

Univerzita Pardubice
Fakulta Chemicko-technologická

Využití heterogenní fotokatalýzy k odstraňování mikroorganismů z vodného prostředí

Bc. Lucie Valešová

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Valešová**
Osobní číslo: **C18500**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Využití heterogenní fotokatalýzy k odstraňování mikroorganismů z vodného prostředí**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na odstraňování mikroorganismů z vod. Důraz kladte na využití fotokatalýzy.
2. Na základě literární rešerše vytipujte 2 – 3 druhy mikroorganismů, které budou sloužit k testování účinnosti heterogenní fotokatalýzy. Proveďte laboratorní experimenty zaměřené na testování podmínek heterogenní fotokatalýzy při odstraňování těchto mikroorganismů. Výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. 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: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Konzultant diplomové práce: **Ing. Petra Peroutková**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne 29. 6. 2020

Bc. Lucie Valešová

PODĚKOVÁNÍ

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

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce je věnována převážně mikrobiálnímu znečištění vod a možnostem, jak toto znečištění eliminovat. Důraz je kladen na využití fotokatalýzy, a to zejména při odstraňování bakterií *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis*.

V rámci praktické části práce pak byl testován vliv použitého fotokatalyzátoru, jeho množství a H₂O₂ na odstranění bakterií *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis* ze vzorků modelových odpadních vod. Z testovaných fotokatalyzátorů bylo nejlepších výsledků dosaženo za použití TiO₂ typ P25. Byl pozorován také významný vliv přídavku H₂O₂ na odstranění bakterií *Bacillus subtilis*, zatímco bakterie *Pseudomonas fluorescens* účinku H₂O₂, a to i v kombinaci s fotokatalýzou velmi odolná.

KLÍČOVÁ SLOVA

vodné prostředí, mikroorganismus, fotokatalýza, TiO₂, H₂O₂, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*

TITLE

Utilization of heterogeneous photocatalysis to remove microorganisms in the environment.

ANNOTATION

In the theoretical part of the thesis was mentioned the aqueous environment and its contamination, which is caused by the presence of bacteria. Subsequent description of bacteria in which the method of photocatalysis was applied, the principle of which is the main part of the thesis. In the experimental part are given the procedures and methods that were used in processing this work and finally the results of the values, which were processed from two bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Photocatalysis of both bacteria together with the addition of hydrogen peroxide gave very positive results, such that the effectiveness of this combination increased compared to previous measurements.

KEYWORDS

aqueous environment, photocatalysis, TiO₂, H₂O₂, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*

OBSAH

Úvod	27
1 Voda	15
1.1 Rozdělení vod dle jejich využití	15
1.2 Zdroje znečištění vod.....	16
1.2.1 Mikrobiologické vyšetření vod.....	17
1.3 Dezinfekce vody	18
1.3.1 Filtrace	19
1.3.2 Chlorace	21
1.3.3 Ozonizace.....	21
1.3.4 UV záření.....	22
2 Mikroorganismy ve vodném prostředí	24
2.1 Rod <i>Escherichia</i>	26
2.1.1 Inaktivace <i>E. coli</i>	29
2.2 Rod <i>Pseudomonas</i>	29
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.2.2 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	31
2.2.3 Inaktivace <i>Pseudomonas</i>	31
2.3 Rod <i>Bacillus</i>	32
2.3.1 <i>Bacillus anthracis</i>	33
2.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	33
2.3.3 <i>Bacillus subtilis</i>	34
2.3.4 Inaktivace <i>Bacillus</i>	34
3 Fotokatalýza	36
3.1 Princip fotokatalýzy	37
3.2 Využití fotokatalýzy	39
3.3 Podmínky pro použití fotokatalýzy.....	40
3.4 Fotokatalyzátory	41
3.4.1 Oxid titaničitý TiO ₂	42

3.4.2	Oxid zinečnatý ZnO	43
3.4.3	Další používané fotokatalyzátory	44
3.5	Dezinfekční účinky fotokatalýzy	45
3.5.1	Dezinfekční účinky fotokatalýzy na <i>E. coli</i>	46
3.5.2	Dezinfekční účinky fotokatalýzy na <i>Pseudomonas</i>	46
3.5.3	Dezinfekční účinky fotokatalýzy na <i>Bacillus</i>	47
4	Cíl práce	48
5	Materiál	49
5.1	Mikroorganismy	49
5.2	Přístroje	49
5.3	Laboratorní pomůcky	50
5.4	Chemikálie a reagenty	50
5.5	Kultivační média a roztoky	51
5.5.1	MPA –Masopeptonový agar (HiMedia, Indie)	51
5.5.2	MPB - Masopeptonový bujón (HiMedia, Indie)	51
5.5.3	Fyziologický roztok	52
5.5.4	Bakteriální kultury	52
6	Pracovní postup	53
6.1	Postup při odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy	53
6.2	Postup při odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy a přídavku H ₂ O ₂	54
7	Výsledky a diskuze	57
7.1	<i>Bacillus subtilis</i>	57
7.1.1	Růstové křivky – čistý <i>Bacillus</i> a <i>Bacillus</i> s TiO ₂	57
7.1.2	Účinnost fotokatalýzy při odstranění <i>Bacillus subtilis</i>	59
7.1.3	Odstranění <i>Bacillus subtilis</i> kombinací TiO ₂ a H ₂ O ₂	61
7.1.4	Množství odstranění <i>bacila</i> čistým H ₂ O ₂	64
7.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65
7.2.1	Růstové křivky – čistý <i>Pseudomonas fluorescens</i> a <i>Ps. fl.</i> s TiO ₂	66
7.2.2	Množství odstranění <i>Pseudomonas fluorescens</i> pomocí AV01 a P25	67
7.2.3	Množství odstranění <i>Pseudomonas fluorescens</i> pomocí TiO ₂ a H ₂ O ₂	70
7.2.4	Množství odstranění <i>Pseudomonas fluorescens</i> čistým H ₂ O ₂	73

8	Závěr	75
9	Použitá literatura	77
	Příloha.....	86

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Znázornění separačních vlastností v závislosti na zvolené technologii	21
Obrázek 2 Schématické znázornění skupin bakterií, detekovatelných při mikrobiologickém rozboru vody (9)	24
Obrázek 3 <i>Escherichia coli</i>	27
Obrázek 4 <i>Pseudomonas</i>	30
Obrázek 5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na živném agaru.....	31
Obrázek 6 <i>Bacillus</i>	33
Obrázek 7 Oxidace přímým přenosem při heterogenní fotokatalýze.....	38
Obrázek 8 Oxidace zprostředkována hydroxylovým radikálem při fotokatalýze.....	38
Obrázek 9 UV oblast pro fotoaktivitu TiO ₂	43
Obrázek 10 Fotokatalytické zařízení.....	54
Obrázek 11 <i>Bacillus subtilis</i> na agaru MPA	86
Obrázek 12 <i>Bacillus subtilis</i> - 3. ředění, vzorek z 45 minuty	87
Obrázek 13 <i>Pseudomonas fluorescens</i> na agaru MPA	87
Obrázek 14 <i>Pseudomonas fluorescens</i> - 2. ředění, vzorek po 120. minutě	88

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Mikrobiologické a biologické ukazatele pitné vody, balené vody a jejich hygienické limity	18
Tabulka 2 Přehled platných norem pro stanovení mikrobiologických ukazatelů ve vodách	25
Tabulka 3 Seznam chemikálií	50
Tabulka 4 Složení kultivačního média MPA	51
Tabulka 5 Složení kultivačního média MPB	51
Tabulka 6 Závislost množství bakterií <i>Bacillus subtilis</i> v čase (AV01)	59
Tabulka 7 Závislost množství bakterií <i>Bacillus subtilis</i> v čase (P25).....	61
Tabulka 8 Závislost množství bakterií <i>Bacillus subtilis</i> v čase (AV01 + H ₂ O ₂)	62
Tabulka 9 Závislost množství bakterií <i>Bacillus subtilis</i> v čase (P25 + H ₂ O ₂).....	63
Tabulka 10 Závislost množství bakterií <i>Bacillus subtilis</i> v čase (H ₂ O ₂)	65
Tabulka 11 Závislost množství bakterií <i>Ps. fl.</i> v čase (AV01).....	68
Tabulka 12 Závislost množství bakterií <i>Ps. fl.</i> v čase (P25)	69
Tabulka 13 Závislost množství bakterií <i>Ps. fl.</i> v čase (AV01 + H ₂ O ₂).....	71
Tabulka 14 Závislost množství bakterií <i>Ps. fl.</i> v čase (P25 + H ₂ O ₂)	72
Tabulka 15 Závislost množství bakterií <i>Ps. fl.</i> v čase (H ₂ O ₂).....	73

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Růstová křivka – závislost OD na čase – <i>Bacillus subtilis</i>	58
Graf 2 Závislost množství <i>Bacilla subtilis</i> na čase fotokatalýzy (AV01).....	60
Graf 3 Závislost množství <i>Bacilla subtilis</i> na čase fotokatalýzy (P25)	61
Graf 4 Závislost množství <i>Bacilla subtilis</i> na čase fotokatalýzy (AV01 + H ₂ O ₂).....	63
Graf 5 Závislost množství <i>Bacilla subtilis</i> na čase fotokatalýzy (P25 + H ₂ O ₂).....	64
Graf 6 Závislost množství <i>Bacilla subtilis</i> na čase fotokatalýzy (H ₂ O ₂)	65
Graf 7 Růstová křivka – závislost OD na čase – <i>Pseudomonas fluorescens</i>	67
Graf 8 Závislost množství <i>Pseudomonas fl.</i> na čase fotokatalýzy (AV01).....	68
Graf 9 Závislost množství <i>Pseudomonas fl.</i> na čase fotokatalýzy (PV25)	70
Graf 10 Závislost množství <i>Pseudomonas fl.</i> na čase fotokatalýzy (AV01 + H ₂ O ₂).....	71
Graf 11 Závislost množství <i>Pseudomonas fl.</i> na čase fotokatalýzy (PV25 + H ₂ O ₂)	72
Graf 12 Závislost množství <i>Pseudomonas fl.</i> na čase fotokatalýzy (H ₂ O ₂).....	74

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Rovnice fotokatalýzy	37
Rovnice 2 Tvorba fotogenerovaných nosičů náboje	37
Rovnice 3 Tvorba OH radikálů	37
Rovnice 4 Tvorba O_2^- radikálů	37
Rovnice 5 Vznik HO_2^- radikálu	38
Rovnice 6 Tvorba H_2O_2	38
Rovnice 7 Tvorba OH radikálu a kyslíku	38
Rovnice 8 Výpočet hodnoty CFU	55

SEZNAM ZKRATEK

- AOP – pokročilé oxidační procesy
- ATB – antibiotika
- CFU – jednotky tvořící kolonie (angl. colony forming units)
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DP – dezinfekční prostředek
- EHEC – enterotoxigenní Escherichia
- EIEC – enteroinvazivní Escherichia
- ELISA – z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- eV – elektronvolt
- GIT – gastrointestinální trakt
- KTJ – kolonii tvořící jednotka
- LED – elektroluminiscenční dioda (angl. Light-Emitting Diode)
- MH – mezní hodnota
- MO – mikroorganismus
- NHM – nejvyšší mezní hodnota
- nm – nanometr
- OH· - hydroxylový radikál
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- PEC – fotoelektrochemická buňka
- pH – vodíkový exponent (angl. potential of hydrogen)
- POPs – Persistent Organic Pollutants
- ROS – reaktivní formy kyslíku
- UPEC – uropatogenní Escherichia
- UV – ultrafialové záření
- VID – viditelné záření
- VOC – těkavá organická látka (angl. volatile organic compound)
- VTEC – verotoxigenní Escherichia

ÚVOD

Život na Zemi, včetně toho lidského, je závislý na řadě faktorů a složek, bez kterých se neobejde, např. vzduch, voda, půda, sluneční záření. Je proto důležité se o životní prostředí starat a zkvalitňovat ho. V současné době již existuje řada technologií využívaných k ochraně životního prostředí, které se vynalézají proto, aby naše soužití s dalšími organismy bylo udržitelné, neškodilo nám a my mohli nadále využívat potřebné složky.

Voda je pro naši existenci jednou ze základních podmínek, a proto je třeba ji udržovat v co nejlepším stavu. Je tím míněna také její mikrobiální nezávadnost. Bohužel je voda v současné době často kontaminována takovými mikroorganismy, které našemu tělu neprospívají, a s tím mohou přicházet i zdravotní komplikace. Mezi ně patří zejména střevní potíže a další infekční onemocnění, jako například salmonelóza, cholera a další.

Velmi také záleží na tom, kde se zdroj vody nachází a cílem je zajistit takovou vodu, která není zdravotně závadná. K posouzení kvality vody nám slouží např. různé mikrobiologické rozbory. Poté se aplikují postupy, při kterých dochází ke snížení či úplnému odstranění mikroorganismů z vody. V současné době se nejčastěji využívá k dezinfekci vody chlorace a ozonizace. Oba tyto postupy však mají svá úskalí, ať již bezpečnostní či finanční. Dále se využívá sterilizace pomocí UV lampy, případně využití reverzní osmózy. Do skupiny nejnovějších metod, které lze využít při odstraňování mikroorganismů, patří také heterogenní fotokatalýza, kterou se zabývám ve své diplomové práci.

1 VODA

Voda je dle kvality a výskytu rozdělována na dva základní typy – voda povrchová a voda podzemní.

Vody povrchové jsou vody přirozeně se vyskytující na zemském povrchu, dělí se na stojaté (lentické) a tekoucí (lotické). Ochrana povrchových vod vyplývá ze zákona č. 254/2001 Sb. O vodách o změně některých zákonů [1].

Podzemní vody se přirozeně vyskytují pod zemským povrchem a jsou v přímém styku s horninami. Právě tato voda je cenným sladkovodním zdrojem, a proto je důležité dbát na ochranu zdroje před znečištěním a následnou kontaminací. [2]

Zákon 258/2000 Sb. a vyhláška MZe ČR 252/2004 Sb. definuje pitnou vodu jako „*zdravotně nezávadnou vodu, která při trvalém požívání nevyvolá onemocnění nebo poruchy zdraví přítomností mikroorganismů nebo látek ovlivňujících akutním, chronickým či pozdním působením zdraví fyzických osob a jejich potomstva, jejíž smyslově postižitelné vlastnosti a jakost nebrání jejímu požívání a užívání pro hygienické potřeby fyzických osob* [3].“

Bohužel je v současné době takové rozmístění vodních zdrojů, že k pitné vodě nemá přístup více než 1 miliarda lidí. Proto je potřeba získávat pitnou vodu z vody pocházející z povrchových a podzemních zdrojů, která se upraví do stavu pitné a zdravotně nezávadné vody. S tím je však spojená i potřeba odstranění škodlivých mikroorganismů. K tomu většinou nestačí pouhá filtrace či dezinfekce, dost často proces snižování znečištění probíhá hned v několika krocích, které následují po sobě [3].

1.1 Rozdělení vod dle jejich využití

Vodu lze rozdělit do různých skupin hned z několika hledisek. Existují dva hlavní parametry, podle kterých vodu dělíme – v závislosti na obsahu minerálních látek a obsahu nečistot. Zmiňovaný obsah minerálních látek dělí vodu na slanou, minerální, tvrdou a měkkou. Slaná voda je součástí většiny oceánů a moří. Minerální voda obsahuje značné množství minerálních látek a rozpuštěných plynů. Tvrdá voda, procházející vrstvami zemské kůry obsahuje především vápenaté a hořečnaté soli. Měkkou vodu můžeme znát také jako dešťovou, která se následně nachází v potocích a řekách. [4]

Druhým parametrem, podle kterého se voda hodnotí a rozděluje je obsah nečistot. Zde se zahrnuje také pitná voda, která by měla být zdravotně nezávadná. Tuto vodu lze získat i z vody podzemní a povrchové pomocí technologických úprav. Zároveň se pitná voda využívá i pro běžné použití v domácnostech, při mytí a praní. S tím souvisí i odpadní voda, která je znečištěna činností člověka. Tato voda prochází před volným vypuštěním do přírody čistícím procesem. [4]

1.2 Zdroje znečištění vod

Pod pojmem znečištění si můžeme představit změnu fyzikálních, chemických a biologických vlastností. S tím souvisí i změna jakosti vody, která má za následek zhoršení její vhodnosti pro daný účel. Z pohledu fyzikálního a chemického se jedná zejména o látky přirozené a umělé, které mají za následek znečištění samotné vody. Jedná se o látky anorganického a organického původu, mezi které lze řadit například fosfor, dusík a další dusíkaté látky. Znečištění lze hodnotit i podle účinku, v tomto směru se zaměřujeme na úbytek kyslíku ve vodách, změnu pH a přítomnost patogenních mikroorganismů. [5]

Vzhledem k širokému rozsahu zdroje znečištění lze tuto skutečnost vyjádřit v základní klasifikaci členění.

Zde rozlišujeme zdroje původu znečištění:

- *přírodního (přirozeného) původu,*
- *antropogenního původu.*

Dále členíme zdroje podle prostorové povahy a mechanismu transportu na:

- *zdroje plošné,*
- *zdroje liniové,*
- *zdroje bodové,*
- *zdroje bodové – vypouštění surových a čištěných odpadních vod,*
- *zdroje difúzní – drobné znečištění (zemědělské usedlosti, skládky),*
- *zdroje plošné – povrchové splachy a smyvy z plochy povodí.*

Při tomto dělení je důležité brát v potaz, jak prostorové měřítko, tak i data k tomu potřebná, která jsou odvozena z časového vývoje a regionální proměnlivosti. [5]

1.2.1 Mikrobiologické vyšetření vod

Sledování kvality pitné vody je věnována velká pozornost a při jejím nedodržení hrozí lidem řada zdravotních problémů, a to jak akutního, tak i chronického rázu [6].

Mezi hlavní příčiny, které mohou za špatnou kvalitu vody, patří kontaminace bakteriálního nebo fekálního původu. Proto je v současné době věnována velká pozornost pravidelným laboratorním rozborům vzorků vod. Výsledkem rozboru je následné hodnocení vody z fyzikálního, chemického i mikrobiologického hlediska. [7] Závazným podkladem pro hodnocení jakosti pitné vody je vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č.252/2004 Sb. ve znění pozdějších předpisů, která transponuje evropskou směrnici Rady 98/83/EC o jakosti vody určené pro lidskou spotřebu [7].

Podstatou tohoto hodnocení je zjištění přítomnosti mikroorganismů a jejich zařazení do taxonomických skupin. Pokud se prokáže přítomnost škodlivých bakterií v pitné vodě, stává se tak zdravotně závadnou a nelze ji konzumovat z důvodu možných zdravotních problémů. [8]

Mezi základní identifikační vyšetření řadíme posouzení vzhledu narostlé kolonie mikroorganismu na selektivním médiu, dále stanovení presumptivních organismů. Další metodou, která se provádí ve specializovaných laboratořích, je identifikace tzv. pestré řady. V současné době se v laboratořích využívá tzv. mikrotestů. Ty urychlují a zároveň usnadňují analýzu jednotlivých mikroorganismů a patří mezi spolehlivé metody, které se preventivně provádějí. Už v roce 1892 byla definována koncepce indikačních organismů, které tvoří soubor kritérií u kvality vody a týkají se zejména fekálních organismů. V případě, že tyto indikační organismy nejsou přítomny v pitné vodě, se zde s určitou pravděpodobností nevyskytují ani patogenní organismy. [8]

Z mikrobiologického hlediska nás tedy nejvíce zajímají právě indikační organismy, které mohou vést k ohrožení zdraví. Do této skupiny řadíme koliformní bakterie, enterokoky a sulfát redukující klostridie, např. *Clostridium perfringens*. Také požadavky na tento rozbor jsou legislativně ošetřeny vyhláškou č.252/2004 Sb. v platném znění. Jsou zde stanoveny hygienické

požadavky na pitnou a teplou vodu, četnost a rozsah kontroly pitné vody, tj. dodržení hygienických limitů mikrobiologických, biologických, fyzikálních a chemických ukazatelů. [9]

Tabulka 1 Mikrobiologické a biologické ukazatele pitné vody, balené vody a jejich hygienické limity

Ukazatel	Jednotka	Limit	Typ limitu	Poznámky
<i>Escherichia coli</i>	KTJ/100 ml	0	NHM	
	KTJ/250 ml	0	NHM	Balená voda
Koliformní bakterie	KTJ/100 ml	0	MH	
Intestinální enterokoky	KTJ/100 ml	0	NHM	
	KTJ/250 ml	0	NHM	Balená voda
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KTJ/250 ml	0	NHM	Balená voda
Počty kolonií při 22 °C	KTJ/ml	200	MH	
	KTJ/ml	100	NHM	Balená voda
Počty kolonií při 36 °C	KTJ/ml	20	MH	
	KTJ/ml	20	NHM	Balená voda
<i>Clostridium perfringens</i>	KTJ/100 ml	0	MH	

Poznámka: NHM...nejvyšší mezní hodnota, MH....mezní hodnota

1.3 Dezinfekce vody

Dezinfekce vody se provádí za účelem zajištění mikrobiologické nezávadnosti, zejména u pitné vody. Dezinfekci lze provést pomocí fyzikálních postupů nebo chemickými dezinfekčními prostředky, které zabrání působení patogenních mikroorganismů na lidský organismus při následné konzumaci vody. Největší mikrobiální ohrožení pitné vody představuje nejčastěji kontaminace stolicí lidského a živočišného původu. Technologie při odstraňování mikroorganismů (MO) a ošetření pitné vody jsou součástí dezinfekčních procesů, do kterých lze zahrnout fyzikální odstraňování a chemickou oxidaci organických a anorganických nečistot ve vodě, následnou chemickou dezinfekci pomocí chlorace, ozonace, oxidu chloričitého a UV ošetření pro inaktivaci patogenů v celém spektru. V praxi se často k dosažení zdravotně nezávadné vody využívá kombinace několika kroků (někdy se i opakujících). [10, 11]

Výběr dezinfekčního postupu ovlivňují následující faktory:

- Účinnost dezinfekčních prostředků na MO
- Kvalita dezinfikované vody
- Tvorba nežádoucích vedlejších produktů
- Velikost prostoru, kde dezinfekce probíhá [11]

Dezinfekce pitné vody je pro odstranění mikrobiální kontaminace používána od počátku 20. století. Samotná účinnost mikrobiální dezinfekce může být zcela specifická pro konkrétní systém. Mikroby se liší svou citlivostí na dezinfekci. Nejcitlivější jsou vegetativní bakterie, následně viry a nakonec bakteriální spory. Při hodnocení citlivosti nás zajímá mikrobiální odpověď, která se vyznačuje stavem nazývaným „*životaschopný, ale nekultivovatelný*“. Tento stav vyjadřuje neschopnost MO růst při vystavení dezinfekčnímu prostředku (DP). [11, 12]

Opakem neschopnosti MO růst po aplikaci DP je odolnost MO v růstu a snížení účinnosti DP, a to díky agregaci. Agregace nebo shlukování je přirozeným stavem mnoha vodních mikrobů. Mikroby jsou shlukovány a úzce spojovány s buněčnými zbytky fekálního původu, toto prostředí vytváří pro mikroby ochranu před vystavením se dezinfekčním prostředkům. Zároveň bakterie chrání tvorba biofilmu na jejich povrchu [12].

