SEKUNDÁRNÍ VLIV LIMITACE KYSLÍKU NA ZASTOUPENÍ PRODUKTŮ NITRIFIKACE PŘI ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

PAVEL ŠVEHLA, LUKÁŠ PACEK, HELENA RADECHOVSKÁ a JOSEF RADECHOVSKÝ

Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – Suchdol
svehla@af.czu.cz, hrncirovah@af.czu.cz

Došlo 27.5.14, přepracováno 22.9.15, přijato 16.10.15.

Klíčová slova: nitrifikace, odpadní vody, dusitany, dusičnany, kyslík, inhibice

Úvod

Nitrifikace je jedním ze stěžejních biochemických procesů spadajících do přirozeného koloběhu dusíku ve vodních ekosystémech[1]. Zároveň je v kombinaci s denitrifikací i podstatou odstraňování dusíkatého znečištění z odpadních vod[2,3]. Při nitrifikaci dochází ke konverzi amoniakálního dusíku (N-amon) na dusičnanový dusík ($N\text{-}NO_3^-$). Tato biochemická transformace probíhá ve dvou krocích a podílejí se na ní dvě nezávislé skupiny nitrifikačních bakterií. N-amon je nejprve oxidován na dusitanový dusík ($N\text{-}NO_2^-$) činností nitritačních organismů rodů *Nitrosomonas*, *Nitrosococus* a dalších. Za standardních podmínek je následně $N\text{-}NO_2^-$ převáděn na $N\text{-}NO_3^-$ v rámci činnosti nitratačních organismů rodů *Nitrobacter*, *Nitrospira* a dalších. Vzhledem k tomu, že nitratační organismy jsou oproti nitritačním výrazně citlivější na podmínky, za kterých nitrifikační proces probíhá, může se za určitých okolností stát, že je v důsledku selektivní inhibice aktivity nitratačních organismů nitrifikace ukončena v dusitanovém stupni[4–6]. Na cíleném ukončení nitrifikace ve fázi $N\text{-}NO_2^-$ jsou založeny některé inovativní postupy biologického odstraňování sloučenin dusíku z odpadních vod[6–9].

Jedním z faktorů, které mohou významně ovlivňovat distribuci konečných produktů nitrifikace, je dostupnost kyslíku v čištěné vodě[5,9–13]. Nitratační organismy mají ve srovnání s nitritačními vyšší saturační kyslíkovou konstantu[5,12,13]. Proto může limitace dostupnosti kyslíku vyvolávat nárůst zastoupení $N\text{-}NO_2^-$ mezi konečnými produkty nitrifikace na úkor $N\text{-}NO_3^-$. Selektivní inhibice nitratačních organismů zároveň může být vyvolána i zvýšenou koncentrací dusíkatých sloučenin účastnících se nitrifikačního procesu, zejména volného amoniaku (Free Ammonia – FA), volné kyseliny dusité (Free Nitrous Acid – FNA) či disociovaného dusitanového iontu[4,14–16]. Efekt těchto látek je do značné míry ovlivněn technologickými podmínkami čistícího procesu, přičemž zásadní vliv může mít zejména pH a teplota[4], koncentrace sloučenin dusíku ve vstupní vodě[17] a způsob průtoku čištěné vody[18]. Studiu přímého vlivu koncentrace rozpuštěného kyslíku na aktivitu nitratačních organismů již byla v minulosti věnována řada prací[5,12,13]. Podobně i na jejich inhibici působením toxických forem dusíku bylo zaměřeno mnoho studií[4,14–16]. Na druhou stranu minimální pozornost byla dosud věnována hodnocení sekundárního vlivu snížené dostupnosti kyslíku spočívajícího v následných změnách fyzikálně-chemických parametrů v systému.

Cílem tohoto příspěvku je posoudit vliv nárůstu koncentrace $N\text{-}NO_2^-$ vyvolaného primárně inhibicí nitratačních organismů limitovanou dostupností kyslíku na zastoupení konečných produktů nitrifikace po opětovném přechodu systému do podmínek s nelimitovanou dostupností O_2.

