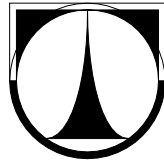


---

**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI**  
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií



**Vývoj nanovláknenného nosiče pro hybridní  
bioreaktory s imobilizovanou biomasou  
a využití obrazové analýzy pro hodnocení  
biofilmových struktur**

Development of nanofiber carrier for hybrid bioreactors  
with immobilized biomass and using image analysis  
for biofilm structures evaluation

**Autoreferát disertační práce**

**V Liberci 25. 6. 2013**

Ing. Lucie Křiklavová

Doktorand: *Ing. Lucie Křiklavová* *lucie.kriklavova@tul.cz*  
Školitel: *Ing. Tomáš Lederer, Ph.D.* *tomas.lederer@tul.cz*

Forma studia: *prezenční*  
Studijní program: *P 3901 Aplikované vědy v inženýrství*  
Studijní obor: *3901V025 Přírodovědné inženýrství*  
Tematický okruh: *Biotechnologie*  
Studium: *1. 7. 2009 – 30. 6. 2013*

Technická univerzita v Liberci  
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií  
Ústav nových technologií a aplikované informatiky  
Studentská 2  
461 17 Liberec 1

# A OBSAH

A	OBSAH .....	3
B	ABSTRAKT .....	4
C	ABSTRACT .....	5
D	CÍLE A PŘÍNOSY DISERTAČNÍ PRÁCE .....	6
E	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
F	PRAKTICKÁ ČÁST.....	10
1.	VÝVOJ NANOVLÁKENNÉHO NOSIČE .....	10
1.1.	<i>Nosič biomasy jako určující prvek při čištění odpadních vod .....</i>	<i>10</i>
1.2.	<i>Charakterizace nanovláknenného nosiče .....</i>	<i>13</i>
	Nosič pro fixní lože .....	15
	Nosič pro fluidní lože .....	16
2.	OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR .....	19
G	ZÁVĚR .....	25
	<i>Doporučení na pokračování práce v daném tématu .....</i>	<i>27</i>
H	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ STUDENTA .....	28
a)	<i>Impaktované a recenzované články .....</i>	<i>28</i>
b)	<i>Ověřené technologie.....</i>	<i>29</i>
c)	<i>Články ve Scopus nebo Web of Knowledge databázi .....</i>	<i>29</i>
d)	<i>Vystoupení na konferencích a další publikace.....</i>	<i>30</i>
I	SEZNAM POUŽÍVANÉ LITERATURY .....	32

## B ABSTRAKT

Předkládaná disertační práce se zabývá návrhem, vývojem a ověřením polymerního nanovláknenného nosiče biomasy, který může být využíván v hybridních bioreaktorech s imobilizovanou biomasou. V rámci vývoje nanovláknenného nosiče byla pozornost věnována především nosné niti, která musí splňovat náročná hlediska (mechanická a chemická stabilita, kolonizovatelnost, vysoký měrný povrch aj.). Z finální verze nosné nitě byly vytvořeny dva základní typy nanovláknenných nosičů – nosič pro fluidní lože (proudící společně s okolní kapalinou), nosič pro fixní lože (kapalina proudí skrze pevně uchycený nosič). Nanovláknenný nosič poskytuje mnohé výrazné výhody, jakými jsou především velký specifický měrný povrch, vyšší resistance biofilmu vůči vnějšímu toxickému působení a zejména rychlost zpracování nosiče.

Laboratorní ověřování vyvíjeného nanovláknenného nosiče probíhalo na reálných a modelových odpadních vodách. Za přesně stanovených podmínek byly ověřovány základní technologické parametry a identifikovány byly limitní stavy (minimální doba zdržení odpadní vody, maximální a minimální teplota, rozpětí pH, salinity, hodnocení respirace systému aj.). Paralelně jsou vyvíjené nanovláknenné nosiče porovnávány s komerčním nosičem AnoxKaldnes.

K hodnocení procesů upoutávání bakteriálního biofilmu na nosič byl v disertační práci navržen postup za využití obrazové analýzy. Stanoven byl růst a vývoj biomasy a hodnoceny byly výsledné biofilmové struktury. V rámci disertační práce byla vytvořena ucelená neinvazivní metodika hodnocení imobilizovaných mikrobiálních struktur na podkladovém materiálu (obecně na libovolném nosiči biomasy). Vytvořená metodika byla úspěšně korelována s gravimetrickým stanovením sušiny.

### **Klíčová slova**

Nanovláknenný nosič, průmyslové odpadní vody, nosiče biomasy, imobilizace mikroorganismů, biodegradace, obrazová analýza biofilmu.

## C ABSTRACT

This dissertation covers the design, development, and validation of polymer nanofiber carriers for use in hybrid bioreactors with immobilized biomass. In developing the nanofiber carriers, special attention was paid to the supporting threads, which must meet exacting standards (e.g. mechanical and chemical stability; colonization possibility; high surface area). Two basic types of nanofiber carriers were developed based on the final version of the threads: a fluidized bed carrier (carrier flows with the surrounding liquid) and a fixed bed carrier (liquid flows through a firmly attached carrier). Nanofiber carriers provide many significant advantages, such as their large specific surface area, high biofilm resistance against external toxic effects and speed of carrier incorporation.

The basic technological parameters of the nanofiber carrier were verified in the laboratory, using both real and model wastewater, and technological limits identified (e.g. minimum wastewater residence time; maximum and minimum temperature and salinity; respiration assessment). At the same time, nanofiber carrier performance was compared with a commercial carrier (AnoxKaldnes).

The latest image analysis methods were used to evaluate immobilized-bacteria biofilm (bacterial biofilm incorporation and formation on the carrier), its growth, and development of biofilm structure. A comprehensive non-invasive methodology was developed for the evaluation of immobilized microbial structures on base materials (i.e. on a biomass carrier). This methodology has been successfully correlated with gravimetric determination of dry matter.

### Key words

Nanofiber carrier, industrial wastewater, carrier biomass, microbial immobilization, biodegradation, biofilm image analysis.

## D CÍLE A PŘÍNOSY DISERTAČNÍ PRÁCE

Primárním cílem předkládané disertační práce byl vývoj polymerního nanovláknenného nosiče bakteriálního biofilmu pro jeho užití v biologickém čištění odpadních vod. Přínosem vyvíjeného nanovláknenného nosiče je stabilizace (resp. podpoření a intenzifikace) čistírenských procesů. Prostředkem k dosažení tohoto výsledku je zvýšení podílu mikroorganismů v systému, a to díky vysokému specifickému měrnému povrchu nanovláknenných nosičů. Využití nanovláken resp. nanotextilií představuje zcela nový směr při přípravě modifikovaných nosičů. Výhodou je využití původního způsobu přípravy nanovláken a jejich unikátních vlastností v novém směru při biologickém čištění odpadních vod. V rámci disertační práce byla prokázána schopnost nanovláken nést vybrané mikroorganismy za vzniku aktivního biofilmu. Jedná se o jedinečný způsob, který může být aplikován v mnoha oblastech čištění odpadních vod, především v průmyslových ČOV (vysoce zatížených vod), a dále i při mnoha dalších aplikacích, kde by kombinace biologických metod s využitím nanotechnologií (ve formě nanovláknenných útvarů) dopomohla k efektivnějším procesům. Výsledky laboratorních experimentů i plnoprovozní aplikace ukázali, že biologické čištění průmyslových odpadních vod v biofilmovém bioreaktoru za pomoci nanovláknenného nosiče je velice vhodnou variantou, jak odstraňovat specifické znečištění (např. anilin, kyanidy, DPG, fenoly, chloramin). Nanovláknenný nosič je velice vhodný podklad, neboť biofilm narůstá několikanásobně vyšší rychlostí a zároveň je více odolný než biofilm na komerčních nosičích. Tento výsledek má zásadní význam jednak při zapracování systému, ale zejména v případech regenerace po mimořádných událostech, které jsou v reálné praxi vysoce pravděpodobným rizikem. Disertační práce je zaměřena směrem, který by měl v budoucnu přinést účinná technologická i ekonomická řešení, která by celé řadě průmyslových podniků pomohla problematiku čištění odpadních vod řešit efektivněji.

Cílem disertační práce byl i vývoj a verifikace příslušné metodiky hodnocení vytvářeného biofilmu, a to za využití moderních metod analýzy obrazu. Cílem vytvářené metodiky bylo charakterizovat biofilm (růst a vývoj) a jeho strukturní vlastnosti. V rámci disertační práce byla vytvořena ucelená metodika hodnocení imobilizovaných mikrobiálních struktur, která byla navíc korelována se standardním laboratorním hodnocením biomasy (stanovení sušiny). Přínosem tohoto postupu je využití moderní metody, která je oproti standardním metodikám několikanásobně rychlejší, přesnější a více či méně i objektivnější. Navíc v rámci jednoho měření poskytuje analýza obrazu více výstupních informací (informace nejen o množství biomasy, ale i o jejím charakteru, seskupení aj.), což s sebou přináší jednoznačné přínosy mimo jiné také v rámci pochopení problematiky utváření biofilmu a v poznání toho, jaké parametry prostředí zásadně ovlivňují vývoj biofilmu. Přínosem analýzy obrazu je navíc i neinvazivní charakter tohoto měření, což s sebou přináší výhodu v možnosti znovupoužití odebraného vzorku (měření vzorek nepodléhá deformacím ani destrukci).

## E TEORETICKÁ ČÁST

Zvýšený tlak na kvalitu a ochranu životního prostředí v souvislosti s legislativou EU (stejně tak ČR) se odráží i ve zpřísnujících se legislativních limitech pro kvalitu vypouštěných odpadních vod. Tento tlak se projevuje jak v oblasti komunálních ČOV, tak v případě průmyslových aplikací. Užití konvenčních čistírenských technologií pro čištění specificky znečištěných průmyslových odpadních vod je často omezené nebo vyžaduje specifická řešení. Jednou z vhodných variant je imobilizace biomasy ve formě přirozeného biofilmu na vhodném nosiči s primárním cílem zvýšení koncentrace biologického činitele v systému (Masák 2002). Imobilizace bakteriální populace přináší mnohé výhody. Z hlediska mechanické manipulace jde o snadnou separaci biomasy, snížení zatížení dosazovacích nádrží a jednoduchá manipulace s materiálem. Z mikrobiologického hlediska fixace biomasy zabraňuje vyplavování mikroorganismů a udržuje vysokou koncentraci biomasy v reaktoru. Rozhodující výhoda imobilizace je zásadní pro pomalu rostoucí mikroorganismy (mikroorganismy rozkládající biologicky rozložitelné látky pomalu nebo mikroorganismy, jejichž růstová rychlost je snížena vlivem extrémních fyzikálně-chemických vlastností prostředí). (Masák 2002)

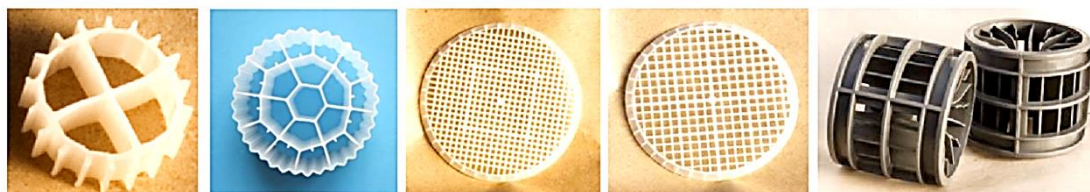
S vyšší koncentrací biomasy souvisí kratší doby zdržení v reaktoru, což umožňuje zakoncentrování pomalu rostoucích mikroorganismů a tvorbu dostatečné difúzní bariéry biofilmu, která snižuje účinky toxických látek a fyzikálně-chemických podmínek. Následně je možné využití menšího potřebného objemu nádrže. Imobilizace také zpravidla zvyšuje odolnost organismů, např. proti teplotním šokům, nepříznivým hodnotám pH či chemickým látkám (Masák 2002).

Cílem využití nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod, má za cíl podporovat bakteriální populace, které provádějí dekontaminaci. Nosič je pevným prvkem, který by měl nejen stabilizovat, ale především podpořit a vylepšit schopnosti mikroorganismů. Znalost potřeb bakteriální populace může dopomoci k pochopení procesů adheze a následně k tvorbě biofilmu. Výsledek může být přínosný při zdokonalování parametrů nosiče biomasy, resp. pro případ předkládané disertační práce i při jeho vývoji.

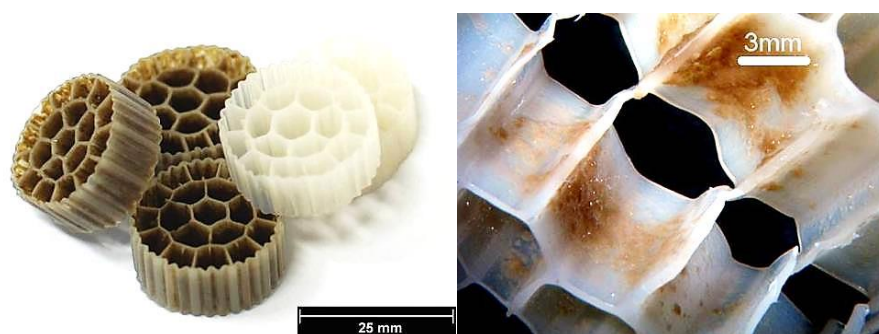
Bakterie přirozeně se vyskytující v přírodě mají tendence přirůstat k libovolnému povrchu, který se vyskytuje v jejich bezprostředním okolí. Například kamenivo v řekách, které dokonce sloužilo, jako jeden z prvních reálných aplikací na čistírnách odpadních vod. Kamenivo nebylo příliš vhodné, především pro svou značnou hmotnost a nízký aktivní povrch. Proto se hledaly materiály, které tyto nevýhody kompenzují. Přešlo se tedy na lehce dostupné a levné materiály jako plastové nasekané drenážní trubky, keramzit, perlit, písek, aktivní uhlí, sklo, aj. (Hermanowicz a Ganczarczyk, 1983; Mulcahy a Shieh, 1987). Tyto již splňovaly náročnější požadavky, ale často docházelo k zarůstání náplně, což vedlo k tvorbě anaerobních zón, a dále pak ke snížení aktivního povrchu a účinnosti.

