

# **Biodegradace vybraných kosmetických sloučenin v aktivovaném kalu**

Bc. Eva Ringlová

---

Diplomová práce  
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2014/2015

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Eva Ringlová  
Osobní číslo: T13411  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky  
Forma studia: prezenční

Téma práce: Biodegradace vybraných kosmetických sloučenin v aktivovaném kalu

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na popis vybraných kosmetických látek a na jejich vlastnosti.
2. Experimentálně ověřte biologickou rozložitelnost daných látek v aktivovaném kalu.
3. Pokuste se izolovat bakteriální kultury odpovědné za případný rozklad daných látek a prozkoumejte jejich základní vlastnosti.
4. Výsledky přehledně zpracujte požadovanou formou a diplomovou práci odevzdejte v písemné i elektronické podobě v předepsaném termínu.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Odborné práce získané z vědeckých databází, především z Web of Science, SCOPUS, Medline, TOXNET a dalších, dle aktuálních potřeb.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Konzultant: **Ing. Markéta Julinová, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
Ing. Martina Černeková, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývala biodegradací kosmetických sloučenin phenoxyethanolu, cocamidopropyl betainu, ethylhexyl salicylatu a cyclotetrasiloxanu v prostředí aktivovaného kalu analyzovanou respirometrem Micro-Oxymax. Samotné látky, základní čistírenské technologie a biotechnologie jsou rozebrány v teoretické části této práce. Experimentální část byla také zaměřena na izolaci degradujících bakterií, analýzu rychlosti jejich růstu a míry degradace testovaných sloučenin. Získané čisté i smíšené kultury bakterií byly zakonzervovány pro navazující mikrobiologická studia.

Klíčová slova: biodegradace, respirometr, aktivovaný kal, bakterie.

## **ABSTRACT**

The diploma thesis deal with the biodegradability of cosmetic compounds of phenoxyethanol, cocamidopropyl betaine, ethylhexyl salicylate and cyclotetrasiloxane in the activated sludge, analysed with the aid of Micro-Oxymax respirometer. The substances themselves, basic water treatment technologies and biotechnologies are described in the theoretical part of this thesis. The experimental part of the thesis was focused on the isolation of degrading bacteria, analysis of their growth rate and their abilities to tested compounds degradation. Obtained pure as well as mixed bacterial cultures were preserved for future microbiological studies.

Key words: biodegradability, respirometer, activated sludge, bacteria.

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. a konzultantce Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za jejich neustálý vstřícný přístup, trpělivost a cenné rady po celou dobu vypracovávání této práce. Dále své poděkování směřuji celému kolektivu laboratoří mikrobiologie za vytvoření výborných pracovních podmínek. Mnohé díky patří i mé rodině a nejbližším za pomoc a podporu poskytnutou po celou dobu napomáhaly k úspěšnému studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 BIOTECHNOLOGIE</b> .....	<b>13</b>
1.1 ZÁKLADNÍ DISCIPLÍNY .....	13
1.2 BIOTECHNOLOGIE V OCHRANĚ ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ .....	14
1.2.1 Bioindikace znečišťování vod a ovzduší.....	14
1.2.2 Bioremediace.....	15
1.2.3 Biotechnologie ve vodárenství a při čištění plynů .....	15
<b>2 ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD</b> .....	<b>17</b>
2.1 ROZDĚLENÍ ODPADNÍCH VOD .....	17
2.2 KONTAMINANTY .....	19
2.3 TECHNOLOGICKÁ ČISTÍCÍ LINKA.....	19
2.4 MIKROBIÁLNÍ PROCESY PŘEMĚNY LÁTEK.....	21
<b>3 BIODEGRADACE</b> .....	<b>23</b>
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBNÍ AKTIVITY .....	24
3.1.1 Vliv prostředí na aktivitu mikroorganismů.....	24
3.1.2 Účinek struktury a fyzikálně-chemických vlastností kontaminantu .....	25
<b>4 TESTOVANÉ KOSMETICKÉ SLOUČENINY</b> .....	<b>26</b>
4.1 PHENOXYETHANOL .....	26
4.1.1 Vlastnosti.....	26
4.1.2 Použití .....	27
4.1.3 Chování v životním prostředí.....	28
4.2 COCAMIDOPROPYL BETAINE .....	29
4.2.1 Vlastnosti.....	29
4.2.2 Použití .....	30
4.2.3 Chování v životním prostředí.....	30
4.3 ETHYLHEXYL SALICYLATE .....	31
4.3.1 Vlastnosti.....	31
4.3.2 Použití .....	31
4.3.3 Chování v životním prostředí.....	31
4.4 CYCLOTETRASILOXANE.....	32
4.4.1 Vlastnosti.....	32
4.4.2 Použití .....	33
4.4.3 Chování v životním prostředí.....	33
<b>5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>6 POUŽITÝ MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY</b> .....	<b>36</b>



6.1	TESTOVANÉ LÁTKY .....	36
6.2	CHEMIKÁLIE A ČINIDLA.....	36
6.3	ROZTOKY .....	38
6.4	MINERÁLNÍ MÉDIA A ŽIVNÉ AGARY .....	41
6.5	BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	44
6.6	ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY .....	44
6.6.1	Zařízení .....	44
6.6.2	Pomůcky.....	45
<b>7</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>46</b>
7.1	STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK AEROBNÍMI MO PROSTŘEDNICTVÍM SYSTÉMU MICRO-OXYMAX .....	46
7.1.1	Princip .....	46
7.1.2	Samotné provedení experimentu.....	47
7.1.3	Zpracování naměřených dat .....	47
7.1.3.1	Základní vzorce vztahující se k spotřebě kyslíku .....	48
7.1.3.2	Základní vzorce vztahující na produkci oxidu uhličitého .....	49
7.2	STANOVENÍ SUŠINY AK .....	49
7.3	MĚŘENÍ PH.....	49
7.4	ZJIŠTĚNÍ ROZPUŠTĚNÉHO ORGANICKY VÁZANÉHO UHLÍKU (DOC).....	50
7.5	ISOLACE BAKTERIÍ, PODÍLEJÍCÍCH SE NA DEGRADACI TESTOVANÝCH LÁTEK .....	50
7.6	MODIFIKOVANÝ POSTUP NAMNOŽENÍ A ISOLACE DEGRADAČNÍCH BAKTERIÍ U PHE .....	51
7.7	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI RŮSTU JEDNOTLIVÝCH KULTUR BAKTERIÍ V PŘÍTOMNOSTI CAPB A EHS.....	51
7.8	ZHODNOCENÍ RYCHLOSTI RŮSTU A MÍRY DEGRADACE IZOLOVANÝCH KULTUR Z KALOVÉ SUSPENZE CAPB.....	52
7.9	OVĚŘENÍ RŮSTU IZOLOVANÝCH KULTUR EHS NA EH A SALNA .....	52
7.10	KONZERVACE ZÍSKANÝCH KULTUR BAKTERIÍ.....	53
7.11	GRAMOVO BARVENÍ .....	53
7.12	KOH-TEST .....	53
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE .....</b>	<b>54</b>
8.1	VÝSLEDKY POCHÁZEJÍCÍ Z ANALÝZY PROVÁDĚNÉ SYSTÉMEM MICRO- OXYMAX .....	54
8.1.1	Spotřeba O <sub>2</sub> .....	55
8.1.2	Produkce CO <sub>2</sub> .....	58
8.2	BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ PHE.....	61
8.2.1	Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s PHE .....	61
8.3	BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ CAPB.....	62
8.3.1	Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s CAPB .....	62
8.3.2	Ověření schopnosti růstu jednotlivých kultur bakterií s CAPB .....	63
8.3.3	Rychlost růstu a míry degradace izolovaných kultur z kalové suspenze CAPB .....	64
8.3.4	Základní identifikace kultur F1V a F1M .....	66

8.4	BAKTERIE DEGRADUJÍCÍ EHS.....	67
8.4.1	Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s EHS .....	67
8.4.2	Potvrzení schopnosti růstu jednotlivých kultur bakterií s využitím EHS .....	67
8.4.3	Růst izolovaných kultur EHS na EH a SALNa.....	68
8.4.4	Základní identifikace kultur degradující EHS.....	70
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>83</b>

## ÚVOD

V dnešní uspěchané době, zaměřené často více na kvantitu nežli na kvalitu látek a produktů, se často pozapomíná na jednu skutečnost. Jak se budou tyto látky chovat, jakmile se dostanou do životního prostředí, v jaké formě nakonec budou setrvávat, a dojde ostatně k jejich úplnému rozkladu? Až v posledních desetiletích se začalo řešit, jak na všechny tyto látky reaguje prostředí kolem nás. Výsledky možného znečištění se sice nemusí objevit hned, avšak časem se může nečekaně projevit nepříjemná pravda, které bychom mohli čelit mnohem dříve, kdybychom se přece jen zastavili a začali se zavčas ptát.

Velké množství odpadních vod proudí z našich domácností, různých institucí a průmyslových oblastí do čistíren odpadních vod, kde má voda být přečištěna a navrácena zpět. Už jen čistírny odpadních vod jsou výsledkem lidské činnosti znečišťování, kdy už látky takového rozsahu neuměla voda sama zpracovat svým samočisticím procesem. Ani čistírny odpadních vod však nevyřeší všechno, a tak se skrze ně do životního prostředí dostávají látky, které nejsou biologicky odbouratelné a stávají se tak pro nás problémem často nepojmenovaného významu. Proto bychom měli do budoucna věnovat pozornost stanovení biodegradace a toxicity všech látek tak, aby nedocházelo ke kontaminaci životního prostředí, nebo už přímo syntetizovat produkty netoxického charakteru i po jejich rozkladu. Všichni máme jeden stejný cíl – zachovat naši planetu Zemí pro další generace.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOTECHNOLOGIE

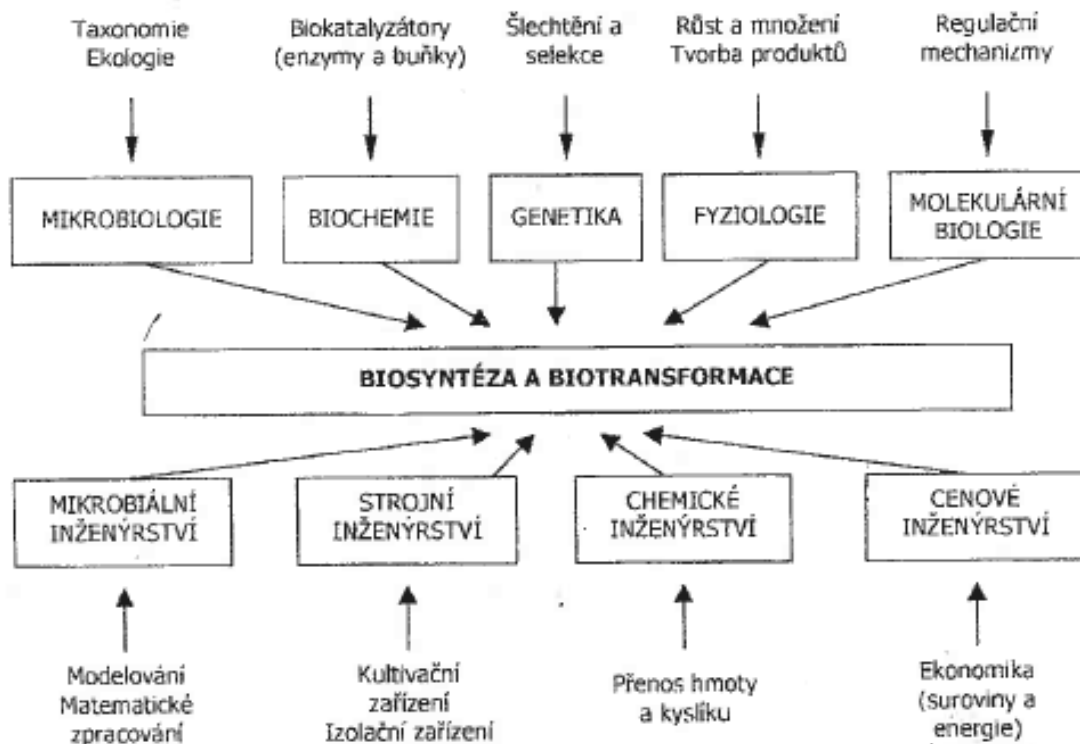
Lidstvo je neoddelitelnou součástí přírody, kde jeho touha po zajišťování i uspokojování vlastních potřeb a nalezení východisek z problémů vzniklých jeho činností vedly ke vzniku a rozvoji nových technologií. Jednou z nich je multidisciplinární biotechnologie, která je nám v některých ohledech známa od nepaměti a její počátky bývají datovány již do let 7000 př. n. l., a to v oblasti zpracování zemědělských produktů [1, s. 2-3]. V průběhu desetiletí se pro tuto technologii sepsalo několik definic pokoušejících se její podstatu jasně vyjádřit. Biotechnologie byla kupříkladu charakterizována Josefem Římanem v roce 1982 jako skupina výrobních a procesních postupů založených na látkové přeměně, tvůrčích mechanismech či dalších projevech mikrobiálních systémů a mikroorganismů (MO), nižších i vyšších rostlin a živočichů [2, s. 10]. Za přesnější vysvětlení této vědní disciplíny se však považuje definice vyslovená na konferenci Úmluvy OSN o biologické rozmanitosti roku 1992, jež byla podepsána až 168 státy a je doposud uznávána. Biotechnologie je vymezena jako jakákoliv technologická operace, využívající biologických systémů, živých organismů nebo jim podobných derivátů, k výrobě nebo úpravě produktů či procesů pro specifické užití [3, s. 1].

### 1.1 Základní disciplíny

Obory aplikované v biotechnologických procesech je možno rozdělit na biologické, chemické a inženýrské, které jsou způsobilé propojeně fungovat díky procesům biosyntézy a biotransformace (Obr. 1). Rozdíl mezi těmito dvěma ději spočívá v jejich složitosti, kdy je biosyntéza složitější z důvodu růstu buněk v komplikovaných bioreaktorech a z hlediska dodržování řady specifických podmínek, jako je sterilita prostředí nebo přesnost měření. Biotransformační procesy jsou obvykle jednodušší, jelikož se využívají imobilizované biokatalyzátory v menších a méně složitých zařízeních [4, s. 3].

Mezi základní obory biotechnologie patří molekulární biologie, která je založena na schopnosti přenosu genu či genů z jednoho organismu do druhého a je výrazně propojena s technikami genového inženýrství. Značně podstatnou vědní disciplínou je také mikrobiologie či průmyslová biotechnologie využívající biochemické procesy MO k výrobě rozličných produktů, jako třeba alkoholických nápojů. Biotechnologie také zahrnuje oblast uplatňující živočišné buňky, tkáně a orgány ke kultivaci produktů typu vakcín, monoklonálních protilátek a léčiv. Nedílnou součástí multidisciplinární biotechnologie je také velmi

nadějný obor nanobiotechnologie s možností aplikace v medicíně, kupříkladu v podobě respirocytů schopných napodobit činnost reálných červených krvinek. Biotechnologie hraje rovněž podstatnou roli v oblasti životního prostředí [4, s. 4; 5, s. 1.4-1.5].



Obr. 1. Základní obory v biotechnologii a jejich propojení [4, s. 4]

## 1.2 Biotechnologie v ochraně životního prostředí

Biologické čištění odpadních vod (OV) či vzduchu, bioremediace, biometalurgie nebo produkce biopaliv jsou procesy, při nichž jsou zužitkovány různé metabolické děje na úrovni populací mikroorganismů, organismů a funkcí genů s cílem přeměnit substrát žadáným způsobem, a vyřešit tak problémy vycházející z kontaminace prostředí. Zahrnuje se zde široká škála aplikací, například mikrobiální procesy degradací a biotransformací kontaminantů nebo procesy mikrobiálních výrob environmentálně šetrných sloučenin MO [6, s. 104-105; 7 s. 8].

### 1.2.1 Bioindikace znečišťování vod a ovzduší

Při zjišťování úrovně čistoty vody se v mnohých případech využívají živé organismy jako mladé ryby, larvy vodního hmyzu, korýši nebo vodní řasy. Pozoruje se také přítomnost vodního hmyzu, protože ten nejenom reaguje na přítomnost toxických látek, ale i na snížení obsahu kyslíku ve vodě způsobené výskytem organických látek, jako jsou

odpady z cukrovarů, papíren a řady dalších odvětví. Čistota ovzduší může být sledována organismy pasivně, pomocí jejich citlivosti na výskyt nečistot v ovzduší, nebo aktivně za předpokladu zužitkování jejich schopností akumulovat kontaminanty ve svých pletivech. Pro pasivní monitorování kvality ovzduší se nejčastěji používají epifytické lišejníky nebo například včelí med při zjišťování obsahu těžkých kovů ze zdrojů emisí. Mechy jsou oproti tomu aplikovány při aktivní bioindikaci, jelikož jsou schopné zadržovat mnohé organické sloučeniny a stopové prvky [8, s. 141-142; 9 s. 388-395].

### 1.2.2 Bioremediace

Hovoříme-li o bioremediaci, rozumíme tím kontrolované použití biologických postupů degradace nebo transformace různých nežádoucích sloučenin metabolickou činností živých organismů. Jinými slovy se jedná o biodegradaci toxických látek prostřednictvím mikroorganismů, rostlin nebo živočichů. MO tyto látky využívají jako zdroje uhlíku a energie pro základní životní funkce nebo přeměňují polutanty na jiné sloučeniny v přítomnosti kosubstrátu. Kontaminanty jsou tak transformovány na méně škodlivé nebo neškodné produkty, které se následně přirozeně začlení do základních biogeochemických cyklů [10, s. 125]. Bioremediace neboli bioasanace lze zužít pro čištění podzemních vod a půdy [7 s. 8].

Před zavedením jakéhokoliv postupu dekontaminace prostředí je vždy důležité se nejprve zeptat, zda je cílem polutant rozložit, detoxifikovat nebo jej pouze fyzikálně odstranit z daného místa. Následně je pak možné určit a použít vhodný bioremediační proces. Existují různé typy biochemických mechanismů, které směřují k mineralizaci, částečné transformaci nebo humifikaci polutantu, či ke změně redoxního stavu v případě těžkých kovů [11, s. 51-52]. Metabolickou činnost MO při těchto dějích lze vylepšit genetickými modifikacemi jejich kmenů, jako tomu bylo například u bakterie *Pseudomonas putina*, která byla po zásahu genetických inženýrů schopna vyčistit ropné skvrny na moři. V budoucnosti bude pravděpodobně také větší měrou slavit úspěchy fytofarmacie založená na schopnosti specifických rostlin kumulovat během svého růstu těžké kovy z kontaminovaných zemín nebo podzemních vod [11, s. 181].

### 1.2.3 Biotechnologie ve vodárenství a při čištění plynů

Klasická biologická analýza používaná při monitorování kvality vody zahrnuje sledování spotřeby kyslíku v odpadních vodách nebo testování toxicity vůči živým organismům.

Biotechnologické postupy se přímo u čištění odpadních vod používají k metabolizaci uhlíkatých látek a k eliminaci dusíkatých, sirných sloučenin i sloučenin fosforu. V případě čištění plynů z potravinářského a chemického průmyslu nebo čističek odpadních vod lze odstranit jak plynné látky organické (ketony, aldehydy atp.), tak i anorganické (amoniak, sirovodík) [7, s. 9].



## 2 ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD

Základním dokumentem Evropské unie (EU) pojednávajícím o problematice čištění odpadních vod je Směrnice Rady 91/271/EEC o čištění městských OV, jejímž cílem je ochrana životního prostředí před nepříznivými vlivy odvádění, čištění a vypouštění městských OV a průmyslových OV z určitých odvětví průmyslu.