I přes to, že dokážou být MO odolné a ubránit se účinkům DP, existuje v dnešní době mnoho metod a způsobů, jak růstu a množení MO v prostředí zabránit. Nejlepší účinky DP byly popsány v kombinaci s dalšími procesy, jako je např. chlorace, ozonizace a působení UVC, které budou podrobněji vysvětleny dále. [12]

1.3.1 Filtrace

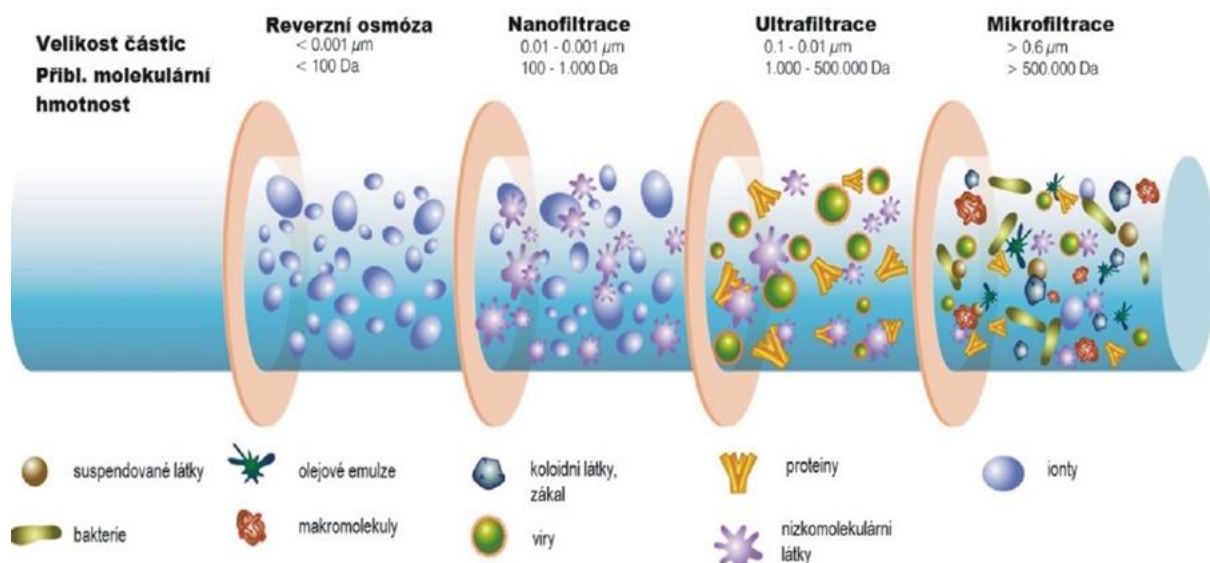
Filtrace je proces, při kterém jsou pevné částice v kapalině nebo v plynném prostředí odstraněny za použití filtračního média. Tímto médiem tekutina protéká, ale pevné částice zůstanou zachyceny na povrchu nebo uvnitř média. Velikost pórů nebo mezera mezi nimi určuje, jakou velikost částic může filtr odstranit. [13, 14]

Z pohledu klasifikace, lze filtraci dělit podle povahy hnací síly, která způsobuje filtraci (gravitační, tlakovou a vakuovou silou), která zároveň určuje i její rychlost nebo podle typu filtru (deskové rámové filtry, listové, kotoučové a pískové filtry) a velikosti pórů [13].

Mezi filtry, které se používají pro filtraci vody lze využít hloubkový skládaný filtr, který zvyšuje průtokovou kapacitu poskytováním větší povrchové plochy pro filtraci. Filtr akumuluje částice na vnějším povrchu, což umožňuje vytvoření filtračního koláče a tím zvyšuje filtrační účinek. Většina skládaných filtrů lze opláchnout. Dalšími používanými filtry jsou kazetové filtry s vláknitým nebo keramickým filtračním materiálem jsou spolehlivější při odstraňování malých částic, než je třeba pískový filtr. [14]

V současné době se nabízí modernější a účinnější metody známé jako tlakové membránové procesy, které úzce souvisí s filtrací. Názvem tlakové membránové procesy se zpravidla označují čtyři typy separačních technik: mikrofiltrace (MF), ultrafiltrace (UF), nanofiltrace (NF) a reverzní osmóza (RO). Společným znakem technik je použití polopropustné membrány jako separačního elementu a tlakového rozdílu jako hnací síly transportu přes membránu. Vzájemná odlišnost spočívá ve velikostech používaných tlakových rozdílu, vlastnostech membrán a převažujícím transportním mechanismu. Membránové systémy umožňují např. fyzikální dezinfekci vody na základě sítové filtrace organismů, které jsou větší než velikost pórů membrán. Menší částice prochází membránou do filtrátu tzv. permeátu. Proto je určení velikosti pórů a jejich rozložení na povrchu membrány důležitým faktorem pro účinnost odstranění sledovaného polutantu. Co se týká velikosti bakterie, ta se pohybuje v rozmezí 0,5 – 3 μm , viry jsou o něco menší 20 – 100 nm. [15, 16]

Procesy založené na principu mechanické separace nerozpuštěných a koloidních látek, bakterií patří mikrofiltrace (MF) a ultrafiltrace (UF). Rozdíl je ve velikosti pórů membrán, které se pohybují v rozmezí 0,05 – 10 μm . Vzhledem k tomuto rozmezí lze vyzdvihnout ještě účinnější proces separace, a to nanofiltraci (NF), která se využívá pro separaci vícevalentních iontů (Ca^{2+} , Mg^{2+} a organických barviv). Nanofiltrace se pohybuje na pomezí ultrafiltrace a reverzní osmózy. Velikost pórů se v tomto případě pohybuje kolem 2 nm. Reverzní osmózu (RO) lze také využít samostatně, a to zejména k separaci rozpuštěných látek v kapalině pomocí semipermeabilní membrány, která je pro vodu rozpustná, ale nerozpustná pro mikroorganismy, koloidy a molekuly organických látek. [17]



Obrázek 1 Znárodnění separačních vlastností v závislosti na zvolené technologii

1.3.2 Chlorace

Chlorace je poměrně levná, účinná a snadno aplikovatelná metoda, která se často používá k dezinfekci vody. Jedná se o chemickou metodu využívající různé typy chloru nebo látek obsahujících chlor. Mezi nejběžněji používané patří plynný chlór, chlornan sodný a chlornan vápenatý. Hlavní podstatou inaktivace MO je poškození jejich buněčné membrány. Jakmile je buněčná membrána oslabena, může chlor vstoupit do buňky, narušit dýchání buněk a aktivitu deoxyribonukleové kyseliny (DNA) čímž dojde k zániku buněk. [18]

Chlorace může být provedena kdykoli během celého procesu úpravy vody. Jakýkoliv typ chloru, který se v procesu úpravy vody přidává má za následek tvorbu kyseliny chlorné (HOCl) a chlornanových iontů (OCl⁻), které jsou hlavními dezinfekčními látkami ve vodě. Kombinace obou těchto komponent tvoří takzvaný „Volný chlorin“. Volný chlor má vysoký oxidační potenciál a představuje tak účinnější DP. Je známo, že v pitné vodě zůstává zbytkové množství chloru, to však není zcela na škodu. Přítomné zbytky chloru vytvářejí rezistentní prostředí pro opětovný růst patogenů ve vodě. [18]

I přesto, že chlor patří mezi nejpoužívanější DP, bývá často nahrazován jinými látkami, jako např. ozon a oxid chloričitý, které nepředstavují takové riziko na zdraví. [19]

1.3.3 Ozonizace

Z pohledu chemického se jedná o formu kyslíku s molekulárním vzorcem O₃. Tvoří se např. ze vzdušného O₂ při vystavení výboji silného elektrického proudu. Ozon je nestabilní a

rychle se rozkládá zpět na O₂. To je při dezinfekci vody výhodou, protože nezanechává žádné toxické zbytky. Jedná se o jeden z nejúčinnějších dezinfekčních prostředků dostupných při úpravě vody. V porovnání s chlórem je ozon při inaktivaci virů a bakterií mnohem účinnější, ale jeho použití je finančně náročnější. Ozon může být kombinován i s jinými oxidačními činidly, které napomáhají k rychlejší a účinnější dezinfekci vody. Zároveň lze využít jeho oxidační vlastnosti i při snižování koncentrace železa, manganu a síry. [20]

Účinnost ozonizace závisí částečně na době kontaktu. Obecně ozon vyžaduje kratší dobu kontaktu než chlor a rozdíl je i v závislosti na samotné úpravě vody. Přihlíží se zde i na teplotu vody. Platí, že čím nižší je teplota vody, tím více ozonu se ve vodě absorbuje. Co se týká hodnoty pH, ozon je účinný v širokém rozmezí. Typická dávka ozonu se udává kolem 1-2 mg/l. V porovnání s chlorací dochází k dezinfekci ozonem pouze v místě kontaktu mezi ozonem a vodou. [21]

Při současném výzkumu lidských patogenních bakterií, jako je *E. coli* a *Ps. fluorescens*, bylo zjištěno, že tyto bakterie mají vysokou citlivost na vystavení účinkům ozonu [22].

1.3.4 UV záření

Dezinfekce UV zářením je dlouholetá osvědčená technologie, která slouží k odstranění MO, jako jsou bakterie, viry a prvoci. UV světlo je forma světla, která je svou vlnovou délkou mezi rentgenovým a viditelným světlem. Rozsah vlnových délek UV světla mezi 200–300 nm (označováno jako UV-C) je klasifikován jako germicidní, což znamená, že je schopný inaktivovat zmiňované MO. Tato schopnost se využívá např. při úpravě pitné vody. [23, 24]

Při UV záření, které je také specifikováno jako fyzický proces, dochází k inaktivaci MO a následnému poškození nukleové kyseliny DNA nebo RNA. Vysoká energie spojená s krátkou vlnovou délkou ($\lambda = 254$ nm) je absorbována buněčnou RNA a DNA a uvnitř buňky způsobuje nové vazby mezi sousedními nukleotidy a zároveň dochází k fotochemickému poškození. To má za následek zabránění se replikaci a neschopnosti infikovat. [23, 24]

Mezi hlavní výhody UV dezinfekce vody patří:

- nevyžaduje dávkování chemikálií
- má krátkou reakční dobu
- při působení nedochází ke změně složení vody
- mikrobicidní účinek není závislý jak na hodnotě pH, tak na teplotě

Mezi hlavní nevýhody UV dezinfekce vody patří:

- není možné žádného přímého měření dávky UV
- působení je pouze v místě ozáření
- poměrně vysoké provozní náklady zahrnující výměnu lampy a spotřebu elektrické energie na UV dezinfekci [23, 24]

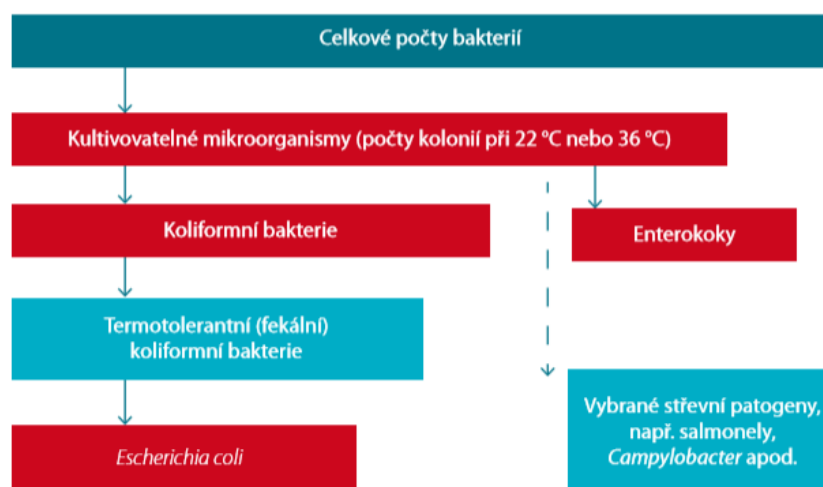
2 MIKROORGANISMY VE VODNÉM PROSTŘEDÍ

Mikroorganismy jsou malé jednobuněčné organismy, které lze pozorovat pouze mikroskopicky. Nachází se ve vodném prostředí samostatně nebo symbioticky s jiným organismem. Mezi mikroorganismy zahrnujeme zejména domény *Bacteria* a *Archaea* ze zástupců prokaryot a mikromycety a prvky z eukaryot. Pokud se jedná o organismy nebuněčné, hovoříme o virech. [25]

Mikrobiologická analýza vody je založena především na konceptu fekálních indikátorových bakterií. Tento rozbor je podstatou pro dosažení co nejlepší kvality pitné vody. „Podle Světové zdravotnické organizace překračuje úmrtnost na choroby související s vodou více než 5 miliónů lidí ročně. Z toho více než 50 % představují mikrobiální střevní infekce, které ovlivňují celý svět.“ [26]

Kromě stanovení konkrétního druhu bakterie je pro zdravotní nezávadnost vody důležitý také počet mikroorganismů. Jedná se o protozoa, zejména *Giardia* a *Cryptosporidium*, žijící běžně ve střevním traktu zvířat. Během životního cyklu tvoří tzv. cysty, které jsou velmi odolné např. účinkům chloru. Proto je jejich dezinfekce velmi obtížná, navíc způsobují vážná průjemová onemocnění, která jsou prokazatelně spojována i s úmrtími. [26, 27]

Mikrobiologické testování kvality vody lze provést několika způsoby. Jeden z hlavních testů je hodnocení zákalu vody. Zákal udává množství suspendovaného materiálu (např. půda), ve kterém jsou i MO, dále se využívá testování bakterií pomocí indikátoru fekálního znečištění. V tomto případě nás zajímá hlavně přítomnost *E. coli* v pitné vodě. Jestliže je tato bakterie přítomna v pitné vodě, vykazuje to kontaminaci fekálního původu, a je tak velká pravděpodobnost, že došlo ke znečištění zdroje. [26, 27]



Obrázek 2 Schématické znázornění skupin bakterií, detekovatelných při mikrobiologickém rozboru vody (9)

Základní rozdělení bakterií osidlujících vodné prostředí je možné dle několika kritérií. Podle tvaru dělíme bakterie na koky a tyčinky, podle složení a barvitelnosti buněčné stěny na grampozitivní a gramnegativní. Dále na autotrofní a heterotrofní dle způsobu získávání živin, na chemotrofní a fototrofní v závislosti na využití energie a podle (na základě) vztahu ke kyslíku na aerobní, fakultativně anaerobní, anaerobní a mikroaerofilní. V souvislosti s hygienickými pravidly u vodného prostředí lze mikroorganismy rozdělit na patogenní, potenciálně patogenní a nepatogenní. S ohledem na indikační schopnost bakterií lze hodnotit indikátory fekálního znečištění a indikátory organického znečištění. Následné hodnocení bakterií v daném prostředí spočívá v měření jejich aktivit, odhadu množství mikrobiální biomasy (pomocí stanovení množství organické hmoty, proteinů, ATP, lipidů apod.), mikroskopickém pozorování (zejména pomocí fluorescenční mikroskopie) a kultivačním stanovení. [28]

Z pohledu kvality a konzumace pitné vody je potřeba vyloučit zejména bakterie saprofytické a potenciálně patogenní nebo patogenní, které by mohli u některých jedinců vyvolat při konzumaci vody zdravotní obtíže spojené např. s průjmovým a jiným onemocněním souvisejícím s podrážděním gastrointestinálního traktu. [28]

Tabulka 2 Přehled platných norem pro stanovení mikrobiologických ukazatelů ve vodách

označení normy	název normy
TNV 75 7835	Jakost vod – Stanovení termotolerantních koliformních bakterií a <i>Escherichia coli</i>
TNV 75 7837	Jakost vod – Stanovení koliformních bakterií v nedesinfikovaných vodách
ČSN ENSO 9308 - 1	Jakost vod – Stanovení <i>Escherichia coli</i> a koliformních bakterií – Část 1: Metoda membránových filtrů
ČSN EN ISO 7899 - 2	Jakost vod – Stanovení intestinálních enterokoků – Část 2: Metoda membránových filtrů
ČSN EN ISO 6222	Jakost vod – Stanovení kultivovatelných mikroorganismů – Stanovení počtu kolonií očkovaním do živného svarového kultivačního média
Council Directive 98/83/EC, Vyhláška 252/2004	Stanovení <i>Clostridium perfringens</i> (včetně spor)
ČSN EN 12780	Jakost vod – Stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i> metodou membránových filtrů
ČSN EN 6888 - 1	Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázapozitivních stafylokoků (<i>Staphylococcus aureus</i> a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird – Parkera

TNV 75 7855	Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu <i>Salmonella</i>
ČSN ISO 11731	Jakost vod – Stanovení bakterií rodu <i>Legionella</i>
ČSN ISO 11731 – 2	Jakost vod – Stanovení bakterií rodu <i>Legionella</i> Část 2: Metoda přímé membránové filtrace pro vody s malým počtem bakterií

2.1 Rod *Escherichia*

Escherichia coli patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* je gram-negativní tyčinka fakultativně anaerobní, která se nachází přirozeně v mikroflóře střeva lidí a zvířat. Je považována za neškodnou bakterii v případě, že je v pořádku gastrointestiální trakt jedince a jeho imunitní systém. *E. coli* se vyskytuje v různých formách, od saprofytických kmenů po kmeny patogenní. Na základě genomických informací byl druh rozdělen do šesti skupin, označovaných jako A, B1, B2, C, D a E. Pro hostitele je podstatná forma patogenní, která může výrazně ohrozit jeho zdravotní stav. Tuto formu lze rozdělit dle působení na jedince do několika skupin kmenů. [29, 30]

- Verotoxigenní (VTEC)
- Enterotoxigenní (EHEC)
- Enteroinzuzivní (EIEC)
- Uropatogenní (UPEC) [31]

Známa *E. coli* O157:H7 je příkladem VTEC, která způsobila úmrtí na celém světě. Produkované verotoxiny způsobují krvavé průjmy, které mohou přejít až do hemolyticko-uremického syndromu HUS. Stejný projev je znám i u enterohemoragické *E. coli* produkující Shiga toxin (Stx.). Právě produkce shiga-like toxinů má za následek patogenitu, která se projevuje inhibicí proteosyntézy střevních buněk a uvolnění vody do lumen střeva. Zmiňovaný toxin, který *E. coli* produkuje, způsobuje onemocnění jako je průjem, křeče nebo hemoragický uremický syndrom. [29, 30]

E. coli spadá do skupiny fekálně koliformních bakterií, která není schopna rozkládat ureázu. *E. coli* nejlépe roste při 37 °C za aerobních podmínek na MacConkey agaru, na kterém tvoří růžové kolonie. [27]



Obrázek 3 *Escherichia coli* (dostupné: *Fda.gov*, 2019 – online)

Jmenované kmeny (VTEC, EHEC a STEC) jsou poměrně odolné, rozsah teploty, při které jsou schopny růstu je od 7 °C do 50 °C. Doba inkubace se pohybuje v rozmezí od 3 do 8 dnů. [30]

Stanovení této bakterie je českou legislativou vyžadováno v povrchových vodách (NV 229/2007), pitných vodách (Vyhl. 275/2004 Sb., 187/2005 Sb., 293/2006 Sb.), balených vodách (Vyhl. 275/2004 Sb.) a koupalištích (Vyhl. 135/2004 Sb., 292/2006 Sb. [28]).

