

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Kateřina Bryčková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Studium toxicity fotolytů vybraných azobarviv pomocí mikrobiologických a  
ekotoxikologických testů

Diplomová práce

2023

Bc. Kateřina Bryčková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Bryčková**  
Osobní číslo: **C21491**  
Studijní program: **N0711A130014 Udržitelný rozvoj v chemii a technologii**  
Téma práce: **Studium toxicity fotolytů vybraných azobarviv pomocí mikrobiologických a ekotoxikologických testů**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

## Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši na dané téma, zaměřte se na stanovení antimikrobiálních a ekotoxikologických účinků pomocí standardních i alternativních technik s využitím dafnií, řas a bakterií.
2. Proveďte fotochemickou degradaci komerčních azobarviv pomocí oxidu titaničitého ve fotochemickém reaktoru a vzniklé fotolyty podrobte mikrobiologickým a ekotoxikologickým testům z hlediska sledování toxicity.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, proveďte jejich diskusi a porovnejte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**  
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultanti diplomové práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
**Ing. Oldřich Machalický, Dr.**  
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Anna Krejčová, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 25. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem: Studium toxicity fotolytů vybraných azobarviv pomocí mikrobiologických a ekotoxikologických testů 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. 7 /2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27.04.2023

Bc. Kateřina Bryčková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Dále také za to, že mi pomohla domluvit testování na různých pracovištích, panu Ing. Oldřichovi Machalickému, Dr. za pomoc s fotokatalýzou a chemickými testy. Mé poděkování patří též paní doc. Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za pomoc při mikrobiologickém testování a hledání informací k bakteriálním kulturám. Nakonec bych ráda poděkovala paní Mgr. Monice Roupcové, že mě vzala na své pracoviště, věnovala mi čas při ekotoxikologických testech a vše mi důkladně vysvětlila.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá rozkladem azobarviv pomocí heterogenní fotokatalýzy a následným testováním toxicity fotolytů pomocí mikrobiologických a ekotoxikologických testů.

K testování byla vybrána tři komerční azobarviva-Saturnová modř LBRR 200, Saturnová žluť LFF 200 a Saturnová červeň F3B 200 (C.I. Direct Blue 71, Direct Yellow 28 a Direct Red 80). Ve fotochemickém reaktoru byla provedena fotochemická degradace všech tří azobarviv za přítomnosti  $\text{TiO}_2$  jako katalyzátoru. Toxicita vzorků byla následně testována *in vitro* pomocí bakterií, kde se testoval nárůst bakterií ve vzorcích připravených dvojkovým ředěním. Následně byla toxicita testována na řasách a dafniích ve Výzkumném ústavu organických syntéz.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Direct Blue 71, Direct Yellow 28, Direct Red 80, heterogenní fotokatalýza, mikrobiologické testy, ekotoxikologické testy

## **TITLE**

The study of toxicity of photolytes of selected azo dyes by mean of microbiological and ecotoxicological tests

## **ANNOTATION**

This thesis deals with the degradation of azo dyes by heterogeneous photocatalysis and testing of toxicity of photolytes by microbiological and ecotoxicological tests.

Three commercial azo dyes as C.I. Direct Blue 71, Direct Yellow 28 and Direct Red 80 were selected for testing. Photochemical degradation of all three azo dyes carried out in a photochemical reactor in the presence of  $\text{TiO}_2$  as a catalyst. The toxicities of the samples were then tested using bacteria *in vitro* to test bacterial growth in two times diluted samples. In addition, toxicity was also tested on algae and daphnia at Research Institute for Organic Syntheses, Inc. (VUOS a.s.).

## **KEYWORDS**

Direct Blue 71, Direct Yellow 28, Direct Red 80, heterogeneous photocatalysis, microbiological tests, ecotoxicological tests

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	10
SEZNAM TABULEK .....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	13
ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	15
1.1 Azobarviva a jejich toxicita .....	15
1.2 Heterogenní fotokatalýza .....	16
1.2.1 TiO <sub>2</sub> .....	16
1.3 Chemická spotřeba kyslíku .....	17
1.4 Celkový organický uhlík .....	17
1.5 Mikrobiologické testy .....	18
1.5.1 Identifikační testy .....	18
1.5.2 Metody ke stanovení minimální inhibiční koncentrace .....	19
1.6 Ekotoxikologie .....	22
1.6.1 Základní pojmy .....	22
1.6.2 Testy toxicity .....	23
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	24
2.1 Azobarviva .....	24
2.1.1 Saturnová modř LBRR 200 .....	24
2.1.2 Saturnová žlut' LFF 200 .....	24
2.1.3 Saturnová červen' F3B 200 .....	25
2.2 UV/VIS absorpční spektrofotometrie .....	25
2.3 Fotochemický reaktor.....	26
2.4 Fotolýza barviv.....	26
2.5 Elementární analýza .....	27
2.6 CHSK .....	27
2.7 Ředění bujónu .....	28
2.7.1 Příprava kultivačních médií .....	28
2.7.2 Příprava fyziologického roztoku .....	29
2.7.3 Příprava čistých mikrobiálních kultur .....	29
2.7.4 Postup určení hodnoty MIC .....	30
2.8 Membránová filtrace .....	31



2.9	Gramovo barvení .....	32
2.9.1	Činidla a zařazení .....	32
2.9.2	Postup Gramova barvení .....	32
2.10	Oxidázový test .....	32
2.11	Katalázový test .....	33
2.12	NEFERMtest 24 .....	33
2.13	Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic .....	34
2.13.1	Referenční látka .....	34
2.13.2	Popis metody .....	34
2.13.3	Průběh testu .....	37
2.13.4	Vyhodnocení testu .....	39
2.14	Zkouška akutní imobilizace dafnií .....	40
2.14.1	Referenční látka .....	40
2.14.2	Testovací organismus .....	40
2.14.3	Zředovací voda .....	41
2.14.4	Průběh zkoušky .....	42
2.14.5	Vyhodnocení EC <sub>50</sub> .....	43
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	44
3.1	Fotokatalýza .....	44
3.2	Elementární analýza .....	44
3.3	CHSK .....	45
3.4	TOC .....	45
3.5	Mikrobiologické testy .....	46
3.5.1	Ředění bujony .....	46
3.5.2	Identifikační testy .....	49
3.6	Ekotoxikologické testy .....	51
3.6.1	Inhibice růstu řas .....	51
3.6.2	Zkouška akutní imobilizace dafnií .....	56
	ZÁVĚR .....	62
	POUŽITÁ LITERATURA .....	64

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Ponomý fotoreaktor .....	26
Obrázek 2 - Příklad očkování TSA agaru .....	31
Obrázek 3 - Filtrační aparatura .....	31
Obrázek 4 - NEFERMtest 24 před inkubací .....	33
Obrázek 5 - NEFERMtest 24 po inkubaci .....	33
Obrázek 6 - <i>Desmodesmus subspicatus</i> [22] .....	35
Obrázek 7 - Koncentrační řada pro Saturnovou žluť a kontrola .....	38
Obrázek 8 - <i>Daphnia magna</i> [23] .....	41
Obrázek 9 - <i>Daphnia magna</i> popis [24] .....	41
Obrázek 10 - Koncentrační řada pro Saturnovou červeň a kontrola .....	43
Obrázek 11 - Vzorek Saturnové moři po inkubaci ( <i>E. coli</i> a <i>S. aureus</i> ) .....	46
Obrázek 12 - Vzorek Saturnové modři před inkubací .....	46
Obrázek 13 - Vzorek Saturnové modři po inkubaci ( <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. faecalis</i> ) .....	46
Obrázek 14 - Vzorek Saturnové žluti před inkubací .....	47
Obrázek 15 - Vzorek Saturnové žluti po inkubaci ( <i>E. coli</i> a <i>S. aureus</i> ) .....	47
Obrázek 16 - Vzorek Saturnové žluti po inkubaci ( <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. faecalis</i> ) .....	47
Obrázek 17 - Vzorek Saturnové červeně před inkubací .....	47
Obrázek 18 - Vzorek Saturnové červeně po inkubaci ( <i>E. coli</i> a <i>S. aureus</i> ) .....	47
Obrázek 19 - Vzorek Saturnové červeně po inkubaci ( <i>P. aeruginosa</i> a <i>E. faecalis</i> ) .....	47
Obrázek 20 - Odbarvený vzorek po inkubaci ( <i>E. coli</i> a <i>S. aureus</i> ) .....	48
Obrázek 21 - Odbarvený vzorek před inkubací .....	48
Obrázek 22 - Výsledek Gramova barvení .....	49
Obrázek 23 - Kultura <i>Chryseobacterium indologenes</i> na TSA agaru .....	50

## SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma 1 - Direct Blue 71 .....	24
Schéma 2 - Direct Yellow 28 .....	24
Schéma 3 - Direct Red 80 .....	25
Schéma 4 - Dvojkové ředění .....	30

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - UV/VIS absorpční spektra vybraných azobarviv (barvy křivek odpovídají barvám azobarviv) .....	25
Graf 2 - Průběh fotokatalýzy Saturnové modři LBRR 200 .....	44
Graf 3 - Průběh fotokatalýzy Saturnové žluti LFF 200 .....	44
Graf 4 - Průběh fotokatalýzy Saturnové červeně .....	44

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Příprava roztoků pro fotokatalýzu .....	27
Tabulka 2 - Složení TSA .....	28
Tabulka 3 - Složení MH bujónu .....	28
Tabulka 4 - Složení fyziologického roztoku .....	29
Tabulka 5 - McFarlandova zákalová tabulka ke stanovení počtu bakterií .....	29
Tabulka 6 - Klasifikace <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	35
Tabulka 7 - Stanovení objemu inokula .....	36
Tabulka 8 - Složení médií k přípravě živného roztoku .....	37
Tabulka 9 - Dávkování barevných vzorků .....	38
Tabulka 10 - Koncentrační řada vzorků po fotokatalýze .....	39
Tabulka 11 - Klasifikace <i>Daphnia magna Straus</i> .....	40
Tabulka 12 - Složení zředovací vody .....	42
Tabulka 13 - Elementární analýza vzorků .....	45
Tabulka 14 - CHSK vzorků před a po fotokatalýze .....	45
Tabulka 15 - TOC azobarviv po fotokatalýze .....	46
Tabulka 16 - Přítomnost bakterií v nezředěném vzorku .....	48
Tabulka 17 - Výsledek NEFERMtestu 24 .....	50
Tabulka 18 - Příklad výpočtu objemu inokula řasové kultury .....	51
Tabulka 19 - pH roztoků Saturnové modři .....	52
Tabulka 20 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové modři po 72 hodinách .....	52
Tabulka 21 - pH roztoků Saturnové modři po fotolýze .....	52
Tabulka 22 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové modři po fotolýze po 72 hodinách .....	53
Tabulka 23 - pH roztoků Saturnové žluti .....	53
Tabulka 24 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové žluti po 72 hodinách .....	53
Tabulka 25 - pH roztoků Saturnové žluti po fotolýze .....	54
Tabulka 26 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové žluti po fotolýze po 72 hodinách .....	54
Tabulka 27 - pH roztoků Saturnové červeně .....	54
Tabulka 28 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové červeně po 72 hodinách .....	55
Tabulka 29 - pH roztoků Saturnové červeně po fotolýze .....	55
Tabulka 30 - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové červeně po fotolýze po 72 hodinách .....	55
Tabulka 31 - pH roztoku Saturnové modři .....	56
Tabulka 32 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové modři .....	56
Tabulka 33 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou modř .....	56
Tabulka 34 - pH roztoku Saturnové modři po fotokatalýze .....	57
Tabulka 35 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové modři po fotokatalýze .....	57
Tabulka 36 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou modř po fotokatalýze .....	57
Tabulka 37 - pH roztoku Saturnové žluti .....	58
Tabulka 38 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové žluti .....	58
Tabulka 39 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou žluť .....	58
Tabulka 40 - pH roztoku Saturnové žluti po fotokatalýze .....	59
Tabulka 41 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové žluti po fotokatalýze .....	59
Tabulka 42 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou žluť po fotokatalýze .....	59
Tabulka 43 - pH roztoku Saturnové červeně .....	60
Tabulka 44 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové červeně .....	60

Tabulka 45 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou červeň .....	60
Tabulka 46 - pH roztoku Saturnové červeň po fotokatalýze .....	61
Tabulka 47 - Koncentrace O <sub>2</sub> v roztoku Saturnové červeň po fotokatalýze.....	61
Tabulka 48 - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou červeň po fotokatalýze.....	61

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
DMPD	<i>N,N</i> -dimethyl- <i>p</i> -fenylendiamin
ED <sub>50</sub>	Střední účinná dávka
LD <sub>50</sub>	Střední smrtelná dávka
MH	Mueller-Hintonové bujón
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NK	Negativní kontrola
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci
PK	Pozitivní kontrola
TKN	Celkový Kjeldahlův dusík (Total Kjeldahl Nitrogen)
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>p</i> -fenylendiamin
TOC	Celkový organický uhlík (Total Organic Carbon)
TSA	Trypton-sójový agar

## ÚVOD

Rychle rostoucí celosvětová populace i rozvoj průmyslu v posledních letech vyvolaly energetickou krizi a znečištění životního prostředí. To značně ovlivnilo zdraví lidí a udržitelný rozvoj životního prostředí. Nejdůležitějšími tématy se proto postupně stala ochrana životního prostředí a technologie odstraňování škodlivin.

Pokročilé oxidační procesy jako je fotokatalýza, Fentonova oxidace, sonolýza, ozonizace atd., mohou potenciálně splnit kritéria čištění pro odpadní vody obsahující vysoce stabilní a málo biologicky odbouratelné sloučeniny. Mezi nimi je rozsáhle studována heterogenní fotokatalýza využívající polovodičové katalyzátory za účelem degradace organických polutantů díky své schopnosti produkovat vysoce reaktivní radikály při ozařování světlem bez potřeby dalších chemikálií.

Ekotoxikologické biotesty jsou i přes velký pokrok v přístrojovém vybavení a technice jedním z nejspolehlivějších způsobů, jak zjistit toxikologický dopad odpadních látek na životní prostředí. Jde o jediný způsob, jak s jistotou určit toxicitu nejen pro člověka, ale i pro ostatní organismy. Metody jako je například hmotnostní spektrometrie nebo kapalinová chromatografie dokážou určit koncentraci polutantu (znečišťující látky) i na desetiny  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , ale nedokážou nás informovat o jejich účincích na ekosystém. V případě směsi polutantů nelze určit jejich kombinovaný efekt, zda ho budou mít protichůdný či synergický (společný). Na toto a mnoho dalších otázek v tuto chvíli mohou odpovědět nejlépe právě ekotoxikologické testy.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat toxicitu komerčních azobarviv (Saturnová modř LBRR 200, Saturnová žlut' LFF 200 a Saturnová červeň F3B 200) a jejich fotolytů pomocí mikrobiologických (určení nárůstu bakterií v roztocích připravených dvojkovým ředěním) a ekotoxikologických testů (testování toxicity vzorků na řasách a dafniích).