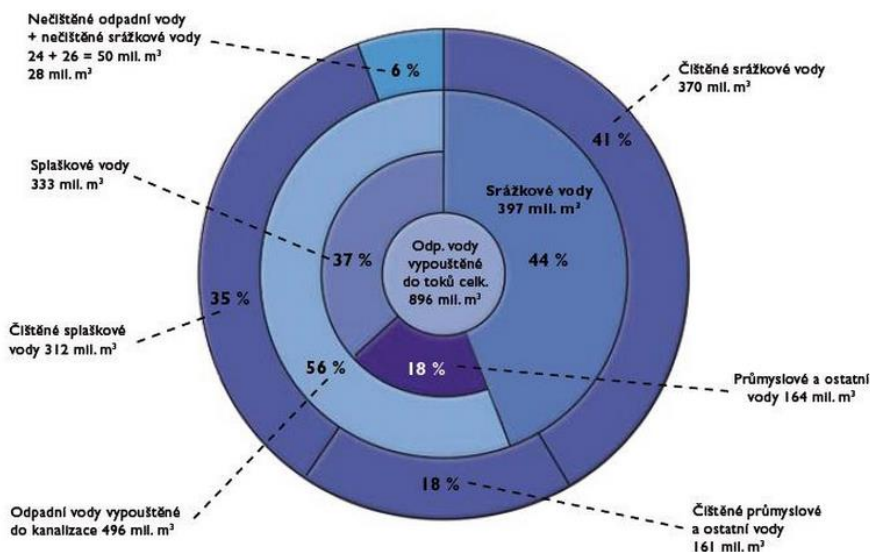
V České republice (ČR) je hlavním právním nástrojem pro ochranu vod Zákon o vodách č. 254/2001 Sb. Mimo hlavní záměr tohoto zákona chránit povrchové a podzemní vody nebo kupříkladu dále stanovit podmínky pro hospodárné využívání vodních zdrojů, jsou zde také přesně definovány OV. Odpadní vody jsou vody použité v obytných, průmyslových, zemědělských, zdravotnických a jiných stavbách, zařízeních nebo dopravních prostředcích, pokud mají po použití změněnou jakost (složení nebo teplotu), jakož i jiné vody z těchto staveb, zařízení nebo dopravních prostředků odtékajících, pokud mohou ohrozit jakost povrchových nebo podzemních vod. Řadíme zde i průsakové vody ze skládek odpadu a také z odkališť. Pojmy jako městské a průmyslové OV či jiné mající vztah k čištění vod jsou definovány v Nařízení vlády ČR č. 61/2003 Sb., kde jsou k nalezení i ukazatele a hodnoty přípustného znečištění povrchových a odpadních vod či náležitosti povolení k vypouštění OV do vod povrchových a do kanalizací. Podstatnou listinou v oblasti čištění OV je také Zákon o odpadech č. 185/2001 Sb. ujasňující zacházení s čistírenskými kaly [13, s. 6-13].

### 2.1 Rozdělení odpadních vod

Průměrná produkce OV v ČR se v roce 2014 podle provedené statistiky pohybovala okolo miliardy metrů krychlových za rok z hlediska zastoupení jednotlivých druhů OV, kdy značná část těchto vod byla podrobována určitým procesům čištění (Obr. 2). Obecně lze OV popsat jako složité směsi anorganického a organického materiálu smíchaného se syntetickými látkami, přičemž je možné OV rozdělit na splaškové, průmyslové a srážkové především podle jejich původu a dále v nich obsažených složek [14, s. 4,3; 14, s. 105-106].

OV vypouštěné do veřejné kanalizace z bytů, obytných domů či městských zařízení jako jsou školy, restaurace, hotely apod. pocházející od běžných obyvatel nazýváme splaškové. Průměrná specifická spotřeba splaškových vod je odhadována přibližně na 150 l/na osobu za den [15, s. 105-106]. V takovýchto OV je obsažen velký podíl organických látek typu polysacharidů, lipidů, mastných kyselin nebo sloučenin dusíku, fosforu a uhlíku převážně

se vyskytujících v podobě fekálií a moči. Ve splaškových vodách jsou přítomny také anorganické látky zejména chloridy, fosfáty a tenzidy původně obsažené hlavně v pracích a čisticích prostředcích používaných v domácnosti [16, s. 4,3]. Splaškové OV mají zpravidla zbarvení šedé až šedohnědé, jsou značně zakalené, jejich teplota v klimatických podmínkách ČR se pohybuje od 5 do 20 °C a hodnota pH je v rozmezí 6,8 do 7,5 [17, s. 25].



Obr. 2. Průměrná roční produkce OV [18].

Při těžení, zpracování a produkci surovin vznikají OV průmyslové mající své specifické složení dle typu závodu, odkud pocházejí [19, s. 17]. Buď bývají odpuštěny do veřejné kanalizace přímo z místa pracoviště za předpokladu, že neohrožují životní prostředí, nebo jsou předčištěny ve vlastní čističce přítomné v daném závodě. Do vodních recipientů jsou vypuštěny samostatně či spolu se splaškovými odpadními vodami skrze veřejnou kanalizaci, jimž se pak dále říká OV městské. Celkově existují veřejné kanalizace dvojího typu. Převažujícím typem je jednotná kanalizace odvádějící z obydlené části obce výše uvedené odpadní vody společně s vodou srážkovou. Druhým, méně častým typem je oddělená veřejná kanalizace pro splaškové a průmyslové vody a zvláště vody dešťové [18; 20 s. 105-106].

Posledním typem jsou OV dešťové vznikající z atmosférických srážek při dopadu na zastavěná území, kde jsou dále odváděny ze zabydlené části obce jednotnou veřejnou kanalizací. Obsah kontaminantů v dešťových OV závisí na místě dopadu a na jejich následném transportu. Znečištěné dešťové OV vznikají například při dopadu na městské komunikace kontaminované ropnými látkami uniklými z automobilů. Koncentrace organického znečiš-

tění v těchto vodách je velice blízká hodnotám u vod splaškových [20, s. 112, 105-106]. Speciálním případem je voda balastní nesouvisející s atmosférickými srážkami, která je vodou průsakovou a řadí OV<sup>+</sup>[18].

## 2.2 Kontaminanty

Cílem čištění odpadních vod je osvobodit odpadní vodu od všech, nebo přinejmenším od převážné většiny, znečišťujících látek různého charakteru. Kontaminanty zatěžující životní prostředí lze rozdělit hned do několika základních skupin – látek rozpouštějících se v odpadní vodě, látek nerozpustných, radioaktivních a ostatních. Rozpuštěné látky jsou diferenciovány na látky anorganické (amonné ionty, fosforečnany) a substance organické biologicky rozložitelné (cukry, mastné kyseliny) či biologicky nerozložitelné (azobarviva). Do nerozpuštěných látek bývají zařazovány anorganické látky usaditelné (písek, hlína) i neusaditelné (brusný prach) a dále látky organické biologicky rozložitelné (škrob) či nerozložitelné (papír, plasty), usaditelné (celulosa vlákna) a neusaditelné typu plovoucího, jako je papír, nebo koloidního, jako je bakteriální biomasa. Radioaktivními látkami bývají označovány přírodní uranové minerály (oxidy, slídy) či látky s přírodními nebo umělými izotopy. Mikroorganismy, teplota, pH, elektrochemický potenciál a tvrdost (mineralizace) jsou považovány za ostatní agens [10, s. 11; 21, s. 33]. Patří zde také specifická skupina mikropolutantů schopných v nepatrných koncentracích negativně ovlivnit kvalitu vody nebo eventuálně i zdraví člověka. Jedná se především o zbytky léčiv, kosmetických přípravků nebo látek se specifickými fyziologickými účinky, např. takových, co narušují hormonální systém člověka [21, s. 33].

## 2.3 Technologická čistící linka

Voda má sama o sobě, bez lidského přičinění, schopnost odstranit látky v tzv. samočisticím procesu, na němž se převážně podílí biocenózy vodních organismů schopných nejenom rozkládat organické látky na látky jednodušší, ale i současně kumulovat látky toxické pro jiné mikroorganismy. Proces samočištění je však v dnešní době nepostačující z důvodu ustavičného stupňujícího se znečišťování vod, a proto byly zavedeny čistící pochody umožňující zpracovat vodu na stanovenou úroveň kvality. Základní operace likvidující znečištění odpadních vod jsou prováděny v čistírnách odpadních vod (ČOV), přičemž probíhají ve dvou nebo v lepším případě ve třech stupních, jejichž podstatou jsou přirozené procesy samočisticí. Existují i jiné, další možnosti čištění odpadních vod jako jsou cirku-

lační příkopy, nádrže rybníčního typu či kořenové čistírny, které však nejsou předmětem této diplomové práce [10, s. 11].

Výběr a seřazení jednotlivých operací do technologické čisticí linky závisí na různých faktorech. Celkový proces čištění by však měl být především účinný s propracovaným systémem zjištěných informací týkajících se složení odpadních vod, charakteru znečištění i přítomnosti nejrizikovějších látek. Dále by měl být ekonomicky přijatelný, chránit zdraví obyvatel a také zabezpečený proti zavlečení dalších znečišťujících látek v průběhu procesu např. anorganických solí nebo pomalu rozložitelných organických látek [21, s. 32-33; 22, s. 425].

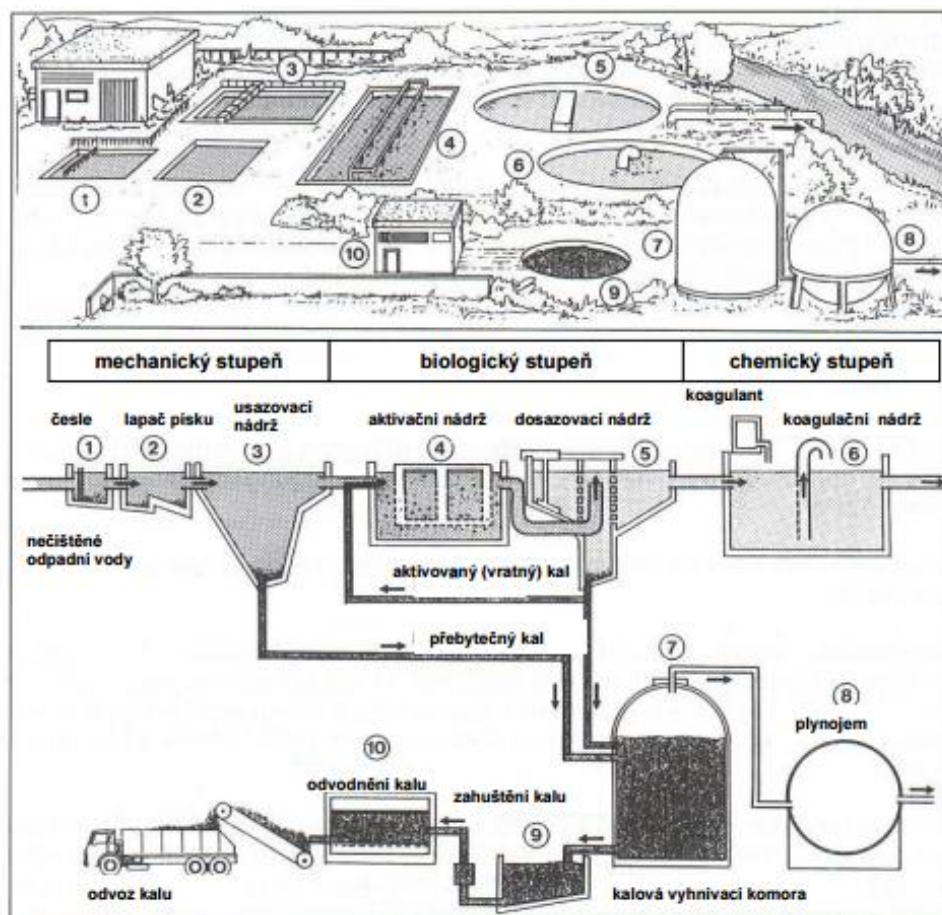
V prvním mechanickém stupni čištění (neboli čištěním primárním) je bráno za cíl odstranit z OV unášený materiál a suspendované látky, jimiž by mohly být poškozeny další stupně čistírny. Nejprve OV prochází lapačem štěrku, dále česly (mřížemi) zachycujícími plovoucí předměty, na něž navazují lapače písku, kde se hrubší částice usazují. V případě vysoké koncentrace tuků v přitékající OV, např. z potravinářského závodu, jsou na ČOV instalovány lapače tuků. V následné, poslední mechanické části čištění dochází k odstranění organických a anorganických látek sedimentací v usazovací nádrži (Obr. 3) [13, s. 31].

Takto předčištěná voda pokračuje do druhého biologického stupně čištění (čištění sekundárního), kde jsou neodstraněné organické látky z prvního stupně odbourávány a mineralizovány za činnosti MO v podobě tzv. čistírenského kalu. Ve své podstatě se jedná o napodobení a zrychlení dějů probíhajících v přírodě. Proces je tedy levný, ale na druhou stranu hůře ovladatelný vzhledem ke schopnosti MO vnímat každou změnu prostředí [10, s. 60; 23, s. 11-13]. Nejčastěji je k druhému stupni ČOV používáno intenzivně provzdušňovaných a promíchávaných aktivačních nádrží za použití aktivovaného kalu obsahujícího řadu mikroorganismů (bakterie, plísňe, prvoci) i nebuněčnou organickou hmotu, kde nejprve dochází k vyvločkování koloidně rozpuštěných látek adsorpcí na kalových vločkách a následně k aerobnímu odbourání organických sloučenin za pomoci mikroorganismů [13, s. 31].

Biologicky vyčištěná voda je dále odváděna do dosazovacích nádrží z důvodu sedimentace kalu a vloček. Zachycený kal se odčerpává a zpracovává v kalovém hospodářství čistírny. Nejdříve čerstvý kal vyhnívá v anaerobním prostředí vyhnívacích komor za vzniku vyhnílého kalu a bioplynu jímaného do plynojemu. Takový kal se dále ponechává zbavit přebytečné vody (kalolisy, centrifugami nebo vypouštěním na kalové pole) a poté se někdy zpra-

covává na komposty používané jako hnojivo pro zemědělské účely – nesmí však obsahovat škodlivé látky, například těžké kovy.

V třetím stupni dočišťování vody dochází ke snižování obsahu minerálních živin chemickým (srážením, adsorpcí, iontoměniči) nebo i biologickým způsobem [10, s. 65-70].



Obr. 3. Znárodnění trojstupňové čistírny odpadních vod [24].

## 2.4 Mikrobiální procesy přeměny látek

Při aerobním čištění odpadních vod jsou organické látky rozkládány heterogenní mikrobiální kulturou na oxid uhličitý, vodu a biomasu. Technologický průběh zásadně ovlivňují vložkovité a vláknité mikroorganismy, podstatné pro tvorbu vloček aktivovaného kalu, tzv. bioflokulaci. Kostru větších a správně sedimentujících vloček tvoří vláknité MO, na které se zachytávají MO vložkovité. Vlákenné MO jsou mimoto prospěšné i při odstranění zákalu v supernatantu. Musí jich být však přiměřené množství, protože jinak dochází k technologickým obtížím čištění vod. Na bioflokulaci se podílejí extracelulární polymery různého původu, jako jsou pouzderné bakteriální polymery, protozoální polymery či polymery z vlastní odpadní vody, dále křemičitany, oxidy železa a v neposlední řadě

polyvalentní kationty. Ionty vápníku a hořčíku, tvořící můstky mezi buňkami MO a polymery, nejvíce ovlivňují svou kvalitou vlastností vzniklých vloček. Mikroskopický rozbor aktivovaného kalu, například zhodnocení velikosti, tvaru i struktury vloček či aktivace a rozvoj obou již zmiňovaných MO, je pravidelnou součástí analytického sledování, které má prvotně za cíl posoudit flokulační a separační vlastnosti kalu [10, s. 124-130].

Při anaerobním čištění odpadních vod a anaerobní stabilizaci kalů dochází k odbourávání organických látek, nejprve kvasnými procesy na organické kyseliny, methanol, methylaminy, oxid uhličitý a vodík, přičemž organické kyseliny s vyšším počtem uhlíků v molekule pak podléhají přeměnám na kyselinu octovou. Tato kyselina, vodík a oxid uhličitý, methanol a methylaminy jsou poté methanogenními archeoty převáděny anaerobní respirací na methan. Spolu s kvasnými procesy může také docházet v přítomnosti síranů a dusičnanů k bakteriální anaerobní respiraci organických látek na oxid uhličitý a vodu, přičemž je možný vznik sulfanu, pokud jsou sírany přítomny ve vyšších množstvích. Výhoda anaerobního procesu čištění vod tkví v zisku energetického bioplynu, možnosti čistit velmi znečištěné odpadní vody a rovněž odbourávat vícechlorované sloučeniny [10, s. 124-130].

Další možností biologického čištění je denitrifikace odpadních i pitných vod, založená na anaerobní respiraci bakterií, při níž nitráty a nitrity slouží jako akceptory protonů a elektronů při oxidaci substrátů (organických látek). Odstranění nitrátů a nitritů je prováděno jejich redukcí na směs dusíku a oxidu dusného, unikajícího do ovzduší. Souvisejícím více-  
stupňovým procesem je nitrifikačně-denitrifikační proces, sloužící k odstranění celkového dusíku (převážně organického) z určitých typů odpadních vod (městských, zemědělských) [25, s. 69-80].

Podstatným dějem je také odstraňování fosforu z odpadních vod čistírenských provozů. Některé bakterie, tzv. polyfosfátové jsou schopny ve svých buňkách akumulovat za aerobních podmínek polyfosfáty. Předtím ale musí být vystaveny anaerobním podmínkám s lehce využitelnými uhlíkatými substráty [10, s. 124-130].

### 3 BIODEGRADACE

Význam uvedeného děje je již možné pochopit ze samotné skladby slova biodegradace. Kořen slova degradace vyjadřuje rozklad makromolekulárních látek na nízkomolekulární a předpona bio označuje obecně rozkladné činitele, jimiž jsou bakterie, houby, hmyz a jiné organismy. Biodegradací jsou velmi často organické látky zcela rozloženy na jednodušší sloučeniny či prvky, tím pádem vznikají anorganické sloučeniny uhlíku, dusíku, síry, fosforu a jiných prvků tvořících původní látku, jež jsou uvolňovány do okolí a zapojeny tak do koloběhu prvků v přírodě [25, s. 5; 26]. V případě biodegradace organických sloučenin se jedná o sérii biologických degradačních kroků s častou exergonickou reakcí, kdy v jejím průběhu dochází k oxidaci původní sloučeniny. Tato tzv. degradační dráha je v podstatě stále stejná bez ohledu na složitost molekuly a nezáleží, zda probíhá za aerobních nebo anaerobních podmínek. Vyjma výše zmíněných biologických přeměn, působí také ke snížení komplexity látek abiotické procesy, které ale nejsou tak účinné jako živé organismy [11, s. 39-40].

Mikroorganismy pokládají organické kontaminanty za zdroj živin (růstový substrát), při jehož degradaci získávají energii pro růst a dělení buněk. Při biologickém rozkladu buňka pokaždé syntetizuje specifický enzym katalyzující jednotlivé degradační kroky, který může být lokalizován uvnitř buňky nebo je z buňky uvolňován, aby pomáhal v počátečních krocích biodegradace ve vnějším prostředí. Tyto extracelulární enzymy jsou důležité při rozkladu makromolekul organických látek, u nichž je podstatná degradace na menší jednotky už vně buňky z důvodu následně zdárného transportu přes buněčné obaly (buněčnou stěnu a cytoplasmatickou membránu) a oxidace těchto jednotek uvnitř buňky. Nedostatek vhodných enzymů (a tím i mikroorganismů) schopných biodegradace je hlavním důvodem obtížného rozkladu kontaminantů s nevšední chemickou strukturou, které neumí existující enzymy účinně rozkládat. Pro biologický rozklad je tedy vhodnější, když mají kontaminující látky strukturu podobnou přirozeným růstovým substrátům snadno rozložitelným [11, s. 39-40].

Nicméně biodegradaci nelze uskutečnit za všech okolností, obzvláště jedná-li se o obtížně rozložitelnou látku. V tomto případě dochází pouze k částečné oxidaci látky a uvolněná energie není mikroorganismem využita pro podporu růstu. Kontaminanty jsou tedy rozloženy kometabolicky, když mikroorganismus náhodně vlastní nespecifické enzymy schopné rozložit právě tuto látku. Ke zmíněnému ději může docházet během aktivního růstu

i při styku polutantu s nerostujícími buňkami. Kometabolismus je tedy transformace kosubstrátu nepodstatného pro růst mikroorganismu vedle substrátu naopak potřebného. Leč konverzí polutantu na odlišnou sloučeninu nemusí vždy vzniknout méně toxická látka, ale může být dokonce toxičtější či rekalitrantní [10, s. 125; 11, s. 39-40].