Imobilizace mikroorganismů v přirozeném biofilmu je technologicky využívána již od počátku minulého století. Zkrápěné biofiltry používané pro čištění splaškových odpadních vod byly v minulosti masivně rozšířené i v ČR stejně jako tzv. anglické filtry využívané ve vodárenství pro pomalou filtraci surových vod. Biofiltry používané v čistírenství byly vesměs zkrápěné kolony, jejichž zásadní nevýhodou bylo zarůstání nosiče, limitace s dodávkou kyslíku a obecně nižší účinnost ve srovnání s klasickým aktivačním procesem (Chudoba et al., 1991). Zmíněné nevýhody většinou odstraňují kombinované systémy s biomasou jak fixovanou v ponořeném biofilmu, tak volnou (ve vznosu). První technologie využívaly fixované nosiče biomasy ve formě různých vestaveb, které byly tvořeny profilovanými plastovými konstrukcemi ve formě biologické voštiny. Tyto techniky neodstraňují s jistotou možnost zarůstání náplně a rovněž komplikují údržbu stavebních prvků bioreaktorů, zejména aeračních systémů. Z těchto důvodů jsou moderní nosiče biomasy tvořeny různými částicemi ve fluidním loži nebo jako vyjímatelné segmenty.

Nejnověji se jako nosiče biofilmu využívají obecně nejrůznější podklady, speciálně připravené polymerní materiály s cílem maximalizace specifického povrchu nosiče a s vhodnou morfologií povrchu. Syntetické polymerní materiály jako polyakrylamid, polyuretan, polyetylén a polyvinylalkohol jsou úspěšně používány až v posledních letech (Tampion a Tampion, 1987; Powel, 1990; Trögl et al., 2012; Trögl et al., 2013). Nosiče zachovávají jednoduchost výroby, vysokou efektivitu a značnou možnost velikostní a tvarové variability.



**Obrázek 1 – Nosiče AnoxKaldnes, zleva K1, K3, BiofilmChip™ M, BiofilmChip™ P a F3 (Le Noir, 2011; AnoxKaldnes™ MBBR)**



**Obrázek 2 – Komerční nosič AnoxKaldnes™ MBBR (nový a použitý nosič, detail kolonizace nosiče K3)**

Pokrokovým prostředkem hodnocení materiálových struktur je využití analýzy obrazu. Obrazová analýza poskytuje v jistých směrech dokonce mnohem více zajímavých výsledků než doposavad standardně užívané metody. Velkou předností analýzy obrazu může být její rychlost, objektivní hodnocení, efektivita při zpracování velkého množství dat, také nevyžaduje



žádnou větší zkušenost s analytickým postupem. V biologické praxi je pak výhodou neinvazivní charakter hodnocení. (Hlaváč, Šonka 1992; O'Gorman et al. 2008; Wu et al. 2008)

Obecně lze měřící metody rozdělit podle toho, zda v průběhu měření dochází ke změně původní struktury, nebo vlastností měřeného objektu; jinak řečeno, zda lze stejné měření provést na totožném vzorku opakovaně. Existují metody invazivní, které původní strukturu poškozují (metody rozpouštění, zahřívání nebo metody mechanického poškození objektu), a metody neinvazivní, které využívají především různých druhů záření, různé druhy spektroskopie, difrakční a optické metody.

Předkládaná metoda obrazové analýzy umožňuje neinvazivním způsobem hodnocení bakteriálního biofilmu na nosičích biomasy za využití optické mikroskopie (bez využití barviv, fixace vzorku aj.), kde obraz je finálně digitálně zpracován (Pirkl, 2003). Cílem disertační práce je charakterizovat bakteriální biofilm neinvazivní metodou (umožňuje opětovné použití měřeného vzorku) tak, aby výsledky měly stejnou vypovídací schopnost s výstupy, které lze získat standardními invazivními metodami (jako například stanovení sušiny). Výsledkem předkládané disertační práce je potvrzení možnosti použití metody analýzy obrazu k charakterizaci bakteriální populace a k určení kinetiky růstu biofilmu.

Analýza obrazu (image analysis) je proces získávání smysluplných informací z obrazu pomocí technik zpracování obrazu (image processing techniques). Které informace jsou důležité, je závislé na konkrétním úkolu nebo situaci. Mohou to být jednoduše barvy, velikost nebo tvar zkoumaných objektů nebo to mohou být i složitější parametry, jako determinace textury. Zpracování obrazu poskytuje širokou sadu nástrojů a metod, které jsou aplikovány na vstupní data (obraz) obvykle dle chronologických postupů. Postupy lze rozčlenit do následujících kategorií, pořízení obrazu, před-zpracování obrazu, vylepšení obrazu, segmentace obrazu, morfologické zpracování obrazu a identifikace oblastí.

## F PRAKTICKÁ ČÁST

Disertační práce byla řešena od července roku 2009 do června roku 2013 na pracovištích Technické univerzity v Liberci. Velice tímto děkuji ústavu Nových technologií a aplikované informatiky na Fakultě mechatroniky, informatiky a mezioborových studií (NTI); a také děkuji výzkumnému centru Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace (Cxl), v rámci jejichž pracovišť byla předkládaná práce řešena.

Další velký dík patří Fakultě textilní (KNT) a Ústavu pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace (Cxl), v rámci jejichž kapacit byla realizována příprava a poloprovozní výroba textilních nití s nanovlákněným povlakem. Předkládaná disertační práce se nezabývá způsobem výroby nanovláken a technologií upoutání nanovláken na podložní matici. Předkládaná disertační práce se zabývá aplikací vyvinutých struktur v rámci čištění průmyslových odpadních vod, analýzou a syntézou výsledků, na základě kterých jsou dále doporučovány další postupy a procesy, jak danou nanovlákněnou strukturu (nit s nanovlákněným povlakem a nosič utvářený z nití s nanovlákněným povlakem) modifikovat, vylepšit a dále optimalizovat pro ČOV.

### 1. VÝVOJ NANOVLÁKNĚNÉHO NOSIČE

Pro dekontaminaci znečištěných odpadních vod se stále hledají vhodnější materiály a postupy, které procesy biologické dekontaminace urychlí, zefektivní, případně i zlevní. Jednou z možných variant je využití stávající technologie nosičů biomasy v kombinaci s novými metodami nanotechnologie (nanovlákněných materiálů), na což je zaměřena předkládaná disertační práce. Cílem je vytvořit zcela speciální nosič biomasy pro čistírenské technologie založený na nanovlákněných resp. mikro-vlákněných sítích.

Hlavním cílem předkládané disertační práce bylo vytvořit původní nosič biomasy disponující výhodami z oblasti nanotechnologie a maximálně podporující buněčnou kolonizaci. Rozvoj moderního a originálního přístupu nanovlákněného nosiče představuje parciální a paralelní řešení mikrobiologie, materiálového inženýrství a bioinženýrství. Výsledkem je výroba jemných polymerních vláken, s průměrem od desítek nanometrů po několik mikrometrů.

#### 1.1. Nosič biomasy jako určující prvek při čištění odpadních vod

Na základě daných parametrů byl na Technické univerzitě v Liberci (TUL) zahájen vývoj nového typu nosiče, který je založen na využití nanovlákněných materiálů. Výslednou formou aplikace je nit, která je tvořena nosným vláknem s nánosem nanotextilie, která je dále zformovaná

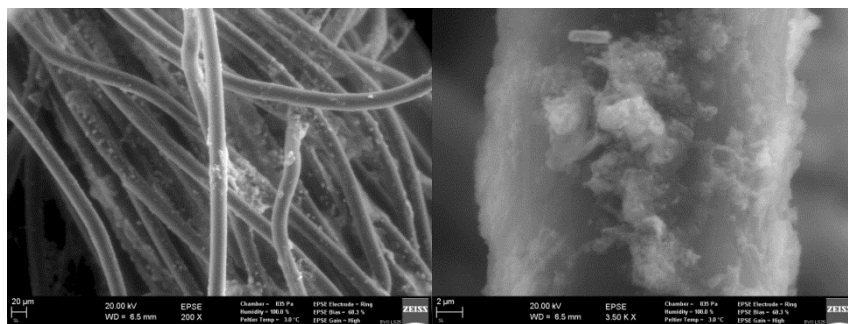
do speciálních tvarů. Jednoznačnou výhodou těchto nosičů je vysoký specifický povrch (díky nanovlákným vrstvám je poměr povrchu vlákna k jeho objemu maximální).

Nanovláknový nosič biomasy je určující prvek při aplikaci čištění odpadních vod, který splňuje požadované vlastnosti jako nosič biomasy, a díky specifické morfologii má další výhody:

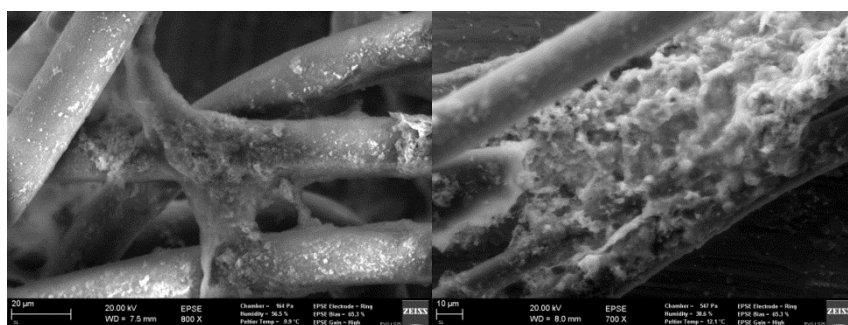
- 1) Materiály, z nichž jsou nanovlákná a základní nit vyrobeny, jsou polymery (polypropylen, polyuretan, polyetylen), kde tyto materiály jsou pro vodní organismy a pro mikroorganismy zcela netoxické a biokompatibilní.
- 2) Většina mikroorganismů lépe adheruje na hydrofobní povrchy (plasty) než na hydrofilní (sklo), (Palmer et al., 2007). Využití polymerních nanovláken s sebou přináší vyšší afinitu mikroorganismů k jejich povrchu a tedy i snazší a rychlejší počáteční kolonizaci.
- 3) Použité materiály a jejich úprava je biochemicky inertní, chemicky stabilní a v závěru po vyhodnocení několika testů a provedení finálních úprav (v rámci předkládané disertační práce) bylo docíleno i fyzikální stability nanovláknenného nosiče (resp. nanovláknenných vrstev na nosiči).
- 4) Morfologická vhodnost nanovláknenného nosiče je zaručena využitím nanovláknenných struktur, které jsou umístěny na povrchu nosné nitě. Povrchová struktura, vysoký specifický povrch, velká mezerovitost a póry o velikosti nano-měřítko umožňují velice rychlé ulpívání a následně upoutávání mikroorganismů. Mikroorganismy kolonizují především povrch nanovláken, ale díky jejich charakteristické morfologii jsou schopny prorůst i do vnitřní struktury nitě, výsledná stabilita biofilmu je mnohonásobně vyšší oproti jiným nosičům. Navíc dle (Mulder and Heijnen 1988; Heijnen et al. 1992) drsnost povrchu nosiče zlepšuje rozvoj biofilmu. Drsnost povrchu je dominantním faktorem pro růst biofilmu, a to více než fyzikálně-chemické vlastnosti daného povrchu (Loosdrecht et al. 1988). Pokud mikroorganismy kolonizují nanovláknenné struktury jsou mnohem více chráněny před smykovým třením (což by jinak mělo za následek uvolňování biofilmu).
- 5) Neobyčejný design nanovláknenného nosiče, extrémní flexibilita, poddajnost, tvarovatelnost (snadná formovatelnost, jelikož nosič není z „tvrdého“ polymeru o předem daném tvaru) a zároveň vysoká stabilita a navíc technologický způsob výroby (chaoticky propletená vlákna a nanovlákná a prostorové obloučky jednotlivých vláken) ještě více zvyšuje výsledný povrch nosiče (až desítky  $\text{m}^2/\text{g}$ ).
- 6) Velkou výhodou nanovláknenného nosiče je možnost kombinovat dané polymery a tím nastavovat densitu nosiče (od hustoty cca.  $900 \text{ kg/m}^3$  až po  $1200 \text{ kg/m}^3$ ), v podstatě přímo dle specifické aplikace, dle složení dané odpadní vody nebo charakteru využívaných buněčných konsorcií. Měrná hmotnost nosiče může být vždy srovnatelná s odpadní vodou.
- 7) Možnost vytvářet zcela libovolný design nosiče (pro fluidní lože i pro fixní lože) umožňuje aplikaci tohoto typu nosiče pro zcela libovolný charakter odpadní vody,

bakteriální populace nebo dle specifických požadavků čistíren odpadních vod. Například pro pomalu rostoucí mikroorganismy je možné využít textilní pleteniny s menší vzdáleností nití (tzv. rozestup ok síta), pro rychle rostoucí mikroorganismy lze využít textilní síť s hustším proplétáním.

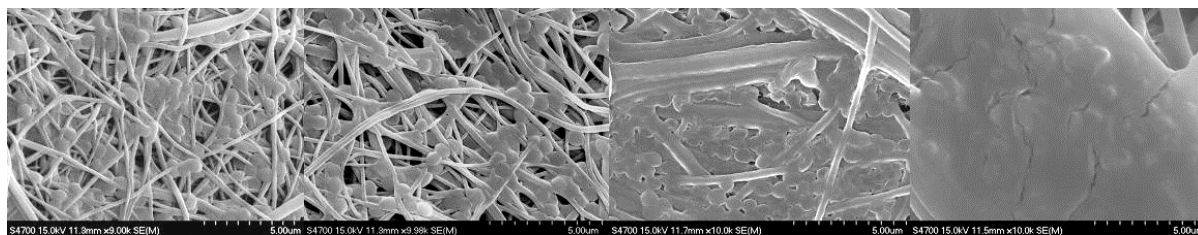
- 8) Významnou výhodou nanovláknenného nosiče je možnost narůstání bakteriálního biofilmu nejen na povrchu nosiče, ale také blíže k jeho středu (uvnitř nosiče, resp. uvnitř vlákna, jak dokazují níže uvedené fotografie), kde jsou bakterie lépe chráněny před toxickými vlivy okolního prostředí (např. střížné síly hydraulického míchání). Vyšší ochranu buněk zajišťuje samozřejmě i extracelulární biomasa. Díky struktuře podkladové a nanovláknenné nitě je umožněno pronikání substrátu a kyslíku k mikroorganismům i pro mocnější biofilmy.
- 9) Tloušťka biofilmu je rozhodujícím parametrem, protože jen vrstva penetrována kyslíkem (aktivní biofilm) se zúčastňuje degradačních procesů. Tloušťka aktivního biofilmu se obvykle pohybuje v rozmezí 50 až 150  $\mu\text{m}$  (Chudoba 1991). Díky využití nanovláknenných vrstev a díky možnosti pronikání kyslíku a živin ze spodní strany biofilmu (ze strany od nosiče) je možné, že mohutnost aktivního biofilmu může být pro tyto struktury až dvojnásobná, tj. 100 až 300  $\mu\text{m}$ , což by pro remediační aplikace (čištění vysoce zatížených průmyslových odpadních vod) mohlo být velkým přínosem.
- 10) Finanční náročnost současných typů nanovláknenných nosičů je sice mírně vyšší než je tomu u komerčních nosičů. Avšak v průběhu času, až se způsob výroby nanovláknenných nosičů více rozšíří, pak klesne současná cena a nové nanovláknenné nosiče budou moci cenově konkurovat stávajícím komerčním nosičům.