- Kmeny verotoxigenní *E. coli*

Tento kmen byl poprvé popsán v Kanadě v 80. letech 20. století, kdy byl velký nárůst morbidity a úmrtnosti zapříčiněn hemoragickou kolitidou. Toto onemocnění bylo následně spojeno s požitím potravin a vody, které byly nedostatečně tepelně upravené, a tak mohlo dojít ke kontaminaci a infekci daného jedince. Posléze došlo i k přímé identifikaci daného typu *Escherichia coli*, kterým bylo označení sérotypu *E. coli* O157:H7. Projevy intoxikace jeho verotoxiny byly spojeny s krvavým průjmem, křečemi, akutním a chronickým onemocněním ledvin a mohly přejít až do hemolyticko-uremického syndromu. [32]

Tento kmen je schopen růst při teplotách od 7 °C do 50 °C, ale optimum zůstává 37 °C. Jsou poměrně odolné, tomu odpovídá schopnost růst i v prostředí s pH okolo 4,4. Doba kultivace se pohybuje v rozmezí od 3 do 8 dnů. Hlavní prevencí, jak se vyvarovat následnému onemocnění, je dodržovat správné hygienické návyky, a to jak při manipulaci tak i při konzumaci potravin, které by mohly být kontaminované. [30]

- Kmeny enterotoxigenní *E. coli*

Tento sérotyp patří mezi nejčastější příčiny průjmů u malých dětí jak u nás, tak ve světě. Každý rok je odhadováno na 280 miliónů případů s průjmovým onemocněním, kterým následně podlehnou 300 000 – 500 000 lidí. I tento typ nákazy souvisí s požitím kontaminovaného jídla a vody. Primárním projevem nákazy je vodnatý průjem, který může trvat i několik dní a zároveň je spojen s dehydratací a úbytkem váhy. Předpokladem projevu je připojení patologického sérotypu k epitelu tenkého střeva a následná produkce toxinu, který zapříčiní zdravotní problémy. [33]

U kmenů, které byly izolované od lidí, bylo analyzováno více než 25 specifických antigenů, nazývané také jako kolonizační faktory (CFs), které působí v různém rozsahu toxigenně. Z toho důvodu je vývoj vakcín ETEC založen hlavně na získání informací o přirozené imunitě a případné přítomnosti antigenů. Samotný kmen ETEC se kultivuje na agaru MacConkey po dobu 24 hod při teplotě 37 °C. Konfirmace se doporučuje pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR). [33]

- Kmeny enteroinvazivní *E. coli*

Enteroinvazivní sérotyp je spojován s bakteriemi z rodu *Shigella*, která patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Společně s EIEC jsou schopny napadnout střevní sliznici člověka a způsobit průjmový syndrom známý jako bacilární úplavice. EIEC a *Shigella* mají hodně společného a z hlediska epidemiologických studií jsou problémem veřejného zdraví po celém světě. Pro jejich rozlišení se využívá sérologických a biochemických metod. V současné době je možné analýzy těchto sérotypů provádět pomocí metod ELISA, polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) a pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). [34]

Primárním zdrojem EIEC jsou nejspíše infikovaní lidé. Infekční dávka *Shigell* je nízká, stačí 10 až několik stovek buněk, u EIEC je zapotřebí nejméně 10⁶ organismů. Patogenita je dána schopností invaze a poškození stěny tlustého střeva. [34]

- Kmeny uropatogenní *E. coli*

Močový trakt patří mezi nejčastější místa bakteriální infekce způsobená *E. coli*. Mezi jedince trpící symptomatickou infekcí močových cest (UTI) řadíme zejména novorozence, mladé ženy a sexuálně aktivní ženy a muže. Kmeny *E. coli* kolonizují tlusté střevo a močový trakt. Každoročně onemocní infekcí močových cest (UTI) přibližně 150 miliónů lidí po celém světě. Kmeny UPEC mají řadu virulentních faktorů (fibríe, pili, bičíky, toxiny), které přispívají ke vzniku onemocnění. Schopnost bakterie přilnout na epitelální stěnu hostitele, představuje

hlavní riziko patogenity. Toto ovšem zcela neplatí u epitelu močového měchýře, který vykazuje obranný mechanismus proti uchycení bakterie na povrch. Léčba antibiotiky se odvíjí od identifikace uropatogenu a jeho citlivosti ke konkrétním ATB. [35]

2.1.1 Inaktivace *E. coli*

Pokud jde o samotnou inaktivaci *E. coli* ve vodném prostředí lze použít např. dezinfekční prostředek, fotokatalýza nebo nové alternativní možnosti. Nabízí se zde dezinfekce pomocí chloru, přičemž dojde k rychlé smrti buněk *E. coli* nebo použití heterogenní fotokatalýzy společně s fotokatalyzátorem TiO₂. Bylo zjištěno, že tímto působením dojde k inaktivaci až 99 % buněk *E. coli*. Na toto téma byla zpracována studie, ze které vyplývá, že při aplikaci fofokatalýzy pomocí fotokatalyzátu TiO₂ o koncentraci 1 mg/l na suspenzi *E. coli* o koncentraci buněk 10³/ ml pod fluorescenčním světlem bylo po uplynutí 60 min. dosaženo úplné inaktivace *E. coli*. [36]

Další metoda, která se při inaktivaci uplatňuje je konvenční dezinfekce pomocí UV rtuťových výbojek. Jedná se o efektivní technologii čištění vody. V posledních letech se využívá alternativy ve formě UV – LED, které emitují vlnové délky mezi 200-290 nm a slouží pro úpravu vody a snížení patogenů. Experimentální testy ukázaly při použití UV – LED při vlnové délce 265 nm po dobu 50 min. redukci *E. coli*. o dva řády. Dále se nabízí použití nanočástic TiO₂ společně s dotovaným dusíkem a stříbrem aktivované viditelným světlem, které účinně snižují *E. coli*. [37]

2.2 Rod *Pseudomonas*

Jedná se o gram-negativní mírně zakřivené pohyblivé tyčky spadající do čeledi *Pseudomonadaceae*. Nejsou schopné fermentovat glukózu a jsou schopné růst při pH mezi 4-8. Optimální kultivační podmínky jsou při teplotě 37 °C. *Pseudomonas* se vyskytují ve vodném prostředí, v půdě, ale mohou se nacházet i na povrchu rostlin a zvířat. Za určitých podmínek vystupuje jako patogen. Šíří se kontaktem poraněné tkáně s kontaminovaným prostředím. Způsobuje infekce močových cest, dýchacích cest, bakteriémie. Míra úmrtnosti infikovaných touto bakterií může dosahovat téměř 50 %. [28]



Obrázek 4 *Pseudomonas* (dostupné the-scientist.com – online)

Pro tento rod je specifická produkce pigmentů, které jsou pro určitý druh specifické a napomáhají tak k jeho identifikaci. Důležité jsou zejména dva pigmenty, prvním pigmentem je pyoverdin – žlutozelený fluorescenční pigment rozpustný ve vodě specifický pro *Ps. fluorescens* a druhým pigmentem je pyocyanin, který produkuje *Ps. aeruginosa*. Pigmentace je jedním z nejvíce nevyzpytatelných fenotypových znaků. Difuzní pigmenty, které fluoreskují pod UV světlem s krátkou vlnovou délkou ($\lambda = 254 \text{ nm}$) se souhrnně nazývají „*fluorescenční pigmenty*“. Další běžné pigmenty (modré, červené, žluté nebo zelené) patří do chemické rodiny fenazinů, některé z nich fluoreskují v UV oblasti při vlnové délce 350 nm, což je důležité rozlišení. [38, 39]

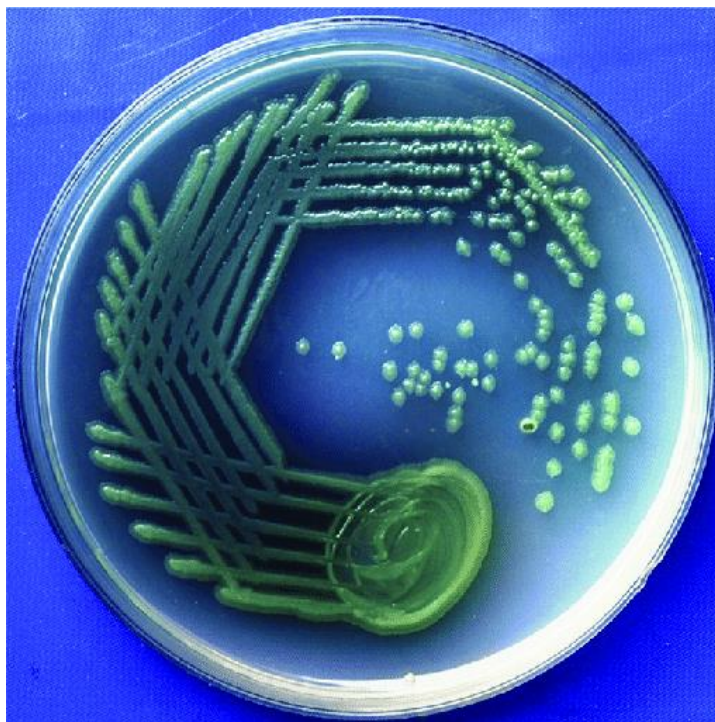
Syntézu těchto pigmentů ovlivňuje mnoho faktorů, jako je např. kultivační médium, pH, světlo a přítomnost některých iontů (Fe^{3+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}). Zejména železo je pro *Pseudomonas aeruginosa* důležité z hlediska zdroje živin. Bohužel v této formě není snadné železo získat, a proto pro jeho příjem *Pseudomonas* využívá siderofory, které vylučuje, a díky nim snadno váže a transportuje železo. [38, 39]

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Jedná se o poměrně rozšířenou bakterii, kterou můžeme najít jak ve vodě, tak i v půdě. Je zodpovědná za infekce močových i dýchacích cest, kůže a krevního řečiště. Představuje zhruba 80 % oportunních infekcí, které způsobuje rod *Pseudomonas*. Je kataláza a oxidáza pozitivní. Pseudomonády jsou přirozeně vysoce odolné vůči dezinfekčním a antimikrobiálním látkám. Za určitých podmínek se chová jako patogen, zejména u jedinců s oslabeným imunitním systémem. Všechny kmeny produkují endotoxin, který je hlavním faktorem virulence. Druhy se potvrzují biochemickými a DNA hybridizačními testy. [40]

Fakt, že se jedná o poměrně odolnou bakterii dokazuje kromě rezistence na několik antibiotik i schopnost metabolizovat širokou škálu sloučenin a proliferovat je ve vodách

s nízkou koncentrací rozpuštěných sloučenin. To ukazuje na velmi dobrou schopnost přizpůsobit se v prostředí s nízkou dostupností živin. Zároveň je schopná tvořit biofilm. Tato vlastnost dělá bakterii mnohem odolnější vůči vnějším vlivům. [40]



Obrázek 5 *Pseudomonas aeruginosa* na živném agaru (dostupné [researchgate.net](https://www.researchgate.net) – online)

2.2.2 *Pseudomonas fluorescens*

Je řazena mezi běžné nepatogenní saprofyty, které kolonizují půdní, vodní a povrchové prostředí rostlin. Vylučuje rozpustný fluorescein. Je méně virulentní než *Ps. Aeruginosa*. Existuje zajímavá souvislost mezi *Ps. fluorescens* a lidským onemocněním, protože přibližně 50 % pacientů s Crohnovou chorobou si vyvíjí sérové protilátky proti *Ps. fluorescens*. Rovněž je ale schopna vyvolat akutní infekci, zejména krevního oběhu. [41]

2.2.3 Inaktivace *Pseudomonas*

Ps. aeruginosa je MO, který je odolný vůči chlóru a ozáření UV světlem. G-bakterie *Ps. aeruginosa* je považována za podmíněně patogenní. V roce 1972 bylo ve studii prokázáno, že TiO_2 vykazuje silnou baktericidní aktivitu v přítomnosti světla (365 nm) na klinicky relevantních MO jako jsou *E. coli* a *Ps. aeruginosa*. Dále jsou dostupná data, která popisují inaktivaci *Pseudomonas* pomocí oxidu chloričitého. Byly navrženy experimenty ke sledování

baktericidních mechanismů, které měly vliv na permeabilitu vnější buněčné a cytoplazmatické membrány a morfologii buněk. [42, 43]

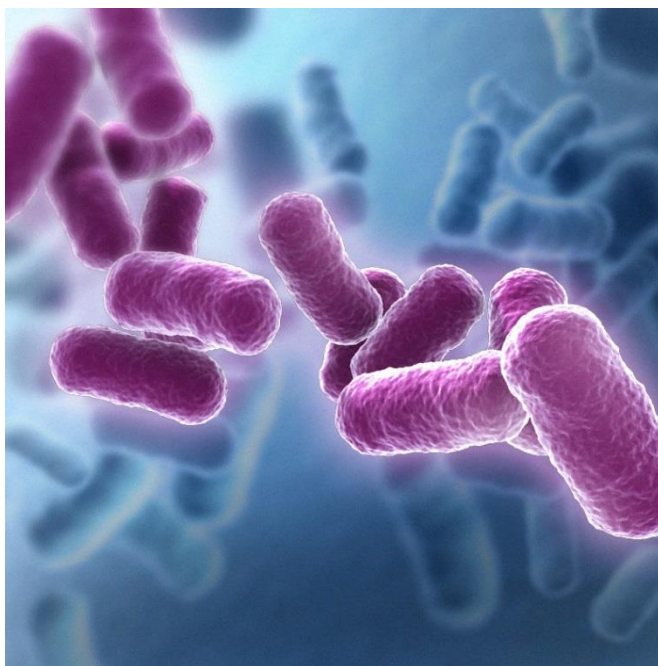
V současné době existují studie, které se zabývaly inaktivací gram negativních bakterií pomocí iontové mědi za kontrolovaných podmínek při dávkách mědi 0,3 a 1 mg/l. Bylo pozorováno snížení množství *E. coli* a *P. aeruginosa*. Tato studie přináší pozitivní zprávy pro mikrobiální kontrolu skladované vody. [44]

Chemická oxidační činidla, jako je chlor, ozon nebo peroxid vodíku mnohdy proti rezistentním MO nestačí. Proto je nutné použít vyspělejší a účinnější metody. Mezi tyto metody lze zahrnout pokročilé oxidační procesy (AOP). Hydroxylový radikál, který využívají, vzniká různými mechanismy, např. i za přispění UV záření společně s fotokatalyzátorem (např. TiO_2). Pokud jsou ozářené částice TiO_2 v přímém kontaktu s mikroby, mikrobiální povrch se stává cílem počátečního oxidačního útoku. Opět existuje studie, která prokazatelně definuje účinný proces v kombinaci UV/ TiO_2 pro úspěšné odstraňování *P. aeruginosa*. [45]

2.3 *Rod Bacillus*

Tento rod se řadí mezi aerobní nebo fakultativně anaerobní gram-pozitivní bakterie, které mají tvar tyčinky. Některé mohou tvořit výjimku a mohou se barvit jako gramnegativní bakterie. Navíc je jim vlastní široká škála fyziologických vlastností, které jim umožňují žít v přírodním prostředí. *Bacillus* má schopnost tvořit spory, které jsou odolné vůči teplu, chladu, záření a dezinfekčním prostředkům. [46]

Tento rod patří do čeledi *Bacillaceae*. Druhy této čeledi jsou identifikovány pomocí morfologických a biochemických kritérií. Jedná se o poměrně odolné mikroorganismy, které nejen, že jsou schopny růst při teplotě 30-35 °C, ale ve formě spor mohou růst i při vysoké teplotě 120 °C, která už je pro některé bakterie smrtelná, jejich vhodné prostředí je při pH 4,3-9,3 a koncentraci chloridu sodného 7 %, při kterých by mohlo přežít jen málo jiných organismů. [47]



Obrázek 6 *Bacillus* (dostupné turbosquid.com – online)

2.3.1 *Bacillus anthracis*

Jedná se o velmi odolnou bakterii, která způsobuje vážná onemocnění. Tato bakterie produkující spory potřebuje ke sporulaci kyslík, tento poznatek je důležitý zejména z pohledu epidemiologie. *Bacillus anthracis* znám také pod názvem antrax, vytváří polypeptidovou kapsli, která jej chrání před fagocytózou. Mezi osoby ohrožené antraxem patří ty, které přicházejí do styku s infikovanými zvířaty nebo živočišnými produkty. Základními typy onemocnění jsou kožní antrax, který je diagnostikován na základě charakteristické papuly nebo escharu s rozsáhlým okolním edémem. Střevní antrax je výsledkem požití infikovaného masa a plicní antrax je výsledkem inhalace spor. Antrax je snadno léčitelný antibiotiky (ATB, např. penicilinem, tetracyklinem nebo chloramfenikolem). Antrax způsobuje asi nejznámější onemocnění, ale i další druhy rodu *Bacillus* se podílejí na celé řadě infekcí, včetně abscesů, bakteriémie, infekce ran a popálenin. [46]

2.3.2 *Bacillus cereus*

Hlavními faktory virulence bakterie *Bacillus cereus* je nekrotizující enterotoxin a silný hemolysin, které způsobují vážná onemocnění. Tato onemocnění se vyskytují zejména při požití kontaminované potravy, ve které se bakterie množí při nesprávném skladování. Otrava způsobená *B. cereus* může mít dva různé typy projevu. Prvním typem onemocnění je průjem spojený s bolestmi břicha, které se objevují 8 až 16 hodin po konzumaci kontaminované

potravy. Druhý typ se vyznačuje nauzeou a zvracením 1 až 5 hodin po konzumaci. Příčinou je odolnost a produkce samotného toxinu. Jeho patogenitu navíc podporuje i tvorba spor, díky kterým je *B. cereus* odolnější a je schopen odolávat pasterizaci i gama záření. V prostředí se dokáže dobře udržet díky hydrofóbní povaze. [46, 48]

2.3.3 *Bacillus subtilis*

Jedná se o rozmanitý bakteriální druh schopný růst v různých prostředích včetně GIT zvířat. Zároveň je schopen vytvářet vysoce rezistentní spící endospory. Tyto spory se snadno rozptylují vzduchem a jsou schopné migrovat na delší vzdálenost. I u tohoto druhu hrozí onemocnění požitím kontaminované potravy. Existují různé diskuse o tom, v jakém prostředí a za jakých podmínek se spory hromadí. Jedna ze studií prokázala, že *B. subtilis* byl ve vegetativní formě ve spojení s půdou, která obsahovala rozkládající organický materiál. [49]

Mnohem častěji se mluví o *B. subtilis* ve spojení s rostlinami. Je schopen růst v těsné blízkosti povrchů jejich kořenů. Existují studie, které dokazují, že *B. subtilis* může podporovat růst rostlin. Možné vysvětlení je takové, že *B. subtilis* konkuruje jiným mikrobům, které by jinak nepříznivě ovlivňovaly rostlinu. *B. subtilis* aktivuje obranný systém hostitele, takže rostlina je připravena odolávat potenciálním patogenům a zároveň umožňuje rostlině snadněji získat určité živiny (např. fosfor a dusík). [49]

2.3.4 Inaktivace *Bacillus*

O inaktivaci tohoto kmene byla napsána studie, která se zabývala kombinací fotokatalytické inaktivace TiO_2 s UV při dezinfekci pitné vody. Využívá se zde volných radikálů $\text{HO}\cdot$, které mohou působit jako silný biocid, protože mají vysoký oxidační potenciál a neselektivní reaktivitu. Studie se zabývala dvěma kmeny bacilů (*B. subtilis* a *B. cereus*) a jejich fotokatalytickou inaktivací ve vodě. Byly použity dva zdroje UV záření. [50]

1. Monochromatická UV lampa s intenzitou ozáření $7\text{mW}/\text{cm}^2$ při 365 nm
2. Denní světlo, které mělo mezi 12 – 14 hodinou pro vlnovou délku 365 nm intezitu $4\text{mW}/\text{cm}^2$.

Při studiu účinnosti fotokatalýzy byly použity *B. cereus* a *B. subtilis*, které jsou vysoce odolné vůči oxidačnímu stresu. Během experimentu bylo zjištěno, že proto, aby došlo k dostatečnému snížení tvorby spor *B.cereus* a *B. subtilis* stačí působit fotokatalyzátorem TiO_2 o

koncentraci 0,25 g/l po dobu 300 min, aby došlo ke snížení počtu obou bakterií přibližně o 4 řády. Během experimentu se prokázalo, že v porovnání s počátečním množstvím spor *B. cereus* a *B. subtilis* došlo k lepšímu výsledku u *B. subtilis*. Z dalších výsledků vyplývá, že co se týká porovnání zdrojů záření, u obou zdrojů je účinnost srovnatelná, ale vzhledem k ceně je sluneční světlo levnější. [50]

3 FOTOKATALÝZA

Fotolýza je proces, při kterém je organická nebo anorganická chemická látka štěpena fotony neboli částicemi zprostředkujícími elektromagnetickou interakci. Tyto částice, které jsou popisovány např. vlnovými délkami, interagují s jednou cílovou molekulou. Reakce fotolýzy není omezena na účinky viditelného světla, ale jakýkoliv foton s dostatečnou energií může způsobit chemickou přeměnu anorganických vazeb chemické látky. Protože energie fotonu je nepřímou úměrná vlnové délce. Jedná se tedy o proces, při kterém dochází k přerušení chemických vazeb v důsledku přenosu světelné energie (přímá fotolýza) nebo radiační energie (nepřímá fotolýza) na tyto vazby. [51, 52]

Rychlost fotolýzy závisí na mnoha faktorech, včetně adsorpčních vlastností a reaktivity chemické látky a intenzitě slunečního záření. V tomto procesu je fotochemický mechanismus fotolýzy rozdělen do tří stupňů: adsorpce světla, která excituje elektrony v molekule, primární fotochemické procesy, které transformují nebo deexcitují excitovanou molekulu a sekundární tepelné reakce, které transformují meziprodukty produkované v předchozím kroku. [51, 52]

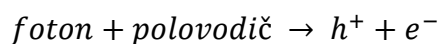
Vzhledem ke zvyšující se složitosti odpadních vod, jsou jako slibné také možnosti úpravy vody metody založené na použití procesů fotokatalytické oxidace. Homogenní a heterogenní fotokatalytické metody jsou při čištění vody založeny na oxidaci působením fotokatalyzátoru a UV světla s možným doplněním např. o ozon, peroxid vodíku atd. [53]

V posledních čtyřech desetiletích došlo k rozvoji fotokatalýzy a rozšířil se i zájem o tuto oblast. Jako fotokatalyzátory pro odstraňování organických a anorganických látek z vodního prostředí se využívají zejména polovodičové materiály. [53]

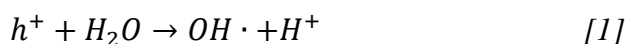
Heterogenní fotokatalýza, pomocí UV/ TiO₂ je jedním z nejběžnějších fotokatalytických procesů, která je založena na adsorpci fotonů energie v maximu 3,2 eV za použití vlnové délky menší než 390 nm. K vytvoření excitovaných vysoce energetických stavů párů elektronů a děr dochází, když jsou polovodiče s širokopásmovým zářením ozářeny vyšší než jejich energií. Výsledkem je přeskok elektronů do vodivostního pásu a vytvoření pozitivní díry ve valenčním pásu. Pro tento systém je charakteristické, že se jedná o silná oxidační a redukční činidla. Reagují s organickými sloučeninami, což vede k jejich oxidaci za vzniku CO₂ a H₂O jako konečných produktů. [54]

3.1 Princip fotokatalýzy

Světlo, dopadající na polovodičový katalyzátor, způsobí přesun elektronu z energeticky nižší (valenční) hladiny na vyšší (vodivostní) hladinu, tím jsou vytvářena elektricky nabitá centra:

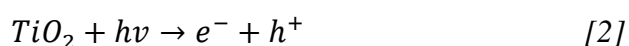


Kde e^- je pohyblivý elektron, h^+ je kladně nabitě centrum (elektronová mezera, angl. "hole", díra). Podaří-li se tato centra odděleně využít, uvolňuje se elektrická energie nebo probíhá chemická reakce. Elektron působí redukci, na straně kladného centra dojde k oxidaci. Následnou a nejpravděpodobnější reakcí, která nastane, bude opět sloučení obou center a degradace světelné energie na teplo. Při fotokatalýze rozhoduje kinetika vyvolaných chemických reakcí. Kladná centra jsou silná oxidační činidla. Je-li přítomna voda, vznikají radikály $OH\cdot$, které působí jako oxidační činidla.