Pokud by se měla hodnotit přístupnost uhlovodíků pro biodegradaci, tak jsou na tom lépe uhlovodíky alifatické oproti aromatickým. Jejich využitelnost závisí na rozpustnosti ve vodě a délce a struktuře řetězce. Alkany jsou degradovány velice pomalu za předpokladu, že mají více než 20 uhlíků nebo mají k hlavnímu řetězci navázané methylové skupiny. Obecně jsou cyklické sloučeniny odolnější proti oxidaci mikroorganismy [10, s. 14].

### **3.1 Faktory ovlivňující mikrobiální aktivitu**

Mikrobiální aktivita je bezesporu ovlivněna strukturou i fyzikálně-chemickými vlastnostmi kontaminantu, ale také biologickými a fyzikálně-chemickými faktory okolí, v němž se vyskytuje. Každé prostředí je definováno svojí degradační kapacitou označující maximální úroveň mikrobiální aktivity, již lze očekávat za určitých environmentálních podmínek [11, s. 40].

#### **3.1.1 Vliv prostředí na aktivitu mikroorganismů**

Pravděpodobně největší účinek na mikrobiální aktivitu má obsah organické hmoty v daném prostředí, dostupnost kyslíku a také přítomnost dostatečného množství asimilovatelného dusíku. Aerobní biochemické dráhy degradace jsou celkově rychlejší a účinnější než anaerobní dráhy, které jsou však na druhou stranu schopny biotransformace některých chlorovaných uhlovodíků nerozložitelných za přítomnosti vzduchu. Při rozkladu organických polutantů obsahujících jen uhlík a vodík vyžadují mikroorganismy pro zdárnou biodegradaci přísun dalších nezbytných živin, jako jsou dusík a fosfor. Přímo ukázkou toho je prováděný experiment na kontaminovaném jezeře, kde byla v časném jarním období při dostatku těchto prvků rychlost biodegradace maximální, zato v letním období byla jejich nedostupností limitována, a tak bylo možné rozklad zlepšit přidáním dusíkatých hnojiv [10, s. 14; 11, s. 43-44; 25, s. 52-60].

Za poněkud méně důležité, ale přesto podstatné faktory se považují teplota, pH, salinita a obsah vody. Rozmezí hodnot u těchto činitelů je rozdílné u každé skupiny látek, a tak například pro rychlejší rozklad uhlovodíků je optimální rozmezí teplot 0-30 °C, pH vyšší než 7, podmínky spíše s menší koncentrací soli a v půdě je ideální nasycení vodou



v rozmezí 38-81 % saturace (tzv. vodní kapacity), kdy je dostupnost vody a kyslíku maximální [11, s. 40-42; 25, s. 52-62].

### **3.1.2 Účinek struktury a fyzikálně-chemických vlastností kontaminantu**

Degradace kontaminující látky je ovlivněna sterickými vlivy ve struktuře dané látky, které zabraňují rozpoznání molekuly aktivním místem degradujícího enzymu [11, s. 40-42].

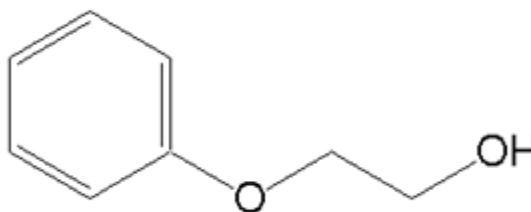
Podstatný vliv na biodegradaci látky má rovněž genetický potenciál daný přítomností a expresí vhodných genů v přirozeném mikrobiálním uskupení. Obvykle se tento potenciál uskutečňuje po určitém období adaptace, které je časově závislé na struktuře polutantu. Následné budoucí možné setkání s danou látkou tak obvykle vyvolá u adaptovaného společenství mikroorganismů rychlejší degradaci [11, s. 40-41].

## 4 TESTOVANÉ KOSMETICKÉ SLOUČENINY

V této diplomové práci jsou uváděny názvy kosmetických sloučenin podle Mezinárodní nomenklatury kosmetických přísad (INCI), již jsou výrobci povinni dodržovat na svých kosmetických přípravcích. Také jsou zde používány běžné komerční či technické názvy, pokud se jedná o známé, často užívané pojmy [27, s. 12].

### 4.1 Phenoxyethanol

Pro chemickou látku uváděnou jako Phenoxyethanol (PHE) existuje mnoho synonym. Jako příklad lze uvést Ethylene Glycol Monophenyl Ether, Monophenyl Glycol, 1-hydroxy-2-phenoxyethane, Dowanol nebo Rose ether [28]. Její přesný chemický název dle názvosloví International Nonproprietary Name (INN) zní 2-fenoxyethan-1-ol [29]. Tuto sloučeninu obecně řadíme do skupiny fenoetherů, což jsou aromatické sloučeniny obsahující benzenový kruh substituovaný etherovou skupinou (Obr. 4) [30].



Obr. 4. Chemická struktura 2-phenoxyethanolu [31].

#### 4.1.1 Vlastnosti

Jedná se o kapalinu olejovité konzistence typického aromatu s rozpustností 2,67 g látky na 100 ml vody při dostatečném intenzivním míchání. O PHE se dá celkově říci, že je rozpustný v etanolu, éteru a roztoku hydroxidu sodného, dále ve vodě a různých rostlinných olejích a také je schopen se mísit s acetonem a glycerolem [28]. Je o něm známo, že je membránově aktivním činidlem [28; 32, s. 2-6]. Molekulová hmotnost PHE činí 138,16 g/mol a bod tání se pohybuje okolo 14 °C. Zůstává stabilním i v extrémních podmínkách [33, s. 496-499; 34, s. 922-923]. Při zacházení s touto látkou je nutné dbát zvýšené opatrnosti, protože je toxická, ať už při vdechnutí, požití či jen běžným kontaktem s kůží. Účinky expozice mohou zahrnovat podráždění očí, bolesti hlavy, třes či depresi centrální nervové soustavy (CNS)[35].

#### 4.1.2 Použití

Účinek PHE proti širokému spektru MO, obzvláště *Pseudomonas aeruginosa*, byl znám již v roce 1944, kdy byly kožní infekce pokrývány obklady namočenými v roztoku této látky [36]. Proto je vysoce účinným konzervantem v oblasti farmacie a kosmetiky [34, s. 922-923]. Bývá aplikován do kosmetických přípravků typu pleťových krémů, masek, vod nebo také ochranných krémů na opalování, šamponů na vlasy, deodorantů, make-upů apod. Významnou roli také hraje v očních, nosních i ušních kapkách a krémech pro zevní antiseptickou léčbu [28]. V rámci použití je aplikován za účelem konzervace ať už ve směsi s dalšími konzervačními přísadami nebo samostatně. PHE se používá v kombinaci s parabeny, kvartérními amoniiovými solemi či dalšími látkami [34, s. 922-923]. V kosmetických přípravcích se vždy aplikuje max. do koncentrace 1 % dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích [29, s. 2; 32].

Mezi nejznámější konzervační směsi lze považovat směs Euxyl® K 400, využívanou především v přípravcích sloužících k očištění těla a vlasů, nebo Euxyl® PE 9010, vyvinutý pro aplikaci především v neoplachových produktech (pleťových vodách, krémech, transparentních gelech a dalších) [28; 32; 33].

Euxyl® K 400 je komerčně dostupnou směsí methyldibromoglutaronitrilu (MDBGN) a phenoxyethanolu v poměru 1:4. MDBGN je užíván pro své konzervační a biocidní vlastnosti, kdy účinkuje proti bakteriím, kvasinkám a houbám i ve velice nízkých koncentracích. Bohužel je ale aktuálním kontaktním alergenem ve skupině konzervantů přítomných v kosmetických přípravcích, přičemž v kombinaci s phenoxyethanolem vyvolává dermatitidy vznikající obvykle na obličeji, krku nebo rukou. V roce 2006 byl Euxyl® K 400 umístěn do evropské standardní sady alergenů na doporučení International Society Contact Dermatitis Research Group (ISCDRG) [28; 38, s. 6-9]. V Evropské unii byla povolena aplikace MDBGN od března 2005 pouze v „rinse-off“ přípravcích v koncentraci do 0,1 %. Avšak s ohledem na doposud provedené testy nebyla ani u těchto oplachových přípravků zjištěna taková koncentrace MDBGN, která by byla bezpečná a nevyvolávala kontaktní dermatitidu. Studie ukazují, že celkový součet nízkých dávek MDBGN z více expozičních aplikovaných po krátkou dobu má obdobný účinek na vznik dermatitidy jako jediná expozice této látky ve vyšší koncentraci [39, s. 2-11; 40]. Nakonec je tedy dle posledních informací z roku 2006 jakékoli užití MDBGN v KP na území EU zakázáno. V ostatních státech se koncentrace užití liší podle národní legislativy.

Patentovaný Euxyl® PE 9010 je tekutý mírně biocidní koncentrát tvořený výhradně aktivní složkou phenoxyethanolem (90%) rozpuštěnou v multifunkčním aditivu ethylhexylglycerinu (10%), který je v širokém záběru používán v kosmetických přípravcích. Řadíme jej do skupiny 1-alkyl glycerol etherů, jejíž sloučeniny s různými alkylovými řetězci jsou přítomny v přírodních produktech a organismech savců, ptáků, rostlin, bakterií a mnoha dalších. Pro svou vysokou čistotu, bezbarvost, téměř nulový zápach a šetrnost k pokožce se tato látka stala velice oblíbenou přísadou do kosmetických přípravků, a to především do deodorantů jako aktivní deodorační sloučenina, která je velice dobrou alternativou triclosanu, a dále přípravků sloužících k ošetření pleti. Jako multifunkční přísada snižuje povrchové napětí ve vodných systémech, a tak lépe smáčí. Nízké povrchové napětí tak umožňuje jednodušší disperzi v odlišných systémech, a to i při nízké teplotě. Díky své vysoké solventnosti může sloužit jako rozpouštědlo pro lipofilní přísady typu parfému, vitamínů a esenciálních olejů. Byl navržen jako rovnocenná náhrada konzervačních sloučenin parabenů nebo isothiazolinonů. Euxyl® PE 9010 je stejně účinný proti bakteriím, kvasinkám a houbám až do pH 12. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) u většiny MO jsou v případě této směsi nižší než u obsažených jednotlivých látek. Je nutné říci, že samotný ethylhexylglycerin nevykazuje žádnou účinnost proti MO, ale ovlivňuje povrchové napětí na buněčné membráně MO, a tak zvyšuje účinek phenoxyethanolu proti MO [32, s. 2-5].

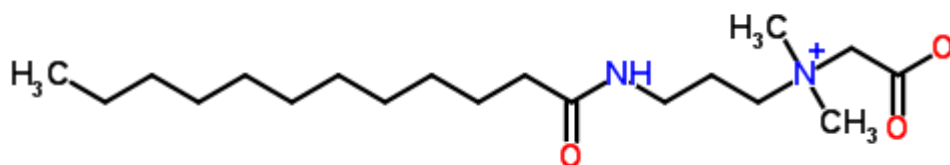
Mimo kosmetiku a léčiva nalézá PHE uplatnění jako repelent proti hmyzu, rozpouštědlo pro acetát celulózy či barviv nebo také jako chemický meziprodukt pro estery karboxylových kyselin (např. akrylát, maleát) [35].

#### 4.1.3 Chování v životním prostředí

Při studiích biodegradace PHE byla sledována biologická spotřeba kyslíku, která byla následně porovnávána s teoretickou spotřebou kyslíku. Bylo zjištěno, že po 5 dnech dosáhla 21 %, po 10 dnech 66 % a po 20 dnech 75 %, z čehož lze vyvozovat, že z větší míry je tato látka povolna biologicky odbouratelná. V jiné studii formou Zahn-Wellness testu se rovněž potvrdilo, že je PHE biologicky rozložitelný z více jak 70 % a také dalším testem, že nepodléhá bioakumulaci [33, s. 296-299; ]. Biodegradací PHE v aktivním kalu byla získána obdobná data, kdy v nich byl podle spotřeby kyslíku za 28 dní z 90 % a podle produkce oxidu uhličitého z 75% rozložen, což nám jen potvrzuje veškerá výše zmíněná tvrzení, že je PHE biologicky odbouratelným [41; 42, s. 2-4].

## 4.2 Cocamidopropyl Betaine

Název této sloučeniny vychází z části molekuly nesoucí kladný i zápor náboj aminokyseliny glycinu, která je přezdívaná betain po trimethylglycinu, jenž byl prvně extrahován z cukrové řepy (sugar beet). Názvy Cocamidopropyl Betainu (CAPB) se jinak různí, jako příklad lze uvést Cocamidopropyl Dimethyl Glycine, Cocamidopropylaminobetaine, Cocoyl Amide Propyldimethyl Glycine, Coconut Oil Amidopropyl Betaine, Ampholyt JB 130 či Tego Betaine L7. CAPB se skládá ze dvou hlavních částí – hydrofobní (nepolární) částí tvořenou uhlovodíkovým řetězcem mastné kyseliny obsažené v kokosovém oleji a hydrofilní (polární) části kvartérní amoniové soli (Obr. 5). Vykazuje tím svou amfipatickou strukturu, která je pro něj jako tenzid zásadní [43; 44].



Obr. 5. Chemická struktura Cocamidopropyl Betainu [44].

### 4.2.1 Vlastnosti

Mnohé vlastnosti CAPB vycházejí ze skutečnosti, že je tenzidem, který má ostatně jako všechny látky tohoto charakteru schopnost již při nízkých koncentracích měnit podmínky na fázovém rozhraní a tím pádem být povrchově aktivním. Jedinečné vlastnosti této látky propůjčuje její nedisociovatelná část molekuly tvořená jak anionem, tak i kationem umožňující CAPB být kombinován s kationickými a anionickými tenzidy v různých recepturách výrobků [44]. Řadíme jej obecně do amfoterních tenzidů s podskupinou betainů a sulfobetainů, jejichž vlastnosti jsou značně odlišné od ostatních podskupin tenzidů (derivátů imidazolu, derivátů aminokyselin, lecitinu a souvisejících fosfatidů) zejména pokud jde o jejich rozpustnost a elektrický náboj. Při vysokých hodnotách pH i hodnotě pH isoelektrického bodu se totiž nechovají jako aniontové tenzidy a zachovávají si stále svou dobrou rozpustnost [43, s. 43-44]. Přímou u CAPB je to dáno čtyřvázným dusíkem, který si ponechává kladný náboj v celém rozmezí pH, kdy by v případě jeho zániku došlo k destrukci molekuly. Při nízkých hodnotách pH se z něj stává tenzid kationtový. Označujeme jej tedy jako zwitterion [45, s. 15-16; 47].

CAPB je čirá světle žlutá kapalina s mírným zápachem po tuku se schopností solubilizovat ve vodě, ethanolu a isopropanolu, avšak ne v minerálním oleji. K prodeji bývá obvykle dodávána formou vodného roztoku v cca 30% koncentraci s chloridem sodným. Výstupy vícera vědeckých experimentů rovněž prokazující nemutagenitu a nekarcinogenitu této látky [47].

#### 4.2.2 Použití

Obecně lze o amfoterních tenzidech říci, že mají jak na kůži, tak i na oči oproti jiným tenzidům mírnější dráždivé účinky, a proto jsou například součástí dětských šampónů, neboť pak tolik při styku s očima nedráždí k slzám [48]. V kombinaci s anionaktivními tenzidy rovněž vyvolávají pouze mírné podráždění kůže plus ještě vytváří společně jemnější strukturu výrobku. Primární použití CAPB je v šampónech, kondicionérech a sprejích na vlasy [49], kdy je jeho nesmírně velkou předností dodání vlasům schopnosti nechat se lépe rozčesat. Dále se stále více používá v kosmetických přípravcích a výrobcích pro osobní hygienu, například jako součást tekutých mýdel, antiseptik, zubních past či produktů péče o pleť. Bývá rovněž jako jeden z mála tenzidů obsahem přírodní kosmetiky [49]. Je však uznáván pouze renomovanou mezinárodní certifikací Ecocert, protože ostatní certifikační organizace na něj skepticky pohlíží z důvodu jeho petrochemické složky. Jinak se mimo kosmetický průmysl uplatňuje v čistících a pracích výrobcích jako jsou přípravky na mytí nádobí nebo na čištění pevných povrchů [49].

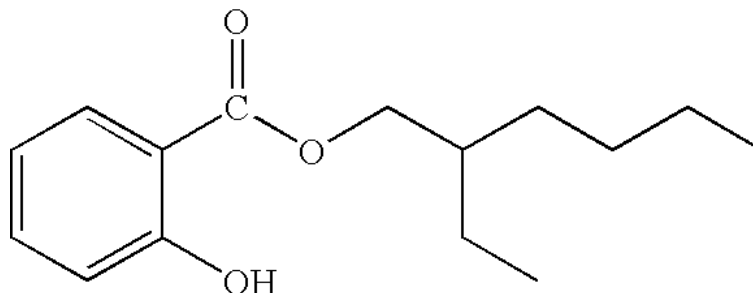
CAPB se nejčastěji distribuuje ve formě 30% roztoku nazývaného Flavol KDA, k jehož typickým vlastnostem patří výborná pěnivost, stabilita pěny a také velmi dobrá snášenlivost s pokožkou a sliznicemi [52].

#### 4.2.3 Chování v životním prostředí

Odpovědi na otázky týkající se úspěšné biodegradace sloučenin betainů, jakožto i CAPB jsou poněkud protichůdné. Některé výzkumy poukazují na postupnou úplnou biodegradabilitu (45 – 58 %) těchto látek, zatímco jiné mimoděk přímo u CAPB prokazují téměř kompletní biologický rozklad betainů. Z hlediska měřeného rozpuštěného organického uhlíku (DOC) dle dalšího výzkumu se vědci přiklání k teorii, že je CAPB zcela jistě úplně biodegradovatelnou látkou, protože hodnota DOC se pohybovala mezi 67-100 % [52].

### 4.3 Ethylhexyl Salicylate

Ethylhexyl Salicylate (EHS) je ester tvořený sloučeninami 2-ethylhexanolem a kyselinou salicylovou, který je známý rovněž pod názvy 2-Hydroxy-2-Ethylhexylester, 2-Ethylhexyl-2-Hydroxybenzoate, Eusolex OS, Ethylhexyl Salicylate či Octyl Salicylate (Obr. 6).



Obr. 6. Chemická struktura Ethylhexyl Salicylate [55].

#### 4.3.1 Vlastnosti

Jedná se o slabě nažloutlou kapalinu s charakteristickým zápachem, nerozpustnou ve vodě, polyolech a glycerolu. Rozpustná je ve většině alkoholů, ketonů, esterů glykolu a ve většině hydrofobních rozpouštědlech. Molární hmotnost EHS je 250,33 g/mol. Pokud je EHS v podobě roztoku, tak nijak nedráždí kůži ani oči, a ani nevykazuje známky sensibilizace [53, 54].

#### 4.3.2 Použití

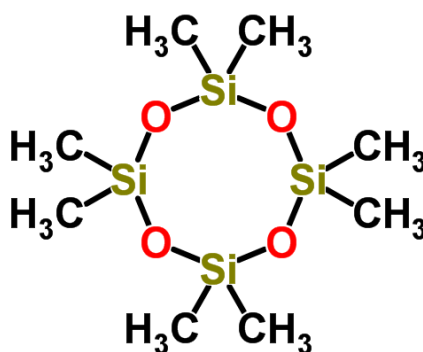
Používá se především jako vonná přísada, absorbér ultrafialového záření (UV) a jako sunscreen agent. Také jej nalezneme ve vlasové kosmetice, rtěnkách a lacích na nehty. Do kosmetických přípravků bývá vpravován v koncentraci od 0,001 % do 8 %. V případě EHS se jedná o organický filtr pro UVB záření typu salicylátů [29, 55].

#### 4.3.3 Chování v životním prostředí

Dle prováděných výzkumů je EHS biologicky rozložitelný, ale až po dlouhodobějším časovém úseku tedy více jak 28 dnech. EHS a ani jeho degradační složky nejsou považovány za toxické [55, s. 6].