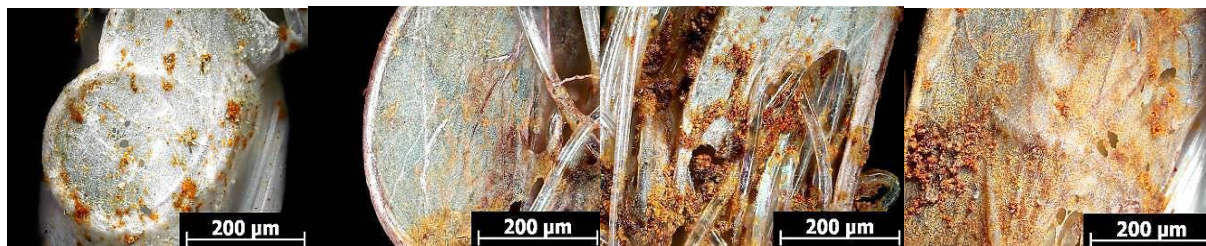
**Obrázek 3 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (20 hodin kultivace). Detail nosiče porůstajícího biofilmem a zachycení prvních solných inkrust (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo)**



**Obrázek 4 – Dokumentace kolonizovaného nosiče (pořízeno na pracovišti Zeiss, Německo)**



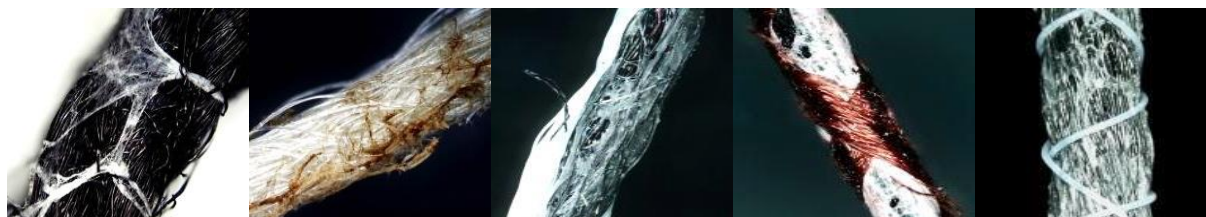
**Obrázek 5 – Dokumentace vývoje kolonizace nanovláknenného nosiče pomocí elektronového mikroskopu (140, 160, 210 a 330 hodin). Dokumentace narůstání bakteriálního biofilmu na/v nanovláknenných vrstvách (resp. uvnitř nosiče). (pořízeno na VŠCHT Praha)**



**Obrázek 6 – Fotografická dokumentace vývoje biofilmu na nanovláknenném nosičích (1, 5, 10, 15 den). Po delší době kolonizace se mikrobiální biomasa přirozeně rozroste i na místa bez nanovláken.**

## 1.2. Charakterizace nanovláknenného nosiče

Nanovláknna a z nich připravené nanotextilie představují prudce se rozvíjející odvětví materiálového průmyslu. Tyto kompozitní materiály mají velký aktivní povrch při nízké specifické hmotnosti a jsou velmi vhodné pro přípravu modifikovaných nosičů přirozených biofilmů cíleně připravených pro specificky znečištěné odpadní vody, ale i pro intenzifikaci klasických čistírenských technologií. Konstrukce nosičů biomasy je zcela zásadní pro dosažení maximální účinnosti čistírenských procesů, přičemž kromě speciálního tvaru jsou důležité materiálové a strukturální charakteristiky nosičů.



**Obrázek 7 – Přehled vývoje nanovláknenné nitě (vzorek A – E)**

Nanovláknenná příze je finálně složena ze tří částí (obrázek 7, vzorek E). Základní vlákno je polypropylen (660 dtex, tvarovaný vzduchem), povlak se skládá z polyuretanových nanovláken (dle využívaného způsobu výroby bylo možné rozpětí 30 – 100 dtex, metoda electrospinning, průměr nanovláken je cca. 260 nm), vše je dvojitě obtočeno ochranným polyetylenovým vláknem (167 dtex, chrání vůči tření při zpracování a při následných aplikacích proti dezintegraci nanovláken). Osнова pro plošné útvary je tvořena polypropylenovým vláknem (200 dtex).

Na základě výsledků disertační práce (výběr materiálu pro nanovlákněné vrstvy, stanovení ideálního množství nanovlákněné vrstvy, testy sorpce látek na nanovlákněný nosič, testy dezintegrace) byla zvolena nanovlákněná niť typu polyuretan, nános 50 dtex. Tento vzorek prokázal nejvyšší rychlost kolonizace bakteriální populací a současně je velice vhodný díky „malé“ míře sorpce k povrchu a díky dostatečné stabilitě nanovrstev ve vodním prostředí (samozřejmě je přítomnost fixační nitě). Současně je polyuretan dobře zpracováván a produkován metodou electrospinning.

Výsledkem hodnocení stability (odtrhávání) nanovláken z povrchu bylo zjištění, že především na počátku experimentu (před kolonizací nosiče biofilmem) nastává dezintegrace nanovláken do okolního prostředí, časem však dochází k jistému ustálení. Pokud se před reálnou aplikací tyto nosiče opláchnou proudem vody, dojde tak k nejmasivnějšímu odtržení volných vláken, které se pak dále do recipientu šířit nebudou. V další fázi se díky morfologii povrchu předpokládá kolonizace biofilmem a odtrhávání vláken se již nepředpokládá. V limitní zkoušce hodnocení toxicity nebyla pozorována statisticky významná imobilizace *Daphnia magna* (hodnoty EC 50 nelze vyhodnotit).

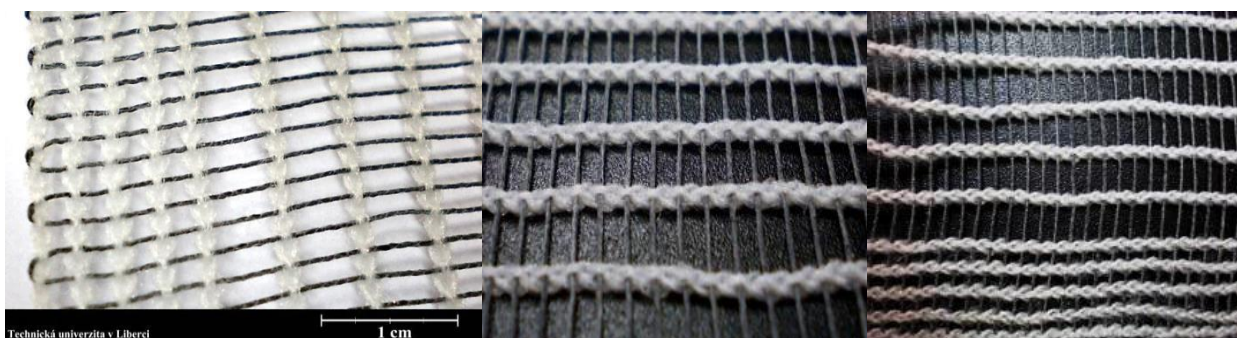
Nanovlákněna jsou schopna udržet i masivní vrstvy biofilmu, který může produkovat rychle rostoucí aktivovaný kal. V pozdějších stádiích nanovlákněna dokonce utvářejí v biofilmu tzv. kostru, která umožňuje zachování plně aktivního biofilmu i pro silnější vrstvy. Celý komplex i po masivním nárůstu biofilmu je densitně srovnatelný s odpadní vodou, což minimalizuje náklady na míchání systému. Dále bylo zjištěno, že po nárůstu mohutnějšího biofilmu a po jeho oplachu proudem vody nedochází k narušení nanovlákněné struktury na povrchu základní nitě a nosič je možné použít pro další kolonizaci (testy s chrom-sírovou směsí potvrdili destabilizaci nanovlákněné struktury). Laboratorní testování dále prokázalo, že nanovlákněna jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. V rámci krátkodobé kultivace dosahuje nanovlákněný nosič v průměru čtyřikrát vyšší míry kolonizace oproti komerčnímu nosiči. Počáteční zapracování nanovlákněného nosiče je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu. V rámci dlouhodobé kultivace (po čtyřech měsících) je pokrytí nanovlákněného nosiče více jak dvojnásobné. Objemová i specifická respirace biomasy fixované na nanovlákněných nosičích byla dokonce až více jak dvakrát rychlejší oproti respiraci s komerčními nosiči AnoxKaldnes. Nanovlákněná struktura umožňuje biofilmu odolávat extrémním podmínkám prostředí. Měření re-kolonizace nosiče prokázalo zpomalování rychlosti kolonizace nosiče, a to pravděpodobně v důsledku zbytkové mikrobiální populace, díky které nastává ona masivní počáteční kolonizace. Na druhou stranu zbytková populace (zůstatek po oplachu nosiče biofilmu) umožňuje rychlé zotavení systému a rychlost zapracování nosiče se zkracuje.

Výslednou přízi dle obrázku 7, vzorek E je možno zpracovávat textilními postupy do formy sférických smotků (pro použití ve fluidním loži) nebo do formy plošných útvarů (technologie proplétání s vloženým útkem, pro použití ve fixním loži).

### Nosič pro fixní lože

Z patentové rešerše na celosvětový stav techniky textilních nosičů biomasy pro čištění odpadních vod, se zaměřením na pleteninové textilie plošného a chomáčového typu (Komberec, 2011) bylo vybráno několik příkladů s jejichž inspirací bylo vytvořeno několik následujících exemplářů fixních a fluidních nosičů.

Z finálně uskupeného vlákna (obrázek 7, vzorek E) bylo vytvořeno několik 2D forem (tkanin, resp. pletenin). Z nitě je možné vytvořit například následující formace: tkanina (perlinková vazba), pletenina (zátažná), pletenina (osnova s vloženým útkem), jeden z možných příkladů je uveden níže. (Jirsák et al., 2010)



Obrázek 8 – Fixní nosič – Pletenina, osnova s vloženým útkem, řetízek PE, nosná nit PL (176 fibril 36x1x3), krycí nit (S, Z) monofil, PU nanovláknenná vrstva (Jirsák et al., 2010)

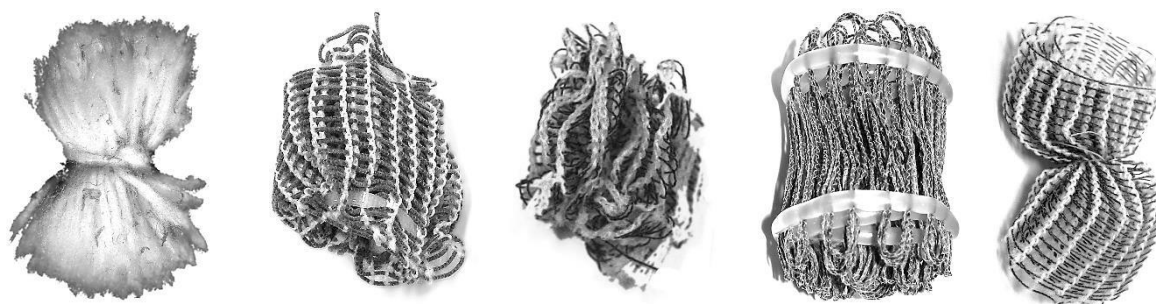


Obrázek 9 – Reálná konstrukce technologie vyjímatelných rámců (Lederer, 2011)

Technologie využití nosných rámců, kterou je možné jako vyjímatelné moduly instalovat do stávajících i nových aktivačních nádrží byla zkonstruována na základě praktických zkušeností vedoucího práce Ing. Tomáše Lederera, Ph.D. Reálné sestavení této technologie provedl Ing. Tomáš Pluhař a Ing. Jaroslav Nosek, Ph.D. Specifický povrch výsledného útvaru s polyuretanovými nanovláknny s hodnotou 50 dtex má pro daný návrh konstrukčního řešení pro fixní lože až tisíce  $\text{m}^2/\text{m}^3$ . Výsledkem technologie nosných rámců v kombinaci s nanovláknenným nosičem je finanční srovnatelnost s komerčními technologiemi.

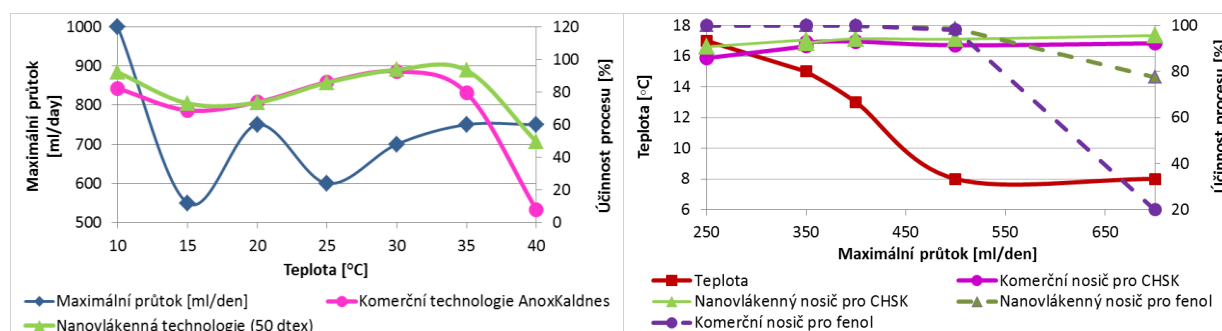
### Nosič pro fluidní lože

V reaktoru pro fluidní lože, proudí nosič spolu s aktivační směsí. Ve vývoji fluidního nosiče se sledoval především tvar, uskupení, velikost, adhesivní vlastnosti použitého materiálu a stabilita nosiče, vznášivost nosiče ve vodě a další. Tvar nosiče může být obecně zcela libovolný, optimální je však sférický tvar, což minimalizuje náklady na míchání. Do dnešního dne bylo odzkoušeno několik tvarů nosiče „bambule, soudky, mašličky“ (obrázek 10 níže). Tyto nosiče jsou pro reálné aplikace na čistírnách odpadních vod vcelku přijatelné, jen pro některé typy dochází k nežádoucím efektům. Optimálním aeračním systémem pro fluidní nanovlákněný nosič je středo-bublinná aerace, a to vzhledem k nutné vyšší mechanické energii na míchání těchto nosičů. Jiná je situace u potenciální intenzifikace stávajících čistíren, kde se v dnešní době nacházejí spíše jemno-bublinné aerátory.



