

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace podmínek heterogenní fotokatalýzy při odstranění *E. coli*
z vodného prostředí

Bc. Pavlína Francová

Diplomová práce

2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

.....
Pavλίna Francová

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph. D., za odborné vedení diplomové práce, věnovaný čas a poskytování cenných rad a připomínek, které mi pomohly diplomovou práci zpracovat. Dále bych také ráda poděkovala Ing. Petře Peroutkové a Ing. Markovi Smolnému za rady při práci v laboratoři.

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce je věnována přehledu hlavních bakterií způsobujících vodní kontaminaci, principu a dezinfekčním účinkům fotokatalýzy. V experimentální a výsledkové části práce jsou uvedeny dosažené výsledky. Účinnost snížení bakteriálního znečištění byla testována na dvou mikroorganismech, *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*, byly použity dva typy fotokatalyzátorů a jejich kombinace s peroxidem vodíku. Nejlepších výsledků u odstraňování obou bakterií bylo dosaženo za použití kombinace fotokatalýzy s přidavkem peroxidu vodíku.

KLÍČOVÁ SLOVA

Fotokatalýza, dezinfekce, *Escherichia coli*, bakterie

TITLE

Optimization of conditions of heterogeneous photocatalysis for the removal of *E.coli* from water

ANNOTATION

The theoretical part of the thesis is devoted to an overview of the main bacteria causing water contamination, the principle and disinfection effects of photocatalysis. In the experimental and results part of the thesis the achieved results are presented. The effectiveness of reducing bacterial contamination was tested on two microorganisms, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*, using two types of photocatalysts and their combination with hydrogen peroxide. The best results in removing both bacteria were achieved using a combination of photocatalysis with the addition of hydrogen peroxide.

KEYWORDS

Photocatalysis, disinfection, *Escherichia coli*, bacteria

OBSAH

ÚVOD.....	12
TEORETICKÁ ČÁST	13
1 MIKROBIOLOGICKÉ ZNEČIŠTĚNÍ VODY	13
1.1 ROD ESCHERICHIA	15
1.1.1 Kmeny shiga-like toxigenní <i>Escherichia coli</i> - STEC.....	16
1.1.2 Kmeny enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i> - ETEC	17
1.1.3 Kmeny enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i> - EIEC	17
1.1.4 Kmeny enteropatogenní <i>Escherichia coli</i> - EPEC.....	18
1.2 ROD PSEUDOMONAS	19
1.2.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	20
1.2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.3 ROD SALMONELLA	23
1.4 ROD VIBRIO.....	25
1.4.1 <i>Vibrio cholerae</i>	25
1.4.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	26
2 DEZINFEKCE VODY	27
2.1 METODY DEZINFEKCE VODY	27
2.1.1 Chlorace	27
2.1.2 Ozonizace.....	28
2.1.3 Pasterizace	28
2.1.4 Fotolýza	29
3 FOTOKATALÝZA	30
3.1 PRINCIP FOTOKATALÝZY	30
3.2 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ FOTOKATALÝZY	33
3.3 VLIV pH NA FOTOKATALÝZU	34
3.4 VLIV INTENZITY A DRUHU ZÁŘENÍ NA FOTOKATALÝZU	34

3.5	DEZINFEKČNÍ ÚČINEK PO UKONČENÍ FOTOKATALÝZY	35
3.6	POLOVODIČE VYUŽÍVANÉ PRO FOTOKATALÝZU.....	36
3.6.1	Oxid titaničitý	36
3.6.2	Oxid zinečnatý	38
3.7	DEZINFEKČNÍ ÚČINKY FOTOKALÝZY	39
3.7.1	Dezinfekční účinky fotokatalýzy na <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
3.7.2	Dezinfekční účinky fotokatalýzy na <i>Escherichia coli</i>	42
4	CÍL PRÁCE	43
	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
5	MATERIÁL.....	44
5.1	Mikroorganismy	44
5.2	Přístroje	44
5.3	Laboratorní pomůcky	45
5.4	Chemikálie a reagenty	45
5.5	Kultivační média a roztoky	45
5.5.1	MPA – Masopeptonový agar (HiMedia, Indie)	45
5.5.2	MPB – Masopeptonový bujón (HiMedia, Indie)	46
5.5.3	Fyziologický roztok	46
5.5.4	Bakteriální kultury	46
6	PRACOVNÍ POSTUP	47
6.1	Postup odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy	47
6.2	Postup odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy a přídavku H ₂ O ₂	48
6.3	Postup odstraňování bakterií pomocí H ₂ O ₂	48
6.4	Nepřímé stanovení počtu buněk - Plotnová metoda	49
7	VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE	51
7.1	Odstraňování bakterie <i>Escherichia coli</i> pomocí fotokatalýzy	51
7.2	Odstraňování bakterie <i>Pseudomonas fluorescens</i> pomocí fotokatalýzy.....	53

7.3	Odstraňování bakterie <i>Escherichia coli</i> kombinací fotokatalýzy s TiO ₂ a přidavku H ₂ O ₂	55
7.4	Odstraňování bakterie <i>Pseudomonas fluorescens</i> kombinací fotokatalýzy s TiO ₂ a přidavku H ₂ O ₂	57
7.5	Odstraňování bakterie <i>Escherichia coli</i> pomocí H ₂ O ₂	60
7.6	Odstraňování bakterie <i>Pseudomonas fluorescens</i> pomocí H ₂ O ₂	61
ZÁVĚR	63
CITACE	66
PŘÍLOHA	73

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 <i>Escherichia coli</i>	15
Obrázek 2 Nárůst <i>Escherichia coli</i> na MacConkey agaru	16
Obrázek 3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> v elektronovém mikroskopu	19
Obrázek 4 Členové komplexu druhů <i>P. fluorescens</i> jako úspěšní kolonizátoři v širokém spektru prostředí a stanovišť díky různorodým funkčním schopnostem	21
Obrázek 5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na centrimidovém agaru	22
Obrázek 6 <i>Salmonella typhimurium</i> a působení TiO ₂ pod účinkem UV zářením	24
Obrázek 7 <i>Vibrio cholerae</i> v elektronovém mikroskopu	25
Obrázek 8 Úprava pitné vody	27
Obrázek 9 Jednoduché znázornění fotokatalýzy	31
Obrázek 10 Struktury oxidu titaničitého (červeně vyznačen titan, modře kyslík)	37
Obrázek 11 Rozdílná tvorba OH radikálů v případě anatasu a rutilu	37
Obrázek 12 Struktury oxidu zinečnatého	38
Obrázek 13 Dezinfekční účinky fotokatalýzy	40
Obrázek 14 Vliv fotokatalýzy na bakterie	40
Obrázek 15 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu bakterie <i>Pseudomonas fluorescens</i>	41
Obrázek 16 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu bakterie <i>Escherichia coli</i>	42
Obrázek 17 Fotokatalytické zařízení	47
Obrázek 18 Kontaminace při pokusu s <i>Escherichia coli</i>	73
Obrázek 19 Masivní nárůst na misce při experimentu s bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i>	73
Obrázek 20 Nárůst kontaminace při experimentu s <i>Pseudomonas fluorescens</i>	73
Obrázek 21 Masivní nárůst kontaminace při experimentu s <i>Pseudomonas fluorescens</i>	74
Obrázek 22 Normální nárůst bakterie <i>Escherichia coli</i>	74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Zástupci mikroorganismů vyskytujících se ve vodě, onemocnění, které způsobují a hlavní zdroje a rezervoáry	14
Tabulka 2 Praktické příklady využití fotokatalýzy	33
Tabulka 3 Seznam chemikálií.....	45

Tabulka 4 Složení MPA.....	45
Tabulka 5 Složení MPB.....	46
Tabulka 6 Výsledky měření dezinfekčního účinku fotokatalýza na bakterii <i>Pseudomonas fluorescens</i> (TiO ₂ P25+ přídavek peroxidu)	75
Tabulka 7 Výsledky měření dezinfekčního účinku fotokatalýza na bakterii <i>Pseudomonas fluorescens</i> (TiO ₂ AV01+ přídavek peroxidu).....	76

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Závislost počtu bakterií <i>Escherichia coli</i> na čase (TiO ₂ P25).....	52
Graf 2 Závislost počtu bakterií <i>Escherichia coli</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ AV01)	53
Graf 3 Závislost počtu bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ P25)	54
Graf 4 Závislost počtu bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ AV01)	55
Graf 5 Závislost počtu bakterií <i>Escherichia coli</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ P25 + přídavek peroxidu)	56
Graf 6 Závislost množství bakterie <i>Escherichia coli</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ AVO01 + peroxid vodíku).....	57
Graf 7 Závislost počtu bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i> v 1ml čase (TiO ₂ P25 + H ₂ O ₂)	58
Graf 8 Závislost počtu bakterií <i>Pseudomonas fluorescens</i> v 1 ml na čase (TiO ₂ AV01 + H ₂ O ₂)	60
Graf 9 Závislost OD na čase - <i>Escherichia coli</i>	61
Graf 10 Závislost OD na čase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	62

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Tvorba fotogenerovaných nosičů náboje.....	32
Rovnice 2 Tvorba OH radikálu.....	32
Rovnice 3 Tvorba O ₂ ⁻ radikálu	32
Rovnice 4 Tvorba HO ₂ radikálu	32
Rovnice 5 Tvorba H ₂ O ₂	32
Rovnice 6 Tvorba OH ⁻ , OH radikálu a kyslíku	32
Rovnice 7 Výpočet hodnoty CFU.....	49

SEZNAM ZKRATEK

CFU	jednotky tvořící kolonie (z ang. colony forming units)
E.	<i>Escherichia</i>
EHEC	enterohemoragické <i>Escherichia coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ISBN	International Standard Book Number
OD	optická hustota (z ang. optical density)
P.	<i>Pseudomonas</i>
STEC	shiga-like toxigenní <i>Escherichia coli</i>
THM	(thialomethany)
TSA agar	Trypton-sójový agar (z ang. tryptic soy agar)
VHEC	verotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
WHO	World Health Organization

ÚVOD

Fotokatalýza je technika, při které využíváme katalyzátoru k urychlení chemických reakcí, které vyžadují energii záření. Fotokatalyzátor je definován jako materiál, který je schopen absorbovat světlo a produkovat páry elektronů, které umožňují chemické přeměny účastníků reakce a regenerují jeho chemické složení po každém cyklu těchto interakcí. Rozlišujeme dva typy fotokatalytických reakcí, těmi jsou homogenní a heterogenní fotokatalýza (Khan *et al.*, 2015).

Fotokatalýza je univerzální technikou, která se ukázala jako velmi účinná pro odstranění širokého spektra biologických druhů mikroorganismů v pitné vodě. Její mechanismus byl podrobně studován, včetně pochopení samotného principu dezinfekce (McCullagh *et al.*, 2007). Za použití fotokatalýzy bychom tak mohli poskytnout rychlou a levnou, ale hlavně efektivnější alternativu dezinfekce vody. Dezinfekce fotokatalýzou by nám tak umožnila výrazně snížit bakteriální kontaminaci vody, která velmi často způsobuje méně či více závažné onemocnění (Byrne *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Nicméně je důležité se u těchto aplikací věnovat standardizačním postupům pro správné vyhodnocení procesu fotokatalytické dezinfekce a úrovně zničení bakterií (McCullagh *et al.*, 2007)

Sterilizace mikrobiálních buněk je důležitá také v lékařských a zemědělských oborech. Pro tento účel zatím využíváme hlavně antibiotika, vakcíny, metabolické inhibitory a baktericidy. Dále využíváme také fyzikální metody, tedy tepelné a UV záření, chlorace, ozonace a jiné. Tyto účinné metody mají ale obvykle nežádoucí účinky na živočichy i rostliny. Patogenní mikroorganismy se navíc rychle vyvíjí a přizpůsobují se našim obranným mechanismům, čemuž odpovídá i neustále se zvyšující rezistence na antibiotika. Proto je pro nás významné se zabývat dalšími alternativními metodami sterilizace (Byrne *et al.*, 2015; Matsunaga *et al.*, 1985).

TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROBIOLOGICKÉ ZNEČIŠTĚNÍ VODY

Pro pitnou vodu je v současné době kontrola mikrobiologického rizika považována za důležitější než kontrola chemického znečištění. Odhaduje se, že 750 milionů lidí v populaci nemá přístup ke kvalitnímu zdroji pitné vody a mnoho dalších spoléhá na zdroje, které vhodné ke konzumaci nejsou. Hlavními zdroji vody v těchto oblastech jsou prameny, jezy, mělké vrty, přehrady. Všechny tyto zdroje jsou náchylné ke kontaminaci mikroorganismy způsobujícími nejrůznější choroby. Každý rok se setkáváme s obrovským počtem lidí, kteří onemocní konzumací vody nevhodné k pití. Onemocnění jsou přenášeny právě prostřednictvím organismů vyskytujících se ve vodě jako jsou viry, bakterie nebo prvoci (někteří zástupci jsou uvedeni v tabulce 1). Infekce střevními bakteriemi a viry se stávají také příčinou podvýživy, protože vedou ke špatnému trávení potravy. Podle World Health Organization (WHO) úmrtnost spojená se znečištěním vody přesahuje 5 milionů lidí ročně. Z nich je více než 50 % přisuzováno mikrobiálním střevním infekcím, kde první místo v tomto žebříčku obsadila cholera. Bohužel se očekává, že se situace s pitnou vodou v příštím desetiletí ještě zhorší. Obecně platí, že největší mikrobiální rizika souvisejí s požitím vody, která je kontaminovaná lidskými a zvířecími výkaly (Byrne *et al.*, 2015; Cabral., 2010; da Silva *et al.*, 2016; Rincón, *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2015).

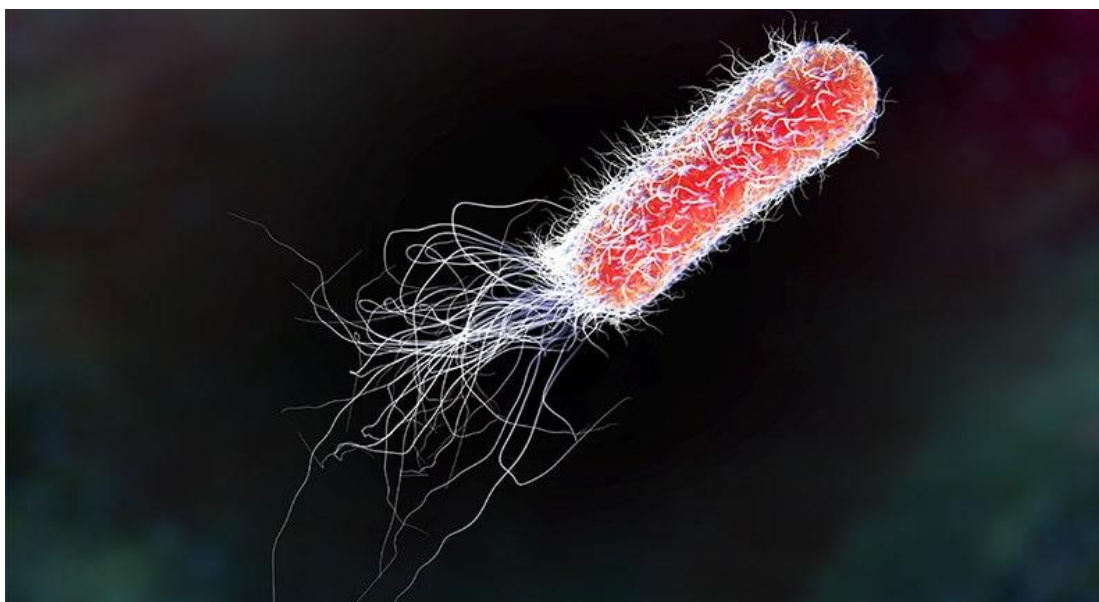
Tabulka 1 Zástupci mikroorganismů vyskytujících se ve vodě, onemocnění, které způsobují a hlavní zdroje a rezervoáry (Ashbolt, 2004)

	Mikroorganismus	Onemocnění	Hlavní rezervoár a primární zdroj
Bakterie	<i>Salmonella typhi</i>	břišní tyfus	lidské výkaly
	<i>Salmonella paratyphi</i>	paratyfus	
	jiné salmonely	salmonelózy	lidské a zvířecí výkaly
	<i>Shigella spp.</i>	shigelóza	lidské výkaly
	<i>Vibrio cholerae</i>	cholera	lidské výkaly a zooplankton
	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>	gastroenteritida	lidské výkaly
	<i>Yersinia enterocolitica</i>		lidské a zvířecí výkaly
	<i>Campylobacter jejuni</i>		
<i>Leptospira spp.</i>	leptospiróza	lidská a zvířecí moč	
Viry	<i>Coxsackie virus A</i>	aseptická meningitida	lidské výkaly
	<i>Coxsackie virus B</i>		
	Rotaviry	gastroenteritida	
	Adenoviry	onemocnění horních dých. cest a GIT traktu	
	<i>Norovirus</i>	gastroenteritida	
Prvoci	<i>Balantidium coli</i>	balantidiózya	lidské a zvířecí výkaly
	<i>Entamoeba histolytica</i>	amébová dysenterie	
	<i>Giardia lamblia</i>	gastroenteritida	voda a zvířecí výkaly
Helminti	<i>Ascaris lumbricoides</i>	ascarióza	lidské a zvířecí výkaly

1.1 ROD ESCHERICHIA

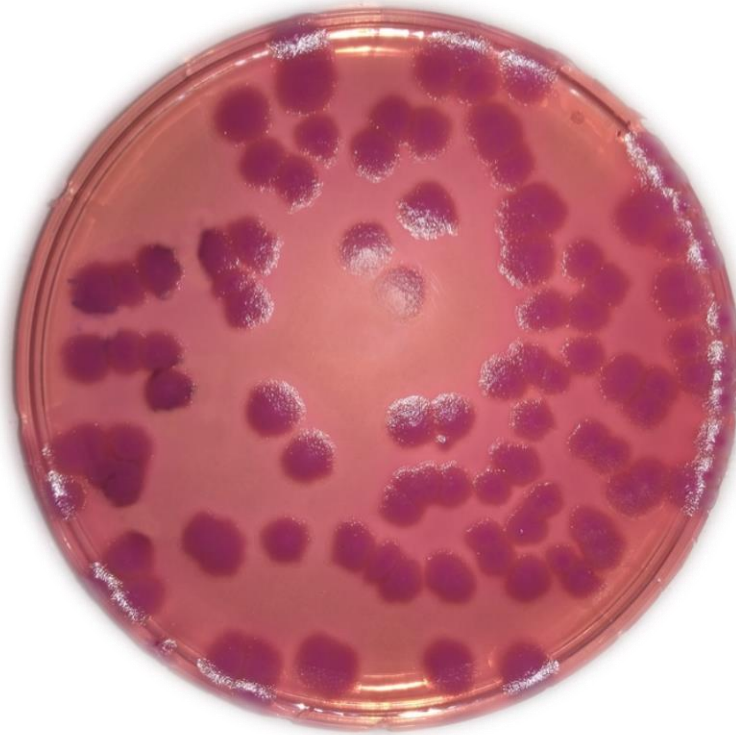
Escherichia coli je gram-negativní tyčinka patřící do *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* je fakultativně anaerobní bakterie, která je přirozenou a převažující součástí normální mikroflóry ve střevě lidí a zvířat, a je tak považována za neškodný komenzální mikroorganismus pro člověka. *Escherichia coli* typicky kolonizuje gastrointestinální trakt kojence během několika hodin života a poté bakterie a hostitel získávají vzájemný prospěch. *Escherichia coli* obvykle zůstává neškodně omezena na střevní lumen, ovšem u oslabeného nebo imunosupresivního hostitele a v případě porušené gastrointestinální bariéry, dokonce i normální, tedy nepatogenní kmeny *Escherichia coli* mohou způsobit infekci. Některé kmeny (které jsou zmíněny níže) jsou patogenní a mohou infikovat střevní oblast a způsobit těžké onemocnění nebo se mohou rozšířit po celém těle (Nataro and Kaper, 1998; Vásquez-García, *et al.*, 2019).

Bakterie *Escherichia coli* (na obrázku 1) je výborným indikátorem fekálního znečištění vody. Díky výskytu této bakterie není nutné testovat další patogenní bakterie. *Escherichia coli* se nalézá v trusu všech savců, ale v prostředí se poté již výrazně nemnoží. Díky této vlastnosti byla v 90. letech 20. století vybrána jako biologický ukazatel bezpečné vody (Edberg *et al.*, 2000).