## 4.4 Cyclotetrasiloxane

Chemická sloučenina cyclotetrasiloxane (D4; Obr. 7) je stále známá pod svým starým označením cyclomethicone dle dřívější INCI, které se už v dnešní době nepoužívá a má dokonce jiný význam. Dnes označuje totiž obecný název pro směs cyklických siloxanů, jež je obvykle tvořena D4, dekamethylcyclopentasiloxanem a dodekamethylcyklohexasiloxanem. Další pojmenování, zkratky, obchodní názvy a registrované ochranné známky používané v běžném životě jsou cyclic dimethylsiloxane tetramer, Cyclen D4/OMCTS, Dow Corning 244, KF 994, Oel Z020 apod. Řadíme jej do skupiny cyklických těkavých methylsiloxanů s velkou tenzí par a malým teplem odpařování. D4 se skládá ze 4 methylsiloxanových jednotek uzavřených do kruhu [56].



Obr. 7. Chemická struktura Cyclotetrasiloxanu [56].

### 4.4.1 Vlastnosti

D4 je bezbarvou olejovitou kapalinou za běžné pokojové teploty s molekulární hmotností 296,61 g/mol. Dále je mírně těkavý, hořlavý, vysokovroucí a špatně rozpustný ve vodě. Pro užití v kosmetických přípravcích je ideální, neboť je bez zápachu i chuti, snadno se roztírá, neštípe a ani není mastný. Z fyzikálního hlediska je málo těkavou sloučeninou lipofilní povahy. Obecně má D4 nízkou hodnotu akutní orální, inhalační i dermální toxicity. Není dráždivý pro oči ani kůži a nevykazuje známky mutagenity. Při testech na krysách se prokázal přímý hormonální (estrogenní) účinek D4 na dělohu, což může být relevantní i pro člověka [56, 57].



#### 4.4.2 Použití

Organická sloučenina D4 má hned několik využití. Používá se jako tzv. stavební blok (monomer) při výrobě silikonových polymerů, jimiž mohou být oleje, tuky, gumy nebo i pryskyřice. Plní rovněž funkci meziprojektu při výrobě jiných organokřemičitých látek. D4 se aplikuje na nekovové povrchy z důvodu jejich úpravy plus se s ní setkáme i v elektronice a textiliích. Širokou oblastí jeho využití jsou přípravky osobní péče (kosmetické výrobky, přípravky na vlasy, přípravky pečující o pleť, antiperspiranty) a domácí přípravky (např. čisticí přípravky). Pokud je přítomen v kosmetice, tak se chová jako antistatikum, emolient, humektant, rozpouštědlo, regulátor viskozity nebo jako vlasový kondicionér [57]. Používá se jako základní kapalina nebo jako rozpouštědlo pro velké molekuly. Koncentrace D4 se v kosmetických přípravcích pohybuje od 0,1 – 54 %. Velmi běžné je používat v kosmetických přípravcích směsi D4, decamethylcyclopentasiloxanu (D5) a dodcamethylcyclohexasiloxane (D6). Sloučeniny D4 a D5 jsou společně součástí prsních implantátů [59]. Jeho typický výskyt je v receptuře úklidových a čisticích přípravků např. v leštidle ve spreji či voskových směsích [56, 58].

#### 4.4.3 Chování v životním prostředí

D4 není biologicky rozložitelnou v prokysličené vodě a ani v půdním systému. Dle prováděného experimentu v Springborn Laboratories roku 1991 došlo po 28 dnech k nulové biodegradaci této látky [60]. V jednom z testů biodegradace za aerobních podmínek v aktivním kalu byly dokonce získané hodnoty rozkladu této látky v minusových hodnotách. Rovněž je akutně a chronicky toxickým pro ryby a korýše v koncentracích 4,4  $\mu\text{l}$  pro ryby a 15  $\mu\text{l}$  pro korýše [58]. Momentálně je kupříkladu v Kanadě konzultováno a prováděno vícero vědeckých expertiz ohledně D4, zda bude možné tuto látku zařadit mezi toxické a zavést pak případná preventivní opatření [60].

## 5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle této diplomové práce lze zformulovat následujícím způsobem:

- v literární rešerši osvětlit základy biotechnologií, čistírenských technologií a biodegradace; detailněji rozebrat testované látky phenoxyethanol, cocamidopropyl betaine, ethylhexyl salicylate a octamethyltetrasiloxane,
- zhodnotit aerobní biologickou rozložitelnost kosmetických sloučenin ve vodném prostředí systémem Micro-Oxymax,
- izolovat, pomnožit a analyzovat rozklad testovaných látek jednotlivými kulturami degradačních bakterií,
- písemně, tabelárně a graficky zpracovat naměřená data a vyslovit závěr.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 POUŽITÝ MATERIÁL, ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY

V následující kapitole jsou popsány veškeré testované látky, použité chemikálie, činidla, roztoky, minerální média, živné roztoky a biologický materiál. Následně jsou zaznamenány informace o všech zařízeních a pomůckách, které byly ve výzkumu pro tuto práci použity.

### 6.1 Testované látky

Veškeré testované kosmetické sloučeniny jsou pojmenovány dle INCI, přičemž jejich obchodní názvy byly v tomto případě vedeny výrobcem odlišně.

#### Phenoxyethanol (PHE)

Pro testy byl použit PHE s obchodním označením 2 – Phenoxyethanol ( $\geq 99\%$ ) od výrobce Sigma Aldrich a.s.

#### Cocamidopropyl Betaine (CAPB)

Pro testy byl upotřeben CAPB nesoucí obchodní označení Flavol KDA od dodavatele Enaspol a.s., kde bylo přítomno 40 hm. % CAPB a 5 – 7 hm. % chloridu sodného.

#### Ethylhexyl Salicylate (EHS)

Pro testy byl užít EHS s označením 2 – Ethylhexylsalicylate ( $\geq 99\%$ ) od výrobce Sigma Aldrich a.s.

#### Cyclotetrasiloxane (D4)

Pro testy byl použit OMCTS s označením Octamethylcyclotetrasiloxane (98%) od výrobce Aldrich Chemistry.

### 6.2 Chemikálie a činidla

Laboratorní testy byly prováděny chemikáliemi čistoty p. a. (pro analýzu) vyrobené společnostmi Sigma Aldrich s. r. o. a býv. Lachema a. s. Česká republika.

#### Sumární vzorec

#### Název chemikálie

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

heptahydrát síranu hořečnatého

$\text{CaCl}_2$

chlorid vápenatý

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

hexahydrát chloridu železitého

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

síran amonný

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	dihydrogenfosforečnan draselný
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	hydrogenfosforečnan draselný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
$\text{H}_3\text{BO}_3$	kyselina boritá
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinečnatého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu manganatého
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu měďnatého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdenanu amonného
$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$	benzoan sodný (BS)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	chlorid amonný
$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{CaN}_2\text{O}_{10}$	D-pantothenát vápenatý (vitamin B5)
$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{ClNO}$	cholin chlorid
$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	kyselina listová
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	myo-inositol
$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$	nikotinamid
$\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$	pyridoxal hydrochlorid
$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$	riboflavin
$\text{NaCl}$	chlorid sodný
$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$	thiamin hydrochlorid
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát síranu amonno-železnatého
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu vápenatého
$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$	salicylan sodný (SALNa)
$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$	2-ethyl-1-hexanol (EH)
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	glukóza

$(C_6H_{10}O_5)_n$	rozpustný škrob
$C_3H_3NaO_3$	pyruvát sodný
$C_{25}H_{30}ClN_3$	krystalová violet'
$C_2H_6O$	etanol
KOH	hydroxid draselný
$H_2O$	destilovaná voda

### 6.3 Roztoky

#### Zásobní roztoky solí (ZRS)

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ..... 22,50 g
- $CaCl_2$  ..... 27,50 g
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ..... 0,250 g
- $(NH_4)_2SO_4$  ..... 10,00 g
- $KH_2PO_4$  (Roztok A) ..... 9,070 g
- $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  (Roztok B) ..... 23,90 g

Příprava: Jednotlivé soli byly naváženy a následně individuálně rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

#### Fosfátový pufr o pH 7,2 (FP)

- $KH_2PO_4$  ..... 8,200 g
- $K_2HPO_4$  ..... 21,80 g
- $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  ..... 44,70 g

Příprava: Ve stanovených množstvích byly soli naváženy a společně rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

#### Roztok stopových prvků (RSP)

- $H_3BO_3$  ..... 0,750 g
- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  ..... 3,000 g
- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  ..... 0,100 g

- $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,500 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,050 g
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,1813 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  ..... 0,050 g

Příprava: Navážené látky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody.

### **Biomédium (BM)**

- ZRS  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ..... 2,00 ml
- ZRS  $\text{CaCl}_2$  ..... 2,00 ml
- ZRS  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ..... 2,00 ml
- ZRS  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ..... 10,0 ml
- FP ..... 40,0 ml
- RSP ..... 2,00 ml
- $\text{H}_2\text{O}$  ..... 800,0 ml

Příprava: Do odměrné baňky o objemu 2 l byla nadávkována 24 hodin prokysličená destilovaná voda, k níž byla poté přidána a důkladně promíchána určená množství ZRS, FP a RSP. Nakonec byla odměrná baňka doplněna prokysličenou destilovanou vodou po rysku.

### **Zásobní roztok benzoanu sodného v biomédium (ZRBS)**

Příprava: Množství 0,01 g benzoanu sodného bylo rozpuštěno v 50 ml biomédia tak, aby při příslušném testu byla vlastní koncentrace látky 0,2 g/l.

### **Zásobní roztok phenoxyethanolu v biomédium (ZRPHE + BM)**

Příprava: Množství 0,01 g phenoxyethanolu bylo rozpuštěno v 50 ml biomédia tak, aby při příslušném testu byla vlastní koncentrace látky 0,2 g/l.

### **Zásobní roztok cocamidopropyl betainu v biomédium (ZRCAPB + BM)**

Příprava: Množství 0,025 g Flavol KDA bylo rozpuštěno v 50 ml biomédia tak, aby při příslušném testu byla vlastní koncentrace CAPB 0,2 g/l.

**Roztok vitamínů (MEMs vitamins)**

Tento komerčně vyrobený roztok vitamínů (dodavatel PAA The Cell Culture Company) obsahoval tyto látky.

- $C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$  ..... 0,10 g/l
- $C_5H_{14}ClNO$  ..... 0,10 g/l
- $C_{19}H_{19}N_7O_6$ ..... 0,10 g/l
- $C_6H_{12}O_6$ ..... 0,20 g/l
- $C_6H_6N_2O$  ..... 0,10 g/l
- $C_8H_9NO_3 \cdot HCl$  ..... 0,10 g/l
- $C_{17}H_{20}N_4O_6$  ..... 0,01 g/l
- NaCl ..... 8,50 g/l
- $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$  ..... 0,10 g/l

**Zásobní roztok phenoxyethanolu přidávaný k minerálnímu agaru (ZRPHE + MA)**

Příprava: Množství 0,5 g phenoxyethanolu bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody do koncentrace 10 g/l. Následně v podobě dokonale promíchaného roztoku bylo vše sterilizováno filtrací přes sterilní filtr MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m do sterilních zkumavek.

**Zásobní roztok cocamidopropyl betainu I přidávaný k minerálnímu agaru (ZRCAPB + MA)**

Příprava: Množství 1,25 g Flavolu KDA bylo rozpuštěno v 50 ml destilované vody, tedy do koncentrace CAPB 10 g/l. Následně v podobě dokonale promíchaného roztoku bylo vše sterilizováno filtrací přes filtr MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m do sterilních zkumavek.

**Zásobní roztok cocamidopropyl betainu II (ZRCAPB)**

Příprava: Množství 1 ml CAPB bylo rozpuštěno v 9 ml destilované vody a následně v podobě dokonale promíchaného roztoku sterilizováno přes filtr MILLIPORE MCE 0,22  $\mu$ m do sterilních zkumavek.



**10% zásobní roztok salicylanu sodného (ZRSALNa)**

Příprava: Množství 1 g SALNa bylo rozpuštěno v 8 ml destilované vody a následně v podobě dokonale promíchaného roztoku sterilizováno přes filtr MILLIPORE MCE 0,22 µm do sterilních zkumavek.

**Fyziologický roztok (FR)**

Příprava: Množství 4,3 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody a sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 25 minut v autoklávu.

**6.4 Minerální média a živné agary**

Používané předpřipravené směsi agarů pochází od společností HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Minerální agar byl připraven v laboratoři ÚIOŽP.

**Minerální agar (MA)**

Složení:

– K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,200 g
– NH <sub>4</sub> Cl .....	0,220 g
– MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,040 g
– FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O .....	0,002 g
– CaCl <sub>2</sub> .....	0,002 g
– RSP .....	0,100 ml
– Purified agar .....	3,400 g
– MEMs vitamins .....	0,100 ml
– H <sub>2</sub> O .....	200,0 ml

Příprava: Navážka 3,8 g směsi připraveného základu pro MA byla suspendována ve 200 ml destilované vody a bylo přidáno 0,1 ml RSP. Následně byla ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí této směsi na cca 50 °C bylo přidáno 0,1 ml roztoku MEMs vitamínů, vše důkladně promícháno a na závěr rozlito do Petriho misek.

**Minerální agar s phenoxyethanolem (MA + PHE)**

Příprava: Navážka 3,8 g předpřipravené směsi MA byla suspendována ve 190 ml destilované vody, do níž bylo přidáno 0,1 ml RSP, kdy byla následně po nabobtnání ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí směsi přibližně na 50 °C bylo přidáno 0,1 ml roztoku MEMs vitamínů a 10 ml ZRPHE + MA, vše důkladně promícháno a na závěr rozlito do Petriho misek.

**Minerální agar s cocamidopropyl betainem (MA + CAPB)**

Příprava: Navážka 3,8 g předpřipravené směsi MA byla suspendována 190 ml destilované vody s přídavkem 0,1 ml RSP a pak byla po nabobtnání ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí směsi přibližně na 50 °C bylo přidáno 0,1 ml roztoku vitamínů a 10 ml ZRCAPB + MA, vše důkladně promícháno a na závěr rozlito do Petriho misek.

**Minerální agar s ethylhexyl salicylátem (MA + EHS)**

Příprava: Navážka 3,8 g předpřipravené směsi MA byla suspendována ve 190 ml destilované vody s přídavkem 0,1 ml RSP, kdy byla následně po nabobtnání ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí směsi přibližně na 50 °C bylo přidáno 0,1 ml roztoku vitamínů a 200 µl EHS, vše důkladně promícháno a na závěr rozlito do Petriho misek.

**Minerální médium (MM)**

Složení:

- Roztok A ..... 2,00 ml
- Roztok B ..... 8,00 ml
- MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O ..... 1,00 ml
- Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O ..... 1,00 ml
- CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O ..... 1,00 ml
- NH<sub>4</sub>Cl ..... 1,00 ml
- NaCl ..... 1,00 ml

- RSP ..... 0,20 ml
- H<sub>2</sub>O ..... 85,0 ml

Příprava: Všechny výše vypsane složky byly ve stanovených množstvích navzájem důkladně promíchány a poté sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí směsi přibližně na 50 °C bylo vše důkladně promícháno a asepticky rozplněno podle určitého testu stanovených množství do sterilních plastových zkumavek.

### **Minerální médium s phenoxyethanolem (MM + PHE)**

Příprava: Všechny výše vypsane složky byly ve stanovených množstvích důkladně rozpuštěny v 85 ml destilované vody, promíchány a poté sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Po zchladnutí směsi přibližně na 50 °C bylo přidáno 50 mg phenoxyethanolu, vše důkladně promícháno a asepticky rozplněno po 3 ml do sterilních plastových zkumavek.

### **Tryptone yeast extract agar (TYA)**

Složení:

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu (trypton).. 3,0 g
- Kvasničný extrakt ..... 1,5 g
- Agar ..... 6,0 g
- H<sub>2</sub>O ..... 500,0 ml

Příprava: Navážka 10,5 g základu pro TYA byla suspendována v 500 ml destilované vody. Následně byla směs ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut a po zchladnutí na cca 50 °C byla rozlita do Petriho misek.

### **R2A agar (R2A)**

Složení:

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu ..... 0,125 g
- Peptidické natráveniny živočišné tkáně ..... 0,125 g
- Hydrolyzát kaseinové kyseliny ..... 0,250 g

- Kvasničný extrakt ..... 0,250 g
- $C_6H_{12}O_6$  ..... 0,250 g
- $(C_6H_{10}O_5)_n$  ..... 0,250 g
- $K_2HPO_4$  ..... 0,015 g
- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  ..... 0,250 g
- $C_3H_3NaO_3$  ..... 0,015 g
- Agar ..... 7,500 g
- $H_2O$  ..... 500,0 ml

Příprava: Navážka 9 g základu pro R2A byla suspendována v 500 ml destilované vody. Následně byla směs ponechána sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 25 minut a po zchladnutí na cca 50 °C byla rozlita do Petriho misek.

## 6.5 Biologický materiál

### Inokulum

Bylo využito zásobní suspenze aktivovaného kalu (AK) v koncentraci 5 g/l biomédia, přičemž AK byl odebrán z aerační nádrže komunální ČOV Malenovice.

Příprava: Nejprve byl AK zbaven hrubých nečistot prostřednictvím filtrace přes síto, dále třikrát dekantován pitnou vodou a pak umístěn do dvojitého fermentoru. Po 24 hodinách provzdušňování byl centrifugován při 3000 ot/min po dobu 10 minut, kdy byl AK po odlití supernatantu zředěn biomédiem na takovou koncentraci, aby při samotném testu byla koncentrace sušiny kalu 500 mg/l. Kontrola byla uskutečněna stanovením sušiny.

## 6.6 Zařízení a pomůcky

### 6.6.1 Zařízení

- Laboratorní analytické váhy R 180D, Santorius (Německo)
- Elektromagnetická míchačka STIRRER OP-913/3
- Laboratorní centrifuga Jouan MR23i (Francie)
- Sušárna Memmert 200UM (SRN)

- pH metr WTW pH /ION metr 735, IonLab (Německo)
- Respirometr Micro-Oxymax, Columbus Ins. (Ohio, USA)
- Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A Schimadzu (Japonsko)
- Autokláv LaM-MCS SANOclav (Německo)
- Laminární box TELSTAR BIO-II-A (Španělsko)
- Laboratorní rotační třepačka
- Mrazicí box Biotech, a.s.
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky TECAN (Sunrise, USA)
- Analytické váhy SI – 64A (Denver Instrument)
- Mikroskop Olympus CX 41 Quickphotopro 2.0. (Japonsko)
- Chladnička Electrolux

#### **6.6.2 Pomůcky**

- Mikrodávkočnice Biohit (Finsko)
- Filtry MILLIPORE MCE 0,22  $\mu\text{m}$
- Mikrotitrační destičky GAMA (ČR)

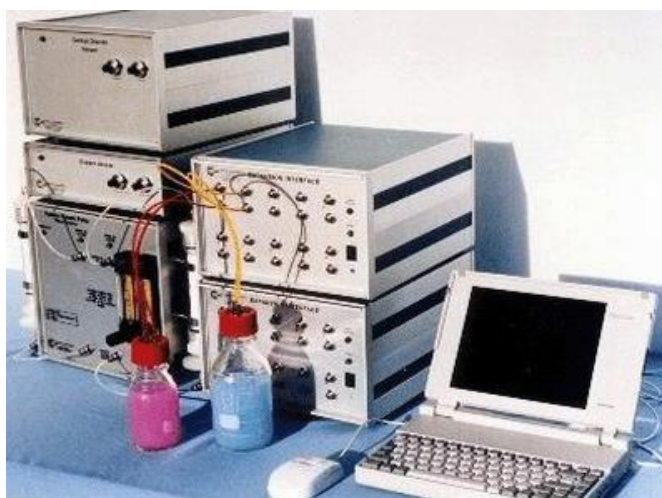
Po celou dobu provádění testů bylo dále užíváno běžného laboratorního skla a také laboratorních pomůcek obvyklých v mikrobiologických laboratořích.