Obrázek 10 – Příklad fluidních nosičů („bambule, třikrát typ „soudky“, „mašličky“)

Hlavním závěrem práce je identifikace ideálního uskupení fluidního nosiče, kterým byl nosič typu „tlustý soudek“. Tato vysoce stabilní struktura schopná odolávat vysokému mechanickému namáhání dosahovala nejvyšší specifické respirační rychlosti. Jako nejvhodnější fixní nosič byl stanoven nosič o hodnotách „400 cm<sup>2</sup>/l“, který dosahoval nejvyšší specifické respirační rychlosti. Bylo prokázáno, že tvar nosiče a jeho vlastnosti mají výrazný vliv na možnosti biodegradace, především při hodnocení specifické respirační rychlosti.



Obrázek 11 – Závislost účinnosti čištění odpadní vody na průtoku a teplotě, reálné odpadní vody zatížené anilinem a fenolem.

V rámci disertační práce byla potvrzena vhodnost nanovlákněných nosičů při aplikacích na čistírnách odpadních vod. Čas zapracování nanovlákněných nosičů je poloviční oproti komerčnímu nosiči. Nanovlákněný nosič také umožňuje rychlejší zapracování nosiče, a tím zkrácení potřebné doby kultivace a rychlejší regeneraci po mimořádných stavech. Nosič na bázi nanovláken je z hlediska účinnosti odstraňování CHSK výhodnější dokonce až o 42 % (při



extrémním zatížení). Nanovláknna umožňují vyšší resistenci imobilizovaných bakterií vůči okolním podmínkám (obrázek 11 vlevo).

Laboratorní testování ukázalo efektivní čištění odpadních vod zatížených fenolem pomocí nanovláknenných nosičů. Nanovláknna jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. Nanovláknenný nosič dosahuje průměrně nižších hodnot celkového zatížení organického znečištění na odtoku, má schopnost odolávat významnějším oscilacím v kvalitě odpadních vod, čímž je možné předcházet opakovanému zapracování bioreaktoru. Počáteční zapracování nanovláknenného nosiče je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu (obrázek 11 vpravo).

Laboratorní testování prokázalo efektivní čištění odpadních vod zatížených chloraminem pomocí nanovláknenných nosičů. Nanovláknna jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu tvořeného aktivovaným kalem. Jelikož aktivovaný kal usedal na nanovláknenné struktury velice rychle, byl tím prokázán rozdíl mezi nanovláknennými strukturami 50 dtex a 100 dtex. Rychlejšího zapracování nanovláknenného nosiče je docíleno díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu, v rámci struktury s hodnotou 100 dtex je nižší kolonizace způsobena pravděpodobně vyšší sorpcí chloraminu k tomuto povrchu.



Obrázek 12 – Biofilm na vyjímatelných nosných rámech, detail biofilmu v mokřém a suchém stavu (pro reálné odpadní vody zatížené chloraminem B v laboratorních podmínkách)

Výroba nanovláken byla metodicky provedena v návaznosti na konzultace s fakultou textilní. Za mnoho praktických námětů patří velký dík prof. RNDr. Oldřichu Jirsákovi, CSc., Filipu Sanetrníkovi a Ing. Michalu Komárkovi, Ph.D. V rámci vlastních zdrojů fakulty jsme nebyli schopni zajistit výrobu nanovláknenných struktur samostatně, proto výrobu těchto vláken zajišťoval pan Filip Sanetrník z Katedry netkaných textilií a nanovláknenných materiálů.

Výsledkem hodnocení v rámci disertační práce bylo laboratorní ověření několika typů nitě s nanovláknenným pokryvem, z nichž finální návrh za použití polyuretanových nanovláken, s mírou povrstvení 50 dtex a doporučení nanovláknna dodatečně zpevňovat za pomoci fixačního vlákna je pro praktické aplikace na biologických ČOV nejvhodnější.

Dále bylo cílem práce z těchto nití vytvořit 2D a 3D struktury (fixních a fluidních nosičů), které je možné textilními postupy zpracovávat v různorodých variantách (různá velikost ok sítě, různá tloušťka základní nitě, různý tvar nosiče aj.) dle specifických požadavků dané

ČOV. Tyto 2D a 3D nosiče byli laboratorně testováni na reálných OV. Výsledkem práce bylo doporučení, který typ nosiče je vhodný pro jaké aplikace a který z nich dosahuje „lepší“ výsledků.

Finální uskupení vláken s nanovlákným povrchem do 2D a 3D nosičů vedlo ke zjištění, že i přes dobrou fixaci nanovláken dochází k jejich odtrhávání z povrchu nosné nitě, časem však dochází k jistému ustálení. Závěrem měření bylo doporučení, aby se nosiče před reálnou aplikací opláchli proudem vody. Díky čemuž dojde k nejmasivnějšímu odtržení volných vláken, které se pak dále do recipientu šířit nebudou. V další fázi se díky morfologii povrchu předpokládá kolonizace biofilmem a odtrhávání vláken se již nepředpokládá. V limitní zkoušce akutní toxicity uniklých nanovlákných částic na *Daphnia magna* nebyli u dafnií pozorovány statisticky významné toxické účinky.

Základní testy ohledně možnosti znovu-použití nanovlákného nosiče jako nosiče biomasy pro reálné aplikace na ČOV vedli k potvrzení vhodnosti použití nanovláken pro reálné aplikace. V práci bylo doloženo, že oplach proudem vody nenarušuje nanovlákné struktury na povrchu základní nitě a nosič je možné použít pro další kolonizaci.

Laboratorní testování dále ukázalo, že nanovlákná jsou efektivním nosičem bakteriálního biofilmu. V rámci krátkodobé kultivace dosahuje nanovlákný nosič v průměru čtyřikrát vyšší míry kolonizace oproti komerčnímu nosiči. Počáteční zapracování nanovlákného nosiče je rychlejší především díky charakteristické morfologii a vysokému měrnému povrchu. V rámci dlouhodobé kultivace (po čtyřech měsících) je pokrytí nanovlákného nosiče více jak dvojnásobné (v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes). Nanovlákná jsou schopna udržet i masivní vrstvy biofilmu, který může produkovat rychle rostoucí aktivovaný kal. V pozdějších stádiích nanovlákná dokonce utvářejí v biofilmu tzv. kostru, která umožňuje zachování plně aktivního biofilmu i pro silnější vrstvy. Celý komplex i po masivním nárůstu biofilmu je densitně srovnatelný s odpadní vodou, což minimalizuje náklady na míchání systému. Objemová i specifická respirace biomasy fixované na nanovlákných nosičích je dokonce až více jak dvakrát rychlejší oproti respiraci s komerčními nosiči AnoxKaldnes.

V disertační práci byla potvrzena efektivnější účinnosti odstraňování CHSK pro nanovlákný nosič (v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes). Nanovlákný nosič dosahuje průměrně nižších hodnot celkového zatížení organického znečištění na odtoku, biologické čištění OV probíhalo dokonce až o 42 % efektivněji (při extrémním zatížení). Nanovlákná umožňují daleko vyšší resistenci imobilizovaných bakterií vůči okolním podmínkám, zde kolonizované bakterie mají schopnost odolávat významnějším oscilacím v kvalitě odpadních vod, čímž je možné předcházet opakovanému zapracování bioreaktoru. Čas zapracování nanovlákných nosičů je poloviční oproti komerčnímu nosiči, což umožňuje zkrácení potřebné doby kultivace a rychlejší regeneraci po mimořádných stavech.

Všechny zde uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce. Případně bylo měření provedeno ve spolupráci s Ing. Tomášem Dubem

a Bc. Dominikou Kortusovou (v disertační práci jsou vždy přesně specifikovány dané kapitoly), na základě čehož vzešly společné články:

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. *Vodní hospodářství* 2013, 63 (5), 151–155. (recenzovaný časopis).

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER T.: *Development of nanofiber support for use as a carrier of bacterial biomass in wastewater treatment*, *NANOCON 2012*, 23. – 25. 10. 2012, Brno; Sborník bude zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

Testy akutní imobilizace dafnií byly provedeny v akreditované laboratoři „Výzkumný ústav organických syntéz a.s., Centrum ekologie, toxikologie a analytiky, Rybitví 296, 533 54 Rybitví, Zkušební laboratoř č. 1057, akreditovaná ČIA dle ČSN EN ISO/IEC 17025“. Vyhodnocení, reprezentace a publikace dat bylo provedeno autorem disertační práce.

## 2. OBRAZOVÁ ANALÝZA BIOFILMOVÝCH STRUKTUR

Obrazová analýza se v posledních letech užívá čím dál častěji, přesto povědomí o této nové a progresivní metodě není v biologických vědách příliš rozšířeno. Obecně je možné tohoto přístupu využívat při jakémkoliv hodnocení nasnímaných fotografií v makro i v mikro-měřítku, černobílých i barevných a v jakémkoli oboru lidské činnosti (od strojírenství po biotechnologie).

Analýza obrazu biofilmu uchycovaného na pevném polymerním nosiči v odborné literatuře již existuje (Lewandowski and Beyenal, 2007), ale analýza obrazu biofilmu, který je formován na nanovlákněném nosiči prováděna nebyla (neexistují žádné dostupné zdroje). Dále uvedené výsledky prokázaly zajímavé vlastnosti nanovlákněných nosičů, které předtím nikdy odhaleny nebyly.

Cílem této kapitoly předkládané disertační práce byl návrh procedur automatické obrazové analýzy pro hodnocení charakteristik imobilizovaných biofilmových struktur. Pro zde uvedené obrazové hodnocení byly použity fotografie z modelového příkladu, kde dominantním c-zdrojem byl fenol. V průběhu těchto měření bylo získáno velké množství fotografií (snímků bakteriálního biofilmu na nosičích), následně tyto obrazy sloužili jako vstupní data pro tuto kapitolu. Fotografie vzorků byly pořízené za pomoci soustavy mikroskopu a digitálního fotoaparátu a následně byly automaticky analyzovány zde navrženým algoritmem (programovým kódem). Získaná data v podobě morfologických vlastností (porozita, fraktální dimenze apod.) byly porovnávány s výsledky laboratorních měření za účelem nalezení základních souvislostí a vazeb.

Obrazová analýza může v jistých směrech poskytovat dokonce více zajímavých výsledků než standardně užívané metody. Při odhalování souvztažností v mikroměřítku se totiž odkrývají

důležité charakteristiky bakteriálních konsorcií, což pomáhá odhalit nejasnosti a odkrýt souvislosti, které jinými metodami odhalit nelze. Charakteristika biofilmu a pochopení jeho struktury a vlastností může mít vliv na účinnost biodegradace, potažmo i celého systému čistíren odpadních vod. Velikost buněčných shluků či neobsazeného prostoru na nosiči má spojitost se změnami v populaci a stavu živin (Beyenal et al., 2000), tvar shluků má pak zase spojitost s hydrodynamikou v systému (Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000). Právě z těchto důvodů je vhodné ne-li nezbytné tyto buněčné struktury sledovat a vyhodnocovat je vhodnými prostředky.

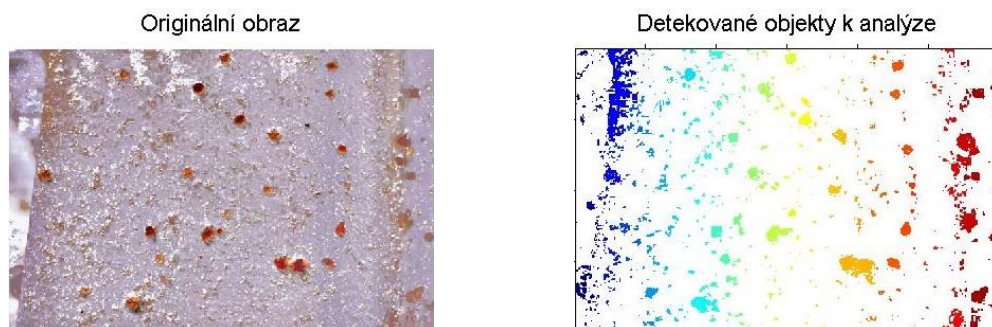
Pro přesné hodnocení parametrů objektu v obraze je vhodné jeho hodnocení ve všech třech rozměrech (tedy 3D), toto hodnocení s sebou přináší nesporné výhody, na druhou stranu je více časově, matematicky i technicky náročnější. Zjednodušený model plošného hodnocení (2D) je pro pochopení základních vztahů a metodiky dostatečné, především pro úvodní fáze kolonizace (pro tenký biofilm).

Procesy tvorby biofilmu a procesy růstu biofilmu na nosiči jsou jedním z nejzásadnějších vlivů pro pochopení hodnocení následného odpoutávání biomasy a k pochopení správných procesů biodegradace vůbec. To podtrhuje nutnost přesného popisu struktury a vývoje biofilmu. (Loosdrecht et al. 1995; Tjihuis et al. 1994a, Lewandowski and Beyenal, 2007). Lepší charakterizace vlastností biofilmu může tedy zlepšit porozumění procesu a upřesnit kvantitativní popis systému. Pro kvantitativní popis nárůstu biofilmu existuje jen omezené množství parametrů, které jsou v současné době k dispozici. (Peyton 1996; Lewandowski and Beyenal, 2007; Yang et al., 2000) Z těchto důvodů se disertační práce zabývá především hodnocením biofilmových struktur v plošném měřítku, u nichž je cílem definovat parametry, které pomohou k charakterizaci biofilmových struktur a dále odhalí možnosti tvorby biofilmu na dvou diametrálně různých nosičích, resp. površích (plastový komerční nosič AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič).

V rámci předzpracování obrazu dochází mimo jiné i k další úpravě obrazu, a tou je komprese. Komprese dat je zpracování počítačových dat s cílem zmenšení jejich objemu při současném zachování informací v datech obsažených. Pro úpravu velikosti obrazu byla v Matlabu použita funkce „*imresize*“ (funkce změny velikosti obrázku). Určující interpolací byla zvolena metoda „*nearest neighbor*“, metoda dává po částech konstantní interpolaci. Ačkoli při tomto procesu dochází k určitému zkreslení dat (obrazu), je možné ztrátu těchto dat tolerovat. Kompresí se především sníží nároky na potřebné výpočetní zdroje (výkonnost procesoru, paměti aj.) a dojde k výraznému urychlení výpočetního času při zpracování komprimovaných obrazů.

