku se používá na výrobu barviv. Ve vodě rozpuštěný zinek se sorbuje na jíly a huminové koloidy. Zinek je esenciálním prvkem, je součástí řady enzymů, účastní se metabolismu bílkovin, nukleových kyselin, uplatňuje se při syntéze DNA. Velké dávky zinku mohou způsobit bolesti žaludku, křeče, zvracení a průjem. Je však snadno vylučován zažívacím traktem, proto nedochází k jeho kumulaci v těle. Pro lidi tak nepředstavuje závažné riziko, ovšem pro vodní živočichy a zejména lososové ryby je zinek velmi toxický [18].

1.3 Termofilní mikroorganismy

1.3.1 Obecná charakteristika

Vývoj a aktivita mikroorganismů je silně závislá na vnějším prostředí. Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst je teplota. Pro různé organismy nemusí být vhodná stejná teplota a z tohoto hlediska je třeba mikroorganismy rozlišovat. Základním dělením mikroorganismů jsou tři skupiny, a to psychofilní, mezofilní a termofilní. Pro psychofilní mikroorganismy je nejvhodnější teplota pro růst pod 20 °C, mezofilní rostou nejlépe při teplotách 20 - 40 °C a termofilní při teplotách nad 45 °C. V rámci těchto rozmezí teplot má každý mikroorganismus své teplotní optimum, při kterém se rozmnožuje nejrychleji. Většina termofilních mikroorganismů má optimální teplotu pro růst mezi 50 - 70 °C. Jsou však známy i mikroorganismy, které mohou růst i při teplotách vyšších než 100 °C, nazývají se hypertermofily a někdy bývají řazeny do samostatné skupiny (Obr. 4.) [19, 20].



Obr. 4.: Rozdělení mikroorganismů podle optimální teploty růstu [21]

Přežití termofilních mikroorganismů v těchto teplotních podmínkách, které ostatní mikroorganismy nepřežívají, je umožněno složením proteinových částí jejich enzymů. V proteinech se jednak tvoří ve zvýšené míře solné můstky a vodíkové vazby mezi bočními řetězci substituovaných zbytků a dále je u termofilů odlišné prostorové uspořádání bílkovin, což je způsobeno úbytkem nebo přeskupením aminokyselin. V sekvencích aminokyselin se u termofilních proteinů častěji vyskytuje arginin a tyrosin, zatímco cystein a serin jsou zastoupeny méně. Termostabilita je rovněž umožněna zvýšeným obsahem fosfolipidů a lipidů s nasycenými mastnými kyselinami v buněčné membráně [22, 23].

Díky tomu, že preferují zvýšené teploty, se termofilní mikroorganismy vyznačují mimořádně vysokou metabolickou aktivitou, vysoká je také jejich rychlost růstu při optimální teplotě [20].

1.3.2 Výskyt

Termofilní mikroorganismy preferují zvýšené teploty, ke svému růstu proto vyžadují termální prostředí. Termální prostředí vzniká přirozeně slunečním zářením, spalovacími procesy, radioaktivním rozpadem a geotermální aktivitou, ale může také vznikat jako výsledek lidské činnosti.

Nejvýznamnějším zdrojem tvorby termálního prostředí je geotermální aktivita. Pro rozvoj termofilních mikroorganismů jsou ideální vulkanické horké prameny, kde se teplota pohybuje od 30 °C až po 90 – 100 °C. Největší počet horkých pramenů je v Yellowstone National Parku, na Islandu, Novém Zélandu, v Japonsku a na Kamčatce.

Spalování může být vyvoláno procesy biologickými i nebiologickými. Mnoho termofilních druhů hub i bakterií se vyskytuje v nahromaděném organickém materiálu jako je např. seno či chlévský hnůj. Teploty zde mohou dosahovat 70 i více stupňů Celsia a jsou výsledkem mikrobiální činnosti. Tyto teploty mohou vést ke samovznícení daného materiálu. Jiným procesem, který je spíše prováděn průmyslově, ale může se vyskytovat i přirozeně, je spalování uhlí. Při tomto procesu se může teplota pohybovat od 45 do 150 °C.

Sluneční záření může ohřát půdu až na 60 °C. Ve vodném prostředí může sluneční záření způsobit významné zvýšení teploty jen v mělkých vodách, kde pak teplota dosahuje maximálně 40 °C. Ohřátí půdy nebo vody je ovšem jen přechodné, uvedené teploty se vyskytují pouze přes poledne.

Velký podíl na produkci tepla má také průmysl. Proto se termofilní mikroorganismy mohou nalézat například v horké vodě topných zařízení, cukrovarech, papírnách, v chladicích věžích elektráren apod. [19].

1.4 Přehled termofilních mikroorganismů

Termofilní mikroorganismy se vyskytují zejména mezi rody bakterií a archeí, ale i mezi eukaryotickými mikroorganismy (houby, řasy).

1.4.1 Archea

Přestože archea již nejsou považována za výlučně extrémofilní, mnohé druhy jsou k životu v extrémních podmínkách přizpůsobené velmi dobře. Archea se ze systematického hlediska dělí do dvou kmenů, Crenarchaeota a Euryarchaeota. Z fyziologického hlediska lze archea rozdělit na extrémně halofilní, methanogenní, hypertermofilní a archea bez buněčné stěny [24, 25].

1.4.1.1 Hypertermofilní archea

Rozmezí růstu těchto archeí je 45-110 °C, teplota pro optimální růst se pohybuje v rozmezí 70 – 105 °C. Za anaerobních podmínek redukuje elementární síru na sulfan, za aerobních podmínek oxiduje sulfan nebo síru na kyselinu sírovou. Donorem elektronů při redukčních reakcích slouží vodík nebo organické sloučeniny. Vyskytují se v místech postvulkanického unikání sirných a vodních par a v mořských hydrotermálních systémech. Patří sem rody *Sulfolobus*, *Pyrococcus*, *Desulfurococcus*, *Pyrodictum*, *Archaeoglobus*, *Thermococcus*, *Thermoproteus* [25].

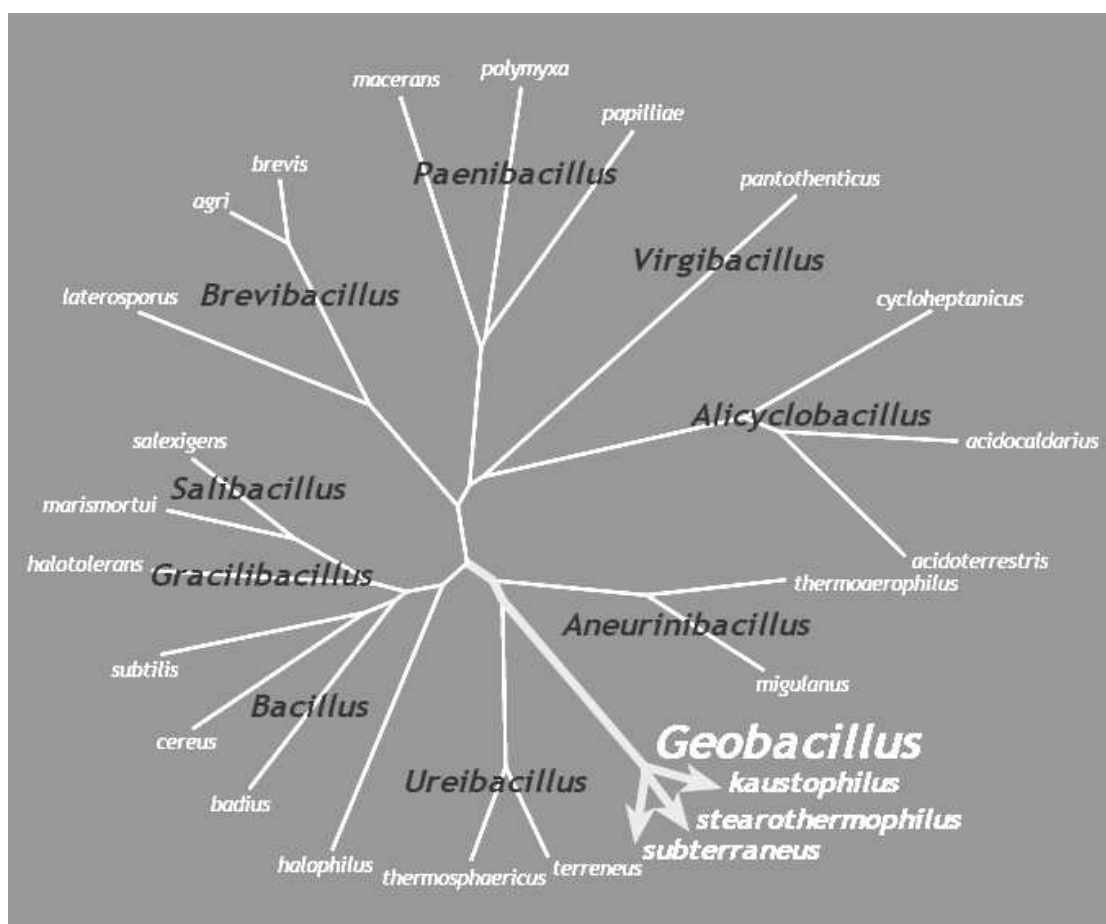
1.4.1.2 *Archea bez buněčné stěny*

Zástupcem této skupiny je rod *Thermoplasma*. Tento rod má mezi archeemi zvláštní postavení. Jsou to totiž jen mírně termofilní a extrémně acidofilní fakultativně anaerobní heterotrofové. Jejich optimální teplota růstu je 55 °C při pH 2. Nemají buněčnou stěnu, ale silnou trojvrstvou membránu, která se skládá z glyceroltetraetherových lipidů, což jim umožňuje přežít ve vyšších teplotách v kyselém prostředí [20, 25].

1.4.2 Termofilní bakterie

1.4.2.1 Rod *Geobacillus*

Genovým sekvencováním 16S-rRNA zástupců rodu *Bacillus* byla odhalena výrazná fylogenetická heterogenita. Na základě těchto analýz byl rod *Bacillus* reorganizován a vzniklo tak postupně několik fylogenetických skupin reklasifikovaných na nové rody (Obr. 5, Tab. 2). Termofilní jsou rody *Anoxybacillus*, *Alicyclobacillus*, *Thermobacillus*, *Ureibacillus* a *Geobacillus* [26, 27].



Obr. 5.: Fylogenetická heterogenita původního rodu *Bacillus* [27]

Tab. 2: Přehled nových rodů [27]

Rod	Stručný popis
<i>Bacillus</i>	aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie tvořící endospory
<i>Amphibacillus</i>	fakultativně anaerobní
<i>Alicyclobacillus</i>	acidofilní, mírně termofilní
<i>Peanibacillus</i>	fakultativně anaerobní, mezofilní
<i>Aneurinibacillus</i>	aerobní, mezofilní
<i>Brevibacillus</i>	aerobní, mezofilní
<i>Halobacillus</i>	mírně halofilní
<i>Virgibacillus</i>	mezofilní, mírně halotolerantní
<i>Gracilibacillus</i>	mezofilní, některé halotolerantní
<i>Salibacillus</i>	mírně halofilní
<i>Anoxybacillus</i>	striktně nebo fakultativně anaerobní, alkalifilní, mírně termofilní
<i>Thermobacillus</i>	aerobní, termofilní
<i>Filobacillus</i>	aerobní, alkalitolerantní, halofilní
<i>Ureibacillus</i>	aerobní, termofilní
<i>Geobacillus</i>	aerobní nebo fakultativně anaerobní, termofilní

Rod *Geobacillus* je tvořen peritrichními tyčinkovitými buňkami vyskytující se buď jednotlivě nebo v krátkých řetězcích. Struktura buněčné stěny je grampozitivní, ale reakce na barvení může kolísat mezi pozitivní a negativní. Tvoří jednu elipsoidní nebo válečkovitou endosporu na buňku, která je umístěna terminálně nebo subterminálně. Tvoří kolonie různého tvaru a velikosti a v některých médiích mohou produkovat pigment. Rod *Geobacillus* je chemoorganotrofní, aerobní nebo fakultativně anaerobní, akceptorem elektronů je kyslík, u některých druhů dusičnan. Růst probíhá v rozmezí teplot 37 – 75 °C s optimem v 55 – 65 °C a při pH 6 – 8,5 s optimem 6,2 – 7,5 [26].

Geobacillus thermodenitrificans

Taxonomické zařazení: » kmen Firmicutes

» třída Bacilli

» řád Bacillales

» čeleď Bacillaceae

» rod *Geobacillus* [28]

Geobacillus thermodenitrificans byl izolován ze šťávy z cukrové řepy v Rakousku. Tvoří ploché kolonie s laločnatými okraji bílé až béžové barvy. Růst probíhá při 50 – 65 °C a optimálním pH 6 – 8. Redukuje dusičnany, za anaerobních podmínek slouží dusičnany jako akceptory elektronů. Je schopen hydrolyzovat škrob, využívá glukosu, fruktosu, maltosu, trehalosu, manosu, laktosu, celobiosu, galaktosu, xylosu, ribosu a arabinosu. Přirozeně se nachází v půdě [27, 29].

Geobacillus thermocatenulatus

Taxonomické zařazení: » kmen Firmicutes

» třída Bacilli

» řád Bacillales

» čeleď Bacillaceae

» rod *Geobacillus* [30]

Geobacillus thermocatenulatus byl izolován z termálního vrtu na Uralu. Tvoří dlouhé tenké tyčinky v nerozvětvených řetízcích, které se v tekutém médiu shlukují. Kolonie jsou nažloutlé, kulaté a vyvýšené, hladké a mazlavé. Teplota pro růst se pohybuje v rozmezí 35 – 78 °C. Tvoří granule kyseliny polyhydroxybutyrové. Produkuje kyseliny z glukosy, levulosity, galaktosy, sacharosy, celobiosy, manitolu, glycerolu a dextrinu [27, 31].

1.4.2.2 Rod *Thermus*

Zástupci rodu *Thermus* jsou gramnegativní aerobní bakterie, nicméně některé nově izolované druhy rostou i v anaerobním prostředí, kde využívají dusičnany jako finální akceptory elektronů. Tento rod netvoří endospory [19, 32].

Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je *Thermus aquaticus*, který byl izolován z horkých pramenů v Yellowstonském národním parku a také z antropogenních termálních lokalit, například z horké vody z vodovodu. Bakterie mají tvar tyčinek nebo vláken. Tyčinky se vyskytují jednotlivě nebo se shlukují. Morfologie je silně ovlivněna teplotou a fází růstu, ve které se bakterie nachází. Při teplotě 75 °C a vyšší se nachází obvykle ve formě vláken, při teplotě 65 – 70 °C se vlákna tvoří ve stacionární fázi růstu. Jejich teplotní optimum pro růst je 70 – 72 °C, maximum 79 °C a minimum 40 °C. Optimální pH je 7,5 – 7,8. Tvoří žluté až oranžové kolonie [33].

Z *Thermus aquaticus* bylo izolováno množství termostabilních enzymů, z nichž největší uplatnění našla její DNA polymeráza (tzv. Taq polymeráza) s teplotním optimem okolo 80 °C, která se používá v PCR [34].

1.4.2.3 Rod *Clostridium*

Druhy tohoto rodu tvoří grampozitivní sporotvorné peritrichní tyčinky, které jsou obligátně anaerobní. Rod *Clostridium* je významný zejména v potravinářství, kde se nepříznivě projevuje tvorbou nepříjemně páchnoucích sloučenin, produkcí velkého množství plynu při anaerobní oxidaci sacharidů a v neposlední řadě produkcí velmi nebezpečných toxinů (*Clostridium botulinum* produkující botulotoxin) [20].

V konzervárenství je nežádoucí termofilní *Clostridium thermosaccharolyticum*, jehož velmi termorezistentní spory přežívají běžné sterilizační teploty aplikované na nekyselé konzervy. Optimální teplota pro jeho rozmnožování je 55 – 62 °C, pod 30 °C se rozmnožovat nemůže, a proto způsobuje kažení konzerv jen při jejich skladování za vyšších teplot [20].

1.4.2.4 Aktinomyce

Aktinomyce jsou grampozitivní aerobní bakterie. Tvoří hyfy, které mohou vytvářet mycelium nebo se rozpadat v tyčinkovité či kulovité buňky. K rozmnožování dochází pomocí

spor, některé rody tvoří sporangia s endosporami. Jsou to typické půdní bakterie. Termofilní zástupci se výrazně podílejí na degradaci organických sloučenin. Rod *Thermomonospora* je schopen rozkládat i lignocelulosový komplex. Důležitou mikroflórou kompostu je rod *Thermoactinomyces*, který bývá původcem samovznícení sena, slámy apod. [20].

1.4.3 Termofilní houby

Mezi eukaryotními organismy je v porovnání s prokaryotními jen velmi málo termofilních druhů. Jedná se především o houby. Nicméně ani termofilní houby nedisponují příliš velkou schopností odolávat vysokým teplotám. Přežívají teploty maximálně 60 – 70 °C a teplotní optimum se pohybuje kolem 50 °C. Termofilní houby jsou hlavní složkou mikroflóry, která se vytváří na nahromaděném rostlinném materiálu, tj. všude tam, kde je teplo, vlhko a dostatek kyslíku pro jejich rozvoj. Představují rozmanitou skupinu různých druhů, mezi zástupce patří například *Mucor pusillus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Chaetomium thermophile*, *Talaromyces thermophilus*, *Stilbella thermophila*, *Canariomyces thermophila*, *Thielavia terrestris* [35].

1.5 Využití termofilních mikroorganismů

Využívání termofilních mikroorganismů v posledních letech výrazně vzrůstá. Moderní biotechnologické aplikace se zaměřují jednak na produkci široké škály termostabilních enzymů a dále na zpracování či odbourání odpadů vznikajících při různých průmyslových výrobcích. V této oblasti se využívají především při kompostování a při čištění odpadních vod.