## 7 METODIKA

### 7.1 Stanovení biologické rozložitelnosti látek aerobními MO prostřednictvím systému Micro-Oxymax

#### 7.1.1 Princip

Analyzátor Micro-Oxymax společnosti Columbus Instruments (Obr. 8) je variabilním typem respirometru, jenž je vždy sestaven tak, aby se přizpůsobil požadovanému typu prostředí (voda, půda, kompost) a koncentraci stanovovaných plynů v plynné fázi. V případě pochodů aerobních je plynnou fází vzduch a u anaerobních je tomu dusíkaté prostředí. Jedná se tedy o systém s cirkulující plynnou fází schopný sledovat rozklad látek za pomoci příslušných detektorů. Při měření biologické spotřeby kyslíku ( $O_2$ ) je využito detektoru fungujícího na principu paramagnetické rezonance, a u detektorů oxidu uhličitého ( $CO_2$ ) či methanu je uplatněna spektroskopie v infračervené oblasti. Celkově je systém sám schopen automaticky vyrovnávat změny tlaku a teplot. Respirometr funguje v uzavřené smyčce, kdy čerpá plyny z testovacích lahví do detektorů a odtud je do nich vrací zpět. Naměřená data jsou v určitých intervalech zaznamenána a následně porovnávána a pak přepočítána na standardní podmínky (teplota  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , tlak  $101\,325\text{ Pa}$ ). Vyjadřována jsou pak jako rychlost produkce/spotřeby sledovaného plynu, kumulativní produkce/spotřeba a objemová koncentrace (%) pozorovaných plynů v plynné fázi každé reakční lahvičky. Výsledky mohou být také znázorněny v mg či  $\mu\text{g}$  za zvolenou časovou jednotku [61].



Obr. 8. Ilustrační fotografie uspořádání respirometru Micro-Oxymax sestávající z detektoru  $O_2$ , detektoru  $CO_2$ , čerpací řídicí jednotky (vlevo shora) a dvouventilových řídicích jednotek s možností připojení 20 měřících pozic (vpravo) [61].

### 7.1.2 Samotné provedení experimentu

Prostřednictvím analyzátoru Micro-Oxymax bylo prováděno kontinuální měření spotřeby  $O_2$  a produkce  $CO_2$  způsobené biologickým aerobním rozkladem vybraných sloučenin ve vodném prostředí. Testy proběhly ve dvou sériích, kdy v první sérii byly analyzovány kosmetické sloučeniny PHE, CAPB s EHS a v druhé sérii látka D4. Oba pokusy byly provedeny podle modifikované metody popsané v normě ČSN EN ISO 9408. Před započítáním testů a po jejich ukončení bylo zjištěno pH suspenze a množství DOC v suspenzi vždy u jednoho zástupce testované látky.

Pracovní objem roztoku v reakčních lahvičkách byl stanoven na 50 ml, přičemž každá testovaná látka byla měřena 4krát vedle sebe. Finální procento biologického rozkladu je tedy průměrem z těchto tří stanovení. Reakční suspenze ve všech případech obsahovala biomédium, inokulum a substrát, tvořící jediný zdroj uhlíku a energie pro MO (standardní nebo zkoušená látka). Slepý pokus vyjadřující endogenní respiraci MO byl připraven odměřením 45 ml biomédia a 5 ml inokula do jednotlivých lahviček. Testované látky dobře rozpustné ve vodě (PHE, CAPB) a látka pro srovnání (BS) byly smíchány v množství 5 ml zásobního roztoku (ZRPHE + BM, ZRCAPB + BM, ZRBS) s 40 ml biomédia a 5 ml inokula takovým způsobem, aby aktuální koncentrace modelové látky v každé reakční lahvičce byla cca 200 mg/l. U testovaných látek ve vodě nerozpustných byla daná látka navažována přímo na kruhové míchadlo vpravené do reakčních baněk, k nimž bylo poté přidáno 45 ml biomédia a 5 ml inokula. EHS byl na analytických vahách navážen v množství cca 10 mg, kdy u třech z šesti reakčních lahviček byla tato navážka s 45 ml biomédia podrobena ultrazvuku pro lepší disperzi částic a na závěr smíchána s 5 ml inokula. Testovaná látka D4 byla navážena v množství cca 15 mg, tedy analogicky jako u všech ostatních s podmínkou koncentrace přibližně 200 mg/l. Přesná koncentrace jednotlivých komponent v reakčních nádobách je zaznamenána ve výsledkové části. Ve všech reakčních lahvičkách bylo zajištěno promíchávání magnetickými míchadly rychlostí nastavenou na 300 rpm a byla dodržována teplota  $25 \pm 1^\circ C$ . Rozklad byl sledován po dobu 28 dnů nebo i déle jestliže tomu bylo zapotřebí.

### 7.1.3 Zpracování naměřených dat

Pro finální správné vyhodnocení provedených testů bylo nutné získaná data dosadit do vzorců a výpočtem tak získat potřebné hodnoty.

### 7.1.3.1 Základní vzorce vztahující se k spotřebě kyslíku

$$TSK = \frac{(4a + b - 2c - 3d) \cdot 8}{M_r}$$

TSK	teoretická spotřeba kyslíku [mg/g]
a	počet atomů uhlíku v substrátu
b	počet atomů vodíku v substrátu
c	počet atomů kyslíku v substrátu
d	počet atomů dusíku v substrátu
$M_r$	relativní molekulová hmotnost substrátu [g/mol]

$$BSK_S = \frac{BSK_c - BSK_{sl.p.}}{C_{zk.l.}}$$

$BSK_S$	substrátová biochemická spotřeba kyslíku [mg/g]
$BSK_c$	biochemická spotřeba kyslíku u zkoušené látky [mg/l]
$BSK_{sl.p.}$	biochemická spotřeba kyslíku u slepého pokusu [mg/l]
$C_{zk.l.}$	hmotnostní koncentrace zkoušené látky [g/l]

$$D_{TSK} = \frac{BSK_S}{TSK} \cdot 100$$

$D_{TSK}$	procento biologického rozkladu [%]
$BSK_S$	substrátová biochemická spotřeba kyslíku [mg/g]
TSK	teoretická spotřeba kyslíku [mg/g]

$$D_{DOC} = \left[ 1 - \frac{(DOC_{kon.sub.} - DOC_{kon.sl.p.})}{DOC_{poč.sub.}} \right] \cdot 100$$

$D_{DOC}$	procento odstranění substrátu podle úbytku rozpuštěného organického uhlíku (DOC) [%]
$DOC_{kon. sub.}$	rozpuštěný organický uhlík v substrátu na konci měření [mg/l]
$DOC_{kon.sl.p.}$	rozpuštěný organický uhlík ve slepém pokusu na konci měření [mg/l]
$DOC_{poč.sub.}$	rozpuštěný organický uhlík v substrátu na začátku měření [mg/l]



### 7.1.3.2 Základní vzorce vztažené na produkci oxidu uhličitého

$$Th_{CO_2} = \frac{m_c}{M_C}$$

$Th_{CO_2}$  teoretické množství vyprodukovaného oxidu uhličitého [mol]

$m_c$  obsah uhlíku v navážce vzorku [g]

$M_C$  molární hmotnost uhlíku [g/mol]

$$SPO_S = \frac{SPO_c - SPO_{sl.p.}}{M_{CO_2}}$$

$SPO_S$  substrátová produkce oxidu uhličitého [mol]

$SPO_c$  produkce oxidu uhličitého u zkoušené látky [g]

$SPO_{sl.p.}$  produkce oxidu uhličitého u slepého pokusu [g]

$M_{CO_2}$  molární hmotnost oxidu uhličitého [g/mol]

$$D_{sCO_2} = \frac{SPO_S}{Th_{CO_2}} \cdot 100$$

$D_{sCO_2}$  procento biologického rozkladu substrátu [%]

$SPO_S$  substrátová produkce oxidu uhličitého [mol]

$Th_{CO_2}$  teoretické množství vyprodukovaného  $CO_2$  [mol]

## 7.2 Stanovení sušiny AK

Suspenze AK byla v množství 10 ml podrobena vakuové filtraci skrze dopředu vysušený a zvážený filtrační papír o plošné hmotnosti  $85 \text{ g/m}^2$ , který byl následně sušen při teplotě  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  až do konstantní hmotnosti. Poté, co filtrační papír vychladl v exsikátoru, byl zvážen na analytických vahách, a tak mohla být sušina AK vypočtena rozdílem jejich hmotností v g/l. Toto stanovení bylo vždy prováděno třikrát vedle sebe.

## 7.3 Měření pH

Před samotným měřením byla provedena kalibrace pH metru komerčními pufrými o pH 9 a pH 4 s následným stanovením hodnot pH u roztoků promíchávaných magnetickými míchadly.

#### 7.4 Zjištění rozpuštěného organicky vázaného uhlíku (DOC)

Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku (DOC) v mg/l byla v testovaných vzorcích stanovena pomocí analyzátoru celkového organického uhlíku TOC-5000 A Schimadzu, schopného změřit současně celkový uhlík (TC) i anorganický uhlík (IC) přítomný v roztoku. Přístroj měří hodnotu celkového organicky vázaného uhlíku (TOC), která je ale vzhledem k předem provedené filtraci vzorku skrze membránový filtr s velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  hodnotou DOC.

Hodnota TC je získána prostřednictvím oxidace veškerého uhlíku ve vzorku přítomného v proudu kyslíku uvnitř spalovací trubice s platinovým katalyzátorem za teploty 650  $^{\circ}\text{C}$ , jejímž následkem vzniká  $\text{CO}_2$  dále vedený na detektor NDIR (Non-dispersive infrared detector). Jeho přítomnost se projevuje signálem, vzniklým absorpcí záření příslušné vlnové délky, zaznamenaným jako plocha píku přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku. Při analýze IC je vzorek vnášen na inertní nosič s kyselinou fosforečnou do toku nosného plynu s následným vytěsněním  $\text{CO}_2$ , kdy je pak změření signálu obdobné jako u stanovení TC. V případě TOC se jedná o rozdíl hodnot TC a IC.

#### 7.5 Isolace bakterií, podílejících se na degradaci testovaných látek

Kalová suspenze testované látky (PHE, CAPB, EHS), pocházející z analýzy biologické rozložitelnosti na respirometru Micro-Oxymax, byla ponechána protřepávat cca 10 minut se sterilními skleněnými kuličkami z důvodu rozbití vzniklých bakteriálních vloček. Poté byla ve sterilních zkumavkách vyředěna desetinnou řadou až do ředění  $10^{-5}$ . V návaznosti na toto ředění bylo z ředění  $10^{-3}$  vyočkováno 0,1 ml inokula na jednu Petriho misku s MA a 0,1 ml na jednu Petriho misku s MA + PHE, MA + CAPB nebo MA + EHS v závislosti na látce použité v suspenzi. Oproti tomu z ředění  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  bylo vždy vyočkováno po 0,1 ml na dvě misky MA a pak 0,1 ml na dvě Petriho misky s předpřipravenými výše zmíněnými agary. Inokulum na miskách bylo důkladně rozetřeno sterilními skleněnými hokejkami po celé ploše misek. Tímto úkonem tak bylo na Petriho miskách dosaženo ředění kalové suspenze  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$  na 1 ml kalové suspenze. Všechny inokulované misky byly inkubovány při 25 $^{\circ}\text{C}$  po dobu 5 dnů a více, kdy byly průběžně hodnoceny. Bakteriální kolonie, rostoucí výrazněji na MA s testovanou látkou než na samotném MA, byly přeočkovány křížovým roztěrem za účelem izolace, neboť byla předpokládána jejich schopnost využívat testovanou látku jako substrát.

## **7.6 Modifikovaný postup namnožení a izolace degradačních bakterií u PHE**

Kalová suspenze z rozkladu PHE na Micro-Oxymaxu, po několikerých přídavcích PHE v koncentraci 200 mg/l, byla nejprve protřepávána se sterilními skleněnými kuličkami. Po této důkladné desintegraci vloček kalu bylo provedeno se suspenzí desetinné ředění od  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$  takovým způsobem, že bylo připraveno 5 sterilních zkumavek s 4,5 ml sterilního FR, kdy bylo do jedné ze zkumavek přidáno 0,5 ml suspenze. Ve dvou paralelních stanoveních bylo připraveno 5 zkumavek s 3 ml MM + PHE s napipetovaným 0,1 ml zředěné suspenze od  $10^{-1}$  do  $10^{-5}$  tak, aby vzniklo ředění  $10^{-2}$  do  $10^{-6}$ . Zkumavky byly následně řádně protřepány a pak naležato inkubovány za mírného pohybu při 25°C po dobu 5 dnů a více. V případě vzniku zákalu bylo provedeno vyočkování na univerzální agary (TYA, R2A) a na připravené MA s PHE.

## **7.7 Ověření schopnosti růstu jednotlivých kultur bakterií v přítomnosti CAPB a EHS**

Tyto zkoušky byly uskutečněny ve sterilních skleněných lahvičkách, do nichž bylo dávkováno 15 ml MM. Lahvičky s MM byly sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut, ponechány vychladnout a poté byly obohaceny přidáním 15 µl MEMs vitaminů a 115 µl sterilního ZRCAPB nebo 15 µl EHS. U dvou takto připravených lahviček byla změřena původní hodnota DOC. Dále bylo ve dvou vyhotoveních zaočkováno buď 30 µl jednotlivých kultur ve formě jejich suspenzí ve FR, anebo kombinace kultur v množství 40 µl či 60 µl. Hustota suspenzí byla přibližně 2. stupeň McFarlandovy stupnice a jejich předinkubace trvala cca 3 dny. Veškeré lahvičky byly poté umístěny na třepačky a kultivovány při 25 °C. Při výskytu zákalu u kterékoli z lahviček bylo provedeno vyočkování na univerzální živné agary. V okamžiku vzniku zákalu u suspenzí PACB v jakékoliv z lahví byl odebrán vzorek v množství 5 ml, buňky byly odstraněny filtrací přes sterilní filtr MILLIPORE s póry 0,2 µm a nakonec byl odebraný objem 3 ml smíchaný s 3 ml destilované vody, dokonale promíchán a analyzován na DOC.

## 7.8 Zhodnocení rychlosti růstu a míry degradace izolovaných kultur z kalové suspenze CAPB

Do sterilních skleněných lahví bylo nadávkováno 50 ml MM. Poté byly všechny lahvičky sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut, ponechány vychladnout a nakonec obohaceny 50 µl MEMs vitamínů a 375 µl sterilního ZRCAPB o přibližné koncentraci 300 mg/l. Po důkladném zamíchání bylo vždy do 3 lahví přidáno 50 µl jedné suspenze izolované kultury o hustotě suspenze 2. stupeň McFarlandovy stupnice. Asepticky pak byly z každé lahve odebrány 2 ml vzorku, u něhož byly buňky odstraněny filtrací přes sterilní filtr MILLIPORE s póry 0,2 µm a následně byl zředěn 4 ml destilované vody, dokonale promíchán a analyzován na DOC. Rovněž byla u všech vzorků změřena optická densita (OD) na přístroji Tecan při vlnové délce 600 nm napipetováním 200 µl každého vzorku do jamek na mikrotitrační destičce následně vložené do přístroje. DOC a OD byly měřeny v pravidelných intervalech, zatímco lahvičky byly stále kultivovány při 25 °C na třepačce.

## 7.9 Ověření růstu izolovaných kultur EHS na EH a SALNa

Čerstvě připravený MM byl rozdělen po 10 ml do skleněných lahví, které byly sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut, k nimž bylo po vychladnutí přidáno 10 µl MEMs vitamínů. Ve dvou paralelních stanoveních bylo připraveno 5 lahví s přísadkou 40 µl ZRSALNa o koncentraci 400 mg/l a také 5 lahví s 3,6 µl EH, do nichž bylo následně napipetováno 20 µl vždy jen jedné suspenze izolované kultury o hustotě suspenze 2. stupeň McFarlandovy stupnice inkubované 3 dny předem. Potom byly asepticky z každé lahve odebrány 2 ml vzorku, u kterého byly poté buňky odstraněny filtrací přes sterilní filtr MILLIPORE s póry 0,2 µm. Následně byl vzorek zředěn 4 ml destilované vody, dokonale promíchán a analyzován na DOC. U všech vzorků byla také změřena optická densita (OD) na přístroji Tecan při vlnové délce 600 nm napipetováním 200 µl každého vzorku do jamek na mikrotitrační destičce následně vložené do přístroje. Kultivace lahví probíhala při 25 °C na třepačce, přičemž hodnoty DOC a OD byly měřeny v pravidelných intervalech.

## 7.10 Konzervace získaných kultur bakterií

Pro případ možného budoucího studia degradací byly veškeré kultury jednotlivých bakterií získané z kalových suspenzí s CAPB a EHS zakonzervovány. Dostatečné množství biomasy dané kultury bylo seškrábnuto laboratorní lancetou z živné půdy a rozmícháno v pár kapkách sterilního glycerolu ve velké mikrozkuhavce typu Eppendorf, která byla následně umístěna do hlubokomrazicího boxu na teplotu  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 7.11 Gramovo barvení

Princip identifikace bakterií Gramovým barvením spočívá v navázání vzniklého komplexu jodu s krystalovou violetí na peptidoglykan v bakteriálních stěnách, který je možné pouze u gramnegativních bakterií snadno odbarvit rozpouštědly etanolem či acetonem.

Na podložní sklíčko byla asepticky připravena suspenze bakteriální kultury a provedena fixace plamenem. Řádně zchladlý roztěr na podložním sklíčku byl následně převrstven roztokem krystalové violeti po dobu 60 vteřin, kdy byla poté barva slita a preparát byl znovu převrstven Lugolovým roztokem ponechaným působit 60 vteřin. Pak byl opatrně opláchnut destilovanou vodou a v šikmé poloze odbarvován etanolem 20 – 25 vteřin. Následovalo opětovné opláchnutí destilovanou vodou, dále po dobu 60 vteřin převrstvení karbolfuchsinem a nakonec opláchnutí destilovanou vodou s opatrným usušením vysoko nad plamenem kahanu. Mikroskopie takto připraveného preparátu byla realizována prostřednictvím imerzního objektivu při zvětšení 1000x a její výsledek byl zdokumentován fotografií každé z kultur.

## 7.12 KOH-test

Gramovo barvení nemusí vždy poskytnout spolehlivé výsledky. Proto byl proveden tento krátký a spolehlivý test pro ověření zjištěných informací, a to pomocí 3% roztoku KOH, hydrolyzujícího buněčnou stěnu pouze gramnegativních bakterií.

Na podložní sklíčko byla nakápnuta malá kapka 3% roztoku KOH a v ní bylo vyžíhanou a zchladlou bakteriologickou kličkou rozmícháno dostatečné množství kultury testované bakterie. Klička byla posléze několikrát od podložního sklíčka zvednuta, aby se zjistilo, jestli kapka KOH zůstává tekutá (grampozitivní bakterie) nebo se stává viskózní, kdy se buňky rozpouští a za kličkou se protahuje vlákno uvolněného buněčného obsahu (gramnegativní bakterie).

## 8 VÝSLEDKOVÁ ČÁST A DISKUZE

Ve výsledkové části jsou chronologicky řazena data, získaná prováděním jednotlivých testů, počínajících u měření vzorků na respirometru Micro-Oxymax se zakončením u konzervace jednotlivých kultur bakterií schopných degradace testovaných látek.

### 8.1 Výsledky pocházející z analýzy prováděné systémem Micro-Oxymax

Všechny kosmetické sloučeniny vybrané za účelem této diplomové práce s BS jako srovnávací látkou byly podrobeny respirometrickým testům, ve kterých byly pro aerobní MO zdrojem uhlíku a energie. V pravidelných časových úsecích (po 8 hodinách) byla zapisována spotřeba  $O_2$  a produkce  $CO_2$  čtyřikrát (u D4 třikrát) vedle sebe pro každou zkoušenou látku tak, aby mohl být průměr jejich hodnot dosazen do vzorce, jímž bylo možné přesně určit procento biologického rozpadu látky, a tak zhodnotit míru její rozložitelnosti. Rovněž byly z naměřených hodnot  $O_2$  a  $CO_2$  odečteny limitní hodnoty biologického rozkladu jako lagová fáze, maximální stupeň rozkladu nebo doba biologického rozpadu, která je meziobdobím dvou zmíněných fází. Pro přehlednost a jasnost výsledků jsou obě série měření uváděny společně.