Elektrony z fotoexcitace působí redukčně, v přírodě jsou využívány hlavně při redukci oxidu uhličitého a pro výstavbu organických látek. [49, 54]

Níže jsou uvedeny rovnice popisující reakce fotokatalýzy (rovnice 2 – 7). Působením záření vhodné vlnové délky dojde ke přeskoku elektronu do vodivostního pásu a vzniku elektronové díry v pásu valenčním (rovnice 2), dochází tedy ke vzniku fotogenerovaných nosičů náboje. [55]



Dále může docházet při reakci elektronové díry s hydroxylovým aniontem ke vzniku hydroxylového radikálu (rovnice 3).



Během následující reakce reaguje elektron s kyslíkem za vzniku superoxidového aniontu (rovnice 4).



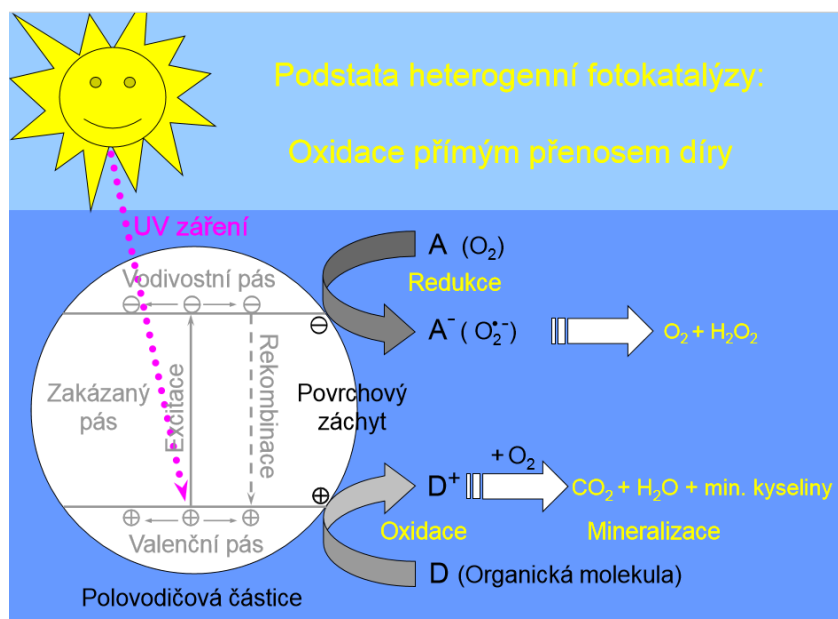
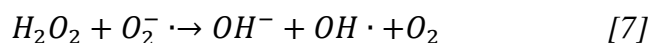
Dále dochází k reakci superoxidového aniontu s kationtem vodíku za vzniku hydroperoxylového radikálu (rovnice 5).



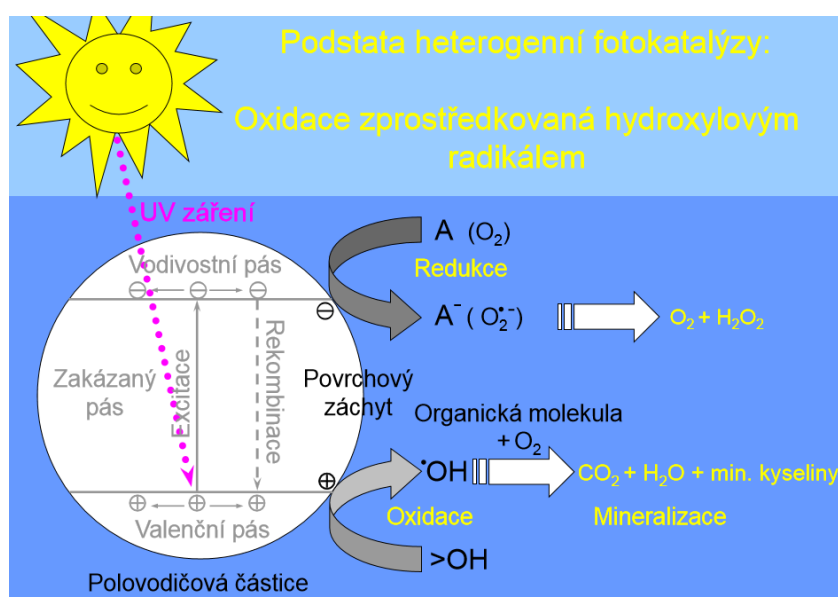
V dalším kroku vzniká ze dvou molekul hydroperoxylového radikálu kyslík a plynný peroxid vodíku (rovnice 6).



Při reakci peroxidu vodíku se superoxidem vznikne hydroxylový radikál a kyslík (rovnice 7).



Obrázek 7 Oxidace přímým přenosem při heterogenní fotokatalýze (dostupné online)



Obrázek 8 Oxidace zprostředkovaná hydroxylovým radikálem při fotokatalýze (dostupné online)

3.2 Využití fotokatalýzy

Pokrok ve výzkumu katalytických vlastností polovodičů v současné době umožňuje využívat poznatky v dalších technologiích, které jsou šetrné k životnímu prostředí. Právě fotokatalýza je dnes využívána hned v několika oblastech životního prostředí, energetiky, systémů zabývajících se čištěním a dezinfekcí vody a vzduchu, sterilizace, vývojem vodíku a fotoelektrochemickou přeměnou. Aby vše mohlo správně fungovat, jsou potřeba dva hlavní už zmiňované faktory. Jedním je ultrafialové záření (UV) s vlnovou délkou kratší než 400 nm. Druhým faktorem je fotokatalyzátor, nejčastěji oxid titaničitý, který je široce používán v rozmanitých barvách, kosmetických přípravcích a potravinových doplňcích. Roční spotřeba TiO_2 ve světě dnes překračuje 3 miliony tun. [56, 57]

Použití této poměrně nové metody má hned několik výhod. Hlavní předností je možný rozklad organické látky až na oxid uhličitý, vodu a anorganické produkty. Tyto složky nejsou pro životní prostředí škodlivé a nevznikají tak odpady, které by se musely později likvidovat jiným způsobem. Do budoucna představuje slibné možnosti propojení fotokatalýzy s membránovou filtrací. Tato kombinace umožní zpracování složitějších odpadních produktů v průmyslu i v zemědělství. [57]

Fotokatalytické vlastnosti TiO_2 jsou dány tvorbou fotogenerovaných nosičů náboje (díra a elektron), ke kterým dochází při absorpci UV světla odpovídající energii tzv. zakázaného pásu. Tyto díry difundují na povrch TiO_2 a reagují s adsorbovanými molekulami vody za vzniku hydroxylových radikálů ($\text{OH}\cdot$). Navíc se povrchy fotokatalyzátoru stávají superhydrofilními s kontaktním úhlem menším než 5 % při ozáření UV světlem. Toho lze využít např. ve stavebnictví. Při dostatečném vystavení světlu dosahuje povrch superhydrofilicity. Voda poté neexistuje ve formě kapky, ale rozprostírá se po povrchu materiálu obsahující fotokatalyzátor. V Japonsku využívají této schopnosti k samočištění vnějšího stavebního materiálu budov. [58]

Fotokatalýza se stala atraktivní v mnoha oborech zabývajících se čištěním vody a vzduchu a také ve stavebním průmyslu. Dnes existuje více než 1000 firem, které své podnikání směřují k účinkům fotokatalytické technologie. Např. české firmy TOTO a RAKO se zabývají výrobou tzv. samočisticího obkladového materiálu pro venkovní a vnitřní použití. Aplikace fotokatalýzy TiO_2 na materiály na bázi cementu umožnila degradaci řady těkavých organických látek (VOC) a některých anorganických sloučenin (NO_x), které jsou agresivní vůči vlastnostem cementových materiálů a životnímu prostředí. Antibakteriální vlastnosti TiO_2 byly využity zejména v systémech čištění vody a vzduchu. Této vlastnosti bylo využito např. u keramických

dlaždic. Jejich povrch byl potažen TiO_2 a tím se vytvořil antiseptický účinek v místnostech nemocnic, jídelen a dalších prostorech s velkým pohybem lidí. Dnes se přidávají kovy Cu a Ag k TiO_2 pro zvýšení antibakteriálních vlastností. TiO_2 vykazuje schopnost rozkládat organické sloučeniny z vnějších buněčných membrán některých MO, což může způsobit jejich buněčnou smrt. Na základě toho byl TiO_2 studován za účelem eliminace *E. coli* při úpravě vody. Při použití TiO_2 byla také zaznamenána úplná fotodegradace řas (*Cladophora*). [56, 59]

V současné době se začíná hodně mluvit o samotné konstrukci nanostruktur a mikrostruktur TiO_2 , které díky zajímavé morfologii přinášejí nové vlastnosti. Nanostrukturované materiály TiO_2 se široce používají nejen ve fotokatalýze, ale také v solárních článcích. [60]

Kombinace technologie dezinfekce a fotokatalýzy za využití sluneční energie nabízí rozšíření možností pro odstranění patogenních MO z pitné vody. V tomto směru přichází v úvahu využití fotoreaktorů. Solární fotokatalýza používá pouze fotony s krátkou vlnovou délkou k iniciaci fotochemického procesu. Protože jde o fotokatalytický proces, opět zde vznikají hydroxylové radikály, které mají nejpozitivnější elektrochemický redukční potenciál (+ 2,8 eV) pro eliminaci rezistentních MO. [61]

3.3 Podmínky pro použití fotokatalýzy

Studie, které se zabývaly fotokatalýzou, definovaly několik základních provozních parametrů, které mají vliv na její průběh. Fotokatalytická aktivita TiO_2 závisí na povrchových a strukturálních polovodičových vlastnostech, jako je složení krystalů, povrch a pórovitost daného katalyzátoru a pásová mezera. Velikost částic je důležitá, protože souvisí s účinností katalyzátoru. P25 obsahuje 75 % anatasu a 25 % rutilu se specifickým povrchem $50 \text{ m}^2/\text{g}$ a velikostí částic 20 nm, právě tyto vlastnosti zvyšují u tohoto fotokatalyzátoru fotokatalytické účinky. Co se týká rozdílného pásu mezi jednotlivými látkami, existuje studie, při které byla sledována rychlost degradace a pořadí bylo následovné $\text{P25} > \text{ZnO} > \text{TiO}_2 > \text{CdS} > \text{WO}_3$. Vyšší fotoaktivita P25 byla přičítána jeho krystalickému složení rutilu a anatasu. Mezi další parametr, který ovlivňuje fotokatalýzu je intenzita světla, která určuje rozsah absorpce světla pomocí polovodičového katalyzátoru při dané vlnové délce. Ze studie, při které byly testovány 3 různé typy UV lam při 254, 300 a 350 nm byl největší kvantový výtěžek fotokatalýzy získán při 300 nm. Tyto parametry se spíše týkali typu a složení fotokatalyzátoru, pokud se zaměříme na prostředí, ve kterém fotokatalýza probíhá, zaměříme se na složení fotokatalyzátoru, pH reakčního roztoku, typy rozpouštědel, typ a intenzita záření a teplota. [62]

Interpretace účinku pH na fotokatalytický proces je velmi obtížný úkol. Souvisí například s elektrostatickými interakcemi mezi povrchem fotokatalyzátoru, molekulami rozpouštědla, substrátem a nabitými částicemi vytvořenými během reakčního procesu. Povrch TiO_2 je kladně nabitý v kyselém prostředí a záporně nabitý v alkalickém prostředí. Uvádí se, že TiO_2 má vyšší oxidační aktivitu při nižším pH, ale přebytek H^+ může snížit reakční rychlost. [63, 64]

Účinek fotodegradačního procesu je možné změnou pH ovlivnit. Existuje hned několik reakčních mechanismů, jak přispět k degradaci nečistot ve vodném prostředí. Mezi tyto mechanismy patří např. přímá oxidace nebo přímá redukce elektronu ve vodivém pásu. Všechny tyto mechanismy jsou ovlivněny povahou substrátu a pH. pH roztoku modifikuje rozhraní mezi elektrickou dvojitou vrstvou pevného elektrolytu a ovlivňuje separaci na povrchu polovodičových částic. Povrch fotokatalyzátoru je převážně záporně nabitý. Když se pH snižuje, funkční skupiny jsou protonovány, čímž se zvyšuje kladný náboj povrchu fotokatalyzátoru. Při zvýšené hodnotě pH dochází ke zvýšené tvorbě hydroxylových radikálů. Degradace organických molekul je však potlačena, když je pH příliš vysoké ($\text{pH} > 12$), protože hydroxylové ionty soutěží s organickými molekulami o adsorpci na povrchu katalyzátorů. Výsledkem je to, že pro různé organické roztoky musí být stanoveno optimální pH roztoku. TiO_2 vykazuje amfoterní charakter. Tzn., že na jeho povrchu se může vyvinout pozitivní nebo negativní náboj, a proto změna pH může ovlivnit adsorpci molekul na povrch TiO_2 . Díky dalším studiím bylo prokázáno, že inhibiční účinek byl zřetelný v alkalickém prostředí (pH v rozmezí 11-13). [65, 66]

Dalším parametrem ovlivňující fotokatalýzu je teplota. Je prokázáno, že při zvyšování teploty se fotokatalytická degradace organických molekul zvyšovala. Většina fotokatalytických procesů nevyžaduje vysokou teplotu a je schopna pracovat při pokojové teplotě. Optimální rozmezí teplot se pohybuje mezi 20 – 80 °C. Je to z toho důvodu, že při nízkých teplotách se aktivita snižuje a rychlost reakce klesá, pokud by teplota byla vyšší než 80 °C, mohlo by dojít varu a rychlost reakce by byla díky exotermickému limitu zastavena. [67]

3.4 Fotokatalyzátory

Fotokatalyzátor je látka, která je aktivována adsorpcí fotonu a je schopna urychlit reakci, aniž by byla spotřebována. Nejpoužívanější fotokatalyzátory patří mezi polovodiče. Polovodičem zprostředkovaná fotokatalýza zahrnuje fotoexcitaci, která způsobuje separaci náboje v polovodičových částicích, následovanou současnou oxidací a redukcí adsorbovaných

organických substrátů. Účinnost redoxní reakce je určena životností separace náboje. Polovodič je popisován tzv. pásovým modelem atomů, zároveň dochází k překryvu valenčních orbitalů, a tím vzniká souvislý kontinuální pás energií, který je specifický pro fotokatalytickou reakci. [68]

Polovodiče z oxidů kovů jsou považovány za nejvhodnější fotokatalyzátory díky jejich fotokorozivní odolnosti a energii širokopásmových mezer. Právě ty mají u heterogenní fotokatalýzy velký potenciál při čištění životního prostředí a odstraňování organických látek. Oxidy kovů mají velkým význam při sanaci životního prostředí díky své schopnosti generovat nosiče náboje. Významnými vlastnostmi fotokatalytického systému jsou požadovaná mezera v pásmu, vhodná morfologie, velká plocha povrchu, stabilita a možnost opakovatelnosti v použití. Oxidy kovů jako jsou oxidy vanadu, chromu, titanu, zinku a dalších mají tyto vlastnosti. Indukují proces separace náboje s tvorbou pozitivních otvorů, které jsou schopné oxidovat organické substráty. V tomto procesu je oxid kovu aktivován UV nebo VIS světlem. Fotoexcitované elektrony jsou podporovány z valenčního pásma do vodivého pásma, čímž se vytvoří pár elektron / díra (e^-/h^+). Fotodegenerovaný pár je schopen redukovat nebo oxidovat sloučeninu adsorbovanou na povrchu fotokatalyzátoru. Většina fotokatalytických procesů je zaměřena na přeměnu toxických látek na méně toxické nebo na CO_2 a H_2O . [69]

3.4.1 Oxid titaničitý TiO_2

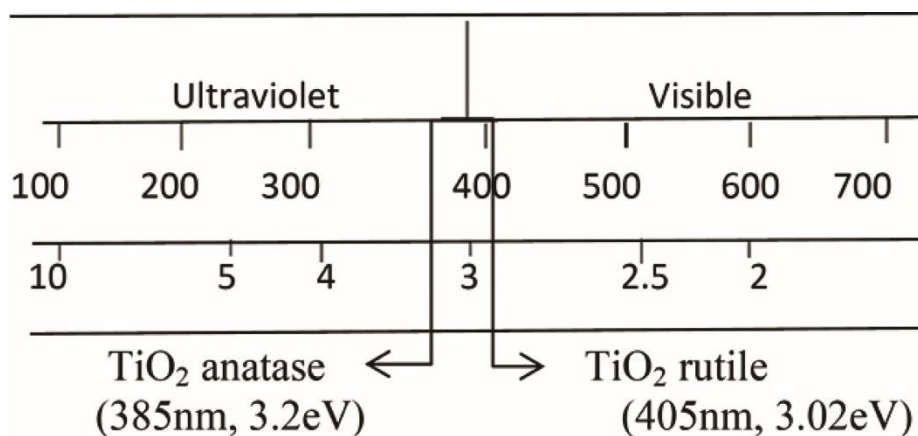
Jedná se o jeden z nejpoužívanějších a nejúčinnějších fotokatalyzátorů dnešní doby. Využívá se zejména ve oblasti čištění vody a vzduchu. Je finančně výhodný, tepelně stabilní, netoxický, chemicky a biologicky inertní. Fotokatalytická aktivita závisí na povrchových a strukturálních vlastnostech, které zahrnují složení krystalů, povrchovou plochu, velikost částic, pórovitost a energii pásové mezery.

Oxid titaničitý, také znám jako anhydrid kyseliny titaničité, se přirozeně vyskytuje ve třech krystalových modifikacích: tetragonální rutil, tetragonální anatas a ortorombický brookit. TiO_2 se vyrábí z ilmenitu v krystalických formách zvaných anatas a rutil. Anatasovou formu lze získat zpracováním síranu titaničitého a ten se získá předchozím zpracováním ilmenitu kyseliny sírové. Rutilová krystalická forma se získá, když se surový rutil chloruje a výsledný chlorid titaničitý se podrobí oxidaci v plynné fázi. Rutil je primární ruda amorfni povahy a představuje nejstabilnější formu. Vyskytuje se v červené barvě, anatas ve žluté až modré. Rutil má vysokou absorpční vlastnost. Obě formy se používají při bílé pigmentaci barev, papírů a keramiky. Opalovací krémy obsahují rutil, protože absorbuje ultrafialové paprsky. Další formou TiO_2 ,

kteřá se v laboratoři používá je směs rutilu a anatasu v poměru (25:75), ta je známa pod názvem Degussa P25. [57, 70]

Jedna z příčin toho, že anatasová forma TiO_2 je více fotoaktivní než rutilová forma, spočívá v rozdílech jejich struktur eneregetických pásů. Aby došlo k aktivaci procesu degradace, vyžaduje TiO_2 světlo při vlnové délce překračující pásmovou mezeru aktivní rutilní fáze (3,0 eV) a anatasové fáze (3,2 eV) tj. vlnových délek <387 nm. Těchto parametrů může nejlépe dosáhnout UV záření, které však představuje v přirozeném slunečním světle pouze 5-8 % slunečního spektra. To výrazně omezuje použití technologie v oblastech, kde je nedostatek elektřiny a možnosti nahradit tento zdroj energie umělým osvětlením. Toto omezení představuje pro vědce cíl, jak dosáhnout zlepšení katalytické aktivity za použití viditelného světla. [70, 71]

Pokroky ve výzkumu přinášejí novou strategii v procesu, jak změnit pásmovou mezeru katalyzátoru. Vědci se domnívají, že přidáním iontu přechodného kovu (např. V, Cr, Mn, Fe a Ni) k TiO_2 , dojde k posunutí absorpčního pásma TiO_2 z UV do viditelné oblasti. To by mělo za následek velké zvýšení účinnosti fotokatalýzy slunečním světlem. Takto vysoké účinnosti lze využít ve stavebním průmyslu, kdy se fotokatalyzátor přidává do materiálu, z kterého se staví nebo se jím pokrývá sklo, u kterého se využívá hydrofilní vlastnosti TiO_2 V tomto případě je možné využít fotokatalyzátor TiO_2 , který účinně rozkládá organické kontaminanty ve vodě. [71]



Obrázek 9 UV oblast pro fotoaktivitu TiO_2 (dostupné sciELO.conicyt.cl – online)

3.4.2 Oxid zinečnatý ZnO

Oxid zinečnatý je polovodič s širokopásmovou mezerou 3,37 – 3,44 eV a velkou excitovanou vazebnou energií 60 meV. V přírodě se vyskytuje jako minerál zinkit. Za atmosférického tlaku se krystalický ZnO nachází v termodynamicky stabilní hexagonální

modifikaci. Samotná sloučenina je ve vodě nerozpustná. Společně s TiO_2 patří mezi nejpoužívanější polovodičové fotokatalyzátory, a to díky vysoké fotocitlivosti, fotochemické stabilitě, velké pásmové mezeře, silné oxidační síle a netoxické povaze. ZnO se vyrábí několika způsoby, pomocí hydrotermální syntézy, tepelným rozkladem nebo metodou srážení a pyrolýzou plamenem. Surový oxid zinečnatý je žluto-šedá pevná látka bez zápachu. Tato anorganická látka se využívá v řadě výrobních procesů. Využívá se například v gumárenství, kosmetice, potravinářství, ale i v lékařství. Většina ZnO se vyrábí synteticky, a to hned v několika odlišných strukturách a modifikacích. [72]

ZnO byl navržen jako alternativní fotokatalyzátor k TiO_2 , protože má podobnou energii pásmové mezery, ale zároveň vykazuje vyšší absorpční účinnost v celé části slunečního spektra ve srovnání s TiO_2 . Aby se vyhodnotila fotocitlivost ZnO a TiO_2 , byla zpracována studie, která se zabývala porovnáním fotodegradačního účinku na pesticidy v odpadní vodě. Prokázalo se, že ZnO vykazuje lepší výsledky ve srovnání s TiO_2 za slunečního záření. Navíc náklady na ZnO jsou až o 75 % nižší než výrobní náklady na nanočástice TiO_2 . Fotoaktivita katalyzátoru se řídí schopností vytvářet fotogenerované páry elektron - díra. Hlavním omezením ZnO je rychlost rekombinace fotogenerovaných párů elektron - díra, která narušuje fotodegradační reakci. Navíc, účinnost přeměny sluneční energie ZnO je ovlivněna její optickou absorpční schopností, která byla spojena s její energií s velkou šířkou pásma. [73]