# 1. TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Azobarviva a jejich toxicita

Azobarviva se v přírodě nevyskytují, připravují se pouze syntetickou cestou a ve své molekule obsahují jednu nebo více azo skupin. Využívají se pro svou jednoduchost, všestrannost, efektivitu syntézy a vynikající optické vlastnosti a vysoké stálosti. Představují více jak 70 % komerčních barviv využívaných v různých odvětvích jako je zpracování kůže, kosmetika, farmacie, a především textilní průmysl. To vede ke vzniku odpadních vod a znečištění životního prostředí [1,2].

Některá textilní barviva se nevážou pevně na tkaninu, proto až 20 % barviva zůstává v odpadní vodě, která je v některých zemích bez úpravy vypouštěna do vodního prostředí. Kvalita vodních útvarů se zhoršuje, dochází ke zvýšení biochemické a chemické spotřeby kyslíku, snížení pronikání světla, zhoršuje se biologická aktivita vodní flory a fauny. Vypuštění odpadní vody bez vhodné úpravy představuje vážné ekotoxikologické ohrožení a může vést k bioakumulaci, jejíž vstup do potravinového řetězce může ovlivnit lidské zdraví. Toxické účinky azobarviv mohou být způsobeny jak samotnými barvivami, tak jejich metabolity, kterými jsou například arylaminy [2,3].

Další problém týkající se účinků azobarviv na ekosystémy se týká skutečnosti, že chemické testy samy o sobě dostatečně nevyjadřují dopad těchto znečišťujících látek. Pro stanovení toxických účinků jsou tedy nutné biologické organismy. Škodlivé účinky azobarviv ve vodních útvarech sahají daleko za vizuální znečištění, protože tato barviva obsahují aminy a benzidiny, které mají vysoký potenciál toxicity ve formě metabolitů po molekulární degradaci [1,2].

Styk s odpadní vodou z textilního průmyslu může vést k různým poškozením zdraví, jako je kvadruplegie, nekróza tkání nebo respirační toxicita. Některá barviva jsou méně toxická, ale po jejich redukci azo vazby mohou mít mutagenní účinek. Je tedy důležité znát toxicitu původního barviva v odpadní vodě, ale i sloučeniny, kterou nalezneme v chemicky upravené/vyčištěné vodě [2,3].

Saturnová barviva použitá v této práci jsou ve vodě rozpustná se silnou afinitou k celulóзовým substrátům. Jsou vhodná především pro vytahovací postup barvení. Lze je navzájem kombinovat. Jsou vhodná pro barvení artiklů, od kterých se vyžaduje dobrá světlostálost.

## 1.2 Heterogenní fotokatalýza

Heterogenní katalýza se řadí mezi tzv. pokročilé oxidační procesy a byla objevena v roce 1972 při štěpení vody ve fotoelektrochemickém článku obsahujícím monokrystalickou  $\text{TiO}_2$  elektrodu [4,5].

Proces heterogenní fotokatalýzy lze rozdělit do pěti dílčích kroků:

1. Přenos výchozích látek z tekuté fáze k povrchu katalyzátoru
2. Adsorpce výchozích látek na povrchu katalyzátoru
3. Fotochemická reakce na povrchu katalyzátoru
4. Desorpce produktů z povrchu katalyzátoru
5. Přenos produktů z povrchu katalyzátoru do tekuté fáze.

Při heterogenní fotokatalýze se používá především oxid titaničitý, ale dá se nahradit i jinými polovodiči jako například  $\text{WO}_3$ ,  $\text{CdTe}$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{SnO}$  nebo  $\text{AgNbO}_3$ . Obecně platí, že ideální katalyzátor by měl mít následující vlastnosti-silnou absorpci viditelného světla, dlouhou životnost excitovaného stavu, vysokou výtěžnost stavů separace náboje a dobrou mobilitu náboje. Stabilita a opětovná použitelnost katalyzátoru jsou dva důležité parametry, které je třeba vzít v úvahu při praktické aplikaci [4,5].

### 1.2.1 $\text{TiO}_2$

Oxid titaničitý je přirozeně vyskytující se minerál, který má všestranné využití. Je rozsáhle studován pro svou velkou povrchovou plochu, vynikající tepelnou a chemickou stabilitu, netoxicitu, vysokou odolnost vůči fotokorozi a dostupnost v různých krystalických formách s vysokou fotokatalytickou aktivitou [4,5].

Komerční použití čistého  $\text{TiO}_2$  jako fotokatalyzátoru je však stále omezené. Největšími překážkami jsou relativně nízká kvantová účinnost čistého  $\text{TiO}_2$ , a navíc jsou částice  $\text{TiO}_2$  aktivní pouze pod UV světlem, protože nemohou absorbovat světlo s vlnovými délkami většími než 398 nm [6].



### 1.3 Chemická spotřeba kyslíku

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) patří mezi skupinová stanovení organických látek ve vodách. Je definována jako množství kyslíku, které se za přesně vymezených podmínek spotřebuje na oxidaci organických látek ve vodě silným oxidačním činidlem. Test využívá silné chemické oxidanty v kyselém roztoku a teplo k oxidaci organického uhlíku na  $H_2O$  a  $CO_2$ . Udává se obvykle v  $mg \cdot l^{-1}$  jako hmotnost kyslíku, která je ekvivalentní spotřebě oxidačního činidla na 1 litr vody. Hodnota CHSK je tedy mírou celkového obsahu organických látek ve vodě, a tím i důležitým ukazatelem organického znečištění vody [7,8].

Jako oxidační činidlo bývá používán manganistan draselný v kyselém prostředí. Pak se hovoří o chemické spotřebě manganistanovou metodou ( $CHSK_{Mn}$ -Kubelova metoda), která se používá u pitných nebo podzemních vod. Častěji se používá jako oxidační činidlo dichroman draselný, v tomto případě hovoříme o chemické spotřebě kyslíku dichromanovou metodou ( $CHSK_{Cr}$ ), která se používá hlavně pro vody odpadní [7,8].

Princip stanovení  $CHSK_{Cr}$  spočívá v oxidaci organických látek ve vzorku roztokem  $K_2Cr_2O_7$  po dobu dvou hodin při teplotě  $150\text{ }^\circ C$  za přítomnosti silně koncentrované kyseliny sírové a katalyzátoru síranu stříbrného. Hodnota  $CHSK_{Cr}$  je úměrná koncentraci vyredukovaných chromitých iontů, které se stanovují spektrofotometricky, nebo je úměrná nezreagovanému množství dichromanu, které se stanovuje titrací s indikátorem ferroinem pomocí odměrného roztoku síranu železnato-amonného. Přidavkem síranu rtuťnatého se eliminují chloridy až do koncentrace  $1000\text{ } mg \cdot l^{-1}$  [7,8].

### 1.4 Celkový organický uhlík

Celkový organický uhlík (TOC) je parametr ukazující celkové množství organických látek přítomných ve zkoumaném vzorku vod a slouží jako nespecifický ukazatel kvality vody.

Pro stanovení TOC je nutné nejprve převést veškerý organický uhlík ve vodě na  $CO_2$ , čehož je možné dosáhnout buď termicky nebo chemickou oxidací.  $CO_2$  je pak stanovován metodami infračervené spektrometrie, plameno-ionizační detekcí nebo adsorpcí v roztoku a měřením vodivosti. Hodnoty TOC se udávají v  $mg/l$  [7].

Hodnota TOC pro pitné vody je  $5\text{ } mg/l$  a  $10\text{ } mg/l$  pro povrchové vody. Odpadní vody mají hranici  $50\text{ } 000\text{ } kg/rok$  v únicích organického uhlíku do vody [7].

## 1.5 Mikrobiologické testy

Speciální mikrobiologie studuje vlastnosti druhů a skupin mikroorganismů (např. mechanismus vyvolávající onemocnění nebo způsoby identifikace). Mikrobiologie je velice rozsáhlý obor, proto ho dělíme na podobory-bakteriologii, virologii, mykologii a parazitologii. Tato práce se zaměřuje pouze na bakteriologické testy [9].

### 1.5.1 Identifikační testy

Identifikace neznámých vzorků bakterií spočívá v hodnocení jejich morfologie (makroskopické a mikroskopické znaky, charakter růstu kolonií, identifikační barvení-Gramovo, acidorezistentní, tvorba pouzdra aj.), fyziologických (teplota růstu, vztah ke kyslíku, rezistence a tolerance k NaCl, antibiotikům aj.) a biochemických vlastností (redukce nitrátů, zdroje uhlíku, tvorba indolu aj.) [10].

#### 1.4.1.1 Gramovo barvení

Barvení podle Grama je jednou z nejdůležitějších technik používaných pro identifikaci bakterií. Teoreticky by se měly bakterie dělit do dvou skupin-grampozitivní (barví se modrofialově) a gramnegativní (barví se červeně). Některé bakteriální rody Gramovým barvením nelze obarvit, jsou to rody bez buněčné stěny (mykoplazmata), spirálovité bakterie a silně acidorezistentní rody (mykobakterie); např. *Mycobacterium bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a další [10,11].

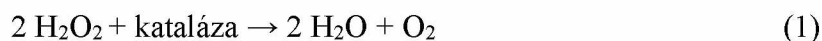
Grampozitivní bakterie mají silnější peptidoglykanovou buněčnou stěnu ve srovnání s gramnegativními bakteriemi. Jedná se o polymer o tloušťce 20 až 80 nm, zatímco peptidoglykanová vrstva gramnegativní buněčné stěny je silná 2 až 3 nm a pokrytá vnější lipidovou dvouvrstvou membránou [11].

Chybný výsledek může nastat pokud:

- 1) Nebude použita vhodně stará kultura
- 2) Dojde k fixaci stěru před zaschnutím
- 3) Nátěr bude příliš hustý
- 4) Nebude použita dost koncentrovaná krystalová violet
- 5) Vystavení jodu nebude dostatečné

#### 1.4.1.2 Katalázový test

Tento test se používá k určení přítomnosti enzymu peroxidázy. Kataláza urychluje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu (rovnice 1). Tato reakce se projeví viditelnou tvorbou bublin [10,12].



#### 1.4.1.3 Oxidázový test

Oxidázový test je biochemická reakce, která testuje přítomnost cytochrom c oxidáz. V přítomnosti organismu, který obsahuje enzym cytochromoxidázu, se redukované bezbarvé činidlo stává oxidovaným barevným produktem. Jako činidlo se nejčastěji používá *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-fenylendiamin (TMPD) nebo *N,N*-dimethyl-*p*-fenylendiamin (DMPD). Při oxidaci je bezbarvé činidlo v několika vteřinách tmavě modré až kaštanové [10,12].

### 1.5.2 Metody ke stanovení minimální inhibiční koncentrace

Ředící metody jsou nejvhodnější pro stanovení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC). Nabízejí možnost určit koncentraci antimikrobiální látky v bujónu nebo agaru. Zaznamenaná hodnota MIC je definována jako nejnižší koncentrace testované antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu, a obvykle se vyjadřuje v  $\mu\text{g/ml}$  nebo  $\text{mg/l}$  [10,13].

#### 1.5.2.1 Metoda ředění bujónu

Mikro nebo makro ředění bujónu je jednou z nejzákladnějších metod testování antimikrobiální citlivosti. Postup zahrnuje přípravu dvojkového ředění antimikrobiální látky (např. 1, 2, 4, 8, 16 a 32  $\mu\text{g/ml}$ ) v kapalném růstovém médiu dávkovaném ve zkumavkách obsahujících minimální objem 2 ml (makro ředění) nebo s menšími objemy s použitím 96 jamkové mikrotitrační destičky (mikro ředění). Poté se každá zkumavka nebo jamka naočkuje mikrobiálním inokulem o předem zvolené hodnotě na McFarlandově stupnici. Potom následuje inkubace [13].

McFarlandova metoda umožňuje stanovit koncentraci bakteriálních buněk v kapalném médiu jednou ze dvou instrumentálních technik: turbidimetrie nebo nefelometrie. Mikroby působí tak, že absorbují a rozptylují dopadající světlo, takže naměřená absorbance (turbidimetrie) nebo intenzita světla (nefelometrie) je přímo úměrná jejich koncentraci v médiu.

Makroředicí metoda má několik nevýhod – je zdlouhavá, má vysoké riziko chyby při přípravě antimikrobiálních roztoků pro každou zkoušku, spotřebuje se poměrně velké množství činidel a potřebuje větší prostor. Reprodukovatelnost a ekonomika činidel a prostoru, ke kterým dochází v důsledku miniaturizace testu, jsou tedy hlavními výhodami metody mikroředění. Je dobře známo, že velikost inokula, typ růstového média, inkubační doba a způsob přípravy inokula mohou ovlivnit hodnoty MIC, proto bylo ředění bujónu standardizováno pro testování kvasinek, vláknitých hub a bakterií, které rostou aerobně [13].

#### **1.4.2.2 Bakterie použité pro určení MIC**

##### ***Escherichia coli***

Rod *Escherichia*, který byl pojmenován po německém pediatrovi Theodoru Escherichovi se skládá z fakultativních anaerobních gramnegativních bacilů, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Rodový typ druhu *Escherichia coli* je široce rozšířen, je hlavním fakultativním anaerobem obývajícím tlusté střevo lidí a teplokrevných zvířat. Ačkoli většina kmenů *E. coli* žije neškodně v tlustém střevě a zřídka způsobuje onemocnění u zdravých jedinců. Řada patogenních kmenů může způsobit střevní a extraintestinální onemocnění jak zdravým, tak imunokompromitovaným jedincům [10,14].

*E. coli* je gramnegativní bacil, nesporulující, bičíkovitý a fakultativně anaerobní. Roste na MacConkey agaru, což znamená, že fermentuje laktózu. Identifikační testy katalázy jsou pozitivní a oxidázy jsou negativní [14].

##### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* – grampozitivní bakterie, které jsou kokovité a mají tendenci být uspořádány do klastrů, které jsou popsány jako "hroznové". Na médiích mohou tyto organismy růst až v 10 % solném roztoku a kolonie jsou často zlaté nebo žluté (aureus znamená zlatý nebo žlutý). Tyto organismy mohou růst aerobně nebo anaerobně (fakultativně), při teplotách mezi 18 °C a 40 °C. Typické biochemické identifikační testy zahrnují katalázu pozitivní (všechny patogenní druhy *Staphylococcus*), koagulázu pozitivní (k odlišení *Staphylococcus aureus* od jiných druhů *Staphylococcus*), a pozitivní fermentaci mannitolu (na odlišení od *Staphylococcus epidermidis*) [15].