1.5.1 Kompostování

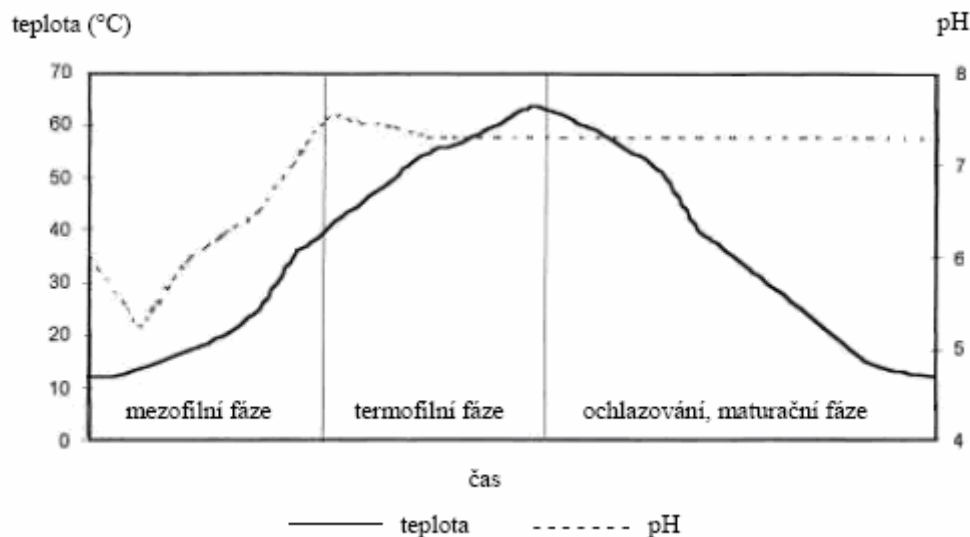
Rozklad organických látek je přirozený proces, pokud je tento proces řízen, kontrolován a urychlován, jde o kompostování. Během kompostování je organická hmota rozkládána různými druhy mikroorganismů na CO₂ a vodu, přičemž vzniká teplo a humus. Kompostování je dynamický proces, protože je uskutečňován rychlým střídáním smíšených mikrobiálních populací, přičemž se uplatňuje jejich synergické působení. Kapacita mikroorganismů degradovat organickou hmotu závisí na jejich schopnosti produkovat enzymy potřebné pro degradaci substrátu. Čím je substrát komplexnější, tím je také zapotřebí bohatší enzymové vybavení [36, 37].

1.5.1.1 Průběh kompostování

Během kompostování se neustále mění teplota, pH a dostupnost živin, a to ovlivňuje typ mikroorganismů, druhovou rozmanitost a rychlost rozkladu. Při optimálních podmínkách prochází kompost třemi fázemi: 1. mezofilní, 2. termofilní a 3. ochlazovací neboli maturační fází. Trvání kompostovacích fází závisí na substrátu a na účinnosti procesu, která je ovlivněna mírou provzdušňování a promíchávání. Změny pH a teploty znázorňuje Obr. 6. [37, 38].

Na počátku převažují mezofilní mikroorganismy, které svým metabolismem produkují teplo a zvyšují teplotu kompostu až do bodu, kdy je potlačena jejich vlastní aktivita. To se stane po zvýšení teploty nad 40 °C - pak získávají převahu termofilní mikroorganismy, které

v kompostu teplotu dále zvyšují. V termofilní fázi dochází k inaktivaci patogenů. Aktivita mikroorganismů výrazně poklesne, když teplota dosáhne 60 °C. V ochlazovací fázi získávají opět dominantní postavení mezofilní druhy [38, 39].



Obr. 6.: Teplotní a pH profil přirozeného procesu kompostování [37]

Na začátku kompostování má hmota teplotu okolí a obvykle bývá mírně kyselá. Rozpustné a snadno rozložitelné látky (monosacharidy, škrob, lipidy) jsou mikroorganismy využívány jako první. Metabolismem těchto látek se tvoří organické kyseliny, v důsledku čehož se snižuje pH. V další fázi probíhá degradace proteinů, tím se uvolňuje amoniak a pH se zase zvyšuje. Poté, co jsou využity lehce rozložitelné zdroje uhlíku, přichází na řadu k degradaci odolnější sloučeniny (př. celulóza, hemicelulóza, lignin), které jsou převáděny na humus [40].

Humus je konečným produktem procesu humifikace, kde jsou sloučeniny přírodního původu částečně převedeny na relativně inertní substance. Humus je tvořen třemi základními sloučeninami, a to ve vodě nerozpustným huminem, huminovou kyselinou, která je ve vodě rozpustná za kyselých podmínek a kyselinou fulvinovou, ve vodě rozpustnou za jakéhokoliv pH. S postupující humifikací se zvyšuje obsah kyseliny huminové. Humus se tvoří hlavně z ligninu, polysacharidů a dusíkatých sloučenin. Chemická dráha od organické látky k humusu je velice komplexní a zahrnuje několik rozkladných a kondenzačních reakcí [36].

1.5.1.2 Mikrobiální zastoupení

Přestože se během kompostování výrazně nemění celkový počet mikroorganismů, mění se zastoupení mikrobiálních druhů během jednotlivých fází. Princip střídání a počet mikroorganismů v každé fázi kompostování závisí na substrátu a na předchozím mikrobiálním druhu [37, 40].

V mezofilní fázi kompostování jsou přítomny mezofilní, případně termotolerantní houby, hlavně kvasinky a plísňe a kyselinotvorné bakterie. Později se vyvíjí aktinomycety. Na konci mezofilní fáze se začíná zvyšovat zastoupení termofilních bakterií, aktinomycet a hub.

Optimální teplota pro termofilní houby je 40 – 55 °C a maximum 60 – 62 °C. Při teplotách nad 60 °C jsou houby usmrceny nebo přežívají ve formě spor. Termofilní aktinomycety jsou zpravidla odolnější k vyšším teplotám než houby a jejich počet vzrůstá při jejich teplotním optimu, které je 50 – 55 °C. Při teplotách nad 60 °C se jejich počet snižuje a degradace je prováděna výhradně termofilními bakteriemi, které jsou však nejaktivnější v rozmezí teplot 50 – 60 °C. Z kompostů o teplotě 50 – 60 °C bývá izolováno mnoho druhů zejména rodu *Bacillus* (původního, viz kap. 1.4.2.1), při teplotách nad 60 °C však druhová rozmanitost klesá a při 75 – 80 °C ustává aktivita všech mikroorganismů [41].

Kompostování je obecně aerobní proces, ale může se rozvinout i tzv. anaerobní mikroprostředí. V takovém místě se nacházejí anaerobní druhy, které mají většinou vysoce celulolytickou aktivitu, a proto jsou zřejmě důležité při degradaci makromolekul [42].

1.5.1.3 Faktory ovlivňující kompostování

Zda bude kompostování úspěšné, závisí na několika faktorech. Je to zejména poměr uhlíku a dusíku (C/N), vlhkost, pH, dostačující přísun kyslíku a správná velikost částic.

Optimální molární poměr uhlíku a dusíku se udává 25 – 40, ale hodnoty závisí na typu substrátu. Dusík bývá limitujícím prvkem, protože je nezbytnou složkou mikrobiálních proteinů, aminokyselin, nukleových kyselin a enzymů. Jestliže je dusíku během kompostování nedostatečné množství, pak degradace probíhá pomalu. Na druhou stranu, při jeho nadbytku se dusík ztrácí v podobě plynného amoniaku nebo jiných dusíkatých sloučenin.

Mikroorganismy jsou schopné využívat organické molekuly, které jsou rozpustné ve vodě. Jestliže vlhkost klesá pod kritickou mez, aktivita mikroorganismů klesá, vysoká vlhkost zase způsobuje nedostatek kyslíku a vyluhování živin. Při následném anaerobním procesu vzniká zápach a snižuje se rychlost rozkladu [37].

1.5.2 Čištění odpadních vod

1.5.2.1 Termofilní anaerobní čistírenské procesy

Biodegradace organických látek v anaerobních podmínkách může probíhat v přírodě samovolně (např. na dně rybníků, v močálech), ale je také tento proces technologicky využíván jako metoda likvidace organického znečištění. Využití nachází hlavně při zpracování různých organických kalů, vodních suspenzí a koncentrovaných roztoků. Anaerobní stabilizace kalů a anaerobní čištění vod je vícestupňový proces, při kterém jsou organické látky rozkládány mikroorganismy za vzniku bioplynu. Bioplyn má vysoký obsah methanu, dále je tvořen CO₂ a stopovým množstvím H₂, N₂ a H₂S. Ve vzniklém bioplynu je zachováno 90 % energie obsažené v substrátu, pouze 5 – 7 % je spotřebováno na růst biomasy a 3 – 5 % se ztrácí ve formě reakčního tepla. Anaerobní procesy jsou tedy energeticky aktivní a navíc nevyžadují velkou spotřebu energie. Energii není potřeba vynakládat na aeraci a v případě čištění vod jsou díky nižší produkci biomasy i nižší náklady na zpracování přebytečného kalu [43].

Termofilní anaerobní stabilizace, která probíhá při teplotě 55 °C, má navíc tyto výhody:

- zvyšuje se rychlost rozkladu organických látek v kalu,
- zvyšuje se účinnost procesu tím, že se prohloubí rozklad organických látek, tím se zvýší i produkce bioplynu a sníží se množství stabilizovaného kalu,
- zvýšená teplota má lepší hygienizační účinek,
- jsou potlačeny problémy s pěněním methanizačních nádrží.

Z technologického hlediska má termofilní proces výhodu v tom, že umožňuje snížit objem reaktorů a pracovat při jejich vyšším zatížení [44].

1.5.2.2 Termofilní aerobní čištění odpadních vod

Ačkoli bylo termofilní aerobní biologické čištění předmětem výzkumu již v 50. letech minulého století, až v poslední době byla soustředěna větší pozornost k vývoji metod a zařízení pro tento proces. Přesto stále ještě nejsou plně k dispozici znalosti důležitých parametrů a požadavků na provoz. Termofilní aerobní čištění je totiž po stránce fyzikální, chemické i biologické natolik odlišné od čištění aktivovaným kalem, že znalosti těchto obvyklých postupů nejsou příliš užitečné [45].

Termofilní aerobní čištění vod má výhody především v podobě vyšších degradačních rychlostí, rychlé inaktivace patogenů a nízké produkci biomasy. Vyšší biodegradační rychlost umožňuje kratší čas zdržení, čímž se snižují také investiční náklady na zařízení. Nevýhodou jsou naopak vysoké náklady na aeraci, slabá flokulace bakterií a problémy s pěněním. Náklady na vzdušnění nejsou nevýhodou jen v porovnání s anaerobními technologiemi, ale i vzhledem k mezofilním aerobním procesům. Špatné usazování mikroorganismů ztěžuje separaci biomasy, a je tak často limitujícím faktorem účinnosti procesu [45].

Poměrně malé jsou znalosti o mikroorganismech účastnících se termofilního aerobního čištění. Dominantní jsou hlavně aerobní heterotrofové, prokázány byly rody *Bacillus*, *Thermus*, proteobakterie a aktinomycety. Termofilní zástupci rodu *Bacillus* mají široké enzymové vybavení, ale také značné výživové nároky, které mohou komplikovat proces. Rod *Thermus* je citlivý na středně až vysoce koncentrované substráty, a proto se příliš neuplatňuje v silně znečištěných vodách [45, 46].

Protože náklady na zvýšení teploty nad 45 °C v provozních zařízení jsou příliš velké, termofilního aerobního procesu je vhodné využívat zejména k čištění odpadních vod z těch průmyslových podniků, které produkují odpadní vody s vysokou teplotou, např. papírenský průmysl. Také je vhodné čistit tímto způsobem vysoce koncentrované odpadní vody, které podléhají autotermnímu rozkladu a dále lze zavést termofilní čištění v místech, kde se nachází zdroj přebytečného tepla, které by jinak zůstalo nevyužité [45].

Autotermní termofilní aerobní stabilizace (ATAD) využívá stejného principu jako kompostování – teplo zprostředkované mikroorganismy dosáhne hodnoty, která udrží teplotu v reaktoru mezi 45 – 65 °C. Základní podmínkou tohoto provozu je dostatečně zahuštěný vstupní kal, který obsahuje dostatek snadno rozložitelných organických látek, dále je třeba zabezpečit efektivní aeraci a míchání a dobrou izolaci reaktoru. Produktem ATAD je hygienizovaný kal třídy A, který lze bez omezení aplikovat na zemědělské půdy jako hnojivo [47].

1.5.2.3 Biosorpce těžkých kovů termofilními mikroorganismy

Biosorpce je způsob čištění odpadních vod od těžkých kovů, přičemž funguje na poněkud jiných principech než výše zmíněné způsoby, které jsou založeny na odbourávání převážně organických látek pomocí metabolismu mikroorganismů. Biosorpce je na metabolismu nezávislá, uplatňují se fyzikálně-chemické interakce mezi kovem a funkčními skupinami přítomnými na povrchu mikrobiální buňky a mikroorganismy tak slouží jako sorbent. Podrobněji se biosorpcí zabývá kapitola 1.1 [2].

Studii biosorpčních potenciálů termofilních mikroorganismů nebylo na rozdíl od studií s mezofilními druhy provedeno mnoho. Přitom biosorpce termofilními mikroorganismy se může kvantitativně i kvalitativně lišit, a to vlivem prostředí, ve kterém mikroorganismy žijí. Termofilní mikroorganismy jsou zvýšeným teplotám různě uzpůsobeny, vliv na biosorpci může mít jejich odlišné fosfolipidové složení. Některá geologická a antropogenní termální prostředí také často vykazují vysoké koncentrace rozpuštěných kovů, proto mikroorganismy z nich izolované mohou být uzpůsobené specifickou buněčnou stěnou [48, 49].

V jedné ze studií byla termofilními mikroorganismy testována biosorpce kadmia. Z 26 termofilních bakterií rodu *Aneurinibacillus*, *Anoxybacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* a *Geobacillus* byla po počátečním testu toxicity na kadmium prokázána nejvyšší tolerance u zástupců rodu *Geobacillus*. Pro další zkoumání byly vybrány bakterie *Geobacillus stearothermophilus* a *Geobacillus thermocatenulatus*, podle jejichž biosorpčních vlastností byl navržen model pro kvantifikaci adsorpce kadmia termofilními mikroorganismy [48].

V jiné studii byly jako biosorbenty pro ionty Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Mn^{2+} použity termofilní bakterie *Geobacillus toebii* sub. sp. *decanicus* a *Geobacillus thermoleovorans* sub. sp. *stromboliensis*. Aplikací Langmuirovy izotermy na získané výsledky bylo zjištěno, že biosorpce probíhá jako jednovrstvá adsorpce na vazebná místa povrchu biosorbentu. Vyhodnocení FT-IR spekter ukázalo, že hlavními vazebnými místy jsou aminy, karboxyly a aromatické skupiny [49].

Biosorpční kapacita byla také zkoumána u bakterie *Geobacillus thermodenitrificans*, která vykazovala dobré výsledky zejména při sorpci Fe^{3+} , Cr^{3+} a Co^{2+} [50].

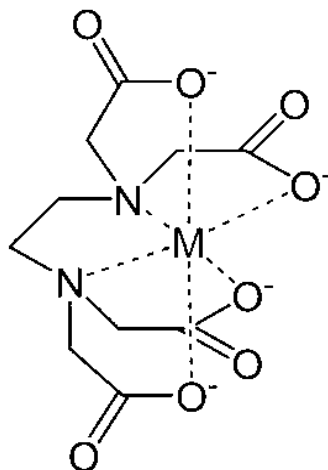
Nicméně, existuje také studie, která srovnává sorpční schopnosti termofilních a mezofilních mikroorganismů a v ní se uvádí, že termofilní mikroorganismy mají nižší hustotu sorpčních míst než mezofilní druhy. Vyslovuje také hypotézu, že celková hustota sorpčních míst na buněčné stěně je nepřímo úměrná teplotě růstu. Pro tuto hypotézu je však třeba dalších studií, neboť prozatím nebyla potvrzena [51].

1.6 Analytické metody

1.6.1 Komplexometrie

Komplexometrické titrace, uvedené do analytické chemie v první polovině 20. století, byly po dlouhou dobu jednou z hlavních metod anorganické analýzy. Jejich výhoda spočívá v jednoduchosti a nenáročnosti na vybavení laboratoře [52].

Komplexometrické titrace využívají schopnosti aminopolykarboxylových kyselin tvořit s některými kationty kovů komplexy, které jsou dobře rozpustné ve vodě a jen nepatrně disociují. Dominující postavení má v komplexometrických stanoveních disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové (EDTA), známá také pod názvem Chelaton 3. Všechny komplexy EDTA s kationty kovů mají složení 1 : 1 bez ohledu na mocnost kovu (Obr. 7) [52, 53].



Obr.7. : Struktura komplexu EDTA s obecným kovem M [53]

Principem komplexometrických titrací je přidávání EDTA k roztoku stanovovaného iontu až do bodu ekvivalence, ve kterém jsou právě všechny kationty kovu vázány do komplexu s EDTA. Bod ekvivalence se zjišťuje pomocí komplexometrických indikátorů. Komplexy s EDTA se vytvářejí postupně, nejprve s volnými kationty a poté vytěsněním kationtů z komplexů s indikátorem, které jsou méně stabilní. Komplexy kovu s indikátorem jsou jinak zbarveny než volný indikátor, a proto změna zbarvení roztoku umožňuje rozpoznat konec titrace. Titraci je třeba provádět při určitém pH titrovaného roztoku, protože při reakci se uvolňují protony a také stálost komplexů EDTA s kovovými ionty závisí na hodnotě pH. Požadované pH se proto zajišťuje tlumivými roztoky [53].

1.6.1.1 Stanovení mědi

Měďnatý ion tvoří s EDTA v kyselém prostředí intenzívně modře zbarvený komplex. Pro přímé stanovení mědi se používá indikátor murexid ve slabě amoniakálním prostředí, ve kterém je modrý komplex Cu-EDTA podstatně méně zbarven. Koncentrace amoniaku je však značně kritická. Při titraci je výrazný barevný přechod, a to ze žlutého zbarvení na fialové [52].

1.6.1.2 Stanovení olova

Stanovení olova je proveditelné přímo jak v kyselém, tak i alkalickém prostředí. Olovnatý kation neblokuje žádné indikátory. V alkalickém prostředí je vhodným indikátorem Erio T, pro kyselé prostředí jsou doporučeny indikátory methylthymolová modř a xylenolová oranž, jejichž barevná změna při pH 5 – 5,5 v roztocích tlumených urotropinem je nejostřejší [52].

1.6.1.3 Stanovení zinku

Zinek tvoří s EDTA dostatečně stabilní komplex, a to i v slabě kyselém prostředí, kdy je stanovitelný přímou titrací ještě při pH 4. Jako indikátor se doporučuje xylenolová oranž, která poskytuje v roztocích tlumených urotropinem velmi ostrý barevný přechod z červenofialové do citrónově žluté [52].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce je studium biosorpce iontů Cu^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} termofilními bakteriemi *Geobacillus thermodenitrificans* a *Geobacillus thermocatenulatus*.

2.2 Použitý materiál, chemikálie a přístroje

2.2.1 Bakteriální kmeny

Ke studiu biosorpčních schopností byly vybrány dva kmeny rodu *Geobacillus*:

- *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566
- *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809

Bakteriální kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

2.2.2 Chemikálie

2.2.2.1 Pro přípravu kultivačního média

pepton
hovězí extrakt
 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a.