Jaký vliv může mít komprese obrazu na jednotlivé parametry je ukázáno na vybraných grafech níže. Komprese vyšší než 80 % výrazně ovlivňuje výpočet parametrů. 80 % komprese je v grafu označena svislou dvojitou zelenou čarou. Ve všech hodnocených parametrech dochází pro více než 80 % kompresi (tj. v grafu vlevo od zelené linky) k velkému zkreslení dat nebo k jejich oscilaci. Výsledkem práce byla volba daného rozlišení obrazu (resp. dané komprese obrazu),

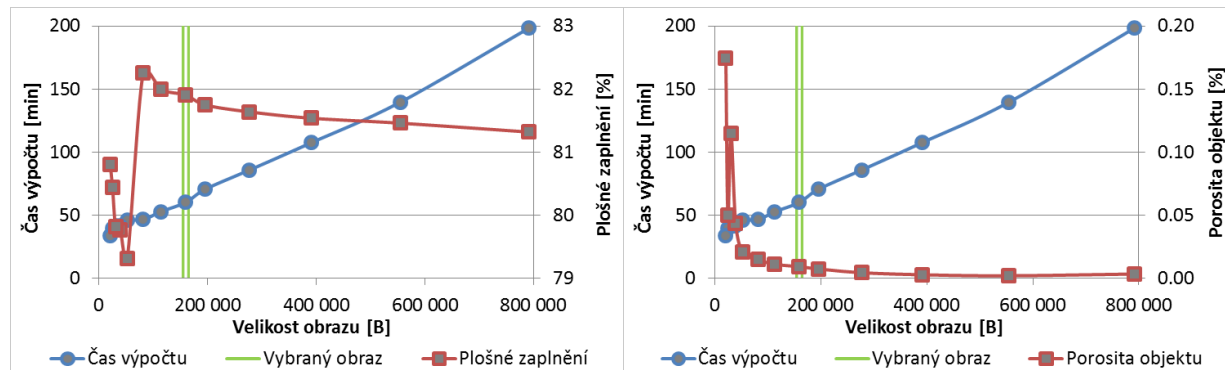
kteří umožní urychlení výpočetního času, ale zároveň stále nedojde k narušení či změně měřených charakteristik.



Obrázek 13 – Příklad identifikace bakteriálního biofilmu pomocí navrženého algoritmu v Matlabu



Obrázek 14 – Příklad identifikace bakteriálního biofilmu pomocí navrženého algoritmu v Matlabu

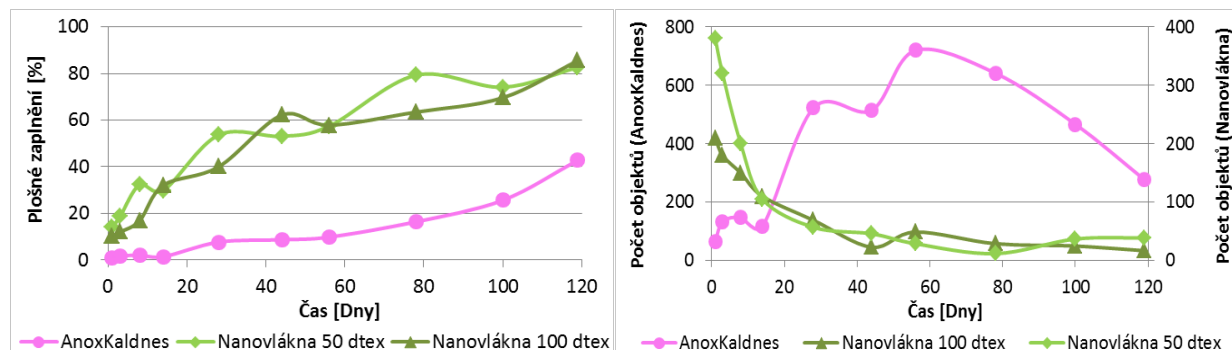


Obrázek 15 – Vliv komprese obrazu na hodnocené parametry obrazovou analýzou – Plošné zaplnění, Porosita

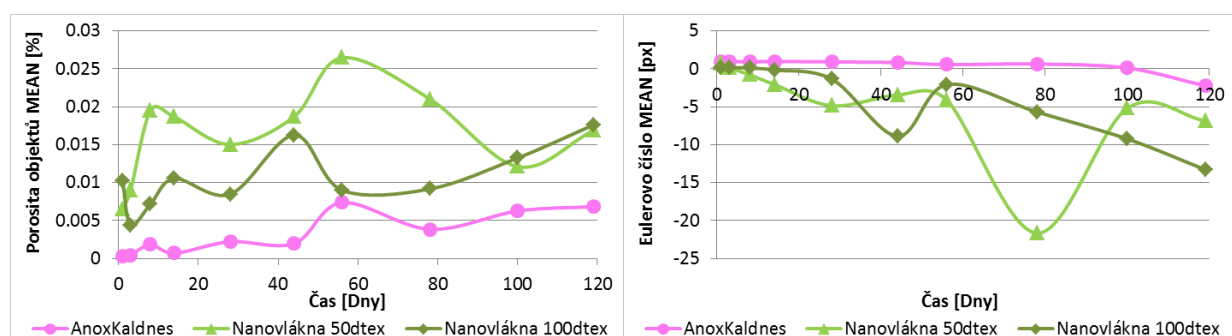
Hlavním výsledkem hodnocení plošných biofilmových struktur je potvrzení vhodnosti nanovláknitého nosiče při kolonizaci bakteriální populací. Nanovláknitý nosič umožňuje bakteriím rychlou kolonizaci, především v počátečních stavech kultivace. Kinetika růstu parametru plošné zaplnění je především pro nanovláknité struktury několikanásobně rychlejší oproti komerčním nosičům. Kolonizace nanovláknitých povrchů probíhá již během několika hodin kultivace, počty objektů jsou v první hodině po inokulaci v řádech několik stovek a dále již klesají, což značí tvorbu sekundárního biofilmu (bez nutnosti zpracování nosiče, úpravy jeho povrchu, primární biofilm na nanovláknitých strukturách nevzniká).

Nanovláknité struktury umožňují zde upoutanému biofilmu získat jedinečné vlastnosti; biofilm je vysoce homogenní s převládajícím směrem růstu podél nanovláken; biofilm obsahuje četné

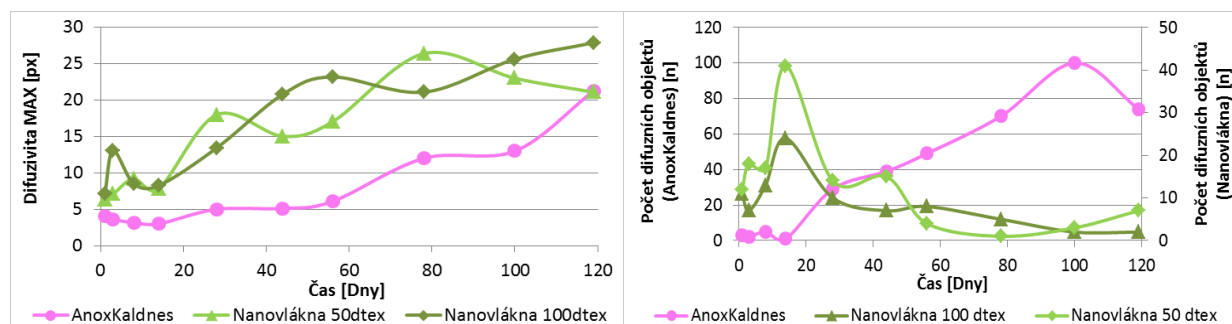
kanálky, které umožňují efektivní transport živin a kyslíku do vnitřních struktur biofilmu a nedochází k difúzní limitaci (nebo jen velice minimálně); kolonie utvářené na nanovláknenných strukturách jsou vysoce homogenní a okraje kolonií velice hladké, výsledkem je strukturně pevný a odolný biofilm.



Obrázek 16 – Obrazová analýza – Plošné zaplnění, Počet objektů

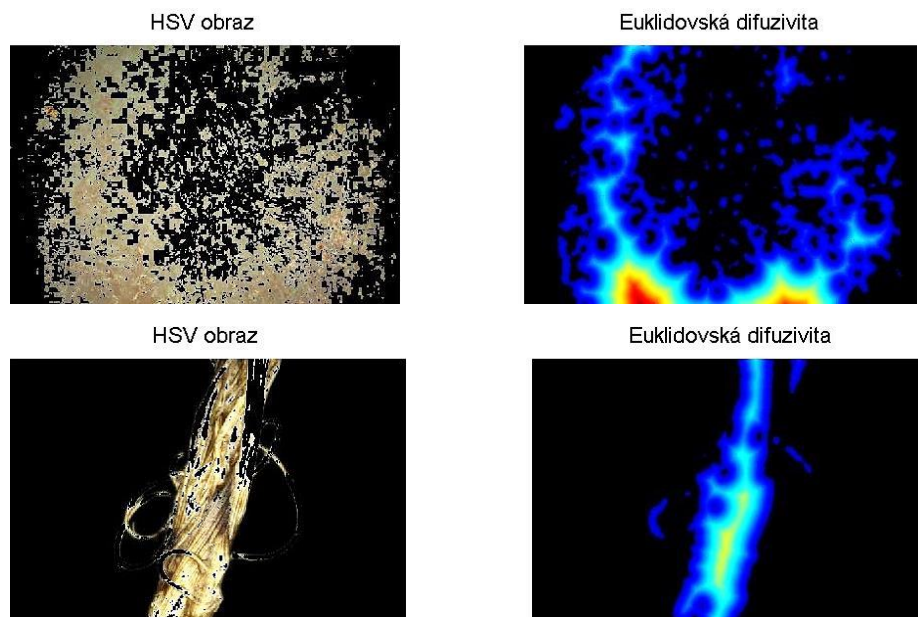


Obrázek 17 – Obrazová analýza – Porosita objektů, Eulerovo číslo



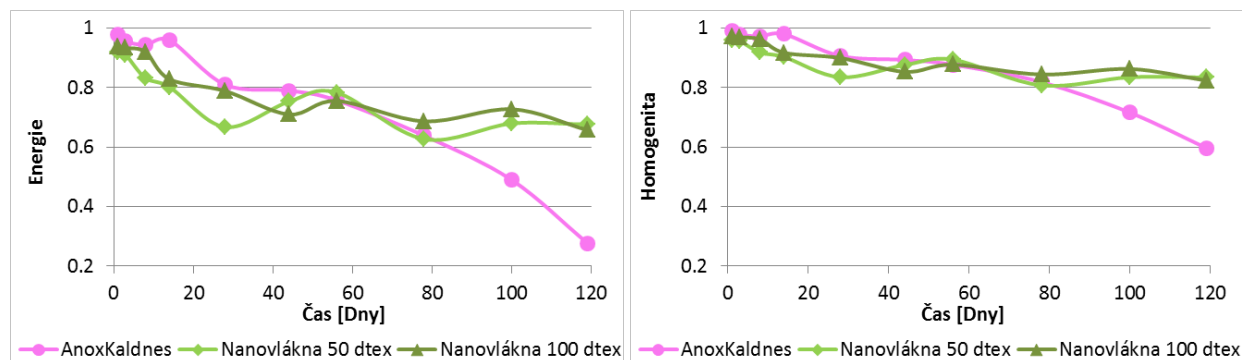
Obrázek 18 – Obrazová analýza – Maximální difuzní vzdálenost, Počet difuzních objektů

Difuzní limitace u nanovláknenných struktur nastává jen minimálně, navíc počet difuzně limitujících míst je na nosiči řádově méně (obrázek 18 vpravo). Obrázek difuzivity pro oba typy nosičů dokumentuje obrázek 19 níže, kde žluté až červené plochy indikují místa, kde s nejvyšší pravděpodobností může nastávat difuzní limitace. Prostup kyslíku a živin může být v těchto místech omezen nebo dokonce znemožněn, v důsledku čehož mohou vznikat i anaerobní zóny. Obrázek níže potvrzuje, že na nanovláknenném nosiči tyto plochy vnikají jen málo nebo dokonce vůbec.

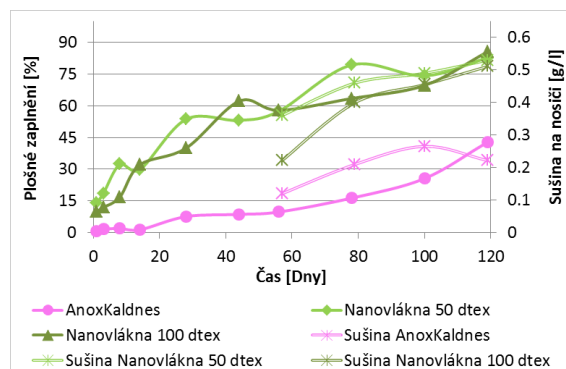


**Obrázek 19 – Znázornění měření difuzivity vyjádřený jako obraz pro AnoxKaldnes a nanovláknenný nosič**

Výsledkem hodnocení texturních parametrů je vcelku homogenní pokrývání nanovláknenného nosiče biofilmem, pro komerční nosič AnoxKaldnes je pokrývání povrchu více heterogenní, tj. existují místa, která jsou dobře pokrývána, ale také existují místa bez pokryvu. Vyšší energie u biofilmových struktur na nanovláknenném nosiči naznačuje skutečnost, že biofilm má více homogenní strukturu. Parametry energie a homogenity jsou pro nanovláknenný nosič vyšší, což naznačuje výskyt mohutnějšího biofilmu (v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes).



**Obrázek 20 – Obrazová analýza – Energie, Homogenita**



**Obrázek 21 – Korelace časového průběhu nárůstu biofilmu (průběh kolonizace) a vyjádření sušiny**

Cílem kapitoly korelace obrazového hodnocení biofilmu se standardně užívanou invazivní metodou stanovení sušiny bylo ověření souladu gravimetrického stanovení sušiny s neinvazivním hodnocením založeným na vyvinuté metodice analýzy obrazu. Výsledek potvrzuje cca 90% shodu vyvinuté metodiky analýzy obrazu s gravimetrickým hodnocením.

Hlavním výsledkem při zpracování obrazu je potvrzení nutnosti úpravy pozadí a jistých objektů v obraze, jelikož snímací aparatura nebude nikdy natolik „dokonalá“, aby zabránila vzniku těchto artefaktů. Hodnocení komprese obrazu mělo za cíl stanovit, jaký vliv má rozlišení obrazu (resp. komprese originálního obrazu) na hodnocené parametry. Výsledkem práce byla volba dané komprese obrazu, což urychlí výpočetní čas, přičemž stále nedojde k narušení či změně měřených charakteristik. Při postupech segmentace obrazu bylo zjištěno, že pro hodnocení obrazu je nutné využití HSV barevného prostoru (nedochází k vyhodnocování nežádoucích složek obrazu) a definovaného postupu založeného na rozdílu složek HSV obrazu.