3.4.3 Další používané fotokatalyzátory

Výzkum fotokatalytických materiálů se v posledních desetiletích neustále rozvíjí. Dosud bylo testováno více než 190 různých polovodičů jako vhodných fotokatalyzátorů. Samotná fotokatalýza je velmi perspektivní technologie v oblasti odstraňování znečištění ze složek životního prostředí. Pozornost je stále v největší míře věnována nejpoužívanějšímu fotokatalyzátoru TiO_2 , ale v současné době přicházejí nové koncepční návrhy, které se zaměřují na modifikace existujících fotokatalyzátorů z důvodu zlepšení fotokatalytické aktivity při působení sluneční energie. [73]

Struktura energetického pásu fotokatalyzátoru hraje významnou roli ve vlastnosti absorpce světla a při určování redoxního potenciálu. Aby bylo možné efektivně využít sluneční energii, je návrh a úprava struktury pásu cestou k získání fotokatalyzátorů účinných za působení viditelného světla s co nejvyšším výkonem. Mezi tyto fotokatalyzátory patří WO_3 , Ag_3PO_4 , BiVO_4 , které mají vhodné konfigurace energetického pásu. Pozoruhodné výsledky z roku 2008 přinášejí sdělení týkající se štěpení vody. Oxidace vody je náročnější než redukce

vody. Je známo více než 100 polovodičových fotokatalyzátorů pro redukci H_2 , ale mnohem méně pro oxidaci na O_2 . WO_3 a $BiVO_4$ jsou známé oxidační katalyzátory pro vývoj O_2 při ozáření viditelným světlem. [74]

WO_3 - Oxid wolframový

Jedná se o polovodič, který přináší oproti TiO_2 různé výhody. Nejen, že může být ozářen viditelným světlem, ale navíc má i dobrou stabilitu v kyselém prostředí, což by mohlo umožnit aplikaci WO_3 při úpravě vody kontaminované organickými kyselinami. Navíc vědci vyvinuly jednoduchou a ekonomicky výhodnou metodu výroby nanočástic hydrátu kyseliny wolframové. Zjistili, že nanotrubičky WO_3 s nanočásticemi platiny (Pt) vykazují větší povrchovou plochu a vyšší fotokatalytickou aktivitu. [74]

Ag_3PO_4 – Fosforečnan stříbrný

V roce 2010 byl testován další aktivní fotokatalyzátor účinný za viditelného světla pro oxidaci vody a fotokompozici organických sloučenin. Kvantová účinnost je u tohoto fotokatalyzátoru až 90 %. Práce s ním, ale přináší i určité nevýhody. Velikost částic Ag_3PO_4 je relativně velká (0,5-2 μm), což omezuje fotokatalytický výkon. Zároveň trpí vážným problémem se stabilitou, která tvoří překážku pro praktické využití jako recyklovatelného a vysoce účinného fotokatalyzátoru. [74]

$BiVO_4$ – Bizmut vanadičný

Je jedním z typických komplexních oxidů, které mají vynikající fotokatalytické vlastnosti ve viditelném světle. Jako polovodič s přímým pásmem 2,4 eV může absorbovat ve viditelném světle. Navíc je stabilní, netoxický a relativně levný. [74]

3.5 Dezinfekční účinky fotokatalýzy

Během minulých let lidé používali obranné systémy proti patogenním MO, jako byly vakcíny, ATB, dezinfekční prostředky, hygienické postupy, dezinfekce a sterilizace. Tyto obranné systémy jsou velice účinné, ale nejsou stoprocentní. Mikroorganismy se rozvíjejí, vytvářejí si rezistenci k ATB a vědeckému vývoji trvá i několik let, než vytvoří nové a účinné antibiotikum proti MO. Po objevení heterogenní fotokatalýzy a TiO_2 nastal v odstraňování MO velký převrat. Objev přinesl hned několik výhod, finanční náklady nebyly tak vysoké, nebyly

zaznamenány negativní účinky na životní prostředí a prokázaly se fotokatalytické účinky na patogeny ve vodném prostředí. [75]

Fotokatalýza je založena na redoxních vlastnostech fotogenerovaných nábojů zachycených na povrchu a vytvořených reaktivních forem kyslíku (ROS; OH·; H₂O₂; atd.). Existuje mnoho studií o cytotoxicitě reaktivních forem kyslíku fotogenerovaných na povrchu TiO₂ ozářeným UV světlem. Jedním z nejvíce toxických pro MO je OH·, kvůli své schopnosti oxidovat mnoho organických substrátů, jako jsou sacharidy, lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Podporuje peroxidaci polynenasyceného fosfolipidu složky lipidové membrány a indukuje poruchu v buněčné membráně. Vědci také učinili pokusy, kde se snažili objasnit mechanismus fototoxicity titanu. Ukázalo se, že oxidace koenzymu A (CoA) může být možným mechanismem fotoindukované buněčné smrti. [76]

3.5.1 Dezinfekční účinky fotokatalýzy na *E. coli*

Byly testovány fotokatalytické inaktivace bakterie *E. coli*. Oxid titaničitý dotovaný uhlíkem, případně modifikovaný komplexem chloridu platnatého byl použit ve formě suspenze. Biocidní účinek na *E. coli* byl pozorován při ozáření viditelným světlem v případě přítomnosti obou fotokatalyzátorů. Další studií bylo dokázáno, že ozářený TiO₂ indukující peroxidaci polynenasycených fosfolipidových složek lipidové membrány způsobuje hlavní poškození v membráně *E. coli* vedoucí k inaktivaci základních životních procesů buňky a v důsledku toho k její smrti. [76]

3.5.2 Dezinfekční účinky fotokatalýzy na *Pseudomonas*

Z pohledu mikrobiologie se jedná o gram-negativní bakterií. V tomto případě je fotokatalýza mnohem náročnější, což je zapříčiněno složením buněčné stěny, G- bakterií. Tenká vrstva peptidoglykanu (7-11 nm) je zapouzdřena fosfolipidovou dvojvrstvou (vnější membrána).

Opět byla zpracována studie, která se zabývala fotokatalytickou aktivitou TiO₂ na *Ps. fluorescens*. Účinnost TiO₂ závisí na počáteční bakteriální populaci, obsahu TiO₂ a intenzitě UV-A záření. Ošetření TiO₂ má za následek zvýšenou peroxidaci lipidů a poškození integrity buněčné membrány před smrtí buněk. Tato teorie byla potvrzena praktickou aplikací na zmiňovanou bakterii. Výsledky studie ukazují, že bakteriální buňky *Ps. fluorescens* při počátečním počtu buněk 10⁷ CFU/ml začaly vykazovat po působení fotokatalyzátoru poškození

buněčné membrány po 30 minutách ošetření, úniku cytoplazmy po 90 minutách a lýze po 150 minutách ošetření, v konečném výsledku bylo množství populace *Ps. fluorescens* 10^5 CFU/ml. [66]

3.5.3 Dezinfekční účinky fotokatalýzy na *Bacillus*

Z pohledu mikrobiologického rozboru se jedná o bakterii gram-pozitivní. V důsledku toho *Bacillus* méně odolává fotokatalytickému procesu. G⁺ bakterie má buněčnou membránu obklopenou buněčnou stěnou obsahující silnou vrstvu (20-80 nm) porézního peptidoglykanu, která je zodpovědná za strukturální integritu a retenci krystalové violeti. Řetězcy kyseliny lipoteichoové sahají z buněčné membrány přes buněčnou stěnu a hrají roli v reakcích vázání buněk. [47]

Vzhledem ke složitosti MO je pochopitelné, proč je celý mechanismus fotokatalytické inaktivace stále neznámý. Jsou však známy sekvence, ke kterým dochází během fotokatalytické inaktivace. Jedná se o prodloužený útok ROS, což má za následek poškození buněčné stěny, následné působení na cytoplazmatickou membránu a přímý útok na intracelulární komponenty. Přestože má fotokatalýza velký potenciál pro použití jako biocidní technologie, při provádění je třeba postupovat opatrně, neboť organismy mají potenciál zotavit se ze smrtelného stresu vystaveného ROS a znovu růst. Fotokatalytické posílení dezinfekce vody pomocí záření a TiO₂ prokázalo v mnoha případech úspěšnou inaktivaci vodních patogenů (*E.coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*). [75]

Ve vypracované studii byly porovnány úrovně inaktivace spór *Bacillus subtilis* pro různé dezinfekční procesy (UV, TiO₂ a UV-TiO₂). Výsledky ukázaly, že inaktivační účinek na spóry *B. subtilis* samotným ošetřením UV byl mnohem nižší než u bakterií bez endospor. Samotný TiO₂ ve tmě jako kontrolní experiment nevykazoval téměř žádný inaktivační účinek. Ve srovnání se samotným UV ošetřením se inaktivační účinek významně zvýšil s přidáním TiO₂. Zvýšení intenzity UV záření a koncentrace TiO₂ přispěly ke zvýšení inaktivačního účinku. Bylo zjištěno, že peroxidace lipidů je základním mechanismem inaktivace. Výsledkem byla silně poškozená buněčná membrána a buněčný obsah byl kompletně lyzován procesem UV-TiO₂, což naznačuje, že peroxidace lipidů by mohla být podstatou zvýšení účinnosti inaktivace. [77]

4 CÍL PRÁCE

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

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL

5.1 Mikroorganismy

Testování probíhalo na bakterii *Pseudomonas fluorescens* CCM 2115 z České sbírky mikroorganismů, Brno. Dále byl testován *Bacillus subtilis* CCM 2216, taktéž z České sbírky mikroorganismů, Brno. Tyto kmeny byly dlouhodobě uchovávané v mrazícím boxu při teplotě -20 °C v kryozkumavkách.

5.2 Přístroje

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

5.3 Laboratorní pomůcky

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

5.4 Chemikálie a reagenty

Tabulka 3 Seznam chemikálií

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

5.5 Kultivační média a roztoky

5.5.1 MPA –Masopeptonový agar (HiMedia, Indie)

Pro kultivaci bakterií *Pseudomonas fluorescens* a *Bacillus subtilis* jsem použila kultivační médium MPA. Složení média je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Složení kultivačního média MPA

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

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

5.5.2 MPB - Masopeptonový bujón (HiMedia, Indie)

MPB agar jsem použila pro pomnožení bakterií. Složení MPB je popsáno v tabulce 6.

Tabulka 5 Složení kultivačního média MPB

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

Příprava bujónu: Podle pokynů výrobce jsem navážila 25 g směsi pro přípravu MPB do sterilní nádoby a rozmíchala v 1 l demineralizované vody, zároveň jsem změřila pH bujónu, které by mělo být $7,2 \pm 0,2$. Směs jsem sterilizovala v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a vychladnutí jsem nechala roztok vychladnout a skladovala v chladničce při teplotě 5 °C.

5.5.3 Fyziologický roztok

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

5.5.4 Bakteriální kultury

Příprava bakteriální kultury: Bakteriální kulturu jsem připravila z dlouhodobě skladované kryozkumavky. Kulturu jsem rozmíchala v roztoku připraveném z MPB a sterilní demineralizované vody v poměru 1:1. Takto připravený roztok jsem inkubovala při 30 °C po dobu 24 hodin, aby se vytvořil potřebný zákal po analýzu.

6 PRACOVNÍ POSTUP

6.1 Postup při odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy

Do skleněné sterilní kádinky o objemu 600 ml jsem připravila 300 ml roztoku bakteriální kultury (*Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus subtilis*) o zákalu 0,5 McFarland. Tento roztok jsem připravila naředěním předem připraveného MPB média, ve kterém se bakterie kultivovala po dobu 24 h při 30 °C, sterilní destilovanou vodou. Z tohoto roztoku jsem odebrala 1 ml, který byl zpracován dle kapitoly 6.2. Do kádinky jsem přidala potřebné množství (0,5 g/l, 1 g/l nebo 3 g/l) oxidu titaničitého AV01 popř. P25. Do kádinky jsem vložila míchadlo a umístila ji na magnetické míchadlo. Nad kádinku jsem umístila UV lampu, kterou jsem zapnula (celé fotokatalytické zařízení je na obrázku 17). První vzorek jsem odebrala po 5 minutách experimentu, druhý jsem odebrala po 15 minutách od začátku experimentu. Následně jsem každých 15 minut odebrala vzorek až do konečného času 120 minut. Odebraný vzorek jsem za účelem stanovení počtu mikroorganismů zpracovala stejným způsobem jako původní roztok. To znamená, že jsem odebraný vzorek během fotokatalýzy důkladně promíchala a odebrala 1 ml, který jsem přenesla do 1. zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Z této zkumavky jsem opět odebrala čistou špičkou 1 ml a přenesla do další zkumavky. Takto jsem pokračovala až do požadovaného ředění, tedy 10^8 CFU/ml. Tato ředění jsem následně naočkovala pomocí L hokejky na MPA agar a dala do termostatu inkubovat na 48 hodin při 30 °C.



Obrázek 10 Fotokatalytické zařízení (Autor)

6.2 Postup při odstraňování bakterií pomocí fotokatalýzy a přídavku H₂O₂

Do sterilní kádinky o objemu 600 ml jsem připravila 300 ml roztoku bakteriální kultury (*Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus*) o zákalu 0,5 McFarland. Tento roztok jsem připravila naředěním, předem připraveného MPB média, ve kterém se bakterie kultivovaly po dobu 24 h při 30 °C, sterilní destilovanou vodou. Z toho roztoku jsem odebrala 1 ml, který byl zpracován dle kapitoly 6.3. Do kádinky jsem přidala potřebné množství (0,5 g/l, 1 g/l nebo 3 g/l) oxidu titaničitého AV01 popř. P25 a potřebné množství peroxidu vodíku (0,25, 0,5 ml nebo 1 ml). Do kádinky jsem vložila míchadlo a umístila ji na magnetické míchadlo. Nad kádinkou jsem umístila UV lampu, kterou jsem následně zapnula. První vzorek jsem odebrala po 5 minutách experimentu, druhý jsem odebrala po 15 minutách od začátku experimentu a následně každých 15 minut jsem odebrala vzorek, až do konečného času 120 min. Každý odebraný vzorek jsem zpracovala stejným způsobem, to znamená, že jsem odebraný vzorek během fotokatalýzy důkladně promíchala a odebrala 1 ml, který jsem přenesla do 1. zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Z této zkumavky jsem opět odebrala čistou špičkou 1 ml a přenesla do další zkumavky. Takto jsem pokračovala až do požadovaného ředění, tedy 10^x CFU/ml. Tato ředění jsem následně naočkovala pomocí L hokejky na MPA agar a dala do termostatu inkubovat na 48 hodin při 30 °C.

Výsledné hodnoty uvedené v tabulkách ve výsledkové části vycházejí z průměru tří zopakovaných měření pro jednotlivé experimenty popsané v předešlých dvou kapitolách.

6.3 Nepřímé stanovení počtu buněk – Plotnová metoda

Do sterilních plastových zkumavek jsem napipetovala 9 ml sterilního fyziologického roztoku. Do tohoto roztoku jsem pipetovala 1 ml z 300 ml roztoku připraveného pro fotokatalýzu (*Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus* o zákalu 0,5 McFarland) popř. ze vzorku odebraného během fotokatalýzy. Obsah zkumavky jsem důkladně promíchala a opět odebrala 1 ml a ten přenesla do další zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, takto jsem pokračovala až do požadované hodnoty ředění.

Petriho misky s MPA vytemperované na laboratorní teplotu jsem důkladně popsala, aby nedošlo k jejich záměně. Na tyto misky jsem pipetovala 100 µl roztoku ze zkumavek s požadovaným ředěním a pečlivě jsem roztok rozetřela po celé misce sterilní skleněnou hokejkou. Při očkování jsem měla zapnutý kahan a víčko misky jsem přidržovala těsně nad miskou, aby nedošlo ke kontaminaci. Misky jsem otočila, uložila do termostatu a při 30 °C je nechala kultivovat 48 hodin. Po 24 hodinách jsem misky zkontrolovala. Spočítala jsem množství kolonií a misky nechala kultivovat do dalšího dne a zaznamenala výsledky. Po 48 hodinách jsem misky opět zkontrolovala a zaznamenala konečný počet kolonií. Pro misky s nárůstem od 15 do 300 kolonií bakterií *Pseudomonas fluorescens* nebo *Bacillus* jsem provedla výpočet podle vzorce pro výpočet hodnoty CFU/ml. Výsledkem tohoto výpočtu je hodnota CFU/ml, což znamená počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii, tedy počet buněk v 1 ml.

Vzorec pro výpočet hodnoty CFU:

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

Rovnice 8 Výpočet hodnoty CFU

N CFU = počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii

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

n_1 počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění

n_2 počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění

d faktor pro výpočet prvního použitého ředění

V objem inokula očkovaného na každou z ploten

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 *Bacillus subtilis*

V níže uvedených podkapitolách jsou uvedeny a diskutovány výsledky experimentů s bakterií *Bacillus subtilis*. Během experimentů, které byly provedeny v několika kombinacích, byla naměřena data, která byla zpracována do formy tabulek. V tabulkách je uveden poměr mezi naměřeným množstvím *Bacillus* v čase k počátečnímu množství bakterie. Závislost množství *Bacillus* v čase fotokatalýzy byla graficky znázorněna u každého experimentu. Byl testován vliv použitého druhu fotokatalyzátoru (AV01 a P25), jeho koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l nebo 3 g/l) a dále pak vliv přídavku peroxidu vodíku (0,25, 0,5 nebo 1 ml) k fotokatalýze. Dále byl testován také vliv samotného peroxidu vodíku na inhibici bakterie *Bacillus subtilis*.

Sledovaný vliv experimentálních podmínek na růst, resp. úbytek počtu bakterií, je vyjádřen jako CFU/CFU^{poč.}. V první podkapitole (7.1.1) jsou uvedeny experimentálně získané růstové křivky čisté bakterie *Bacillus subtilis* a dále křivka *Bacillus subtilis* společně s přídavkem TiO₂ a *Bacillus subtilis* s přídavkem peroxidu vodíku. V další podkapitole (7.1.2) jsou uvedeny výsledky zbylých experimentů s touto bakterií.

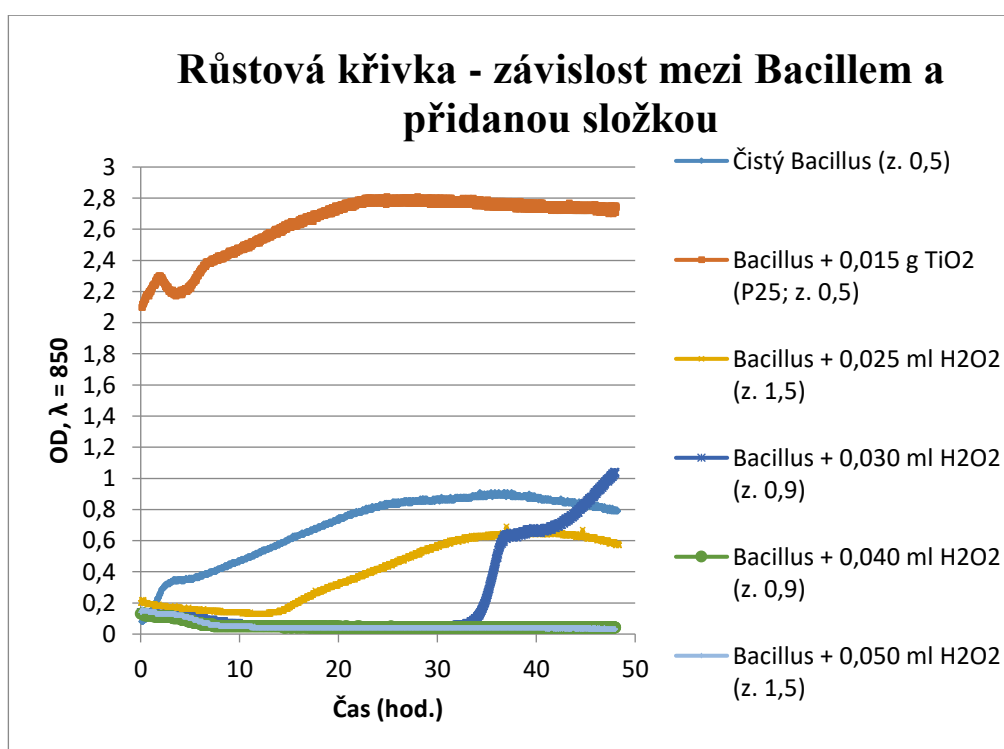
7.1.1 Růstové křivky bakterie *Bacillus subtilis*

Během experimentu bylo u *Bacillus subtilis* provedeno měření, při kterém byl růst bakterie na základě měření optické hustoty (OD) na záznamníku růstu po dobu 48 hodin. Výsledné hodnoty v grafech tedy vyjadřují závislost OD na čase, tato růstová křivka je znázorněna v grafu 1. V průběhu experimentu byl změřen čistý *Bacillus subtilis* při zákalu 0,5 dle McFarlanda. Dále pak *Bacillus subtilis* v kombinaci s fotokatalyzátorem TiO₂ typu P25 s navázkou 0,015 g v 30 ml roztoku, a v neposlední řadě kombinace *Bacillus subtilis* s daným množstvím H₂O₂. Všechny tyto růstové křivky jsou znázorněny v grafu 1.

Graf 1 znázorňuje závislost optické hustoty (OD) *Bacillus subtilis* na čase (48 hod.) v různých kombinacích. Z údajů plyne několik zajímavých závěrů. První z nich je, že porovnáme-li záznam pro čistý *Bacillus subtilis* a záznam, kde byl přidán fotokatalyzátor (ale během celého růstu byla zkumavka zakryta a bylo tak zabráněno přístupu záření), jsou oba průběhy v podstatě identické. Je pravdou, že záznam s fotokatalyzátorem je od samotného počátku posunut k vyšším hodnotám, to je ale způsobeno právě přídavkem TiO₂.

Na základě tohoto porovnání lze tedy konstatovat, že samotný přídavek fotokatalyzátoru nikterak neovlivnil růst bakterií.