2.2.2.2 Pro přípravu roztoků těžkých kovů

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ p.a.
 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ p.a.
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ p.a.

2.2.2.3 Pro komplexometrické stanovení

EDTA p.a.
murexid
xylenolová oranž
urotropin
 NH_4Cl
 NH_3 roztok 25 %
NaOH
 HNO_3 65%

2.2.3 Přístroje

fermentor New Brunswick BioFlo/CelliGen 115
termostatovaná třepačka Heidolph Unimax 1010
termostatovaná třepačka Heidolph Promax 1020
centrifuga Hettich zentrifugen EBA 20
analytické váhy Ohaus Pioneer
pec Mora 524
přístroj pro měření buněčné hustoty Biowave WPA CO 8000
pH metr Hanna HI 98129

2.3 Použité metody

2.3.1 Kultivace bakterií

2.3.1.1 Kultivační médium

Oba kmeny bakterií byly kultivovány na doporučeném Bacillus médiu, jehož složení je:

pepton	5 g
masový extrakt	3 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01 g
destilovaná voda	1000 ml

2.3.1.2 Kultivační podmínky

Submerzní kultivace bakterií byla prováděna v 250 ml Erlenmeyerových baňkách se 100 ml kultivačního média, které bylo zaočkováno 10 ml oživené lyofilizované kultury. Kultivace obou kmenů probíhala na termostatované třepačce při stejných podmínkách, tj. při 65 °C a otáčkách 110 min⁻¹. Takto nakultivovaná biomasa byla použita jako inokulum pro stanovení růstových křivek a pro zaočkování do fermentoru.

2.3.2 Stanovení růstových křivek

V průběhu kultivace (postup a podmínky viz. kap. 2.3.1.2) byly v pravidelných intervalech odebrány vzorky, u kterých byla turbidimetricky měřena optická hustota při 600 nm proti blanku, kterým bylo čisté médium. Kultivace byla opakována s jiným startovacím časem tak, aby byly pokryty chybějící odběry způsobené noční pauzou.

2.3.3 Kultivace biomasy ve fermentoru

Do fermentoru bylo připraveno 1,5 l kultivačního média a zaočkováno 150 ml inokula. Kultivace *Geobacillus thermodenitrificans* probíhala aerobně při 65 °C, otáčkách 100 min⁻¹, pH 6,0 po dobu 24 h; kultivace *Geobacillus thermocatenulatus* probíhala aerobně při 60 °C, otáčkách 100 min⁻¹, pH 6,0 po dobu 24 h.

2.3.3.1 Kultivace na odpadní syrovátce

Snížení nákladů na kultivaci bakterií lze uskutečnit využitím syrovátky jako kultivačního média. Syrovátku dodala firma Pribina spol. s r.o., kde vzniká jako odpadní produkt při výrobě sýru Hermelín. Před kultivací byla syrovátka zbavena bílkovin – okyselením $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ na pH 4,6 a povařením na vodní lázni po dobu 20 min se vysrážely kaseiny a α - a β -laktoglobuliny, které byly odstředěny při otáčkách 5000 min^{-1} (10 min). Nakonec bylo pomocí $1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$ upraveno pH na 6.

Kultivace probíhala ve fermentoru, kde bylo zaočkováno 1,5 l upravené syrovátky 150 ml rekultivovaného inokula. Podmínky kultivace byly shodné s podmínkami uvedenými v kap. 2.3.3.

2.3.4 Příprava biomasy na biosorpci

Biomasa nakultivovaná ve fermentoru byla odstředěna na centrifuze při otáčkách 6000 min^{-1} po dobu 10 min. Poté byla 2x promyta deionizovanou vodou, pokaždé odstředěna za stejných výše uvedených podmínek, nakonec rozsuspendována v malém množství deionizované vody a sušena v peci při 80°C do konstantní hmotnosti. Pro získání co největšího specifického povrchu byla suchá biomasa rozetřena v porcelánové misce.

2.3.5 Příprava roztoků těžkých kovů

Navážky jednotlivých solí byly v odměrných baňkách rozpuštěny v destilované vodě na požadovanou koncentraci. Úprava pH byla provedena pomocí $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$ a $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$. Přesná koncentrace roztoků pak byla stanovena komplexometrickými titracemi. Vzhledem k tomu, že experimenty byly prováděny postupně, byly po 5 dnech připravovány vždy nové roztoky, aby se předešlo jejich vypařování a změně koncentrace. Z tohoto důvodu byly také roztoky uchovávány v chladničce při 4°C .

2.3.6 Biosorpční experimenty

Biosorpční experimenty byly provedeny ve vsádkovém uspořádání. K 20 ml testovaného roztoku těžkého kovu v 100 ml Erlenmeyerové baňce bylo přidáno přesné množství suché biomasy *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566 (dále jen CCM 2566), resp. *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809 (dále jen CCM 2809) a suspenze byla nechána inkubovat na třepačce při teplotě 25°C a otáčkách 100 min^{-1} po dobu 12 hodin. Po této době byla biomasa odstředěna při otáčkách 6000 min^{-1} po dobu 10 min. Supernatant byl použit pro komplexometrické stanovení konečné koncentrace těžkého kovu.

2.3.6.1 Vliv pH

Pro posouzení, při kterém pH probíhá biosorpce nejúčinněji, byla do 50 ml odměrných baněk připravena sada roztoků kovů dle následujícího rozpisu:

Tři roztoky Cu^{2+} s pH 3, 4 a 5, vždy o koncentraci $0,5 \text{ g.l}^{-1}$;
tři roztoky Zn^{2+} s pH 3, 4 a 5, vždy o koncentraci $0,5 \text{ g.l}^{-1}$;

tři roztoky Pb^{2+} s pH 3, 4 a 5, vždy o koncentraci 1 g.l^{-1} .

Z každého roztoku bylo použito 20 ml, ke kterým bylo přidáno 20 mg suché biomasy (s přesností na 0,1 mg). Dále bylo postupováno, jak je uvedeno v kap. 2.3.6.

2.3.6.2 Vliv koncentrace biomasy

Ke 20 ml roztoku kovu o koncentraci $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ (Cu^{2+} , Zn^{2+}), resp. 1 g.l^{-1} (Pb^{2+}) a optimálním pH (zjištěném předcházejícím stanovením) bylo přidáno různé množství suché biomasy - 10, 20, 40 a 60 mg (s přesností na 0,1 mg). Dále bylo postupováno, jak je uvedeno v kap. 2.3.6.

2.3.6.3 Vliv kultivace na syrovátce

Postup pro tento experiment je totožný s předcházejícím, ale byla využita biomasa kultivovaná na syrovátce. Opět bylo ke 20 ml roztoku kovu o koncentraci $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ (Cu^{2+} , Zn^{2+}), resp. 1 g.l^{-1} (Pb^{2+}) a optimálním pH přidáno různé množství suché biomasy - 10, 20, 40 a 60 mg (s přesností na 0,1 mg). Dále bylo postupováno, jak je uvedeno v kap. 2.3.6.

2.3.6.4 Vliv koncentrace těžkých kovů

Pro posouzení závislosti sorpční kapacity bakterií na koncentraci kovů byly připraveny roztoky o různých koncentracích, ke kterým bylo přidáno 40 mg suché biomasy (s přesností na 0,1 mg) a dále bylo postupováno, jak je uvedeno v kap. 2.3.6. Roztoky měly následující složení:

roztok Cu^{2+} o koncentracích 0,5; 0,6; 0,7 a $0,8 \text{ g.l}^{-1}$ a optimálním pH;
roztok Zn^{2+} o koncentracích 0,5; 0,6; 0,7 a $0,8 \text{ g.l}^{-1}$ a optimálním pH;
roztok Pb^{2+} o koncentracích 1; 1,1; 1,2 a $1,3 \text{ g.l}^{-1}$ a optimálním pH.

2.3.6.5 Použité výpočetní vztahy

Úbytek kovu byl počítán ze vztahu:

$$\text{úbytek kovu (\%)} = \frac{c_p - c_k}{c_p} \cdot 100, \quad (9)$$

kde c_p je počáteční koncentrace kovu (g.l^{-1}), c_k je konečná koncentrace kovu (g.l^{-1}).

Sorpční kapacita byla počítána ze vztahu:

$$q = \frac{V (c_p - c_k)}{m}, \quad (10)$$

kde V je objem roztoku obsahující kov (l), c_p je počáteční koncentrace kovu (mg.l^{-1}) a c_k konečná koncentrace kovu (mg.l^{-1}) a m je hmotnost sušiny biosorbentu (g).

2.3.7 Chelatometrické stanovení koncentrace těžkých kovů

2.3.7.1 Stanovení mědi

Pro stanovení byly odebírány 2 ml vzorku, které byly přiměřeně zředěny destilovanou vodou (asi 25 ml). K roztoku bylo přidáno asi 5 ml 1 mol.l⁻¹ NH₄Cl a kapka NH₃ (roztok NH₃ zředěný vodou 1:1), aby výsledné pH bylo přibližně 8. Po přidání indikátoru murexidu byl vzorek titrován 0,001 mol.l⁻¹ EDTA do první změny žlutého zabarvení na fialové. Každý vzorek byl titrován 3x.

2.3.7.2 Stanovení olova

Pro stanovení byly odebírány 2 ml vzorku, které byly přiměřeně zředěny destilovanou vodou (asi 25 ml) a přidáno několik kapek 0,2% roztoku xylenolové oranže a po částech tuhý urotropin až do vzniku intenzivního červenofialového zabarvení. Vzorek byl titrován 0,001 mol.l⁻¹ EDTA do první změny zabarvení na citrónově žluté. Každý vzorek byl titrován 3x.

2.3.7.3 Stanovení zinku

Pro stanovení byly odebírány 2 ml vzorku, které byly přiměřeně zředěny destilovanou vodou (asi 25 ml) a přidáno několik kapek 0,1% roztoku xylenolové oranže a vzniklý žlutý roztok byl neutralizován 1 mol.l⁻¹ NaOH až do vzniku červeného zabarvení. Poté byla po kapkách přidávána 1 mol.l⁻¹ HNO₃, aby červené zabarvení zmizelo. Nakonec byl přidáván tuhý urotropin, až se opět červené zabarvení objevilo. Vzorek byl titrován 0,001 mol.l⁻¹ EDTA do první změny zabarvení na citrónově žluté. Každý vzorek byl titrován 3x.

2.3.7.4 Použité výpočetní vztahy

Výpočet koncentrace chelatonu:

$$c_{EDTA} = \frac{m}{M \cdot V}, \quad (11)$$

kde m je navážka chelatonu (g), M molekulová hmotnost chelatonu (g.mol⁻¹) a V je objem roztoku chelatonu (l).

Výpočet koncentrace kovových iontů:

$$c_{M^{2+}} = \frac{c_{EDTA} \cdot V_{EDTA} \cdot f \cdot A}{V}, \quad (12)$$

kde c_{EDTA} je koncentrace chelatonu (mol.l⁻¹), V_{EDTA} je spotřeba chelatonu při titraci (l), f je faktor ředění, A je atomová hmotnost kovu (g.mol⁻¹) a V je objem roztoku kovu (l).

Naměřená data byla statisticky zpracována na hladině statistické významnosti 0,05 určením intervalu spolehlivosti, který se vypočítá ze vztahu:

$$\bar{x} \pm t_{\alpha, \nu} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (13)$$

kde $\bar{x}$ je aritmetický průměr, $t_{\alpha, \nu}$ je tabelovaný Studentův koeficient s v stupni volnosti a na hladině významnosti α , s je směrodatná odchylka a n počet výsledků.

Výpočet aritmetického průměru:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (14)$$

kde x_i je naměřená hodnota, n je počet výsledků.

Výpočet směrodatné odchylky:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}, \quad (15)$$

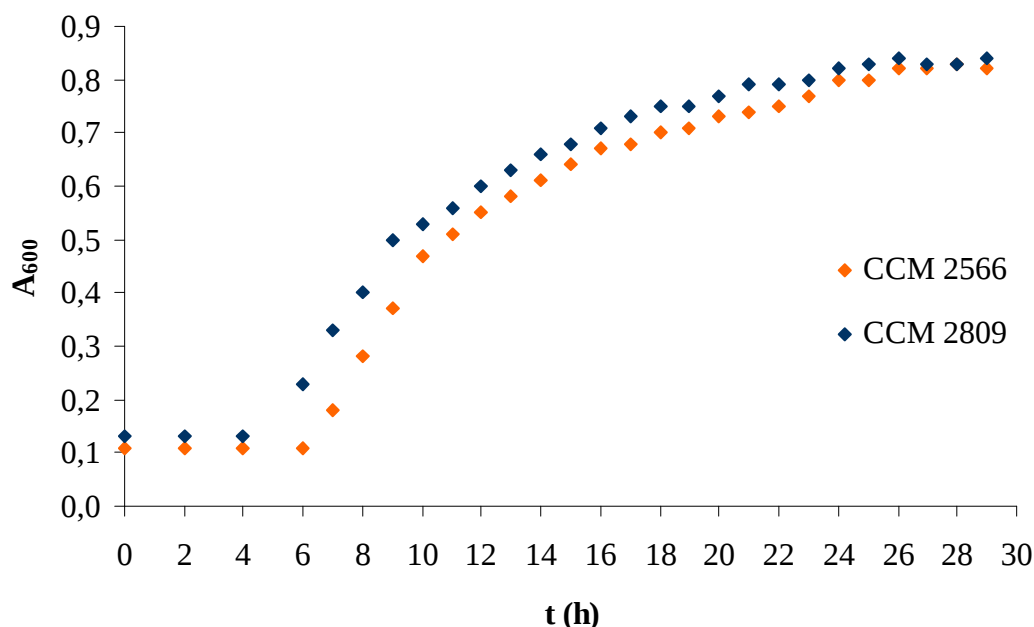
kde x_i je naměřená hodnota, $\bar{x}$ je aritmetický průměr, n počet výsledků.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Růstové křivky

Hodnoty absorbance při 600 nm získané turbidimetricky během kultivace bakterií *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566 a *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809 při 65 °C jsou uvedeny v Příloze. Hodnoty byly vyneseny do Grafu 1 jako závislost absorbance na čase.

Graf 1: Růstové křivky CCM 2566 a CCM 2809



Z růstových křivek jsou patrné všechny fáze růstu – lag fáze, exponenciální i stacionární fáze. Srovnáním obou růstových křivek vyplývá, že bakterie CCM 2809 ze začátku rostla rychleji, navíc lag fáze u ní trvala jen přibližně 4 hodiny, zatímco u CCM 2566 trvala přibližně 6 hodin. Do stacionární fáze se však obě bakterie dostaly po zhruba stejné době, tj. kolem 25. hodiny a narostlo i téměř stejné množství biomasy. Pro biosorpční experimenty je vhodné pracovat s biomasou nacházející se v pozdní exponenciální fázi, kdy je přítomno co největší množství živých buněk. Z tohoto důvodu byly pro veškeré experimenty obě bakterie kultivovány vždy po dobu 24 hodin.

3.2 Optimalizace komplexometrických titrací

Biosorpční schopnosti mikroorganismů byly u převážné většiny studií posuzovány při nízkých koncentracích kovů ($10 - 300 \text{ mg.l}^{-1}$), které byly měřeny nejčastěji metodou atomové absorpční spektrometrie. Pro tuto práci měl být původně také využit školní atomový absorpční spektrometr, ale z důvodu jeho poruchy bylo nutné přistoupit k metodě jiné. Zvoleny byly komplexometrické titrace. Jejich mez stanovitelnosti je však vyšší než u atomové absorpční spektrometrie, a proto byly zvoleny vyšší počáteční koncentrace kovů.

Pro Cu^{2+} a Zn^{2+} ionty byla určena jako vhodná koncentrace od 500 mg.l^{-1} , pro Pb^{2+} ionty od 1000 mg.l^{-1} . Při koncentracích 500 mg.l^{-1} resp. 1000 mg.l^{-1} byl již dostatečně výrazný barevný přechod při titraci $0,001 \text{ mol.l}^{-1}$ EDTA a zároveň signifikantní spotřeba chelatonu (přibližně 10 ml a více).

3.3 Biosorpční experimenty

3.3.1 Vliv pH

Podle literatury je pro biosorpci obecně nejvhodnější rozmezí pH 3 – 6 [9]. Při úpravě roztoků docházelo u všech tří kovů při $\text{pH} > 5,5$ k hydrolytickému vylučování hydroxidů daných iontů, což by ovlivňovalo biosorpci, proto byl posuzován vliv pouze tří hodnot, a to pH 3, 4 a 5.

Spotřebované objemy chelatonu jsou uvedeny v Příloze (stejně tak jako veškeré ostatní naměřené spotřeby chelatonu při dalších experimentech). Tab. 3 uvádí vypočítané počáteční a konečné koncentrace a procentuální úbytky kovů.

Výpočet koncentrací byl proveden pomocí vztahů (11) a (12) a data byla statisticky zpracována v programu Excel použitím funkcí PRUMER, SMODCH a CONFIDENCE:

$$\text{navážka EDTA do 1 l byla } 0,3730 \text{ g} \Rightarrow c_{\text{EDTA}} = \frac{m}{M \cdot V} = \frac{0,373}{372,24 \cdot 1} = 0,001002 \text{ mol.l}^{-1}$$

Příklad výpočtu počáteční koncentrace roztoku Cu^{2+} o pH 3:

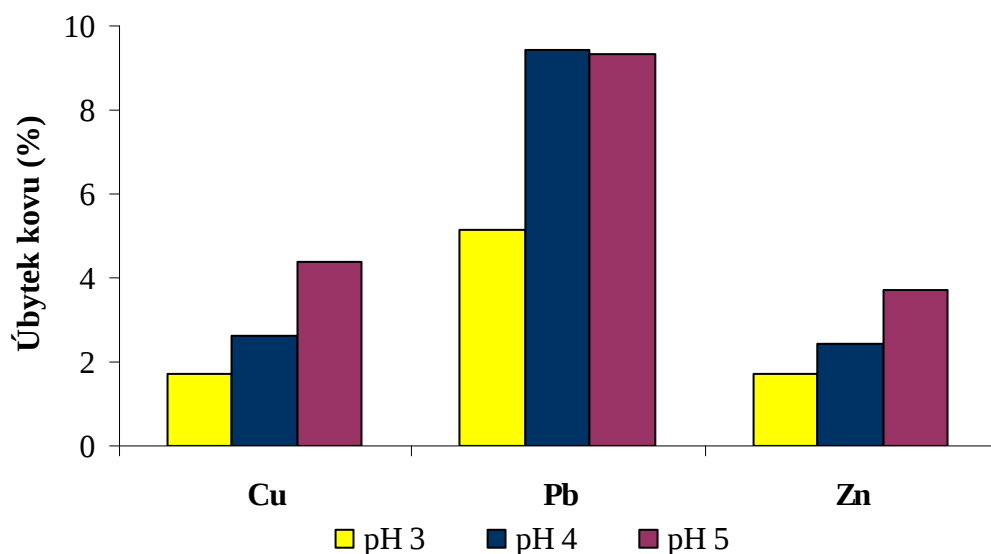
$$\text{průměrná spotřeba EDTA byla } 15,37 \text{ ml, na titraci bylo odpipetováno } 2 \text{ ml z } 50 \text{ ml zásobního roztoku} \Rightarrow c_p = \frac{c_{\text{EDTA}} \cdot V_{\text{titr}} \cdot f \cdot A}{V} = \frac{0,001002 \cdot 0,01537 \cdot 25 \cdot 63,546}{0,05} = 0,489 \text{ g.l}^{-1}$$

Tímto způsobem byly počítány všechny následující koncentrace roztoků.