Je to hlavní bakteriální lidský patogen, který způsobuje širokou škálu klinických projevů. Infekce jsou běžné jak v komunitním, tak v nemocničním prostředí a léčba zůstává náročná na zvládnutí kvůli vzniku multirezistentních kmenů, jako je MRSA (*Methicillin-*

*Resistant Staphylococcus aureus*). *S. aureus* se nachází v životním prostředí a také v normální lidské flóře, na kůži a sliznicích (nejčastěji nosní oblast) většiny zdravých jedinců. *S. aureus* obvykle nezpůsobuje infekci na zdravé kůži, pokud je však umožněno vstoupit do krevního oběhu nebo vnitřních tkání, mohou tyto bakterie způsobit řadu potenciálně závažných infekcí. Přenos je obvykle přímým kontaktem. Některé infekce však zahrnují jiné způsoby přenosu [10,15].

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je gramnegativní, aerobní, nesporulující tyčinka, která je schopna způsobit řadu infekcí jak u imunokompetentních, tak u imunokompromitovaných hostitelů. Způsobuje infekce mezi imunokompromitovanými hostiteli, je extrémně všestranná, rezistentní vůči antibiotikům a má širokou škálu dynamické obrany, což z ní činí extrémně náročný organismus k léčbě v moderní medicíně. Produkuje zelenomodrý pigment pyocyanin, který zbarvuje jak kolonie, tak i půdu kolem [10,16].

*P. aeruginosa* se běžně vyskytuje v životním prostředí, zejména ve sladké vodě. Může způsobit širokou škálu komunitních infekcí, jako je folikulitida. Je to obvykle oportunní patogen a je také důležitou příčinou nozokomiálních infekcí, jako je pneumonie spojená s ventilátorem, infekce močových cest spojené s katétrem a další. Nachází se běžně v nádržích v nemocničním prostředí zahrnujících pitnou vodu, kohoutcích, umyvadlech, zubních kartáčcích, výrobnících ledu, dezinfekčních roztocích a prostředcích, tuhých mýdlech, zařízeních pro respirační terapii nebo na endoskopech [10,16].

### ***Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis* je grampozitivní fakultativní anaerobní bakterie (kok v krátkých až středních řetězcích) vyskytující se normálně v lidské flóře. Je ekologicky tolerantní a má schopnost přežít drsné podmínky, protože vykazuje značné genetické polymorfismy. Může se vázat na dentin a odolávat působení hydroxidu vápenatého, zejména pokud není udržováno vysoké pH. Je častou příčinou infekce močových cest, bakteriémie a infekční endokarditidy. Zřídka způsobuje intraabdominální infekce a meningitidu. Má vnitřní rezistenci vůči některým antibiotikům. Získává a přenáší rezistenci na jiné bakterie prostřednictvím mobilních genetických prvků [10,17].

## 1.6 Ekotoxikologie

Ekotoxikologie, jak ukazuje stavba slova, je oborem nacházejícím se na hranici mezi ekologií a toxikologií. Zabývá se účinky škodlivých látek na faunu, flóru a ekosystémy. Kolem roku 1969 byla poprvé popsána v práci Truhauta, který ji definoval jako odvětví toxikologie, která studuje toxický efekt sloučenin na živé organismy, bez rozdílu, zda se jedná o rostliny či živočichy a zda jsou na souši nebo ve vodě. Na rozdíl od klinické toxikologie tedy nezkoumá účinky pouze na člověka [18,19,20].

Pro ekotoxikologii je důležité porozumět fyzikálním (např. molekulární struktura, sorbce, rozpustnost, atd.), biologickým (bioakumulace, biotransformace, atd.) a chemickým (např. oxidace, hydrolýza, fotolýza, atd.) faktorům ovlivňujícím koncentrace látky v prostředí [18,19].

### 1.6.1 Základní pojmy

**Chemická škodlivina** – látka, která je schopná způsobit poškození zdraví, odchylku od normálního stavu anebo vyvolat onemocnění. Z toxikologického hlediska lze každou chemickou látku považovat za potenciální škodlivinu, protože za určitých podmínek může mít každá látka negativní vliv na organismus.

**Jed** – na tento pojem existuje řada definic. Jednou z nich je: nevratnost účinku činí z látky jed. Laik definuje jed jako látku schopnou způsobit otravu.

**Expozice** – vystavení organismu účinku látky a proces vstupu škodlivé látky do organismu. Toxická látka se dostává do přímého kontaktu s biosystémem.

**Nebezpečnost škodliviny** – potenciální schopnost škodliviny vyvolat poškození zdraví. Čím je účinná dávka nižší, tím je nebezpečí škodliviny větší.

**Riziko** – pravděpodobnost, že za určitých podmínek se při expozici škodlivině dostaví poškození zdraví. Čím je nebezpečnost látky vyšší a způsob zacházení je méně bezpečný, je riziko vyšší.

**Účinek** – biologická změna, kterou svým působením škodlivina vyvolá. Je všeobecně známo, že čím je dávka vyšší tak je účinek vyšší. Projeví-li se účinek rychle po první dávce, tak mluvíme o akutním účinku. Je-li poškození vyvoláno po opakované či dlouhodobé expozici, tak hovoříme o chronickém účinku. Existuje oblast neúčinných koncentrací – práh účinku, kdy je účinek pozorován až nad danou hranicí [18,19].

**Dávka** – množství látky, které je přijaté do organismu. Nejčastěji se vyjadřuje v hmotnostních jednotkách škodliviny vztažených na jednotku tělesné hmotnosti organismu [ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ].

Nedochází-li k pozorovatelné změně, mluvíme o dávce neúčinné, podprahové.  $\text{ED}_{50}$  neboli střední účinná dávka způsobí sledovaný efekt u 50 % pokusných organismů.  $\text{LD}_{50}$  neboli střední smrtelná dávka je množství škodliviny, která způsobí úhyn 50 % testovaných organismů.

Další důležité pojmy v ekotoxikologii týkající se dávky jsou: nejvyšší dávka bez příznivého účinku (NOEL – no observed effect level), nejvyšší koncentrace bez nepříznivého účinku (NOEC – no observed effect concentration) a nejnižší koncentrace pozorovatelného účinku (LOEC – lowest observed effect concentration) [18,19].

### 1.6.2 Testy toxicity

Testy toxicity v laboratořích začínají u krátkodobých testů a postupně pokračují komplikovanějšími dlouhodobými testy. U všech těchto testů platí, že vyžadují kontrolu podmínek jako je teplota, pH nebo množství rozpuštěného kyslíku. Všechny testy musí mít kontrolu, aby bylo možné potvrdit, že pozorovaný účinek je vyvolán pomocí testované látky. Součástí testu je tedy vždy pozitivní a negativní kontrola [18,19].

**Pozitivní kontrola** – materiál, jehož efekt na testovaný organismus je známý. Ideálním toxikantem je látka, která je toxická již v nízkých koncentracích, je stabilní, rychle usmrcuje a dá se dobře a levně detekovat analytickými metodami [18,19].

**Negativní kontrola** – roztok (nejčastěji voda) o stejném chemickém složení, ale bez přítomnosti testované látky. Kontrola je vystavena stejným podmínkám i postupům a organismy jsou ze stejného zdroje jako ty, které jsou použity v testu. Negativní kontrola slouží k určení možného pozadí ovlivňujícího výsledky testu (např. stav organismu nebo kvalita ředící vody). Má velký význam pro konečnou podobu výsledků [18,19].

## 2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Azobarviva

Barviva vybraná pro tuto práci byla získána jako komerční vzorky od firmy Synthesia a.s..

#### 2.1.1 Saturnová modř LBRR 200

Saturnová modř LBRR 200 (C.I. Direct Blue 71, schéma 1), má molární hmotnost  $1030 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , sumární vzorec  $\text{C}_{40}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{Na}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$  a v absorpčním maximu ( $\lambda = 586 \text{ nm}$ , graf 1) je hodnota absorpčního koeficientu  $50\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [21].

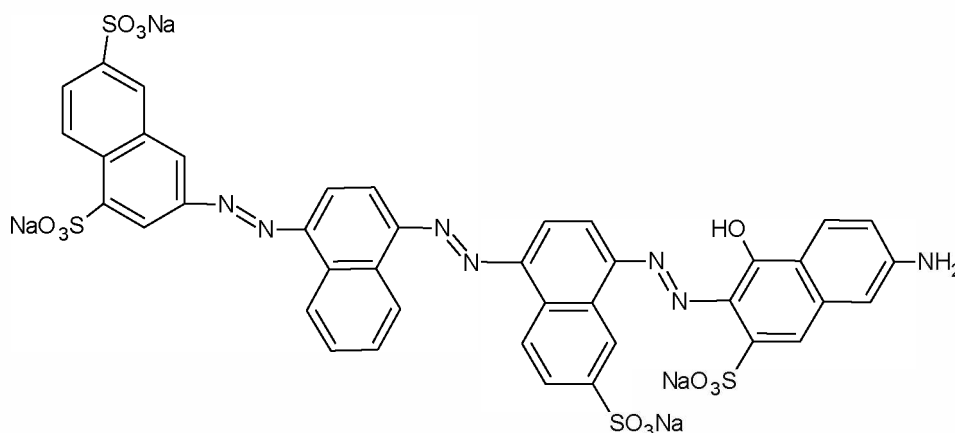


Schéma 1 - Direct Blue 71

#### 2.1.2 Saturnová žlut' LFF 200

Saturnová žlut' LFF 200 (C.I. Direct Yellow 28, schéma 2), má molární hmotnost  $681 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , sumární vzorec  $\text{C}_{28}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_4$  a v absorpčním maximu ( $\lambda = 396 \text{ nm}$ , graf 1) je hodnota absorpčního koeficientu  $15\,500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [20].

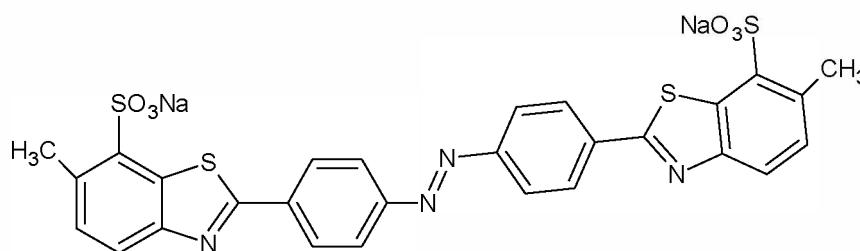


Schéma 2 - Direct Yellow 28



### 2.1.3 Saturnová červeň F3B 200

Saturnová červeň F3B 200 (C.I. Direct Red 80, schéma 3) má molární hmotnost 1265 g·mol<sup>-1</sup>; sumární vzorec C<sub>45</sub>H<sub>33</sub>N<sub>10</sub>NaO<sub>21</sub>S<sub>6</sub> a v absorpčním maximu ( $\lambda = 529$  nm, graf 1) je hodnota absorpčního koeficientu 24 300 l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> [20].

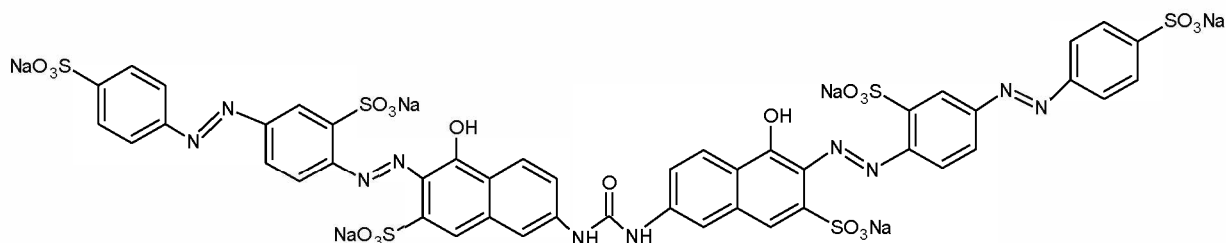
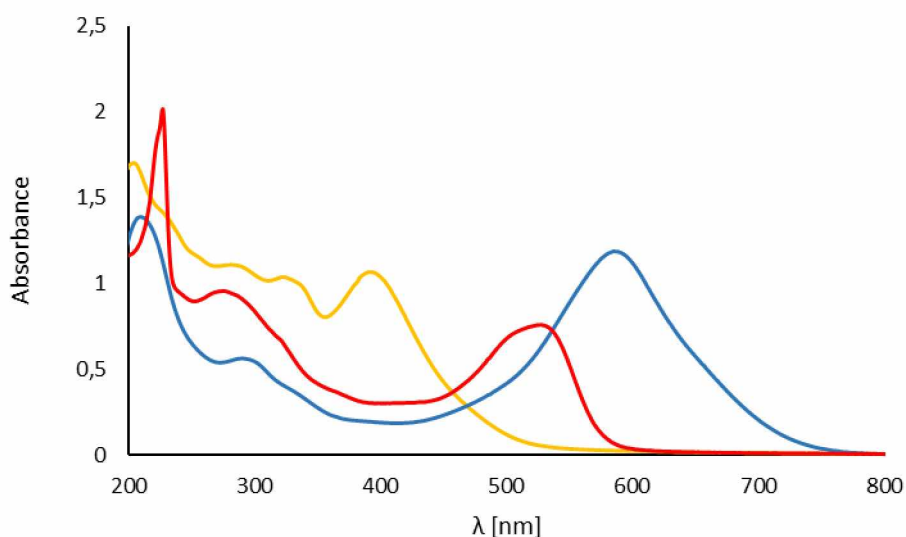


Schéma 3 - Direct Red 80



Graf 1 - UV/VIS absorpční spektra vybraných azobarviv (barvy křivek odpovídají barvám azobarviv)

## 2.2 UV/VIS absorpční spektrofotometrie

Pro měření absorpčních spekter byl použit UV/VIS spektrofotometr Hewlett Packard 8453. Vzorky byly proměřovány v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm.