Oproti tomu přídavek H_2O_2 na růst bakterie *Bacillus subtilis* vliv měl. Ze záznamu je patrné, že již nejmenší testovaný přídavek H_2O_2 vyvolal z počátku mírný pokles OD, a tedy i zabránil okamžitému růstu bakterie, po cca 14 hodinách však již je na záznamu patrný růst bakterie. Další zvýšení přídavku H_2O_2 na 0,03 ml vedlo k zamezení růstu bakterie *Bacillus subtilis*, na záznamu je však patrný růst po cca 35 hodinách od začátku experimentu. To je možné vysvětlit tím, že přídavkem H_2O_2 sice došlo k inaktivaci většiny bakterií, část z nich však přežila ve formě spor. Tyto spory pak následně vyklíčily a dále se rozmnožovaly. Při dalším zvyšování přídavku H_2O_2 již ani po 48 hodinách nedošlo k žádnému růstu bakterií.



Graf 1 Růstová křivka – závislost OD na čase – *Bacillus subtilis*

7.1.2 Účinnost fotokatalýzy při odstranění *Bacillus subtilis*

Při experimentech založených na odstraňování *Bacillus subtilis* z vodného prostředí jsem se zaměřila na fotokatalytickou aktivitu fotokatalyzátoru TiO₂ dvou typů AV01 a P25 při koncentracích 0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l. Sledovala jsem vliv těchto parametrů na odstranění *Bacillus subtilis* v závislosti na čase. Jednotlivé výsledky experimentů jsou vyjádřeny ve formě tabulek a grafů.

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ AV01

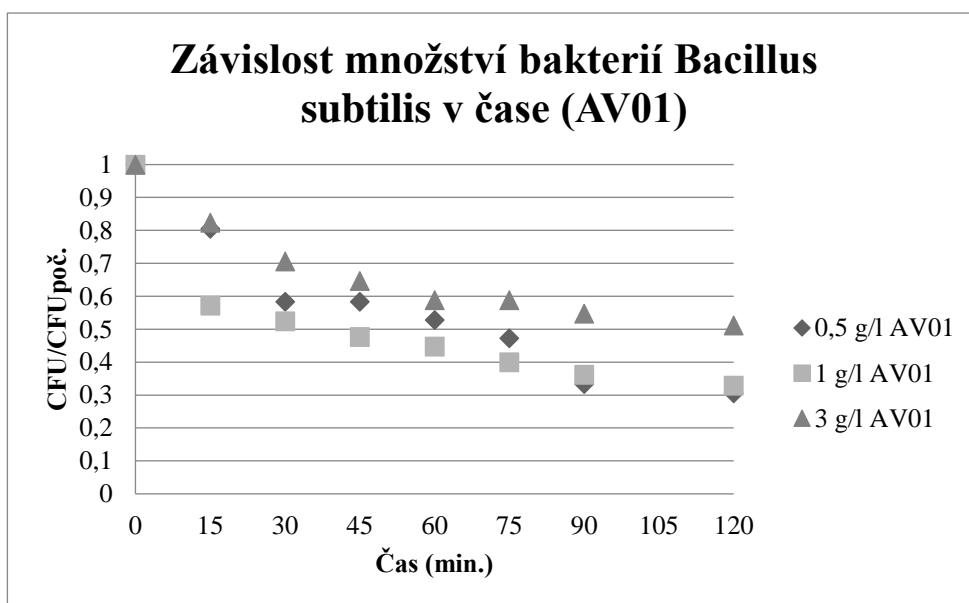
V tabulce 6 a grafu 2 jsou uvedeny výsledky experimentů na základě kterých byla stanovena koncentrace AV01, která byla z hlediska vlivu na bakterii *Bacillus subtilis* v závislosti na čase nejúčinnější. V tabulce 6 jsou uvedeny hodnoty poměru konečného množství bakterie k počátečnímu množství bakterií *Bacillus subtilis* v závislosti na čase. Z hodnot je patrné, že fotokatalýza byla nejúčinnější u navážky 0,5 g AV01. Po 120 minutách bylo v tomto případě odstraněno téměř 70 % z původního počtu bakterií. Je však potřeba poznamenat, že prakticky totožného výsledku bylo dosaženo s navázkou fotokatalyzátoru 1 g/l. Nicméně při téměř totožné účinnosti se jako finančně výhodnější ukazuje použití menšího množství TiO₂. Jako nejhorší v této sérii experimentů se ukázalo použití fotokatalyzátoru o koncentraci 3 g/l. To může být způsobeno již tak vysokou koncentrací fotokatalyzátoru, že během fotokatalýzy dochází ke shlukování jednotlivých primárních částic, případně díky takto vysoké koncentraci již nedochází k tak dokonalému kontaktu všech částic s použitým UV-A zářením. Bohužel tyto předpoklady u dalších experimentů nebyly zcela jednoznačně potvrzeny a vycházejí převážně z prací jiných autorů. Jedná se například o práci, ve které se autor přímo zabývá analýzou fotokatalyzátoru na bázi TiO₂. Nebo se jedná o práci, ve které je přímo popsán vliv TiO₂ na jednotlivé membrány mikroorganismů, které se mezi sebou liší. [78, 79]

Tabulka 6 Závislost množství bakterií *Bacillus subtilis* v čase (AV01)

<i>Bacillus subtilis</i> + Fotokatalyzátor TiO₂ (AV01)								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Navážka TiO ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,5 g/l	1	0,81	0,58	0,58	0,53	0,47	0,33	0,31
1 g/l	1	0,57	0,52	0,48	0,45	0,40	0,36	0,33
3 g/l	1	0,82	0,71	0,65	0,59	0,59	0,55	0,51

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 2 Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy (AV01)

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ P25

V tabulce 7 a grafu 3 jsou opět znázorněny hodnoty, které vycházejí z poměru naměřeného množství *Bacillus subtilis* po fotokatalýze k počátečnímu množství. Celkový poměr mezi množstvím *Bacillus subtilis* se mění v závislosti na čase expozice. Experimenty byly opět provedeny pro tři koncentrace fotokatalyzátoru P25.

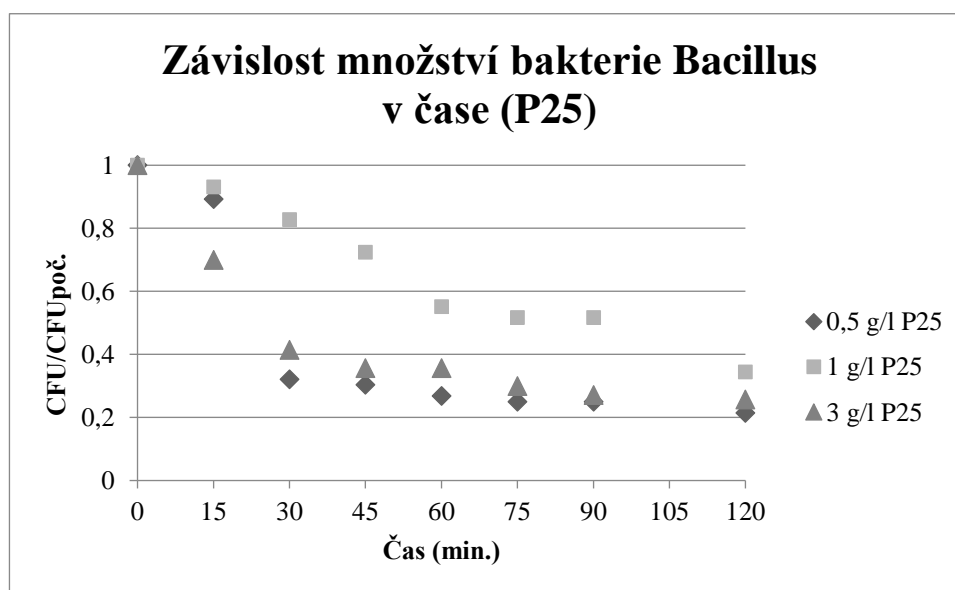
Z naměřených hodnot vyplývá, že nejvyšší účinnosti inhibice bakterie *Bacillus subtilis* bylo dosaženo při použití fotokatalyzátoru P25 o koncentraci 0,5 g/l, kdy došlo k odstranění téměř 80 % z původního počtu bakterií. Obdobný výsledek (účinnost jen asi o 5 % horší) byl dosažen za použití koncentrace 3 g/l. Porovnáním výsledků s předešlým fotokatalyzátorem, tj. s AV01 je patrné, že použití P25 vedlo k lepším výsledkům, byť rozdíl není nikterak zásadní. Otázkou, kterou se nepodařilo zodpovědět zůstává, proč při použití koncentrace 1 g/l bylo dosaženo horších výsledků než ve zbylých dvou případech.

Tabulka 7 Závislost množství bakterií *Bacillus subtilis* v čase (P25)

<i>Bacillus subtilis</i> + Fotokatalyzátor TiO₂ (P25)								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Navážka TiO ₂	CFU/CFU_{poč}							
0,5 g/l	1	0,89	0,32	0,30	0,27	0,25	0,25	0,21
1 g/l	1	0,93	0,83	0,73	0,55	0,52	0,52	0,34
3 g/l	1	0,7	0,41	0,36	0,36	0,3	0,27	0,26

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 3 Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy (P25)

7.1.3 Odstranění *Bacillus subtilis* kombinací TiO₂ a H₂O₂

Tyto experimenty jsou zaměřeny na odstraňování *Bacilla subtilis* z vodného prostředí pomocí kombinace fotokatalýzy fotokatalyzátorem TiO₂ (AV01 a P25) s koncentrací 1 g/l společně s jednotlivými přídávky 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml H₂O₂. Opět jsou jednotlivé hodnoty vyjádřeny ve formě tabulek, kde je znázorněn poměr mezi množstvím bakterie k v původnímu

množství v závislosti na čase. Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy je vyjádřena graficky.

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ AV01 a H₂O₂

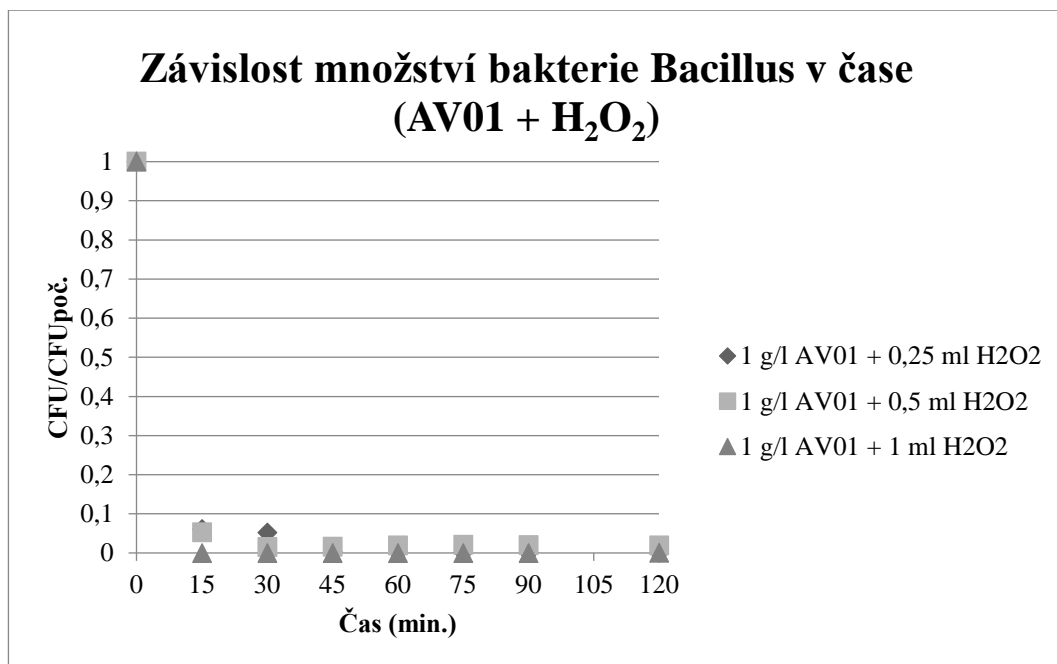
V porovnání s daty, které vycházejí z předchozích experimentů zaměřených pouze na fotokatalyzátor TiO₂ (AV01 a P25), je viditelná mnohem větší účinnost fotokatalýzy při použití kombinace TiO₂ AV01 a H₂O₂. Tabulka 8 a graf 4 znázorňuje poměr mezi naměřeným množstvím *Bacillus subtilis* v daném čase k počátečnímu množství pro kombinaci AV01 o koncentraci 1 g/l s přidáním daného objemu H₂O₂ (0,25; 0,5 a 1 ml). Z výsledků je patrný prakticky okamžitý pozitivní efekt na odstranění bakterie *Bacilla subtilis* a to i při nejnižším objemu přidávaného H₂O₂. Z dat lze usuzovat, že přídavek H₂O₂ působil na bakterie okamžitě, zatímco fotokatalytický účinek působí s jistým časovým odstupem, který je zapotřebí k nastartování reakce a vytvoření dostatečné koncentrace hydroxylových radikálů.

Tabulka 8 Závislost množství bakterií *Bacillus subtilis* v čase (AV01 + H₂O₂)

<i>Bacillus subtilis</i> + Fotokatalyzátor TiO₂ (1 g/l AV01 + H₂O₂)								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H ₂ O ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,25 ml	1	0,06	0,05	0,003	0,002	0,001	0	0
0,5 ml	1	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
1 ml	1	0	0	0	0	0	0	0

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 4 Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy (AV01 + H₂O₂)

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ P25 s H₂O₂

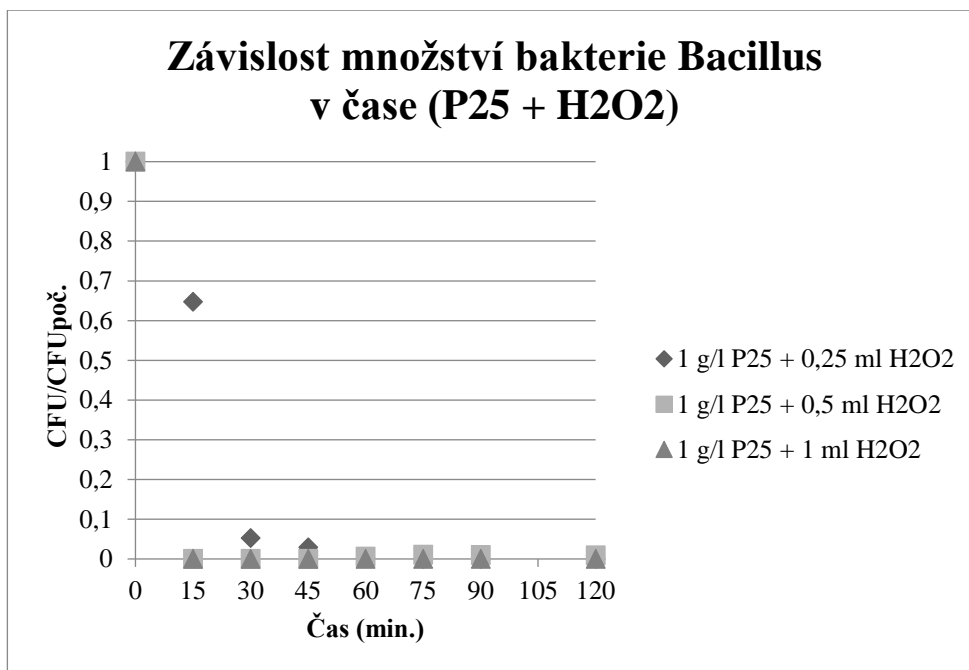
V porovnání s předchozím experimentem je možné konstatovat, že výsledek přidavku H₂O₂ byl pro oba fotokatalyzátory stejný, tj. stejně jako u AV01 došlo i u P25 k prakticky okamžitému zahubení bakterií. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9 a grafu 5.

Tabulka 9 Závislost množství bakterií *Bacillus subtilis* v čase (P25 + H₂O₂)

<i>Bacillus subtilis</i> + Fotokatalyzátor TiO₂ (1 g/l P25 + H₂O₂)								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H ₂ O ₂	CFU/CFU _{poč}							
0,25 ml	1	0,65	0,05	0,03	0	0	0	0
0,5 ml	1	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0
1 ml	1	0	0	0	0	0	0	0

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 5 Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy (P25 + H₂O₂)

7.1.4 Množství odstranění *bacila* čistým H₂O₂

V tomto experimentu byl testován vliv pouze samotného přídatku H₂O₂ bez použití fotokatalyzátoru na bakterie *Bacillus subtilis*. H₂O₂ byl použit ve třech různých objemech, konkrétně se jednalo o 0,25ml, 0,5 ml a 1 ml.

Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny ve formě tabulky a grafu, kde je znázorněn poměr mezi množstvím naměřeného *Bacillus subtilis* v čase k počátečnímu množství *Bacillus subtilis*. Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase po přidání daného objemu H₂O₂ je graficky znázorněna v grafu 6 a v tabelární podobě v tabulce 10.

Z hodnot je patrné, že se jedná o velmi účinnou formu dezinfekce. Data ukazují, že ke 100% snížení množství bakterie došlo po uplynutí 60 minut u přídatků 0,5 a 1ml H₂O₂. Vzhledem k počtu bakterií a účinku na ně, můžeme říci, že tento experiment vyhověl u všech tří přídatků. Po prvních 15 minutách došlo ke snížení počtu bakterií u 0,25 ml H₂O₂ o 95 %, u 0,5 ml H₂O₂ a u přídatku 1 ml H₂O₂ se jednalo o téměř 100 %. Tyto hodnoty vypovídají o tom, že se opravdu jedná o účinnou metodu při odstraňování *Bacilla subtilis* z vodného prostředí. Velkou

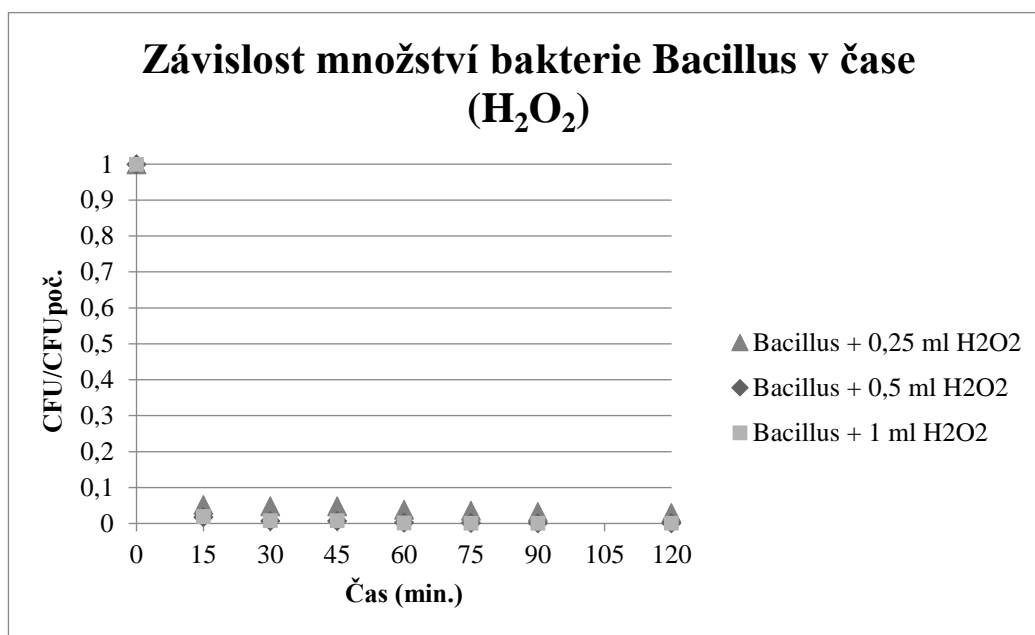
nevýhodou však je množství spotřebované H_2O_2 , kdy jeho použití v masovém měřítku v takto velkých objemech by bylo finančně neúnosné.

Tabulka 10 Závislost množství bakterií *Bacillus subtilis* v čase (H_2O_2)

<i>Bacillus subtilis</i> + čistý H_2O_2								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H_2O_2	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,25 ml	1	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03
0,5 ml	1	0,02	0,01	0,01	0	0	0	0
1 ml	1	0,02	0,01	0,01	0	0	0	0

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 6 Závislost množství *Bacilla subtilis* na čase fotokatalýzy (H_2O_2)

7.2 *Pseudomonas fluorescens*

Níže jsou popsány experimenty s bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Ty byly opět provedeny v několika kombinacích, které odpovídají experimentům provedeným s bakterií *Bacillus subtilis*. Naměřená data byla zpracována a vyjádřena ve formě tabulek a grafů. Sledovaným parametrem byl opět poměr mezi naměřeným množstvím *Pseudomonas* v daném čase k počátečnímu množství *Pseudomonas* v čase počátečním. Jednotlivé podkapitoly popisují

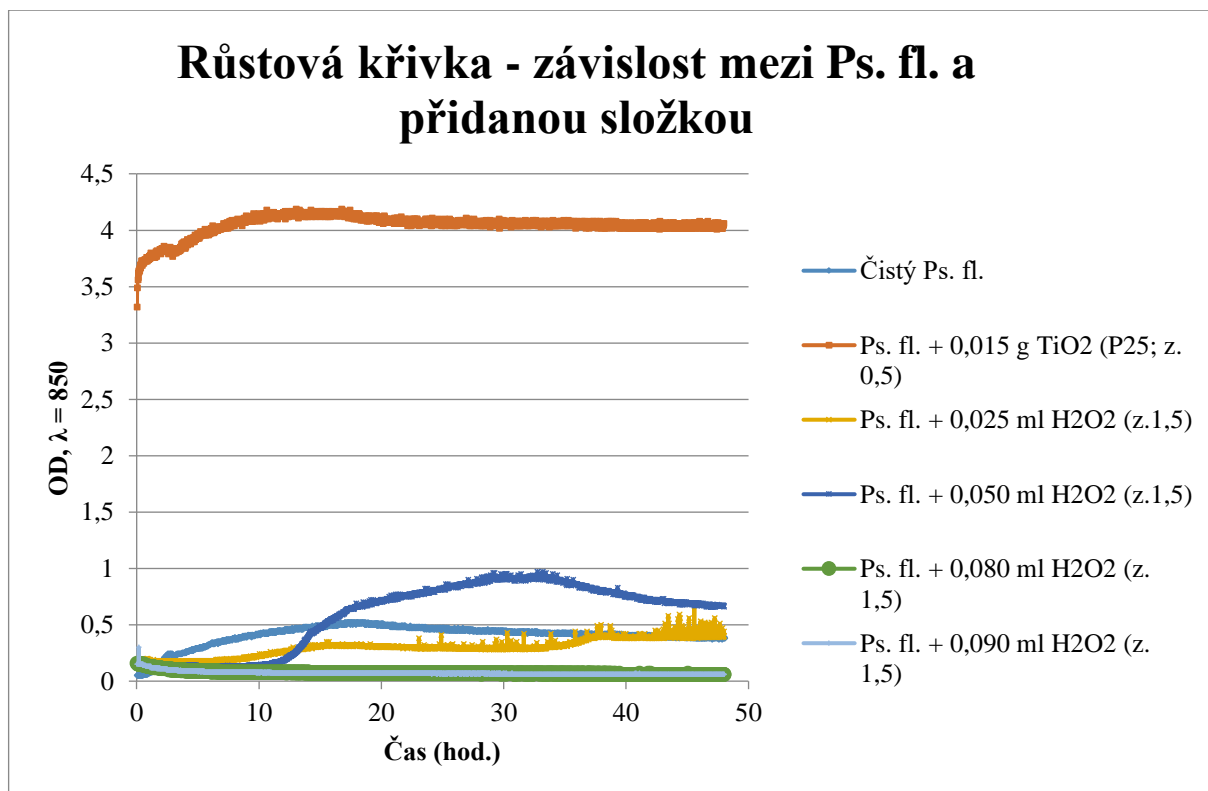
dané experimenty představující vliv použitého typu fotokatalyzátoru TiO₂, typu AV01 nebo P25 o různé koncentraci, dále pak experimenty s fotokatalyzátorem o koncentraci 1 g/l společně s přídatkem 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml H₂O₂. a nakonec kombinaci bakterie s čistým H₂O₂. Součástí této kapitoly je i podkapitola, která popisuje měření OD, při kterém byl sledován pokles nebo nárůst *Pseudomonas fluorescens* v závislosti na čase, jedná se tedy o měření tzv. růstové křivky.