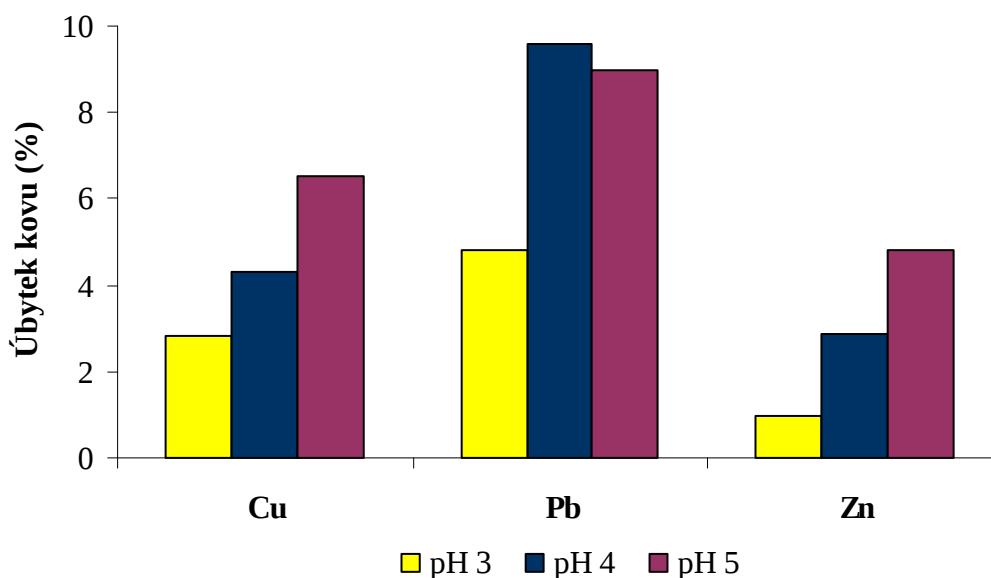
Tab. 3: Hodnoty úbytů kovů při různých pH

kov	pH	$c_p (\text{g.l}^{-1})$	$c_k (\text{g.l}^{-1})$		úbytek kovu (%)	
			CCM 2566	CCM 2809	CCM 2566	CCM 2809
Cu	3	$0,489 \pm 0,002$	$0,481 \pm 0,001$	$0,475 \pm 0,002$	1,735	2,820
	4	$0,483 \pm 0,002$	$0,470 \pm 0,002$	$0,462 \pm 0,002$	2,637	4,286
	5	$0,4961 \pm 0,0008$	$0,474 \pm 0,003$	$0,464 \pm 0,002$	4,385	6,524
Pb	3	$1,076 \pm 0,006$	$1,02 \pm 0,01$	$1,024 \pm 0,009$	5,145	4,823
	4	$1,047 \pm 0,003$	$0,948 \pm 0,006$	$0,946 \pm 0,007$	9,421	9,587
	5	$1,000 \pm 0,006$	$0,907 \pm 0,006$	$0,910 \pm 0,006$	9,343	8,997
Zn	3	$0,509 \pm 0,002$	$0,5003 \pm 0,0009$	$0,504 \pm 0,002$	1,717	0,966
	4	$0,512 \pm 0,002$	$0,500 \pm 0,003$	$0,498 \pm 0,002$	2,452	2,878
	5	$0,5118 \pm 0,0009$	$0,4927 \pm 0,0009$	$0,487 \pm 0,002$	3,735	4,803

Graf 2: Procentuální úbytek kovů při různých pH u CCM 2566



Graf 3: Procentuální úbytek kovů při různých pH u CCM 2809



Z výsledků je patrné, že pH roztoku kovu má na biosorpci poměrně výrazný vliv. U CCM 2566 je pro biosorpci Cu^{2+} a Zn^{2+} nejvhodnější pH 5, pro Pb^{2+} pH 4 (Graf 2). Literatura uvádí pro tento mikroorganismus optimální pH pro biosorpci Cu^{2+} hodnotu 7,5; pro Zn^{2+} 5 a Pb^{2+} 4,5 [50]. Pro poslední dva kovy se tedy výsledky shodují, u měďnatých iontů nemohlo být stanovení provedeno pro pH 7,5 kvůli výše uvedené skutečnosti, že již při pH 5,5 vytvářela měď sraženiny hydroxidu, které by biosorpci znemožňovaly.

U CCM 2809 jsou výsledky shodné – optimální pH pro biosorpci Cu^{2+} a Zn^{2+} je 5, pro Pb^{2+} pH 4 (Graf 3). Srovnání s literaturou není možné, protože tento mikroorganismus byl testován jen na biosorpci kadmia [48].

Pro další experimenty byly používány roztoky kovů o uvedených optimálních pH.

3.3.2 Vliv koncentrace biomasy

Dalším parametrem, který může ovlivňovat biosorpci, je koncentrace biosorbentu, tedy množství sorbující biomasy.

Výpočet sorpční kapacity byl proveden užitím vztahu (10):
Příklad výpočtu pro sorpční kapacitu Cu^{2+} kmenem CCM 2566 o koncentraci $0,5 \text{ g.l}^{-1}$, kdy bylo použito 20 ml roztoku a navážka biomasy byla 11,2 mg:

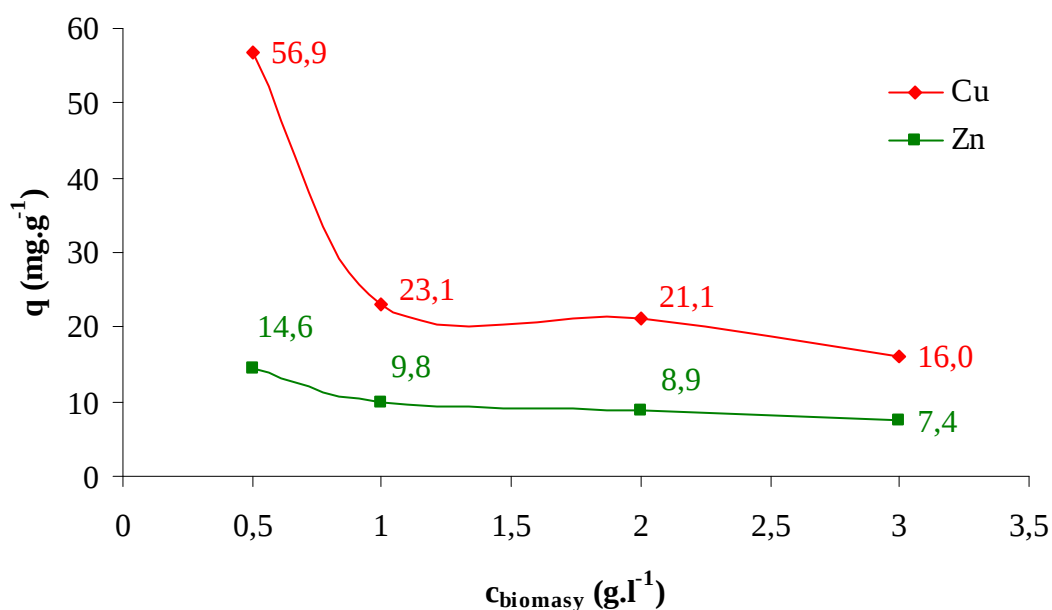
$$q = \frac{V \cdot (c_p - c_k)}{m} = \frac{0,02 \cdot (498,793 - 466,955)}{0,0112} = 56,9 \text{ mg.g}^{-1}$$

Geobacillus thermodenitrificans CCM 2566

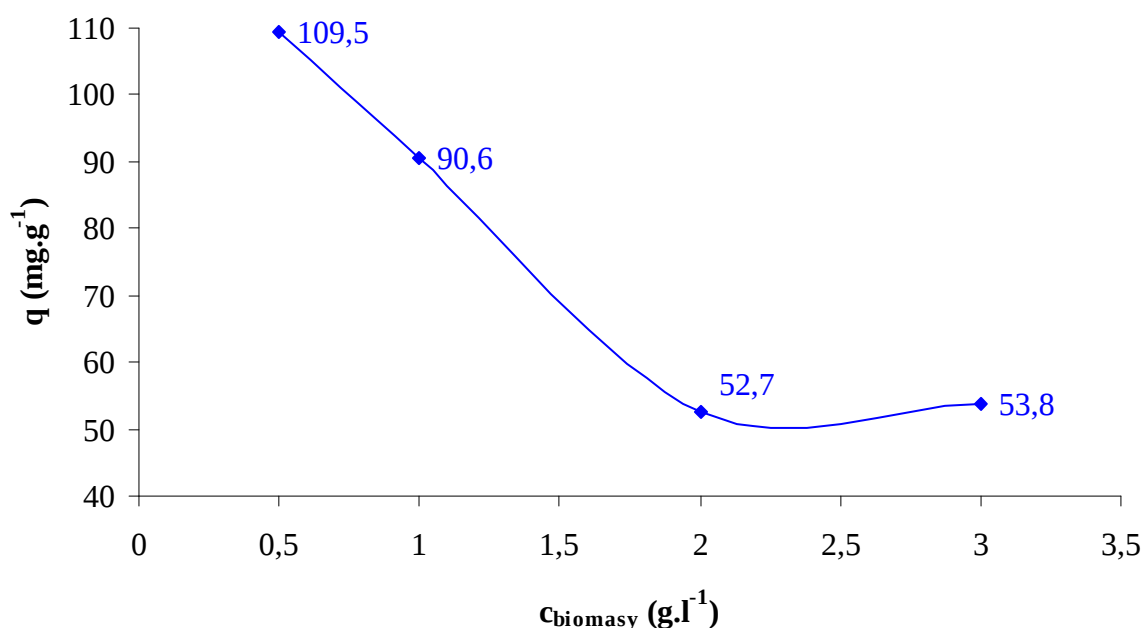
Tab. 4: Hodnoty sorpčních kapacit CCM 2566 při různých koncentracích biomasy

kov	$c_{\text{biomasy}} (\text{g.l}^{-1})$	$m_{\text{biomasy}} (\text{mg})$	$c_p (\text{g.l}^{-1})$	$c_k (\text{g.l}^{-1})$	$q (\text{mg.g}^{-1})$
Cu	0,5	11,2	$0,499 \pm 0,002$	$0,467 \pm 0,002$	56,9
	1	23,0	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,4898 \pm 0,0008$	23,1
	2	41,3	$0,501 \pm 0,002$	$0,457 \pm 0,007$	21,1
	3	61,8	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,467 \pm 0,002$	16,0
Pb	0,5	9,8	$1,002 \pm 0,005$	$0,948 \pm 0,006$	109,5
	1	21,0	$1,069 \pm 0,005$	$0,974 \pm 0,007$	90,6
	2	40,7	$1,069 \pm 0,005$	$0,962 \pm 0,003$	52,7
	3	61,8	$1,069 \pm 0,005$	$0,90 \pm 0,02$	53,8
Zn	0,5	9,0	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,5019 \pm 0,0009$	14,6
	1	22,2	$0,541 \pm 0,002$	$0,530 \pm 0,002$	9,8
	2	40,6	$0,541 \pm 0,002$	$0,523 \pm 0,004$	8,9
	3	60,8	$0,541 \pm 0,002$	$0,518 \pm 0,002$	7,4

Graf 4: Závislost sorpční kapacity CCM 2566 pro Cu^{2+} a Zn^{2+} na koncentraci biomasy



Graf 5: Závislost sorpční kapacity CCM 2566 pro Pb^{2+} na koncentraci biomasy



Závislosti sorpčních kapacit na koncentraci biomasy byly sestrojeny do jednoho grafu pro Cu^{2+} a Zn^{2+} , pro Pb^{2+} ionty musely být sestrojeny zvlášť, protože byly proměřovány při jiné koncentraci a nelze je tedy srovnávat se zbylými dvěma kovy.

U měďnatých iontů (Graf 4) je sorpční kapacita nejvyšší při použití $0,5 g.l^{-1}$ biomasy, a to $56,9 mg.g^{-1}$. Poté prudce klesá a při koncentracích 1, 2 a $3 g.l^{-1}$ se již příliš nemění a pohybuje se kolem hodnoty $20 mg.g^{-1}$. Taktéž u zinečnatých iontů je sorpční kapacita nejvyšší při koncentraci biomasy $0,5 g.l^{-1}$ ($14,6 mg.g^{-1}$). Na rozdíl od Cu^{2+} iontů však vliv koncentrace biomasy není tak výrazný. U Pb^{2+} iontů (Graf 5) není pokles tolik strmý, je téměř lineární až do koncentrace biomasy $2 g.l^{-1}$, kde klesá na hodnotu $52,7 mg.g^{-1}$. Při vyšší koncentraci biomasy se sorpční kapacita nemění. Tyto výsledky korespondují se závěry v literatuře, že snižováním koncentrace biomasy se zvyšuje její sorpční kapacita, i když absolutní úbytek kovu se naopak zvyšuje se zvyšující se koncentrací biomasy. Použití nižší koncentrace biomasy je tedy účinnější. Důvodem snižující se sorpční kapacity při vyšších koncentracích biomasy mohou být vzájemné interakce mezi vazebnými místy [4, 49].

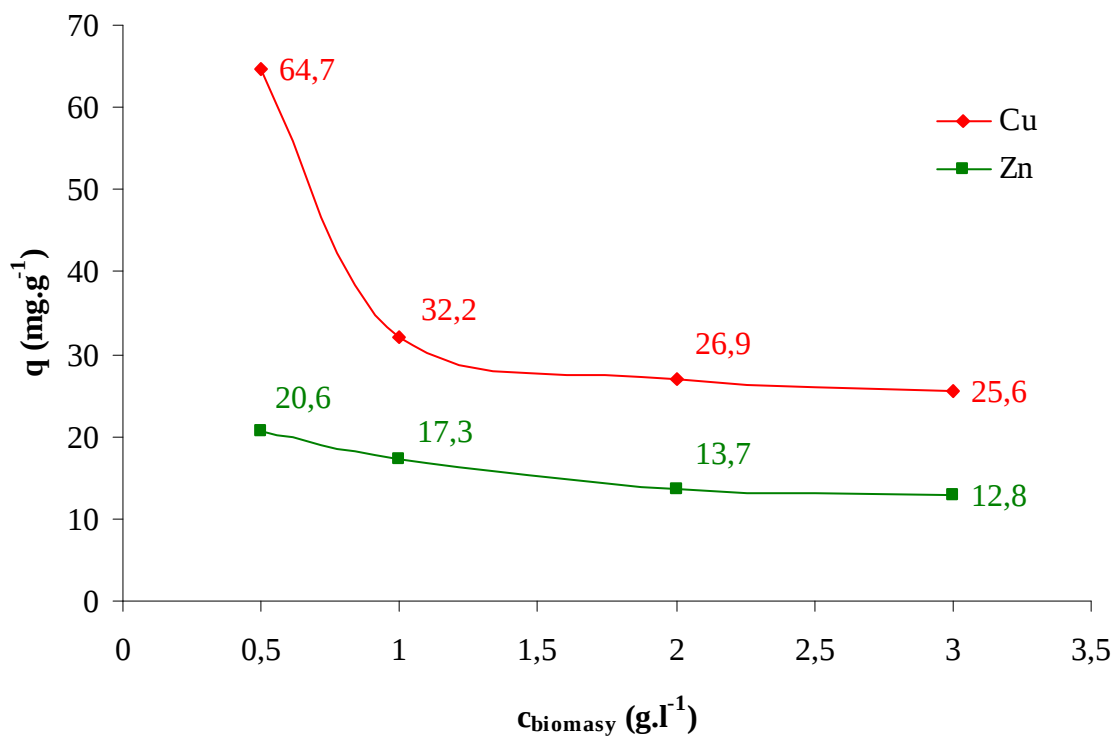
Bakterie *Geobacillus thermodenitrificans* CCM 2566 má vyšší sorpční kapacitu pro Cu^{2+} než pro Zn^{2+} . To je ve shodě se studií zabývající se biosorpcí touto bakterií, ačkoli v ní se uvádí, že sorpční kapacita pro Zn^{2+} je $48,2 mg.g^{-1}$ a pro Cu^{2+} $50,0 mg.g^{-1}$. Tyto hodnoty jsou však zjištěny pro koncentraci kovu $175 mg.l^{-1}$, což je nejvyšší koncentrace, která byla v této studii použita, navíc při koncentraci biomasy $2 g.l^{-1}$. Závislosti sorpční kapacity na koncentraci biomasy se tato studie nezabývala. Nicméně porovnáním uvedených sorpčních kapacit pro danou koncentraci biomasy (Cu^{2+} $50,0 mg.g^{-1}$ vs. $21,1 mg.g^{-1}$ a Zn^{2+} $48,2 mg.g^{-1}$ vs. $8,9 mg.g^{-1}$) je možné usuzovat, že vysoké koncentrace kovu (zde přibližně $0,5 g.l^{-1}$) mohou biosorpci negativně ovlivňovat. Důvodem pro rozdílnou sorpční kapacitu však může být také odlišný původ kmene. Ve studii byl použit kmen izolovaný z řeky Dámodár v Indii, tudíž jeho buněčná stěna mohla být uzpůsobena výskytu těžkých kovů [50].

***Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809**

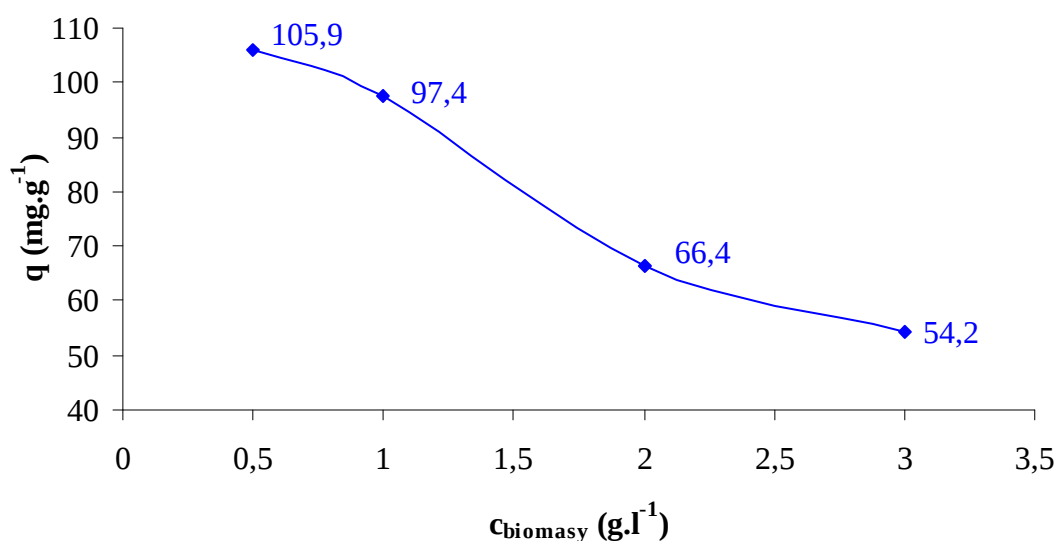
Tab. 5: Hodnoty sorpčních kapacit CCM 2809 při různých koncentracích biomasy

kov	$c_{\text{biomasy}} \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$m_{\text{biomasy}} \text{ (mg)}$	$c_p \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$c_k \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$q \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$
Cu	0,5	10,0	$0,499 \pm 0,002$	$0,4670 \pm 0,0008$	64,7
	1	19,8	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,4845 \pm 0,0008$	32,2
	2	41,8	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,460 \pm 0,004$	26,9
	3	61,4	$0,499 \pm 0,002$	$0,4208 \pm 0,0008$	25,6
Pb	0,5	9,8	$1,002 \pm 0,005$	$0,950 \pm 0,005$	105,9
	1	20,6	$1,002 \pm 0,005$	$0,901 \pm 0,007$	97,4
	2	39,6	$1,002 \pm 0,005$	$0,870 \pm 0,003$	66,4
	3	60,0	$1,002 \pm 0,005$	$0,84 \pm 0,01$	54,2
Zn	0,5	9,0	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,499 \pm 0,002$	20,6
	1	20,8	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,490 \pm 0,002$	17,3
	2	40,0	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,4812 \pm 0,0009$	13,7
	3	58,8	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,471 \pm 0,002$	12,8

Graf 6: Závislost sorpční kapacity CCM 2809 pro Cu^{2+} a Zn^{2+} na koncentraci biomasy



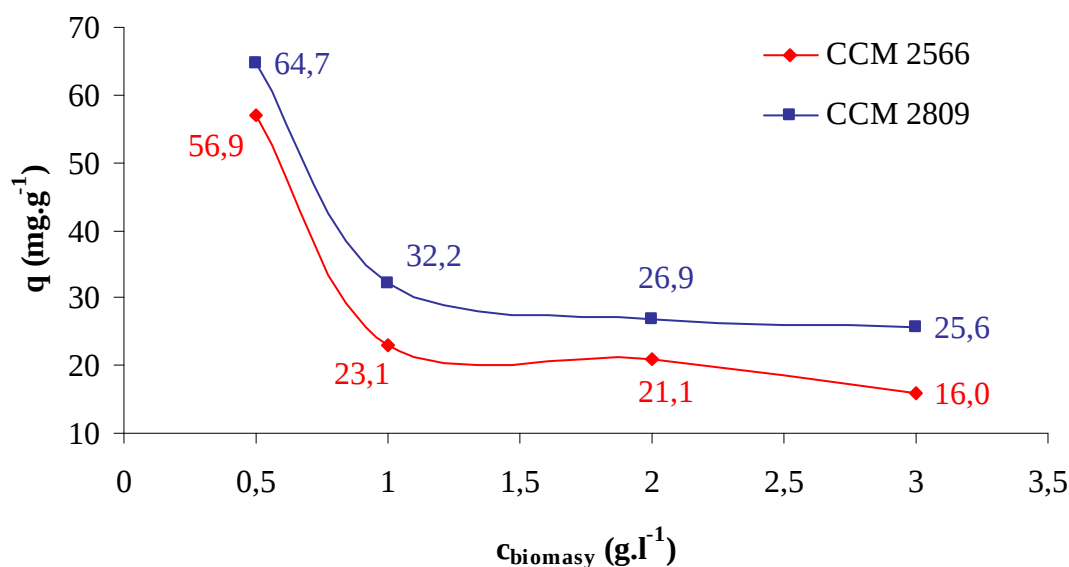
Graf 7: Závislost sorpční kapacity CCM 2809 pro Pb^{2+} na koncentraci biomasy



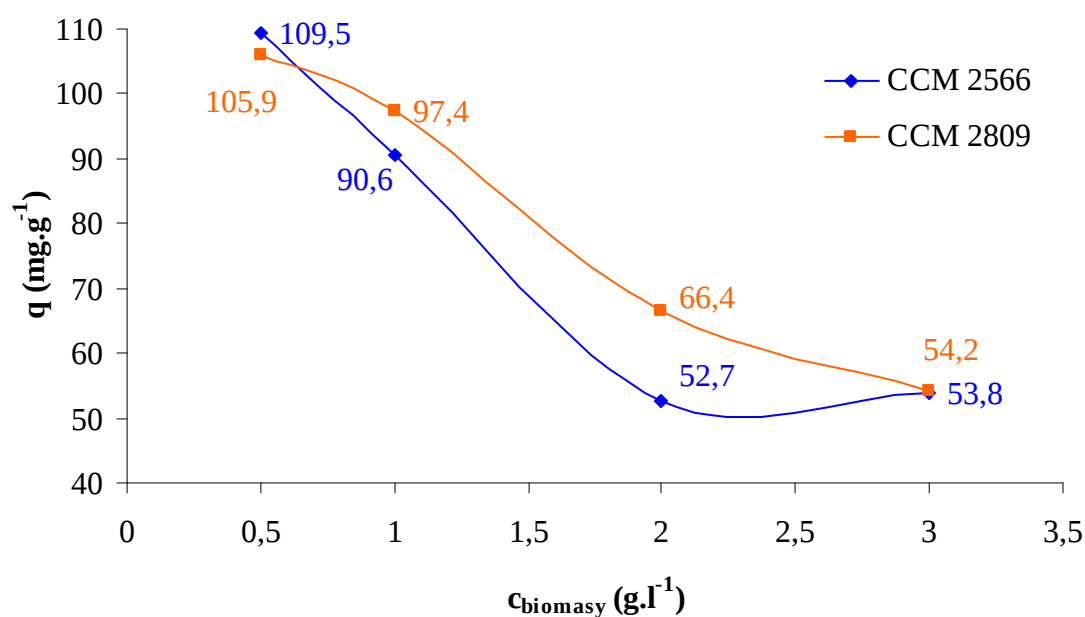
Sorpční kapacita pro měďnaté ionty kmene CCM 2809 (Graf 6) je nejvyšší při nejnižší koncentraci biomasy ($64,7 \text{ mg.g}^{-1}$), poté strmě klesá a od koncentrace biomasy 1 g.l^{-1} a vyšší se již příliš nemění. V případě Zn^{2+} platí opět nepřímá úměra, i když koncentrace biomasy už nemá tak výrazný vliv na sorpční kapacitu. Srovnáním sorpčních kapacit pro Cu^{2+} a Zn^{2+} platí, že kmen CCM 2809 má větší sorpční kapacitu pro měďnaté ionty. U olovnatých iontů (Graf 7) je pokles pozvolný, u nejnižších dvou koncentrací ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$ a 1 g.l^{-1}) není velký rozdíl v sorpčních kapacitách, proto koncentrace $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ není tolik účinná a tedy výhodná, protože absolutní úbytek kovu je nižší.

Pro zjištění, která bakterie má lepší sorpční schopnosti, byly závislosti sorpčních kapacit pro jednotlivé kovové ionty vyneseny do jednoho společného grafu pro obě bakterie.

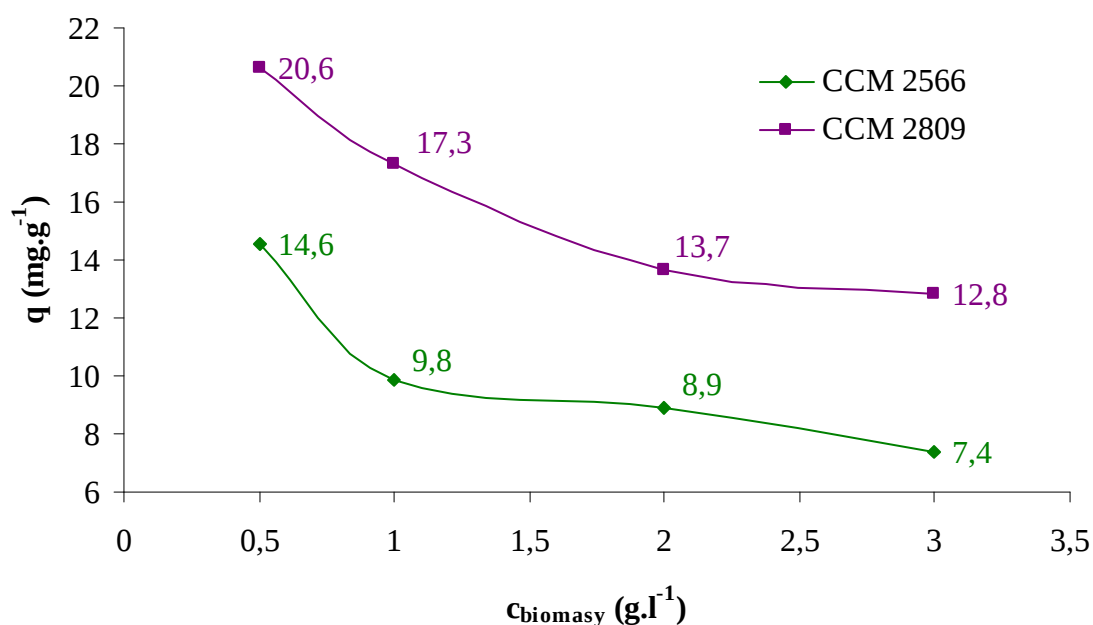
Graf 8: Porovnání sorpčních kapacit obou bakterií pro Cu^{2+}



Graf 9: Porovnání sorpčních kapacit obou bakterií pro Pb^{2+}



Graf 10: Porovnání sorpčních kapacit obou bakterií pro Zn^{2+}



Z Grafů 8, 9 a 10 je patrné, že bakterie *Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809 má v případě měďnatých a zinečnatých iontů zcela průkazně větší sorpční kapacitu, u olovnatých iontů je při koncentraci biomasy $0,5 g.l^{-1}$ sorpční kapacita sice nižší, ale nijak významně, proto lze říct, že obecně má bakterie *G. thermocatenulatus* CCM 2809 větší sorpční kapacitu pro všechny tři sledované kovy než bakterie *G. thermodenitrificans* CCM 2566. Vzhledem k podobnému průběhu srovnávaných křivek lze také předpokládat, že mechanismus biosorpce probíhá u obou bakterií podobně.

3.3.3 Vliv kultivace na syrovátce

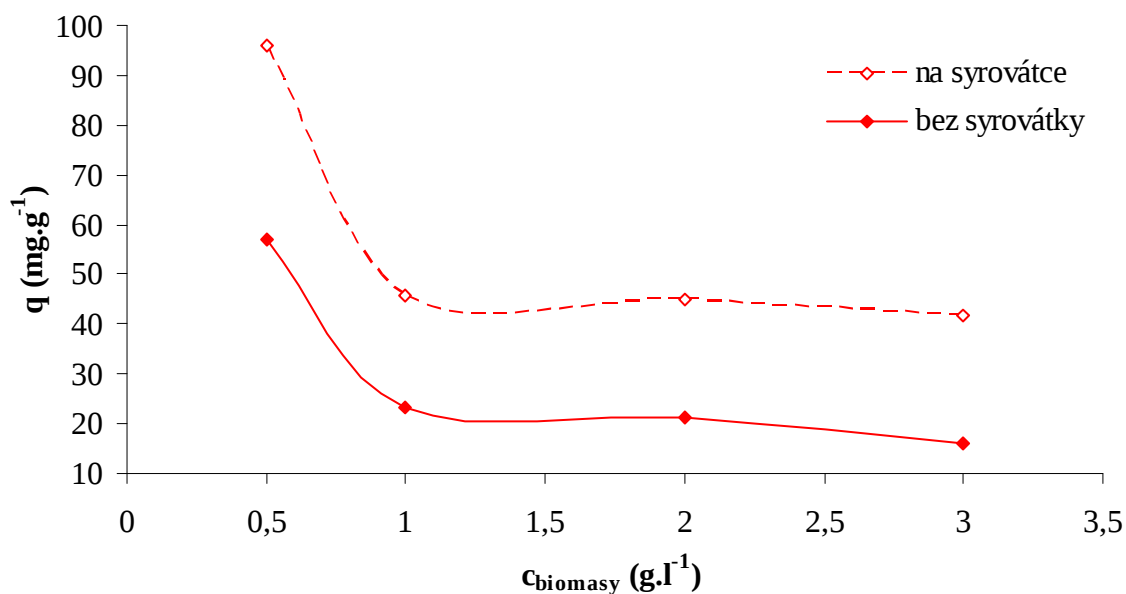
Pro tento experiment byly použity bakterie kultivované na syrovátce, jakožto odpadním produktu sloužícím jako levné živné médium. Cílem bylo posoudit, zda použití syrovátky neovlivňuje sorpční kapacitu.

Geobacillus thermodenitrificans CCM 2566

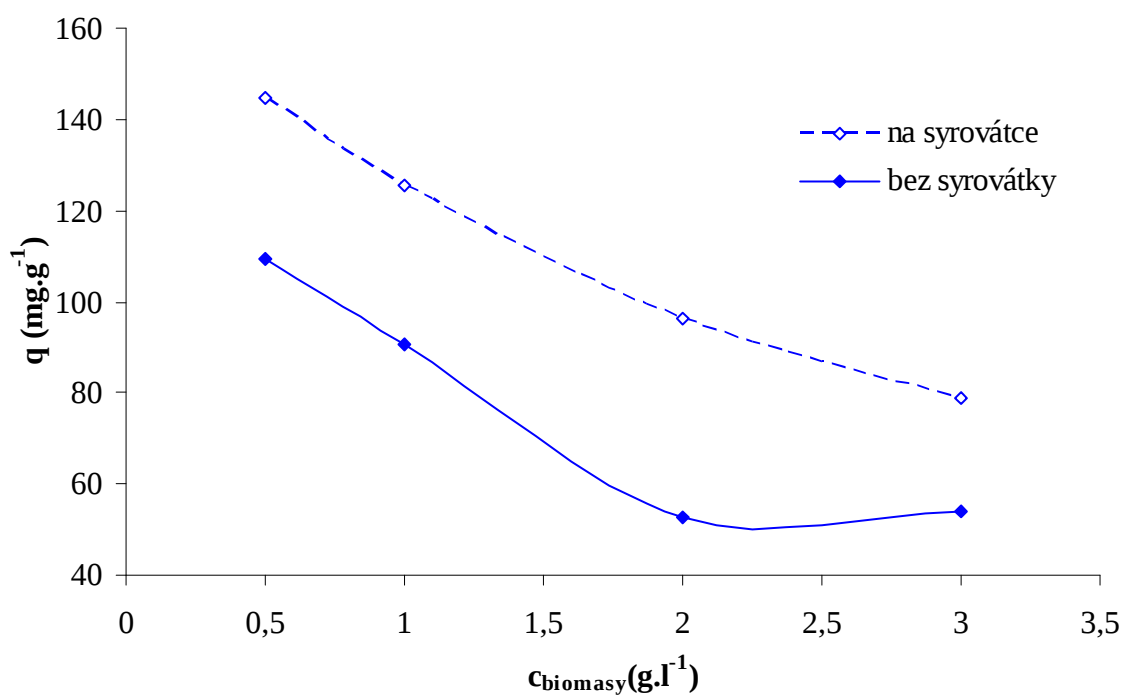
Tab. 6: Hodnoty sorpčních kapacit bakterie CCM 2566 kultivované na syrovátce při různých koncentracích biomasy

kov	$c_{\text{biomasy}} \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$m_{\text{biomasy}} \text{ (mg)}$	$c_p \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$c_k \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$q \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$
Cu	0,5	11,6	$0,499 \pm 0,002$	$0,444 \pm 0,002$	96,1
	1	23,0	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,464 \pm 0,002$	45,7
	2	41,0	$0,501 \pm 0,002$	$0,409 \pm 0,002$	45,0
	3	60,8	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,389 \pm 0,003$	41,9
Pb	0,5	9,8	$1,002 \pm 0,005$	$0,93 \pm 0,01$	144,8
	1	21,8	$1,002 \pm 0,005$	$0,87 \pm 0,01$	125,4
	2	42,8	$1,002 \pm 0,005$	$0,80 \pm 0,01$	96,2
	3	62,4	$1,002 \pm 0,005$	$0,756 \pm 0,007$	78,7
Zn	0,5	10,8	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,469 \pm 0,005$	72,8
	1	20,2	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,4364 \pm 0,0009$	71,4
	2	41,2	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,3807 \pm 0,0009$	62,0
	3	61,6	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,325 \pm 0,002$	59,6