Obrázek 1 *Escherichia coli* (dostupné: Biocote, 2016- online)

Escherichia coli nejlépe roste při 37 °C za aerobních podmínek. Jako selektivní médium používáme MacConkey agar, kde vytváří růžové kolonie (na obrázku 2) (Nataro and Kaper, 1998).



Obrázek 2 Nárůst *Escherichia coli* na MacConkey agaru (autor)

Kmeny *Escherichia coli* izolované ze střevních onemocnění byly seskupeny do několika hlavních skupin podle epidemiologických důkazů, fenotypových znaků, klinických obrazů choroby a specifických faktorů virulence. Mimořádný význam a možný přenos kontaminovanou vodou mají hlavně kmeny: ETEC – enterotoxigenní (0148), EHEC – enterohemoragické (0157), EIEC – enteroinvazivní (0124) (Cabral, 2010).

1.1.1 Kmeny shiga-like toxigenní *Escherichia coli* - STEC

Kmeny shiga-like toxigenní (STEC), dříve také nazývané jako kmeny enterohemoragické *Escherichia coli* (EHEC), nebo také verotoxigenní *Escherichia coli* (VTEC).

Kmeny STEC mohou růst při teplotách od 7 °C do 50 °C s optimální teplotou 37 °C. Některé STEC mohou růst i v kyselých potravinách, u kterých se pH pohybuje okolo 4,4. Kmeny STEC jsou zničeny dosažením teploty alespoň 70 °C ve všech částech potravy. Nejdůležitějším sérotypem je *Escherichia coli* 0157:H7. Kmeny STEC patří mezi kmeny s nejzávažnějšími příznaky onemocnění. Mezi symptomy, které přicházejí na začátku onemocnění, řadíme abdominální křeče a průjem, které přecházejí do krvácivého průjmu (hemoragická kolitida). Často se také objevuje horečka a zvracení. Doba inkubace se pohybuje v rozmezí od 3 do 8 dnů. U většiny pacientů dojde ke zlepšení do 10 dnů. U malé části nemocných (asi 10 %) může dojít k život ohrožujícímu stavu, kterému říkáme hemolytický uremický syndrom. Tento stav se vyznačuje akutním selháním ledvin, hemolytickou anémií a trombocytopenií. Úmrtnost se v tomto případě pohybuje v rozmezí 3 až 5 %. Antibiotická léčba není zařazena, protože vede k uvolnění toxinu a zhoršení průběhu onemocnění. Riziko vzniku onemocnění je také dáno velmi nízkou infekční dávkou. Uvádí se, že k vyvolání infekce stačí pouhých 10 bakterií (WHO, 2018).

1.1.2 Kmeny enterotoxigenní *Escherichia coli* - ETEC

Onemocnění způsobené ETEC může být způsobeno polknutím 10^6 až 10^{10} bakterií. K projevům onemocnění dochází, když bakterie dosáhnou tenkého střeva. Po přilnutí bakterií na povrch střevního epitelu dochází k produkci enterotoxinů a ty pak ovlivňují buňky v postižené oblasti. Produkce tepelně stabilních nebo tepelně labilních enterotoxinů je hlavním faktorem virulence ETEC (Mirhoseini *et al.*, 2018).

1.1.3 Kmeny enteroinvazivní *Escherichia coli* - EIEC

Enteroinvazivní *Escherichia coli* jsou skupinou patogenních bakterií způsobujících střevní onemocnění při invazi lidské sliznice tlustého střeva. Kmeny EIEC způsobují až v 10 % případů bacilární dysenterii. Ve zbylých případech způsobují toto onemocnění druhy bakterie *Shigella*. Klinické projevy, které jsou nerozeznatelné od infekce způsobené kmeny druhu *Shigella*, zahrnují nevolnost, horečku, těžké abdominální křeče, malátnost a vodnatý průjem s možnou příměsí krve a hlenu. Bakterie *Shigella* potřebují nižší infekční dávku pro vyvolání onemocnění (101-104 organismů), zatímco kmeny EIEC vyžadují větší infekční dávku (106-1010 mikroorganismů). *Shigella* spp. i kmeny EIEC exprimují podobnou sadu proteinů a

jsou přenášeny přímým kontaktem lidí nebo prostřednictvím kontaminovaného jídla a vody (Hsu *et al.*, 2010; Michelacci *et al.*, 2016).

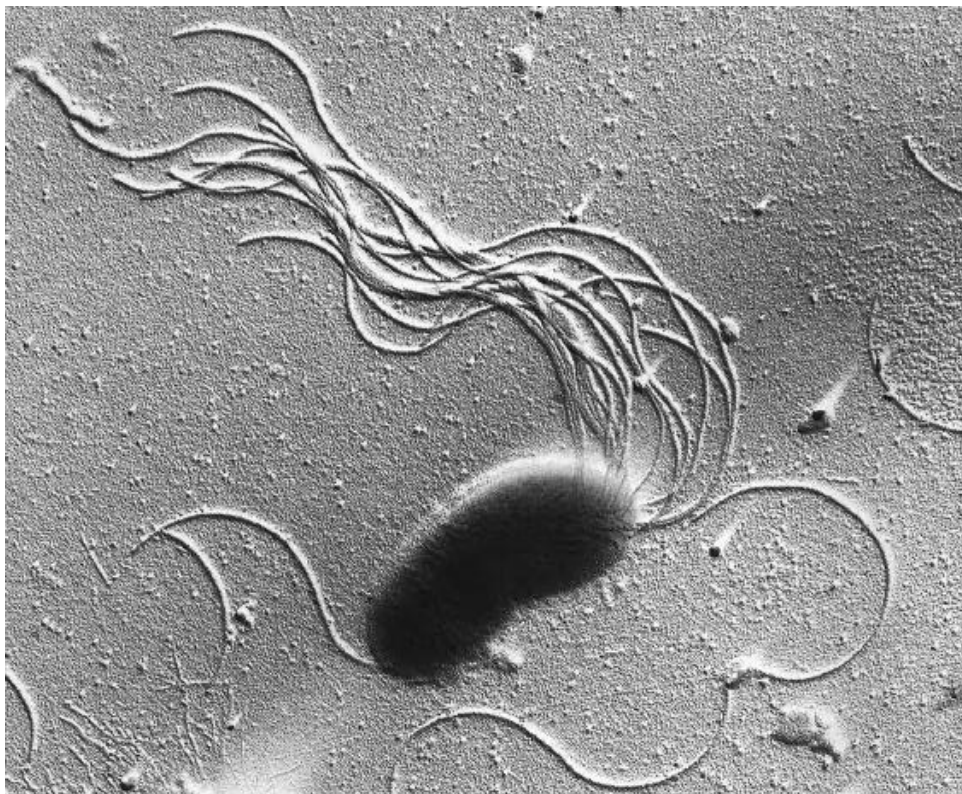
1.1.4 Kmeny enteropatogenní *Escherichia coli* - EPEC

Enteropatogenní *Escherichia coli* patří mezi nejvýznamnější patogeny infikující děti po celém světě a jsou jednou z hlavních příčin přetrvávajících průjmů (Ochoa and Contreras, 2011). Zástupci tohoto kmene nemají schopnost produkovat tepelně labilní ani stabilní enterotoxiny (Gomes *et al.*, 2016).

1.2 ROD PSEUDOMONAS

Rod *Pseudomonas* zahrnuje heterogenní skupinu mikroorganismů z čeledi *Pseudomonadaceae*. Tato skupina zahrnuje všudypřítomné gram-negativní, aerobní, nefermentující tyčinky. Jsou kataláza i oxidáza pozitivní a netvoří spory. Členové skupiny *Pseudomonas* se adaptují různým podmínkám, takže je můžeme nacházet v široké škále míst (půda, voda, rostliny, živočišné tkáně). Často se také podílí na degradaci a znehodnocování potravin a v této souvislosti je důležité podotknout, že jejich enzymy jsou tepelně odolné. Členové této skupiny mohou produkovat pigmenty, jako je pyoverdin, pyocyanin a indigoidin. Zejména *Pseudomonas fluorescens* (obrázek 3) způsobuje změny ve struktuře a barvě potravinářského produktu v důsledku produkce enzymů a pigmentů. Pseudomonády produkující pigment navíc rychle rostou při nízkých teplotách a produkují exopolysacharidy, které přispívají k tvorbě biofilmu (Caldera *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2016).

Pseudomonas jsou obecně rezistentní vůči β -laktamovým antibiotikům a penicilinu (Arslan and Özdemir, 2011).

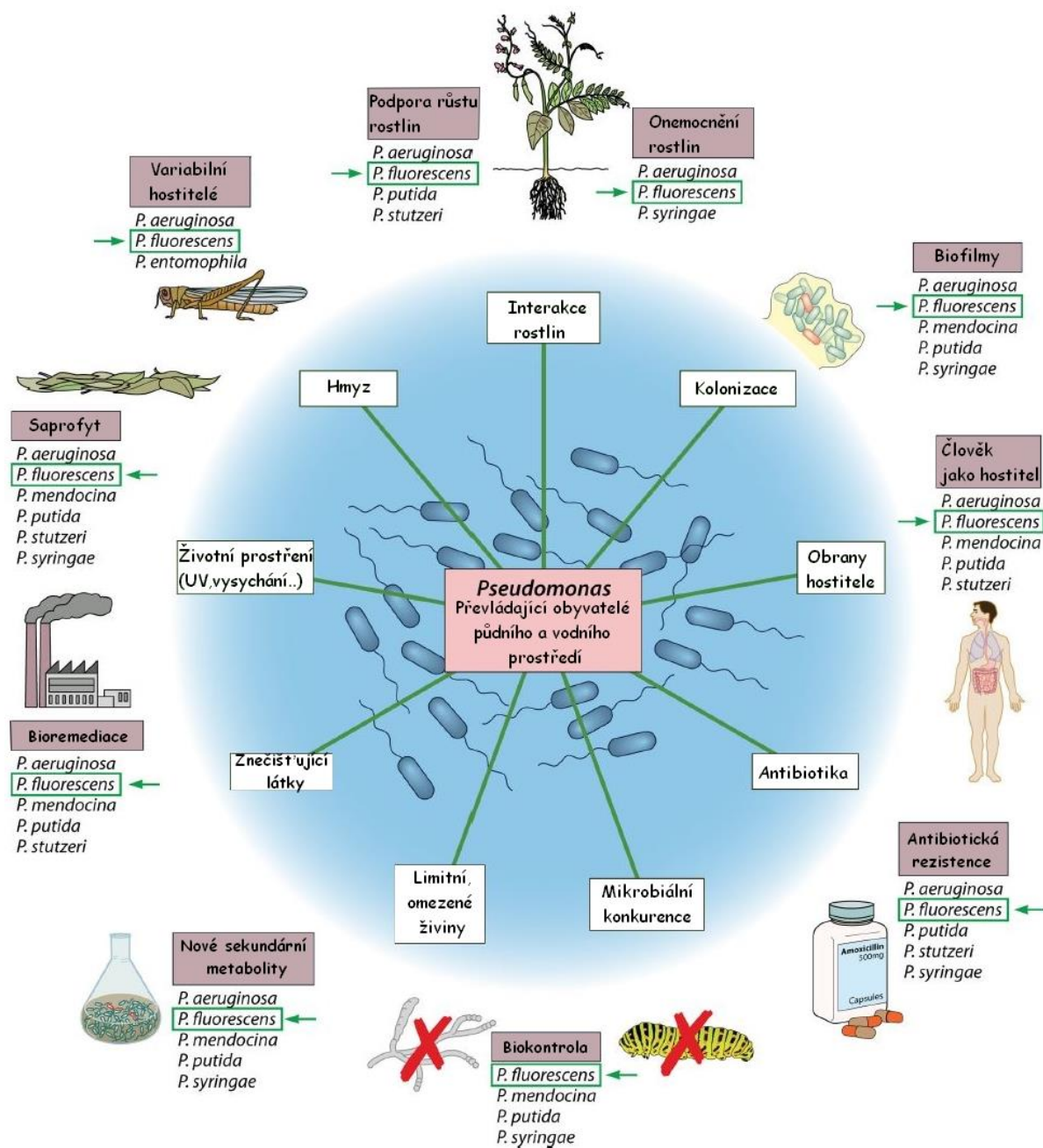


Obrázek 3 *Pseudomonas fluorescens* v elektronovém mikroskopu (převzato: Scales *et al.*, 2014)

1.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas fluorescens je běžný patogen ve vodním prostředí a postihuje obratlovce i bezobratlé živočichy. Tento patogen postihuje celou řadu druhů ryb, ale i ptáků a lidí. Existují také nepatogenní *Pseudomonas fluorescens*, které můžeme izolovat z rostlin nebo z půdy (Sun and Sun, 2015).

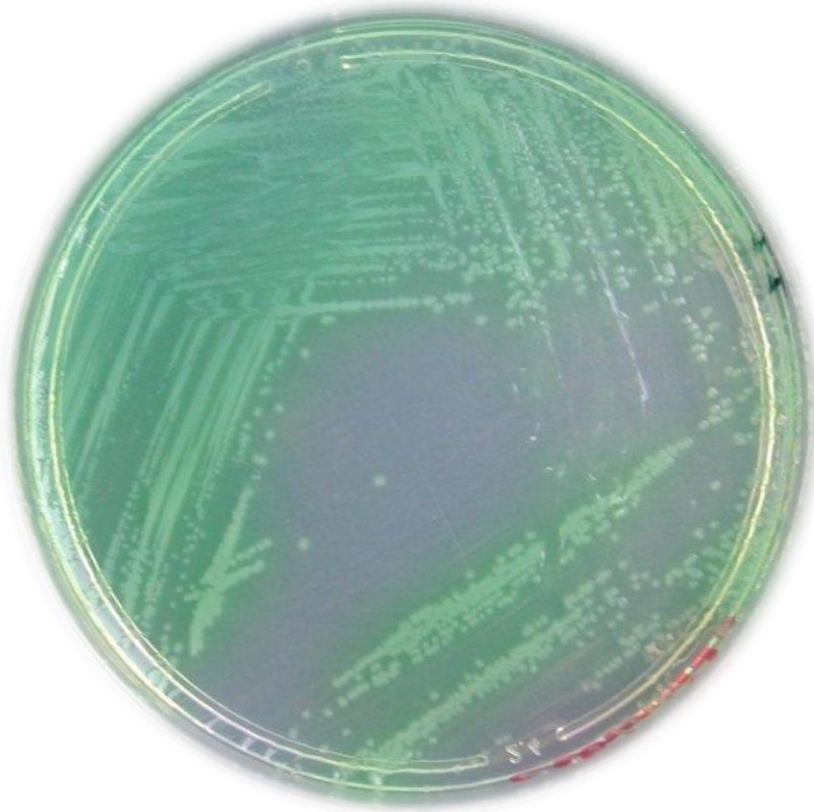
Pseudomonas fluorescens dobře roste na TSA (trypton-sójový agar) agaru, na krevním agaru má hemolytickou aktivitu. Extrémně mnohostranné metabolické schopnosti *Pseudomonas fluorescens* dodávají této bakterii schopnost přetrvávat v širokém spektru prostředí mimo savčí hostitele, včetně půdy, rhizosfér a povrchů rostlin, nesterilních léčiv, sprchových hlav, dokonce i vnitřních prostor, jako jsou povrchy stěn (obrázek 4). *Pseudomonas fluorescens* byl nejvíce studován jako environmentální mikrob, zejména pro jeho úlohu při podpoře zdraví rostlin, prostřednictvím řady kódovaných antimikrobiálních mechanismů. Pro izoláty ze životního prostředí je optimální teplota mezi 25-30 °C, pro izoláty ze savců 34-37 °C (Scales *et al.*, 2014).



Obrázek 4 Členové komplexu druhů *P. fluorescens* jako úspěšní kolonizátoři v širokém spektru prostředí a stanovišť díky různorodým funkčním schopnostem (převzato a upraveno: Scales et al., 2014).

1.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (na obrázku 5) má perleťový vzhled a charakteristický zápach. Roste dobře při 25-37 °C, ale je schopná růst i při 42 °C. Většina kmenů produkuje jeden nebo více pigmentů, včetně pyocyaninu (modrozelený), pyoverdinu (žlutozelený a fluorescenční) a pyorubinu (červenohnědý) (Wu et al., 2015).



Obrázek 5 *Pseudomonas aeruginosa* na centrimidovém agaru (převzato a upraveno: Ismaeel and Kshask, 2014)

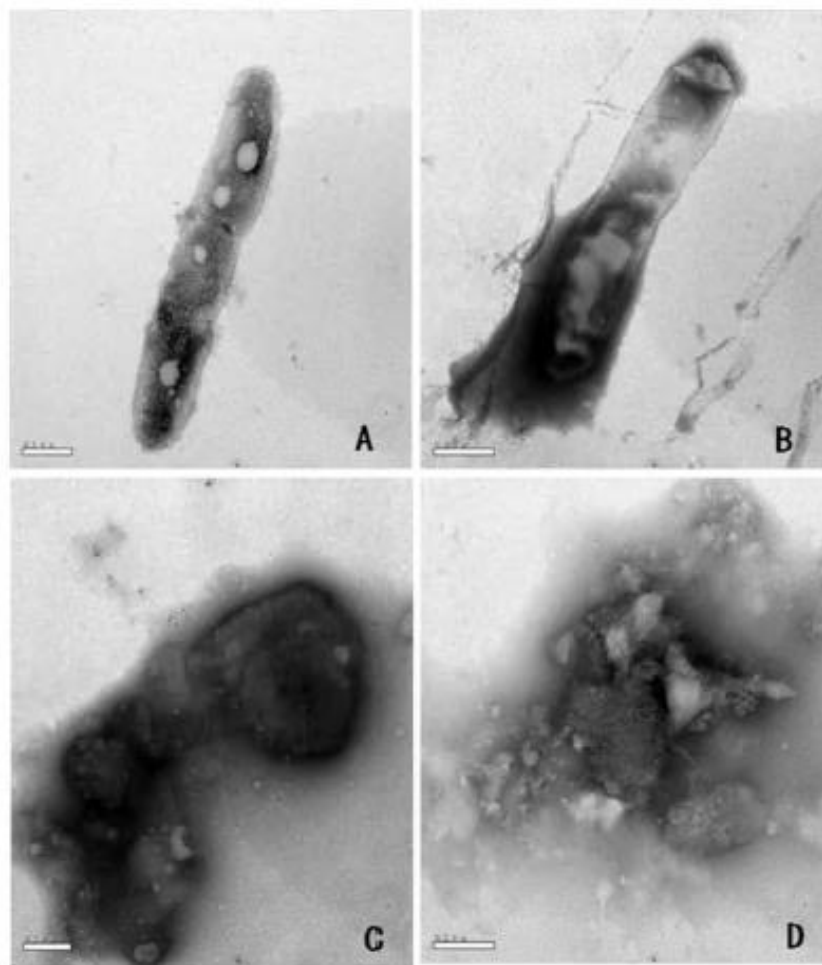
Pseudomonas aeruginosa způsobuje kažení potravin a je patogenní pro lidi i zvířata, často jako sekundární infekce. Postihuje především imunokompromitované osoby a osoby trpící cystickou fibrózou. Mezi nejčastější místa nákazy patří rohovka, kůže, močové a dýchací cesty, ale prakticky se může vyskytovat na mnoha dalších místech. U bakterie *Pseudomonas aeruginosa* je také významná rezistence vůči antibakteriálním látkám. Mezi antimikrobiální látky pro léčbu infekcí způsobených touto bakterií patří pouze některé β -laktamovým antibiotika, jako je karbenicilin, dále cefalosporiny třetí generace, aminoglykosidy a chinolony (Arslan *et al.*, 2011).

1.3 ROD SALMONELLA

Druhy bakterie *Salmonella* jsou gram-negativní bakterie s bičíkem, které mohou infikovat lidi, savce, ptáky, plazy i další živočichy. Zástupci rodu *Salmonella* obvykle způsobují gastrointestinální infekce (Hsu *et al.*, 2011).

Salmonely můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou tzv. tyfoidní salmonely, kam řadíme bakterie *Salmonella Typhi* a *Salmonella Paratyphi*. Tyto bakterie jsou původci závažného invazivního onemocnění, někdy smrtelného, kterému říkáme tyfová horečka nebo paratyphoidní horečka (Sanderson *et al.*, 2015). Do druhé skupiny tzv. netyfoidních salmonel patří např. *Salmonella enterica*. *Salmonella enterica* je jednou z hlavních příčin průjmů po celém světě. K přenosu obvykle dochází při požití potravy nebo vody kontaminované výkaly, ale je možný i přímý přenos z člověka na člověka. Antibiotická terapie se obvykle nezařazuje, ale mohou nastat závažné infekce hlavně u dětí a starších pacientů a u pacientů s oslabeným imunitním systémem (Mellon *et al.*, 2017).