7.2.1 Růstové křivky bakterie *Pseudomonas fluorescens*

Během tohoto experimentu byla u *Pseudomonas fluorescens* provedena série měření, při kterých byl sledován pokles, případně nárůst, bakterie na základě měření OD na záznamníku růstu. Naměřené závislosti jsou znázorněny v grafu 7 a vyjadřují závislosti OD na čase (celková doba 48 hod.), tj. růstové křivky. Uvedené závislosti vycházejí z hodnot, které byly získány průměrováním z opakovaného měření *Pseudomonas*. V průběhu experimentu byl změřen čistý *Pseudomonas fluorescens*, dále pak *Pseudomonas fluorescens* v kombinaci s fotokatalyzátorem TiO₂ typu P25 při navážce 0,015 g do 30 ml roztoku, a v neposlední řadě kombinace *Pseudomonas* při různém zákalu s různým množstvím H₂O₂.

Pokud vezmeme k porovnání růstovou křivku pro čistý *Pseudomonas* a růstovou křivku, kde byl sledován růst *Pseudomonas* s TiO₂, lze opět konstatovat, že přídatek TiO₂ se na růstu nikterak negativně neprojevil. Je tedy zřejmé, že všechny poklesy v růstu při následných fotokatalytických experimentech jsou v důsledku fotokatalytického účinku, a nikoliv pouze v důsledku přídatku samotného TiO₂. Rozdílná hodnota OD při těchto dvou růstových experimentech (jak počáteční, tak i následně během celého růstu) je způsobena právě přídatkem TiO₂. Porovnáním průběhů ale můžeme vidět, že až na tento posun jsou obě růstové křivky velmi podobné.

Další růstové křivky popisují vliv přídatku H₂O₂ na růst, resp. inhibici, bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Oproti experimentům s bakterií *Bacillus subtilis* je z grafu patrné, že na úplné zahubení všech bakterií *Pseudomonas fluorescens* bylo zapotřebí vyšší dávky H₂O₂ než v případě *Bacillus subtilis*. Toto experimentální zjištění koresponduje s teoretickými znalostmi, které uvádějí vyšší citlivost bakterií *Bacillus subtilis* na H₂O₂, než je tomu u bakterií *Pseudomonas fluorescens*.



Graf 7 Růstová křivka – závislost OD na čase – *Pseudomonas fluorescens*

7.2.2 Účinnost fotokatalýzy při odstranění *Pseudomonas fluorescens*

Při experimentech založených na odstraňování *Pseudomonas fluorescens* z vodného prostředí jsem se v tomto případě zaměřila na fotokatalytickou aktivitu fotokatalyzátoru TiO₂ dvou typů AV01 a P25 při daných koncentracích 0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l v závislosti na čase. Jednotlivé hodnoty jsou vyjádřeny ve formě tabulek a grafů, kde jsou data vyjádřena jako časová závislost poměru množství naměřené *Pseudomonas* v čase k počátečnímu množství *Pseudomonas*.

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ AV01

Z hodnot vycházejících z počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens*, které vidíme v tabulce 11, můžeme konstatovat, že došlo k téměř lineárnímu poklesu počtu bakterií v závislosti na čase při působení fotokatalyzátoru TiO₂ typ AV01 při jeho různých koncentracích.

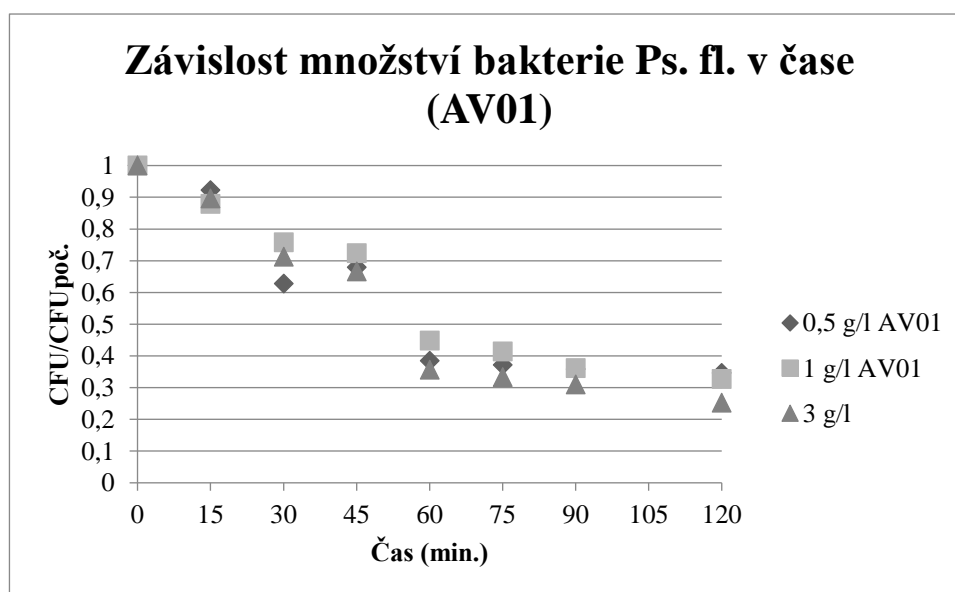
Porovnáním hodnot počtu bakterií na konci experimentů, tj. po 120 minutách je patrné, že s rostoucí koncentrací fotokatalyzátoru vzrostla také účinnost odstranění bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Bohužel tento rozdíl je velmi malý a také z průběhu všech tří závislostí, které jsou zobrazeny v grafu 8 je patrné, že vliv koncentrace fotokatalyzátoru je minimální a není v tomto případě tedy limitujícím faktorem při odstraňování bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Nejvyšší účinnosti odstranění bylo dosaženo pro TiO₂ typu AV01 při použité koncentraci 3 g/l a to 75 % z původního počtu bakterií.

Tabulka 11 Závislost množství bakterií Ps. fl. v čase (AV01)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> + AV01								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Navážka TiO ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,5 g/l	1	0,92	0,68	0,63	0,38	0,37	0,36	0,35
1 g/l	1	0,88	0,76	0,72	0,45	0,41	0,36	0,33
3 g/l	1	0,90	0,71	0,67	0,36	0,33	0,31	0,25

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 8 Závislost množství *Pseudomonas fl.* na čase fotokatalýzy (AV01)

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO₂ typ P25

Testy fotokatalytického účinku na počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* byly provedeny také pro druhý typ fotokatalyzátoru P25. Testovány byly opět 3 koncentrace TiO₂, konkrétně 0,5 g/l, 1 g/l a 3 g/l. I v tomto případě došlo vlivem fotokatalýzy k inhibici bakterií, účinnost byla pro všechny 3 použité koncentrace TiO₂ typu P25 lepší než nejlepší účinnost u typu AV01. Nejlepšího dezinfekčního účinku bylo dosaženo při použití 1 g/l, tato koncentrace odpovídá snížení bakterie po 120 minutách 87 % oproti původnímu množství bakterií v čase 0. Při použití 0,5 g/l dochází k poklesu o 82 % a při použití 3 g/l k poklesu o 80 % vzhledem k původnímu množství bakterií v čase 0.

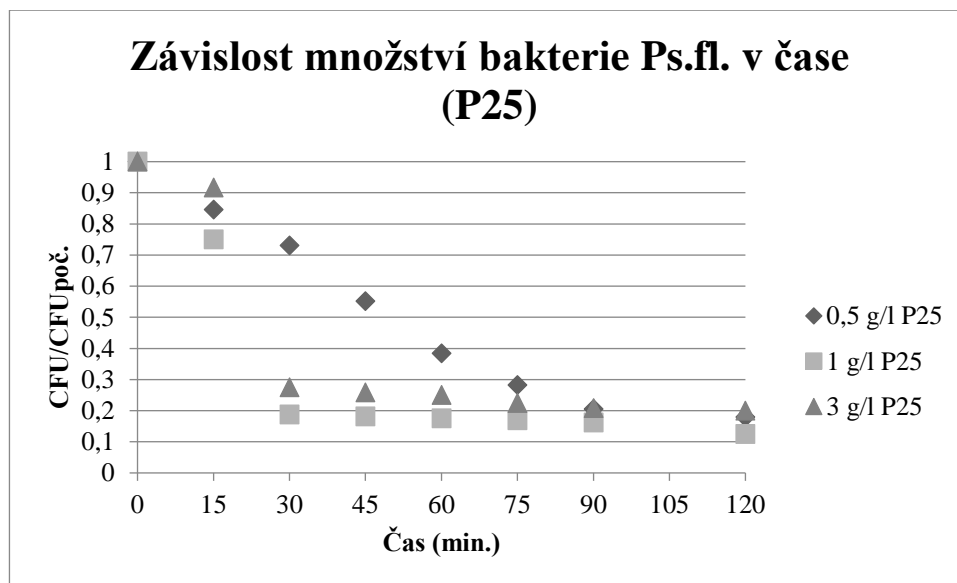
Přestože výsledné hodnoty po 120 minutách jsou si blízké, je zde patrný významný rozdíl v průběhu fotokatalýzy. Zatímco u koncentrací 1 a 3 g/l TiO₂ došlo po 30 minutách ke skokovému poklesu bakterií *Pseudomonas fluorescens* o cca 60 % z jejich původního množství a dál v čase byl již jejich úbytek velmi pozvolný, při použití koncentrace 0,5 g/l byl pokles bakterií v čase téměř konstantní bez výrazného skoku, jak je patrné z grafu 9.

Tabulka 12 Závislost množství bakterií *Ps. fl.* v čase (P25)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> + P25								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Navážka TiO ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,5 g/l	1	0,85	0,73	0,55	0,38	0,28	0,21	0,18
1 g/l	1	0,75	0,19	0,18	0,18	0,17	0,16	0,13
3 g/l	1	0,92	0,28	0,26	0,25	0,23	0,21	0,20

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 9 Závislost množství *Pseudomonas fl.* na čase fotokatalýzy (P25)

7.2.3 Odstranění *Pseudomonas fluorescens* kombinací TiO_2 a H_2O_2

Tyto experimenty jsou zaměřeny na odstraňování *Ps. fl.* z vodného prostředí pomocí kombinace fotokatalýzy fotokatalyzátorem TiO_2 (AV01 a P25) s koncentrací 1 g/l společně s jednotlivými přídávky 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml H_2O_2 . Opět jsou jednotlivé hodnoty vyjádřeny ve formě tabulek, kde je znázorněn poměr naměřeného množství *Pseudomonas* v čase k počátečnímu množství *Pseudomonas*. Závislost množství *Pseudomonas fluorescens* na čase fotokatalýzy je graficky znázorněna.

Fotokatalýza s fotokatalyzátorem TiO_2 typ AV01 s H_2O_2

V porovnání s experimenty, při kterých byl odstraňován *Bacillus*, můžeme konstatovat rozdílný vliv účinnosti H_2O_2 na inhibici bakterií. Zatímco u bakterie *Bacilla subtilis* došlo k okamžitému, skokovému, odstranění téměř všech bakterií i při použití nejnižšího množství H_2O_2 , u bakterie *Pseudomonas fluorescens* byl tento skokový úbytek pozorován pouze v případě, kdy byl použit nejvyšší přídavek H_2O_2 a došlo k odstranění 99,97 % bakterií oproti původnímu množství v čase 0. Ve zbylých případech, tj. při použití menšího množství peroxidu byl pokles počtu bakterií pozvolný a zdaleka ne tak velký. Při použití 0,5 ml H_2O_2 došlo k poklesu o 42 % a při použití 0,25 ml H_2O_2 k poklesu o 35 % vzhledem k původnímu množství

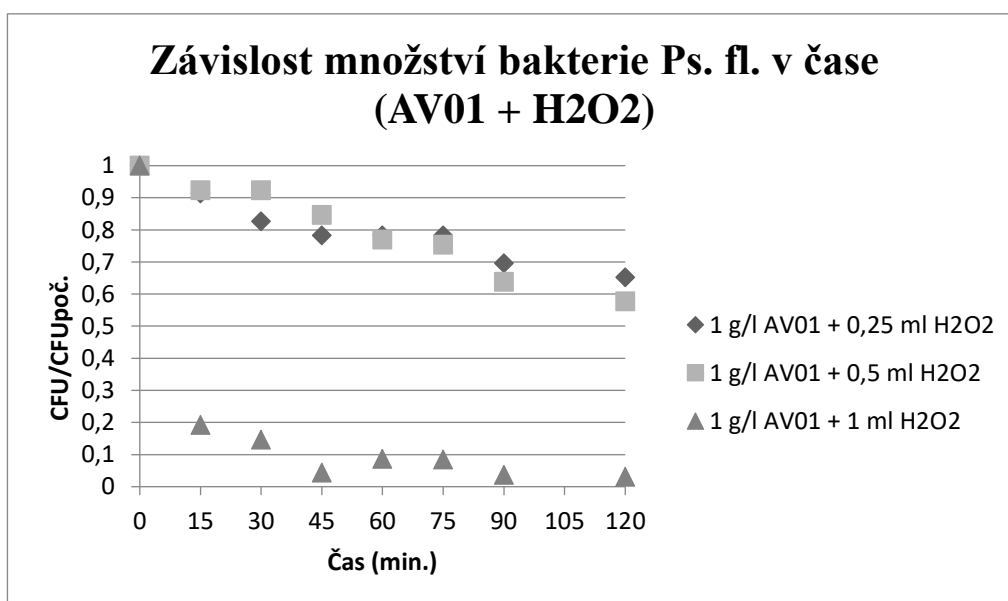
bakterií v čase 0. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tabulce 13 a dále pak znázorněny v grafu 10.

Tabulka 13 Závislost množství bakterií *Ps. fl.* v čase (*AV01 + H₂O₂*)

<i>Pseudomonas fluorescens + 1 g/l AV01 + H₂O₂</i>								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H ₂ O ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,25 ml	1	0,91	0,83	0,78	0,78	0,78	0,70	0,65
0,5 ml	1	0,92	0,92	0,85	0,77	0,75	0,64	0,58
1 ml	1	0,19	0,15	0,04	0,09	0,08	0,04	0,03

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 10 Závislost množství *Pseudomonas fl.* na čase fotokatalýzy (*AV01 + H₂O₂*)

Fotokatalýza fotokatalyzátorem TiO₂ typ P25 s H₂O₂

V této sérii experimentů byla testována účinnost použitého fotokatalyzátoru TiO₂ typu P25 o koncentraci 1 g/l s přidavkem 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml H₂O₂ na snižování množství bakterií *Pseudomonas fluorescens*. Z tabulky 14 je patrné, že k největšímu snížení počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* došlo u experimentu s fotokatalyzátorem TiO₂ typ P25 při koncentraci 1 g/l a přidavku 1 ml H₂O₂. V tomto případě je poměr CFU/CFU_{poč} po uplynutí

120 minut pro *Pseudomonas* nejnižší a to 0,05. To znamená, že bylo odstraněno 95 % bakterií z jejich původního počtu. U zbylých dvou použitých množství H_2O_2 však opět, stejně jako v případě, kdy byl použit typ AV01, pozorujeme pouze pozvolný efekt fotokatalýzy a H_2O_2 na bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Konkrétně u použitého množství 0,25 ml H_2O_2 byl pokles počtu bakterií o 27 % a u 0,5 ml H_2O_2 o 54 % na konci experimentů. Tj. po 120 minutách.

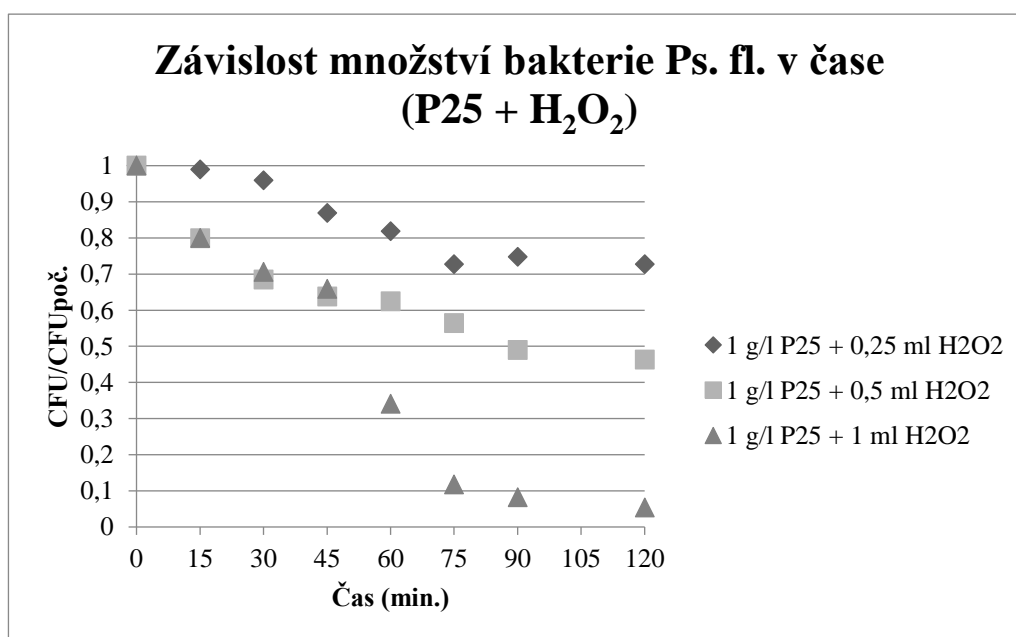
Pokud porovnáme dosažené výsledky pro oba fotokatalyzátory s přidavkem H_2O_2 pro oba testované druhy bakterií, je patrné, že stejně jako v případě růstových křivek i zde se projevil výraznější vliv fotokatalýzy s H_2O_2 na bakterii *Bacillus subtilis*, než tomu bylo v případě *Pseudomonas fluorescens*.

Tabulka 14 Závislost množství bakterií *Ps. fl.* v čase ($P25 + H_2O_2$)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> + 1 g/l P25 + H_2O_2								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H_2O_2	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,25 ml	1	0,99	0,96	0,87	0,82	0,73	0,75	0,73
0,5 ml	1	0,80	0,68	0,64	0,62	0,56	0,49	0,46
1 ml	1	0,80	0,71	0,66	0,34	0,12	0,08	0,05

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím



Graf 11 Závislost množství *Pseudomonas fl.* na čase fotokatalýzy ($PV25 + H_2O_2$)

7.2.4 Množství odstranění *Pseudomonas fluorescens* čistým H₂O₂

V tomto experimentu byl na odstranění *Pseudomonas fluorescens* z vodného prostředí testován pouze H₂O₂ v přídatku o objemu 0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 15 a závislost množství *Pseudomonas fluorescens* v čase je graficky znázorněna v grafu 12.

V porovnání s výsledky získanými při experimentech odstraňování *Bacilla* pomocí čistého peroxidu, lze konstatovat, že k tak znatelnému snížení množství bakterií *Pseudomonas*, jak u *Bacilla* nedošlo. Toto zjištění je v souladu s výsledky experimentů z růstových křivek a z výsledků fotokatalýzy za přídatku H₂O₂.

Pokud porovnáme hodnoty v rámci tomto experimentu, největšího účinku můžeme vidět u přídatku 1 ml H₂O₂, kde po 120 minutách došlo k odstranění bakterií z 39 %.

Ve zbylých případech byla účinnost odstranění bakterií pro přídatek 0,25 ml H₂O₂ pouze 26 %, u 0,5 ml H₂O₂ pak 35 %.