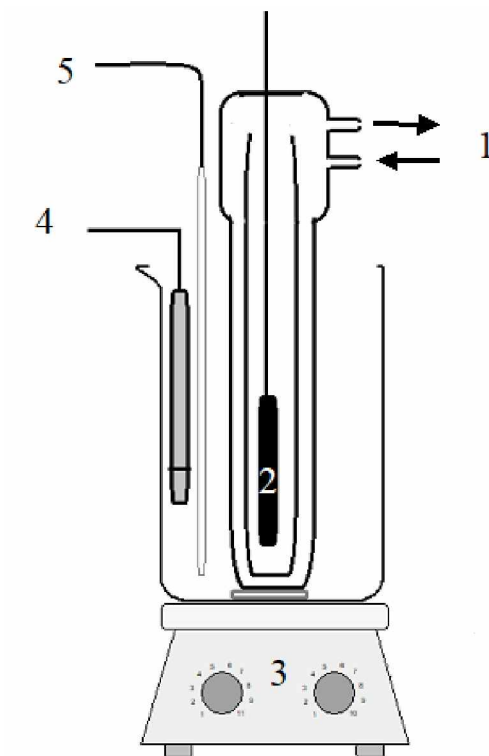
Koncentrace roztoků pro fotolýzu byla vypočtena s použitím Lambert-Beerova zákona (rovnice 2).

$$A = c \cdot l \cdot \varepsilon \quad (2)$$

kde A je absorbance, c je koncentrace vzorku [mol·l<sup>-1</sup>], l je tloušťka kyvety a  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [l·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>].

## 2.3 Fotochemický reaktor

Pro fotolýzu byl použit ponorný vsádkový fotoreaktor (obrázek 1). Jako zdroj záření byla použita vodou chlazená vysokotlaká rtuťová výbojka Philips HPLN – 150 s příkonem 63 W ( $I = 0,72$  A,  $U = 88$  V).



Obrázek 1 - Ponomý fotoreaktor

*1-cirkulace chladícího média, 2-zdroj záření, 3-magnetické míchadlo, 4-pH elektroda, 5-přívod vzduchu*

## 2.4 Fotolýza barviv

Postup pro fotolýzu Saturnové modři byl následující: Do fotoreaktoru bylo předloženo 400 ml destilované vody, zapojeno probublávání vzduchem, chlazení a zapnula se lampa. Navážka barviva (tabulka 1) byla rozpuštěna v 50 ml destilované vody.  $\text{TiO}_2$  byl suspendován v 50 ml destilované vody a vložen do ultrazvukové lázně na 30 minut. V okamžiku smísení barviva s vodou a fotokatalyzátorem byl odebrán vzorek (čas 0 min). V pravidelných časových intervalech byl odebírán 1 ml vzorku do zkumavky a zředěn destilovanou vodou na 10 ml. Odebrané vzorky byly odstředěny (15 min,  $\text{TiO}_2$  se usadil na dně zkumavky) a bylo změřeno absorpční spektrum. Fotolýza byla vždy ukončena v době, kdy se poslední dva odebrané vzorky shodovaly a nedocházelo tedy již k odbarvování a rozkladu. Tento postup se opakoval i pro ostatní barviva (Saturnová žluť a červeně).

**Tabulka 1** - Příprava roztoků pro fotokatalýzu

<b>Barvivo</b>	<b>Navážka barviva [g]</b>	<b>Navážka TiO<sub>2</sub> [g]</b>
<b>Saturnová modř LBRR 200</b>	0,110	0,202
<b>Saturnová žlut LFF 200</b>	0,110	0,202
<b>Saturnová červen F3B 200</b>	0,115	0,203

## **2.5 Elementární analýza**

Elementární analýzy vzorků byly měřeny na přístroji FLASH 2000. Principem metody je spálení vzorku ve spalovací peci v proudu kyslíku při vysoké teplotě, následná katalytická redukce, záchyt nežádoucích složek, separace jednotlivých vzniklých plynů na krátké chromatografické koloně s detekcí na TCD detektoru a identifikací pomocí ovládacího softwaru.

## **2.6 CHSK**

Chemická spotřeba kyslíku byla stanovena pomocí kyvetových testů LCI400 od firmy Hach. Tyto testy jsou pro stanovení hodnoty CHSK 0-1000 mg/l O<sub>2</sub>.

Ve všech kyvetách byla nejprve rozmíchána usazenina několikanásobným převrácením kyvety. Do první kyvety byly pipetovány 2 ml destilované vody – slepý pokus. Do dalších dvou kyvet se pipetovaly 2 ml barevného a odbarveného vzorku a všechny kyvety se vložily do termostatu (148 °C, 2 hodiny). Po ochlazení na 60 °C byly kyvety z termostatu vyndány, promíchány a nechány vychladnout na pokojovou teplotu. Do spektrofotometru byl nejprve vložen slepý pokus (kyvety mají na sobě čárové kódy, takže nebylo potřeba nic nastavovat) a poté byly proměřeny vzorky. Všechny vzorky – barevné i odbarvené se testovaly 2× pro kontrolu výsledků.

## 2.7 Ředění bujónu

### 2.7.1 Příprava kultivačních médií

Byl navážen práškový agar nebo bujón a následovalo jeho rozpuštění v destilované vodě, jejíž objem odpovídal poměru udávanému výrobcem na obalu. Lahve se uzavřely víčkem, na baňky se dal alobal s popisem a následovala sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 103 kPa.

Po vychladnutí byl agar rozlíván do Petriho misek ve sterilní místnosti v blízkosti hořícího kahanu a po ztuhnutí byly misky otočeny a uschovány v lednici při teplotě 2–5 °C. Tekutá média se uschovala v Erlenmayerových baňkách při teplotě 2–5 °C. Složení jednotlivých kultivačních médií je uvedeno v tabulce 2 a 3.

**Tabulka 2** - Složení TSA

<b>TSA (trypton-sójový agar)</b>	
<b>Kasein natrávený tryptokázou</b>	15 g
<b>Pepton</b>	5 g
<b>Chlorid sodný NaCl</b>	5 g
<b>Agar</b>	15 g
<b>Destilovaná voda</b>	1000 ml
<b>Výrobce</b>	HiMedia, Mumbai, India

**Tabulka 3** - Složení MH bujónu

<b>MH bujón (Mueller-Hinton)</b>	
<b>Hovězí extrakt</b>	2 g
<b>Pepton</b>	17,5 g
<b>Škrob</b>	1,5 g
<b>Destilovaná voda</b>	1000 ml
<b>Výrobce</b>	HiMedia, Mumbai, India

### 2.7.2 Příprava fyziologického roztoku

Příprava zahrnovala navážení chloridu sodného a jeho rozpuštění v destilované vodě, jejíž objem odpovídá poměru na přípravu 0,85 % roztoku. Roztok byl následně sterilizován při teplotě 121 °C a tlaku 215 kPa. Po ochlazení byl roztok uchováván v Erlenmayerově baňce při teplotě 2-5 °C.

**Tabulka 4** - Složení fyziologického roztoku

Fyziologický roztok	
Chlorid sodný NaCl	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

### 2.7.3 Příprava čistých mikrobiálních kultur

Pro stanovení hodnoty MIC byly použity 24 hodinové sbírkové kultury od CCM (České sbírky mikroorganismů, což je specializované vědecko-servisní pracoviště, které uchovává a poskytuje kultury mikroorganismů pro potřeby základního a aplikovaného výzkumu, průmyslové využití, rutinní laboratoře, biotechnologie a výuku). Z těchto kultur byla vytvořena bakteriální suspenze, jejíž denzita se určila pomocí McFarlandovy stupnice (tabulka 5). McFarlandovou stupnicí se určuje přibližný počet CFU/ml, což je počet bakterií v 1 ml bakteriální suspenze.

**Tabulka 5** - McFarlandova zákalová tabulka ke stanovení počtu bakterií

Stupeň	Koncentrace 10 <sup>8</sup> CFU/ml
0,5	1,5
1	3
2	6
3	9

## 2.7.4 Postup určení hodnoty MIC

Byla připravena všechna potřebná média podle návodu. Skleněné zkumavky s víčky a špičky byly vysterilizovány a vše se připravilo na pracovní plochu. Do 4 skleněných zkumavek bylo pipetováno 5 ml fyziologického roztoku a do každé zkumavky byla přidána kultivace bakterie (naočkovaná na TSA agar den dopředu a daná do termostatu na 24 hodin při 37 °C) pomocí kličky. Suspenze se vždy promíchala a změřila, aby se docílilo hodnoty zákalu 1 na McFarlandově zákalové stupnici. Připravily se destičky. V první a třetí řadě se do prvních třech jamek pipetovalo 900  $\mu$ l MH bujónu – pozitivní kontrola (PK), do dalších třech jamek se pipetovalo 1 000  $\mu$ l odbarveného vzorku – negativní kontrola (NK). Do druhé a čtvrté řady se od druhé do šesté jamky pipetovalo vždy 900  $\mu$ l MH bujónu. Do prvních jamek přišlo 1800  $\mu$ l odbarveného vzorku. Z těchto prvních jamek se pipetou odebralo 900  $\mu$ l vzorku do druhé jamky, promíchalo a zase přepipetovalo do jamky další – dvojkové ředění (schéma 4). Zbylých 900  $\mu$ l se nechalo ve špičce a ta se vyhodila do odpadu. Nakonec se vždy do každé jamky kromě NK pipetovalo 100  $\mu$ l připravené bakteriální suspenze. Do prvních dvou řad se pipetovala suspenze bakterie *E. coli*, do dalších dvou řad se pipetovala suspenze *Enterococcus faecalis*. Druhá destička se připravila stejně a pipetovala se suspenze bakterií *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Postup se opakoval pro vzorek roztoku barviva. Destičky se daly do termostatu na 48 hodin při 37 °C.

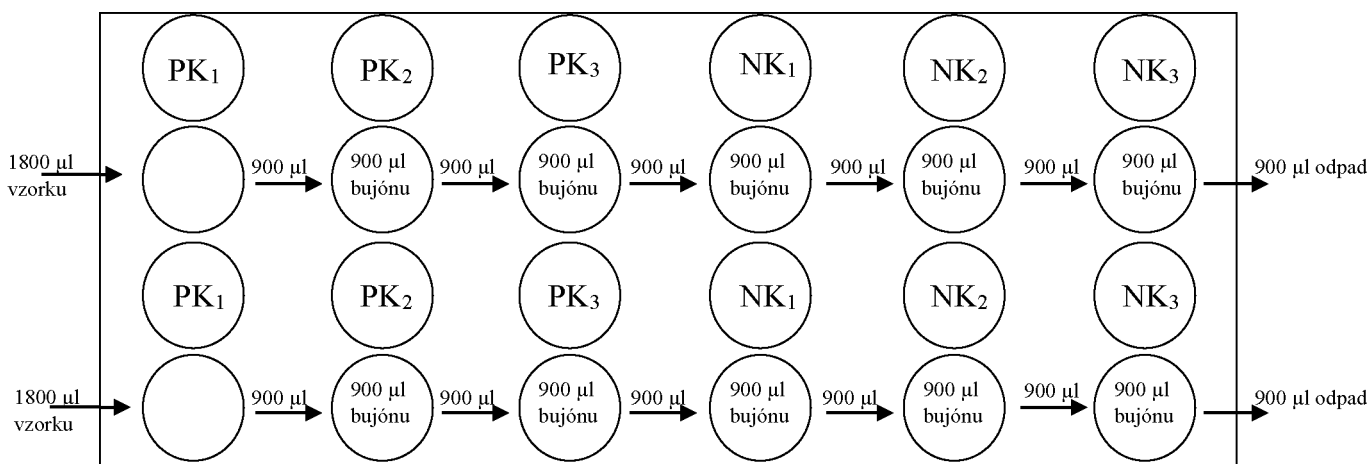
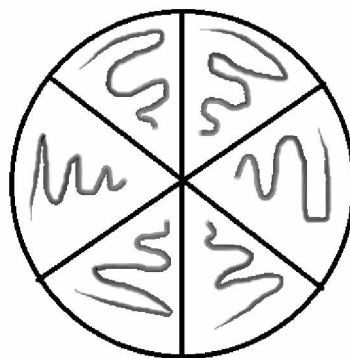


Schéma 4 - Dvojkové ředění

Po 48 hodinách byly destičky vyndány z termostatu a bakterie přeočkovány z každé jamky na připravené misky s TSA agary, které se rozdělily na 6 částí (obrázek 2). Takto vzniklo dohromady 16 naočkovaných misek, které se daly na dalších 24 hodin do termostatu (37 °C). Následující den byly misky vyndány, vyhodnotil se nárůst bakterií, nafotily se výsledky a vše se zlikvidovalo jako biologický odpad.

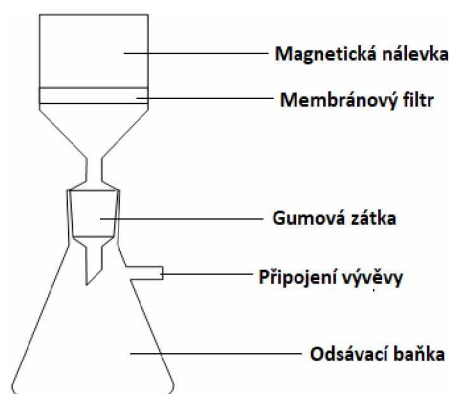


Obrázek 2 - Příklad očkování TSA agaru

Pro reprodukovatelnost výsledků se tyto testy pro každý barevný i odbarvený vzorek provedly dvakrát. Dohromady tedy bylo použito 96 misek s TSA agary a jednalo se o 576 vzorků.

## 2.8 Membránová filtrace

Pro určení přítomnosti bakterií ve vzorku byla provedena membránová filtrace. Filtry byly od firmy PALL o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Do sterilní aparatury (obrázek 3) se dal sterilní pinzetou membránový filtr a zapnula se vývěva. Sterilní pipetou se pipetovalo 10 ml vzorku do nálevky. Po ukončení filtrace byla vývěva vypnuta, vyndal se membránový filtr sterilní pinzetou a položil se do středu misky s TSA agarem a miska se vložila do termostatu (30 °C, 48 hodin). Tento test byl proveden pro vzorek obarvené, odbarvené i destilované vody.



Obrázek 3 - Filtrační aparatura

Bakterie, které se na filtru po dvou dnech objevily, byly pomocí kličky naočkovány na misky s TSA agarem a dány do termostatu (37 °C, 24 hodin) a podrobeny identifikačním testům.

## **2.9 Gramovo barvení**

### **2.9.1 Činidla a zařazení**

Mezi činidla potřebná pro Gramovo barvení patří:

- 1) Krystalová violet
- 2) Lugolův roztok (vodný roztok elementárního jodu a jodidu draselného)
- 3) Ethanol jako odbarvovač
- 4) Destilovaná voda
- 5) Safranin nebo Karbolfuchsin

### **2.9.2 Postup Gramova barvení**

Nejprve byla připravena sklíčka. Před nanesením bakteriálního inokula se vyžihala nad plamenem. Na sklíčko se nanasla kapka fyziologického roztoku a pomocí kličky se nabrala bakteriální suspenze a rozetřela. Sklíčko bylo poté necháno vedle kahanu, aby zaschnulo a poté bylo plamenem zafixováno.