Na obrázku 6 je znázorněno působení oxidu titaničitého při vystavení UV záření na bakterii *Salmonella typhimurium*. Obrázek 6 (A) ukazuje pravidelnou buňku, ve tvaru tyčky s hladkým povrchem buněčné stěny. Obrázek 6 (B) ukazuje ošetřenou buňku, kdy na jednom konci pozorujeme zvětšení a ztmavnutí. Obrázek 6 (C) zobrazuje stav, kdy již dochází ke ztrátě tvaru tyčky a integrity buňky. Na obrázku 6 (D) je buněčná stěna zcela ztracena a obsah buněk uniká do média (Long *et al.*, 2014).



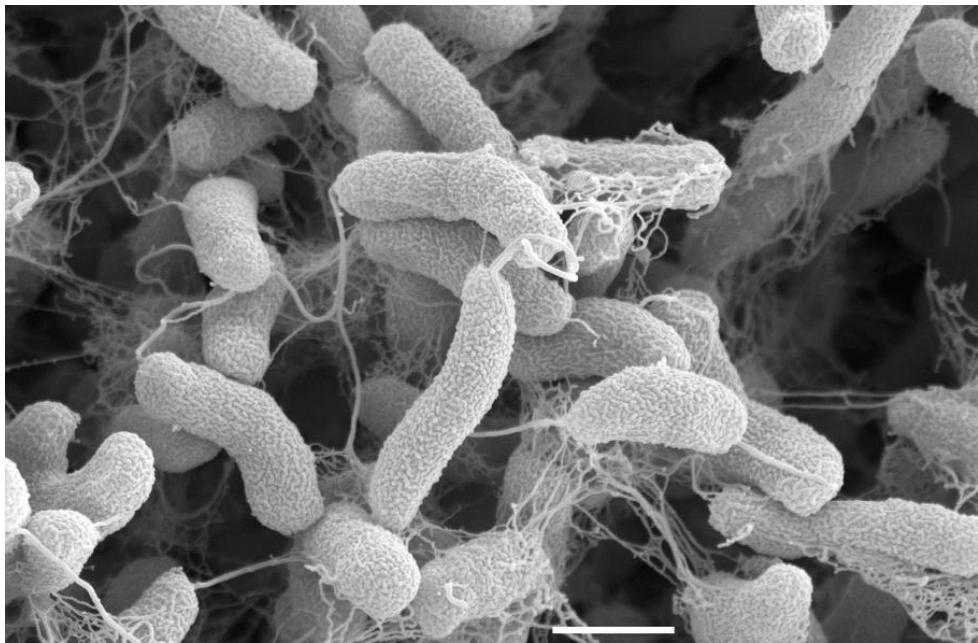
Obrázek 6 *Salmonella typhimurium* a působení TiO_2 pod účinkem UV zářením (Long et al., 2014)

1.4 ROD VIBRIO

Vibria jsou gram-negativní, halofilní bakterie. Řadíme sem např. *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* a další (Messelhäusser *et al.*, 2010).

1.4.1 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae (na obrázku 7) je halofilní, vysoce pohyblivá, zakřivená, gram-negativní tyčinka. Je fakultativně anaerobní, oxidáza pozitivní, fermentuje glukózu, sacharózu a mannitol. *Vibrio cholerae* často způsobuje asymptomatickou infekci nebo mírné průjemové onemocnění. V závažných případech však způsobuje těžký průjem, který může mít u zdravého dospělého člověka fatální následky během 5–24 hodin. Pro propuknutí infekce stačí 108 bakterií. Po typickém inkubačním období, které odpovídá 1–2 dnům (vždy do 5 dnů) se u pacientů objeví náhlý nástup vodnatého průjmu a způsobuje velmi rychlou dehydrataci. Stolica je vysoce infekční. Bez antibiotické léčby se *Vibrio cholerae* vylučuje po dobu 6 dnů (Wail and Harris, 2015).



Obrázek 7 *Vibrio cholerae* v elektronovém mikroskopu (převzato z The Robert Koch Institute – online)

1.4.2 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus je halofilní bakterie, které se daří v teplém podnebí v mořích a v ústích řek. *Vibrio parahaemolyticus* je volně žijící bakterie v poloslaných vodách a slanost vyžaduje pro přežití. Virulentní kmen bakterie může způsobit různá onemocnění, od infekcí ran po akutní gastroenteritidy, které jsou způsobeny konzumací nedostatečně tepelně zpracovaných mořských plodů, zejména měkkýšů (Broberg *et al.*, 2011).

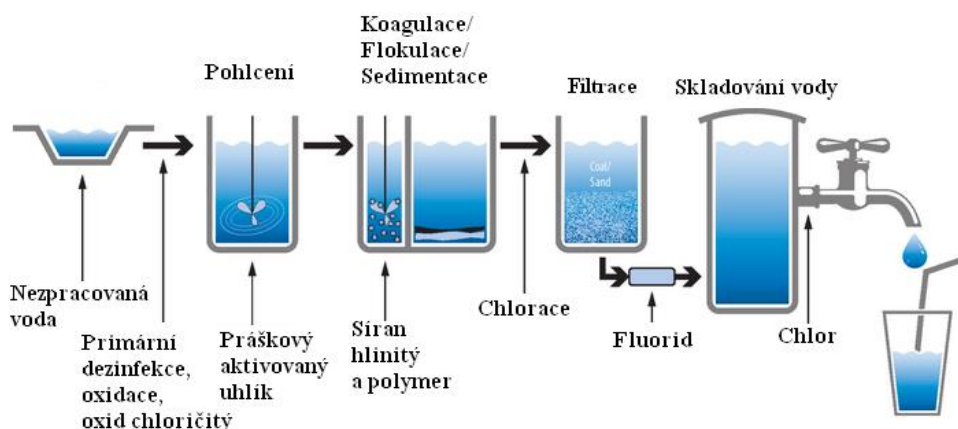
2 DEZINFEKCE VODY

Dezinfekce vody znamená odstranění, deaktivaci nebo usmrcování patogenních mikroorganismů včetně různých prvoků, hub, bakterií, virů, helmintů a prionů. Mikroorganismy jsou dezinfekcí zničeny nebo deaktivovány, což vede k ukončení růstu a reprodukce. Konvenční metody dezinfekce vody obvykle provádíme přidáním silného oxysličovačla, nejčastěji se používá chlor (Pomykačová *et al.*, 2008; Rincón, *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010). Schéma úpravy pitné vody je znázorněno na obrázku 8.

2.1 METODY DEZINFEKCE VODY

2.1.1 Chlorace

Chloraci řadíme mezi konvenční metody dezinfekce. Chlor je dezinfekční prostředek používaný po celém světě, a to hlavně kvůli své účinnosti, nízké ceně a snadné aplikaci (da Silva *et al.*, 2016). Tímto postupem však dochází k ovlivnění chuti vody a zároveň může dojít, v závislosti na druhu vody a aplikaci k tvorbě toxických vedlejších produktů. Mezi nejdůležitější patří THM (thiahalomethany), vznikající z přirozeně se vyskytujících kyselin a jejich derivátů, které se během chlorování pitné vody spojují s chlorem. Těmto látkám je přisuzován karcinogenní a mutagenní potenciál, proto musíme pamatovat i na odstranění těchto sloučenin. Dále mezi tyto toxické látky řadíme halogenoctové kyseliny. Jejich zvýšená koncentrace v pitné vodě může přispívat při dlouhodobé konzumaci k negativním vlivům na reprodukci a také zvýšit rizika vývojových vad a rakoviny (Pomykačová *et al.*, 2008; Rincón, *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010).



Obrázek 8 Úprava pitné vody (převzato a upraveno z: mesaaz.gov)

2.1.2 Ozonizace

Ozonizace je schopna účinně inaktivovat většinu bakterií, spór, virů, prvků a prionového proteinu ve vodě. Na rozdíl od chlorace ozon zanechává velmi málo zbytkového produktu při jeho oxidačních reakcích. Jeho použití je také šetrnější k životními prostředí, protože nevznikají škodlivé vedlejší produkty (Verma *et al.*, 2016; Xi *et al.*, 2017).

Ozon je výborný dezinfekční prostředek. Ve vodě je nestabilní. Využívá se především pro svou antimikrobiální aktivitu, ale také pro schopnost oxidace organických látek, kontrolu chuti a zápachu vody, odbarvení a eliminaci mikropolutantů. Ozon má rychlejší dezinfekční kinetiku a je účinnější v eliminaci většiny mikroorganismů v porovnání s jinými běžně používanými chemickými dezinfekčními látkami. Výhodou je, že jeho účinků můžeme také využít na mikroorganismy, které jsou rezistentní vůči chlóru, včetně dalších mikroorganismů, které jsou velmi odolné vůči většině dezinfekční činidel (Verma *et al.*, 2016; von Gunten, 2003).

Baktericidní účinek ozonu vede k úplné nebo částečné destrukci buněčné stěny a tento mechanismus je považován za hlavní antibakteriální funkci ozonu. Ozon také rozkládá chromozomy, N-glykosidovou vazbu, DNA vodíkové vazby, stejně jako vazbu mezi fosfátem a cukrem, která tvoří cukr-fosfátovou kostru DNA a dochází tak k depolymeraci a vytékání buněčných složek, jako jsou proteiny, DNA a anorganické ionty. Baktericidní účinky ozonu jsou efektivnější pro gram-pozitivní bakterie. Tato skutečnost byla potvrzena ve studii Ersoy *et al.*, 2019 s bakteriemi *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*, kdy pro likvidaci bakterie *Escherichia coli*, byla zapotřebí delší doba ozonizace, než pro *Enterococcus faecalis*. Celý proces ozonace se v obou případech výrazně lišil. Hlavní mechanismus dezinfekce u bakterie *Escherichia coli* je pravděpodobně poškození buněčné stěny, u bakterie *Enterococcus faecalis* dochází s největší pravděpodobností k poškození intracelulárních složek, ale i narušení membrány (Ersoy *et al.*, 2019; Verma *et al.*, 2016; von Gunten, 2003).

2.1.3 Pasterizace

Termínem termální pasterizace je myšleno zvýšení teploty vody k tomu, aby byla voda bezpečná k pití. Pasterizace neodstraňuje materiál, jako je tomu například u filtrace. Kromě toho pasterizace nevyžaduje, aby byly usmrceny všechny druhy patogenních mikroorganismů, ale aby byly patogenní populace sníženy na úroveň, kdy již nedochází k žádnému riziku

s ohledem na lidské zdraví. V důsledku toho pasterizaci neřadíme ke sterilizačním metodám. Pasterizace může být provedena dvěma způsoby. Buď dochází k ohřevu zásobníku za použití slunečního záření, dřeva nebo kapalných paliv nebo se voda ohřívá během průtoku potrubím. Patogeny jsou schopny přežít zvýšení teploty po určitou dobu. Trvání silně závisí na dosažené teplotě a typu patogenu. Obecně platí, že požadovaná doba expozice se se snižující teplotou zvyšuje. Výhodou pasterizace je, že není ovlivněna zakalením vody (Abraham *et al.*, 2015).

2.1.4 Fotolýza

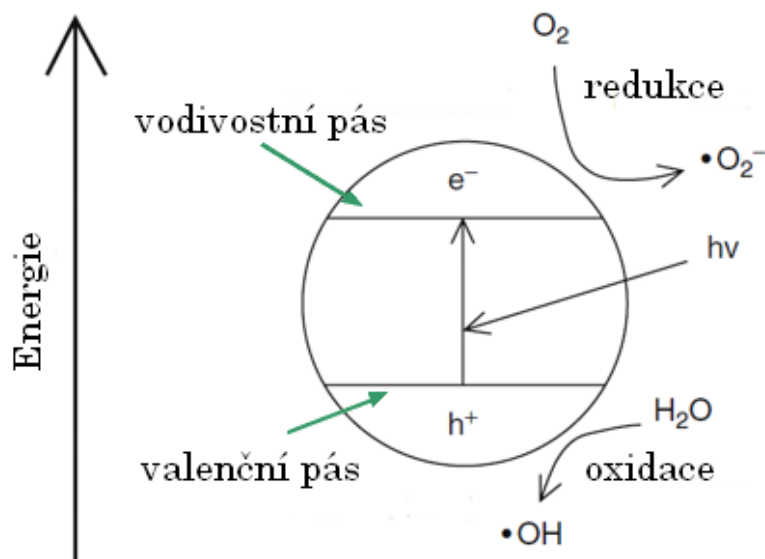
Fotokatalýza, jakožto metoda využívající UV záření je bezpečnou alternativou a zároveň šetrnou k životnímu prostředí (Rincón *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010). Detailně je tato metoda popsána v následujících kapitolách.

3 FOTOKATALÝZA

3.1 PRINCIP FOTOKATALÝZY

Proces fotokatalýzy je založen na oxidaci znečišťujících organických sloučenin nacházejících se ve vzduchu nebo ve vodě reakcemi, které se objevují na polovodičovém katalytickém povrchu. Tento povrch se aktivuje světlem (fotony) se specifickou vlnovou délkou (menší než 400 nm) a energií stejnou nebo vyšší, než je energie zakázaného pásu katalyzátoru. Jednoduché schéma tohoto principu je na obrázku 9. Povrch fotokatalyzátoru je tedy ozařován světlem (fotony), jehož energie je stejná nebo vyšší než energie zakázaného pásu (oblast mezi valenčním a vodivostním pásem). Tím dochází k excitaci elektronů a vytvoří se dvojice nosičů náboje, elektron a díra, která má schopnost oxidace a redukce. Dochází k vytvoření pozitivní díry (kterou značíme h^+), a to tak, že elektron opustil své místo ve valenčním pásu polovodiče a k tvorbě elektronu (který značíme e^-) v pásu vodivostním, jak popisuje rovnice 1. Dále je pro tuto reakci nutné využití oxidačního činidla, nejčastěji vzduch nebo čistý kyslík (Aziz *et al.*, 2016; Dalrymple *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2017; Rodgher *et al.*, 2014).

Fotogenerované nosiče náboje (tedy kladně nabitá díra a elektron) pak migrují po povrchu/rozhraní fotokatalyzátoru a jsou schopny redukovat nebo oxidovat sloučeniny adsorbované na povrchu katalyzátoru, tedy iniciují sérii reakcí a produkují vysoce aktivní reaktivní druhy kyslíky (ROS), jak je znázorněno v rovnicích 2-6 (Khan *et al.*, 2015; Reddy *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). Fotogenerované elektrony musí reagovat s vhodným akceptorem, v prostředí fotokatalýzy předpokládáme, že se jedná o kyslík, který tvoří zpočátku superoxidový radikál, a nakonec se z něj stává voda, zatímco fotogenerované díry, většinou indukují oxidaci organické látky, tedy makromolekuly. Viry a bakterie mohou být takto také zcela odstraněny nebo usmrceny. Fotokatalýza odstraňuje nejen organickou a mikrobiální kontaminaci, ale má také vysoký potenciál pro úplné odstranění anorganických kontaminantů, i toto znečištění prostředí může být přeměněno na méně nebezpečné sloučeniny oxidací (reakce s dírami) nebo redukcí (reakcí s elektrony) (Robertson *et al.*, 2012; Sontakke *et al.*, 2012).



Obrázek 9 Jednoduché znázornění fotokatalýzy (Převzato a upraveno: Ohama and van Gemert, 2011)

Fotokatalytická aktivita oxidu kovu pochází ze dvou zdrojů. Jedním z nich je tvorba OH radikálů oxidací OH aniontů, druhá je tvorba O_2^- radikálů redukcí O_2 . Jak již bylo zmíněno, jak radikály, tak anionty mohou reagovat se znečišťujícími látkami a degradují je nebo přeměňují na méně škodlivé vedlejší produkty (Khan, *et al.*, 2015).

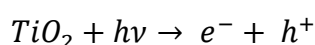
Při reakci, kdy vzniká superperoxid vodíku, může vznikat intermediát – hyperperoxidový radikál, který může být dále protonován za vzniku peroxidu vodíku. Peroxid vodíku v tomto katalytickém procesu působí jako oxidační činidlo a produkuje další hydroxidové radikály, čím se zvyšuje rychlost degradace kontaminujících látek. Vzniklé radikály a superoxidové ionty jsou nejdůležitějšími produkty, které se tvoří při fotokatalýze za použití oxidu titaničitého, neboť rychle a kontinuálně napadají kontaminanty na povrchu částic oxidu titaničitého, popř. i v roztoku. Přičemž se nehromadí zbytky organických kontaminantů (nevytváří se žádný kal, který by bylo nutné odstranit), neboť dochází k úplné destrukci původního materiálu na oxid uhličitý a vodu a samotná částice oxidu titaničitého zůstává nezměněna, takže není nutno dodávat další materiál (Aziz *et al.*, 2016).

Elektron a díra se také mohou rekombinovat a uvolňovat absorbovanou světelnou energii ve formě tepla. Tento děj je nežádoucí a lze mu zabránit redoxními reakcemi. Aby se zabránilo rekombinaci je nutné během celého procesu zajistit přítomnost vhodného tzv. lapače nebo vhodnou povrchovou úpravu. Ve valenčním pásmu částice oxidu titaničitého může pozitivní

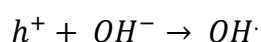
díra reagovat přímo s absorbovanými znečišťujícími látkami, ale reakce s molekulami vody je v tomto případě mnohem pravděpodobnější, protože se vyskytují ve větším počtu než molekuly kontaminantů. Oxidace vody nebo hydroxidových iontů pozitivně nabitou dírou způsobí vznik hydroxidového radikálu (Aziz et al., 2016).

Významný vliv na proces fotokatalýzy má také přítomný kyslík. Ve vodivém pásu je kyslík redukován na superoxidový ion. Tato důležitá reakce zabraňuje elektronu v rekombinaci s dírou a vede ke tvorbě různých kyslíkových radikálů, které se mohou podílet na eliminaci kontaminantů (Aziz et al., 2016; Lang *et al.*, 2014).

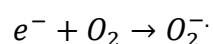
Rovnice popisující reakce fotokatalýzy (převzato a upraveno z Augugliaro *et al.*, 2012)



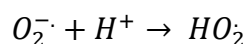
Rovnice 1 Tvorba fotogenerovaných nosičů náboje



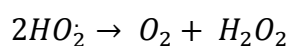
Rovnice 2 Tvorba OH radikálu



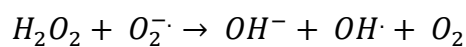
Rovnice 3 Tvorba $O_2^{\cdot-}$ radikálu



Rovnice 4 Tvorba HO_2 radikálu



Rovnice 5 Tvorba H_2O_2



Rovnice 6 Tvorba OH^- , $OH\cdot$ radikálu a kyslíku

3.2 PRAKTICKÉ VYUŽITÍ FOTOKATALÝZY

Většina studií využívá pro fotokatalýzu UV záření. Pro praktické použití této metody je důležité využít energii sluneční jako alternativu a proces fotokatalýzy se tím stane ekonomičtější. Aby bylo možné provést fotokatalýzu s využitím sluneční energie je nutné, aby měl katalyzátor přijatelnou hodnotu energie zakázaného pásu. Za účelem zjištění podmínek vhodných pro provedení fotokatalýzy ve viditelné oblasti záření byla provedena řada studií (Sontakke *et al.*, 2012).