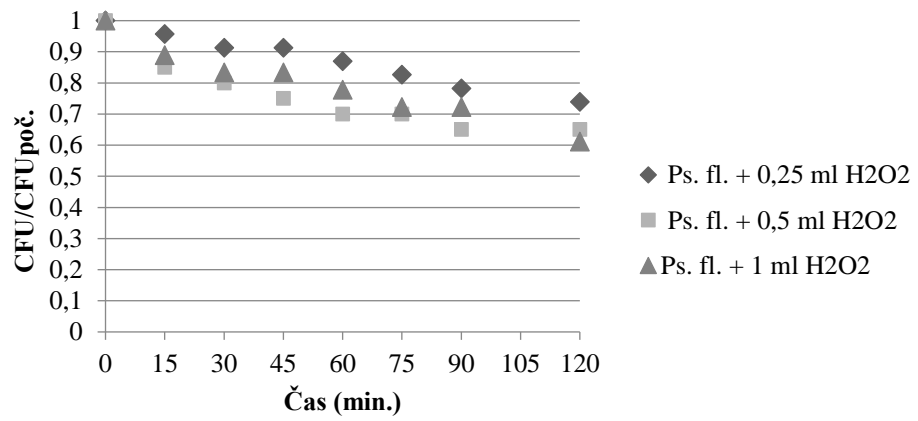
Tabulka 15 Závislost množství bakterií *Ps. fl.* v čase (H₂O₂)

<i>Pseudomonas fluorescens</i> + čistý H ₂ O ₂								
Čas (min)	0	15	30	45	60	75	90	120
Objem H ₂ O ₂	<u>CFU/CFU_{poč}</u>							
0,25 ml	1	0,96	0,91	0,91	0,87	0,83	0,78	0,74
0,5 ml	1	0,85	0,80	0,75	0,70	0,70	0,65	0,65
1 ml	1	0,89	0,83	0,83	0,78	0,72	0,72	0,61

Hodnoty vycházejí z průměrů tří měřených experimentů

CFU/CFU_{poč} – poměr mezi naměřeným množstvím bakterií v čase a počátečním množstvím

Závislost množství bakterie Ps. fl. v čase (H₂O₂)



Graf 12 Závislost množství *Pseudomonas fl.* na čase fotokatalýzy (H₂O₂)

8 ZÁVĚR

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

Na základě této rešerše pak byly provedeny praktické experimenty na dvou mikroorganismech, kterými byly *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas fluorescens*. Testovány byly 2 typy fotokatalyzátoru TiO₂, konkrétně AV01 a P25 a jejich různé koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l, 3 g/l). Dále byl zkoumán vliv tří odlišných přídávku H₂O₂ (0,25 ml, 0,5 ml a 1 ml) na účinnost fotokatalýzy a samotný účinek peroxidu vodíku.

Při testování vlivu typu fotokatalyzátoru TiO₂ (AV01 a P25) došlo u *Bacilla subtilis* k nejlepšímu dezinfekčnímu účinku při použití fotokatalyzátoru P25, kdy pro všechny použité koncentrační hladiny bylo dosaženo lepších výsledků než s AV01. Výjimkou je koncentrace 1 g/l, kde bylo pro oba typy TiO₂ dosaženo prakticky shodného výsledku odstranění bakterií. Dále pak experimenty prokázaly, že nejvhodnější z testovaných koncentrací je pro oba typy TiO₂ při odstraňování bakterie *Bacillus subtilis* 0,5 g/l. Nejlepší výsledek z hlediska účinnosti byl dosažen za použití TiO₂ typu P25, koncentrace 0,5 g/l, kdy bylo odstraněno 79 % bakterií *Bacillus subtilis*.

U *Pseudomonas fluorescens* byl vliv použitého typu TiO₂ na výsledky fotokatalýzy ještě významnější než u bakterie *Bacillus subtilis*. Na všech testovaných koncentračních hladinách došlo u typu P25 k vyššímu procentu odstranění bakterií než u typu AV01. Při posouzení vlivu koncentrace fotokatalyzátoru pak při použití AV01 bylo dosaženo nejlepšího výsledku pro 3 g/l, kdy bylo odstraněno 75 % z původního počtu bakterií *Pseudomonas fluorescens* (oproti 65 resp. 67 % při zbylých koncentracích). U typu P25 pak byl účinek odstranění bakterií nejvyšší pro koncentraci fotokatalyzátoru 1 g/l a to 87 %.

Dále byla testována účinnost fotokatalýzy v kombinaci s přídávkem H₂O₂. Jednalo se o velmi účinnou kombinaci, při které došlo k vysokému snížení množství bakterií vzhledem k původnímu množství a významně se zde projevil vliv druhu bakterie, která byla odstraňována. Zatímco u *Bacilla* došlo k téměř okamžitému skokovému snížení množství bakterií, u bakterie *Pseudomonas fluorescens* nebyla odezva tak významná a k významnému snížení došlo jen za použití kombinace fotokatalyzátoru a největšího množství H₂O₂. Jelikož tento jev byl pozorován u obou testovaných typů fotokatalyzátoru, je zřejmé, že hlavní vliv na odstranění bakterií při použití kombinovaného postupu, tj. fotokatalyzátor a H₂O₂ měl alespoň ze začátku procesu právě přídavek peroxidu.

Pro posouzení vlivu samotného H_2O_2 byla provedena další série experimentů. Do roztoku s danou bakterií byl přidán pouze peroxid bez fotokatalyzátoru a byl sledován vliv tohoto přídatku na účinnost jejich odstranění. Tyto experimenty potvrdily předpoklad, že přídatek H_2O_2 má významný vliv na inhibici bakterií, a to především u *Bacilla subtilis*, kdy již při nejmenším testovaném množství H_2O_2 došlo prakticky k okamžité a téměř 100 % inhibici všech bakterií. U bakterie *Pseudomonas fluorescens* je účinek peroxidu významně horší, a i v případě použití největšího testovaného množství H_2O_2 došlo k odstranění pouze 39 % bakterií.

Pro oba testované bakterie byly hodnoceny jejich růstové křivky. Byl sledován nejen růst samotných bakterií, ale také případný vliv přídatku fotokatalyzátoru a H_2O_2 . Tyto experimenty prokázaly, že přídatek fotokatalyzátoru nikterak růst ani jednoho z testovaných druhů bakterií neovlivnil a výše popsaný výsledek jsou zcela jednoznačně dány až působením fotokatalýzy. Výsledek testování přídatku H_2O_2 pak korespondují s již výše uvedenými poznatky.

Závěrem lze konstatovat, že jak samotná fotokatalýza, tak její kombinace např. s H_2O_2 představuje nadějnou metodu pro odstraňování mikroorganismů z vod. Jak ale výsledky ukazují, je zde velký vliv jak použitého typu fotokatalyzátoru, tak druhu odstraňovaných bakterií.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Povrchové vody [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2019 [cit. 2019-09-23]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/povrchove_vody
- [2] Podzemní vody [online]. Praha: Ministerstvo životního prostředí, 2019 [cit. 2019-09-23]. Dostupné z: https://www.mzp.cz/cz/podzemni_vody
- [3] Voda. [Http://www.envic.cz/voda-zaklad-zivota.htm](http://www.envic.cz/voda-zaklad-zivota.htm) [online]. Plzeň: Environmentální informační centrum Plzeň, 2010 [cit. 2019-09-23]. Dostupné z: <http://www.envic.cz/voda-zaklad-zivota.htm>
- [4] Příručka pro čištění a úpravu vody. Přerov: KEMIFLOC, 1996. ISBN 80-239-2528-8.
- [5] LANGHAMMER, Jakub. Kvalita povrchových vod a jejich ochrana [online]. 1. Praha: Skriptum, Katedra fyzické geografie a geoekologie, Přírodovědecká fakulta Karlova, 2002 [cit. 2019-09-26]. ISBN 978-80-7080-701-9. Dostupné z: https://web.natur.cuni.cz/~langhamr/lectures/wq/skripta/skriptaWQ_2009_web.pdf
- [6] Pitná voda [online]. Praha: Státní zdravotní ústav, 2018 [cit. 2019-09-30]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/pitna-voda>
- [7] Zpráva o kvalitě pitné vody v ČR za rok 2018 [online]. 2019. Státní zdravotní ústav, Praha: Státní zdravotní ústav, Praha, 2019 [cit. 2019-09-30]. ISBN 978-80-7071-385-3. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/monit/voda_2018.pdf
- [8] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. Mikrobiologie v technologii vod. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [9] BAUDIŠOVÁ, Dana. Metody mikrobiologického rozboru vody: (příručka pro hydroanalytické laboratoře). Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G. Masaryka, 2017. ISBN 978-80-87402-61-0.
- [10] What is water disinfection?. Lenntech - water disinfection [online]. The Netherlands: Lenntech, 2019 [cit. 2019-10-15]. Dostupné z: <https://www.lenntech.com/processes/disinfection/what-is-water-disinfection.htm>

- [11] *Water Treatment Manual: Disinfection* [online]. 1. Ireland: Environmental Protection Agency, 2011 [cit. 2020-01-21]. ISBN 978-184095-421-0. Dostupné z: https://www.epa.ie/pubs/advice/drinkingwater/Disinfection2_web.pdf
- [12] INACTIVATION OF HEALTHRELATED MICROORGANISMS IN WATER BY DISINFECTION PROCESSES. *Water Science Technology* [online]. 1989, **21**(3), 179-195 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://iwaponline.com/wst/article/21/3/179-195/23587>
- [13] Filtration. *Encyklopedia Britannica* [online]. Canada: University of Calgary, 2017 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/filtration-chemistry/Filter-types>
- [14] *Drinking water and Human Health* [online]. Kansas City: Extension, 2019 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://drinking-water.extension.org/drinking-water-treatment-filtration/>
- [15] Sedimentation and filtration. *World Health Organization* [online]. Geneva: World Health Organization, 2019 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/WSH02.07_5.pdf?ua=1
- [16] Tlakové membránové procesy. *CZEMP* [online]. Česká lípa: CZEMP, 2018 [cit. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.czemp.cz/cs/membranove-procesy/tlakove-membranove-procesy>
- [17] Tlakové membránové procesy ve vodním hospodářství. *Asio čištění a úprava vod* [online]. Brno: ASIO TECH, spol. s r.o., 2014 [cit. 2020-04-29]. Dostupné z: <https://www.asio.cz/cz/264.tlakove-membranove-procesy-ve-vodnim-hospodarstvi>
- [18] What is Chlorination? *Safe Drinking Water Foundation* [online]. Saskatoon: Safe Drinking Water Foundation, 2017 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://www.safewater.org/fact-sheets-1/2017/1/23/what-is-chlorination>
- [19] Chlorinated drinking-water, chlorination by-products, some other halogenated compounds, cobalt and cobalt compounds. 1. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1991. ISBN 92-832-125

- [20] Ozonation / Ozone Water Treatment. Waterprofessionals [online]. North Carolina and South Carolina: waterprofessionals, 2019 [cit. 2019-10-30]. Dostupné z: <http://www.waterprofessionals.com/learning-center/ozonation/#>
- [21] *Drinking Water Treatment – Ozone* [online]. Kansas City: Extension, 2019 [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <https://drinking-water.extension.org/drinking-water-treatment-ozone/>
- [22] Effect of ozonation on pathogenic bacteria. *Pelagia Research Library* [online]. 2012, **3**(1), 299-302 [cit. 2020-01-21]. ISSN 0976-8610. Dostupné z: <http://www.imedpub.com/articles/effect-of-ozonation-on-pathogenic-bacteria.pdf>
- [23] Introduction to UV Disinfection. *Trojanuv water confidence* [online]. London: Trojan technologies, 2020 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <https://www.trojanuv.com/uv-basics?acceptCookies=1>
- [24] Proč dezinfikovat vodu pomocí UV záření? *WaterFilter - Filtrace a úprava vody* [online]. Praha: WaterFilter, 2020 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <https://www.waterfilter.cz/proc-dezinfikovat-vodu-pomoci-uv-zareni/>
- [25] MADIGAN, Michael T. a John M. MARTINKO. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, 2006. ISBN 0-13-196893-9.
- [26] Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. *International Journal of Enviromental Research and Public Health* [online]. 2010, **7**(10), 3657–3703 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1660-4601/7/10/3657>
- [27] CHAPELLE, Frank. *Ground-water microbiology and geochemistry*. 2nd ed. New York, N.Y.: Wiley, 2001. ISBN 047134852X.
- [28] Bakterie ve vodách a jejich rozdělení. Bakterie ve vodách a jejich rozdělení [online]. Praha: Masarykova Univerzita, 2008 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:2KIY0uU_YTwJ:https://is.muni.cz/th/pr83d/1_UVOD.pdf+&cd=1&hl=cs&ct=clnk&gl=cz
- [29] Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal* [online]. 2011, 2011(5), 173–183 [cit. 2019-10-08]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/ismej201080>

- [30] WHO. E. coli [online]. Geneva: WHO (World Health Organization), 2018 [cit. 2019-10-08]. Dostupné z: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- [31] Pathogenic E. coli. Todar's online Textbook of bacteriology [online]. University of Wisconsin: Department of Bacteriology Wisconsin, 2012 [cit. 2019-10-14]. Dostupné z: http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli_4.html
- [32] Verotoxigenic Escherichia coli (VTEC): A major public health threat in Canada. The Canadian Journal of Infectious Diseases [online]. 2002, 13(5), 321-330 [cit. 2019-10-10]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094888/>
- [33] Characterization of enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from Nicaraguan children in hospital, primary care and community settings. Journal of Medical Microbiology [online]. 2014, 63(5), 729-734 [cit. 2019-10-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042496/>
- [34] Characterization of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains by RAPD analysis. FEMS Microbiology Letters [online]. 1998, 165(1), 159-165 [cit. 2019-10-14]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/165/1/159/623712>
- [35] UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. Frontiers in Microbiology [online]. Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, Torino, Italy: University of Turin, 2017, (8) [cit. 2019-10-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5559502/>
- [36] Inactivation of Escherichia coli by photocatalytic oxidation. *Chemosphere* [online]. 1996, 5(32), 959-965 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0045653595003592?via%3Dihub>
- [37] Photocatalytic inactivation of Escherichia coli bacteria in water using low pressure plasma deposited TiO₂ cellulose fabric. *Photochemical. Photobiological Sciences* [online]. 2019, 18(9), 2248-2258 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/PP/C9PP00050J#!divAbstract>
- [38] The Fluorescent Pigment of Pseudomonas fluorescens : Biosynthesis, Purification and Physicochemical Properties. *Journal of General Microbiology* [online]. 1978, 1978(107),

- 319-328 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/107/2/mic-107-2-319.pdf?expires=1588534570&id=id&accname=guest&checksum=12F969EDB7E10DE4FA900E4BF618C9F5>
- [39] *Practical Handbook of Microbiology* [online]. 2. New York: CRC Press, 1989 [cit. 2020-05-03]. ISBN 0-8493-3704-6. Dostupné z: books.google.cz - Practical Handbook of Microbiology
- [40] Pseudomonas aeruginosa in public water supply. *Water Practice and Technology* [online]. 2019, **14**(3), 732-737 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://iwaponline.com/wpt/article/14/3/732/69476/Pseudomonas-aeruginosa-in-public-water-supply>
- [41] Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the Pseudomonas fluorescens Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(4), 927-948 [cit. 2019-10-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4187640/>
- [42] Bactericidal Activity of TiO₂ on Cells of Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853. *Environmental Photocatalysis 2013* [online]. 2013, **2013**(1), 7 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/ijp/2013/954914/>
- [43] Chlorine dioxide inactivation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in water: The kinetics and mechanism. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 2018, **26**, 46-54 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214714418302836>
- [44] Disinfection of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa by copper in water. *Journal of Water and Health* [online]. 2016, **14**(3), 424-432 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: <https://iwaponline.com/jwh/article/14/3/424/28474/Disinfection-of-Escherichia-coli-and-Pseudomonas>
- [45] Photocatalytic disinfection of water polluted by Pseudomonas Aeruginosa. *Global NEST Journal* [online]. 2007, **9**(2), 132-136 [cit. 2020-01-22]. Dostupné z: https://journal.gnest.org/sites/default/files/Journal%20Papers/132-136_444_DANESHVAR_9-2.pdf

- [46] BARON, Samuel. Medical microbiology. 4th ed. Galveston, Tex.: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.
- [47] Bacillus cereus. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno* [online]. Brno [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/bc/bc.html>
- [48] Bacillus cereus, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2010, **23**(2), 382-398 [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://cmr.asm.org/content/cmr/23/2/382.full.pdf>
- [49] Ecology and genomics of Bacillus subtilis. *Trends in Microbiology* [online]. 2008, **16**(6), 269-275 [cit. 2020-01-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X08000887?via%3Dihub>
- [50] Disinfection of Bacillus spp. spores in drinking water by TiO₂ photocatalysis as a model for Bacillus anthracis. *Water Supply* [online]. 2004, **4**(2), 7-14 [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://iwaponline.com/ws/article/4/2/7/25938/Disinfection-of-Bacillus-spp-spores-in-drinking>
- [51] JØRGENSEN, Sven Erik a Brian D. FATH, ed. Encyclopedia of Ecology. Amsterdam: Elsevier B.V., 2008. ISBN 978-0-444-52033-3.
- [52] SPEIGHT, James G. Environmental organic chemistry for engineers. 1. Boston: Elsevier/Butterworth-Heinemann, [2017]. ISBN 0128044926.
- [53] Photocatalytic Degradation of Organic Pollutants in Water. Intechopen [online]. London, UK: IntechOpen Limited, 7th floor, 2013 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-monitoring-risk-and-treatment/photocatalytic-degradation-of-organic-pollutants-in-water>
- [54] Photocatalysis: Oxidative Processes in Water Treatment. *Journal of Chemistry* [online]. 2013, 2013(168701), 8 [cit. 2019-11-20]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/168701>
- [55] Optimalizace podmínek heterogenní fotokatalýzy při odstranění E. coli z vodného prostředí [online]. Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická, 2019 [cit. 2019-11-20]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/73782/FrancovaP_Optimalizace_podminek_J

P_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Diplomová práce. Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická.

- [56] *Tio₂ fotokatalýza základy a aplikace*. 1. Praha: VIVAS, 2002. ISBN 80-903113-3-4.
- [57] Porous organic materials for photocatalysis. Mpip-mainz.mpg [online]. Mainz: Max planck institute for polymer research, 2015 [cit. 2019-11-06]. Dostupné z: <https://www.mpip-mainz.mpg.de/4774938/Photocatalysis>
- [58] OHAMA, Yoshihiko a Dionys van GEMERT. *Application of titanium dioxide photocatalysis to construction materials: state-of-the-art report of the RILEM Technical Committee 194-TDP*. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2011. ISBN 978-94-007-1296-6.
- [59] Production of electricity and hydrogen by photocatalytic degradation of organic wastes in a photoelectrochemical cell: The concept of the Photofuelcell: A review of a re-emerging research field. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2011, **185**(2-3), 575-590 [cit. 2020-01-28].
- [60] TiO₂ photocatalysis: Design and applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* [online]. 2012, **13**(3), 169-189 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2012.06.001>
- [61] Influence of parameters on the photocatalytic degradation of tetracycline in wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2016, **46**(8), 757-782 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643389.2016.1159093>
- [62] Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: A short review. *Journal of Environmental Management* [online]. 2011, **92**(3), 311-330 [cit. 2020-06-18]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479710002768>
- [63] A review on the factors affecting the photocatalytic degradation of hazardous materials. *Material Science & Engineering International Journal* [online]. 2017, **1**(3), 106-114 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MSEIJ/MSEIJ-01-00018.pdf>

- [64] Parameters affecting the photocatalytic degradation of dyes using TiO₂. *Applied Water Science* [online]. 2017, 7(4), 1569–1578 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13201-015-0367-y>
- [65] Influencing Parameters in the Photocatalytic Degradation of Organic Effluent via Nanometal Oxide Catalyst. *Indian Journal of Materials Science* [online]. 2015, 2015(58), 16 [cit. 2019-12-04]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/601827>
- [66] RAMAMURTHY, V. a Kirk S. SCHANZE. *Organic and inorganic photochemistry*. New York: M. Dekker, c1998. ISBN 0-8247-0174-7.
- [67] MOZIA, Sylwia. Photocatalytic membrane reactors (PMRs) in water and wastewater treatment. A review. *Separation and Purification Technology*[online]. 2010, 73(2)
- [68] Metal oxides as photocatalysts. *Journal of Saudi Chemical Society* [online]. 2015, 19(5), 462-464 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610315000393>
- [69] Luttrell, T., Halpegamage, S., Tao, J. *et al.* Why is anatase a better photocatalyst than rutile? - Model studies on epitaxial TiO₂ films. *Sci Rep* 4, 4043 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep04043>
- [70] What's the difference between rutile TiO₂ and anatase TiO₂. *Fangyuan titanium industry* [online]. China: Fangyuan titanium industry, 2019 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: <http://www.fangyuan-tio2.com/what-s-the-difference-between-rutile-tio2-and-anatase-tio2.html>
- [71] Photocatalytic processes – Selection Criteria for the Choice of Materials. *Photocatalytic processes* [online]. 2003, (2), 71-74 [cit. 2020-01-28]. Dostupné z: https://ncr.iitm.ac.in/251_B.Viswanathan.pdf
- [72] A review of ZnO nanoparticles as solar photocatalysts: Synthesis, mechanisms and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2018, 81(1), 536-551 [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.020>
- [73] Solar photocatalysis for water disinfection: materials and reactor design. *Catalysis Science & Technology* [online]. 2014, (4), 1211-1227 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2014/cy/c4cy00006d?page=search>

- [74] Typical Non-TiO₂-Based Visible-Light Photocatalysts. *IntechOpen* [online]. 2016, (8) [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/62889>[online]. 2009, **88**(3-4), 576-581 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3059320/>
- [75] Visible-Light-Induced Photocatalytic Inactivation of Bacteria by Composite Photocatalysts of Palladium Oxide and Nitrogen-Doped Titanium Oxide. *Appl Catal B*.
- [76] Photocatalytic disinfection of spoilage bacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Micrococcus caseolyticus* by nano-TiO₂. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2014, **59**(2), 1009-1017 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.062>
- [77] Investigation of UV-TiO₂ photocatalysis and its mechanism in *Bacillus subtilis* spore inactivation. *J Environ Sci (China)* [online]. 2014, **26**(9), 1943-1951 [cit. 2020-01-30]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25193846>
- [78] *Studium fotokatalytické účinnosti heterogenních katalyzátorů na bázi TiO₂*. Univerzita Pardubice, 2018. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice.
- [79] Studies on Effect of TiO₂ Nanoparticles on Growth and Membrane Permeability of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus subtilis*. *Current Nanoscience* [online]. 2010, **6**(4), 381-387 [cit. 2020-06-23]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/72022/article>

PŘÍLOHA



Obrázek 11 Bacillus subtilis na agaru MPA



Obrázek 12 *Bacillus subtilis* - 3. ředění, vzorek z 45 minuty



Obrázek 13 *Pseudomonas fluorescens* na agaru MPA



Obrázek 14 *Pseudomonas fluorescens* - 2. ředění, vzorek po 120. minutě