Experimentální část

Pokusy probíhaly v laboratorním měřítku jako simulace biologického čištění kalové vody vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu. Tato voda obsahovala N-amon v koncentračním rozmezí 900–1750 mg l^{-1}. Experiment byl realizován s využitím laboratorního modelu vytvořeného z plexiskla. Testy probíhaly v teplotním rozmezí 23±1 °C. Model pracoval v režimu kontinuálního průtoku na principu směšovací aktivace[3], biomasa odpovědná za čistící proces byla kultivována ve formě suspenze (aktivovaného kalu[3]). Ze systému nebyl odváděn žádný přebytečný kal. Pracovní objem biologického reaktoru činil 1,5 l, přičemž za vlastní reaktor byla zařazena dosazovací nádrž o objemu 0,25 l, ze které byl aktivovaný kal recirkulován zpět do reaktoru. Provzdušňování hrubobublinnou aerací bylo zajištěno akvaristickým motorkem. Čerpání vstupující a vystupující vody zajišťovala peristaltická čerpadla. Průměrná koncentrace nerozpuštěných organických látek (NL_{org}) kvantifikující biomasu aktivovaného kalu činila po celé období provozu reaktoru 7,1 g l^{-1}. Reaktor byl zaočkován nitrifikujícím aktivovaným kalem. Následně proběhlo zapracování reaktoru trvající 105 dnů, které spočívalo ve stabilizaci nitrifikačního procesu a v postupném zvyšování zatížení reaktoru dusíkem na hodnoty okolo 1,3 kg $m^{-3}d^{-1}$ (vyjádřeno objemově), resp. 0,18 kg kg^{-1} d^{-1} (specifické vyjádření vztažené na 1 kg sušiny kvantifikované parametrem NL_{org}). V rámci tohoto příspěvku jsou hodnoceny pouze výsledky z následného období provozu trvajícího 225 dnů. Toto období provozu modelu bylo rozděleno do pěti etap (etapy E1–E5). E1 a E2 se lišily zejména kyslíkovým režimem (tab. I). V rámci E1 byla udržována koncentrace kyslíku okolo 3,0 mg l^{-1}, během E1 pak byla nastavená hodnota snížena na 0,7 mg l^{-1}. Od E3 byla opět nastavena hodnota 3 mg l^{-1}, která byla zachována až do konce experimentu. Rozdělení provozu modelu do E3–E5 bylo dáno změnami

Tabulka I
Základní charakteristiky modelu v jednotlivých etapách

Etapa	Dny provozu	O_2 [mg l^{-1}]	Zatížení dusíkem [kg m^{-3} d^{-1}]	Doba zdržení [h]
1	1–37	3,0	1,4	23
2	38–77	0,7	1,3	24
3	78–148	3,0	1,2	32
4	149–170	3,0	1,1	33
5	171–225	3,0	1,0	34