Tabulka 2 Praktické příklady využití fotokatalýzy (Haider *et al.*, 2019)

	Využití	Konkrétní příklady
Samočistící vlastnost	Materiály pro bytové a kancelářské budovy	Vnější obklady, kuchyňské a koupelnové komponenty, interiérové vybavení, plastové povrchy, stavební kameny
	Vnitřní a venkovní lampy a související systémy	Průsvitný papír pro kryty vnitřních lamp, povlaky na zářivkách a krycí skla
	Materiály pro silnice	Stěny tunelů, stěna s izolací, dopravní značky a reflektory
	Jiné	Stanový materiál, oděvy pro nemocniční oděvy a uniformy, nátěry pro automobily
Čištění vzduchu	Čištění vzduchu ve vnitřních prostorech	domovní čističky vzduchu, klimatizační zařízení vybavené fotokatalyzátorem, vnitřní čističky vzduchu pro továrny
	Venkovní čištění vzduchu	Tunely, vzduchotěsné stěny a budovy
Dezinfekce vody	Pitná voda	Čištění říční vody, podzemní vody a vodních nádrží
	Jiná	Nádrže na krmení ryb, drenážní vodu a průmyslovou odpadní vodu
Protinádorová terapie	Léčba tumorů	Endoskopické nástroje
Samo-sterilizační	Nemocniční obklady	Pokrytí podlah a stěn operačních sálů, silikonové pryže pro lékařské katétry a nemocniční oděvy a uniformy

3.3 VLIV pH NA FOTOKATALÝZU

Ve studii (Schwegmann et al., 2013) byla testována dezinfekční schopnost fotokatalýzy na *E. coli* v roztocích o různých hodnotách pH. V první fázi této studie bylo testováno, zda k dezinfekčnímu účinku nedochází pouze v důsledku vysoké koncentrace H^+ nebo OH^- iontů. Bakterie byla vystavena dané hodnotě pH po dobu 60 minut. Po uplynutí 60 minut nebylo pozorováno žádné poškození buněk, a to ani při $pH = 3$ ani $pH=10$. K usmrcení buněk nedochází ani po 4 hodinové expozici při $pH=3$. V další fázi byly buňky podrobeny fotokatalýze s fotokatalyzátorem (TiO_2 P25) při různých hodnotách pH (4, 7, a 10). Buňky byly více poškozeny při $pH=4$ než při $pH=7$ a 10. Při hodnotě $pH=10$ byla dezinfekční schopnost fotokatalýzy nejpomalejší. Snímky z elektronového mikroskopu ukázaly, že povrch buněk bakterie byl pokryt fotokatalyzátorem ve větší míře při hodnotě $pH = 4$ oproti hodnotě $pH=10$. Výsledky tedy ukazují, že míra dezinfekce závisí na elektrostatické interakci mezi buňkami bakterie a fotokatalyzátorem a rychlejší dezinfekci při nižší pH můžeme vysvětlit na základě interakčních profilů. Oxid titaničitý přichází blíže k buňce a reakce mezi elektrony (radikály) a kontaminantem je pravděpodobnější.

Ve studii (Cho et al., 2004) skutečnost, že dochází k elektrostatickému odpuzování mezi povrchem TiO_2 a *Escherichia coli* při vysokém pH (v důsledku toho, že oba mají stejný záporný náboj), nebyla potvrzena.

3.4 VLIV INTENZITY A DRUHU ZÁŘENÍ NA FOTOKATALÝZU

Ve studii (Rincón and Pulgarin, 2003) byla sledována závislost degradace *Escherichia coli* na intenzitě světla. Bylo potvrzeno, že tato závislost není lineární a tato skutečnost byla vysvětlena tvorbou OH radikálů, které se nadměrně tvoří při zvýšené intenzitě světla a mohou se vzájemně rekombinovat.

Ve studii (Benabbou et al., 2007) byl testován vliv intenzity použitého UVA záření při fotokatalýze. Tento vliv byl testován při koncentraci 0,25 g/l TiO_2 a bylo pozorováno zvýšení účinnosti při vyšších intenzitách záření. Při snížení intenzity z 3,85 na 0,48 mW/cm^2 došlo k navýšení doby potřebné pro úplnou inaktivaci bakterie *Escherichia coli* z 90 na 180 minut. Podobného výsledku bylo dosaženo při použití koncentrace 1,5 g/l TiO_2 . Zároveň byly testovány různé typy záření. V této studii také bylo potvrzeno, že neúčinnější je UVC záření. Pro úplnou inaktivaci bakterií s počáteční koncentrací $1 \cdot 10^6$ CFU/ml bylo zapotřebí pouze

20 minut expozice UVC světla. Při UVB ozařování je zapotřebí pro stejný účinek expozice záření po dobu 60 minut, pro UVA je tato doba 90minut.

3.5 DEZINFEKČNÍ ÚČINEK PO UKONČENÍ FOTOKATALÝZY

Dezinfekční účinek po ukončení ozařování nemusí být trvalý. Existuje několik opravných mechanismů, které mohou bakterie využívat po ukončení fotokatalýzy. Po expozici záření, tedy po odstranění stresového období pro bakterie a vytvoření příznivějších podmínek, se může obnovit schopnost růstu. Tato skutečnost neplatí při vyšších intenzitách záření nebo tvrdších podmínkách dezinfekce (např. přidavek H_2O_2) (Lanao *et al.*, 2012).

Studie (Rincón and Pulgarin, 2003) popisuje účinek fotokatalýzy na bakterie *Escherichia coli* po ukončení expozice světelného záření a odstranění fotokatalyzátoru. Při této studii bylo ověřeno, že množství bakterií v průběhu fotokatalýzy výrazně klesá. Poté byl katalyzátor a světelné záření odstraněno a pozorováno množství bakterií. Po 60 minutách fotokatalýzy (při intenzitě záření 400 W/m^2) bylo sníženo množství bakterií z koncentrace $4 \cdot 10^7$ na $2 \cdot 10^7$, ale po 3 hodinách bez záření a fotokatalyzátoru se koncentrace opět zvýšila na původní hodnotu, čímž bylo potvrzeno, že bakterie bez záření dokáží překonávat stres způsobený zářením a opravnými mechanismy dochází k obnově bakterií. Pokud použijeme dlouhou dobu expozice při nižší intenzitě záření nebo vyšší intenzitu záření (např. 1000 W/m^2) dochází k nevratným změnám a k opravným mechanismům nedochází.

3.6 POLOVODIČE VYUŽÍVANÉ PRO FOTOKATALÝZU

Mezi fotokatalytické polovodiče řadíme oxidy kovů, jako např. oxidy vanadu, chromu, titanu (oxid titaničitý), zinku (oxid zinečnatý), cínu, železa. Významné vlastnosti polovodičů, které je nutno sledovat jsou vysoká hodnota specifického povrchu, vhodná morfologie, stabilita v různých podmínkách, biokompatibilita, možnost opětovného použití a v neposlední řadě také schopnost vytvářet nosiče náboje, pokud jsou fotokatalyzátory stimulovány požadovaným množstvím energie. Katalyzátor je možné použít ve formě suspenze nebo ho můžeme imobilizovat do tenké vrstvy. Pokud použijeme katalyzátor ve formě suspenze je nutné po proběhnutí reakce katalyzátor odfiltrovat. Při využití katalyzátoru ve formě filmu tato povinnost odpadá a snížíme tím finanční náklady a dojde také k úspoře času (Dalrymple *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2015; Rodgher *et al.*, 2014).

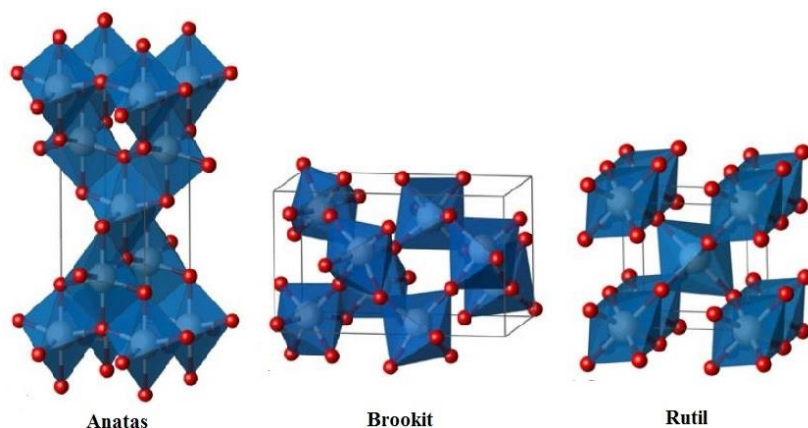
3.6.1 Oxid titaničitý

Oxid titaničitý (TiO_2) je přirozeně se vyskytující oxid titanu a byl objeven v roce 1995. Jeho komerční výroba začala ve dvacátých letech 20. století. Asi 95 % titanové rudy se zpracovává na oxid titaničitý, který je nejpoužívanějším titanovým produktem (Rahimi *et al.*, 2016).

Pro oxid titaničitý, který využíváme jako pigment, se vžil výraz titanová běloba. Ta našla využití v mnoha oblastech, používá se např. do opalovacích krémů, zubních past, cukrovinek a jiných potravin, léků, do barev a laků, k barvení papírů a plastů a dalších (Sudha and Sivakumar, 2015).

Oxid titaničitý má řadu pozitivních vlastností, mezi které patří nízká cena, chemická stabilita, absence toxicity a dlouhá živostnost (Nakata and Fujishima, 2012).

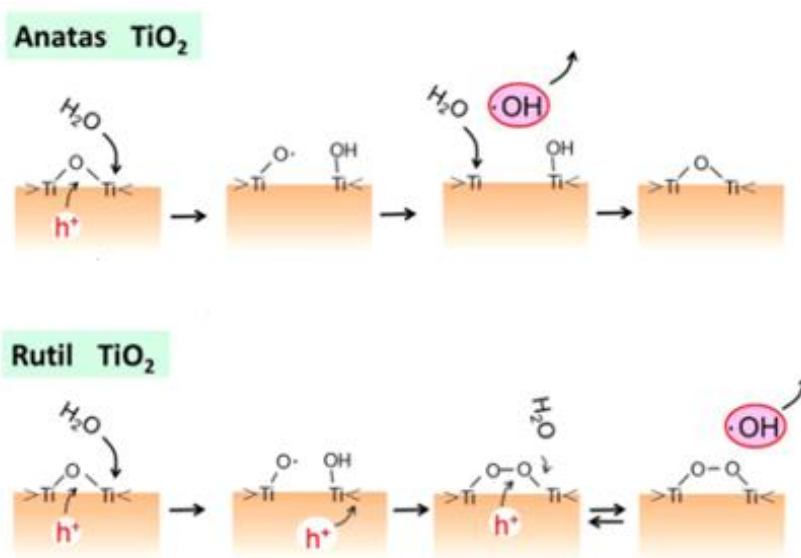
Oxid titaničitý je nejpoužívanější polovodič pro fotokatalýzu vyskytující se ve 3 modifikacích, které nazýváme anatas, rutil a brookit (znázornění struktur na obrázku 10). V přírodě se objevuje ve dvou tetragonálních formách, které nazýváme rutil a anatas. Pro fotokatalýzu využíváme nejčastěji anatas (Wold, 1993).



Obrázek 10 Struktury oxidu titaničitého (červeně vyznačen titan, modře kyslík) (převzato a upraveno: Landmann *et al.*, 2012)

Rutil má vzhledem k anatasu kompaktnější strukturu, a to způsobuje významné rozdíly ve fyzikálních vlastnostech. Rutil má vyšší index lomu, vyšší hustota a větší chemickou stabilitu než anatas. Rutil taje při 1825 °C, zatímco anatas se nevratně transformuje na rutil při teplotách začínajících na 500 °C. Brookit je nejvzácnější forma oxidu a je obtížné jej vyrábět v čisté podobě. Brookit má stejnou barvu a lesk jako rutil i jeho tvrdost a hustota jsou téměř stejné (Rahimi *et al.*, 2016).

Testována byla také tvorba radikálů v jednotlivých formách oxidu. Bylo zjištěno, že rutil produkuje menší množství OH radikálů ve srovnání s katalyzátorem anatasového typu. Princip vzniku radikálů je na obrázku 11 (Zhang and Nosaka, 2014).

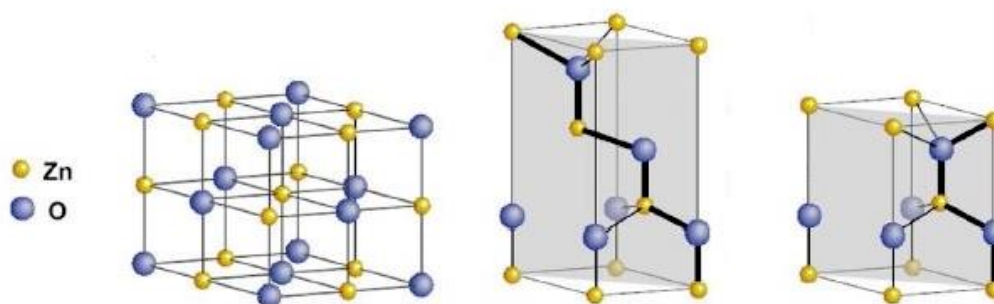


Obrázek 11 Rozdílná tvorba OH radikálů v případě anatasu a rutilu (Zhang and Nosaka, 2014)

Katalytická aktivita oxidu titaničitého pochází z jeho elektronové struktury a fotoelektrických vlastností. Při této aktivitě sledujeme energetický rozdíl mezi dvěma pásmy, konkrétně tedy mezi valenčním a vodivostním, kterému říkáme energetická mezera pásu, tato mezera odpovídá 3,2 eV u anatasu a 3,0 eV u rutilu (Aziz *et al.*, 2016; Dalrymple *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2017).

3.6.2 Oxid zinečnatý

Oxid zinečnatý je perspektivní materiál, který má řadu využití, jako jsou solární články, plynové senzory a v neposlední řadě i fotokatalýza. Široké využití tohoto fotokatalyzátoru vychází ze specifických vlastností, mezi které patří přijatelná zakázaného pásu (3,37 eV), jeho zdravotní nezávadnost, chemická stabilita (Di Mauro *et al.*, 2016). Mezi další pozitivní vlastnost tohoto katalyzátoru řadíme nízké výrobní náklady (o 75 % nižší než u TiO₂) a schopnost absorbovat větší podíl slunečního spektra opět ve srovnání s TiO₂. Oxid zinečnatý se může vyskytovat ve třech formách, které jsou na obrázku 12. Oxid zinečnatý je zpravidla typ polovodiče N s přítomností vnitřních defektů, které ovlivní jeho optické vlastnosti a elektrické vlastnosti. Čím více kyslíkových defektů polovodič má, tím více vzniká nosičů náboje (Ong *et al.*, 2018).



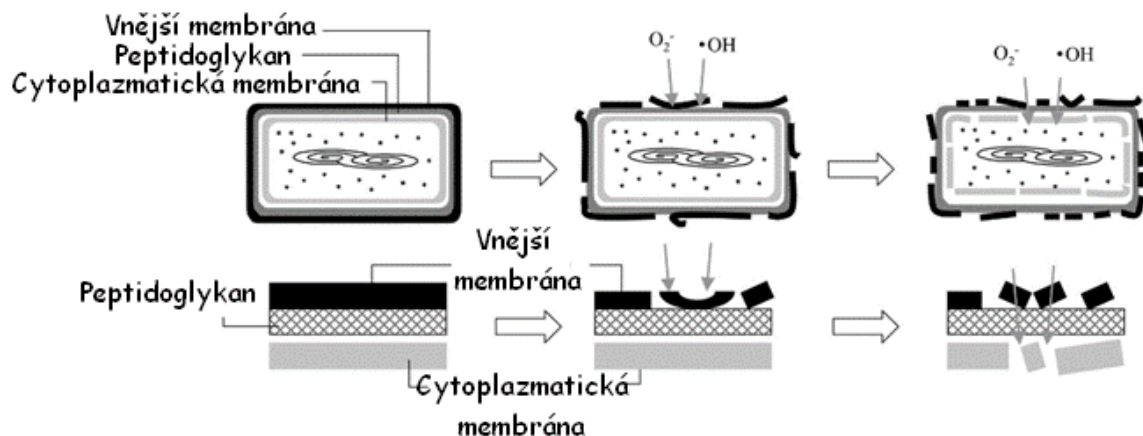
Obrázek 12 Struktury oxidu zinečnatého (převzato a upraveno: Ong *et al.*, 2018)

3.7 DEZINFEKČNÍ ÚČINKY FOTOKALÝZY

Dezinfekční účinky fotokatalýzy (obrázek 13) jsou známy již od roku 1985, kdy byly bakterie (*Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Escherichia coli*) inkubovány s částicemi oxidu titaničitého a platiny a ozářeny halogenidovými zářivkami po dobu 60-120 minut. Při tomto procesu je koenzym A v buňkách oxidován, čímž je inhibována buněčná respirace, což vede k úmrtí buňky (Matsunaga *et al.*, 1985).

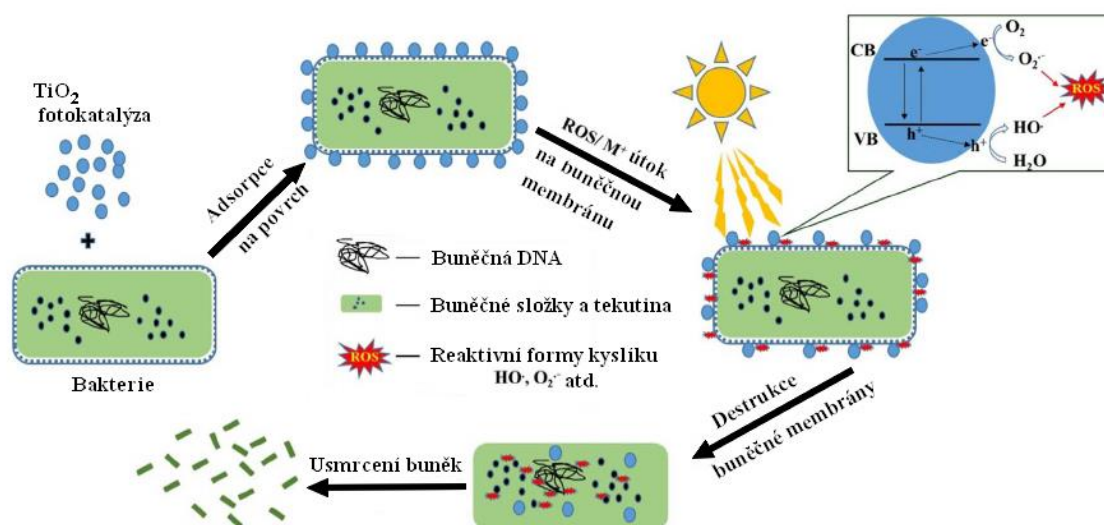
Dnes již víme, že fotokatalyticky je možno zneškodnit širokou škálu gram-negativních i gram-pozitivních bakterií včetně endospor, hub, řas, prvoků a virů. Také je možné fotokatalýzou ničit mikrobiální toxiny a priony, které jsou odolné proti běžným dezinfekčním účinkům (Paspaltsis *et al.*, 2006). Tohoto efektu fotokatalýzy můžeme využít např. k přípravě tzv. samo-sterilizačních desek. Tuto samo-sterilizační schopnost můžeme otestovat typickým experimentem, který provádíme na skleněné desce potažené oxidem titaničitým. Na tuto desku rozetřeme 150µl suspenze bakterie *Escherichia coli*, která obsahuje přibližně 3000 buněk. Desku poté ozařujeme UV světlem. Po jedné hodině dojde k usmrcení 100 % bakterií. Pokud nepoužijeme vrstvu oxidu titaničitého a desku tedy pouze ozařujeme UV světlem, dojde po 4 hodinách k usmrcení pouze 50 % původních bakterií (Fujishima *et al.*, 2010)

Mechanismus účinku byl sledován při ozařování bakterie *Escherichia coli* na tenké vrstvě oxidu titaničitého. Bylo prokázáno, že baktericidní působení fotokatalýzy na bakterie s buněčnou stěnou probíhá ve dvou krocích. V případě ozařování sféroplasty, tedy bakteriální buňky bez buněčné stěny, byla reakce výrazně rychlejší, než v případě kompletní buňky. Tím bylo zjištěno, že nejprve musí dojít k narušení buněčné stěny a teprve poté dochází k rozrušení složek buňky. Narušení buněčné membrány je obecně řazeno mezi nedůležitější mechanismy inaktivace bakterií fotokatalýzou. Naproti tomu peptidoglykan obsažený v buňkách nemá žádnou bariérovou funkci a během ozařování se nijak nemění. Celý proces je vyobrazen na obrázku 14 (Dalrymple *et al.*, 2010; Sunada *et al.*, 2003).