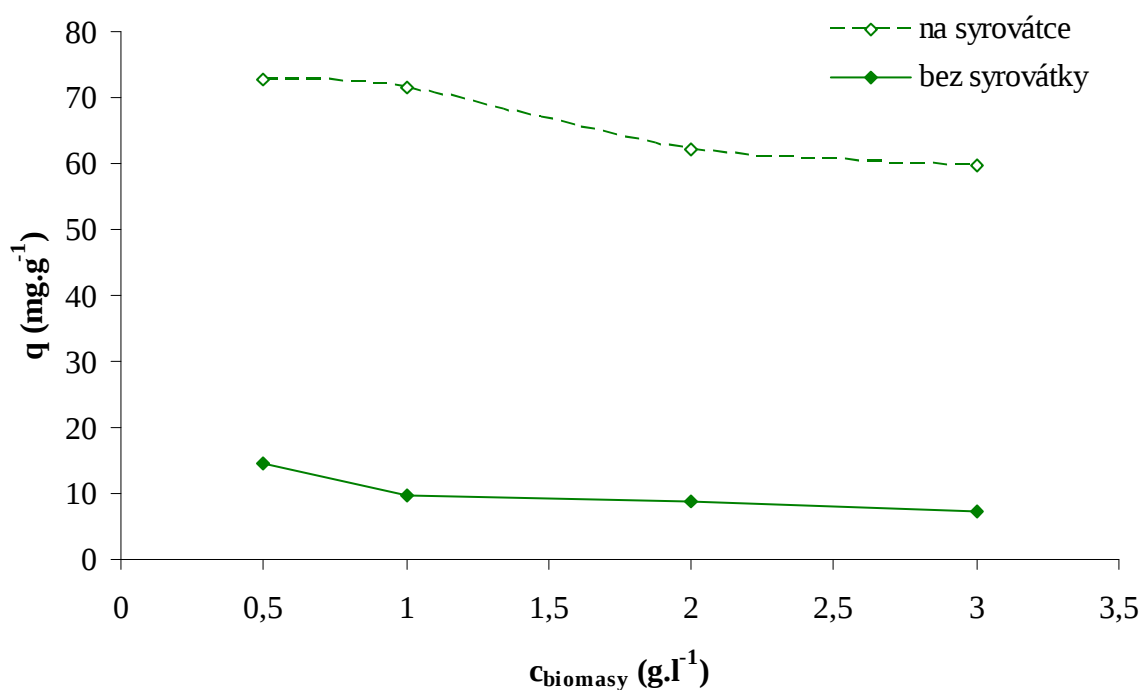
Graf 11: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2566 kultivované na syrovátce a bez ní pro Cu^{2+}



Graf 12: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2566 kultivované na syrovátce a bez ní pro Pb^{2+}



Graf 13: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2566 kultivované na syrovátce a bez ní pro Zn^{2+}



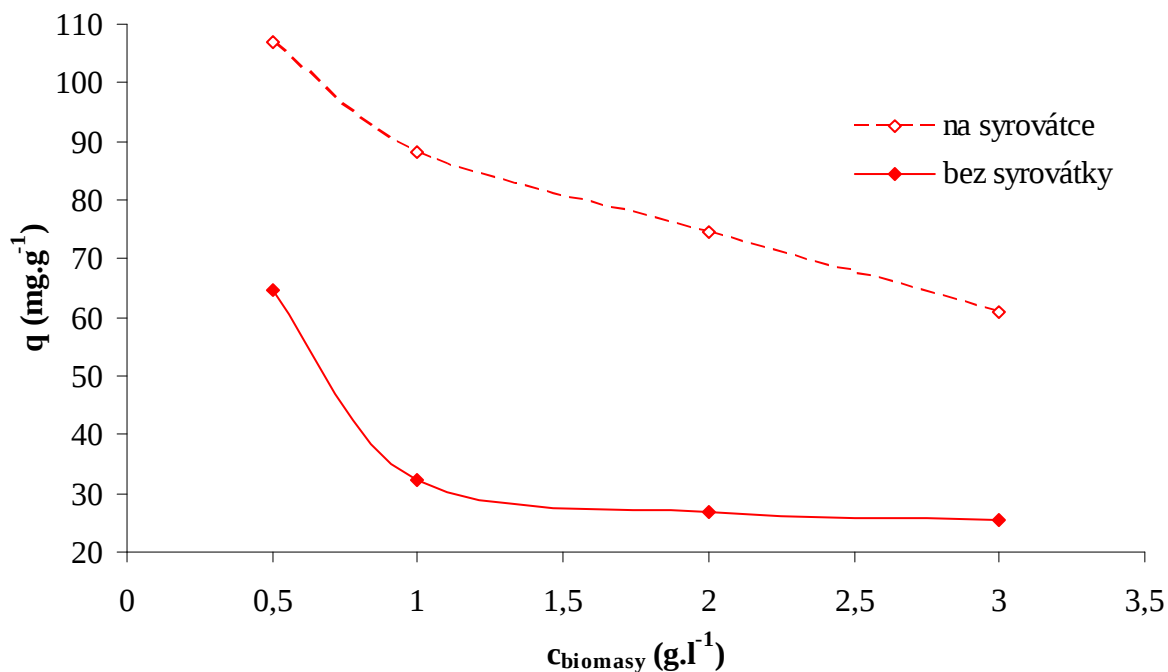
Z pohledu na Grafy 11, 12 a 13 je patrné, že sorpční kapacita CCM 2566 se použitím syrovátky jako kultivačního média výrazně zvýšila pro všechny tři sledované kovy.

***Geobacillus thermocatenulatus* CCM 2809**

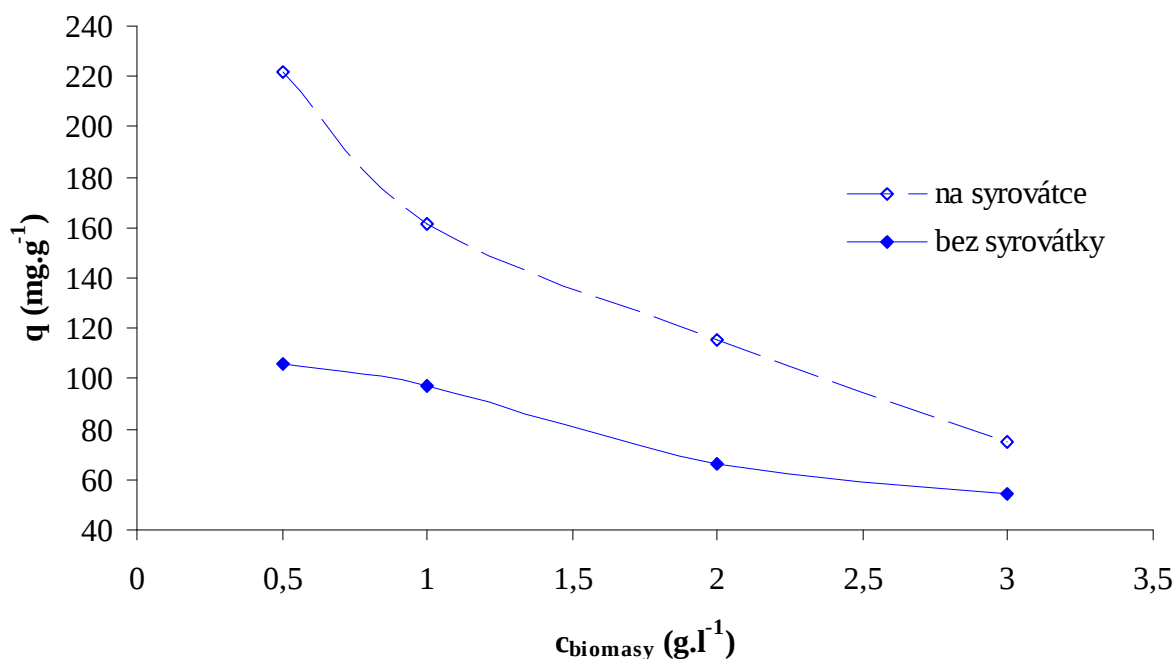
Tab. 7: Hodnoty sorpčních kapacit bakterie CCM 2809 kultivované na syrovátce při různých koncentracích biomasy

kov	$c_{\text{biomasy}} \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$m_{\text{biomasy}} \text{ (mg)}$	$c_p \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$c_k \text{ (g.l}^{-1}\text{)}$	$q \text{ (mg.g}^{-1}\text{)}$
Cu	0,5	11,6	$0,499 \pm 0,002$	$0,437 \pm 0,002$	107,0
	1	23,2	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,414 \pm 0,003$	88,3
	2	40,8	$0,501 \pm 0,002$	$0,349 \pm 0,003$	74,7
	3	60,6	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,3316 \pm 0,0008$	60,9
Pb	0,5	10,6	$1,002 \pm 0,005$	$0,884 \pm 0,003$	222,0
	1	21,4	$1,069 \pm 0,005$	$0,896 \pm 0,006$	161,7
	2	40,1	$1,069 \pm 0,005$	$0,837 \pm 0,006$	115,6
	3	61,6	$1,069 \pm 0,005$	$0,839 \pm 0,003$	74,7
Zn	0,5	10,2	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,466 \pm 0,002$	82,5
	1	20,4	$0,541 \pm 0,002$	$0,475 \pm 0,003$	64,3
	2	39,6	$0,541 \pm 0,002$	$0,42 \pm 0,02$	59,6
	3	63,8	$0,541 \pm 0,002$	$0,352 \pm 0,002$	59,1

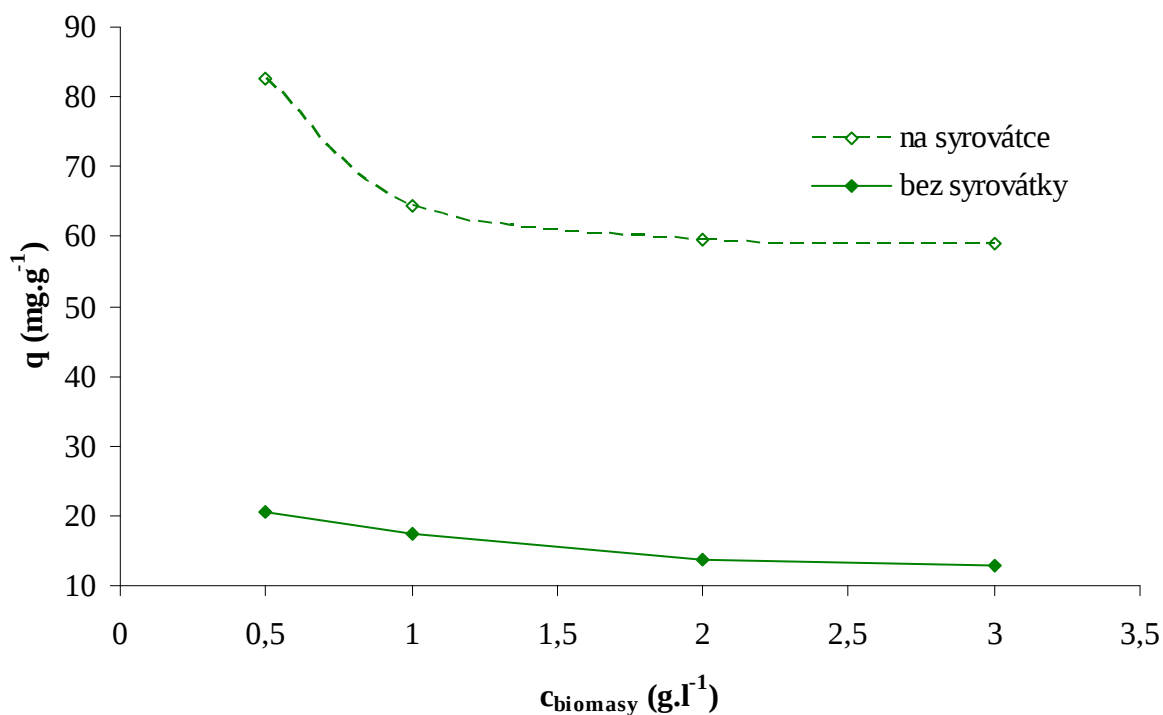
Graf 14: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2809 kultivované na syrovátce a bez ní pro Cu^{2+}



Graf 15: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2809 kultivované na syrovátce a bez ní pro Pb^{2+}



Graf 16: Srovnání sorpčních kapacit CCM 2809 kultivované na syrovátce a bez ní pro Zn^{2+}



Z Grafů 14, 15 a 16 lze opět pozorovat zvýšení sorpčních kapacit pro všechny tři kovy při kultivaci CCM 2809 na syrovátce.

Důvodem větších sorpčních kapacit u obou bakterií s určitostí není to, že by se nějak „aktivovala“ vazebná místa. Částečně by mohlo vlivem kultivace dojít ke změnám na buněčné stěně, např. k rozdílnému stérickému uspořádání přítomných biopolymerů,

v jejichž struktuře by se pak zachytilo více kovových iontů, mnohem pravděpodobnější je ale fakt, že se na sorpci kovů začala podílet i přítomná syrovátka. Zbytky syrovátky totiž nebylo možné ani při dodržení postupu promývání biomasy, (tj. dvojí promytí deionizovanou vodou) zcela odstranit. Důkazem bylo světlé zabarvení sušené biomasy, její odlišná (mazlavá) konzistence a zejména jev při samotném biosorpčním experimentu, kdy se na granulky biomasy postupně navazovaly Cu^{2+} ionty a způsobovaly její výrazně modré zbarvení. Tento jev u biomasy kultivované na *Bacillus* médiu pozorován v takové míře nebyl.

Uvedené hodnoty sorpčních kapacit biomasy kultivované na syrovátce tak nelze považovat za zcela odpovídající, protože záleží na tom, kolik syrovátky na biomase ulpělo. Nicméně to, že obecně dochází k většímu úbytku kovů z roztoků, bylo prokázáno u obou bakterií pro všechny tři stanovované kovové ionty.

3.3.4 Vliv koncentrace těžkých kovů

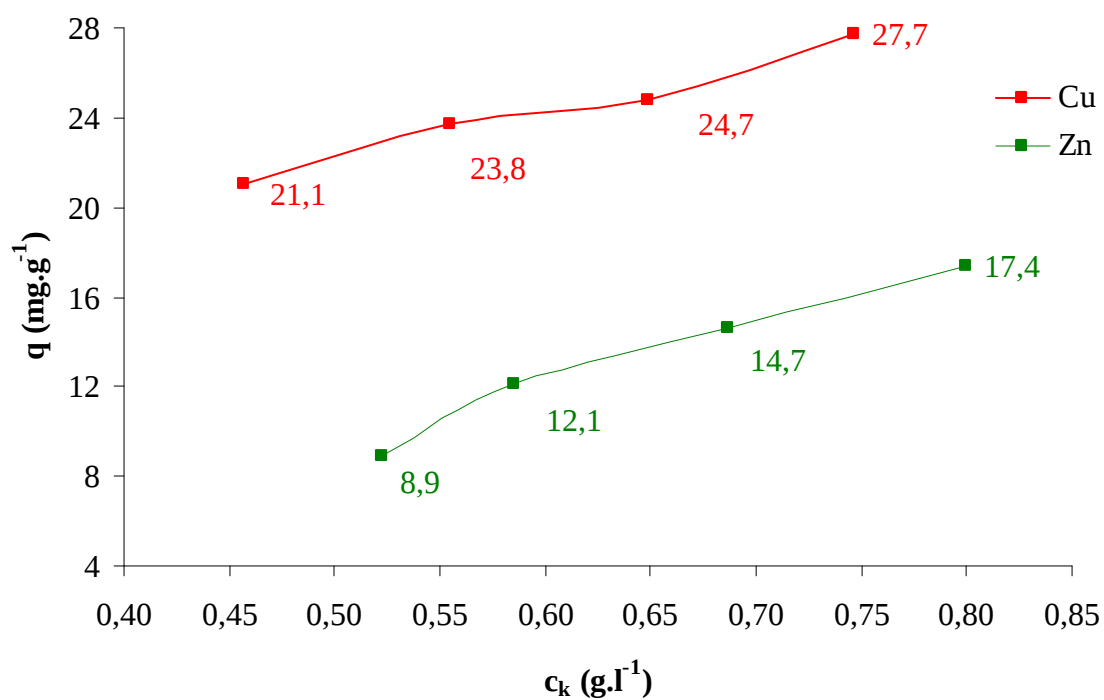
Toto stanovení má za cíl posoudit, jak se sorpční kapacita bakterií mění v závislosti na koncentraci těžkých kovů. Na základě získaných výsledků lze za tímto účelem sestavit nelinearizované sorpční izotermy, jakožto závislosti sorpční kapacity na konečných (rovnovážných) koncentracích kovů. Základním požadavkem pro sestavení těchto závislostí je konstantní teplota během celého procesu, což bylo dodrženo (experimenty probíhaly za teploty 25 °C) a ustavení rovnováhy. Biosorpce je proces velmi rychlý, rovnováha nastává obvykle v řádech minut. Podle literatury byla doba potřebná pro ustavení rovnováhy u *G. thermodenitrificans* 6 hodin [50], proto byla pro experimenty zvolena doba 12 h, aby byla s jistotou splněna i tato podmínka.

Geobacillus thermodenitrificans CCM 2566

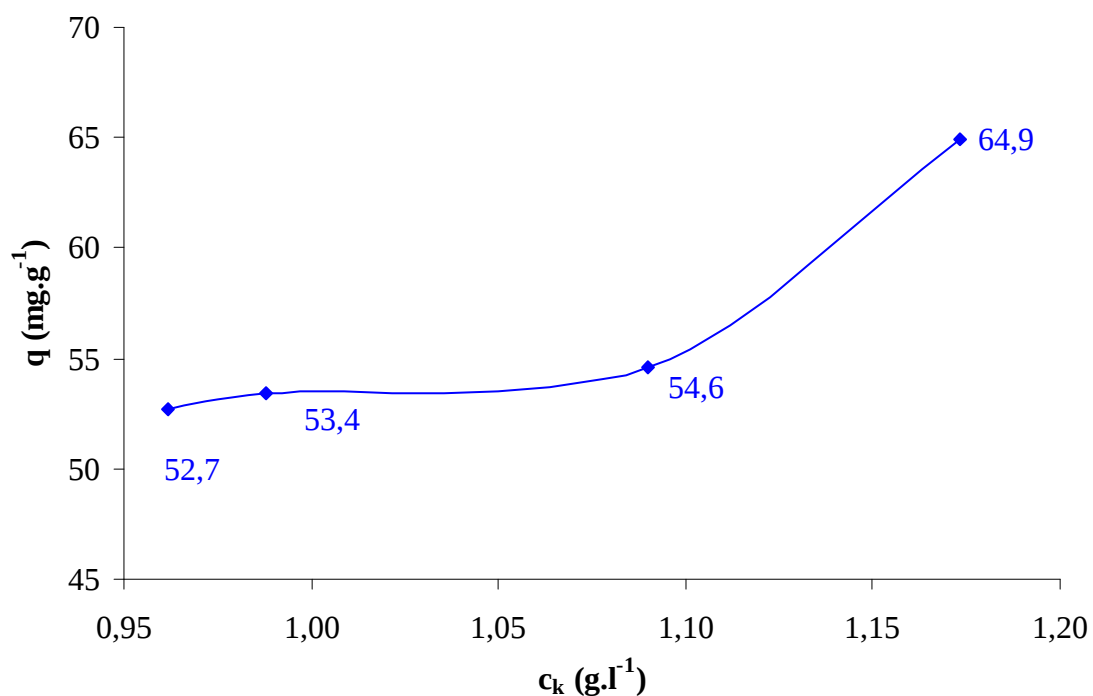
Tab. 8: Vliv počáteční koncentrace kovu na sorpční kapacitu CCM 2566

kov	m_{biomasy} (mg)	c_p (g.l ⁻¹)	c_k (g.l ⁻¹)	úbytek kovu (%)	q (mg.g ⁻¹)
Cu	41,3	0,501 ± 0,002	0,457 ± 0,004	8,7	21,1
	40,2	0,603 ± 0,002	0,555 ± 0,002	7,9	23,8
	41,6	0,700 ± 0,002	0,648 ± 0,003	7,4	24,7
	39,8	0,801 ± 0,002	0,746 ± 0,002	6,9	27,7
Pb	40,7	1,069 ± 0,005	0,962 ± 0,003	10,0	52,7
	40,8	1,097 ± 0,006	0,99 ± 0,01	9,9	53,4
	41,2	1,202 ± 0,003	1,09 ± 0,01	9,4	54,6
	40,5	1,305 ± 0,006	1,17 ± 0,01	10,1	64,9
Zn	40,6	0,541 ± 0,002	0,523 ± 0,004	3,3	8,9
	41,6	0,611 ± 0,002	0,586 ± 0,002	4,1	12,1
	39,5	0,716 ± 0,002	0,687 ± 0,005	4,0	14,7
	40,2	0,835 ± 0,002	0,800 ± 0,003	4,2	17,4

Graf 17: Sorpční izoterma CCM 2566 pro Cu^{2+} a Zn^{2+}



Graf 18: Sorpční izoterma CCM 2566 pro Pb^{2+}



Z důvodu stanovení Pb^{2+} při jiných koncentracích než zbylé ionty je sorpční izoterma pro tento kov sestrojena zvlášť.