Na zafixovanou kulturu byla nanesena krystalová violet a nechala se 30 sekund působit. Poté byla smyta pomocí Lugolova roztoku. Ten byl na sklíčku nechán 30 sekund působit. Pomocí ethanolu se vše smylo, a nakonec opláchlo destilovanou vodou. Na závěr se na sklíčko nakapal safranin a nechal se působit 60 sekund. Sklíčko se opláchlo destilovanou vodou a nechalo uschnout.

Na zaschlé sklíčko se dala kapka imerzního oleje a vložilo se do mikroskopu. Takto byly otestovány všechny bakteriální kultury z membránové filtrace.

## **2.10 Oxidázový test**

Tento test byl proveden pomocí napuštěných papírků detekčním činidlem. Papírek se vzal plastovou pinzetou a lehce se ním přejelo po bakteriální kultuře na TSA agaru. Pozitivní reakce byla pozorována rychlým zmodráním papírku v místě kontaktu s bakterií.



## 2.11 Katalázový test

Na vyžíhané sklíčko byla pomocí kličky nanесena kultura testované bakterie. Kapátkem se přidala kapka 3 % peroxidu vodíku. Pozitivní výsledek se projevil ihned tvorbou bublin.

## 2.12 NEFERMtest 24

Tento test je určen pro identifikaci gramnegativních nefermentujících bakterií a dodává ho firma Erba Lachema. Tato souprava umožňuje identifikaci až 40 kmenů pomocí 24 biochemických testů na mikrotitrační destičce.

Z 24 hodin staré kultury bylo připraveno 5 ml fyziologického roztoku o hodnotě zákalu 2,1 na McFarlandově zákalové stupnici. Připravily se 2 testy-pro testování bakterií z odbarveného i barevného vzorku. Postupovalo se přesně podle návodu a do všech 24 jamek bylo pipetováno 100  $\mu$ l připraveného inokula. K prvním pěti jamkám prvního řádku testu se přidaly vždy dvě kapky parafínového oleje. Destička s testy se přikryla rámečkem a dala do inkubačního sáčku. Takto připravená destička se odnesla do termostatu (37 ° C, 24 hodin).

Po inkubaci se odečetly všechny barevné změny (obrázek 4 a 5) podle návodu a výsledky se zapsaly do formuláře na výsledky, který byl součástí balení testů. Formuláře se vzaly k počítači s nainstalovaným programem ErbaExpert. Program podle zadaných dat vyhodnotil, o které bakterie se pravděpodobně jedná.



**Obrázek 4** - NEFERMtest 24 před inkubací



**Obrázek 5** - NEFERMtest 24 po inkubaci

## 2.13 Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic

**OECD** – Organizace pro hospodářství a rozvoj je mezinárodní organizace, která dala dohromady více jak 150 nejvýznamnějších mezinárodně dohodnutých testovacích metod používaných vládou, průmyslem a soukromými laboratořemi k identifikaci potencionálních rizik chemických látek. Jedná se o metody, které se používají při testování bezpečnosti a registraci chemických látek. Mohou být také použity v procesu výběru chemikálií při výzkumu a výrobě nových chemických látek.

Testování bylo provedeno podle směrnice OECD/OCDE 201 „Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test“, která byla přijata v roce 2006. Tento test slouží ke stanovení akutní toxicity chemických látek na sladkovodní řasy a sinice. Testované koncentrace vzorků azobarviv a jejich fotolytů se kultivují s řasovou kulturou 72 hodin. Metoda je nejsnáze použitelná pro látky rozpustné ve vodě. Při testování těkavých látek nebo zbarvených roztoků se může postup dle potřeby upravit.

### 2.13.1 Referenční látka

Jako referenční látka se používá látka určená pro kontrolu zkušebního postupu. Pro tuto metodu se nejčastěji používá  $K_2Cr_2O_7$  nebo 3,5 – dichlorfenol, obě tyto chemikálie se hodí jako referenční látka pro zelené řasy. Zkouška s referenční látkou slouží k ověření kvality zkušebních organismů (řasových kultur) a podmínek v laboratoři. Provádí se minimálně dvakrát ročně a data se musí zaznamenávat, protože výsledky se poté porovnávají s ostatními laboratořemi.

### 2.13.2 Popis metody

#### 2.13.2.1 Testovací organismus

Pro tento test lze využít několik druhů mikrořas a sinic. Z řas jsou to například *Pseudokirchneriella subcapitata* nebo *Desmodesmus subspicatus* (tabulka 6) a ze sinic *Synechococcus leopoliensis* a *Anabaena flos-aquae*. Pro tuto práci byla jako testovací organismus vybrána zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* (dříve známá jako *Scenedesmus subspicatus*) Brinkmann 1953/SAG 86.8 ze sbírky autotrofních organismů CCALA Třeboň (obrázek 6).

**Tabulka 6** - Klasifikace *Desmodesmus subspicatus*

<b>Kmen</b>	<i>Plantae</i>
<b>Třída</b>	<i>Chlorophyceae</i>
<b>Řád</b>	<i>Sphaeropleales</i>
<b>Čeleď</b>	<i>Scenedesmaceae</i>
<b>Rod</b>	<i>Desmodesmus subspicatus</i>

Kmenové kultury se přeočkují ze šikmého agaru nebo živného média a pěstují se v 250 ml Erlenmayerových baňkách se 100 ml zkušebního média, na přímém světle a při laboratorní teplotě.



**Obrázek 6** - *Desmodesmus subspicatus* [22]

#### **2.13.2.2 Inokulační kultura**

Řasové inokulum pro test se odebírá z předkultury. Kmenová kultura se nasadí 2–4 dny před začátkem zkoušky. Pro provedení testu je potřeba koncentrace 5000 buněk v 1 ml. Buňky se nejprve spočítají ve 40 velkých čtvercích Bürkerovy komůrky, počty se zapisují do tabulky 7.

**Tabulka 7 - Stanovení objemu inokula**

Počet buněk										součet

**Výpočet objemu inokula (rovnice 3)**

$$x = \frac{V \cdot c}{a} \quad (3)$$

kde: x = potřebný objem inokula

c = požadovaná hustota řasové kultury (5000 buněk v 1 ml)

V = objem testovaného roztoku v ml (200 ml)

a = hustota inokulační kultury

**Výpočet počtu řasových buněk v 1 ml (rovnice 4)**

$$a = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot 1000}{P} \quad a = \frac{p \cdot 25 \cdot 10 \cdot 1000}{40} \quad (4)$$

kde: a = počet buněk v 1 ml

p = součet buněk ve všech počítaných velkých čtvercích

v = převratná hodnota plochy jednoho čtverce, v němž jsou buňky počítány

h = převratná hodnota hloubky komůrky

1000 = přepočítání na 1 ml

P = počet počítaných čtverců

### 2.13.2.3 Zkušební médium

K přípravě roztoků živin se používá voda s konduktivitou menší než 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , což odpovídá deionizované nebo demineralizované vodě. Připraví se čtyři zásobní roztoky, které se každé 3 měsíce mění a z těch se poté připraví konečné živné médium (tabulka 8).

**Tabulka 8** - Složení médií k přípravě živného roztoku

Roztok 1 – makrosložky živin	$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 g
Roztok 2 – Fe-EDTA	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100 mg
Roztok 3 – stopové prvky	$\text{H}_3\text{BO}_3$	185 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg
	$\text{ZnCl}_2$	3 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg
Roztok 4 – $\text{NaHCO}_3$	$\text{NaHCO}_3$	50 g

Všechny tyto roztoky byly doplněny deionizovanou vodou do 1000 ml a uschovány v lednici při 4 °C. Zkušební živné médium bylo připraveno smícháním 10 ml roztoku 1 a 1 ml roztoku 2, 3 a 4 a doplněno do 1000 ml odměrné baňky deionizovanou vodou.

### 2.13.3 Průběh testu

#### 2.13.3.1 Testování barevných vzorků

Bylo připraveno čerstvé zkušební médium. Poté se navážilo 50 mg barviva a rozpustilo v 500 ml zkušební média. Z takto nachystaného zásobního roztoku barviva se připravily vzorky. Udělalo se 5 roztoků vzorků, které se připravovaly do 200 ml odměrných baněk podle tabulky 9. Přidalo se vypočítané množství řasové kultury odpovídajícího

5000 buňkám na 1 ml a doplnily se zkušebním médiem po rysku (obrázek 7). Vždy se musela připravit i kontrola, která obsahovala jenom zkušební médium a řasovou kulturu.

**Tabulka 9** - Dávkování barevných vzorků

mg/l	100	50	10	5	1
ml/200 ml	200	100	20	10	2



**Obrázek 7** - Koncentrační řada pro Saturnovou žlut' a kontrola

Z takto připravených vzorků se odlilo  $3 \times 50$  ml do Erlenmayerových baněk, které se uzavřely zátkami z buničiny, aby se k řasám nadále dostával vzduch. Baňky se vložily do laboratorní třepačky, která nepřetržitě 72 hodin třepala se vzorky za stálého osvětlení bílým světlem. Ve zbylých 50 ml vzorků se změřilo počáteční pH roztoků.

Test se vzorkem Saturnové modři se musel pro intenzitu zbarvení upravit. Do Erlenmayerových baněk se odměřilo jen  $3 \times 20$  ml, aby došlo k osvětlení vzorků a řasy měly přirozené prostředí.

### 2.13.3.2 Testování vzorků po fotokatalýze

Připravilo se čerstvé zkušební médium. Poté se rovnou do odměrných baněk připravila koncentrační řada podle tabulky 10. Protože nebyla známa koncentrace roztoku, byla koncentrační řada připravena dvojkovým ředěním. Do první baňky byly přidány zásobní roztoky živin č. 1, 2, 3 a 4 v množství pro přípravu 200 ml, aby i první vzorek obsahoval živiny potřebné pro růst řas.

**Tabulka 10** - Koncentrační řada vzorků po fotokatalýze

ml/200 ml	200	100	50	25	12,5
-----------	-----	-----	----	----	------

Ke vzorku byly přidány řasy a roztoky se doplnily po rysku zkušebním médiem. Poté byl již postup stejný jako u barevných vzorků.

Po 72 hodinové kultivaci byl spočítán počet řasových buněk v každé Erlenmayerově baňce a změřeno pH na konci testu u každé koncentrace.

#### 2.13.4 Vyhodnocení testu

##### Průměrná růstová rychlost

Průměrná specifická růstová rychlost  $\mu$  je pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními i exponovanými vzorky a vypočítá se podle následující rovnice 5:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (5)$$

kde:  $\mu_{i-j}$  = růstová rychlost od doby  $i$  do doby  $j$

$X_i$  = biomasa v době  $i$

$X_j$  = biomasa v době  $j$

Procentuální inhibice růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky se vypočítá z rovnice 6:

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \cdot 100 \quad (6)$$

kde:  $I_r$  = procentuální inhibice průměrné specifické rychlosti

$\mu_c$  = střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti v kontrolní skupině

$\mu_T$  = průměrná specifická růstová rychlost u opakování s exponovaným vzorkem

## 2.14 Zkouška akutní imobilizace dafnií

Testování bylo provedeno podle směrnice OECD/OCDE 202 *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test“, která byla přijata v roce 2004. Tento test slouží ke stanovení akutní toxicity chemických látek na dafnie. Testované koncentrace vzorků azobarviv a jejich fotolytů se kultivují s dafniemi po dobu 48 hodin pro zjištění hodnoty EC<sub>50</sub>.

EC<sub>50</sub> – koncentrace odhadnutá pro imobilizaci 50 % dafnií během stanovené expoziční doby

Akutní toxicita se u dafnií sleduje jako imobilizace po 24 a 48 hodinách. Dafnie neschopné plavat do 15 sekund po lehkém zamíchání se považují za imobilizované (schopnost hýbat tykadly se nebere jako schopnost plavat).

### 2.14.1 Referenční látka

Jako referenční látky se používají toxické roztoky, které se běžně využívají v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách. Kontrolují tak, zda jsou testovací podmínky spolehlivé. Jako kontrola slouží hodnota EC<sub>50</sub>, která má například pro K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> po 24 hodinách hodnotu v rozmezí 0,6 – 1,7 mg/l. Zkouška s referenční látkou se provádí minimálně dvakrát za rok.

### 2.14.2 Testovací organismus

Preferovaným druhem pro tuto zkoušku je *Daphnia magna Straus* (tabulka 11). Nedoporučuje se používat první generaci. Nesmí být však starší více než 24 hodin a musí být chovány v podobných kultivačních podmínkách jako v průběhu testu. Nebudou-li podmínky stejné, je potřeba dát dafniím čas na aklimatizaci.

**Tabulka 11** - Klasifikace *Daphnia magna Straus*

<b>Kmen</b>	členovci ( <i>Arthropoda</i> )
<b>Podkmen</b>	korýši ( <i>Crustacea</i> )
<b>Třída</b>	lupenonožci ( <i>Branchiopoda</i> )
<b>Řád</b>	perloočky ( <i>Cladocera</i> )
<b>Čeleď</b>	hrotnatkovití ( <i>Daphniidae</i> )



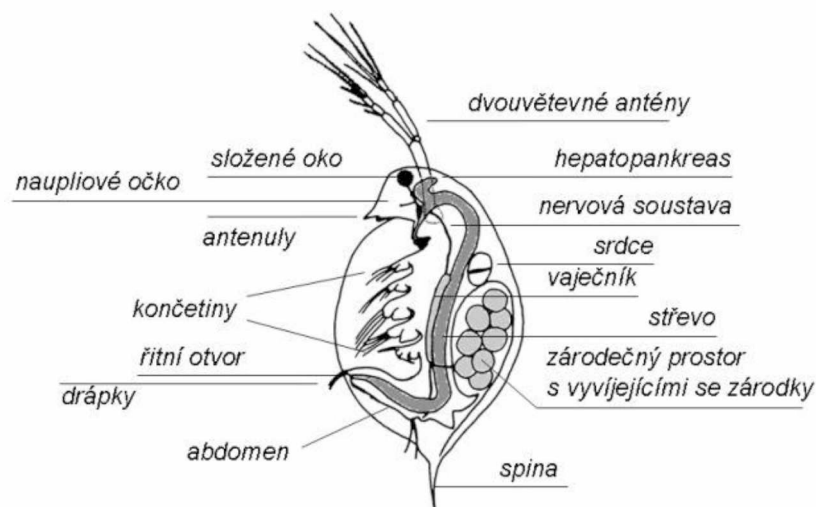
*Daphnia magna* Straus nebo česky Hrotnatka velká (obrázek 8 a 9) je poměrně jednoduchý organismus pro kultivaci – dobře se s ní manipuluje, má krátkou generační periodu a ideální velikost. Dále také citlivě reaguje na cizorodé látky a změny prostředí. Je to velice rozšířený druh a testy s ní mají značnou vypovídací hodnotu.