U obou prováděných sérií testů bylo na počátku a na konci měřeno pH, obsah sušiny kalu a DOC. Veškerá naměřená data jsou vypsána v Tab. 1. Počáteční záznamy pH byly vyšší než u suspenzí po proběhlých testech, avšak její hodnoty se stále pohybovaly v neutrální oblasti pH, tedy optimální pro růst širokého spektra MO. Množství rozpuštěného organického uhlíku ve vodě (DOC), měřeného na přístroji Shimadzu, bylo podle zaznamenaných hodnot po testech zřetelně nižší, čímž byl nadto doložen fakt úplného biologického rozkladu sloučenin ve vodě rozpustných. Ze získaných hodnot bylo vypočteno i procento odstranitelnosti těchto látek, zaznamenané také v Tab. 1. Při porovnání obsahu sušiny na počátku a na konci pokusu lze vidět, mimo hodnoty D4, její navýšení, tedy nárůst biomasy využívající testované látky k růstu. Už díky obsahu sušiny tak lze doložit rozklad všech látek s výjimkou D4, který nebyl nikterak rozložen.

Uzančně vymezená doba testu je 28 dní, přičemž test může být ukončen předčasně, jestliže biodegradační křivka dosáhla konstantní hodnoty při po sobě nejméně třech jdoucích měřeních. První série, kdy byla testována většina vybraných sloučenin (PHE, CAPB, EHS) byla ponechána probíhat 5 týdnů (34 dnů) a druhá série 6 týdnů (43 dnů). Data o probíhající ději byla sbírána po delší dobu, aby se zajistila přesnost prováděné analýzy. V průběhu

první série došlo k rozkladu všech látek, zato v druhé sérii i přes její dlouhé trvání k rozkladu D4 nedošlo. Z 1. série bylo po 20 dnech odebráno po dvou vzorcích suspenzí PHE a CAPB (lahvičky 3. a 4.) z důvodu provádění dalších mikrobiologických pokusů. Ve všech tabulkách a grafech se tedy vždy pracovalo s daty i průměry dvou stanovení (lahvičky 1. a 2.).

Tab. 1. Veškeré naměřené hodnoty pH, obsahu sušiny kalu, rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a odstranitelnosti ( $D_{DOC}$ ) u všech testovaných látek.

Vzorek	pH <sub>poč</sub>	pH <sub>kon</sub>	sušina <sub>poč</sub>	sušina <sub>kon</sub>	DOC <sub>poč</sub>	DOC <sub>kon</sub>	D <sub>DOC</sub>
	-	-	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	[%]
Sl. p. (1 s.)	7,323	6,815	476,3	490,1	81,52	6,533	-
Sl. p. (2 s.)	7,683	7,154	403,1	433,5	83,21	7,999	-
BS	7,388	7,164	476,3	525,5	80,56	7,847	98,36
PHE	7,404	6,839	476,3	600,1	79,45	7,052	99,35
CAPB	7,401	6,615	476,3	626,3	70,61	8,618	97,05
EHS	-	7,112	476,3	728,0	-	-	-
EHS UZ	-	7,070	476,3	744,2	-	-	-
D4	-	6,873	403,1	400,5	-	-	-

### 8.1.1 Spotřeba O<sub>2</sub>

Veškerá potřebná data vztahující se k O<sub>2</sub> a jeho spotřebě při degradaci vybraných sloučenin jsou uvedena v Tab. 2. Hmotnostní koncentrace spotřebovaného O<sub>2</sub> pro oxidaci látky (BSK) se u všech sloučenin kromě BS a D4 blížila teoretické neboli maximální spotřebě O<sub>2</sub>. U BS bylo potřeba více kyslíku, než se předpokládalo, což je viditelné z vyšších hodnot BSK. V případě záporných hodnot u sloučeniny D4 k degradaci nedošlo. K vyhodnocení BSK bylo potřebné určit respirační spotřebu samotného inokula, tedy slepého vzorku, který měl v obou případech hodnoty výrazně nižší oproti ostatním vzorkům, protože obsahoval pouze zdroje uhlíku a energie pocházející z inokula, oproti suspenzím s přidanými látkami, na jejichž využití bylo potřeba více kyslíku.

Jasnější výsledek degradace látek lze vidět skrze hodnoty procentuálního biologického rozkladu substrátu ( $D_{TSK}$ ). Hodnota u BS činila 69,77 %, což značí, že došlo k úplnému rozkladu této látky. Potvrdilo se tím také správné provedení zkoušky, které mělo limit degradace srovnávací látky min. 50 %. Ostatní látky vykazovaly hodnoty blízké 50 % ukazující procento biologického rozkladu látky z průměru všech měření. I přes viditelně nižší

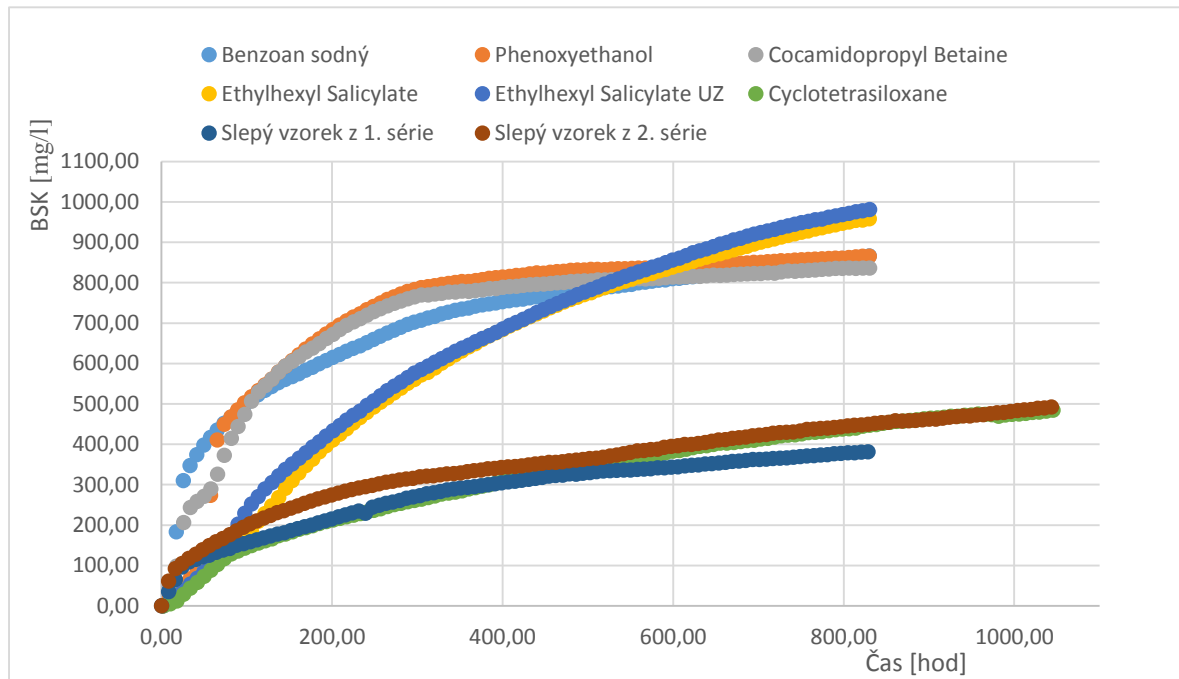
hodnoty  $D_{TSK}$  však u nich docházelo k částečné degradaci na rozdíl od D4, kde byly hodnoty v mínusu a tím se nám dokázala nedegradabilita této látky. Z 1. série bylo po 20 dnech odebráno po dvou vzorcích suspenzí PHE a CAPB (lahvičky 3. a 4.) z důvodu provádění dalších mikrobiologických pokusů. Ve všech tabulkách a grafech se tedy vždy pracovalo s daty i průměry dvou stanovení (lahvičky 1. a 2.).

Tab. 2. Data získaná z obou sérií měření vztažená na spotřebu kyslíku získanou analýzou biodegradability látek systémem Micro-Oxymax.

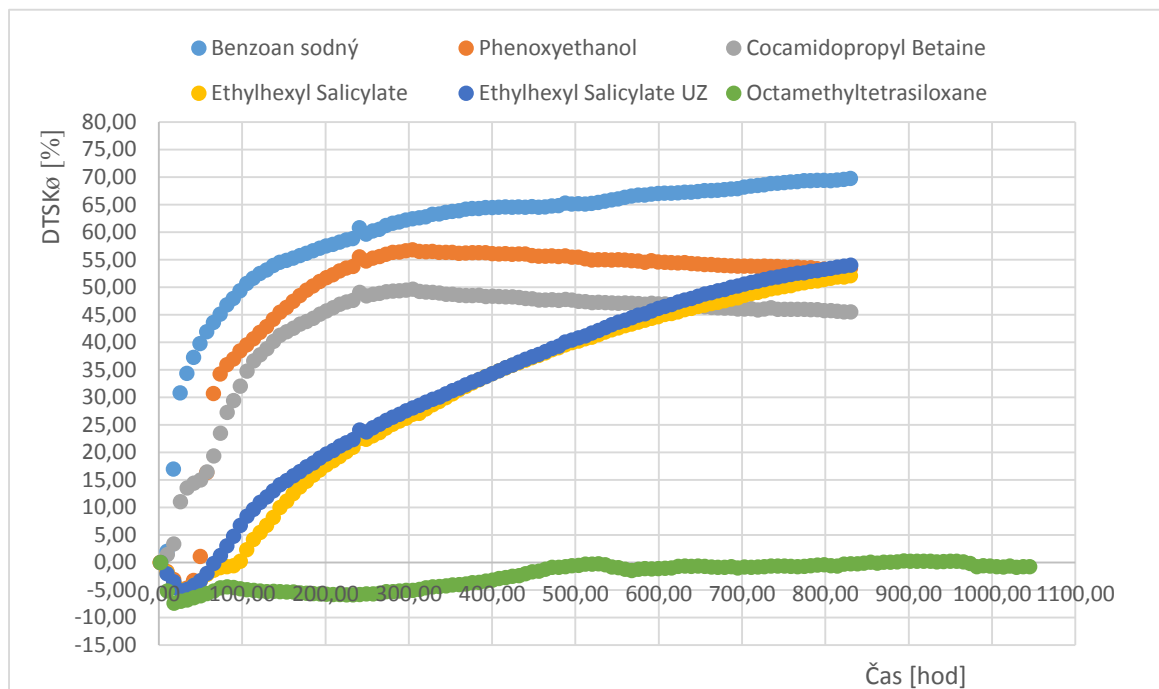
Testovaná látka	Slepý vzorek z 1. série měření (BS1)					Slepý vzorek z 2. série měření (BS2)				
Lahvička	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$
TSK [mg/g]	-					-				
BSK [mg/l]	368,2	455,0	383,6	317,0	<b>381,0</b>	533,8	533,8	488,0	455,4	<b>502,8</b>
$D_{TSK}$ [%]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testované látky	<b>Benzoan sodný (BS)</b>					<b>Phenoxyethanol (PHE)</b>				
Lahvička	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$
TSK [mg/g]	1665,40					2200,40				
BSKs [mg/g]	1165,0	1226,0	1150,0	1108,0	<b>1162,0</b>	1490,0	1080,0	1011,0	981,3	<b>1285,0</b>
$D_{TSK}$ [%]	69,94	73,60	69,04	66,51	<b>69,77</b>	67,70	58,30	56,96	55,85	<b>63,00</b>
Testované látky	<b>Cocamidopropyl Betaine (CAPB)</b>					<b>Ethylhexyl Salicylate (EHS)</b>				
Lahvička	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$
TSK [mg/g]	2428,8					2382,3				
BSKs [mg/g]	1077,0	1248,0	1049,0	1418,0	<b>1162,5</b>	1303,0	1169,0	1316,0	1273,0	<b>1265,0</b>
$D_{TSK}$ [%]	45,22	52,40	44,04	59,51	<b>48,81</b>	53,65	48,13	54,19	52,41	<b>52,10</b>
Testované látky	<b>Ethylhexyl Salicylate UZ (EHS UZ)</b>					<b>Cyclotetrasiloxane (D4)</b>				
Lahvička	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$	1	2	3	4	$\bar{\sigma}$
TSK [mg/g]	2382,3					1758,8				
BSKs [mg/g]	1303,0	1169,0	1316,0	1273,0	<b>1265,0</b>	-70,87	-34,62	64,51	-	<b>-27,32</b>
$D_{TSK}$ [%]	56,24	42,23	73,31	44,00	<b>53,95</b>	-4,030	-1,970	3,670	-	<b>-0,780</b>



Průběh biologické spotřeby kyslíku v jednotlivých degračních pokusech i průběh celkové degradace sledovaných látek je uveden v grafech, na Obr. 9 a 10.



Obr. 9. Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti substrátové biochemické spotřeby kyslíku na době měření.



Obr. 10. Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti procenta biologického rozkladu substrátu na době měření z naměřených hodnot spotřeby kyslíku.

Celkový průběh prováděné analýzy na Obr. 9 i 10 naznačuje, že PHE a CAPB se rozkládají za absence lagové fáze a s obdobnou rychlostí jako se rozkládá srovnávací látka (BS). Maximální stupeň biologického rozkladu byl vypočten u BS na 69,77 %, u PHE na 63,00 % a u CAPB na 48,81 %. Z grafu na Obr. 10 je zřejmé, že přibližně po 300 hodinách nastává prodleva (plató) v rozkladu PHE a CAPB a hodnota DTSK se již nezvyšuje. V případě EHS probíhal rozklad pozvolněji a z výsledků je patrné, že proces probíhal prakticky stejně u EHS sonifikovaného i EHS bez použití ultrazvuku. Na těchto grafech je rovněž znatelně znázorněna neschopnost bakterií rozložit D4, protože se hodnoty rozkladu v průběhu nikterak výrazně nemění nebo respektive spíše klesají, což může znamenat mírnou toxicitu této látky.

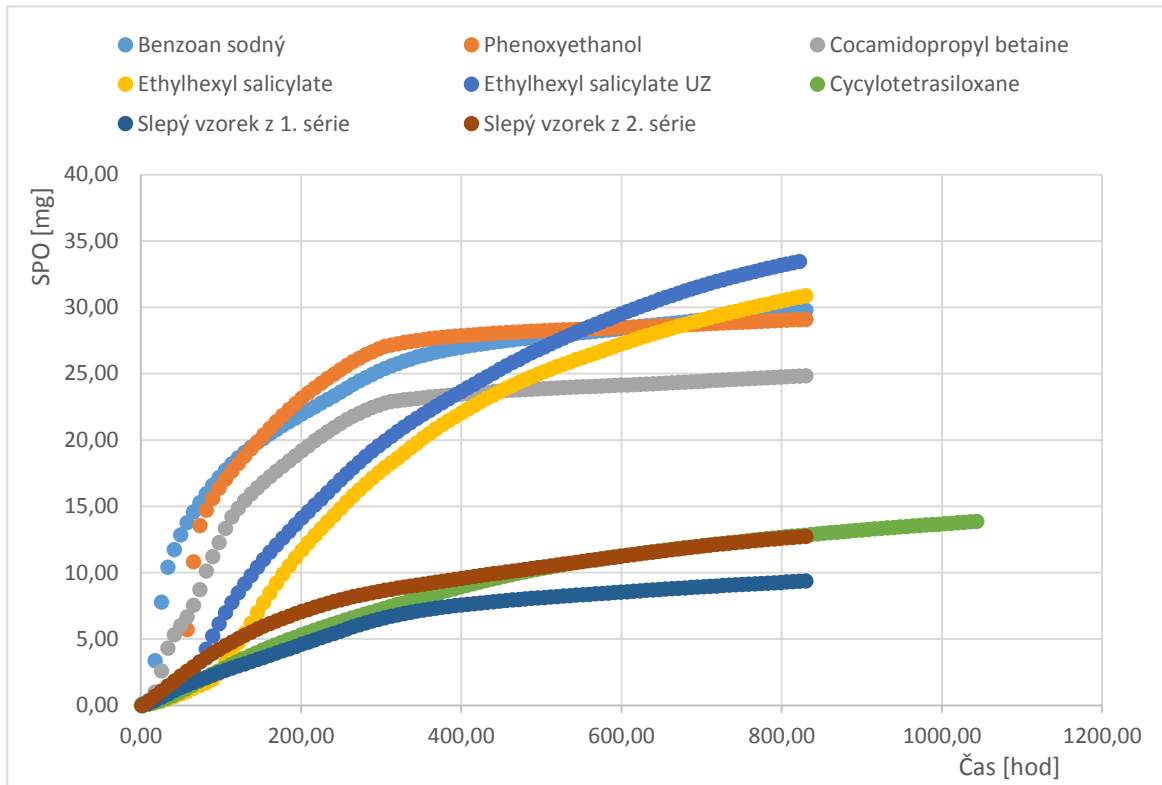
### 8.1.2 Produkce CO<sub>2</sub>

Všechna vypočítaná data vztahující se k tvorbě CO<sub>2</sub> a související s rozkladem vybraných látek jsou vypsána v Tab. 3. Díky těmto výsledkům lze sloučeniny označit jako biodegradabilní. Výjimkou je opět D4, u kterého byly hodnoty nulové, z čehož lze usuzovat, že jej není možné biologickou cestou rozložit. Při porovnání hodnot odstranitelnosti látek se získanými hodnotami spotřeby O<sub>2</sub> jde vidět procentuální navýšení hodnot biologického rozkladu substrátu získaných z tvorby CO<sub>2</sub>. Bakterie totiž nejenom rozkládají daný substrát, ale i rostou a celkově produkují CO<sub>2</sub> jako projev své životaschopnosti.

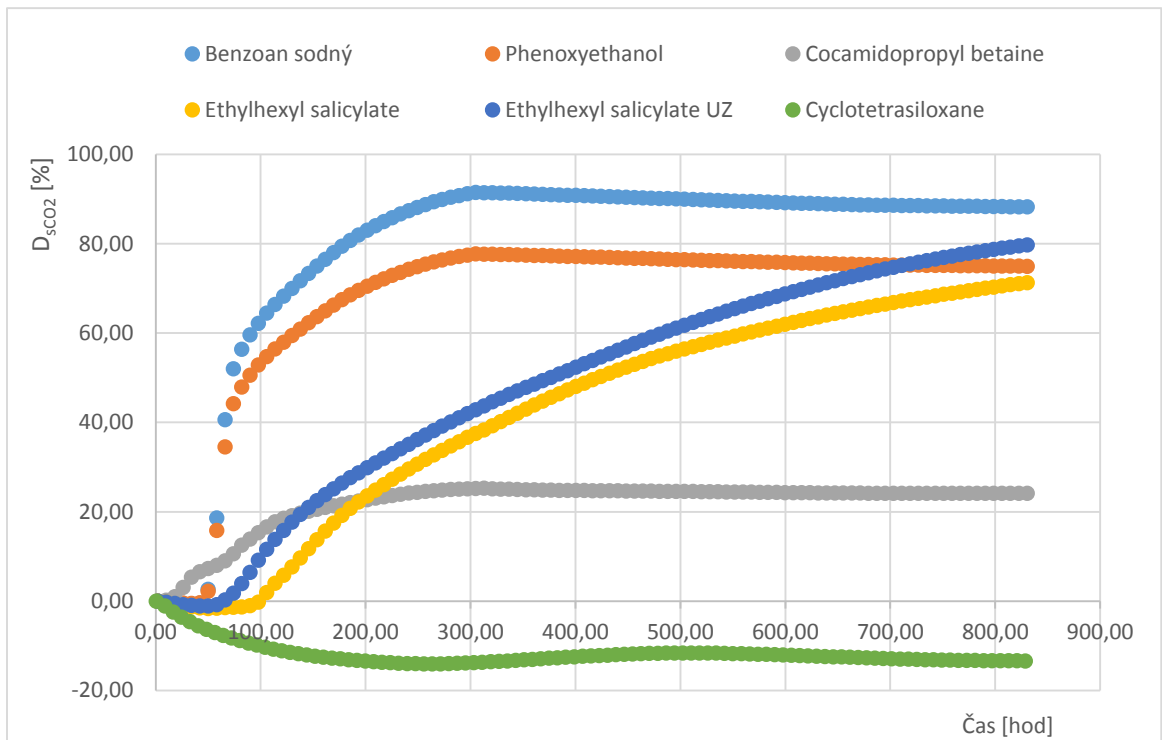
Průběh biologického rozkladu v závislosti na čase je graficky vyjádřen na Obr. 11 a 12.. Veskrze jsou shodné s průběhem rozkladu dle spotřeby O<sub>2</sub> jen s vyššími hodnotami a tak je není nutné znova rozebírat.