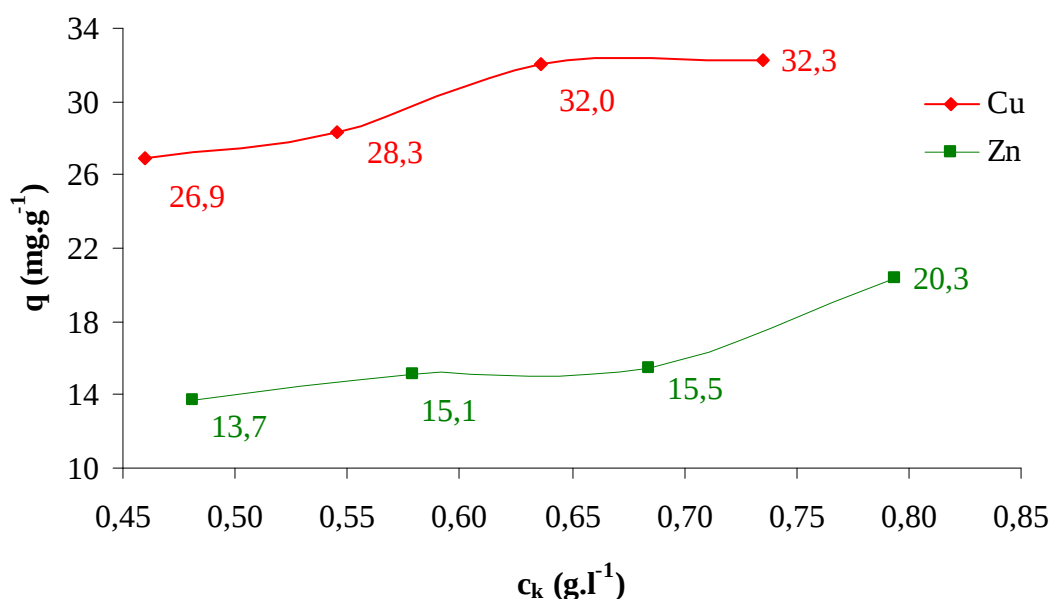
Z Grafů 17 a 18 je patrné, že zvyšováním koncentrace kovů se sorpční kapacita bakterie CCM 2566 zvyšuje pro všechny tři stanovované kovy. U Cu^{2+} a Zn^{2+} je zvýšení sorpčních kapacit poměrně pravidelné, u Pb^{2+} dochází k nárůstu až u nejvyšší koncentrace. Zvyšováním koncentrace kovu by zároveň mělo docházet k snižování jeho procentuálního úbytku. [49] Tento předpoklad je splněn u Cu^{2+} iontů, až na poslední hodnotu u Pb^{2+} iontů, u Zn^{2+} iontů procentuální úbytek poněkud kolísá, ale alespoň se pohybuje v úzkém intervalu (Tab. 8).

Geobacillus thermocatenulatus CCM 2809

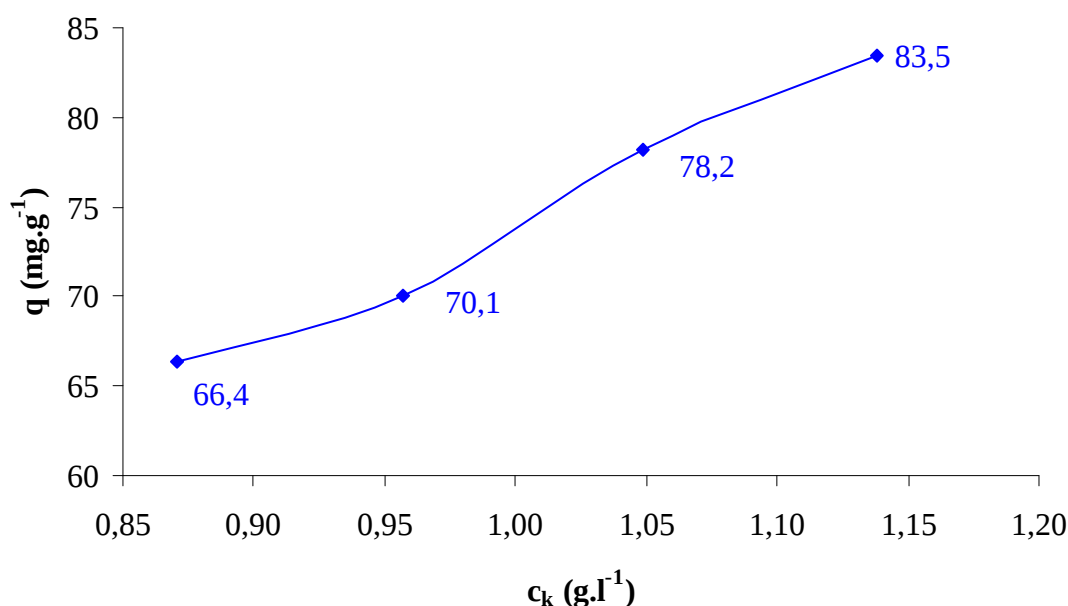
Tab. 9: Vliv počáteční koncentrace kovu na sorpční kapacitu CCM 2809

kov	m_{biomasy} (mg)	c_p (g.l ⁻¹)	c_k (g.l ⁻¹)	úbytek kovu (%)	q (mg.g ⁻¹)
Cu	41,8	$0,5163 \pm 0,0008$	$0,460 \pm 0,004$	10,9	26,9
	40,5	$0,603 \pm 0,002$	$0,545 \pm 0,002$	9,5	28,3
	39,8	$0,700 \pm 0,002$	$0,6362 \pm 0,0008$	9,1	32,0
	41,1	$0,801 \pm 0,002$	$0,7349 \pm 0,0008$	8,3	32,3
Pb	39,6	$1,002 \pm 0,005$	$0,870 \pm 0,003$	13,1	66,4
	40,0	$1,097 \pm 0,006$	$0,96 \pm 0,01$	12,8	70,1
	39,4	$1,202 \pm 0,003$	$1,05 \pm 0,01$	12,8	78,2
	39,8	$1,305 \pm 0,006$	$1,138 \pm 0,006$	12,7	83,5
Zn	40,0	$0,5085 \pm 0,0009$	$0,4812 \pm 0,0009$	5,4	13,7
	41,2	$0,611 \pm 0,002$	$0,580 \pm 0,003$	5,1	15,1
	40,3	$0,716 \pm 0,002$	$0,6844 \pm 0,0009$	4,4	15,5
	39,8	$0,835 \pm 0,002$	$0,794 \pm 0,002$	4,8	20,3

Graf 19: Sorpční izoterma CCM 2809 pro Cu^{2+} a Zn^{2+}



Graf 20: Sorpční izoterma CCM 2809 pro Pb^{2+}



U bakterie CCM 2809 se také sorpční kapacita zvyšuje s rostoucí koncentrací u všech kovů (Grafy 19 a 20) a opět je pozorován trend snižování procentuálního úbytku kovu při rostoucí koncentraci (Tab. 9).

Významným nedostatkem tohoto stanovení je, že byl proměřen jen určitý výsek z intervalu koncentrací, a to poměrně vysoké koncentrace. Protože však komplexometrické titrace neumožňovaly proměřit oblast nízkých koncentrací, nejsou hodnoty sorpčních kapacit pro tyto koncentrace v izotermách vůbec zahrnuty. Přitom zvyšování sorpční kapacity není lineární, ale bývá nejvýraznější právě při nízkých koncentracích [49]. Kvůli těmto chybějícím hodnotám nemohly být proto sestaveny ani linearizované Langmuirovy izotermy, ze kterých by bylo možné stanovit maximální sorpční kapacitu bakterie pro daný kov, což je nejčastěji používaný parametr, který slouží k srovnávání sorpčního potenciálu mezi různými druhy sorbentů. Proto je také obtížné srovnat sorpční potenciál zde testovaných bakterií s jinými, u nichž byla maximální sorpční kapacita stanovena.

Z hodnot procentuálních úbytků kovů, které se pohybují u bakterie CCM 2566 zhruba okolo 8 % pro Cu^{2+} , 10 % pro Pb^{2+} a 4 % pro Zn^{2+} , u bakterie CCM 2809 okolo 9 % pro Cu^{2+} , 13 % pro Pb^{2+} a 7 % pro Zn^{2+} (přesné hodnoty Tab. 8 a 9), je jasné, že biosorpce není v takto vysokých koncentracích těmito bakteriemi účinná. Praktické využití této metody je tedy možné jen v oblasti nízkých koncentrací, jak také uvádí literatura. Pak se účinnost může blížit až ke 100 %, zejména u velmi nízkých koncentrací (např. okolo 10 mg.l⁻¹) [49, 50].

Co se týká srovnání afinit bakterií k jednotlivým kovům, tak pokud vezmeme v úvahu, že Pb^{2+} ionty byly proměřovány při vyšších koncentracích než zbylé dva kovy a přitom procentuální úbytek Pb^{2+} je větší, je možné předpokládat, že obě bakterie mají nejvyšší afinitu právě k olovnatým iontům. Pořadí afinity jednotlivých kovů k oběma bakteriím by pak bylo $Pb > Cu > Zn$.

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce se zabývala biosorpcí těžkých kovů termofilními bakteriemi. Jako biosorbenty byly vybrány dva zástupci rodu *Geobacillus* – *G. thermodenitrificans* CCM 2566 a *G. thermocatenulatus* CCM 2809, jejichž biosorpční schopnosti byly posuzovány pro ionty Cu^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} . Biosorpční experimenty probíhaly ve vsádkovém uspořádání s mícháním a pro každý kov zvlášť. Sledován byl vliv různých faktorů, které mohou biosorpci ovlivňovat – pH, koncentrace biomasy, koncentrace kovu a způsob kultivace.

Vliv pH byl poměrně výrazný, optimální pH pro biosorpci Cu^{2+} a Zn^{2+} bylo 5, pro Pb^{2+} pH 4 u obou bakterií.

Pro posouzení schopnosti biosorbentu vázat ionty těžkých kovů byla stanovována veličina sorpční kapacita. Při studiu vlivu koncentrace biomasy na biosorpci bylo zjištěno, že při nižších koncentracích má daná biomasa větší sorpční kapacitu a biosorpce je efektivnější.

Koncentrace kovu taktéž ovlivňuje velikost sorpční kapacity obou bakterií, čím je koncentrace kovu větší, tím je větší i sorpční kapacita, ale zároveň se snižuje účinnost biosorpce. Vzhledem k tomu, že stanovení koncentrace kovů byla kvůli poruše atomového absorpčního spektrometru prováděna komplexometrickými titracemi, probíhaly veškeré experimenty s poměrně koncentrovanými roztoky, které pro biosorpci nejsou vhodné. To dokazuje i velmi nízké procento nasorbovaného množství kovů.

Stejně jako všechny jiné oblasti, i biosorpce směřují k tomu, aby byly prováděny co nejlevněji. Snížit náklady lze například způsobem kultivace biomasy. Proto byl testován vliv syrovátky, odpadního produktu při výrobě sýru, sloužící jako levná náhrada kultivačních médií. Pozorován byl výrazný nárůst sorpčních kapacit obou bakterií pro všechny kovy. Přestože to s největší pravděpodobností nebylo způsobeno změnou biosorpčních schopností samotných bakterií, ale kombinací sorpce syrovátky a biomasy, lze tento efekt považovat za pozitivní.

Afinita kovů k oběma bakteriím byla určena ve směru $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn}$. Biosorpce u obou bakterií probíhala velmi podobně, srovnání velikostí sorpčních kapacit ale ukazuje, že bakterie *G. thermocatenulatus* má lepší sorpční schopnosti než *G. thermodenitrificans*.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] VOLESKY, B. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* [online]. 2001, 59, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [2] AHLUWALIA S. S; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. [online]. 2007, 98, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [3] VOLESKY, B. Biosorption and me. *Water Research* [online]. 2007, 41, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [4] AHALYA, N; RAMACHANDRA, T. V; KANAMADI, R. D. Biosorption of Heavy Metals. *Research Journal Of Chemistry And Environment*. [online]. 2003, 7, [cit. 2010-02-17]. Dostupný z: <<http://wgbis.ces.iisc.ernet.in/energy/water/paper/biosorption/Biosorption.pdf>>.
- [5] VIJAYARAGHAVAN, N; YEOUNG-SANG YUN. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, 26, [cit. 2010-02-20]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [6] VOLESKY, B; HOLAN, Z. R. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnology Progress* [online]. 1995, 11, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://biosorption.mcgill.ca/publication/PDFs/101-BP'95-11,235-50-RevHolan.pdf>>.
- [7] NAJA, G; MURPHY V; VOLESKY, B. Biosorption, Metals. *Wiley Encyclopedia of Industrial Biotechnology* [online]. 2010 [cit. 2010-02-20]. Dostupný z: <<http://biosorption.mcgill.ca/publication/PDFs/ENCYwiley'10.pdf>>.
- [8] VOLESKY, B. *Sorption and Biosorption* [online]. Montreal: BV-Sorbex, 2004 [cit. 2010-03-23]. Equilibrium biosorption performance. Dostupný z: <[http://biosorption.mcgill.ca/publication/book/6.1-4w\(103-16\).pdf](http://biosorption.mcgill.ca/publication/book/6.1-4w(103-16).pdf)>.
- [9] KRATOCHVIL, D; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* [online]. 1998, 16, [cit. 2010-02-16]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [10] FIGUEIRA, M. M; VOLESKY, B; CIMINELLI V. S. T; RODDICK F. A. Biosorption of metals in brown seaweed biomass. *Water Research* [online]. 2000, 34, [cit. 2010-02-21]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [11] SOGHOIAN, SINERT: Toxicity, Heavy Metals [online]. 2009. [cit. 2010-03-13]. Dostupné z: <<http://emedicine.medscape.com/article/814960-overview>>.
- [12] NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1999, 51, [cit. 2010-02-21]. Dostupný z: <<http://www.springerlink.com>>.
- [13] VOLESKY, B; NAJA, G. M. Handbook on Heavy Metals in the Environment [online]. Boca Raton: CRC Press, 2010 [cit. 2010-03-24]. Toxicity and Sources of Pb,

- Cd, Hg, Cr, As, and Radionuclides in the Environment. Dostupný z: <<http://biosorption.mcgill.ca/publication/PDFs/HandBcrc\10-Ch2.pdf>>.
- [14] BENCKO, V; CIKRT, M; LENERT, J. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. Praha: Grada Publishing. 1995. 288 s. ISBN 80-7169-150-X
 - [15] PAVLIŠ, M. *Toxické kovy* [online]. 2005 [cit. 2010-03-12]. Dostupné z: <http://ekologie.upol.cz/ku/etxo/toxikologie_kovu.pdf>.
 - [16] *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2008 [cit. 2010-03-13]. Látka: Olovo a sloučeniny (jako Pb). Dostupné z: <http://www.irz.cz/latky/olovo_a_sl>.
 - [17] *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2008 [cit. 2010-03-13]. Látka: Měď a sloučeniny (jako Cu). Dostupné z: <http://www.irz.cz/latky/med_a_sl>.
 - [18] *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2008 [cit. 2010-03-13]. Látka: Zinek a sloučeniny (jako Zn). Dostupné z: <http://www.irz.cz/latky/zinek_a_sl>.
 - [19] BROCK, T. D. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*. New York: Springer-Verlag. 1978. 465 s. ISBN 0-387-90309-7
 - [20] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*. 3. opravené vydání. Praha: Academia. 2002. 364 s. ISBN 80-200-1024-6.
 - [21] TempRanges_ER0807_Fig1.jpg (600×369) [online]. 2008 [cit. 2009-12-02]. Dostupné z: <http://www.emlab.com/m/media/TempRanges_ER0807_Fig1.jpg>.
 - [22] KUMAR, S. et al. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*. [online]. 2000, 3, [cit. 2009-11-27]. Dostupné z: <<http://peds.oxfordjournals.org>>.
 - [23] GARIP, S. et al. Differentiation of Mesophilic and Thermophilic Bacteria with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* [online]. 2007, 61, [cit. 2009-11-27]. Dostupný z: <<http://www.opticsinfobase.org>>.
 - [24] DELONG, E. F. Everything in moderation: archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. 1998, 6, [cit. 2009-11-28]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
 - [25] ROSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. 1. vydání. Praha: Pedagogické nakladatelství. 2003. 797s. ISBN 80-7183-268-5.
 - [26] NAZINA, T. N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. [online] 2001, 51, [cit. 2009-12-03]. Dostupný z: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/51/2/433>>.
 - [27] ZEIGLER, D. *The Genus Geobacillus: Introduction and Strain Catalog* [online]. 2001 [cit. 2009-12-03]. Dostupné z: <<http://www.bgsc.org/Catalogs/Catpart3.pdf>>.