Hlavním závěrem při hodnocení plošných biofilmových struktur je potvrzení vhodnosti nanovláčenného nosiče při kolonizaci bakteriální populací. Nanovláčenný nosič umožňuje bakteriím rychlou kolonizaci, především v počátečních stavech imobilizace (kolonizace nanovláčenného nosiče probíhá již během několika hodin kultivace). Nanovláčenné struktury umožňují zde upoutanému biofilmu získat jedinečné vlastnosti; biofilm je vysoce homogenní s převládajícím směrem růstu podél nanovláček; biofilm obsahuje četné kanálky, které umožňují efektivní transport živin a kyslíku do vnitřních struktur biofilmu a jen velice minimálně dochází k difúzní limitaci; kolonie utvářené na nanovláčenných strukturách jsou vysoce homogenní a okraje kolonií velice hladké, výsledkem je strukturně pevný a odolný biofilm. Při hodnocení texturních parametrů bylo zjištěno, že nanovláčenný nosič je vcelku homogenně pokrýván biofilmem, kdežto pro komerční nosič AnoxKaldnes je pokrývání povrchu více heterogenní, tj. existují místa, která jsou dobře pokrývána, ale zároveň existují místa bez pokryvu. Vyšší energie u biofilmových struktur na nanovláčenném nosiči naznačuje skutečnost, že biofilm má více homogenní strukturu. Parametry energie a homogenity jsou pro nanovláčenný nosič vyšší, což naznačuje přítomnosti mohutnějšího biofilmu (v porovnání s komerčním nosičem AnoxKaldnes).

Cílem disertační práce bylo také ověření souladu gravimetrického stanovení sušiny s neinvazivním hodnocením založeným na vyvinuté metodice analýzy obrazu. Výsledek potvrzuje cca 90% shodu vyvinuté metodiky analýzy obrazu s gravimetrickým hodnocením.

Všechny zde uvedené výsledky byly založeny na vlastním měření a provedeny byly autorem disertační práce.



## G ZÁVĚR

V předkládané disertační práci byly předneseny výsledky v oblasti použití nanovláken (scaffoldového materiálu) jako podkladu pro bakteriální biofilm. V rámci disertační práce byl selektován vhodný polymer (na základě testů kolonizace, stability nanovrstev, aj.). Dále byl stanoven optimální poměr těchto nanovláken na podkladové niti (ideální míra povrstvení). Výsledkem práce tak je návrh nitě, která již splňuje všechny kritické požadavky na vývoj a výrobu nanovláknenného nosiče biomasy pro reálné aplikace na ČOV. Z finálně uskupené nitě a na základě patentové rešerše byly navrženy, vytvořeny a otestovány fluidní a fixní nosiče biomasy. U těchto nových nosičů byly hodnoceny stěžejní charakteristiky jako bioaktivita, toxicita, možnosti opětovné rekolonizace, možnosti tvorby mohutnějšího biofilmu, měření hustoty komplexu po nárůstu biomasy a další.

Přednost využití nanovláken pro aplikace na ČOV je především jejich vysoký měrný povrch; bakteriím tato struktura umožňuje vysokou adhesivitu k povrchu, což v důsledku zjednodušuje imobilizaci bakterií, zejména v úvodních fázích kolonizace (rychlejší zpracování nosiče), případně během náročných havarijních stavů (zkrácení potřebné doby regenerace systému). Díky morfologii povrchu (velká pórovitost a malé rozměry pórů) je výsledná struktura biofilmu více stabilní, což navíc zajišťuje stabilní účinnosti biologického čištění. Přítomnost nanovláken umožňuje imobilizovaným bakteriím získat vyšší resistenci vůči okolním podmínkám a dokonce dochází ke snížení vlivu skokových změn v průběhu činnosti reaktoru, například při extrémních nárazových stavech (výkyvy látkového zatížení, teploty aj.), které nastávají v reálné průmyslové praxi producentů průmyslových odpadních vod velice často.

Mezi zásadní výhody nanovláknenného nosiče patří možnost nastavovat densitu nosiče dle požadavků specifické aplikace ( $900 \text{ kg/m}^3$  až  $1200 \text{ kg/m}^3$ ); možnost narůstání bakteriálního biofilmu nejen na povrchu vlákna, ale také blíže k jeho středu (ochrana před toxickými vlivy okolního prostředí); efektivnější degradace odpadních vod bez oscilací účinnosti. Pochopitelně stále existuje několik sporných otázek, jako dezintegrace nanovláken, toxicita na vyšší organismy či dokonce bioakumulace vláken v organismech, což je nutné dále studovat.

Cílem disertační práce byl také návrh programového prostředku pro hodnocení vázaných mikroorganismů (biofilmu) pomocí analýzy mikroskopického obrazu. Vytvořen byl komplexní automatický kód v programovém prostředí Matlab, který velice dobře kompenzuje nevýhody manuálního hodnocení. Průměrný čas k vyhodnocení jednoho obrazu automatickým kódem je 36 sekund (manuální hodnocení často dosahuje i několika hodin). Vyhodnocená data jsou vypsána do tabulkového editoru (využívá se MS Excel, ale lze nastavit i jinak), výstupní grafy a obrázky jsou exportovány ve formě „JPG“ obrazů do dané výstupní složky. Díky obrazovému hodnocení lze mimo jiné získat detailnější informace o biofilmu a dále o možnostech jeho vytváření v závislosti na podkladovém materiálu a jeho vlastnostech (morfologie povrchu aj.). Současné 2D hodnocení je zcela postačující především při hodnocení pomalu rostoucích bakteriálních populací, pro tenké biofilmy nebo pro hodnocení počáteční fáze kolonizace.

Výsledná korelace mezi obrazovým a gravimetrickým stanovením biomasy (stanovením sušiny), pro rané fáze růstu biofilmu, dosahuje v průměru 90 %.

Obrazová analýza dále prokázala, že pro nanovlákný nosič není nutná tvorba primárního biofilmu (jako je tomu u jiných nosičů dle La Motta 1980), ale právě díky struktuře nanovlákného povrchu dochází ihned k procesu tvorby sekundárního biofilmu (permanentní zachycení). Díky čemuž je počáteční i opakované zpracování nosiče několikanásobně rychlejší. Obrazovým hodnocením lze získat například i kinetiku růstu biofilmu v závislosti na okolních podmínkách (teplota, pH, salinita aj.). Moderní přístup za využití analýzy obrazu umožňuje nedestruktivní hodnocení bakteriálního biofilmu na libovolném podkladovém materiálu, navíc je možné odhalit další skryté souvislosti v charakterizaci struktury biofilmu a v jeho tvorbě, které mohou pomoci při charakterizaci celého systému biologického čištění.

### **Výroba nanovláken byla provedena na fakultě textilní (KNT, TUL).**

#### **Původní výsledky disertační práce jsou především:**

- **Vývoj nanovlákného nosiče pro aplikace na čistírnách odpadních vod**
  - o Doporučení na nejvhodnější materiál
  - o Doporučení vhodné míry povrstvení nanovlákn
  - o Doporučení nanovlákn dodatečně zpevňovat za pomoci fixačního vlákna
  - o Laboratorní ověření nitě s nanovlákným povrchem
- **Vývoj 2D a 3D struktur (fixních a fluidních nosičů), které je možné textilními postupy zpracovávat v různorodých variantách (různá velikost ok sítě, různá tloušťka základní nitě, různý tvar nosiče aj.).**
  - o Laboratorní ověření nosičů na reálných odpadních vodách.
  - o Selektce vhodného typu nosiče pro dané aplikace.
- **Definice efektivity nanovlákných nosičů pro dané aplikace**
  - o Počáteční zpracování nanovlákného nosiče je rychlejší.
  - o Nanovlákný nosič dosahuje v průměru čtyřikrát vyšší míry pokrytí biofilmem oproti komerčnímu nosiči (v průběhu jednoho měsíce).
  - o Nanovlákn jsou schopna udržet i masivní vrstvy biofilmu, který může produkovat rychle rostoucí aktivovaný kal.
  - o Nanovlákný nosič dosahuje průměrně nižších hodnot celkového zatížení organického znečištění na odtoku.
- **Vývoj metodiky hodnocení růstu biomasy na podkladovém materiálu, včetně charakterizace vznikajícího bakteriálního biofilmu.**
  - o Charakterizace biofilmu na nanovlákném materiálu (potvrzení jedinečných vlastností zde vzniklého biofilmu – vysoká homogenita, četné kanálky, minimální difúzní limitace).
  - o Ověření souladu gravimetrického stanovení sušiny s neinvazivním hodnocením založeným na vyvinuté metodice analýzy obrazu (90% shoda).

## Doporučení na pokračování práce v daném tématu

Jelikož současný stav problematiky stále nedovoluje optimální a bezchybné hodnocení úniku nanovláken z podložní nitě (dezintegrace nanovláken) bude tato sporná otázka předmětem dalších studií a navazujících měření. Stejně tak v současné době neexistuje vhodná metodika pro hodnocení toxicity nanočástic na vyšší organismy (existují velké problémy s agregací a sedimentací částic). Velké testování nanovláknenných nosičů je plánováno pro komunální ČOV (v předkládané disertační práci byla pozornost věnována pouze vodám průmyslovým, vysoce zatíženým). U komunálních ČOV, bude cílem sledování ulpívání aktivovaného kalu k nanovláknenným strukturám a hodnocení charakteristik takto vzniklého biofilmu (především aktivita biofilmu, hodnocení difuzní limitace pro mohutnější biofilm a potenciální možnosti zarůstání sítě pleteniny, jelikož se bude jednat o rychle rostoucí bakteriální populaci).

Obrazová analýza v rámci předkládané disertační práce přispěla k odhalení důležitých souvislostí a nových aspektů inovativních materiálů. V obrazové analýze budou dále hodnoceny a měřeny parametry jako vliv střížných sil na morfologii povrchu biofilmu, vliv pH, vliv teploty, salinity a dalších parametrů. Hodnocení pomůže při návrhu biologických reaktorů ČOV.

Prezentovaná metoda obrazové analýzy stále obnáší mnohá úskalí. Optické hodnocení biofilmu platí jen pro tenké vrstvy biofilmu. Postupem času, přibližně po dvou měsících v závislosti na rychlosti růstu mikroorganismů, není vhodné tuto metodu používat, protože biofilm je již velice mohutný a metoda již není zcela validní, poté jsou příhodné gravimetrické metody. Možností jak postup dále vylepšit je použití mikroskopu s možností měření v ose „z“, a to pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (Lawrence et al., 1991). Jedná se o tzv. hodnocení biofilmu ve 3D rozměru, kde technika umožňuje nedestruktivní způsobem, bezdotykově, dvourozměrné optické řezy biofilmu a jeho trojrozměrnou rekonstrukci (Deeber et al., 1994; Stoodley et al., 1994). Využití konfokální mikroskopie bude náplní práce v dalších experimentech.

Výsledky z obrazové analýzy navíc pomohou k vytvoření vhodnějšího modelu růstu biomasy v bioreaktorech. Obrazová analýza dále přispěje k vytvoření matematických modelů predikce adhezivního chování buněk k povrchu (na základě Picioreanu et al., 1998; Lardon et al., 2002) především pro nové materiály, jako jsou scaffoldové podklady (využití nanovláknenných struktur) u nichž standardní modely (dle Hermanowicz et al. 1995; de Beer et al., 1994) selhávají nebo ne zcela odpovídají současné literatuře.

Další možné využití potenciálu obrazové analýzy v laboratorních experimentech je plánováno pro experimenty: testování stability nanovláken (barvením nebo využitím fluorescenční mikroskopie); hodnocení narušování povrchu nosiče mikroorganismy, velký potenciál se také skýtá v hodnocení dispergovaných mikroorganismů, resp. aktivovaného kalu, kde lze hodnotit jeho morfologické a kompoziční vlastnosti (zastoupení EPS, počet a struktura vláken a vloček aj.). Díky včasné detekci vláknitých organismů na ČOV bude například možné předcházet nežádoucím stavům pěnění či bytnění kalu.

## a) Impaktované a recenzované články

DOSTÁLKOVÁ J., JIRKŮ V., KŘIKLAVOVÁ L., PROCHÁZKOVÁ G., SUCHÁNEK M., BRÁNYIK T., *The utility of cell surface characterization in the application of cellulolytic biofilms*. World Journal of Microbiology and Biotechnology (2013), v recenzním řízení.

TRÖGL J., JIRKOVÁ I., ZEMÁNKOVÁ P., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., PAVLORKOVÁ J., KURÁŇ P., POPELKA J., KŘIKLAVOVÁ L.: *Estimation of the quantity of bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst via phospholipid fatty acids content: A preliminary study*. Folia Microbiol. 2 (2013) 135-140. DOI: 10.1007/s12223-012-0189-3. IF = 0.677

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Vodní hospodářství 2013, 63 (5), 151–155. (recenzovaný časopis).

KŘIKLAVOVÁ, L., VALECKÝ, L., DUB, T., NOVÁK L., LEDERER, T.: *Metody obrazové analýzy aktivovaných kalů a biofilmů*. Sovak 2013, v tisku. (recenzovaný časopis)

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., JIRKŮ, V., *The use of composite fibers for production of biomass carriers*, Uveřejněno v knize: "Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges" (ISBN: 978-981-4405-03-4), edited by A. Mendez-Vilas and published by World Scientific Publishing Co., (Pub. date: 2012), pp 187-191.

TRÖGL J., KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P. HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L.: *Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst*. Int. J. Environ. Sci. Technol. 3 (2012) 425-432. DOI: 10.1007/s13762-012-0048-4. IF = 3.157

BOUŠKOVÁ A., MRÁKOTA J., STLOUKAL R., TRÖGL J., PILAŘOVÁ V., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T.: *Three examples of nitrogen removal from industrial wastewater using Lentikats Biotechnology*. Desalination 280 (2011) 191-196 DOI: 10.1016/j.desal.2011.07.001 IF = 1,851

LEDERER T., KŘIKLAVOVÁ L. kapitola *Využití nanovláknenných materiálů jako nosiče biomasy*. In Chemicky podporované in situ sanační technologie, 1. st ed.; Černík M. a kol., Ed.; ISBN: 978-80-7080-767-5; VŠCHT: Praha, 2010; pp str. 255 – str. 266.

## b) Ověřené technologie

Technologie čištění odpadních vod s využitím nanovlákného nosiče biomasy. (2013) (Lederer, Křiklavová, Sanetrník, Pluhař, uplatněno 2012 pro Bochemie a.s. Bohumín IČ 27654087)

RIV/46747885:24220/10:#0001648 – Technologie výroby plošného útvaru z přízí obsahujících nanovlákná (2010) (Jirsák, Sanetrník, Křiklavová, Lederer, uplatněno 2010 pro TREVOS Košťálov, s r.o.)