Obrázek 13 Dezinfekční účinky fotokatalýzy (převzato a upraveno: Sunada et al., 2003)

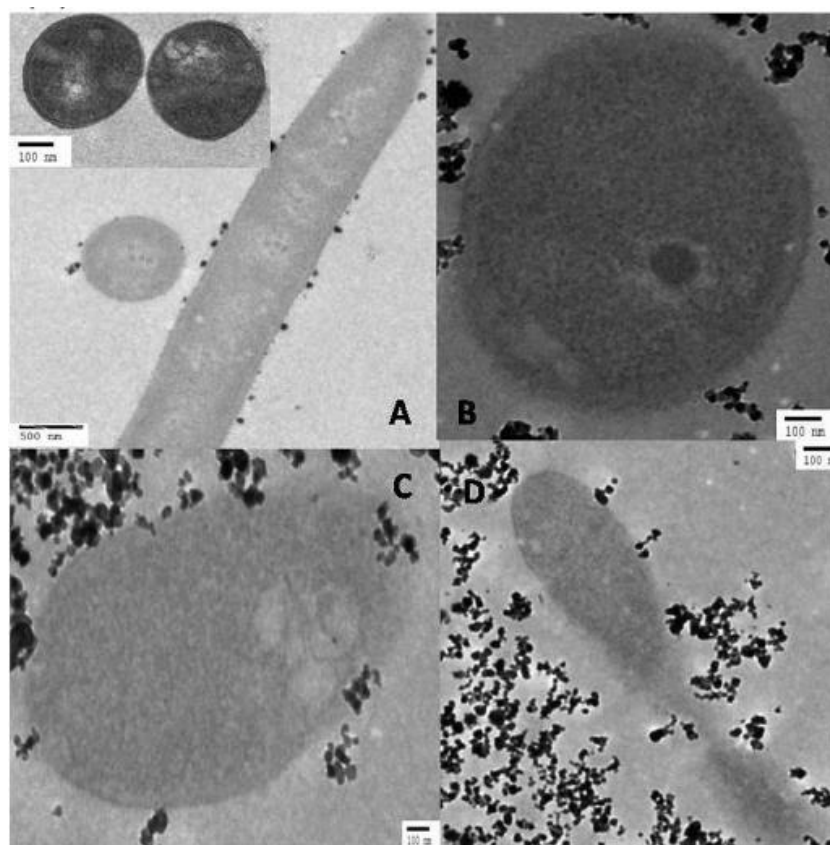
Oxid titaničitý může vážně poškodit i aminokyseliny nebo DNA, nicméně mnohé z těchto molekul jsou příliš složité a mají různou chemickou a fyzikální odolnost. Pro příklad je možné uvést třídy fosfolipidů, které existují v mnoha druzích a variantách. Nejsou tedy důležité vlastnosti těchto složek, ale i strukturní uspořádání (lipidové dvojvrstvy, zesíťované peptidové řetězce), které poskytuje větší odolnost vůči inaktivaci fotokatalýzou. Pokud však probíhá fotokatalýza po dostatečně dlouhou dobu, dojde k oxidaci většiny organického materiálu, který tvoří až 96 % hmotnosti sušiny (proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny, lipopolysacharidy) (Dalrymple et al., 2010).



Obrázek 14 Vliv fotokatalýzy na bakterie (převzato a upraveno: Reddy 2017)

3.7.1 Dezinfekční účinky fotokatalýzy na *Pseudomonas fluorescens*

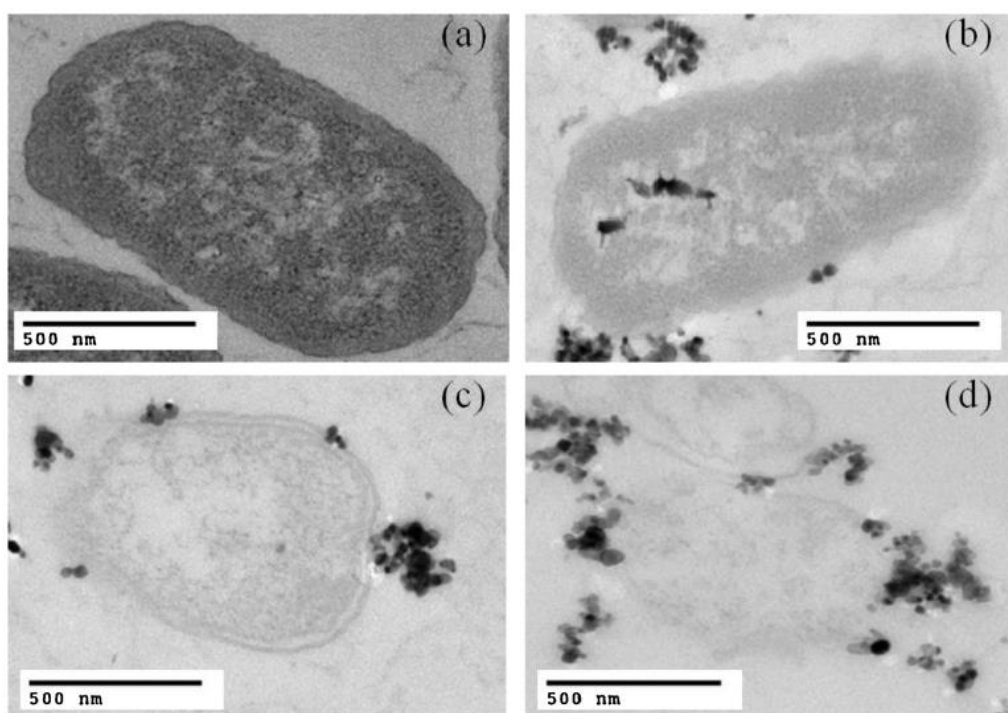
Studie (Wang *et al.*, 2014) popisuje fotokatalýzu bakterie *Pseudomonas fluorescens* v přítomnosti nanočástic TiO_2 . Kontrolní buňky bakterie *Pseudomonas fluorescens* (obrázek 15–A) mají povrch buňky hladký a buněčné membrány a vnější buněčné stěny jsou snadno identifikovatelné. Po provedení fotokatalýzy po dobu 30 minut (obrázek 15–B) zůstávají bakteriální buňky nedotčeny a lipidová dvojvrstva je stále viditelná. Černé tečky na obrázku jsou částice TiO_2 . Po 90 minutách procesu (obrázek 15–C) ztrácí buňka integritu vnější buněčné stěny. Hranice buněčných membrán se stává nejasnou. Bílé místa na buňce pravděpodobně značí otvory na povrchu buněk. Po 150 minutách (obrázek 15–D) expozice bakteriální buňky ztrácí svoji vnější hranici a také části cytoplazmy.



Obrázek 15 Snímek z transmisního elektronového mikroskopu bakterie *Pseudomonas fluorescens* (převzato: Wang *et al.*, 2014)

3.7.2 Dezinfekční účinky fotokatalýzy na *Escherichia coli*

Ve studii Gao *et al.*, 2016, byla zkoumána účinnost fotokatalýzy pro dezinfekci bakterie *Escherichia coli* (obrázek 16). Před fotokatalytickou expozicí (obrázek 16 – a) je jasně viditelná morfologie buňky a hladká a celistvá buněčná stěna a membrána. Po hodině expozice záření (obrázek 16 – b) jsou na bakterii vidět morfologické změny v cytoplazmě buňky i na její buněčné membráně. Po 3 hodinách expozice záření (obrázek 16 – c) je již viditelná zvlněná buněčná membrána a ztráta téměř veškerého intracelulárního obsahu buňky. Obrázek 16 – d znázorňuje aplikaci záření po dobu 6 hodin. Bakteriální stěna je úplně poškozena a intracelulární obsah buňky je uvolněn.



Obrázek 16 Snímky z transmisního elektronového mikroskopu bakterie *Escherichia coli* (Gao *et al.*, 2016)

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na fotokatalýzu a její využití ke snižování mikrobiálního znečištění ve vodách. Dále také provést laboratorní testy zaměřené na optimalizaci podmínek heterogenní fotokatalýzy při odstraňování *E. coli* z vodného prostředí. Tyto experimentální výsledky vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL

5.1 Mikroorganismy

Testování fotokatalytických dezinfekčních účinků bez a s přidavkem peroxidu vodíku jsem provedla na bakterii *Escherichia coli* CCM 3954 z České sbírky mikroorganismů, Brno. Dále byla testována také *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115, taktéž z České sbírky mikroorganismů, Brno. Tyto kmeny byly dlouhodobě uchovávány v mrazícím boxu při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v kryozkumavce.

5.2 Přístroje

- Autokláv (systém VX-40)
- Denzitometr (Den – 1, Biosan)
- Fotokatalytické zařízení
 - Skleněná kádinka (600ml) s měřeným roztokem (300ml)
 - Magnetické míchadlo (IKA colorsquid)
 - Zdroj záření (UV-LED lampa CBM-120-UV-C14-FB365-21, Luminus)
(Obrázek 17). Základní parametry dodané výrobcem:
 - Provozní proud (9 A)
 - Tok záření (6,8 W)
 - UV zdroj (12 x LED s životností 8000 hodin)
 - Vlnová délka záření (365 nm)
 - Vložené napětí (3,6 V)
- Horkovzdušný sterilizátor (Memmert)
- Chladnička (Gorenje, Electrolux)
- Předvážky (Kern 440-49N)

5.3 Laboratorní pomůcky

- Automatické pipety (různé objemy)
- Erlenmayerovy baňky (500ml)
- Lžičky
- Odměrná baňka (600ml)
- Plastové Petriho misky
- Plastové zkumavky (18 ml a 50ml)
- Skleněná tyčinka (hokejka)
- Špičky
- Váženky

5.4 Chemikálie a reagenty

Tabulka 3 Seznam chemikálií

Název	Vzorec	Výrobce
Demineralizovaná voda	H ₂ O	UPa
Peroxid vodíku 30 % p. a.	H ₂ O ₂	Lach-Ner
Chlorid sodný p.a.	NaOH	Lach-Ner
Aeroxide TiO ₂ P25	TiO ₂	Evonik industries
TiO ₂ AV01	TiO ₂	Precheza Přešov

5.5 Kultivační média a roztoky

5.5.1 MPA – Masopeptonový agar (HiMedia, Indie)

Pro kultivaci bakterií *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens* na Petriho miskách jsem použila MPA. Složení je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Složení MPA

Složení	g/l
Masový pepton	10
Hovězí extrakt	10
Chlorid sodný	5
Agar	15

Příprava agaru: Podle pokynů výrobce jsem navázila 40 g směsi a rozmíchala ji v 1 l destilované vody. Směs jsem následně sterilizovala v autoklávu, a to při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a vychladnutí jsem směs rozlévala do sterilních plastových Petriho misek. Vychladlé misky na laboratorní teplotu jsem uložila do lednice, kde jsme je skladovala při 5 °C.

5.5.2 MPB – Masopeptonový bujón (HiMedia, Indie)

MPB agar jsem použila pro pomnožení bakterií. Složení MPB je v tabulce 5.

Tabulka 5 Složení MPB

Složení	g/l
Masový extrakt (sušina)	10
Pepton pro bakteriologii	10
Chlorid sodný	5

Příprava bujónu: Podle pokynů výrobce jsem navázila 25 g směsi pro přípravu MPB do sterilní nádoby a rozmíchala v 1 l destilované vody. Směs jsem sterilizovala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a vychladnutí jsem nechala roztok vychladnout a skladovala v chladničce při teplotě 5 °C.

5.5.3 Fyziologický roztok

Příprava fyziologického roztoku: Fyziologický roztok jsem připravovala rozpuštěním 9 g chloridu sodného ve vhodné nádobě v 1 l destilované vody. Takto připravený roztok jsem následně sterilizovala v autoklávu, a to při 121 °C po dobu 15 minut.

5.5.4 Bakteriální kultury

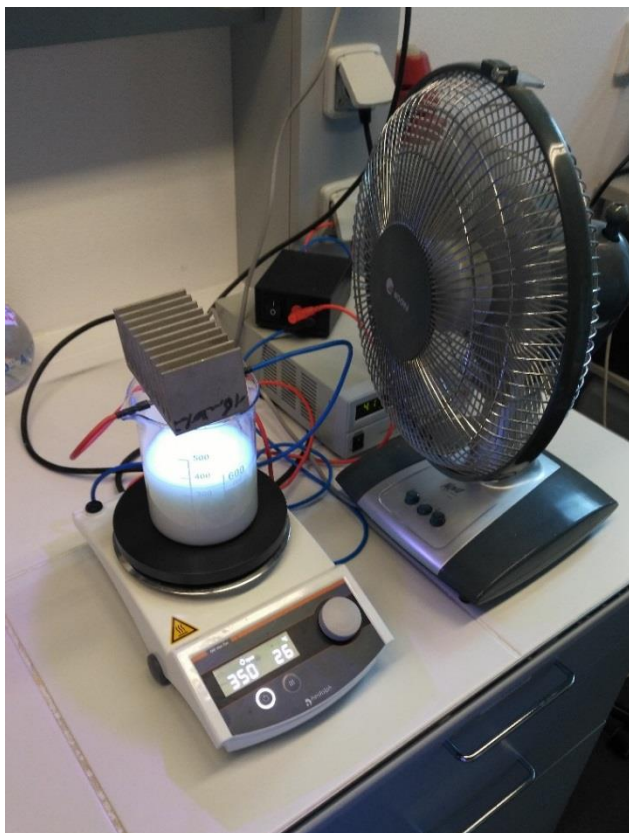
Příprava bakteriální kultury: Bakteriální kulturu jsem připravila pomocí dlouhodobě skladované kryozkumavky. Kulturu jsem rozmíchala v roztoku připraveném z MPB a sterilní destilované vody v poměru 1:1. Takto připravený roztok jsem inkubovala při 30 °C po dobu 48 hodin, aby se vytvořil potřebný zákal po analýzu.

6 PRACOVNÍ POSTUP

6.1 Postup odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy

Do skleněné sterilní kádinky o objemu 600 ml jsem připravila 300 ml roztoku bakteriální kultury (*Escherichia coli* nebo *Pseudomonas fluorescens*) o zákalu 0,5 McFarland. Tento roztok jsem připravila naředěním předem připraveného MPB média, ve kterém se kultivovala bakterie po dobu 48 h při 30 °C, sterilní destilovanou vodou. Z toho roztoku jsem odebrala 1 ml, který byl zpracován dle kapitoly 6.4.

Do kádinky jsem přidala potřebné množství (0,5 g/l, 1 g/l nebo 3 g/l) oxidu titaničitého P25 popř. AV01. Do kádinky jsem také vložila míchadlo a umístila ji na magnetické míchadlo pod UV lampu, kterou jsem zapnula (celé fotokatalytické zařízení je na obrázku 17). První vzorek jsem odebrala při 5 minutách experimentu, druhý jsem odebrala po 15 minutách od začátku experimentu a následně každých 15 minut jsem odebrala vzorek až do konečného času 120 minut. Odebraný vzorek jsem za účelem stanovení počtu mikroorganismů zpracovala stejným způsobem jako původní roztok.



Obrázek 17 Fotokatalytické zařízení (autor)

6.2 Postup odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy a přídavku H₂O₂

Do sterilní kádinky o objemu 600 ml jsem připravila 300 ml roztoku bakteriální kultury (*Escherichia coli* nebo *Pseudomonas fluorescens*) o zákalu 0,5 McFarland. Tento roztok jsem připravila naředěním, předem připraveného MPB média, ve kterém se bakterie kultivovaly bakterie po dobu 48 h při 30 °C, sterilní destilovanou vodou. Z toho roztoku jsem odebrala 1 ml, který byl zpracován dle kapitoly 6.4.

Do kádinky jsem přidala potřebné množství (0,5 g/l, 1 g/l nebo 3 g/l) oxidu titaničitého P25 popř. AV01 a potřebné množství peroxidu vodíku (0,5 ml nebo 1ml). Do kádinky jsem vložila míchadlo a umístila ji na magnetické míchadlo pod UV lampu, kterou jsem zapnula. První vzorek jsem odebrala při 5 minutách experimentu, druhý jsem odebrala po 15 minutách od začátku experimentu a následně každých 15 minut jsem odebrala vzorek až do konečného času 45 popř. 60 minut. Každý odebraný vzorek jsem zpracovala stejným způsobem jako původní, nultý, vzorek.

6.3 Postup odstraňování bakterií pomocí H₂O₂

Dezinfekční účinek peroxidu vodíku na bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* jsem měřila pomocí záznamníku růstu. Zkumavku o objemu 30 ml jsem nejprve naplnila na laboratorní teplotu vytemperovaným roztokem MPB. Tuto zkumavku jsem vložila do záznamníku růstu a proměřila ho jako tzv. slepý vzorek. Pak jsem si připravila roztok bakteriální kultury (*Escherichia coli* nebo *Pseudomonas fluorescens*) o zákalu 0,5. Tento roztok jsem připravila naředěním, předem připraveného MPB média, ve kterém se kultivovala bakterie po dobu 48 h při 30 °C, sterilní destilovanou vodou. Z takto připraveného roztoku jsem odebrala 30 ml do sterilní plastové zkumavky (50 ml). Zkumavku jsem umístila do záznamníku růstu. V programu jsem nastavila požadované hodnoty a záznamník spustila.

6.4 Nepřímé stanovení počtu buněk - Plotnová metoda

Do sterilních plastových zkumavek jsem napipetovala 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Do tohoto roztoku jsem napipetovala 1 ml z 300 ml roztoku připraveného pro fotokatalýzu (*Escherichia coli* nebo *Pseudomonas fluorescens* o zákalu 0,5 McFarland) popř. ze vzorku odebraného během fotokatalýzy. Obsah zkumavky jsem důkladně promíchala a opět odebrala 1 ml a ten přenesla do další zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Takto jsem pokračovala až do požadovaného ředění, tedy 10^8 CFU.

Petriho misky s MPA vytemperované na laboratorní teplotu jsem důkladně popsala, aby nedošlo k jejich záměně. Na tyto misky jsem napipetovala 100 μ l roztoku ze zkumavek s požadovaným ředěním a pečlivě jsem roztok rozetřela po celé misce sterilní skleněnou hokejkou. Při očkování jsem měla zapnutý kahan a víčko misky jsem přidržovala těsně nad miskou, aby co nejméně docházelo ke kontaminaci. Misky jsem otočila, uložila do termostatu a při 30 °C je nechala kultivovat 48 hodin. Po 24 hodin jsem misky zkontrolovala. Spočítala jsem množství kolonií a misky s nárůstem do 300 kolonií nechala kultivovat do dalšího dne a zaznamenala výsledky. Po 48 hodinách jsem misky opět zkontrolovala a zaznamenala konečný počet kolonií. Pro misky s nárůstem od 30 do 300 kolonií bakterií *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas fluorescens* jsem provedla výpočet podle vzorce pro výpočet hodnoty CFU. Výsledkem tohoto výpočtu je hodnota CFU/ml, tedy počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii a zároveň buněk v 1 ml.

Vzorec pro výpočet hodnoty CFU:

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

Rovnice 7 Výpočet hodnoty CFU

N CFU = počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii

$\sum c$ součet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách

n_1 počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění

- n_2 počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění
- d faktor pro výpočet prvního použitého ředění
- V objem inokula očkovaného na každou z ploten

7 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

7.1 Odstraňování bakterie *Escherichia coli* pomocí fotokatalýzy

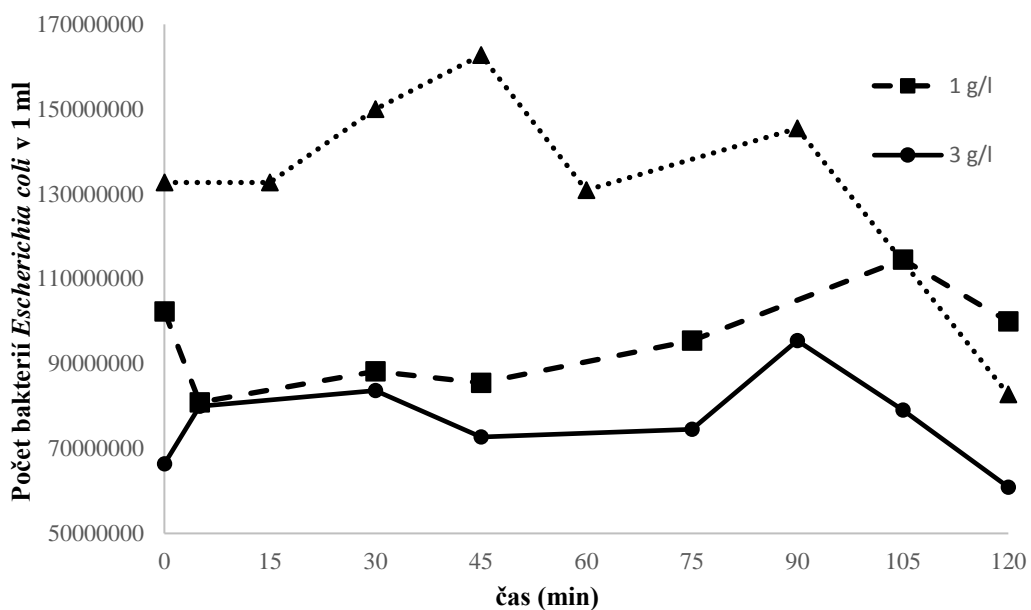
Při experimentech zaměřených na odstraňování bakterie *Escherichia coli* pouze pomocí fotokatalýzy za přítomnosti fotokatalyzátoru TiO_2 jsem sledovala pokles bakterií v čase. Pro stanovení počtu bakterií jsem použila nepřímé stanovení plotnovou metodou. Při tomto experimentu byly použity dva typy katalyzátoru TiO_2 , konkrétně AV01 a P25 a jejich různé koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l).