Tab. 3. Data získaná z obou sérií měření vztážená na produkci oxidu uhličitého získanou analýzou biodegradability látek systémem Micro-Oxymax.

Testované látky	Slepý vzorek z 1. série (BS1)					Slepý vzorek z 2. série (BS2)				
Lahvička	1	2	3	4	ø	1	2	3	4	ø
Th [mol]	-					-				
SPO [mg]	7,700	10,22	9,890	9,650	<b>9,370</b>	14,466	13,765	12,784		<b>13,67</b>
DSCO <sub>2</sub> [%]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testované látky	Benzoan sodný (BS)					Phenoxyethanol (PHE)				
Lahvička	1	2	3	4	ø	1	2	3	4	ø
Th [mol]	0,5076					0,5979				
SPO [mg]	19,86	20,52	20,28	20,97	<b>20,41</b>	31,63	30,41	20,60	20,53	<b>31,02</b>
DSCO <sub>2</sub> [%]	88,82	91,77	90,70	93,80	<b>91,27</b>	84,59	79,94	78,25	77,99	<b>82,27</b>
Testované látky	Cocamidopropyl Betaine (CAPB)					Ethylhexyl Salicylate (EHS)				
Lahvička	1	2	3	4	ø	1	2	3	4	ø
Th [mol]	0,5830					0,6789	0,6801	0,6927	0,6861	0,6845
SPO [mg]	26,42	26,71	24,79	21,11	<b>39,78</b>	30,71	28,94	31,68	32,13	<b>30,87</b>
DSCO <sub>2</sub> [%]	66,39	67,52	56,93	71,29	<b>66,96</b>	71,35	65,34	73,13	75,31	<b>71,28</b>
Testované látky	Ethylhexyl Salicylate UZ (EHS UZ)					Octamethyltetrasiloxane (D4)				
Lahvička	1	2	3	4	ø	1	2	3	4	ø
Th [mol]	0,6903	0,6795	0,6831	0,6909	0,6860	0,5125	0,5270	0,5270	-	0,5222
SPO [mg]	33,09	28,85	40,45	31,44	<b>33,45</b>	13,98	13,17	14,43	-	<b>13,86</b>
DSCO <sub>2</sub> [%]	79,99	65,07	103,28	72,52	<b>80,22</b>	0,00	0,00	0,00	-	<b>0,00</b>



Obr. 11. Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti substrátové biochemické produkce oxidu uhličitého na době měření.



Obr. 12. Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti procenta biologického rozkladu substrátu na době měření získaného z naměřených hodnot produkce oxidu uhličitého.

## 8.2 Bakterie degradující PHE

Cílem této části experimentální práce bylo pokusit se izolovat z kalové suspenze s testovanou látkou bakterie se schopností rozkladu PHE a případně poté je identifikovat pomocí základních mikrobiologických operací.

### 8.2.1 Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s PHE

Pro vlastní zaočkování živných agarů (MA+PHE a MA) byla použita kalová suspenze, ve které proběhl rozklad phenoxyethanolu (reakční lahev označená jako PHE19) a do které byl ještě uskutečněn dvojitý přídavek PHE v koncentraci 200 mg/l s následnou kultivací (3 týdny), z důvodu vyššího namnožení bakterií degradujících PHE. Růst bakterií na stanovených živných médiích byl průběžně hodnocen, a bylo předpokládáno, že v případě výrazného a viditelného růstu na MA+PHE budou jednotlivé kolonie bakterií přeočkovány na čerstvé agary na základě jejich velikosti, tvaru a barvy. Doba růstu bakterií byla přibližně 3 týdny. Avšak, ať už se jednalo o ředění kalové suspenze  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  nebo  $10^{-6}$ , tak nebylo ani v jednom z případů zaznamenáno zjevného rozdílu v růstu bakterií na MA a MA+PHE. Test byl proto prováděn opakovaně, s pozměněním přípravy živných agarů – přesněji vynecháním přídavku roztoku vitamínů – aby bylo zabráněno růstu nedegradujících bakterií. Přesto však, ani po této změně, nebylo možné přímo odlišit degradéry PHE a izolovat je.

V případě ředění suspenze na  $10^{-4}$  byla na agarových plotnách navíc příliš vysoká hustota kolonií, tím ani nebylo možné přeočkovat jednotlivé kolonie bakterií. Misky s vyočkovanými suspenzemi, zředěnými na  $10^{-5}$  a  $10^{-6}$ , byly přehlednější a tak z nich byly dvě kultury bakterií izolovány, i přes výše uvedené skutečnosti, na čerstvá živná média. Jednalo se o velké bílo-žluté kolonie pojmenované P1V a drobné žluto-hnědé kolonie označené P1M, schopné rovnocenného růstu na MA i MA+PHE. Dále byla zaznamenána i všudypřítomnost ploché průhledné kultury bakterií P1P, kterou se však v průběhu práce nepodařilo samostatně separovat. Nakonec se však přistoupilo k jinému způsobu izolace bakterií, a to prostřednictvím dalšího pomnožení v tekutých médiích. Pomnožení kultur bakterií a jejich opětovná separace

Po provedení pomnožení kalové suspenze v minerálním médiu s PHE, dle postupu popsaného v Kap. 7.6, byl ve všech zkumavkách s MM+PHE, naočkovaných zředěnou kalovou suspenzí zaznamenán zákal, objevující se po 5 – 7 dnech inkubace. Z ředění

s nejviditelnějšími zákalý (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>) tedy bylo provedeno vyočkování křížovým roztěrem na stanovená živná média vždy ve dvou provedeních. Opět byl růst bakterií na MA s PHE a na universálním agaru přibližně stejný a tak nebylo možné vytipovat kolonie degradujících bakterií. Přesto byly opětovně izolovány kolonie identické s kulturami P1V a P1M, z důvodu následného ověření jejich růstu v 3 ml připraveného MM+PHE. Ani jedna z těchto kultur bakterií ani po 4 týdnech v tekutém médiu s PHE nevyrostla a tak se lze domnívat, že tyto kultury se na degradaci PHE nepodílely nebo že k degradaci PHE je potřeba přítomnosti dalších kultur bakterií (symbioza). Naskytuje se tu ale i možnost, že se degradace PHE uskuteční pouze za výskytu kultury P1P, což by i vysvětlovalo její neschopnost růstu bez jednotlivých kultur P1V nebo P1M. Bylo totiž vyzorováno, že jakmile došlo k izolaci kultury P1P od zmíněných kultur, nedošlo na jakékoli agarové plotně k jejímu růstu. Konkrétní degradéry PHE se tedy nepodařilo izolovat v čisté kultuře. Na druhou stranu je nutno uvést, že pomnožená smíšená mikrobiální suspenze v tekutém minerálním médiu s PHE (500 mg/l) byla několikrát přeočkována v množství 10 µl do 3 ml čerstvého identického média s PHE a vždy došlo po inkubaci k růstu smíšené kultury, projevující se zákalem média a změnou zabarvení z víceméně bezbarvé podoby do nahnědlého odstínu. To dokazovalo přítomnost degradujících mikroorganismů a byla proto zkoušena i jejich izolace na universálních živných médiích (R2A, TYA). Přes získání řady kultur nebyla v následných testech ani jedna z nich schopna samostatného růstu v minerálním médiu s PHE, i přes opakované pokusy, s dlouhou inkubační dobou. Bylo tedy zřejmé, že otázka mikrobiálních kultur podílejících se na rozkladu této látky je složitější a že degradace PHE není závislá jen na jedné klíčové degradační kultuře. Proto byla směsná suspenze, získaná z MM+PHE se všemi přítomnými kulturami mikroorganismů zakonzervována v glycerolu při -80°C, pro podrobné studium v rámci příští DP.

### **8.3 Bakterie degradující CAPB**

U testované látky CAPB byl cíl vymezen obdobně jako u PHE, tedy izolovat a identifikovat degradéry uvedené látky.

#### **8.3.1 Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s CAPB**

Zaočkování živných agarů bylo provedeno užitím kalové suspenze s CAPB, označené jako CAPB22, obsahující dvojitý přídavek CAPB v koncentraci 200 mg/l. Provedení a průběh celého testu byl obdobný jako u PHE, jen s kratší dobou růstu bakterií v každém pomnožo-

vacím cyklu (cca 10 dní). Rozdíl mezi koloniemi narostnými na MA a na MA+CAPB nebyl zpozorován, ale přesto byly jednotlivé viditelné kultury izolovány, aby mohly být vystaveny dalším testům, týkajících se degradace CAPB. Jako případný degradér byla jednak izolována kultura tvořící velké bílé kolonie, označená jako kultura F1V, a také zcela odlišná malá nažloutlá kultura F1M.

### 8.3.2 Ověření schopnosti růstu jednotlivých kultur bakterií s CAPB

V tomto pokusu byl sledován růst získaných kultur v tekutém médiu s CAPB jako jediným zdrojem uhlíku a energie. Po provedení veškerých úkonů popsanych v Kap. 7.7 byly zjištěny vstupní hodnoty DOC v připraveném MM s roztokem vitamínů a ZRCAPB, do nichž nebyla přidána žádná z izolovaných kultur F1V a F1M pocházejících z kalové suspenze s CAPB. Tyto data pak byla porovnána s naměřenými daty DOC v inkubačních lahvích, naočkovaných jednotlivými kulturami i jejich kombinací, získanými v okamžik vzniku zákalu v lahvičkách, ke kterému došlo po 7 dnech (Tab. 4). Porovnáním průměrů těchto hodnot lze jasně vidět pokles koncentrace rozpuštěného organického uhlíku, což dokazuje degradační schopnosti obou izolovaných kultur F1V a F1M, které dokázaly CAPB využívat jako růstový substrát, přičemž kultura F1M snížila hodnotu DOC o něco výrazněji než kultura F1V.

Tab. 3. Hodnoty DOC naměřené před a po provedení pokusu degradace PACB izolovanými kulturami.

Kultura	Měření	Čas [hod]	
		0	168
		DOC [mg/l]	
Žádná	1	67,12	-
	2	68,68	-
<b>Průměr</b>		<b>67,90</b>	-
<b>Směrodatná odchylka</b>		1,10	-
F1V	3	-	38,76
	4	-	39,17
<b>Průměr</b>		-	<b>38,97</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>		-	0,290
F1M	5	-	34,21
	6	-	33,58
<b>Průměr</b>		-	<b>33,90</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>		-	0,450
F1V + F1M	7	-	34,63
	8	-	33,71
<b>Průměr</b>		-	<b>34,17</b>
<b>Směrodatná odchylka</b>		-	0,650

### 8.3.3 Rychlost růstu a míry degradace izolovaných kultur z kalové suspenze CAPB

V dalším testu bylo proto podrobněji sledováno, jak jsou obě získané kultury schopny rozkládat CAPB. Při zkoušce rychlosti a míry degradace jednotlivých kultur bakterií bylo nasazeno šest lahviček s minerálním médiem a CAPB, připravených podle Kap. 7.8, kdy tři z nich byly naočkované kulturou F1V a zbylé tři kulturou F1M. Celkově pokus probíhal 18 dní, během nichž byly v intervalu nejprve 2, pak 4 a nakonec 6 dnů odebrány z každé z lahviček vzorky pro stanovení DOC a také optické density (OD).

Hodnoty DOC naměřené v průběhu pokusu jsou zaznamenány v Tab. 5 a jejich grafické znázornění na Obr. 13. Stanovené hodnoty OD jsou uvedeny v Tab. 6 s následujícím vyjádřením na Obr. 14. Veškeré hodnoty vyjádřené v grafech odpovídají průměru stanovení ze třech paralelních lahviček ( $DOC_{\sigma}$ ) a chybové úsečky jsou shodné s jejich směrodatnými odchylkami ( $\sigma$ ).

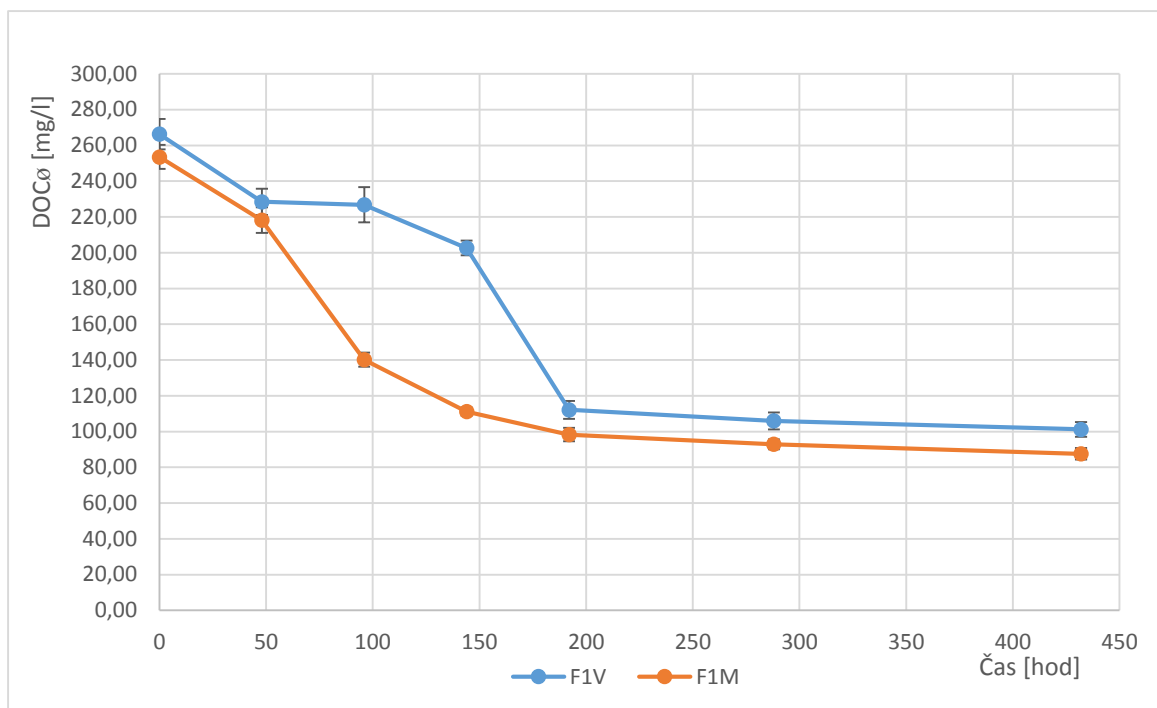
Tab. 4. Hodnoty rozpuštěného organického uhlíku v průběhu pokusu degradace testované látky CAPB kulturami F1V a F1M.

Čas [hod]		0	48	96	144	192	288	432
Kultura	Měření	DOC [mg/l]						
F1V	1	82,02	74,63	69,89	65,68	43,11	40,85	38,19
F1V	2	98,28	84,18	86,99	72,27	34,00	32,5	29,89
F1V	3	85,99	69,66	69,9	64,67	35,02	32,59	33,10
<b>DOC<math>_{\sigma}</math> [mg/l]</b>		<b>266,3</b>	<b>228,5</b>	<b>226,8</b>	<b>202,6</b>	<b>112,1</b>	<b>105,9</b>	<b>101,2</b>
$\sigma$		8,477	7,379	9,870	4,127	4,991	4,795	4,185
F1M	4	82,56	67,73	50,76	36,57	36,71	34,11	32,58
F1M	5	79,07	69,45	46,42	39,6	29,12	29,1	28,73
F1M	6	91,94	81,03	42,97	35,02	32,46	29,69	26,25
<b>DOC<math>_{\sigma}</math> [mg/l]</b>		<b>253,6</b>	<b>218,2</b>	<b>140,2</b>	<b>111,2</b>	<b>98,29</b>	<b>92,90</b>	<b>87,56</b>
$\sigma$		6,656	7,234	3,903	2,330	3,804	2,738	3,190

Z Obr. 11 lze u obou křivek vyčíst jasné snížení koncentrace DOC z důvodu degradace přítomného CAPB a jeho využití jako substrátu pro růst buněk. U kultury F1V dochází k nejvýraznější ztrátě rozpustného organického uhlíku po 144 hodinách s následujícím postupným mírným klesáním koncentrace DOC až na hodnoty okolo 100 mg/l, kde už dochází k minimálním změnám a koncentrace DOC se stává pomalu konstantní. V tomto momentě tak mohl být pokus ukončen. Lze tedy předpokládat, že k rozložení CAPB došlo v časovém úseku 96 až 192 hodin testované degradace. V případě kultury F1M docházelo k největšímu rozkladu CAPB po 48 hodinách, kdy se pak v nastávajících dalších hodinách



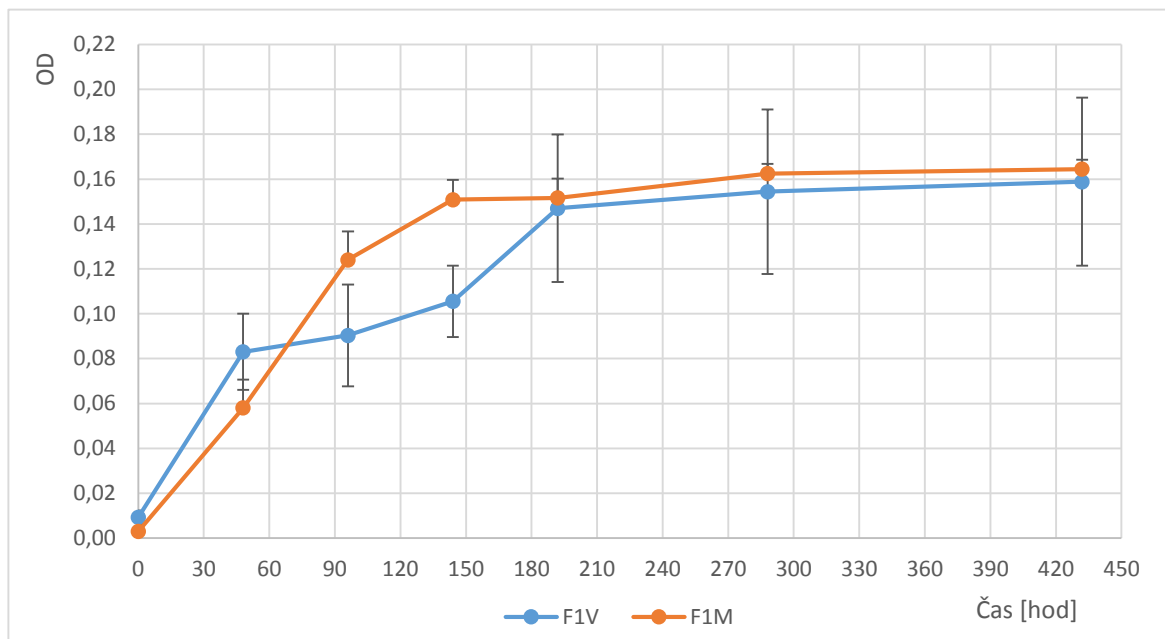
projevovala obdobně jako první kultura bez jakýchkoliv značných změn v koncentraci DOC. Degradace CAPB je tedy postupná.



Obr. 13. Závislost koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami F1V a F1M.

Tab. 5. Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace testované látky CAPB kulturami F1V a F1M.