Obrázek 8 - *Daphnia magna* [23]

Hrotnatky si dlouhodobě udržují matriarchát. Množí se partenogenezí a tvoří tak pouze samice. V zárodečném prostoru samice zraje najednou až 60 diploidních vajíček a snůška může za dobrých podmínek proběhnout za 1 až 2 dny. Mláďata jsou shodná geneticky s matkou. Hrotnatka se stává dospělou v době její první snůšky mláďat.

Nastane-li krizová situace (dojde ke zhoršení podmínek) začnou se líhnout i samci. Zhoršením podmínek je myšlen úbytek potravy nebo změna složení vody či její teplota.



Obrázek 9 - *Daphnia magna* popis [24]

### 2.14.3 Zřed'ovací voda

K přípravě pracovních roztoků se používá voda s konduktivitou menší než 5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , což odpovídá deionizované nebo demineralizované vodě. Standardní zřed'ovací voda se připraví smísením 2,5 ml zásobních roztoků A, B, C a D a doplní do 1000 ml v odměrné baňce deionizovanou vodou.

**Tabulka 12** - Složení zřed'ovací vody

A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	117,6 g
B	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	49,3 g
C	$\text{NaHCO}_3$	25,9 g
D	KCl	2,3 g

Všechny zásobní roztoky v tabulce 12 jsou připraveny rozpuštěním navážky v 1000 ml deionizované vody.

Připravená zřed'ovací voda má mít hodnotu  $\text{pH } 7,8 \pm 0,2$ . Pokud je třeba  $\text{pH}$  upravit, přidá se NaOH nebo HCl. Zásobní roztoky i zřed'ovací voda se uchovávají v lednici při teplotě 4-10  $^{\circ}\text{C}$ . Expirace zásobních roztoků jsou 3 měsíce.

### 2.14.4 Průběh zkoušky

Zkouška se provádí ve dvou paralelních řadách pro jednu koncentraci vždy s 10 ks dafnií v jedné kádince. Paralelně se vždy nasadí kontrolní zkouška se zřed'ovací vodou bez testované látky.

#### 2.14.4.1 Testování barevných vzorků

Byla připravena čerstvá zřed'ovací voda. Poté se navážilo 50 mg barviva a rozpustilo v 500 ml zřed'ovací vody. Z takto nachystaného zásobního roztoku barvy se připravily vzorky. Udělaly se 4 roztoky vzorků, které se připravovaly do 200 ml odměrných baněk a doplnily se zřed'ovací vodou po rysku. Vždy se musela připravit i kontrola, která obsahovala jenom zřed'ovací vodu a dafnie. Poté se do dvou kádinek vždy odměřilo 50 ml vzorku, vzniklo 8 kádinek se vzorky a 2 kádinky jako kontrola. Do všech kádinek se přidalo 10 dafnií, které nebyly starší jak 24 hodin. Ve zbylých 100 ml vzorků se změřilo  $\text{pH}$  a množství kyslíku oximetrem.

Kádinky s dafniemi se přenesly do místnosti, kde se udržuje teplota 20 °C a přiklopily se, aby nedošlo ke ztrátě vody odpařením nebo vniknutí nečistot z okolí. Po 24 a 48 hodinách se zaznamenala imobilizace dafnií a po 48 hodinách na konci testu se změřilo pH a množství kyslíku.



**Obrázek 10 -** *Koncentrační řada pro Saturnovou červeň a kontrola*

#### **2.14.4.2 Testování vzorků po fotokatalýze**

Připravila se čerstvá zředovací voda. Poté se rovnou do odměrných baněk připravila koncentrační řada 4 roztoků, ale protože nebyla známa koncentrace roztoku, byla koncentrační řada připravena dvojkovým ředěním. Do první baňky byly přidány zásobní roztoky A, B, C a D (tabulka 12) v množství pro přípravu 200 ml, aby i první vzorek obsahoval živiny potřebné pro dafnie. Poté se postupovalo stejně jako u barevných vzorků.

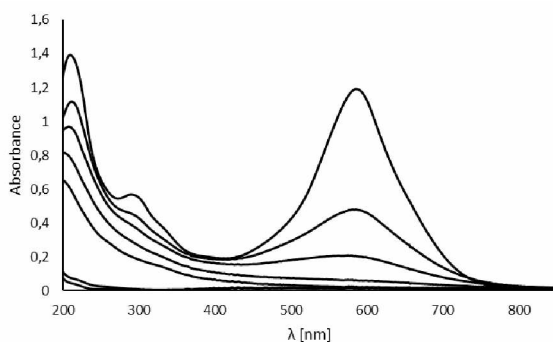
#### **2.14.5 Vyhodnocení EC<sub>50</sub>**

Hodnoty jednotlivých koncentrací a odpovídající imobilizace v % se seřadila do tabulky a vyhodnotila EC<sub>50</sub> pro 24 a 48 hodin. Pro hodnoty vyšší, než 100 mg/l se nemusí EC<sub>50</sub> vyhodnotit přesně. Cílem je prokázat, že hodnota EC<sub>50</sub> je vyšší jak tato koncentrace. Imobilizace v kontrolní skupině nesmí na konci zkoušky překročit 10 % pro platnost testu.

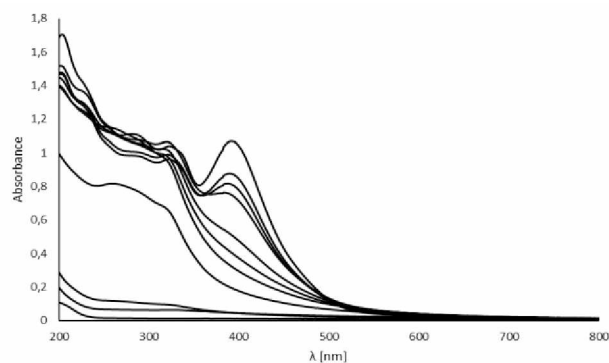
### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 Fotokatalýza

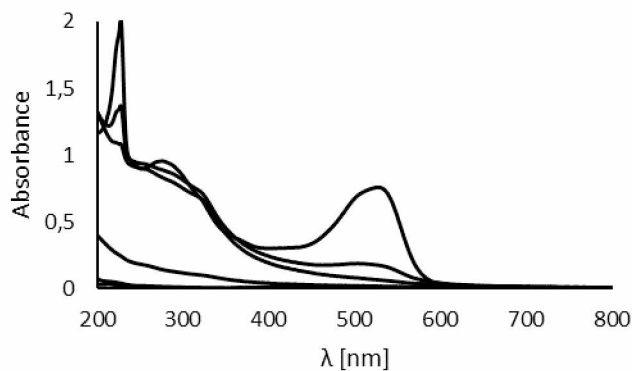
Na grafech 2, 3 a 4 jsou znázorněna absorpční spektra 10× zředěných roztoků azobarviv po odstředění. Absorpční maximum je pro Saturnovou modř LBRR 200-586 nm, pro Saturnovou žlutí LFF 200-396 nm a pro Saturnovou červeně F3B 200-529 nm.



Graf 2 - Průběh fotokatalýzy Saturnové modři LBRR 200



Graf 3 - Průběh fotokatalýzy Saturnové žluti LFF 200



Graf 4 - Průběh fotokatalýzy Saturnové červeně

#### 3.2 Elementární analýza

Ve vzorcích po fotolýze byl stanoven obsah C, H, N a S pomocí elementární analýzy (tabulka 11). Vždy bylo odbarveno a odpařeno 500 ml, tabulka 13 tedy udává procentuální zastoupení prvků v 0,5 l vzorku.

**Tabulka 13** - Elementární analýza vzorků

Barvivo	C	H	N	S
Saturnová modř LBRR 200	0,4	1,74	6,01	6,85
Saturnová žlut' LFF 200	0,5	2,55	9,82	3,02
Saturnová červen' F3B 200	1,12	1,01	3,53	0,37

### 3.3 CHSK

Byly provedeny CHSK testy všech vzorků před a po fotokatalýze. Tyto testy se pro kontrolu výsledků dělaly dvakrát a z hodnot byl poté vypočítán průměr. Vzorky Saturnové žlutí a červeně měly chemickou spotřebu kyslíku po odbarvení 0. Fotokatalýzou se tedy rozložilo organické barvivo 100 % na vodu a CO<sub>2</sub>. Vzorek Saturnové modři měl CHSK po odbarvení v průměru 14,2, což znamená, že fotokatalytický rozklad byl z 96% úspěšný (tabulka 14).

**Tabulka 14** - CHSK vzorků před a po fotokatalýze

	Saturnová modř LBRR 200 (mg/l O <sub>2</sub> )	Saturnová žlut' LFF 200 (mg/l O <sub>2</sub> )	Saturnová červen' F3B 200(mg/l O <sub>2</sub> )
Před fotokatalýzou	243	538	435
	238	570	362
<b>Průměr</b>	<b>240,5</b>	<b>554</b>	<b>398,5</b>
Po fotokatalýze	17,9	0	0
	10,5	0	0
<b>Průměr</b>	<b>14,2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

### 3.4 TOC

Hodnoty pro azobarviva byly vypočítány ze sumárního vzorce a navážky. Hodnoty vzorků po fotokatalýze byly změřeny na přístroji SKALAR Formacs<sup>HT/TN</sup>, který slouží jak ke stanovení TOC, tak ke stanovení TKN (celkový dusík podle Kjeldahla).

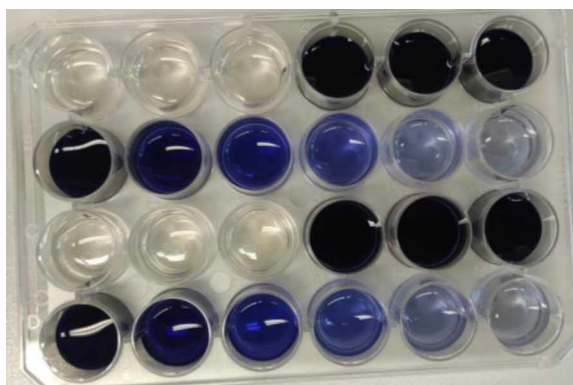
**Tabulka 15 - TOC azobarviv po fotokatalýze**

Vzorky	Saturnová modř LBRR 200	Saturnová žlut' LFF 200	Saturnová červeň F3B 200
Před fotokatalýzou [mg/l]	108,12	108,54	98,18
Po fotokatalýze [mg/l]	23,72	20,91	22,91
Snížení koncentrace TOC [%]	78,06	80,74	76,67

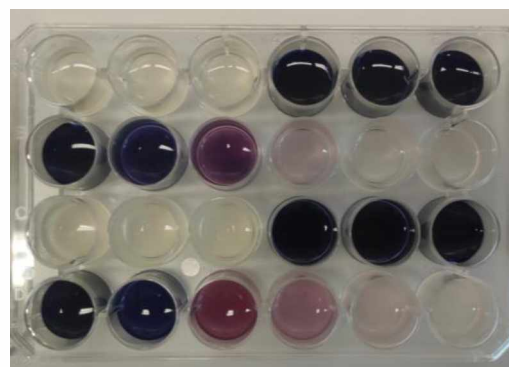
### 3.5 Mikrobiologické testy

#### 3.5.1 Ředění bujónu

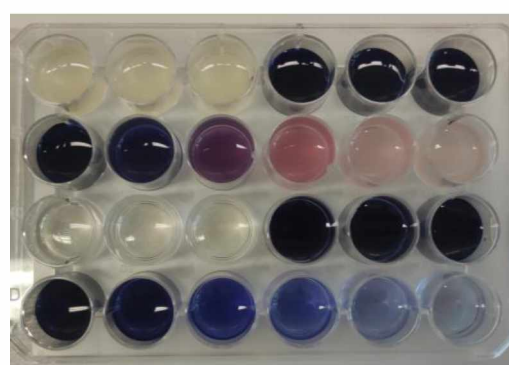
Po 48 hodinové inkubaci destiček byla viditelná změna zbarvení (obrázky 11-21) jednotlivých jamek působením (nárůstem) bakterií. U Saturnové modři je změna zbarvení pro každou bakterii nejvíce viditelná. U všech pozitivních kontrol byla viditelná změna zbarvení, protože se jednalo pouze o bujón a bakteriím se v něm dařilo, všude se tedy daly pozorovat zakalené jamky. U destiček s odbarvenými vzorky se mohla ihned pozorovat změna zbarvení, kdy vzestupně se zvyšoval zákal podle nižší koncentrace odbarveného vzorku a vyšší koncentrace bujónu.



**Obrázek 12 - Vzorek Saturnové modři před inkubací**



**Obrázek 11 - Vzorek Saturnové modři po inkubaci (*E. coli* a *S. aureus*)**



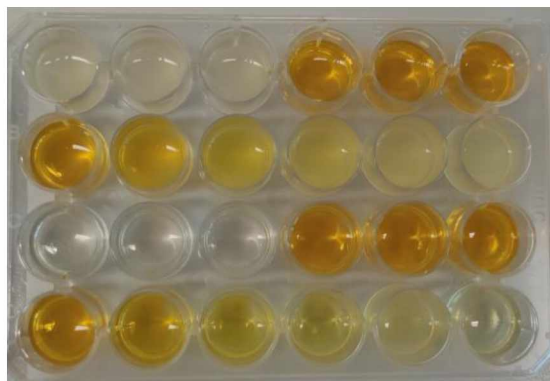
**Obrázek 13 - Vzorek Saturnové modři po inkubaci (*P. aeruginosa* a *E. faecalis*)**



**Obrázek 14** - Vzorek Saturnové žlti před inkubací



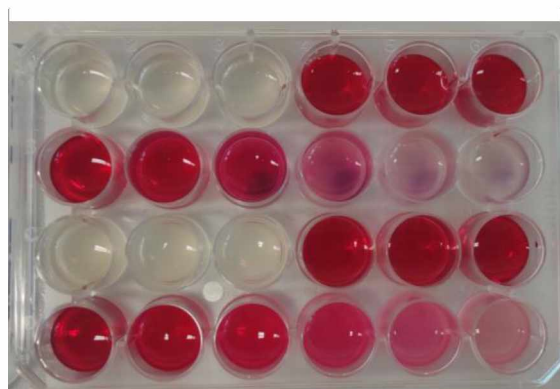
**Obrázek 15** - Vzorek Saturnové žlti po inkubaci (*E. coli* a *S. aureus*)



**Obrázek 16** - Vzorek Saturnové žlti po inkubaci (*P. aeruginosa* a *E. faecalis*)



**Obrázek 17** - Vzorek Saturnové červeně před inkubací



**Obrázek 18** - Vzorek Saturnové červeně po inkubaci (*E. coli* a *S. aureus*)



**Obrázek 19** - Vzorek Saturnové červeně po inkubaci (*P. aeruginosa* a *E. faecalis*)



**Obrázek 21** - Odbarvený vzorek před inkubací



**Obrázek 20** - Odbarvený vzorek po inkubaci (*E. coli* a *S. aureus*)

Po přeočkování na TSA agary a inkubaci 24 hodin byly vždy negativní kontroly (první a třetí řada, jamky 4-6) po použití autoklávaná destilovaná voda negativní, nezměnila se jak barva v jamce, tak nenarostla žádná bakterie na TSA agaru. U pozitivních kontrol (první a třetí řada, jamky 1-3) došlo vždy k nárůstu bakteriální kultury.