Fotokatalýza s katalyzátorem TiO_2 P25

Jak je patrné z grafu 1, který znázorňuje závislost počtu bakterií *Escherichia coli* v 1 ml na čase, jako neúčinnější je možné považovat použití 0,5 g/l katalyzátoru TiO_2 P25. Při této koncentraci fotokatalyzátoru došlo při prvních 5 minutách k poklesu počtu bakterií o 20,89 %, ale poté dochází opět k nárůstu bakterií, stejně jako při koncentraci 3 g/l.

Na konci experimentu, tedy po 120 minutách, dochází k nejlepšímu dezinfekčnímu účinku při použití 0,5 g/l, při kterém dochází k poklesu o 37,67 % oproti původnímu množství bakterií v čase 0. Při použití 1 g/l dochází k poklesu o 2,22 % a při použití 3 g/l k poklesu o 8,22 % vzhledem k původnímu množství bakterií v čase 0.

Z výsledků je patrná velice nízká účinnost fotokatalytického účinku, hodnoty však mohou být zkresleny metodou nepřímého stanovení počtu buněk Plotnovou metodou, případně sekundární kontaminací misek při stanovení.

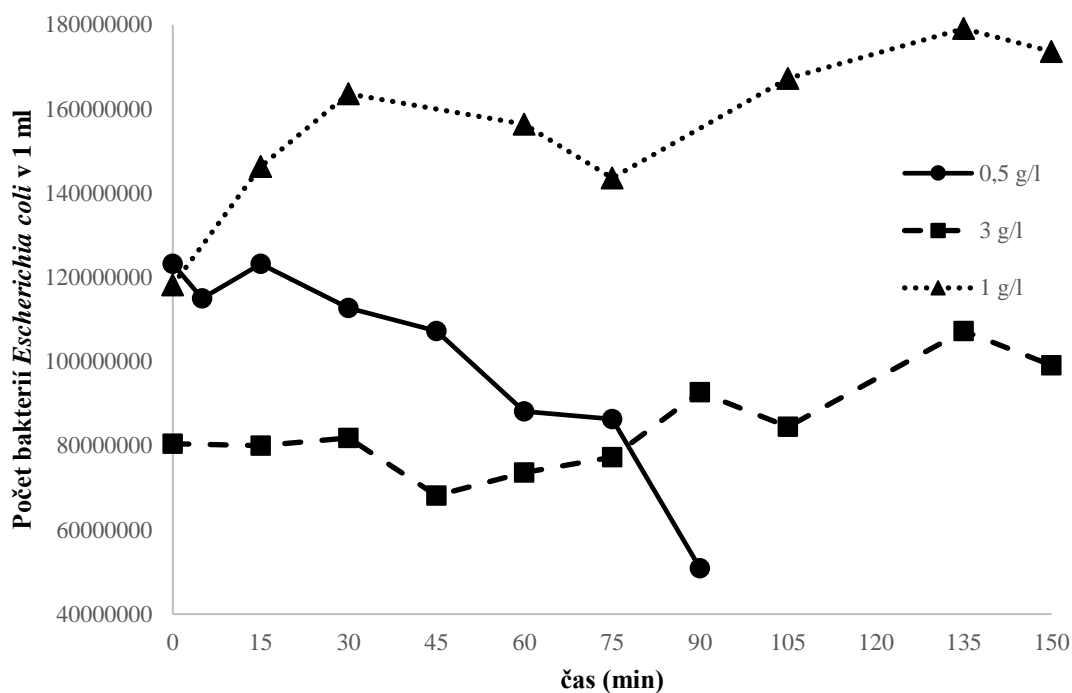


Graf 1 Závislost počtu bakterií *Escherichia coli* na čase (TiO_2 P25)

Fotokatalýza s katalyzátorem TiO_2 AV01

Jak je patrné z grafu 2, který znázorňuje závislost počtu bakterií *Escherichia coli* v 1 ml na čase, při použití fotokatalyzátoru TiO_2 AV01 dochází k největší dezinfekční účinnosti při použití 0,5 g/l katalyzátoru. Po uplynutí 90 minut dochází k usmrcení 58,67 % bakterií oproti původnímu množství. Naopak jako nejméně účinné je použití 1 g/l katalyzátoru. Při tomto množství dochází k velkému nárůstu oproti původnímu množství bakterií, stejně tak u 3 g/l byl sledován nárůst bakterií během 150 minut experimentu.

Obdobně jako u experimentů s předešlým typem katalyzátoru je pravděpodobně nízká míra účinnosti (někdy dokonce nárůst počtu mikroorganismů) způsobena stanovení počtu buněk Plotnovou metodou a kontaminací odebraných a vyočkovaných vzorků na Petriho miskách.



Graf 2 Závislost počtu bakterií *Escherichia coli* v 1 ml na čase (TiO_2 AV01)

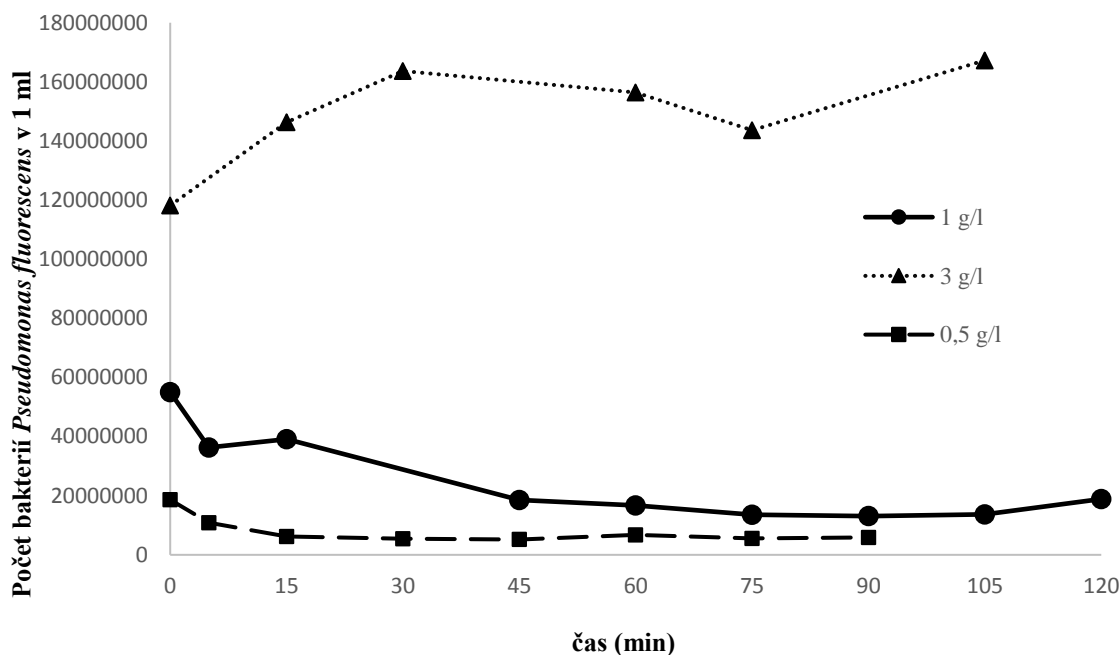
7.2 Odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens* pomocí fotokatalýzy

Při experimentech zaměřených na odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens* pouze pomocí fotokatalýzy za přítomnosti fotokatalyzátoru TiO_2 jsem sledovala pokles bakterií v čase. Pro stanovení počtu bakterií jsem použila nepřímé stanové plotnovou metodou. Při tomto experimentu byly použity různé typy katalyzátoru TiO_2 , konkrétně AV01 a P25 a jejich různé koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l).

Fotokatalýza s katalyzátorem TiO_2 P25

Jak je patrné z grafu 3, který znázorňuje závislost bakterie *Pseudomonas fluorescens* v 1 ml na čase, nejlepšího dezinfekčního účinku jsem dosáhla při použití 0,5 g/l fotokatalyzátoru TiO_2 P25. Při této koncentraci dochází po 5 minutách k úbytku bakterií o 41,46 % a po 90 minutách experimentu došlo k úbytku 68,29 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií. Při použití 1 g/l fotokatalyzátoru se po 5 minutách snížil počet bakterií o 33,88 %, po 120 minutách byl úbytek o 65,62 % vzhledem k původnímu množství bakterií. Při použití 3 g/l došlo během experimentu k nárůstu počtu původního množství bakterií o 41,54 %.

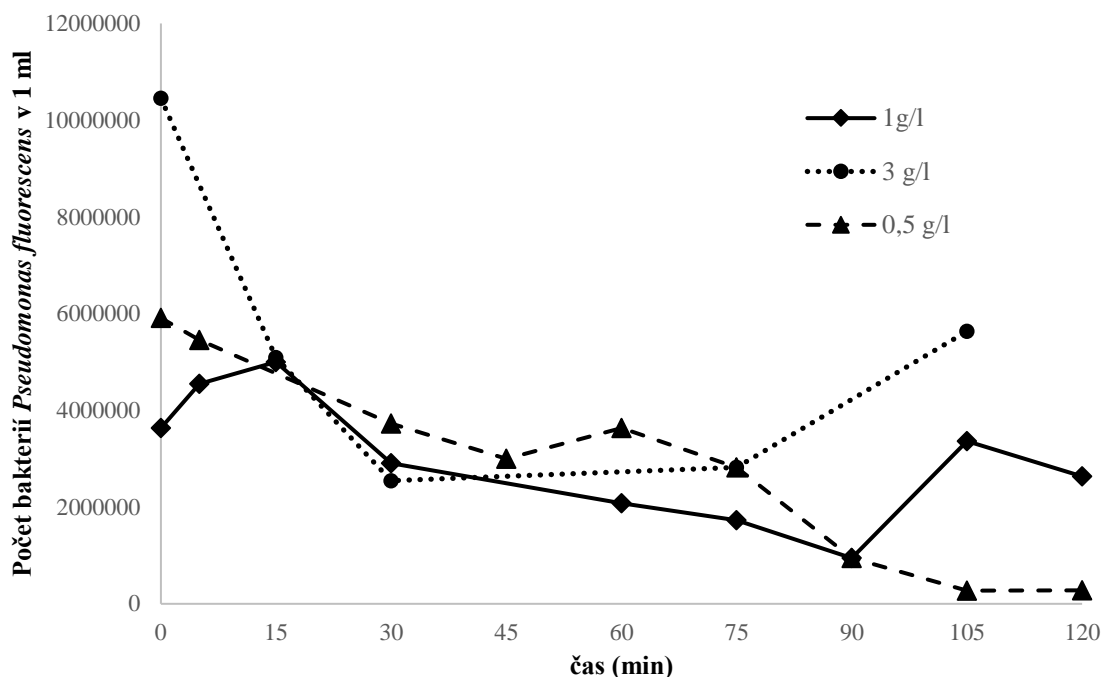
Obecně lze nižší účinnost fotokatalýzy při takto vysoké koncentraci katalyzátoru zdůvodnit tím, že částice tvoří shluky a agregáty, které pak vykazují menší fotokatalytickou aktivitu než rozptýlené částice u nižších koncentrací fotokatalyzátoru. Dalším faktorem, který opět ovlivnil výsledky fotokatalýzy je stanovení počtu mikroorganismů a problém s kontaminací vzorků.



Graf 3 Závislost počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* v 1 ml na čase (TiO_2 P25)

Fotokatalýza s katalyzátorem TiO_2 AV01

Z grafu 4, který zobrazuje závislost počtu bakterií *Escherichia coli* v 1 ml na čase, jsem vyhodnotila jako nejúčinnější použití 0,5 g/l fotokatalyzátoru TiO_2 AV01. Při této koncentraci dochází po 5 minutách k úbytku 7,69 % bakterií. Po 120 minutách dochází k úbytku 95,23 % vzhledem k původnímu množství bakterií. Při použití 3 g/l dochází k úbytku o 51,30 % bakterií po 5 minutách, ale po 105 minutách je úbytek pouze 46,08 % bakterií vzhledem k původnímu množství. Při použití 1 g/l dochází k poklesu pouze o 27,5 % po 120 minutách experimentu. Výsledky potvrzují předpoklad snížení účinnosti fotokatalýzy při vysoké koncentraci TiO_2 , opět je účinnost pro koncentraci 3 g/l nejnižší.



Graf 4 Závislost počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* v 1 ml na čase ($\text{TiO}_2\text{AV01}$)

7.3 Odstraňování bakterie *Escherichia coli* kombinací fotokatalýzy s TiO_2 a přidavku H_2O_2

Při experimentech odstraňování bakterie *Escherichia coli* pomocí fotokatalýzy s TiO_2 a přidavkem peroxidu vodíku jsem sledovala pokles bakterií v čase. Pro stanovení počtu bakterií jsem použila nepřímé stanovení plotnovou metodou. Při tomto experimentu jsem použila různé koncentrace fotokatalyzátoru (0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l) a různé objemy peroxidu vodíku (0,5 ml a 1 ml). Počáteční zákal jsem zvolila 0,5 McFarland. Původní zákal roztoku neodpovídá stejným koncentracím, pravděpodobně kombinací nepřesného měření zákalu a odlišného stáří jednotlivých médií s namnoženou kulturou. Experimenty jsem prováděla při použití 0,5 ml peroxidu 60 minut a při použití 1 ml peroxidu 45 minut.

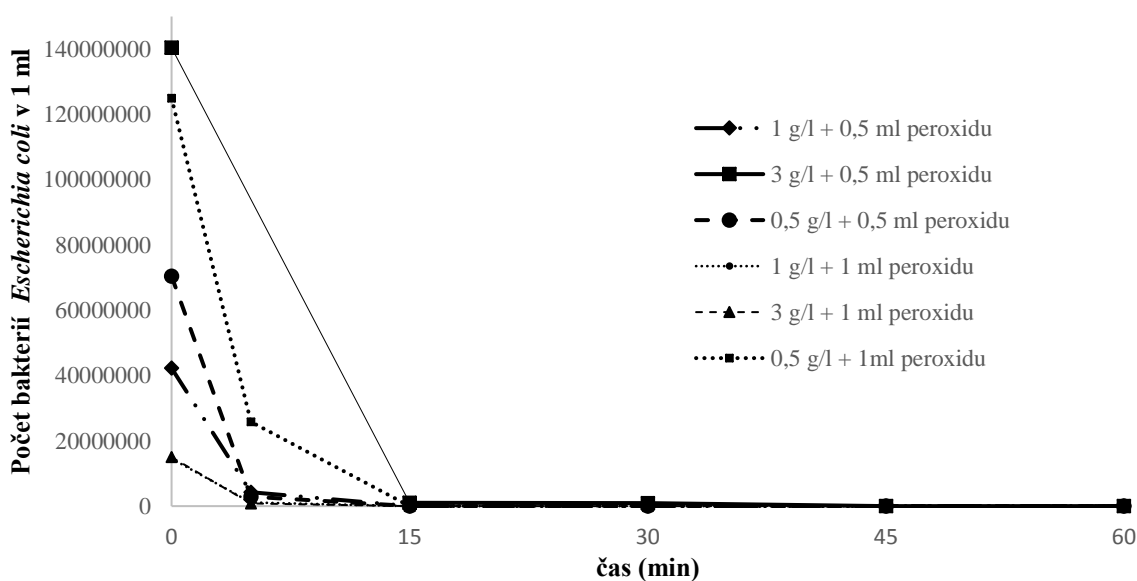
Fotokatalýza s katalyzátorem TiO_2 P25

Z grafu 5 jsem vyhodnotila, že při použití 1 ml (což odpovídá koncentraci 3,33 ml H_2O_2 na 1 l roztoku) peroxidu je fotokatalýza po 5 minutách nejúčinnější pro koncentraci 3 g/l TiO_2 P25, kdy došlo k usmrcení 94,79 % bakterií. Naopak nejméně účinná bylo použití 0,5 g/l TiO_2 P25, kdy došlo po 5 minutách k usmrcení 79,35 % bakterií. Ke 100 % usmrcení bakterií

došlo ve všech případech již po 15 minutách trvání experimentu. Při použití 1 g/l TiO_2 P25 dochází po 5 minutách k úbytku 43,20 % bakterií a po 30 minutách 74,16 % bakterií vzhledem k původní hodnotě.

Při použití 0,5 ml peroxidu (což odpovídá koncentraci 1,66 ml H_2O_2 na 1 l roztoku) byla fotokatalýza nejúčinnější po 5 minutách trvání experimentu s použitím 0,5 g/l fotokatalyzátoru, kdy došlo k usmrcení 95,87 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií. Při této koncentraci fotokatalyzátoru došlo ke 100% usmrcení všech bakterií již při 30 minutách. Při použití 1 g/l bylo usmrceno po 5 minutách pouze 89,89 % bakterií a ke 100% usmrcení došlo až po 60 minutách. Při použití 3 g/l nebyla hodnota po 5 minutách, kvůli kontaminaci, zjištěna a k 100% usmrcení bakterií nedošlo ani po 60 minutách experimentu.

V porovnání s experimenty bez použití peroxidu vodíku je zřejmé, že kombinace fotolýzy a silného oxidovadla je daleko účinnější. Také se zde neprojevil tak významný vliv postupu stanovení počtu buněk a kontaminace.



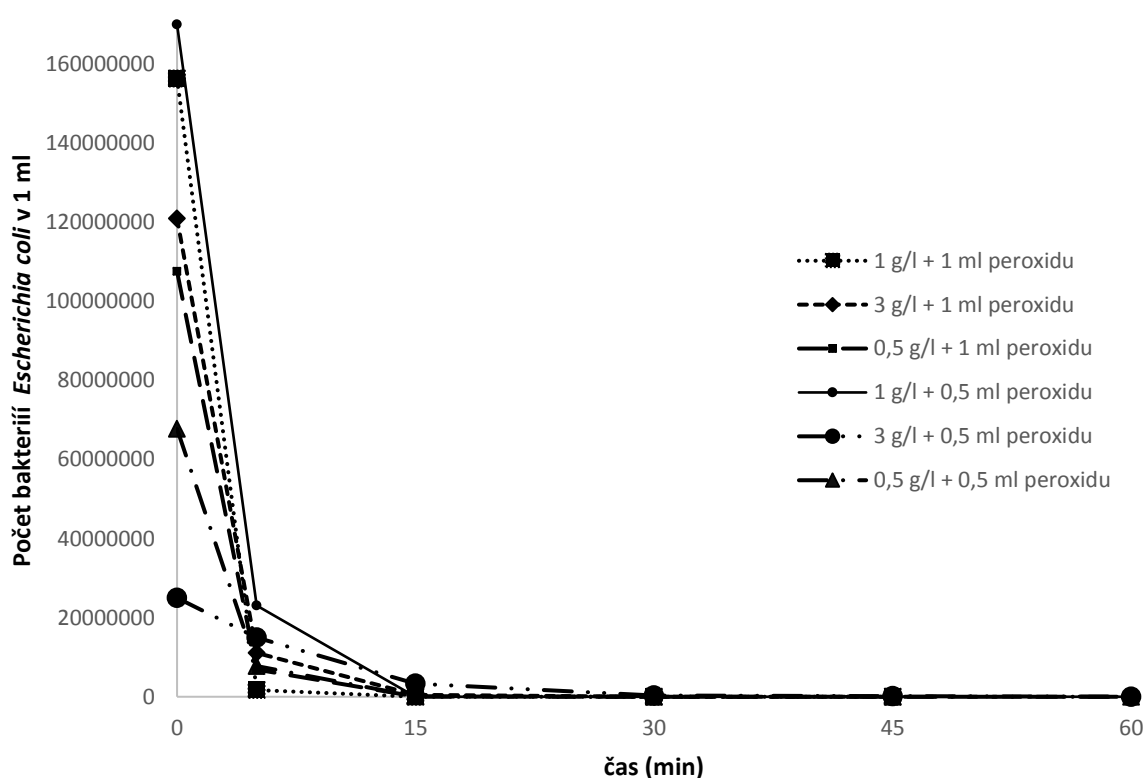
Graf 5 Závislost počtu bakterií *Escherichia coli* v 1 ml na čase (TiO_2 P25 + přidavek peroxidu)

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO_2 AV01

Z grafu 6 jsem vyhodnotila, že při použití 1 ml peroxidu vodíku je po 5 minutách nejúčinnější použití koncentrace 1 g/l katalyzátoru TiO_2 , kdy je usmrceno 98,93 % bakterií vzhledem k původní hodnotě. Při této koncentraci je po 15 minutách usmrceno 100 % bakterií. Při koncentraci 0,5 g/l je po 5 minutách usmrceno 93,58 % bakterií a po 30 minutách dochází

ke 100% usmrcení bakterií. Nejméně účinnější je použití 3 g/l TiO₂, kdy je po 5 minutách úmrtí 90,83 % bakterií a ke 100% usmrcení dochází až po 45 minutách experimentu.