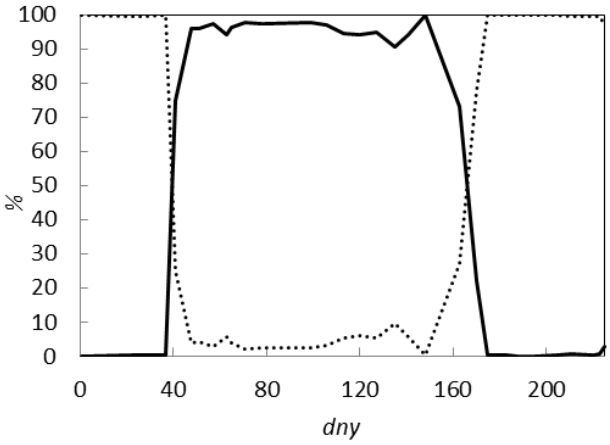
v zastoupení produktů nitrifikace (viz kapitola Výsledky a diskuse). Určité výkyvy v zatížení systému dusíkem v rámci jednotlivých etap (tab. I) byly dány změnami ve vstupní koncentraci N-amon, popř. kolísáním hydraulické doby zdržení způsobeným průběžným zanášením a následným čištěním hadiček transportujících čištěnou vodu. Základní charakteristiky modelu v jednotlivých etapách jsou shrnuty v tab. I.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnota pH v reaktoru byla kontinuálně sledována a udržována na požadované hodnotě s využitím měřícího systému Magic XBC dodávaného firmou Gryf HB. Hodnota pH byla po celé období experimentu udržována dávkováním 10% roztoku NaOH na 7,0±0,1, což umožňovalo dosáhnout účinnosti odstranění N-amon přesahující 90 % (cit.[19]). Ve vzorcích vstupní a výstupní vody bylo s využitím spektrofotometru HACH DR/4000 prováděno spektrofotometrické měření koncentrací jednotlivých forem dusíku (N-amon, $N\text{-}NO_2^-$, $N\text{-}NO_3^-$). V reaktoru byl gravimetricky stanovován obsah NL_{org}. Stanovení hodnot jednotlivých sledovaných parametrů bylo realizováno dle práce[20]. Aktuální koncentrace FNA byla počítána postupem uvedeným v literatuře[4,21]. Vliv změn podmínek ve sledovaném reaktoru na zastoupení nitritačních a nitratačních organismů v biomase aktivovaného kalu byl kvantifikován metodou FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)[22]. Mikrobiologické rozbory byly formou zakázky realizovány na pracovišti Ústavu technologie vody a prostředí VŠCHT Praha, přičemž analyzovány byly vzorky odebrané v rámci E1 a E3.

Výsledky a diskuse

Vliv snížení dostupnosti kyslíku na zastoupení produktů nitrifikace

Zatímco během etapy E1 představoval $N\text{-}NO_2^-$ průměrně 0,3 % z oxidovaných forem dusíku (suma koncentrace $N\text{-}NO_2^-$ a $N\text{-}NO_3^-$), v průběhu E2 došlo ke zvýšení této hodnoty na 93 % (obr. 1). Toto zjištění je ve shodě s dostupnými literárními prameny[5,12,13] a jednoznačně po-



Obr. 1. **Zastoupení $N\text{-}NO_2^-$ a $N\text{-}NO_3^-$ v odtoku;** —— % $N\text{-}NO_2^-$, ... % $N\text{-}NO_3^-$

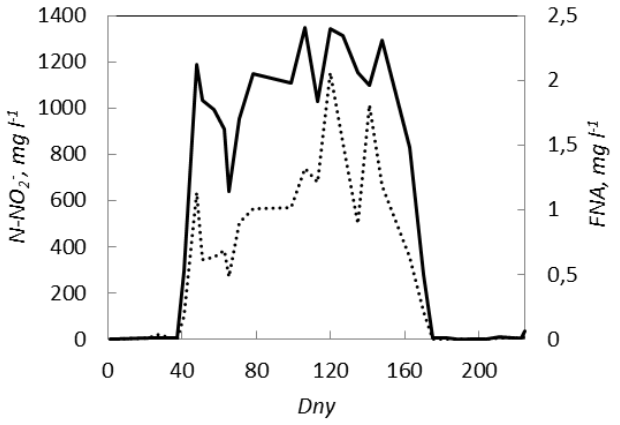
tvrzuje negativní vliv limitace dostupnosti kyslíku na aktivitu nitratačních organismů a jejich v tomto směru podstatně vyšší citlivost ve srovnání s organismy nitritačními.

Zastoupení produktů nitrifikace po opětovném zvýšení koncentrace kyslíku

Přestože v rámci E3 došlo ke zvýšení koncentrace rozpuštěného kyslíku z 0,7 na 3,0 mg l^{-1}, na zastoupení oxidovaných forem dusíku se tato skutečnost prakticky vůbec neprojevila. $N\text{-}NO_2^-$ představoval v této fázi provozu modelu průměrně 96 % oxidovaného dusíku (obr. 1). Až v průběhu E4 došlo k postupnému nárůstu zastoupení $N\text{-}NO_3^-$ na úkor $N\text{-}NO_2^-$. V rámci celé E5 pak dosahovalo zastoupení $N\text{-}NO_2^-$ 0,1–3,0 %. Dlouhodobé udržení akumulace dusitanů po přerušení limitace dostupnosti kyslíku pozorované v průběhu E3 je v rozporu s výsledky publikovanými v řadě dříve uveřejněných prací[23,24].