RIV/46747885:24220/11:#0001811-Použití imobilizovaných mikroorganismů pro nitrifikaci v odpadních vodách s vysokým obsahem amonných iontů a anorganických solí (2011) (Dolina, Lederer, Křiklavová, Ševců, uplatněno 2011 pro LentiKats)

RIV/60461373:22330/08:00020961-Technologie čištění toxických odpadních vod v biofilmovém fluidním bioreaktoru s využitím přirozené imobilizace cíleně připravených mikroorganismů. (2008) (Lederer, Štros, Jirků, Křiklavová, uplatněno 2008 pro AQUATEST a.s, IČ 44794843)

## c) Články ve Scopus nebo Web of Knowledge databázi

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER T.: *Development of nanofiber support for use as a carrier of bacterial biomass in wastewater treatment*, NANOCON 2012, 23. – 25. 10. 2012, Brno; Sborník bude pravděpodobně zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

KŘIKLAVOVÁ, L., LEDERER, T., *A Review Study Of Nanofiber Technology For Wastewater Treatment*, NANOCON 2011, 21. – 23. 09. 2011, Brno; ISBN 978-80-87294-23-9; Sborník byl zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *The use of nanofiber carriers in biofilm reactor for the treatment of industrial wastewaters*, NANOCON 2010, 12. – 14. 10. 2010, Olomouc; ISBN 978-80-87294-18-5; Sborník byl zveřejněn v databázi Thomson Reuters – Web of Science/Web of Knowledge včetně CPCI.

## d) Vystoupení na konferencích a další publikace

### Mezinárodní konference

KŘIKLAVOVÁ, L., KRACÍKOVÁ, B., *Degradation of phenol by Rhodococcus Erythropolis in presence of magnetic fields*, 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation, Prague, June 24 – 28, 2012, p. 131-134. ISBN 978-80-7080-825-2.

TRÖGL J, KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P. HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L.: *Removal of Nitrates from High-Salinity Wastewaters from Desulphurization Process with Denitrifying Bacteria Encapsulated in Lentikats Biocatalyst*. Mezinárodní konference IWA: Water and Industry 2011, Valladolid, Španělsko, 1. – 4. května 2011. Přednáška. Plný text ve sborníku konference.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *The use of composite fibers for production of biomass carriers*, BioMicroWorld2011 – IV International Conference on Environmental Industrial and Applied Microbiology, 14. – 16. 09. 2011, Málaga, Spain; ISBN 978-80-87294-18-5.

LEDERER T., NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., JIRKŮ V., *Operating Experiences with the First Czech Application of MBBR Technology for Treatment of Industrial Wastewaters in CHBČOV Draslovka Kolín*, 7th Anque's International Congress – "Integral Water Cycle: Present And Future", 13-16 June 2010, Oviedo (Spain), ISBN 978-84-693-2257-4

LEDERER T., KŘIKLAVOVÁ L., *Application of Nanofibres for Biological Treatment of Industrial Wastewaters*, The Eighteenth Annual International Conference on COMPOSITES/NANO ENGINEERING (ICCE – 18), July 4-10, 2010, Anchorage, Alaska, USA,

KRIKLAVOVA LUCIE (TUL), DE WEVER HELEEN (VITO), *Sustainable water use in chemical, paper, textile and food industries*, Study carried out for VITO 2010 (výzkumná, závěrečná zpráva z doktorandské stáže)

LEDERER T., NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., *Operating experience with the first application of technology in MBBR CR in the treatment of industrial wastewater in CHBČOV Draslovka Kolín*, Odpadní vody, 8. Mezinárodní konference a výstava, květen 2009, Plzeň, ISBN 978-80-254-4068-1.

### Tuzemské konference

KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., DUB, T., KORTUSOVÁ D., LEDERER T.: *Vývoj alternativních nosičů biomasy pro biologické čištění odpadních vod*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7, pp 36-42.

KŘIKLAVOVÁ, L., VALECKÝ, L., DUB, T., NOVÁK L., LEDERER, T.: *Metody obrazové analýzy aktivovaných kalů a biofilmů*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7, pp 140-147.

DVOŘÁK, L., LEDERER, L., KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L.: *Dlouhodobé zkušenosti s první plno-provozní aplikací MBBR technologie v ČR*. Odpadové vody 2012, 17. – 19. 10.2012, Štrbské Pleso, Slovensko; ISBN 978-80-970896-2-7.

KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., *Nanovláknenné materiály jako nosiče biomasy*, Řešení extrémních požadavků na čištění odpadních vod, Blansko, 24. – 25. 02. 2011. Tribun EU, p. 52-60. ISBN 978-80-7399-286-6.

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., *Hodnocení míry kolonizace na nosiči biomasy využitím obrazové analýzy*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. – 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 156-159. ISBN 978-80-86832-61-6.

KŘIKLAVOVÁ, L., DUB, T., LEDERER, T., *Využití nanovláknenných nosičů při biologickém čištění podzemních vod znečištěných fenoly*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi IV, Třeboň, 17. – 19. 10. 2011. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 42-48. ISBN 978-80-86832-61-6.

LEDERER, T., KŘIKLAVOVÁ, L., NOVÁK, L., *Provozní zkušenosti s první aplikací MBBR technologie v ČR při čištění průmyslových a podzemních odpadních vod na CHBČOV Draslovka Kolín*, Sanační technologie XII, květen 2009, Uherské Hradiště, ISBN 978-80-86832-44-9

KŘIKLAVOVÁ, L.; LEDERER, T. In (ed.), *Optimalizace biologického čištění průmyslových odpadních vod v biofilmovém bioreaktoru*, Inovativní sanační technologie ve výzkumu a praxi, Žďár nad Sázavou, 8. – 9. 10. 2008. Ekomonitor, spol. s r.o., p. 42-49. ISBN 978-80-86832-37-1.

# I SEZNAM POUŽÍVANÉ LITERATURY

- ANOXKALDNES™ MBBR. Technologie AnoxKaldnes™ MBBR - nosiče [online] [cited 2012-03-20]. Dostupné z: <<http://www.veoliawaterst.com/mbr/cz/carriers.htm>>.
- AOI, Y. (2002) In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 552–556.
- AKINSON, B. (1981) Immobilized biomass-a basis for process development in wastewater treatment. In *Biological Fluidized Bed Treatment of Water and Wastewater* (Cooper, P.E. and Akinson, B., eds), pp. 22–34, Ellis Horwood.
- BABU, B.V. (2007) Biofilms in the removal of VOCs and Foul Odours. *Proceedings of National Seminar on Bio Films: Challenges & Applications*, Bharatiya Vidya Bhavan's Bhavan' Research Center in Collaboration with University of Mumbai - Sesquicentennial Celebrations, January 12-13.
- BEYENAL H., DONOVAN C., LEWANDOWSKI Z., HARKIN G. (2004) Three-dimensional biofilm structure quantification, *Journal of Microbiological Methods* 59, 395– 413.
- BISHOP P. L., ZHANG T. C., FU Y.C. (1995) Effects of biofilm structure, microbial distribution and mass transport on biodegradation processes. *Wat. Sci. Tech.*, 31 (1), 143-152.
- BRENT M. PEYTON (1996) Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density, *Water Research*, Volume 30, Issue 1, January 1996, Pages 29-36, ISSN 0043-1354, 10.1016/0043-1354(95)00110-7.
- BRYERS J.D., CHARACKLIS W. G. (1982) *Biotechn. Bioeng.* 24, 2451.
- BURKOVSKI A (EDITOR) (2008). *Corynebacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-30-1.
- CAO. Y. S. AND ALAERTS, G. J. (1995). Influence of reactor type and shear stress on aerobic biofilm morphology, population and kinetics. *Water Res.* 29, 107-118.
- CLOETE (2010), *Nanotechnology in Water Treatment Applications*, Horizon Scientific Press, ISBN 1904455662, 9781904455660.
- ČECH J. S., CHUDOBA J. (1988) Effect of the solids retention time on the rate of biodegradation of organic compounds. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 16(3), 313-323.
- ČEJKOVÁ A., MASÁK J., FIALOVÁ A., SIGLOVÁ M., JIRKŮ V. (2005) Biodegradation potential of *Rhodococcus erythropolis* towards aromatic compounds. *Water Sci. & Technol.* 52,151, ISSN 0273-1223.
- ČEJKOVÁ A., MASÁK J., JIRKŮ V., VESELÝ M., PÁTEK M., NEŠVERA J. (2005) Potential of *Rhodococcus erythropolis* as a bioremediation organism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 317-321, ISSN 0959-3993.
- DECHO, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* 20, 1257–1273.
- DONLAN R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-890.
- DONG, Z., ET AL. (2011) Treatment of oilfield wastewater in moving bed biofilm reactors using a novel suspended ceramic biocarrier. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 196, p. 123–130. ISSN 0304-3894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.09.001.
- DUCHÁČEK V., HRDLIČKA Z. (2009) *Gumárenské suroviny a jejich zpracování*, Vydavatelství VŠCHT Praha, 200 s., ISBN 978-80-7080-713-2.
- EIGHMY, T. T, MARATEA, D. AND BISHOP, P. L. (1983). Electron rnicmscopic examination of wastewater biofilm formation and structural components. *Appl. Eny. Microb.* 45, 1921-1931.
- GJALTEMA A., ARTS P.A.M., VAN LOOSDRECHT M.C.M., KUENEN J.G., HEIJNEN J. J. (1994) Heterogeneity of biofilms in rotating annular reactor: Occurrence, Structure and Consequences, *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 194-204.
- GRIJSPEERDT, K. (1997) Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge. *Water Research.*, vol. 31, no. 5, p. 1126-1134. ISSN 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(96)00350-8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135496003508>.



- HARALICK, J. H., K. SHANMUGA, AND I. DINSTEIN (1973). Textural features for image classification. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics* 3 (6):610-621.
- HERMANOWICZ S.W. (1998) A model of two-dimensional biofilm morphology. *Water Sci. Tech.* 37: 219-222.
- HERMANOWICZ S.W., SCHINDLER U., WILDERER P. (1995) Fractal structure of biofilms: New tools for investigation of morphology, *Water Science and Technology*, Volume 32, Issue 8, Pages 99-105, ISSN 0273-1223, 10.1016/0273-1223(96)00013-3.
- HLAVÁČ, ŠONKA (1992) *Počítačové vidění*, Grada, ISBN 80-85424-67-3, Praha.
- HLAVÍNEK P. (2010) Biofilmové reaktory. [http://water.fce.vutbr.cz/zamestnanci/hlavinek/download/cisteni\\_OV/prednasky/COV\\_08.pdf](http://water.fce.vutbr.cz/zamestnanci/hlavinek/download/cisteni_OV/prednasky/COV_08.pdf) (accessed Jan 10), VUT Brno, Fakulta Stavební, Ústav vodního hospodářství.
- HRDINOVÁ Jitka (2006) Mikrobiální biofilm jako nástroj v bioremediačních technologiích, Diplomová práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, květen 2006.
- HEIJNEN J. J., VAN LOOSDRECHT M. C. M., MULDER A., TIJHUIS L. (1992) Formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Wat. Sci. Techn.*, 26 (3/4), 647-654.
- HOEHN R. C., RAY A. D. (1973) *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 45, 2302.
- HORN, H. AND MORGENROTH, E. (2006) Transport of oxygen, sodium chloride, and sodiumnitrate in biofilms. *Chem. Eng. Sci.* 61, 1347–1356.
- CHALFIE, M. ET AL. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- CHANG C. I., CHEN K., WANG J. AND ALTHOUSE M. L. G. (1994) A relative entropy-based approach to image thresholding. *Pattern recognition* 27, 1275 -1289.
- Chemický a fyzikální rozbor vody. Available 2. 9. 2010 from [www: http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/rozbor%20vody.doc](http://fzp.ujep.cz/~synek/analytika/texty/rozbor%20vody.doc).
- CHITADE A. (2010) Colour based image segmentation using K-Means Clustering. *International Journal of Engineering Science and Technology*, vol. 2, no. 10, p. 5319–5325.
- CHRISTENSEN, F. R., KIISTENSEN, G. H. AND JANSEN, J. L. C. (1989). Biofilm structure — an important and neglected parameter in wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 21(8/9), 805-814.
- CHUDOBA J., DOHÁNYOS M., WANNER J. (1991) *Biologické čištění odpadních vod*. Praha, 1991, ISBN 80-03-00611-2.
- ITO, T. ET AL. (2002) Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfate reducing bacteria inhabiting an oxicanoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 356–364.
- JEFFERSON, K.K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 163–173.
- JIRKŮ V., ČEJKOVÁ A., MASÁK J., PÁTEK M., NEŠVERA J. (2006) Towards the applicability of rhodococci in monoaromatic compounds bioremediation. In: *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology*, A. Mendes-Vilas, Ed., Wiley – VCH Verlag, Weinheim p. 561 ISBN 978-3-527-31611-3.
- JIRKŮ V., MASÁK J., ČEJKOVÁ A. (2006) Carrier technology / humic additives to upgrade biological water treatment. In: *Water Pollution, Modelling, Monitoring and Management*, C.A. Brebia and J.S. Antunes do Carno, Eds. WIT Press, Southampton, Boston, p. 509 ISBN 1-B4564-042-X.
- JIRSÁK O., LUKÁŠ D., SANETRŇÍK F., MARTINOVÁ L., CHALOUPEK J., RŮŽIČKOVÁ J., KOŠŤÁKOVÁ E., HRŮZA J. (2003) Production and properties of nanofibres. *NANO 03*, Brno University of Technology 2003. Page 142-148. ISBN 80-214-2527-X.
- JIRSÁK O., BHARANITHARAN R., RŮŽIČKOVÁ J., KOŠŤÁKOVÁ E., HRŮZA J. (2004) Nanofibers and Its Application. In *HPTEX 2004*, Coimbatore, India.
- JIRSÁK O., SANETRŇÍK F., LUKÁŠ D., KOTEK V., MARTINOVÁ L., CHALOUPEK J. (2005) A method of nanofibers production from polymer solution using electrostatic spinning and a device for carrying out the method, CZ Patent, 294274 (B6) WO 2005024101, March 17.