Dále jsem také z grafu 6 vyhodnotila použití 0,5 ml peroxidu vodíku. Nejvíce účinné je použití v kombinaci s 0,5 g/l fotokatalyzátoru. V tomto případě došlo k usmrcení 88,59 % bakterií. 100 % bakterií bylo usmrceno v čase 60 minut. V případě použití 1 g/l fotokatalyzátoru bylo po 5 minutách usmrceno 86,44 % bakterií, ale ke 100 % usmrcení došlo již po 45 minutách. Nejméně účinné bylo použití 3 g/l, kdy po 5 minutách došlo k usmrcení pouze 40 % bakterií. Po 15 minutách došlo k usmrcení 86,83 % bakterií, ale ke 100% usmrcení nedošlo ani po 60 minutách experimentu.



Graf 6 Závislost množství bakterie *Escherichia coli* v 1 ml na čase (TiO₂ AVO01 + peroxid vodíku)

7.4 Odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens* kombinací fotokatalýzy s TiO₂ a přídavku H₂O₂

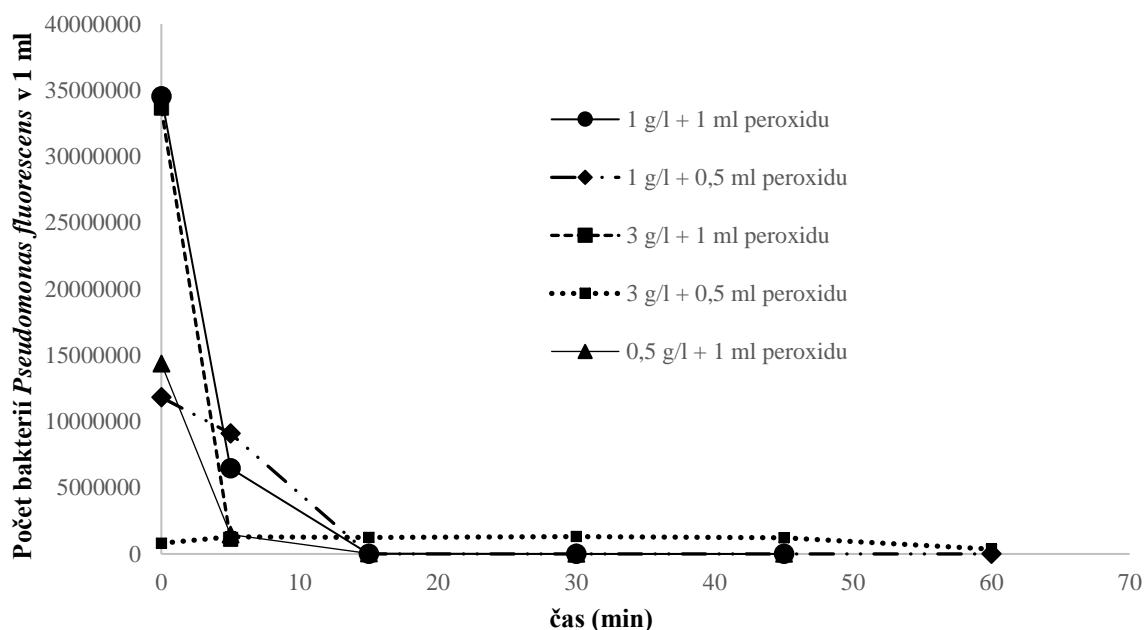
Při experimentech odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens* pomocí fotokatalýzy s TiO₂ a přídavku peroxidu vodíku jsem sledovala pokles bakterií v čase. Pro stanovení počtu bakterií jsem použila nepřímé stanovení plotnovou metodou. Při tomto experimentu jsem

použila různé koncentrace fotokatalyzátoru (0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l) a různé objemy peroxidu vodíku (0,5 ml a 1 ml). Počáteční zákal jsem zvolila 0,5 McFarland. Původní zákal roztoku neodpovídá stejným koncentracím, pravděpodobně kombinací nepřesného měření zákalu a odlišného stáří jednotlivých médií s namnoženou kulturou, navíc byly výsledky zkreslené značným množstvím kontaminace. Experimenty jsem prováděla při použití 0,5 ml peroxidu 60 minut a při použití 1 ml peroxidu 45 minut.

Fotokatalýza s použitím fotokatalyzátoru TiO₂ P25

Z grafu 7 jsem vyhodnotila, že při přidavku 1 ml H₂O₂ je nejúčinnější koncentrace 3 g/l fotokatalyzátoru TiO₂, kdy po 5 minutách bylo usmrceno 96,76 % bakterií a již po 15 minutách došlo k usmrcení 100 % bakterií. Nejméně účinné bylo použití 1 g/l, kdy po 5 minutách bylo usmrceno 81,32 % bakterií oproti původní hodnotě, ale 100 % bakterií bylo usmrceno již po 30 minutách.

Dále jsem také vyhodnotila použití 0,5 ml peroxidu. Při použití 0,5 g/l dochází po 5 minutách k usmrcení 82,26 % bakterií a po 60 minutách k usmrcení 99,996 % bakterií vzhledem k původní hodnotě. Při použití 3 g/l došlo ke snížení o 55,56 % oproti původní hodnotě po 60 minutách experimentu. Při použití 1 g/l byla na misce masivní kontaminace, a proto nebyla tato hodnota zařazena do grafu.



Graf 7 Závislost počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* v 1ml čase (TiO₂ P25 + H₂O₂)

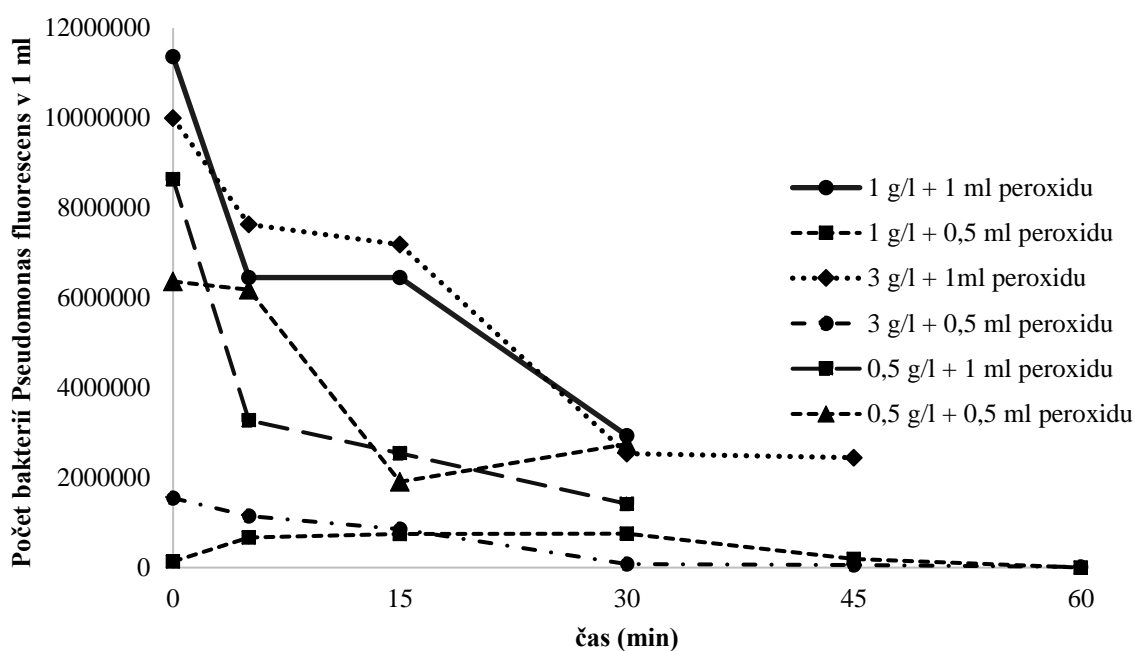
Fotokatalýza s použitím fotokatalyzátoru TiO₂ AV01

Graf 8 ukazuje závislost počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* v 1 ml na čase při použití fotokatalyzátoru TiO₂ AV01 a přídavku peroxidu vodíku. U všech měřených koncentrací fotokatalyzátoru a přídavků peroxidu dochází k výraznému úbytku bakterií do 30 minut od začátku experimentu. Naměřené hodnoty bohužel nejsou příliš přesné, kvůli vysoké kontaminaci, které se během těchto měření objevovala (viz příloha).

Z naměřených hodnot lze vyhodnotit, že při použití 3 g/l fotokatalyzátoru s přídavkem 0,5 ml peroxidu dochází po 5 minutách experimentu k usmrcení 25,88 % bakterií a po 60 minutách dochází k usmrcení 99,00 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií. Použití stejné koncentrace a 1 ml peroxidu způsobí po 5 minutách usmrcení 23,63 % bakterií a po 60 minutách usmrcení 75,55 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií.

Při použití 1 g/l fotokatalyzátoru a 0,5 ml peroxidu vodíku dochází během experimentu k nárůstu bakterií, ale při použití 1 ml peroxidu vodíku dochází během 5 minut experimentu k usmrcení 43,20 % bakterií a po 45 minutách dochází ke snížení množství bakterií o 74,16 % vzhledem k původnímu množství bakterií.

Při použití 0,5 g/l fotokatalyzátoru s 0,5 ml peroxidu dochází po 5 minutách k usmrcení pouze 2,86 % bakterií a 30 minutách dochází ke snížení množství bakterií o 56,86 % bakterií vzhledem k původní hodnotě bakterií.



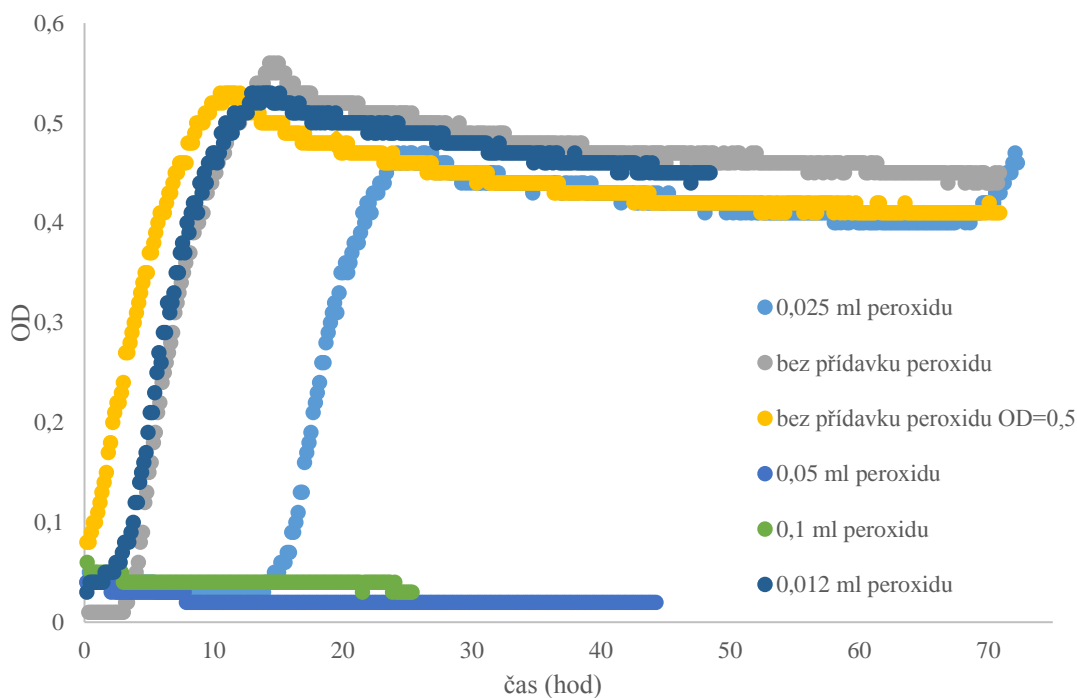
Graf 8 Závislost počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* v 1 ml na čase ($\text{TiO}_2\text{AV01} + \text{H}_2\text{O}_2$)

7.5 Odstraňování bakterie *Escherichia coli* pomocí H_2O_2

Při tomto pokusu jsem použila záznamník růstu, který sledoval pokles a nárůst bakterie *Escherichia coli*, pomocí měření optické hustoty (OD) na záznamníku růstu.

Z grafu 9, který zobrazuje závislost OD bakterie *Escherichia coli* na čase, je patrné, že nejrychleji dochází k poklesu množství bakterií při použití největšího objemu peroxidu vodíku, tedy při použití 0,1 ml (toto množství odpovídá 3,33 ml H_2O_2 na 1 l buněk). Za použití tohoto objemu i u objemu 0,05 ml dochází k výraznému poklesu a k nárůstu buněk už nedochází. Naopak u použití menších objemů (0,012 a 0,025 ml) dochází k nárůstu bakterií, pouze se v závislosti na použitém objemu peroxidu, mění čas nárůstu. V tomto případě platí, že čím větší objem použijeme, tím později dochází k nárůstu bakterií. Pro porovnání jsem také zaznamenala nárůst bez přídavku peroxidu. Tento vzorek jsem připravila rozetřením malého množství bakteriální kultury *Escherichia coli* přímo do zkumavky s MPB médiem. Také byl proměřen roztok bakteriální kultury o počátečním zákalu 0,5 McFarland, který byl připravený naředěním bakteriální kultury fyziologickým roztokem.

Porovnáním těchto výsledků s výsledky fotokatalýzy za přidavku peroxidu je zřejmé, že hlavní dezinfekční účinek byl způsoben i během fotokatalýzy právě peroxidem vodíku, nikoliv fotokatalýzou samotnou.

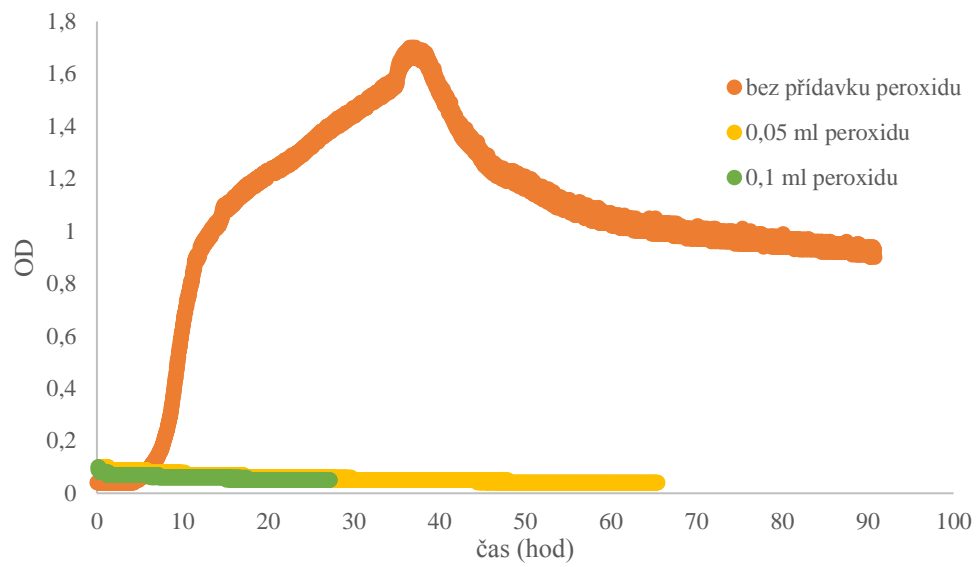


Graf 9 Závislost OD na čase - *Escherichia coli*

7.6 Odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens* pomocí H_2O_2

Při tomto pokusu jsem použila záznamník růstu, který sledoval pokles a nárůst bakterie *Escherichia coli*, pomocí měření optické hustoty (OD) na záznamníku růstu.

Graf 10 zobrazuje závislost OD na čase pro bakterii *Pseudomonas fluorescens*. V grafu je znázorněna, jak závislost bez přidavku peroxidu, tak závislost s jeho přidavkem. Pro přidavky platí, že čím větší je přidavek, tím rychleji dochází ke snížení OD, tedy k rychlejšímu úhynu bakterií.



Graf 10 Závislost OD na čase - *Pseudomonas fluorescens*

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na fotokatalýzu a její využití ke snižování mikrobiálního znečištění ve vodách a experimentálně otestovat optimální podmínky heterogenní fotokatalýzy při odstraňování *Escherichia coli* z vodného prostředí.

Na základě této rešerše pak byly provedeny praktické experimenty fotokatalýzy na dvou mikroorganismech, kterými byly *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*. Testovány byly 2 typy fotokatalyzátoru TiO₂, konkrétně P25 a AV01 a jejich různé koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l, 3 g/l). Dále byl zkoumán vliv přídavku H₂O₂ (0,5 a 1 ml) na účinnost fotokatalýzy i samotný účinek peroxidu vodíku.

Při testování dezinfekčních účinků fotokatalýzy na bakterii *Escherichia coli* bylo dosaženo těchto výsledků:

Při použití fotokatalyzátoru bez přídavku peroxidu, bylo nejvyšší účinnosti dosaženo použitím koncentrace 0,5 g/l u obou typů katalyzátorů. Při použití katalyzátoru TiO₂ P25 došlo po 120 minutách experimentu ke snížení původního počtu bakterií o 37,67 % a při použití TiO₂ AV01 po 90 minutách o 58,67 % oproti původnímu množství. 100% účinnosti nebylo odstranění bakterií nebylo pouhou fotokatalýzou dosaženo ani po 120 minutách experimentu u žádného experimentu.

Větší dezinfekční účinnosti bylo dosaženo při kombinaci s peroxidem vodíku. Nejlepší účinnosti bylo dosaženo při kombinaci 1 g/l katalyzátoru TiO₂ AV01 s 1 ml peroxidu, kdy bylo usmrceno 98,93 % bakterií už po 5 minutách experimentu, po 15 minutách byla dezinfekční účinnost 100 %. Nejlepší účinnosti s katalyzátorem TiO₂ P25 bylo dosaženo v kombinaci 3 g/l fotokatalyzátoru a 1 ml peroxidu. Při tomto experimentu bylo po 5 minutách usmrceno 94,79 % bakterií a 100% dezinfekční účinnosti bylo dosaženo také při 15 minutách experimentu. Vysoké dezinfekční účinnosti bylo dosaženo také při použití TiO₂ P25 o koncentraci 0,5 g/l v kombinaci s 0,5 ml peroxidu, kdy po 5 minutách došlo k usmrcení 95,87 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií a 100% dezinfekční účinnosti bylo dosaženo po 30 minutách experimentu. Jak prokázaly experimenty se samotným fotokatalyzátorem a se samotným peroxidem, je i při kombinaci obou metod dezinfekční účinek způsoben dominantní měrou právě peroxidem.

Samotné působení peroxidu vodíku na bakterii *Escherichia coli* má rozdílné dezinfekční účinky v závislosti na množství, které jsem použila. V malém množství (0,025 a 0,012 ml)

způsobuje zpomalení nárůstu bakterií (v případě 0,025 ml až o 15 hodin oproti výsledkům bez použití peroxidu) a malé snížení počtu bakterií. Ve větším množství (0,05 a 0,1 ml) způsobuje rychlý úhyn bakterií a k dalšímu nárůstu již nedochází.

Pro porovnání byla také testována bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Při testování dezinfekční účinků fotokatalýzy a přídavku peroxidu jsem dosáhla těchto výsledků:

Při použití pouze fotokatalýzy bez použití peroxidu vodíku lze považovat za neúčinnější použití fotokatalyzátoru TiO₂ AV01 o koncentraci 0,5 g/l. Při této koncentraci dochází po 5 minutách k usmrcení jen 7,69 % bakterií, ale po 120 minutách experimentu dochází k usmrcení 95,23 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií. Při použití stejné koncentrace fotokatalyzátoru TiO₂ P25 dochází po 5 minutách k usmrcení 41,46 % bakterií a po 90 minutách k usmrcení 68,29 % bakterií vzhledem k původnímu množství bakterií. Tímto experimentem bylo ověřeno, že dezinfekční účinky fotokatalýzy lze lépe využít pro bakterii *Pseudomonas fluorescens* než pro *Escherichia coli*.