Kombinovaný vliv limitace kyslíku a přítomnosti dusitanů v systému

Výše prezentované výsledky naznačují, že zvýšení zastoupení $N\text{-}NO_2^-$ mezi konečnými produkty nitrifikace nemusí způsobovat jen vlastní snížená dostupnost kyslíku při biologickém čištění odpadních vod. Důležitým aspektem při zpracování vod s extrémně vysokým obsahem N-amon mohou být i sekundární změny v systému vyvolané primárně právě nízkou koncentrací rozpuštěného kyslíku. Zásadní je z tohoto pohledu patrně zejména enormní nárůst koncentrace $N\text{-}NO_2^-$ a s ním spojený zvýšený výskyt FNA v systému. Zatímco v E1 nepřesahovala koncentrace $N\text{-}NO_2^-$ 5 mg l^{-1} a FNA 0,03 mg l^{-1}, v E2 se pohybovala v rozmezí 293–1190 mg l^{-1} pro $N\text{-}NO_2^-$ a 0,17 až 1,14 mg l^{-1} pro FNA (obr. 2). FNA přitom může na nitratační organismy působit negativně v koncentraci 0,2 až 2,8 mg l^{-1} (cit.[4]), přičemž novější studie naznačují, že me-



Obr. 2. **Koncentrace a N-NO_2^- a FNA v průběhu experimentu;** —— % N-NO_2^-, ... % FNA

tabolismus těchto organismů může být negativně ovlivněn dokonce již při koncentraci 0,011 mg l^{-1} N-FNA (cit.[14]), což odpovídá cca 0,036 mg l^{-1} FNA. U disociovaného N-NO_2^- bylo prokázáno 50% snížení nitratační aktivity při koncentraci 198 mg l^{-1} (cit.[16]). V rámci E2 byly tedy nitratační bakterie kromě nedostatku O_2 inhibovány i zvýšenou koncentrací jednotlivých disociačních forem výskytu N-NO_2^-. Přestože na přelomu E2 a E3 polevil v systému selekční tlak na mikroorganismy způsobený sníženou dostupností kyslíku, trvalo v důsledku inhibice vyvolané vysokou koncentrací N-NO_2^- (resp. jeho disociačních forem) dalších 91 dnů (celé období etap E3 a E4), než byla aktivita nitratačních organismů v důsledku jejich postupné adaptace na extrémní podmínky v reaktoru[15] plně obnovena.

Ve shodě s výsledky chemických rozborů bylo zjištěno, že v biomase aktivovaného kalu odebraného z modelu došlo mezi E1 a E3 k výraznému poklesu zastoupení nitratačních organismů. Zatímco ve vzorku odebraném 30. den experimentu (E1) představovaly nitratační organismy 6,4 % z celkové biomasy, ve vzorku z 99. dne (E3) nepřesahovalo jejich zastoupení 1 %. Zároveň bylo při obou odběrech zaznamenáno velice vysoké zastoupení nitritačních organismů (20,4 % ve vzorku z E1 a 27,2 % ve vzorku z E3).