**Tabulka 16** - Přítomnost bakterií v nezředěném vzorku

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Saturnová modř LBRR 200	-	-	+	-
Odbarvená	+	-	+	+
Saturnová žlutá LFF 200	+	-	+	+
Odbarvená	-	-	+	+
Saturnová červená F3B 200	+	-	+	-
Odbarvená	-	-	+	+



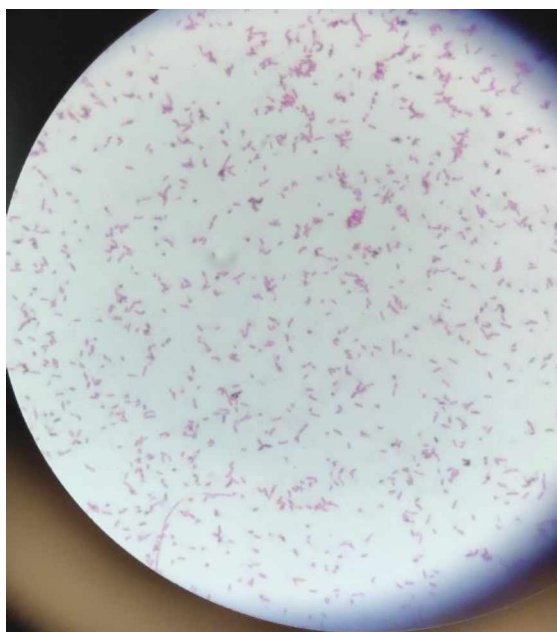
*Staphylococcus aureus* neměl dostatek živin v roztocích bez bujónu a na žádném TSA agaru se neobjevila bakteriální kultura. V jedné studii bylo dohledáno, že některé azosloučeniny mají specifickou antibakteriální aktivitu, zejména proti *S. aureus* a jsou syntetizovány a biologicky vyhodnoceny jako látky antibakteriální. Tyto azosloučeniny ale neměly antibakteriální účinky proti gramnegativním bakteriím jako je *Pseudomonas aeruginosa*, což dokazují i data v tabulce 16, kdy došlo vždy k nárůstu kultury na TSA agaru.

*E. coli* se využívá k redukci některých azobarviv. V tomto případě se ji u dvou ze tří barviv dařilo, a i bez přídavku bujónu došlo k jejímu nárůstu. *E. faecalis* není náročný na kultivaci a v odbarvených vzorcích byla bakteriální kultura vždy.

Ve všech ostatních jamkách dvojkového ředění bakterie narostly. Přídavkem MH bujónu měly bakterie dostatek živin a žádný z roztoků pro ně nebyl toxický. Určení hodnoty MIC je složité pro odbarvené vzorky, protože není známa jejich koncentrace.

### 3.5.2 Identifikační testy

Bakterie z membránové filtrace byly podrobeny identifikačním testům. Nejprve se provedlo Gramovo barvení, které ukázalo, že se jedná o gramnegativní bakterie (obrázek 22).



Obrázek 22 - Výsledek Gramova barvení

Test katalázy byl pozitivní a test oxidázy také. Pro přesnou identifikaci byl použit NEFERMtest 24, jehož výsledky (tabulka 17) se zadaly do programu ErbaExpert. Program určil, že se na 97,55 % jedná o *Chryseobacterium indologenes*.

**Tabulka 17** - Výsledek NEFERMtestu 24

H	G	F	E	D	C	B	A	Řádek
-	-	-	-	-	+	+	-	<b>1</b>
-	+	-	-	-	+	+	-	<b>2</b>
-	-	-	+	-	+	+	+	<b>3</b>

Po tomto zjištění se pro přípravu všech vzorků používala sterilní destilovaná voda, která byla na 2 hodiny vložena do autoklávu, aby kontaminace destilované vody nezkreslovala mikrobiologické testy.

### 3.5.2.1 *Chryseobacterium indologenes*

*Chryseobacterium indologenes* je nepohyblivý, kataláza pozitivní, oxidáza pozitivní, indol pozitivní, gramnegativní bacil, který produkuje výrazně žlutý až oranžový pigment (obrázek 23). U lidí se jedná o vzácný patogen a běžně se v lidské mikroflóře nevyskytuje, ačkoliv je v přírodě četně rozšířen. Běžně se vyskytuje v půdě, vodě, rostlinách a potravinách. Může přežít v chlorovaných vodách a v nemocničním prostředí. Existuje ve vodních systémech a na mokřích površích, kde slouží jako potenciální rezervoáry infekce [25].



**Obrázek 23** - Kultura *Chryseobacterium indologenes* na TSA agaru

*C. indologenes* může způsobovat různé typy infekcí, jako je například bakteriémie, pneumonie, infekce močových či žlučových cest nebo meningitida. Většina infekcí byla zjištěna u hospitalizovaných pacientů se závažnými základními onemocněními, kteří měli zabudované implantáty. Byla zdokumentována kolonizace pacientů prostřednictvím kontaminovaných zdravotnických prostředků zahrnujících tekutiny, jako jsou respirátory, intubační trubice, mlhové stany, zvlhčovače, inkubátory pro novorozence, injekční stříkačky atd. Navzdory své nízké virulenci jsou chryseobakterie ze své podstaty rezistentní vůči mnoha antimikrobiálním látkám. V tuto chvíli neexistuje přesně předepsaná léčba infekce způsobena touto bakterií [25].

### 3.6 Ekotoxikologické testy

#### 3.6.1 Inhibice růstu řas

Ve 40 čtvercích Bürkerovy komůrky bylo dohromady 196 buněk zelených řas (tabulka 18), do všech vzorků se tedy podle výpočtu pipetovalo 0,82 ml řasového inokula. Tento postup se používal pro všechny vzorky. Jako příklad jsou výsledky uvedeny v tabulce 18.

**Tabulka 18** - Příklad výpočtu objemu inokula řasové kultury

Počet buněk										součet
8	4	3	4	3	12	5	6	7	2	196
2	3	5	5	3	4	4	10	6	2	
6	4	6	2	5	7	5	2	8	3	
5	6	4	10	6	6	2	2	5	4	

Výpočet počtu řasových buněk v 1 ml

$$a = 196 \cdot 6250$$

$$a = 1\,225\,000$$

Výpočet objemu inokula

$$x = \frac{200 \cdot 5\,000}{1\,225\,000}$$

$$x = 0,82 \text{ ml}$$

Po 72 hodinách se pomocí mikroskopu spočítalo množství řasových buněk v jednotlivých vzorcích stejně jako při výpočtu objemu inokula, které se pipetuje při přípravě vzorků. Počítačový program pak podle vzorce přepočtl počet buněk ve 40 čtvercích Bürkerovy komůrky na objem v 1 ml a z průměru hodnot vypočítal průměrnou růstovou rychlost a redukci (tabulky 20, 22, 24, 26, 28 a 30).

### 3.6.1.1 Saturnová modř LBRR 200

**Tabulka 19** - pH roztoků Saturnové modři

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	5	1	K
pH 0 hodin	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
pH 72 hodin	8,9	8,9	8,9	8,4	8,4	8,8

K = kontrola

**Tabulka 20** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové modři po 72 hodinách

Koncentrace [mg/l]	V <sub>Z1</sub>	V <sub>Z2</sub>	V <sub>Z3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
100	187500	281250	237500	235417	1,28	21,4
50	143750	300000	325000	256250	1,31	19,6
10	425000	381250	306250	370833	1,44	12,1
5	331250	368750	418750	372917	1,44	12,0
1	381250	481250	462500	441667	1,49	8,5
K	393750	593750	1025000	670833	1,63	-

V<sub>Z1,2,3</sub> = hustota buněk řasového inokula 1 ml vzorku

**I<sub>1,50</sub> (72h) > 100 mg/l**

### Odbarvený vzorek

**Tabulka 21** - pH roztoků Saturnové modři po fotolýze

Objem vzorku [ml]	200	100	50	25	12,5	K
pH 0 hodin	8,0	7,9	8,1	8,3	8,3	8,3
pH 72 hodin	8,3	8,3	8,3	9,0	8,9	8,8

**Tabulka 22** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové modři po fotolýze po 72 hodinách

Objem vzorku [ml/200ml]	Vz <sub>1</sub>	Vz <sub>2</sub>	Vz <sub>3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
200	475000	531250	512500	506250	1,54	5,7
100	400000	443750	356250	400000	1,46	10,6
50	456250	512500	400000	456250	1,50	7,9
25	581250	487500	556250	541667	1,56	4,4
12,5	506250	550000	581250	545833	1,56	4,2
K	393750	593750	1025000	670833	1,63	-

**I<sub>1,50</sub> (72h) > 1000 ml/l****3.6.1.2 Saturnová žlut' LFF 200****Tabulka 23** - pH roztoků Saturnové žluti

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	5	1	K
pH 0 hodin	8,1	8,2	8,3	8,3	8,2	8,1
pH 72 hodin	8,6	8,6	8,7	9,0	8,6	8,7

**Tabulka 24** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové žluti po 72 hodinách

Koncentrace [mg/l]	Vz <sub>1</sub>	Vz <sub>2</sub>	Vz <sub>3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
100	1237500	525000	431250	731250	1,66	13,6
50	67500	487500	812500	658333	1,63	15,4
10	1225000	3412500	925000	1862500	1,97	-2,6
5	3693750	1206250	925000	1941667	1,99	-3,3
1	906250	2131250	825000	1287500	1,85	3,8
K	1693750	1668750	1443750	1602083	1,92	-

**I<sub>1,50</sub> (72h) > 100 mg/l**

### Odbarvený vzorek

**Tabulka 25** - pH roztoků Saturnové žluti po fotolýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	12,5	K
pH 0 hodin	6,9	7,0	7,5	7,8	8,0	8,1
pH 72 hodin	8,1	7,5	8,1	9,5	8,2	8,7

**Tabulka 26** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové žluti po fotolýze po 72 hodinách

Objem vzorku [ml/200ml]	Vz <sub>1</sub>	Vz <sub>2</sub>	Vz <sub>3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
200	681250	1337500	443750	820833	1,7	11,6
100	562500	787500	412500	587500	1,59	17,4
50	525000	412500	362500	433333	1,49	22,7
25	931250	762500	700000	797917	1,69	12,1
12,5	725000	662500	537500	641667	1,62	15,9
K	1693750	1668750	1443750	1602083	1,92	-

**I<sub>r,50</sub> (72h) > 1000 ml/l**

### **3.6.1.3 Saturnová červeň F3B 200**

**Tabulka 27** - pH roztoků Saturnové červeně

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	5	1	K
pH 0 hodin	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1
pH 72 hodin	8,7	8,7	8,8	8,9	8,9	8,3

**Tabulka 28** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové červeně po 72 hodinách

Koncentrace [mg/l]	Vz <sub>1</sub>	Vz <sub>2</sub>	Vz <sub>3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
100	412500	325000	562500	433333	1,49	38,4
50	468750	468750	856250	597917	1,59	14,7
10	406250	431250	381250	406250	1,47	42,3
5	337500	481250	587500	468750	1,51	33,3
1	475000	487500	518750	493750	1,53	29,7
K	450000	668750	981250	700000	1,65	-

**I<sub>r,50</sub> (72h) > 100 mg/l**

### Odbarvený vzorek

**Tabulka 29** - pH roztoků Saturnové červeně po fotolýze

Objem vzorku [ml]	200	100	50	25	12,5	K
pH 0 hodin	7,2	7,3	7,8	8,1	8,1	8,1
pH 72 hodin	8,3	8,4	8,5	8,9	9,1	8,3

**Tabulka 30** - Výsledky nárůstu řas v roztoku Saturnové červeně po fotolýze po 72 hodinách

Objem vzorku [ml/200ml]	Vz <sub>1</sub>	Vz <sub>2</sub>	Vz <sub>3</sub>	Průměrná hustota buněk v 1 ml	Průměrná růstová rychlost	Redukce [%]
200	518750	512500	612500	547917	1,57	5,5
100	518750	581250	631250	577083	1,58	4,5
50	606250	662500	443750	570833	1,58	4,7
25	525000	468750	606250	533333	1,56	6,1
12,5	581250	556250	506250	547917	1,57	5,5
K	512500	668750	981250	720833	1,66	-

**I<sub>r,50</sub> (72h) > 1000 ml/l**

U všech vzorků byla změřena hodnota pH na začátku a na konci testu (tabulky 19, 21, 23, 25, 27 a 29). U všech vzorků bylo pozorováno zvýšení pH po nárůstu řasové kultury.

### 3.6.2 Zkouška akutní imobilizace dafnií

Počet živých dafnií po 24 a 48 hodinách je uveden v tabulkách 33, 36, 39, 42, 45 a 48. U dafnií se měřilo nejen pH, ale také koncentrace O<sub>2</sub> ve vzorku. Jak je vidět v tabulkách 31, 34, 37, 40, 43 a 46, hodnota pH se s časem u každého vzorku mění, ale u některých vzorků klesá, zatím co u jiný naopak roste. V tabulkách 32, 35, 38, 41, 44 a 47 jsou zaznamenány hodnoty koncentrace O<sub>2</sub> v roztocích, stejně jako u pH se i u koncentrace kyslíku hodnota s časem jak snižovala, tak zvyšovala.