Dále byla také testována kombinace fotokatalýzy a přídavku peroxidu vodíku. U těchto experimentů byla neúčinnější kombinace koncentrace 3 g/l katalyzátoru TiO₂ P25 a 1 ml peroxidu vodíku. Při tomto experimentu bylo po 5 minutách usmrceno 96,76 % bakterií vzhledem k původnímu množství a ke 100% účinnosti došlo již po 15 minutách. Při použití 0,5 ml peroxidu při stejné koncentraci fotokatalyzátoru došlo ke 100% účinnosti po 60 minutách. V případě použití katalyzátoru TiO₂ AV01 bylo neúčinnější použití 3 g/l katalyzátoru a 0,5 ml peroxidu, kdy bylo po 60 minutách usmrceno 99 % bakterií vzhledem k původnímu množství.

Při použití pouze peroxidu vodíku (0,1 a 0,05 ml) jsou dezinfekční účinky velmi podobné jako na bakterii *Escherichia coli*. Při těchto objemech peroxidu dochází k velmi rychlému úhynu bakterií a nedochází k jejich nárůstu.

K experimentům je potřeba dodat, že stanovení počtu buněk je do značné míry zkresleno, vznikající masivní kontaminací, zvláště v několika posledních týdnech. Kontaminace se bohužel opakovala i přes dodržení všech pravidel, které jsou pro práci v mikrobiologické laboratoři nutné. Mnoho misek nebylo možné vůbec vyhodnotit i přesto, že byly opakovány pro získání lepších výsledků. Právě z těchto důvodů nejsou u některých experimentů všechny hodnoty uvedeny. Fotografie misek zasáhnutých kontaminací jsou uvedeny v příloze.

Závěrem je nutné konstatovat, že použití fotokatalýzy jako dezinfekčního prostředku je z testovaných mikroorganismů nadějně pro bakterii *Pseudomonas fluorescens*. Pro možnosti

praktického uplatnění je však potřeba ještě celý proces vyzkoušet na větším množství různých mikroorganismů a nelézt jeho optimální podmínky.

CITACE

1. Abraham J. P., Plourde B. D., Minkowycz W. J. Continuous flow solar thermal pasteurization of drinking water: Methods, devices, microbiology, and analysis. *Renewable Energy*, 81, [2015], 795–803.
2. Arslan S., Eyi A., Özdemir F. Spoilage potentials and antimicrobial resistance of *Pseudomonas* ssp. isolated from cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94 (12), [2011], 5851–5856.
3. Ashbolt N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*, 198 (1-3), [2004], 229–238.
4. Augugliaro V., Ballardita M., Loddo V., Palmisano G., Palmisano L., Yurdakal S. Overview on oxidation mechanisms of organic compounds by TiO₂ in heterogeneous photocatalysis. *Journal of photobiology C: photochemistry reviews*, 13, [2012], 223–245.
5. Aziz N. A. A, Palaniandy P, H. A. Aziz, Dahlan I. Review of the mechanism and operational factors influencing the degradation process of contaminants in heterogeneous photocatalysis. *Journal Of Chemical Research*, 11, [2016], 704–712.
6. Benabbou A. K., Derriche Z., Felix C., Lejeune P., Guillard C. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental*, 76, [2007], 257–263.
7. Biocote Limited. Five facts about *E. coli* (online). United Kingdom, Biocote team, [2016], [online]. Citováno: 4. 1. 2019 (Dostupné z: <https://www.biocote.com/blog/five-facts-e-coli>).
8. Broberg Ch. A., Calder T. J., Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and infection*, 13(12–13), [2011], 992–1001.
9. Byrne J. A, Dunlop P. S. M, Hamilton J. W. J, Fernández-Ibáñez P, Polo-Lopéz I, Sharma P. K, Vennard A. S. M. A Review of heterogeneous photocatalysis for water and surface disinfection. *Molekules*, 20, [2015], 5574–5615.
10. Cabral J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7 (10), [2010], 3657–3703.

11. Caldera L., Franzetti L., van Coillie E., de Vos P., Stragier P., de Block J. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* ssp. isolated from different food. *Food Microbiology*, 54, [2016], 142–153.
12. Da Silva G. C., Tiba CH., Calazans G. M. T. Solar pasteurizer for the microbiological decontamination of water. *Renewable Energy*, 87, [2016], 711–719.
13. Da Silva W. L., Lansarin M. A., Dos Santos J. H. Z., Da Rocha Z. N., Pepe I. M. Electrochemical and catalytic studies of a supported photocatalyst produced from petrochemical residue in the photocatalytic degradation of dexamethasone and guaifenesin drugs. *Water, Air & Soil Pollution*, 7, [2016], 227–242.
14. Dalrymple O. K., Stefanakos E., Trotz M. A., Goswami Y. A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Applied Catalysis B: Environmental*, 98, [2010], 27–38.
15. Di Mauro A., Canterella M., Nicotra G., Privitera V., Impellizzeri G. Low temperature atomic layer deposition of ZnO: Applications in photocatalysis. *Applied catalysis B: Environmental*, 196, [2016], 68–76.
16. Edgerg S.C.L, Rice E.W, Karlin R.J, Allen M.J. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88, [2010], 106S–116S.
17. Ersoy Z. G., Barisci S., Dinc O. Mechanism of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. *LWT-food science and technology*, 100, [2019], 306–313.
18. Fujishima A., Rao T. N., Tryk D. A. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C. Photochemistry Reviews* 1, [2000], 1–21.
19. Gao M., Ng T. W., AnT., Li G., Yip H. Y., Zhao H., Wong P. K. The role of catalase and H₂O₂ in photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*: Genetic and biochemical approaches. *Catalysis Today*, 266, [2016], 205–211.
20. Gomes T. A. T., Elias W. P., Scaletsky I. C. A., Guth B. E. C., Rodrigues J. F., Piazza R. M. F., Ferreira L. C. S., Martinez M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47S, [2016], 3–30.
21. Haider A. J., Jameel Z. N., Al-Hussaini I. H. M. Review on: Titanium Dioxide Applications. *Energy Procedia*, 157, [2019], 17–29.
22. Hsu B-M., Huang K-H., Huang S-W., Tseng K-Ch., Su M-J., Lin W-Ch., Ji D-D., Shih F-Ch., Chen J-L., Kao P-M. Evaluation of different analysis and identification methods

- for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 409, [2011], 4435–4441.
23. Hsu B-M., Wu S-F., Huang S-W., Tseng Y-J., Ji D-D., Chen J-S., Shis F-Ch. Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water research*, [2010], 44, 949–955.
 24. Cho M., Chung H., Choi W., Yoon J. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Research*, 38, [2004], 1069–1077.
 25. Ismaeel G. K. and Kshash H. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from ewes milk of clinical and subclinical mastitis in Al-Diwaniyah city, [2014].
 26. Jiang L., Wang Y., Feng Ch. Application of photocatalytic technology in environmental safety. *Procedia Engineering*, 45, [2012], 993–997.
 27. Khan M. M., Adil S. F., Al-Mayouf A. Metal oxides as photocatalysts. *Journal of Saudi Chemical Society*. 19(5), [2015], 462–464.
 28. Lanao M., Ormad M. P., Mosteo R., Ovelleiro J. L. Inactivation of *Enterococcus* sp. By photolysis and TiO₂ photocatalysis with H₂O₂ in natural water. *Solar Energy*, 86, [2012], 619–625.
 29. Landmann M., Rauls E., Schmidt W. G. The electronic structure and optical response of rutile, anatase and brookite TiO₂. *Journal of Physics: Condensed Matter* 24, [2012], 195503.
 30. Lang X, Chen X, Zhao J. Heterogenous visible light photocatalysis for selective organic transformations. *Chemical Society Reviews*, 43, [2014], 473–486.
 31. Long M., Wang J., Zhuang H., Zhang Y., Wu H., Zhang J. Performance and mechanism of standard nano-TiO₂ (P-25) in photocatalytic disinfection of foodborne microorganisms – *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Food control* 39, [2014], 68–74.
 32. Matsunaga T, Tomoda R, Nakajima T, Wake H. Photoelectrochemical sterilization of microbial cells by semiconductor powders. *FEMS Microbiology Letters*, , 29, [1985], 1–2.
 33. McCullagh C., Robertson J. M. C., Bahnemann D. W. The application of TiO₂ photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic microorganisms: a review. *Research on chemicals intermediates*, 33, [2007], 359–375

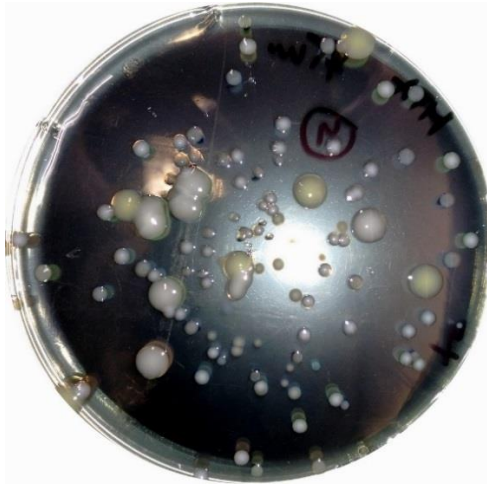
34. Mellon G., Delanoe C., Roux A. L., Heym B., Dubourg O., Hardy P., Chevalliers B., Perronne C., Rouveix E., Salomon J. Non-typhi *Salmonella enterica* urinary tract infections. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 47, (6), [2017], 389–393.
35. Mesaaz. City of mesa 2019. Citováno: 21.1. 2019(Dostupné z: <https://www.mesaaz.gov/residents/water-resources/services/water-treatment-process>)
36. Messelhäusser U., Colditz J., Thäringen D., Kleih W., Höller C., Busch U. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *International Journal of food microbiology*, 142(3), [2010], 360–364.
37. Michelacci V., Prosseda G., Maugliani A., Tozzoli R., Sanchez S., Herrera-León S., Dallman T., Jenkins C., Caprioli A., Morabito S. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), [2016], 287.e.11–9.
38. Mirhoseini A., Amani J., Shahram N. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, [2018], 162–169.
39. Nakata K. and Fujishima A. TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *Journal of photochemistry and photobiology C: photochemistry reviews*. 13, [2012], 169–189
40. Nataro J. P. and Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), [1998], 142–201.
41. Ohama Y. and van Gemert D. Application of Titanium Dioxide Photocatalysis to Construction Materials: State-of-the-Art Report of the RILEM Technical Committee 194-TDP, [2011], kap. 2 ISBN: 978-94-007-1297-3
42. Ochoa T. J. and Contreras C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), [2011], 478–483.
43. Ong CH. B., Ng L. Y., Mohammed A. W. A review of ZnO nanoparticles as solar photocatalysts: Synthesis, mechanisms and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 81, [2018], 536–551.
44. Paspaltsis I, Kotta K, Lagoudaki R, Grigoriadis N, Poullos I, Sklaviadis T. Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prion. *Journal of General Virology*, 87, [2006], 3125-3130
45. Pomykačová I., Svobodová V., Runštuk J., Čadek V., Kožíšek F., Gari D. Halogenoxtové kyseliny v pitné vodě v České Republice. Sborník konference Pitná voda, [2008],s. 140-146. W&ET Team, Č. Budějovice 2008. ISBN 978-80-254-2034-8

46. Rahimi N., Pax R. A., Gray E. MacA. Review of functional titanium oxides. I. TiO₂ and its modifications. *Progress in Solid State Chemistry*, 44, [2016], 86–105.
47. Reddy P. V. L, Kavitha B, Reddy P. A. K, Kim K. TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. *Environmental Research*, 154, [2017], 296–303.
48. Rincón A. G, Pulgarin C, Adler N, Peringer P. Interaction *E. coli* inactivation and DBP-precursors – dihydroxybenzenes isomers-in the photocatalytic process of drinking-water disinfection with TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, 139, [2001], 233–241.
49. Rincón A. G. and Pulgarin C. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *Applied Catalysis B: Environmental*, 44, [2003], 263–284.
50. Robertson P. K. J., Robertson J. M. C., Bahnemann D. W. Removal of microorganisms and their chemical metabolites from water using semiconductor photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 211–212, [2012], 161–171.
51. Rodgher V., Moreira J., Hugo L., Benito S. Photocatalytic degradation of malic acid using a thin coated TiO₂-film: Insights on the mechanism of photocatalysis. *American Institute of Chemical Engineers*, 60(9), [2014], 3289–3299.
52. Rossi C., Chaves-Lopez C., Serio A., Goffredo E., Goda B. T. C., Paparella A. Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. *Italian Journal of Food Safety*, 5, [2016], 5798.
53. Sanderson K. E., Liu S-L., Tang L., Johnston R. N. Chapter 71- Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A., *Molecular medical microbiology* (second edition), 2, [2015], 1275–1306, ISBN: 978-0-12-397169-2.
54. Scales B. S., Dickson R. P., LiPuma J. J., Huffnagle G. B. Microbiology, Genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of human. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), [2014], 927–948.
55. Schwegmann H., Ruppert J., Frimmel H. Influence of the pH-value on the photocatalytic disinfection of bacteria with TiO₂ – Explanation by DLVO and XDLVO theory. *Water Research*, 47, [2013], 1503–1511.

56. Sontakke S., Mohan C., Modak J., Madras G. Visible light photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* with combustion synthesized TiO₂. *Chemical Engineering Journal*, 189–190, [2012], 101–107.
57. Suha D., Sivakumar P. Review on the photocatalytic activity of various composite catalysts. *Chemical Engineering and Processing: Process intensification*. 97, [2015], 112–133.
58. Sun Y-Y., Sun L. *Pseudomonas fluorescens*: Iron-responsive proteins and their involvement in host infection. *Veterinary Microbiology*, 176, [2015], 309–320.
59. Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *Journal of photochemistry and photobiology A: chemistry*, 156, [2003], 227–233.
60. The Robert Koch Institute is a Federal Institute within the portfolio of the Federal Ministry of Health. *Vibrio cholerae* (online), [2014], citováno: 28. 3. 2019 (dostupné z: https://www.rki.de/EN/Content/infections/Diagnostics/NatRefCentresConsultantLab/CONSULAB/EM-images/EM_Tab_Vibrio_cholerae_en.html).
61. Vásquez-García A., de Oliveira A. P. S. C., Majia-Ballesteros J. E., de Godoy S. H. S., Barbieri E., de Sousa R. L. M., Fernandez A. M. *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. *Aquaculture*, 504, [2019], 158–163.
62. Verma K., Gupta D., Gupta A. B., Optimization of ozone disinfection and its effect on trihalomethanes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, [2016], 3021–3032
63. Von Gunten U., Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research*, 37, [2003], 1443–1467.
64. Wang J., Zhuang H., Hinton Jr. A., Bowker B., Zhang J. Photocatalytic disinfection of spoilage bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Micrococcus caseolyticus* by nano-TiO₂. *Food Science and Technology*, 59, [2014], 1009–1017.
65. Wang W, Huang G, Yu J. C, Wong P. K, Advances in photocatalytic disinfection of bacteria: Development of photocatalysts and mechanisms. *Journal of Environmental Sciences*, 34, [2015], 232–247.
66. Weil A. A., Harris J. B. Chapter 60 – *Vibrio cholerae*. *Molecular medical microbiology* (second edition), 2, [2015], 1079–1098, ISBN: 978-0-12-397169-2.
67. WHO (World Health Organization). *E. coli*. (online), Geneva. 2018. Citováno: 4. 1. 2019. (Dostupné z <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>).
68. Wold A. Photocatalytic properties of TiO₂. *Chemistry of materials*, 5, 1993, 280–283.

69. Wu W., Jin Y., Bai F., Jin S. *Molecular Medical Microbiology* (second edition), chapter 41- *Pseudomonas aeruginosa*. 2, [2015],753–767, ISBN: 978-0-12-397169-2.
70. Xi J., Zhang F., Lu Y., Hu H-Y. A novel model simulationg reclaimed water disinfection by ozonation. *Separation and Purification Technology*, 179, [2017], 45–52.
71. Zhang D., Li G., Yu J. C. Inorganic materials for photocatalytic water disinfection. *Journal of chemistry materials*, 20, [2010], 4529–4536.
72. Zhang J. and Nosaka Y. Mechanism of the Oh radical generation in photocatalysis with TiO₂ of different crystalline types. *Journal of Physical Chemistry. C*, 118(20), [2014], 10824–10832.

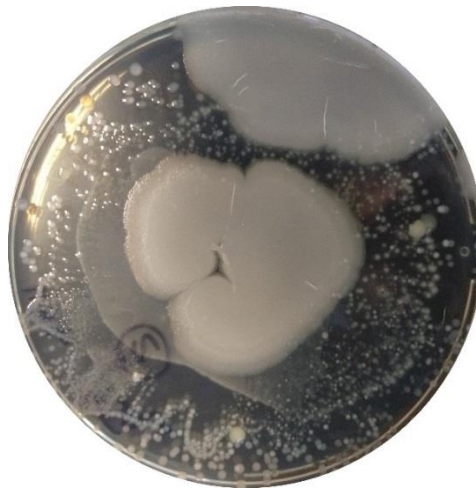
PŘÍLOHA



Obrázek 18 Kontaminace při pokusu s *Escherichia coli*



Obrázek 19 Masivní nárůst na misce při experimentu s bakterií *Pseudomonas fluorescens*



Obrázek 20 Nárůst kontaminace při experimentu s *Pseudomonas fluorescens*



Obrázek 21 Masivní nárůst kontaminace při experimentu s *Pseudomonas fluorescens*



Obrázek 22 Normální nárůst bakterie *Escherichia coli*

Tabulka 6 Výsledky měření dezinfekčního účinku fotokatalýza na bakterii *Pseudomonas fluorescens* (TiO_2 P25+ přídavek peroxidu)

Ředění v misce	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}		
čas (min)										CFU	
1 g/l + 1 ml peroxidu											
0						69	7	0	0	34545455	
5					63	8	1	1		6454545	
15			3	1						3636	
30					4						
45			1								
1 g/l + 0,5 ml peroxidu											
0						24	2	1	0	11818182	
5					94	6	1			9090909	
15		>300	kontaminace								
30											
45											
3 g/l + 1 ml peroxidu											
0						67	7	2	2	33636364	
5					10	2				1090909	
15					1						
30											
45											
3 g/l + 0,5 ml peroxidu											
0					16	2	0	0	0	818182	
5				123	20	1				1300000	
15				120	18	3				1254545	
30			>300	125	19	1				1309091	
45				118	17	2				1227273	
60				32	8	0				363636	
0,5 g/l + 1 ml peroxidu											
0					290	26	4	0	0	14363636	
5			>300	108	53	22	0	0		1463636	
15			32	2	0	0	0			30909	
30	>300	70	8	0	0	0				7091	
45	47	2	0	0	0	0				445	
0,5 g/l + 0,5 ml peroxidu											
0					269	32	0	0	0	13681818	
5			>300	239	28	1				2427273	
15			41	3	22	0				40000	
30		81	9	0	0	0				8182	
45	196	25	5	0	0	0				2009	
60	52	5	0	0	0					518	

Tabulka 7 Výsledky měření dezinfekčního účinku fotokatalýza na bakterii *Pseudomonas fluorescens* (TiO₂-AV01+
přídavek peroxidu)

Ředění v misce	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	
čas (min)										CFU
1 g/l + 1 ml peroxidu										
0						21	4	5	1	11363636
5				>300	64	7	2			6454545
15				>300	66	5	2			6454545
30				280	43					2936364
45			>300							
1 g/l + 0,5 ml peroxidu										
0					2	1	0	0	0	136364
5			>300	51	23	0				238710
15			>300	67	15	0				264516
30			>300	69	14	2				267742
45			>300	13	8	2				67742
60										
3 g/l + 1 ml peroxidu										
0						18	4	3	0	10000000
5				>300	79	5	1			7636364
15				>300	72	7				7181818
30			>300	230	49					2536364
45				231	38					2445455
3 g/l + 0,5 ml peroxidu										
0					30	4	0	0	0	1545455
5				114	12	2				1145455
15			>300	84	10	1				854545
30			65	19	2					76364
45			53	12	2					59091
60		>300	12	5	1					15455
0,5 g/l + 1 ml peroxidu										
0						6	13	2	0	8636364
5				>300	32	4	0			3272727
15				>300	26	2	0			2545455
30				144	12					1418182
45										
0,5 g/l + 0,5 ml peroxidu										
0						12	2	0	0	6363636
5					53	15	0			6181818
15				>300	19	2				1909091
30				282	20					2745455
45										