- JIRSÁK O., SANETRŇÍK F., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T., (2010) *Technologie výroby plošného útvaru z přízí obsahujících nanovlákná*, uplatněno 2010 pro TREVOS Košťálov, s r.o., RIV/46747885:24220/10:#0001648
- KAPRÁLEK F. (1986) *Fyziologie bakterií*, SPN Praha.
- KJELLEBERG, S. AND MOLIN, S. (2002) Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 254–258.
- KOMBEREC, L. (2011) Rešerše na stav techniky a patentovou čistotu, Stav techniky textilních nosičů biomasy pro čištění odpadních vod, se zaměřením na pleteninové textilie plošného (případně i chomáčového) útvaru opatřeného nanovlákným povlakem. Rešeršní zdroje: DB espacenet, stav k 20. 5. 2011; DB Patentscope, stav k 20. 5. 2011; DP freepatentsonline, stav k 23. 5. 2011; DB UPV, stav k 24. 5. 2011.
- LA MOTTA E.J., HICKEY R.F. (1980) Factors affecting attachment and development of biological films on solid media, *Rotating Biological Contactor Technology*, Champion, February 1980.
- LARDON, L., STEYER, J.-P., BERNET, N. AND LE PAGE, C. (2002) Modeling and analysis of biofilms formation and evolution in wastewater treatment processes using multi-agent systems. In: *Integrated assessment and decision support. iEMSs. 1st biennial meeting of the International Environmental Modelling and Software Society*, Lugano, Switzerland, June 24-27, Pp: 226-231.
- LARKIN M. J., KULAKOV L. A., ALLEN CH. C. R. (2005) Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility, *Curr. Opin. Biotech.* 16, 282–290.
- LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R., HOYLE, B. D., COSTERTON, J. W. AND CALDWELL, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558-6567.
- LE NOIR, M. (2011) The Concept of MBBR Process for Water and Sewage Treatment. [online]. 2011 [cited 2012-05-02]. Dostupné z: <<http://dc364.4shared.com/doc/F4TLMedb/preview.html>>.
- LEDERER T. (2011), *Průběžná zpráva k projektu BioCar: Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod*. AQUATEST A.S., Praha.
- NOVÁK L., KŘIKLAVOVÁ L., LEDERER T. (2012), *Průběžná zpráva k projektu BioCar: Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod*. PRO-AQUA CZ, s.r.o., Technická univerzita v Liberci, AQUATEST a.s., Praha.
- LEWANDOWSKI, BEYENAL (2007) *Fundamentals of biofilm research*, CRC Press, ISBN 9780849335419.
- LOOSDRECHT M. C. M., NORDE W., LYKLEMA J., ZEHNDER A. J. B. (1988) Bacterial adhesion: A physicochemical Approach. *Microb. Ecol.* 17, 1-15.
- LOOSDRECHT M. C. M., EIKELBOOM D., GJALTEMA A., MULDER A., TIJHUIS L., HEIJNEN J. J. (1995) Biofilm structures, *Water Science and Technology*, 32 (8), 35–43.
- MA P.X., ELISSEFF J. (2006) *Scaffolding in Tissue Engineering*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, ISBN 1-57444-521-9.
- MANDELBROT, B. (1977) *Fractal, Form and Chance*. Freeman, San Francisco.
- MANDELBROT, B. (1982) *The Fractal Geometry of Nature*. Freeman, San Francisco.
- MARTÍNKOVÁ L., UHNÁKOVÁ B., PÁTEK M., NEŠVERA J., KŘEN V. (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*, *Environment International*.
- MARTINOVÁ L., MÜLLEROVÁ J. (2005) Electrospinning of polymer blends, In: 5th World Conf. AUTEX, 27-29 June 2005, Portorož, Slovenia.
- MASÁK J., ČEJKOVÁ A., SIGLOVÁ M., KOTRBA D., JIRKŮ V., HRON P. (2002) Biofilm formation: A tool increasing biodegradation activity. *Proc. Environmental Biotechnology 2002*, Vol. III. Massey University Press, pp. 523-528.
- MASSOLDEYA, A. A., WHALLON, J., HICKEY, R. F. AND TIEDJE, J. M. (1995) Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microb.* 61, 769-777.
- MATLAB. THE MATHWORKS. (2013) [online]. [cit. 2013-06-05]. Dostupné z: <http://www.mathworks.com/help>

- MCLEOD MP, WARREN RL, HSIAO WW, ARAKI N, MYHRE M, FERNANDES C, MIYAZAWA D, WONG W, LILLQUIST AL, WANG D, DOSANJH M, HARA H, PETRESCU A, MORIN RD, YANG G, STOTT JM, SCHEIN JE, SHIN H, SMAILUS D, SIDDIQUI AS, MARRA MA, JONES SJ, HOLT R, BRINKMAN FS, MIYAUCHI K, FUKUDA M, DAVIES JE, MOHN WW, ELTIS LD (2006). "The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse". PNAS 103 (42): 15582–15587. doi:10.1073/pnas.0607048103.
- MCQUARRIE, J. P., ET AL. (2011) Moving Bed Biofilm Reactor Technology: Process Applications, Design, and Performance. Water Environment Research, vol. 83, p. 560–575. ISSN: 1061-4303.
- MILITKÝ J. (2007) Přednášky: Textilní vlákna; Speciální vlákna. II.th ed. TUL, 423 p. ISBN 978-80-7372-169-5.
- MILITKÝ J. (2007) Technické textilie - vybrané kapitoly. II ed. TUL, 238 p. ISBN 978-80-7372-170-1.
- MULDER A., HEIJNEN J. J. (1988) The effect of carrier characteristics on the biofilm development in airlift suspension reactors. Proc. 2nd NBC. Breteler, H., et al. (eds). Amsterdam. 102-110. Biotechnology, 18 (7), 312-320, 2000.
- MULCAHY L. T. AND SHIEH W. K. (1987) Fluidization and reactor biomass characteristics of the denitrification fluidized bed biofilm reactor. Wat. Res. 21, 451458.
- ODEGAARD H., RUSTEN B., SILJUDALEN J. (1999) The development of the moving bed biofilm process – from idea to commercial product, European Water Management, 2(3), 36-43.
- ODEGAARD H. (2006) Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm proces, Water Sci. Technol., 53(9), 17-33.
- O'GORMAN, SAMMON, SEUL (2008) Practical algorithms for image analysis: description, examples, programs, and projects, Cambridge University Press, ISBN 9780521884112.
- O'NEIL F.J., BROMLEY-CHALLENGER K.C.A., GREENWOOD R.J. AND KNAPP J.S. (2000) Bacterial growth on aniline: Implication for the biotreatment of industrial wastewater. Water Research 34, 18, pp 4397-4409.
- ONUMA, M., OMURA T. (1982) Water Sci. Tech. 14, 553.
- NICOLELLA C., LOOSDRECHT M.C.M., HEIJNEN S.J. (2000) Particle-based biofilm reactor technology, Trends in Biotechnology, vol. 18, no. 7, p. 312-320.
- PALMER J., S. FLINT, J. BROOKS (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34, 577-588.
- PELLEG D., MOORE A. (2000) X-means: Extending K-Means with Efficient Estimation of the Number of Clusters, Proceedings of the Seventeenth International Conference on Machine Learning, 29. 6. – 2. 7. 2000. p.727-734.
- PELLETIER C., BOULEY C., CAYUELA C., BOUTTIER S., BOURLIOUX P., BELLON-FONTAINE M.-N. (1997) Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1725-1731.
- PETROU M., SEVILL P.G. (2006) Image processing: dealing with texture, John Wiley & Sons Inc., ISBN-13: 978-0-470-02628-1, ISBN-10: 0-470-02628-6.
- PICIOREANU C., VAN LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J. (1998) Mathematical Modeling of Biofilm Structure with a Hybrid Differential-Discrete Cellular Automaton Approach, Biotechnol Bioeng. Apr 5; 58(1):101-116.
- PIRKL S. (2003) Moderní mikroskopické metody, Univerzita Pardubice.
- POSPÍŠILOVÁ, J., ROUŠAROVÁ, L. Barvové prostory. [online]. 2010 [cited 2012-11-15]. Available from: <<http://geo3.fsv.cvut.cz/vyuka/kapr/sp/2010/soul/index.html>>.
- POSPÍŠILOVÁ D. ET AL. (2010) Biodegradace fenolu biofilmem bakterie *Rhodococcus erythropolis*. In Sanace ekologických zátěží a nebezpečné odpady, Odpadové fórum.
- RŮŽIČKOVÁ J. (2004) Elektrostatické zvlákňování nanovláken. Ist ed. TUL, 54 p. ISBN 80-7083-867-1.
- SIEGRIST, H., GUJER, W. (1985) Mass transfer mechanism in a heterotrophic biofilm. Water Res. 19(11), 1359-1378.
- SINGH R., DEBARATI P., RAKESH K.J. (2006) Biofilms: implications in bioremediation, Trends in microbiology, 14 (9), 389 – 397.

- SPORMANN A.M. (2008) Physiology of microbes in biofilms. In: Romeo T. (ed.), *Bacterial Biofilms*, 17-36. Springer-Verlag, Berlin.
- STANLEY, N.R. AND LAZZERA, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52, 917–924.
- STOODLEY, P., DEBEER, D. AND LEWANDOWSKI, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems. *App. Eny. Micro biol.*, 60, 2711-2716.
- ŠPIČKA, I., FISCHER, R. Počítačová geometrie a grafika. [online]. 2002 [cited 2012-11-14]. Available from: <<http://www.person.vsb.cz/archivcd/FMMI/PGG/Pocitacova%20geometrie%20a%20grafika.pdf>>.
- TANI, K. ET AL. (1995) Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4074–4082.
- TIJHUIS L., VAN LOOSDRECHT M.C.M., HEIJNEN J.J. (1994) Formation and growth of heterotrophic aerobic biofilms on small suspended particles in airlift reactors. *Biotechnol Bioeng.*, 44,595-608.
- TRÖGL J., JIRKOVÁ I., ZEMÁNKOVÁ P., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P., PAVLORKOVÁ J., KURÁŇ P., POPELKA J., KŘIKLAVOVÁ L. (2013) Estimation of the quantity of bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst via phospholipid fatty acids content: A preliminary study. *Folia Microbiol.* 2, 135-140. DOI: 10.1007/s12223-012-0189-3
- TRÖGL J., KRHŮTKOVÁ O., PILAŘOVÁ V., DÁŇOVÁ P. HOLÍČEK R., KOHLOVÁ M., HEJDA S., SMRČKA J., BOUŠKOVÁ A., KŘIKLAVOVÁ L. (2012) Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 3, 425-432. DOI: 10.1007/s13762-012-0048-4
- TRULEAR M., G., CHARACKLIS W. G. (1982) *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 54, 1288.
- VAN DER GEIZE R., AND L. DIJKHUIZEN (2004) Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Microbiology* 7 (3): 255–261. doi:10.1016/j.mib.2004.04.001.
- VAN LOOSDRECHT M. C. M., HEIJNEN J. J., EBERL H., KREFT J., PICIOREANU C. (2002) Mathematical modelling of biofilm structures, *Antonie van Leeuwenhoek*, 81 (1-4):245-256, Publisher: Springer Netherlands.
- WILLIAMSON K., McCarty P.L. (1976) *J. Water Pollut. Fed.* 48, 9.
- WOESE, C. AND FOX, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- WROLSTAD R.E., ACREE T.E., DECKER E.A., PENNER M.H., REID D.S., SCHWARTZ S.J., SHOEMAKER C.F., SMITH D., SPORNS P. (2005) Measurement of Protein Content (*Handbook of Food Analytical Chemistry*, Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Smith D., Sporns P., Eds.), John Wiley & Sohns, Inc., New Jersey, str. 73-121.
- WU, MERCHANT, CASTLEMAN (2008) *Microscope image processing*, Academic Press, ISBN 9780123725783.
- YANG X., BEYENAL H., HARKIN G. AND LEWANDOWSKI Z. (2000) Quantifying biofilm structure using image analysis. *J. Microbiol. Meth.* 39, 109 -119.
- YANG X., BEYENAL H., HARKIN G., LEWANDOWSKI Z. (2001) Evaluation of biofilm image thresholding methods, *Wat. Res.* Vol. 35, No. 5, pp. 1149-1158.
- ZÁBRANSKÁ J.; A KOL. (2001) *Laboratorní metody v technologii vody*, VŠCHT Praha, 1. vydání – dotisk 2001, ISBN 80-7080-272-3.
- ZAHID. W. AND GANCZARCZYK, J. (1994) A technique for a characterization of RBC biofilm surface. *Water Res.* 28, 2229-2231.
- ZELENY J. (1914) The electrical discharge from liquid points and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces, *Physical Review*, 3(2), 69-91.
- ZHANG, T. C. AND BISHOP. P. L. (1994) Density, porosity and pore structure of biofilms. *Water Res.* 28(11), 2267-2277.
- ZHANG T. C., FU Y. C., BISHOP P. L. (1994) Competition in biofilms, *Water Science and Technology*, 29 (10-11), 263–270.

*This work was supported by the following projects:*

*The state subsidy of the Czech Republic within the project 2B08062 AROMAGEN.*

*The research center ARTEC, MŠMT project 1M0554.*

*The state subsidy of the Czech Republic within the ALFA project Modified biomass carriers for wastewater treatment - TA01021764.*

*The state subsidy of the Czech Republic within the Eureka project Application of magnetic field for biological wastewater treatment - LF11016.*

*The Ministry of Education of the Czech Republic within the SGS project no. 78001/115 on the Technical University of Liberec*

*The Project OP VaVpl Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation CZ.1.05/2.1.00/01.0005.*

*Práce byla podpořena následujícími projekty:*

*Projekt 2B08062 AROMAGEN podporovaného MŠMT ČR.*

*Výzkumné centrum Artec, MŠMT projektu číslo 1M0554.*

*Projekt TA01021764 Modifikované nosiče biomasy pro čištění odpadních vod, programu ALFA, poskytovatele TAČR.*

*Státní dotace České republiky v rámci projektu Eureka, Aplikace magnetického pole na biologické čištění odpadních vod - LF11016.*

*Státní dotace Ministerstva školství ČR v rámci projektu SGS číslo 78001/115 na Technické univerzitě v Liberci.*

*Projekt OP VaVpl Centrum pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace CZ.1.05/2.1.00/01.0005.*

Disertační práce – Vývoj nanovláknenného nosiče pro hybridní bioreaktory s imobilizovanou biomasou a využití obrazové analýzy pro hodnocení biofilmových struktur

Grafická úprava a sazba

Lucie Křiklavová

Technická univerzita v Liberci, Studentská 2, 461 17 Liberec 1

<http://www.tul.cz/>, e-mail: [lucie.kriklavova@tul.cz](mailto:lucie.kriklavova@tul.cz)

Neprošlo jazykovou úpravou.

V Liberci 2013, počet stran 38