Důsledky sekundárního vlivu limitace kyslíku na zastoupení produktů nitrifikace v různých technologických podmínkách

Sekundární vliv limitace dostupnosti kyslíku spočívající v nárůstu koncentrace toxických forem dusíku v biologickém systému čištění odpadní vody může mít pochopitelně potenciál ovlivňovat zastoupení konečných produktů nitrifikace pouze v případě, že aktuální koncentrace FNA (resp. disociovaného N-NO_2^-) bude dostačující pro inhibici aktivity nitratačních organismů. Z tohoto pohledu je zřejmé, že s tímto jevem je možno se setkat pouze při čištění odpadních vod s velice vysokou koncentrací dusíkatého znečištění, popř. při extrémně nízké hodnotě pH vedoucí ke zvýšenému obsahu FNA i v případě, že celková koncentrace N-NO_2^- není příliš vysoká[1,4]. K popsanému efektu může navíc pochopitelně docházet pouze v určitém technologickém uspořádání biologického reaktoru. Vyšší koncentrace produktů nitrifikace (tedy potenciálně i toxických forem N-NO_2^-) mohou být např. zaznamenány v nitrifikačních reaktorech dvoukalového systému (nitrifikace a denitrifikace probíhá ve dvou samostatných biologických reaktorech) než v systému jednokalovém (střídání nitrifikačních a denitrifikačních fází v jednom reaktoru, produkty nitrifikace jsou průběžně odstraňovány denitrifikačním procesem). Z hlediska případného kolísání koncentrace toxických forem dusíku v reaktoru bude také důležitá hydraulická charakteristika daného čistícího systému[3]. Zásadní vliv kolísání koncentrace FA a FNA na selektivní inhibici nitratačních organismů byl potvrzen zejména v systémech SBR (Sequencing Batch Reactor) pracujících na principu semikontinuálního průtoku čištěné vody[18,21].

Využití výsledků výzkumu pro realizaci netradičních biologických postupů odstraňování sloučenin dusíku

Tradiční postup odstraňování sloučenin dusíku z odpadních vod založený na kombinaci nitrifikace a denitrifikace je spojen s poměrně vysokými provozními náklady, které jsou způsobeny zejména velkými nároky nitrifikačních organismů na dodávku kyslíku a relativně vysokou spotřebou organického substrátu při činnosti denitrifikačních organismů[3]. V posledních cca 15 letech však došlo k masívnímu vývoji inovativních metod, které mají potenciál tyto nedostatky do značné míry eliminovat. Nejprogresívnějšími z nich jsou postupy založené na anaerobní oxidaci amoniaku (tzv. proces ANAMMOX)[7,8,26]. Perspektivní mohou být i systémy pracující na principu nitritace a následné denitritace[6,7,19], které se ve srovnání s procesem ANAMMOX jeví jako podstatně méně náročné na řízení procesu. Klíčovým faktorem pro úspěšný provoz ANAMMOX procesu i postupu nitritace/denitritace je nutnost efektivně potlačit činnost nitratačních organismů v nitrifikační fázi. Na rozdíl od standardních systémů biologického čištění, ve kterých je zvýšený výskyt dusitanů nežádoucí[3], je tak v případě aplikace technologie ANAMMOX či nitritace/denitritace naopak nutno maximalizovat zastoupení dusitanů mezi produkty nitrifikační fáze.

V tomto příspěvku byla nastíněna jedna z možností, jak při využití inovativních postupů odstraňování dusíku dlouhodobě udržet v nitrifikačním reaktoru kýženou inhibici nitratačních organismů. Výsledky experimentů naznačují, že při čištění odpadních vod s extrémně vysokým obsahem N-amon může být spolehlivým „spouštěčem“ této inhibice limitovaná dostupnost kyslíku. Ta však zároveň může zpomalit proces nitritace[5,19]. Jako racionální přístup k minimalizaci produkce dusičnanů v reaktorech pracujících na principu netradičních postupů odstraňování