- [28] *Bacillus thermodenitrificans* [online]. 2010 [cit. 2010-03-25]. Uniprot Taxonomy. Dostupné z: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/33940>>.
- [29] MANACHINI, P. L. et al. *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Mikrobiology* [online]. 2000, 50, [cit. 2009-12-03]. Dostupný z: <<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/50/3/1331>>.
- [30] *Geobacillus thermocatenulatus* [online]. 2010 [cit. 2010-03-25]. Uniprot Taxonomy. Dostupné z: <<http://www.uniprot.org/taxonomy/33938>>.
- [31] GOLOVACHEVA, R. S. et al. A new thermophilic species, *Bacillus thermocatenulatus* nov. sp. *Mikrobiologiya*. 1975. 44: 265-268.
- [32] BALKWILL, D. L. et al. Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* [online]. 2004, 8, [cit. 2009-12-10]. Dostupný z: <<http://www.springerlink.com>>.
- [33] BROCK, T. D; FREEZE, H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bakteriology* [online]. 1969, 98, [cit. 2009-12-10]. Dostupný z: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/98/1/289.pdf>>.
- [34] CHIEN, A; EDGAR, D. B; TRELA, J. M. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bakteriology* [online]. 1976, 3, [cit. 2009-12-11]. Dostupný z: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/127/3/1550>>.
- [35] MAHESHWARI et al.: Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2000, 3, [cit. 2009-12-14]. Dostupný z: <<http://mmbr.asm.org/cgi/reprint/64/3/461>>.
- [36] TUOMELA, M; VIKMAN, M; HATAKKA, A; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* [online]. 2000, 72, [cit. 2009-12-02]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [37] GOLUEKE, C. G. Principles of composting. *The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling. The Art and Science of Composting*. Pennsylvania, USA: The JG Press Inc. 1991. pp. 14-27.
- [38] DEACON, J. *Thermophilic microorganisms* [online]. 2009 [cit. 2009-11-27]. Dostupný z: <<http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/thermo.htm>>.
- [39] STROM, P. F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1985, 50, [cit. 2009-12-02]. Dostupný z: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/50/4/899>>.
- [40] CRAWFORD, J. H. Composting of agricultural wastes – a review. *Process Biochemistry*. 1983. 18: 14–18.
- [41] BEFFA, T. et al. Taxonomic and metabolic microbial diversity during composting. *The Science of Composting* [online]. 1995, 1, [cit. 2009-11-28]. Dostupný z: <<http://madep-sa.com/pdf/beffa1995.pdf>>.
- [42] ATKINSON, C. F; JONES, D. D; GAUTHIER, J. J. Putative anaerobic activity in aerated composts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 1996, 16, [cit. 2009-11-29]. Dostupný z: <<http://www.springerlink.com>>.

- [43] DOHÁNYOS, M; KOLLER, J; STRNADOVÁ, N. *Čištění odpadních vod*. 2. vydání. Praha: VŠCHT, 1998. 177 s. ISBN 80-7080-316-9
- [44] ZÁBRANSKÁ, J; DOHÁNYOS, M; JENÍČEK, P; KUTIL, J. Thermophilic process and enhancement of excess activated sludge degradability - two ways of intensification of sludge treatment in the Prague Central Wastewater Treatment Plant. *Water Science and Technology*. 2000. 9: 265-272.
- [45] LAPARA, T. M; ALLEMAN, J. E. Thermophilic aerobic biological wastewater treatment. *Water Research* [online]. 1999, 4, [cit. 2009-11-13]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [46] SUVILAMPI, J; RINTALA, J. Thermophilic aerobic wastewater treatment, process performance, biomass characteristics, and effluent duality. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* [online]. 2003, 2, [cit. 2009-11-25]. Dostupný z: <<http://www.springerlink.com>>.
- [47] LAYDEN, N. M. et al. Autothermal thermophilic aerobic digestion (ATAD) — Part I: Review of origins, design, and process operation. *Journal of Environmental Engineering and Science* [online]. 2007, 6, [cit. 2009-11-27]. Dostupný z: <<http://web.ebscohost.com>>.
- [48] HETZER, A. et al. Cadmium Ion Biosorption by the Thermophilic Bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. Thermocatenulatus*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2006, 72, [cit. 2010-03-15]. Dostupný z: <<http://aem.highwire.org/cgi/reprint/72/6/4020>>.
- [49] ÖZDEMİR, S. et al. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2009, 152, [cit. 2010-03-15]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [50] CHATTERJEE, S. K; BHATTACHARJEE, I; CHANDRA, G. Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2010, 175, [cit. 2010-01-12]. Dostupný z: <<http://www.sciencedirect.com>>.
- [51] DAUGHNEY, Ch. et al. Proton and cadmium adsorption by the archaeon *Thermococcus zilligii*: Generalising the contrast between thermophiles and mesophiles as sorbents. *Chemical Geology* [online]. 2010, 273, [cit. 2010-03-18]. Dostupný z: <<https://waikato.researchgateway.ac.nz>>.
- [52] PŘIBIL, R. *Komplexometrie*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1977. 509 s.
- [53] *Chelatometrie - stanovení tvrdosti vody*. [online]. 2008. [cit. 2010-04-15]. Dostupný z: <<http://analytika.upol.cz/elektromigrace/docs/navody/ACHSB/pdf/>>.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AK	Aminokyseliny
ATAD	Autotermní termofilní aerobní stabilizace
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FT-IR	Infračervená spektrometrie využívající Fourierovu transformaci
G-	Gramnegativní
G+	Grampozitivní
KT	Kyselina teikoová
KU	Kyselina uronová
LPS	Lipopolysacharidy
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PG	Peptidoglykan
PS	Polysacharidy
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
SPS	Sulfátované polysacharidy

SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Naměřená data pro sestrojení růstových křivek
- Příloha 2 Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu pH
- Příloha 3 Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu koncentrace biomasy
- Příloha 4 Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu kultivace na syrovátce
- Příloha 5 Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu koncentrace kovu

PŘÍLOHY

Příloha 1: Naměřená data pro sestrojení růstových křivek (Graf 1)

	<i>G. thermodenitrificans</i> CCM 2566	<i>G. thermocatenulatus</i> CCM 2809
t (h)	A ₆₀₀	A ₆₀₀
0	0,11	0,13
2	0,11	0,13
4	0,11	0,13
6	0,11	0,23
7	0,18	0,33
8	0,28	0,40
9	0,37	0,50
10	0,47	0,53
11	0,51	0,56
12	0,55	0,60
13	0,58	0,63
14	0,61	0,66
15	0,64	0,68
16	0,67	0,71
17	0,68	0,73
18	0,70	0,75
19	0,71	0,75
20	0,73	0,77
21	0,74	0,79
22	0,75	0,79
23	0,77	0,80
24	0,80	0,82
25	0,80	0,83
26	0,82	0,84
27	0,82	0,83
28	0,83	0,83
29	0,82	0,84

Příloha 2: Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu pH

	kov	pH		V_{EDTA} (ml)			Ø V_{EDTA} (ml)
<i>G. thermodenitrificans</i> CCM 2566	Cu	3	původní roztok	15,30	15,40	15,40	15,37 ± 0,05
			konečný roztok	15,10	15,05	15,15	15,10 ± 0,05
		4	původní roztok	15,20	15,10	15,20	15,17 ± 0,05
			konečný roztok	14,80	14,80	14,70	14,77 ± 0,05
		5	původní roztok	15,60	15,60	15,55	15,58 ± 0,03
			konečný roztok	14,95	14,95	14,80	14,90 ± 0,08
	Pb	3	původní roztok	10,30	10,40	10,40	10,37 ± 0,05
			konečný roztok	9,90	9,70	9,90	9,8 ± 0,1
		4	původní roztok	10,10	10,05	10,10	10,08 ± 0,03
			konečný roztok	9,10	9,20	9,10	9,13 ± 0,05
		5	původní roztok	9,60	9,60	9,70	9,63 ± 0,05
			konečný roztok	8,70	8,70	8,80	8,73 ± 0,05
	Zn	3	původní roztok	15,50	15,50	15,60	15,53 ± 0,05
			konečný roztok	15,30	15,25	15,25	15,27 ± 0,03
		4	původní roztok	15,60	15,70	15,60	15,63 ± 0,05
			konečný roztok	15,20	15,20	15,35	15,25 ± 0,08
		5	původní roztok	15,65	15,60	15,60	15,62 ± 0,03
			konečný roztok	15,00	15,05	15,05	15,03 ± 0,03
<i>G. thermocatenulatus</i> CCM 2809	Cu	3	původní roztok	15,30	15,40	15,40	15,37 ± 0,05
			konečný roztok	14,90	15,00	14,90	14,93 ± 0,05
		4	původní roztok	15,20	15,10	15,20	15,17 ± 0,05
			konečný roztok	14,60	14,50	14,45	14,52 ± 0,07
		5	původní roztok	15,60	15,60	15,55	15,58 ± 0,03
			konečný roztok	14,50	14,60	14,60	14,57 ± 0,05
	Pb	3	původní roztok	10,30	10,40	10,40	10,37 ± 0,05
			konečný roztok	10,00	9,80	9,80	9,9 ± 0,1
		4	původní roztok	10,10	10,05	10,10	10,08 ± 0,03
			konečný roztok	9,20	9,05	9,10	9,12 ± 0,07
		5	původní roztok	9,60	9,60	9,70	9,63 ± 0,05
			konečný roztok	8,70	8,80	8,80	8,77 ± 0,05
	Zn	3	původní roztok	15,50	15,50	15,60	15,53 ± 0,05
			konečný roztok	15,40	15,45	15,30	15,38 ± 0,07
		4	původní roztok	15,60	15,70	15,60	15,63 ± 0,05
			konečný roztok	15,20	15,10	15,25	15,18 ± 0,07
		5	původní roztok	15,65	15,60	15,60	15,62 ± 0,03
			konečný roztok	14,80	14,90	14,90	14,87 ± 0,05

Příloha 3: Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu koncentrace biomasy

	kov	C _{biomasy} (g/l)		V _{EDTA} (ml)			Ø V _{EDTA} (ml)
<i>G. thermodenitrificans</i> CCM 2566	Cu	0,5	původní roztok	15,60	15,70	15,70	15,68 ± 0,03
			konečný roztok	14,60	14,70	14,70	14,67 ± 0,03
		1	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	15,35	15,40	15,40	15,38 ± 0,03
		2	původní roztok	15,70	15,70	15,80	15,73 ± 0,05
			konečný roztok	14,10	14,40	14,60	14,4 ± 0,2
	Pb	0,5	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	14,70	14,70	14,60	14,67 ± 0,05
		1	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	9,20	9,10	9,10	9,13 ± 0,05
		2	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	9,30	9,45	9,40	9,38 ± 0,07
		3	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	9,25	9,30	9,25	9,27 ± 0,03
	Zn	0,5	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	8,75	8,85	8,50	8,7 ± 0,2
		1	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	15,30	15,35	15,30	15,32 ± 0,03
		2	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	16,25	16,15	16,10	16,17 ± 0,07
		3	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	15,85	15,90	16,10	16,0 ± 0,1
<i>G. thermocatenulatus</i> CCM 2809	Cu	0,5	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	15,75	15,90	15,80	15,82 ± 0,07
		1	původní roztok	15,65	15,70	15,70	15,68 ± 0,03
			konečný roztok	14,70	14,65	14,65	14,67 ± 0,03
		2	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	15,20	15,20	15,25	15,22 ± 0,03
	Pb	0,5	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	14,30	14,50	14,55	14,5 ± 0,1
		1	původní roztok	15,65	15,70	15,70	15,68 ± 0,03
			konečný roztok	13,20	13,25	13,20	13,22 ± 0,03
		2	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	9,20	9,10	9,15	9,15 ± 0,05
		3	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,70	8,75	8,60	8,68 ± 0,07
	Zn	0,5	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,40	8,40	8,35	8,38 ± 0,03
		1	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	7,95	8,20	8,10	8,1 ± 0,1
		2	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	15,20	15,30	15,20	15,23 ± 0,05
		3	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,90	14,95	15,05	14,97 ± 0,07
	Zn	0,5	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,65	14,70	14,70	14,68 ± 0,03
		1	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,40	14,30	14,40	14,37 ± 0,05
		2	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,40	14,30	14,40	14,37 ± 0,05

Příloha 4: Spotřebované objemy chelatonu při titraci - stanovení vlivu kultivace na syrovátce

	kov	C _{biomasy} (g/l)		V _{EDTA} (ml)			Ø V _{EDTA} (ml)
<i>G. thermodenitrificans</i> CCM 2566	Cu	0,5	původní roztok	15,65	15,70	15,70	15,68 ± 0,03
			konečný roztok	13,90	14,00	13,90	13,93 ± 0,05
		1	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	14,55	14,50	14,65	14,57 ± 0,07
		2	původní roztok	15,70	15,70	15,80	15,73 ± 0,05
			konečný roztok	12,80	12,80	12,90	12,83 ± 0,05
	Pb	3	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	12,30	12,25	12,10	12,2 ± 0,1
		0,5	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,90	8,90	9,10	9,0 ± 0,1
		1	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,30	8,45	8,25	8,3 ± 0,1
		2	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	7,60	7,60	7,80	7,7 ± 0,1
		3	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	7,20	7,30	7,35	7,28 ± 0,07
	Zn	0,5	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,50	14,30	14,15	14,3 ± 0,2
		1	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	13,30	13,35	13,30	13,32 ± 0,03
		2	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	11,60	11,65	11,60	11,62 ± 0,03
		3	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	9,85	10,00	9,90	9,92 ± 0,07
<i>G. thermocatenulatus</i> CCM 2809	Cu	0,5	původní roztok	15,65	15,70	15,70	15,68 ± 0,03
			konečný roztok	13,80	13,70	13,70	13,73 ± 0,05
		1	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	12,90	13,05	13,05	13,00 ± 0,08
		2	původní roztok	15,70	15,70	15,80	15,73 ± 0,05
			konečný roztok	11,05	10,90	10,90	10,95 ± 0,08
	Pb	3	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	10,40	10,45	10,40	10,42 ± 0,03
		0,5	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,50	8,50	8,55	8,52 ± 0,03
		1	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	8,70	8,60	8,60	8,63 ± 0,05
		2	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	8,00	8,10	8,10	8,07 ± 0,05
		3	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	8,05	8,10	8,10	8,08 ± 0,03
	Zn	0,5	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,30	14,25	14,15	14,23 ± 0,07
		1	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	14,60	14,40	14,50	14,50 ± 0,09
		2	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	12,60	13,50	12,60	12,9 ± 0,5
		3	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	10,75	10,70	10,80	10,75 ± 0,05

Příloha 5: Spotřebované objemy chelatonu při titraci – stanovení vlivu koncentrace kovu

	kov	c _{kovu} (g/l)		V _{EDTA} (ml)			Ø V _{EDTA} (ml)
<i>G. thermodenitrificans</i> CCM 2566	Cu	0,5	původní roztok	15,70	15,70	15,80	15,73 ± 0,05
			konečný roztok	14,20	14,40	14,50	14,4 ± 0,1
		0,6	původní roztok	18,90	19,00	18,90	18,93 ± 0,05
			konečný roztok	17,40	17,40	17,50	17,43 ± 0,05
		0,7	původní roztok	22,05	21,90	22,00	21,98 ± 0,07
			konečný roztok	20,50	20,30	20,30	20,4 ± 0,1
	Pb	0,8	původní roztok	25,20	25,10	25,20	25,17 ± 0,05
			konečný roztok	23,35	23,50	23,45	23,43 ± 0,07
		1	původní roztok	10,30	10,35	10,25	10,30 ± 0,05
			konečný roztok	9,25	9,30	9,25	9,27 ± 0,03
		1,1	původní roztok	10,60	10,60	10,50	10,57 ± 0,05
			konečný roztok	9,60	9,40	9,55	9,5 ± 0,1
		1,2	původní roztok	11,55	11,60	11,60	11,58 ± 0,03
			konečný roztok	10,60	10,40	10,50	10,50 ± 0,09
		1,3	původní roztok	12,60	12,50	12,60	12,57 ± 0,05
			konečný roztok	11,30	11,20	11,40	11,30 ± 0,09
	Zn	0,5	původní roztok	16,50	16,45	16,55	16,50 ± 0,05
			konečný roztok	15,85	15,90	16,10	16,0 ± 0,1
		0,6	původní roztok	18,60	18,70	18,60	18,63 ± 0,05
			konečný roztok	17,80	17,95	17,85	17,87 ± 0,07
		0,7	původní roztok	21,80	21,80	21,90	21,83 ± 0,05
			konečný roztok	21,10	20,95	20,80	21,0 ± 0,1
		0,8	původní roztok	25,50	25,50	25,40	25,47 ± 0,05
			konečný roztok	24,50	24,30	24,40	24,40 ± 0,09
<i>G. thermocatenulatus</i> CCM 2809	Cu	0,5	původní roztok	16,20	16,20	16,25	16,22 ± 0,03
			konečný roztok	14,30	14,50	14,55	14,5 ± 0,1
		0,6	původní roztok	18,90	19,00	18,90	18,93 ± 0,05
			konečný roztok	17,10	17,20	17,10	17,13 ± 0,05
		0,7	původní roztok	22,05	21,90	22,00	21,98 ± 0,07
			konečný roztok	19,95	20,00	20,00	19,98 ± 0,03
		0,8	původní roztok	25,20	25,10	25,20	25,17 ± 0,05
			konečný roztok	23,05	23,10	23,10	23,08 ± 0,03
	Pb	1	původní roztok	9,60	9,70	9,65	9,65 ± 0,05
			konečný roztok	8,40	8,40	8,35	8,38 ± 0,03
		1,1	původní roztok	10,60	10,60	10,50	10,57 ± 0,05
			konečný roztok	9,30	9,10	9,25	9,2 ± 0,1
		1,2	původní roztok	11,55	11,60	11,60	11,58 ± 0,03
			konečný roztok	10,20	10,00	10,10	10,10 ± 0,09
		1,3	původní roztok	12,60	12,50	12,60	12,57 ± 0,05
			konečný roztok	11,00	10,90	11,00	10,97 ± 0,05
	Zn	0,5	původní roztok	15,50	15,55	15,50	15,52 ± 0,03
			konečný roztok	14,65	14,70	14,70	14,68 ± 0,03
		0,6	původní roztok	18,60	18,70	18,60	18,63 ± 0,05
			konečný roztok	17,80	17,65	17,60	17,7 ± 0,1
		0,7	původní roztok	21,80	21,80	21,90	21,83 ± 0,05
			konečný roztok	20,90	20,85	20,90	20,88 ± 0,03
		0,8	původní roztok	25,50	25,50	25,40	25,47 ± 0,05
			konečný roztok	24,20	24,30	24,20	24,23 ± 0,05