#### 3.6.2.1 Saturnová modř LBRR 200

**Tabulka 31** - pH roztoku Saturnové modři

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	1	K
pH 0 hodin	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
pH 48 hodin	7,8	7,8	7,8	7,8	7,9

**Tabulka 32** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové modři

Koncentrace O <sub>2</sub> [mg/l]	100	50	10	1	K
O <sub>2</sub> 0 hodin	8,9	8,9	8,9	8,5	8,9
O <sub>2</sub> 48 hodin	8,0	8,0	7,9	7,8	7,8

**Tabulka 33** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou modř

Koncentrace [mg/l]		100	50	10	1	K
Počet dafnií	24 h–1 řada	9	9	10	10	10
	24 h–2 řada	8	10	10	10	10
	24 h–celkem	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	24 h	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Počet dafnií	48 h–1 řada	9	10	10	10	10
	48 h–2 řada	8	9	9	10	10
	48 h–celkem	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	48 h	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 100 mg/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 100 mg/l**



### Odbarvený vzorek

**Tabulka 34** - pH roztoku Saturnové modři po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
pH 0 hodin	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7
pH 48 hodin	7,8	7,8	7,8	7,8	7,9

**Tabulka 35** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové modři po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
O <sub>2</sub> [mg/l] 0 hodin	8,9	8,9	8,9	8,5	8,9
O <sub>2</sub> [mg/l] 48 hodin	8,0	8,0	7,9	8,0	7,9

**Tabulka 36** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou modř po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]		100	50	10	1	K
Počet dafnií	24 h-1 řada	8	10	9	10	10
	24 h-2 řada	10	10	10	10	10
	24 h-celkem	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	24 h	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Počet dafnií	48 h-1 řada	8	10	9	10	10
	48 h-2 řada	10	10	10	10	10
	48 h-celkem	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	48 h	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 1000 ml/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 1000 ml/l**

### 3.6.2.2 Saturnová žluť LFF 200

**Tabulka 37** - pH roztoku Saturnové žluti

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	1	K
pH 0 hodin	7,7	7,7	7,7	7,7	8,0
pH 48 hodin	7,5	7,5	7,5	7,5	7,4

**Tabulka 38** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové žluti

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	1	K
O <sub>2</sub> 0 hodin	8,1	8,1	8,1	8,0	8,2
O <sub>2</sub> 48 hodin	8,6	8,5	8,6	8,4	8,5

**Tabulka 39** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou žluť

Koncentrace [mg/l]		100	50	10	1	K
Počet dafnií	24 h–1 řada	10	9	9	10	9
	24 h–2 řada	10	10	10	10	10
	24 h–celkem	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	24 h	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
Počet dafnií	48 h–1 řada	9	9	9	10	9
	48 h–2 řada	10	10	10	10	10
	48 h–celkem	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	48 h	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 100 mg/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 100 mg/l**

### Odbarvený vzorek

**Tabulka 40** - pH roztoku Saturnové žluti po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
pH 0 hodin	6,3	6,4	7,0	7,4	7,7
pH 48 hodin	6,6	6,7	7,3	7,6	7,9

**Tabulka 41** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové žluti po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
O <sub>2</sub> [mg/l] 0 hodin	8,9	9,1	9,1	9,6	9,0
O <sub>2</sub> [mg/l] 48 hodin	8,0	8,0	7,9	8,0	7,9

**Tabulka 42** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou žlut' po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]		100	50	10	1	K
Počet dafnií	24 h-1 řada	8	10	10	10	10
	24 h-2 řada	10	10	10	10	10
	24 h-celkem	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	24 h	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Počet dafnií	48 h-1 řada	8	10	10	10	10
	48 h-2 řada	10	10	10	10	10
	48 h-celkem	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
Imobilizace %	48 h	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 1000 ml/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 1000 ml/l**

### 3.6.2.3 Saturnová červeň F3B 200

**Tabulka 43** - pH roztoku Saturnové červene

Koncentrace [mg/l]	100	50	10	1	K
pH 0 hodin	7,9	7,9	7,9	7,9	8,0
pH 48 hodin	7,5	7,5	7,5	7,4	7,4

**Tabulka 44** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové červeni

Koncentrace O <sub>2</sub> [mg/l]	100	5	10	1	K
O <sub>2</sub> 0 hodin	8,4	8,4	8,3	8,3	8,2
O <sub>2</sub> 48 hodin	8,8	8,8	8,7	8,7	8,5

**Tabulka 45** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou červeň

Koncentrace [mg/l]		100	50	10	1	K
Počet dafnií	24 h-1 řada	8	9	9	10	9
	24 h-2 řada	7	10	9	10	10
	24 h-celkem	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	24 h	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
Počet dafnií	48 h-1 řada	8	9	9	10	9
	48 h-2 řada	7	10	9	10	10
	48 h-celkem	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	48 h	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 100 mg/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 100 mg/l**

### Odbarvený vzorek

**Tabulka 46** - pH roztoku Saturnové červeně po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
pH 0 hodin	7,0	7,2	7,4	7,5	8,0
pH 48 hodin	7,4	7,5	7,5	7,5	7,4

**Tabulka 47** - Koncentrace O<sub>2</sub> v roztoku Saturnové červeně po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]	200	100	50	25	K
pH 0 hodin	8,6	8,6	8,6	8,6	8,2
pH 48 hodin	8,6	8,7	8,7	8,5	8,5

**Tabulka 48** - Výsledky imobilizace dafnií pro Saturnovou červeně po fotokatalýze

Objem vzorku [ml/200ml]		200	100	50	25	K
Počet dafnií	24 h-1 řada	10	10	10	10	9
	24 h-2 řada	10	10	10	10	10
	24 h-celkem	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	24 h	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
Počet dafnií	48 h-1 řada	10	10	10	10	9
	48 h-2 řada	10	10	10	10	10
	48 h-celkem	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
Imobilizace %	48 h	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

**EC<sub>50</sub> (24h) > 1000 ml/l**

**EC<sub>50</sub> (48h) > 1000 ml/l**

## ZÁVĚR

Byla provedena fotokatalýza tří vybraných komerčních azobarviv. U roztoku Saturnové modři LBRR 200 o koncentraci  $2,14 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  trvala 6 hodin, u Saturnové žluti LFF 200 o koncentraci  $3,23 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  17 hodin a u Saturnové červeně F3B 200 o koncentraci  $1,82 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  trvala 5 hodin. Dle výsledků CHSK testů byla spotřeba kyslíku vzorků pro Saturnovou žlut' LFF 200 a Saturnovou červen' F3B 200 po fotokatalýze totožná jako pro slepý pokus (demineralizovaná voda). U Saturnové modři LBRR 200 došlo ke snížení CHSK o 96 % oproti původnímu roztoku. Celkový organický uhlík klesl o 78 % u Saturnové modři LBRR 200, o 81 % u Saturnové žluti LFF 200 a o 77 % u Saturnové červeně F3B 200. Procentuální zastoupení prvků v roztocích po fotokatalýze bylo pro Saturnovou modř LBRR 200 0,4 % C, 1,74 % H, 6,01 % N a 6,85 % S, pro Saturnovou žlut' LFF 200 0,5 % C, 2,55 % H, 9,82 % N a 3,02 % S a pro Saturnovou červen' F3B 200 1,12 % C, 1,01 % H, 3,53 % N a 0,37 % S.

Na všech miskách pozitivní kontroly došlo k nárůstu testovaných bakterií, naopak u negativní kontroly po použití sterilizované demineralizované vody k nárůstu bakterií nedošlo nikdy. V roztocích vzorků bez přídavku bujónu všude narostla *P. aeruginosa*, naopak *S. aureus* neměl dostatek živin a v žádném roztoku se neobjevila bakteriální kultura. Bakterie *E. faecalis* se objevila ve všech odbarvených vzorcích, ale u dvou původních roztoků ne, to lze vysvětlit tak, že barevné roztoky na ni měly antibakteriální účinky, které vzorky po fotolýze již nemají. *E. coli* čerpala živiny z azosloučenin (Saturnové žluti LFF 200 a Saturnové červeně F3B 200) a v těchto dvou azobarvivech kultura narostla, naopak u těchto vzorků azobarviv po fotolýze neměla dostatek živin a bakteriální kultura vůbec nenarostla. U vzorku Saturnové modři LBRR 200 to bylo naopak. Orientační testy inhibice bakteriálních kultur tedy neurčily toxicitu ani azobarviv, ani vzorků po jejich fotokatalýze.

Ekotoxikologické testy také neprokázaly toxicitu azobarviv ani fotolytů. U všech azobarviv se limitní koncentrace prokázala jako netoxická a došlo k nárůstu zelených řas. Pro všechna vybraná azobarviva tedy platí, že  $I_{r50} (72h) > 100 \text{ mg/l}$ . Pro všechny vzorky po fotokatalýze tedy platí, že  $I_{r50} (72h) > 1000 \text{ ml/l}$ .

U původních vzorků azobarviv, ani u jejich fotolytů nedošlo k imobilizaci více jak 25 % dafnií. U žádné negativní kontroly nedošlo k imobilizaci více jak 10 % dafnií. Pro azobarviva je tedy hodnota  $EC_{50} (24h) > 100 \text{ mg/l}$  a  $EC_{50} (48h) > 100 \text{ mg/l}$ . Pro vzorky po fotokatalýze platí, že  $EC_{50} (24h) > 1000 \text{ ml/l}$  a  $EC_{50} (48h) > 1000 \text{ ml/l}$ .

Mikrobiologické a ekotoxikologické testy neprokázaly toxicitu azobarviv ani jejich fotolytů, při fotokatalýze nedochází ani k rozkladu na toxické meziprodukty. Heterogenní fotokatalýza je tedy vhodný způsob k čištění odpadní vody například z firem textilního průmyslu.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] OYETADE, Joshua Akinropo, Revocatus Lazaro MACHUNDA a Askwar HILONGA. Photocatalytic degradation of azo dyes in textile wastewater by Polyaniline composite catalyst-a review. *Scientific African* [online]. Elsevier B.V, 2022, **17**, e01305 [cit. 2022-10-04]. ISSN 2468-2276. Dostupné z: doi:10.1016/j.sciaf.2022.e01305.
- [2] LI AL-TOHAMY, Rania, Sameh S. ALI, Fanghua LI, et al. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. *Ecotoxicology and environmental safety* [online]. Netherlands: Elsevier, 2022, **231**, 113160-113160 [cit. 2022-10-07]. ISSN 0147-6513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113160.
- [3] CHEQUER, Farah Maria Drumond, Thiago Mescoloto LIZIER, Rafael DE FELÍCIO, Maria Valnice Boldrin ZANONI, Hosana Maria DEBONSI, Norberto Peporine LOPES, Ricard MARCOS a Danielle Palma DE OLIVEIRA. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. *Toxicology in vitro* [online]. England: Elsevier, 2011, **25**(8), 2054-2063 [cit. 2022-10-05]. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2011.05.033.
- [4] WANG, Huijie, Xin LI, Xiaoxue ZHAO, Chunyan LI, Xianghai SONG, Peng ZHANG, Pengwei HUO a Xin LI. A review on heterogeneous photocatalysis for environmental remediation: From semiconductors to modification strategies. *Chinese journal of catalysis* [online]. Elsevier B.V, 2022, **43**(2), 178-214 [cit. 2022-10-21]. ISSN 1872-2067. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2067(21)63910-4.
- [5] KARIM, Ansaf, Sukanya KRISHNAN, Amritanshu SHRIWASTAV. An overview of heterogeneous photocatalysis for the degradation of organic compounds: A special emphasis on photocorrosion and reusability. *Journal of the Indian Chemical Society* [online]. 2022, **99**(6) [cit. 2022-10-20]. ISSN 0019-4522. Dostupné z: doi:10.1016/j.jics.2022.100480.
- [6] ROULOVÁ N, HRDÁ K, KAŠPAR M, PEROUTKOVÁ P, JOSEFOVÁ D, PALARČÍK J. Removal of Chloroacetanilide Herbicides from Water Using Heterogeneous Photocatalysis with TiO<sub>2</sub>/UV-A. *Catalysts*. 2022; 12(6):597.
- [7] PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015, 792 stran: ilustrace; 25 cm. ISBN 978-80-7080-928-0.



- [8] BOYLES, Wayne. *The Science of chemical oxygen demand*. Technical Information Series , Booklet No.9.
- [9] DRNKOVÁ, Barbora. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie a hygiena: pro zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing, 2019, 134 stran. ISBN 978-80-271-0693-6
- [10] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24]. ISBN 978-80-247-3170-4.
- [11] TRIPATHI, Sapra. Gram Staining. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2022. PMID: 32965827.
- [12] ŽEMLIČKOVÁ, Helena. *Praktikum lékařské mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2019, 52 stran; 23 cm. ISBN 978-80-246-4378-6.
- [13] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad Koraichi IBNSOUDA. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* [online]. China: Elsevier B.V, 2016, **6**(2), 71-79 [cit. 2022-10-29]. ISSN 2095-1779. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [14] MUELLER, Matthew, TAINTER, Cristopher. Escherichia Coli. [Updated 2022 Apr 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>.
- [15] TAYLOR, Tracey, UNAKAL, Chandrashekhar. Staphylococcus Aureus. [Updated 2022 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>.
- [16] WILSON, Mina, PANDEY, Shivlal. Pseudomonas Aeruginosa. [Updated 2022 Aug 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>.
- [17] SAID, Mina, TIRTHANI, Ekta, LESHU, Emil. Enterococcus Infections. [Updated 2022 May 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/>.
- [18] ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Liberec: Evernia, 2011. ISBN 978-80-903787-9-7.

- [19] KOMÍNKOVÁ, Dana. *Ekotoxikologie*. V Praze: Česká technika - nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 978-80-01-04058-4.
- [20] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCOVIČOVÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [21] BENDÁKOVÁ, Nela. *Studium odbourávání barviv pomocí fotochemické degradace s oxidem titaničitým*. Univerzita Pardubice, 2012.
- [22] *Desmodesmus subspicatus*. In: *Sagdb.uni-goettingen* [online]. [cit. 2023-02-25]. Dostupné z: [https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str\\_number=86.81](https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=86.81).
- [23] WATANABE, Hajime. Female adult of the water flea *Daphnia magna*. In: *Wikipedia* [online]. [cit. 2023-02-25]. Dostupné z: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia\\_magna-female\\_adult.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_magna-female_adult.jpg).
- [24] VESELÁ, Šárka. Perloočka – nový modelový organismus v experimentální toxikologii. In: *Toxicology* [online]. [cit. 2023-02-25]. Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=93>.
- [25] BHUYAR, G, S JAIN, H SHAH a V MEHTA. Urinary tract infection by *Chryseobacterium indologenes*. *Indian journal of medical microbiology* [online]. Chandigarh: Elsevier B.V, 2012, **30**(3), 370-372 [cit. 2022-11-28]. ISSN 0255-0857. Dostupné z: doi:10.4103/0255-0857.99511.