N-amon se tedy při čištění odpadních vod specifického složení jeví střídání fází s limitovanou a nelimitovanou koncentrací kyslíku. V periodě s limitovanou dostupností kyslíku by byla velice rychle eliminována činnosti nitratačních organismů. V následné fázi s nelimitovanou koncentrací kyslíku by v systému sekundárně působily dusitany, resp. jejich disociační formy inhibující aktivitu nitratačních organismů. Systém by v této fázi mohl být velice výkonný. V případě nárůstu zastoupení dusičnanového dusíku jako produktu nitrifikace by pak mohla následovat další fáze s limitovanou koncentrací kyslíku. Optimalizace délky jednotlivých fází bude cílem navazujícího výzkumu. Nastíněná strategie iniciace a dlouhodobého udržení nitrifikace končící v dusitanovém stupni je však pochopitelně aplikovatelná pouze při čištění odpadních vod charakteristických velice vysokou koncentrací dusíkatého znečištění. Mezi takové vody patří např. kalová voda vznikající při odvodňování anaerobně stabilizovaného kalu, skládkové výluhy, kapalná frakce organického materiálu anaerobně zpracovaného v reaktorech bioplynových stanic či různé specifické typy průmyslových odpadních vod. Naopak pro čištění odpadních vod s relativně nízkou koncentrací N-amon (např. voda čištěná v objektech městských čistíren odpadních vod) je vzhledem k nemožnosti docílit koncentrací FNA, resp. $N\text{-}NO_2^-$, inhibujících aktivitu nitratačních organismů, potřeba volit jinou strategii.

Závěr

V rámci provedených experimentů bylo potvrzeno, že při limitaci dostupnosti kyslíku v systému biologického čištění odpadní vody s extrémně vysokým obsahem N-amon může na aktivitu NOB nedostatek O_2 působit nejen přímo, ale i sekundárně v důsledku nahromadění dusitanů (resp. FNA) v systému. Dominantním finálním produktem nitrifikace pak může i po následném zvýšení koncentrace kyslíku být dlouhodobě $N\text{-}NO_2^-$. Výsledky výzkumu mohou být využity pro regulaci nitrifikačního procesu v rámci provozu biologických reaktorů aplikujících pro čištění specifických typů odpadních vod proces ANAMMOX či postup nitritace/denitritace.

Příspěvek byl vypracován v rámci řešení projektu podporovaného Celouniverzitní grantovou agenturou (CIGA) ČZU v Praze, registrační číslo projektu 20142028. Autoři děkují poskytovateli dotace za finanční podporu výzkumu.

LITERATURA

1. Pitter P.: *Hydrochemie.* Vydavatelství VŠCHT, Praha 1999.
2. Painter H. A.: Water Res. *4*, 393 (1970).
3. Chudoba J., Dohányos M., Wanner J.: *Biologické čištění odpadních vod.* SNTL, Praha 1991.
4. Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S., Srinath E. G.: J. Water Poll. Contr. Fed. *48*, 835 (1976).
5. Ruiz G., Jeison D., Chamy R.: Water Res. *37*, 1371 (2003).
6. van Kempen R., Mulder J. W., Uijterlinde C. A., Loosdrecht M. C. M.: Water Sci. Technol. *44*, 145 (2001).
7. Švehla P., Jeníček P., Habart J., Hanč A., Černý J.: Chem. Listy *101*, 776 (2007).
8. van Dongen U., Jetten M. S. M., van Loosdrecht M. C. M.: Water Sci. Technol. *44*, 153 (2001).
9. Zekker I., Rikmann E., Tenno T., Lemmiksoo V., Menert A., Loorits L., Vabamäe P., Tomingas M., Tenno T.: Biodegradation *23*, 547 (2012).
10. Guo J., Peng Y., Wang S., Zheng Y, Huang H., Wang Z.: Bioresour. Technol. *100*, 2796 (2009).
11. Bournazou M.N.C., Hooshiar K., Arellano-Garcia H., Wozny G., Lyberatos G.: Water Res. *47*, 3399 (2013).
12. Guisasola A., Jubany I., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J.: J. Chem. Technol. Biotechnol. *80*, 388 (2005).
13. Blackburne R., Yuan Y.G., Keller J.: Biodegradation *19*, 303 (2007).
14. Vadivelu V.M., Yuan Z.; Fux C., Keller J.: Environ. Sci. Technol. *40*, 4442 (2006).
15. Vadivelu V.M., Keller J., Yuan Z.: Water Res. *41*, 826 (2007).
16. Buday J., Drtil M., Hutňan M., Derco J.: Chem. Pap. *53*, 379 (1999).
17. Kouba V., Catrysse M., Stryjova H., Jonatova I., Volcke E., Svehla P., Bartacek J. Water Sci. Technol. *69*, 1227 (2014).
18. Svehla P., Bartacek J., Pacek L., Hrncirova H., Radechovsky J., Hanc A., Jenicek P. Chem. Pap. *68*, 871 (2014).
19. Jeníček P., Švehla P., Zábranská J.: Water Sci. Technol. *49*, 73 (2004).
20. Horáková M.: *Analytika vody.* Vydavatelství VŠCHT, Praha 2000.
21. Radechovský J., Švehla P., Hrnčířová H., Pacek L., Balík J.: Chem. Listy *107*, 892 (2013).
22. Daims H., Lucker S., Wagner M.: Environ. Microbiol. *22*, 200 (2006).
23. Wang L., Zeng G., Yang Z., Luo L., Xu H., Huang J.: Biochem. Eng. J. *87*, 62 (2014).
24. Bae W., Baek S., Chung J., Lee Y.: Biodegradation *12*, 359 (2001).
25. Zhou Y., Oehmen A., Lim M., Vadivelu V., Ng W.J.: Water Res. *45*, 4672 (2011).
26. Lackner S., Gilbert E. M., Vlaeminck S. E., Joss A., Horn H., van Loosdrecht M. C. M.: Water Res. *55*, 292. (2014).

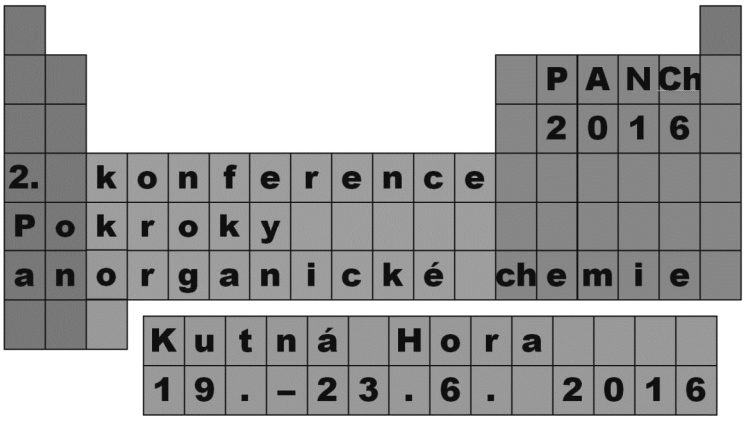
P. Švehla, L. Pacek, H. Radechovská, and J. Radechovský *(Department of Agro-environmental chemistry and Plant Nutrition, Czech University of Life Sciences Prague, Prague 6):* **Secondary Effect of Oxygen Limitation on the Distribution of the Products of Nitrification during Wastewater Treatment**

Within the frames of this experiment, a secondary effect of oxygen limitation during reject water treatment on the distribution of the nitrification final products was demonstrated. This effect consists in extreme increase of nitrite concentration as the consequence of nitrite-oxidising bacteria inhibition induced primarily by the lack of oxygen. Subsequently, a toxic effect of nitrite (or more precisely free nitrous acid) is able to stop the nitrification process on a nitrite level under specific technological arrangement of treatment process even in the case that oxygen limitation is terminated. The results could be used for the control of nitrification process during the operation of biological reactors applying ANAMMOX process or nitritation /denitritation method for the treatment of specific types of wastewaters.

Dovolujeme si pozvat všechny příznivce anorganické chemie na **2. konferenci**

POKROKY ANORGANICKÉ CHEMIE, která se bude konat ve dnech **19. - 23. 6. 2016** v Kutné Hoře. Cílem toho setkání je vytvořit fórum pro prezentaci jednotlivých týmů působících ve všech oblastech anorganické chemie v České a Slovenské republice.

Uzávěrka pro zasílání abstraktů (pro speciální číslo časopisu *Czech Chemical Society – Symposium Series*) je **15. dubna 2016**.



Další informace jsou k dispozici na www stránkách **http://www.natur.cuni.cz/panch2016**.