Čas [hod]		0	48	96	144	192	288	432
Kultura	Měření	OD						
F1V	1	0,0062	0,075	0,076	0,101	0,1192	0,1242	0,1298
F1V	2	0,0121	0,1025	0,1165	0,1233	0,1834	0,1952	0,2011
F1V	3	0,0096	0,0716	0,0786	0,0925	0,1385	0,1439	0,1457
<b>OD<sub>θ</sub></b>		<b>0,01</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,11</b>	<b>0,15</b>	<b>0,15</b>	<b>0,16</b>
<b>σ</b>		0,003	0,017	0,023	0,016	0,033	0,037	0,037
F1M	4	0,0036	0,0628	0,1094	0,1511	0,1516	0,1601	0,1617
F1M	5	0,0017	0,0438	0,132	0,1595	0,1603	0,1674	0,1693
F1M	6	0,0038	0,0677	0,1307	0,142	0,1431	0,1599	0,1625
<b>OD<sub>θ</sub></b>		<b>0,003</b>	<b>0,058</b>	<b>0,124</b>	<b>0,151</b>	<b>0,152</b>	<b>0,16</b>	<b>0,165</b>
<b>σ</b>		0,001	0,013	0,013	0,009	0,009	0,004	0,004

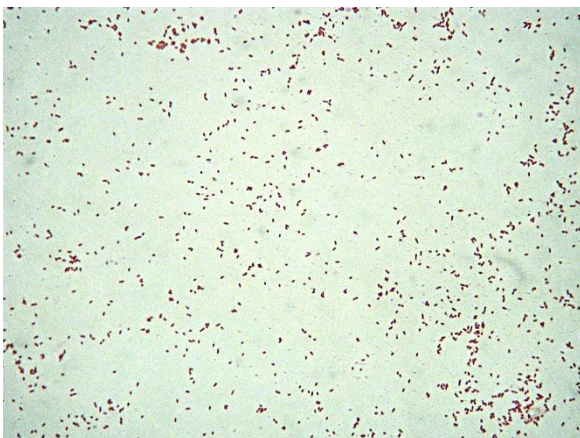


Obr. 14. Závislost OD na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami F1V a F1M.

Zjištěnými hodnotami optické density došlo k potvrzení využívání CAPB oběma kulturami, neboť byl zaznamenán nárůst OD, daný množením buněk. Navýšení biomasy má totiž přímou spojitost s růstem bakterií a degradací substrátu. Nejzřetelnější navýšení hustoty buněk bakterií u kultury F1V nastává po 144 hodinách a u F1M je tomu tak v čase 48 hodin. Rychlost rozkladu CAPB vztahovaná na čas je tedy nakonec u obou kultur bakterií stejná, protože dochází k rozkladu po 196 hodinách. Rozdílné jsou ale svým počátkem a průběhem celé degradace.

### 8.3.4 Základní identifikace kultur F1V a F1M

Nejprve bylo provedeno Gramovo barvení, kdy byla poté kultura F1V identifikována skrze mikroskop Olympus CX41 jako gramnegativní s tvarem zaoblených tyčinek (Obr. 15). Obdobně tomu bylo u kultury F1M, u níž byly pouze tyčinky kratší (Obr. 16). KOH testem se gramnegativita obou kultur jen potvrdila.



Obr. 15. Kultura F1V



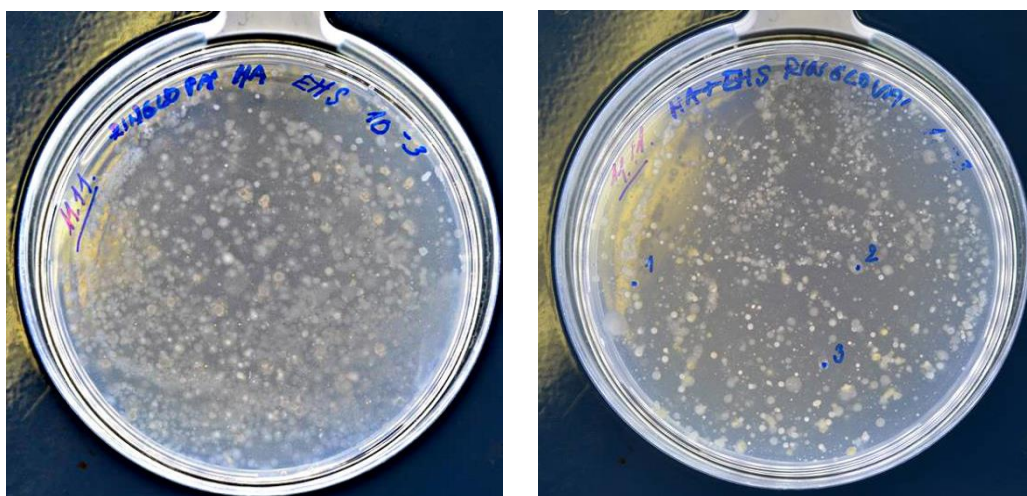
Obr. 16. Kultura F1M

## 8.4 Bakterie degradující EHS

Žádanými výsledky práce s degradéry EHS bylo provést jejich úspěšnou izolaci z kalové suspenze, v níž proběhla degradace s EHS, dále základní rozřazení na grampozitivní či gramnegativní bakterie a také zjistit jestli kultury těchto bakterií rozkládají a využívají pro svůj růst obě části struktury EHS (tedy salicylan i 2-ethylhexanol).

### 8.4.1 Izolace čistých kultur bakterií z kalové suspenze s EHS

Živné agary byly zaočkovány kalovou suspenzí s EHS, nepodrobenou před zahájením degradace působení ultrazvuku, obsahující jeden následný přírůstek EHS v koncentraci 200 mg/l. Celková izolace bakterií byla uskutečněna jako u ostatních suspenzí se sledovanými látkami, přičemž kolonie bakterií degradujících EHS rostly poměrně pomalu, cca 3 týdny. Jako jediný ze všech testů izolace bakterií na pevná živná média bez pomnožení v MM proběhl úspěšně. Byl totiž zpozorován viditelný rozdíl mezi nárůstem kultur na MA a MA+EHS, kdy z agarů, obohaceného EHS, byly následně izolovány 4 kultury bakterií (Obr. 17).



Obr. 87. Fotografie prokazující viditelný rozdíl mezi nárůstem kolonií na MA a PHE. Zatím bez přítomnosti 4 kolonie EHS, která vyrostla o 4 dny později.

### 8.4.2 Potvrzení schopnosti růstu jednotlivých kultur bakterií s využitím EHS

Připravené inkubační lahvičky s minerálním médiem a EHS byly naočkovány individuálními kulturami, přičemž růst kultur byl porovnáván s lahvičkami ničím neočkovanými. Pouze u jedné z lahviček kultury EHS1 nedošlo ke vzniku žádného zákalu a tak nebyl rozklad EHS touto bakterií tímto testem dokázán. Ostatní kultury s růstem potvrzeným záka-

lem byly úspěšně z lahviček přeočkovány na universální agary, které byly porovnány s živnými agary naočkovány izolovanými bakteriemi přímo z kalové suspenze. Prověření růstu kultur na EHS jako jediném zdroji uhlíku a energie nebylo sledováno prostřednictvím koncentrací DOC z důvodu nerozpustnosti EHS ve vodě. Toto potvrzení však mohlo být provedeno sledováním růstu buněk projevující se zvyšující hodnotou OD.

#### 8.4.3 Růst izolovaných kultur EHS na EH a SALNa

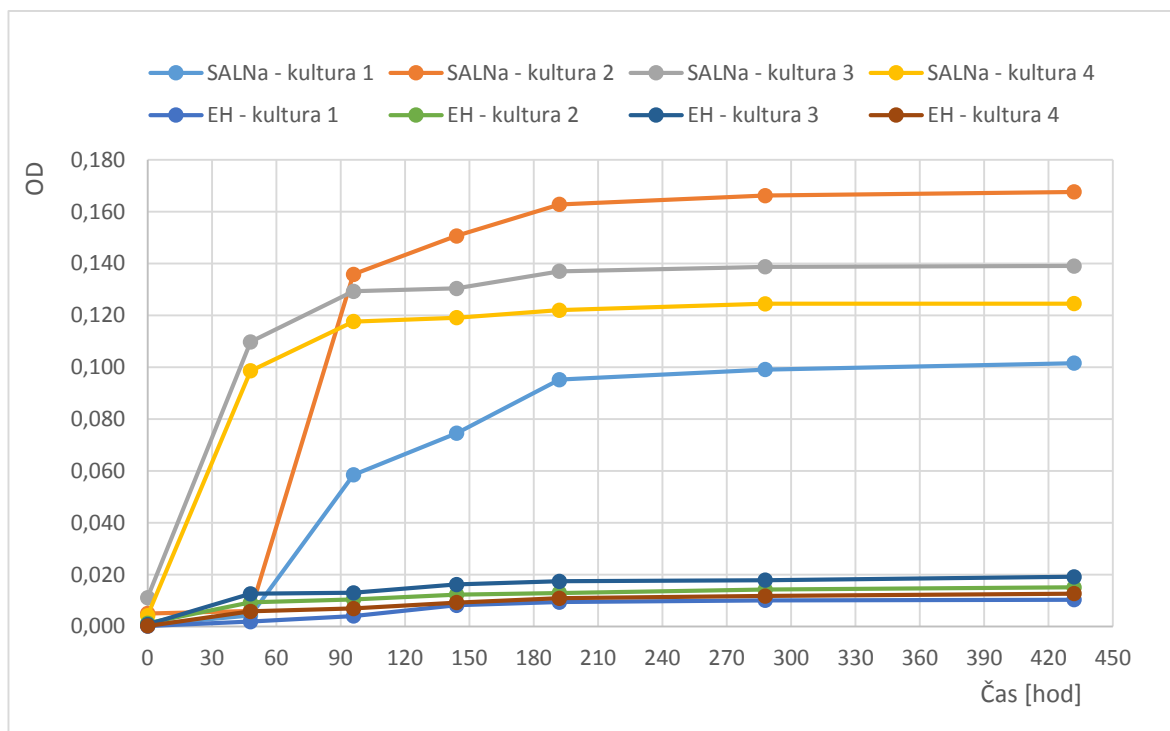
Cílem této zkoušky bylo zjistit pomocí OD, zdali izolované kultury EHS rozkládají úplně (čili využívají pro svůj růst obě části EHS), nebo zda využívají jen jednu z dvou odlišných strukturních částí – SALNa a EH. Úplná získaná data týkající se růstu na SALNa jsou vypsaná v Tabulce 7 a v případě EH v Tabulce 8, která byla všechna spojena v závislosti na čase na Obrázku 18, v němž jde jasně vidět mikrobiální růst v přítomnosti SALNa a nepřítomnost růstu v přítomnosti EH. Z důvodu přehlednosti grafu nebyly v tomto případě uvedeny chybové úsečky.

Tab. 6. Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace SALNa kulturami degradujícími EHS.

Čas [hod]		0	48	96	144	192	288	432
Kultura	Měření	OD						
EHS1	1	0,0002	0,0012	0,1116	0,1133	0,1165	0,1176	0,1176
EHS1	2	0,001	0,0073	0,0053	0,0357	0,0739	0,0805	0,0855
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	<b>0,058</b>	<b>0,075</b>	<b>0,095</b>	<b>0,099</b>	<b>0,102</b>
<b>σ</b>		0,001	0,004	0,075	0,055	0,030	0,026	0,023
EHS2	1	0,0015	0,0045	0,178	0,18	0,1801	0,1824	0,183
EHS2	2	0,0084	0,0074	0,0936	0,1212	0,1455	0,1499	0,1522
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,005</b>	<b>0,006</b>	<b>0,136</b>	<b>0,151</b>	<b>0,163</b>	<b>0,166</b>	<b>0,168</b>
<b>σ</b>		0,005	0,002	0,060	0,042	0,024	0,023	0,022
EHS3	1	0,0124	0,0993	0,1183	0,1202	0,1329	0,1355	0,136
EHS3	2	0,0098	0,1202	0,1402	0,1405	0,141	0,1419	0,142
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,011</b>	<b>0,110</b>	<b>0,129</b>	<b>0,130</b>	<b>0,137</b>	<b>0,139</b>	<b>0,139</b>
<b>σ</b>		0,002	0,015	0,015	0,014	0,006	0,005	0,004
EHS4	1	0,0055	0,0899	0,1226	0,1248	0,1266	0,1282	0,1282
EHS4	2	0,0028	0,1072	0,1126	0,1133	0,1173	0,1207	0,1208
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,004</b>	<b>0,099</b>	<b>0,118</b>	<b>0,119</b>	<b>0,122</b>	<b>0,124</b>	<b>0,125</b>
<b>σ</b>		0,002	0,012	0,007	0,008	0,007	0,005	0,005

Tab. 7. Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace EH kulturami degradujícími EHS.

Čas [hod]		0	48	96	144	192	288	432
Kultura	Měření	OD						
EHS1	1	0,0001	0,0019	0,0054	0,0092	0,0101	0,0102	0,0105
EHS1	2	0,0001	0,0018	0,0026	0,0071	0,0086	0,0099	0,0101
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>	<b>0,008</b>	<b>0,009</b>	<b>0,010</b>	<b>0,010</b>
<b>σ</b>		0,000	0,000	0,002	0,001	0,001	0,000	0,000
EHS2	1	0,00025	0,007	0,0076	0,0099	0,0105	0,0125	0,0133
EHS2	2	0,0021	0,0115	0,0132	0,0146	0,0152	0,0158	0,0168
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,010</b>	<b>0,012</b>	<b>0,013</b>	<b>0,014</b>	<b>0,015</b>
<b>σ</b>		0,001	0,003	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002
EHS3	1	0,0012	0,0082	0,0108	0,0135	0,0147	0,0155	0,0175
EHS3	2	0,0002	0,0169	0,0151	0,0188	0,0201	0,0201	0,0207
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,001</b>	<b>0,013</b>	<b>0,013</b>	<b>0,016</b>	<b>0,017</b>	<b>0,018</b>	<b>0,019</b>
<b>σ</b>		0,001	0,006	0,003	0,004	0,004	0,003	0,002
EHS4	1	0,0001	0,0032	0,0042	0,0079	0,0094	0,01	0,0111
EHS4	2	0,0002	0,0083	0,0096	0,0104	0,0123	0,0134	0,0142
<b>OD<sub>0</sub></b>		<b>0,000</b>	<b>0,006</b>	<b>0,007</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>	<b>0,012</b>	<b>0,013</b>
<b>σ</b>		0,000	0,004	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002



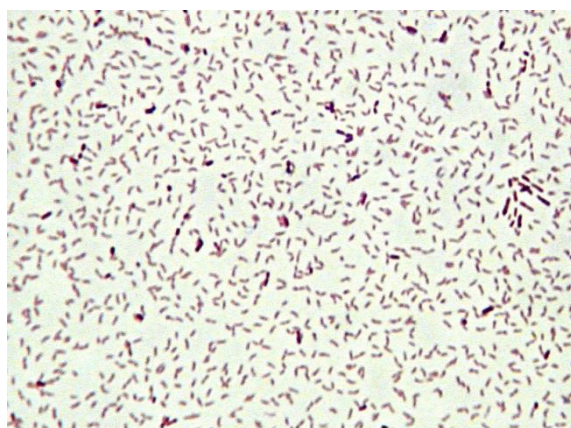
Obr. 18. Závislost OD na době trvání pokusu degradace SALNa a EH kulturami EHS.

#### 8.4.4 Základní identifikace kultur degradující EHS

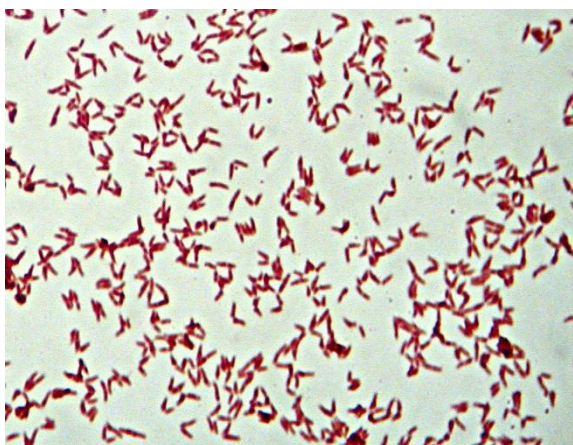
Gramovým barvením byla kultura EHS1 (Obr. 19) vyhodnocena jako gramvariabilní, s mírně ohnutými zaoblenými tyčinkami. Kultury EHS2 (Obr. 20) a EHS3 (Obr. 21) byly gramnegativní, středně velké tyčinky a v případě EHS3 kyjovitého tvaru, často viděné po dvou. Poslední kultura EHS4 (Obr. 22) byla definována jako grampozitivní, rovněž ve tvaru tyčinek. KOH testem byla nakonec potvrzena veškerá provedená zařazení, kdy i bakterie EHS1 byla potvrzena jako gramnegativní.



*Obr. 19. Kultura EHS1*



*Obr. 20. Kultura EHS2*



*Obr. 21. Kultura EHS3*



*Obr. 22. Kultura EHS4*

Všechny kultury výše uvedené byly rovněž zakonzervovány v glycerolu při  $-80^{\circ}\text{C}$ , pro pozdější podrobná mikrobiologická studia v rámci navazujících DP.

## ZÁVĚR

Po provedení veškerých testů a vyhodnocení dat je možné vyslovit určité závěry. Respirometr Micro-Oxymax, analyzující biologickou rozložitelnost látek prostřednictvím biochemické spotřeby kyslíku a produkce oxidu uhličitého, poskytl základní data a výstupy k vyhodnocení rozložitelnosti námi vybraných látek. Phenoxyethanol (PHE), cocoamidopropyl betaine (CAPB) i ethylhexyl salicylát (EHS) se jeví jako biologicky rozložitelné, s hodnotami rozložitelnosti  $D_{TSK}$  pro PHE 63,00 %, CAPB 48,81 %, EHS 52,10 % a EHS UZ 53,95 %. Jinak tomu ale bylo u cyclotetrasiloxanu (D4), u kterého ani po 6 týdnech nedošlo k žádné změně, což je dokumentováno zápornými hodnotami z respirometru. Není tedy biologicky odbouratelný. Z produkce oxidu uhličitého vzešly stejné výsledky jen s o něco vyššími hodnotami (PHE 82,27 %, CAPB 66,96 %, EHS 71,28 %, EHS UZ 80,22 %). Výše zmíněné výsledky byly stvrzeny dalšími testy, zejména stanovení obsahu sušiny suspenze aktivovaného kalu před a po provedení testu nebo také určením procenta odstranění substrátu podle úbytku rozpuštěného organického uhlíku u látek rozpustných ve vodě (PHE 99,35 %, CAPB 97,05 %).

V mikrobiologické části této práce byla prováděna izolace degradérů testovaných látek s jejich následným ověřením růstu v tekutém živném médiu s příslušnou látkou. Separace bakterií z kalové suspenze byla provedena u všech suspenzí s výjimkou D4, neboť u této látky nedošlo k žádané biodegradaci. Z kalové suspenze s PHE se podařilo izolovat dvě kultury bakterií (P1V, P1M) avšak jejich růst v tekutém médiu s PHE byl neúspěšný, pravděpodobně kvůli nutné přítomnosti další bakterie (P1P), která jim umožňuje rozklad PHE. Čisté kultury degradérů PHE se tedy nepodařilo získat a tak byla zakonzervována směsná suspenze se všemi přítomnými kulturami MO. V případě CAPB se podařilo získat dvě čisté kultury bakterií (F1V, F1M), identifikované jako gramnegativní, u nichž byla prokázána degradační schopnost CAPB poklesem koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v minerálním médiu s CAPB, kdy kultura F1V snížila tuto hodnotu z 266,3 mg/l na 101,2 mg/l, tedy o něco výrazněji než kultura F1M, která dokázala snížit 253,6 mg/l na 87,56 mg/l. Pravidelnějším měřením hodnot DOC a OD byla získána přesnější představa o pozvolném průběhu degradace CAPB. Jediný úspěšný test na pevných živných médiích, bez nutného pomnožení kultur bakterií v minerálním médiu, byl uskutečněn u kalové suspenze s EHS, kde byl viděn zřetelný rozdíl mezi nárůstem kultur na minerálním agaru a agaru s EHS. Z obohaceného agaru byly poté izolovány čtyři kultury, přičemž tři z nich byly

gramnegativní (EHS2, EHS3 a EHS4) a čtvrtá grampozitivní (EHS1). Růst kultur za využití EHS byl potvrzen vznikem zákalu u třech z nich, zatímco kulturou EHS1 nebyl rozklad této látky prokázán. Z dalších pokusů vyplynulo, že tyto tři kultury využívaly z EHS jen strukturní část odpovídající salicylanu, zatímco 2-ethylhexanol nebyly schopné využít. 2-ethylhexanol tak pravděpodobně může zůstat ve vodném prostředí.

Na závěr celé práce byly všechny kultury bakterií zamražením konzervovány za účelem budoucího studia.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] MERTA, Pavel. *Základy biotechnologií*. 1.vyd. Ostrava: VŠB-Technická univerzita, 1994, 156 s. ISBN 80-7078-224-2.
- [2] ŠIFNER, František. *Vybrané kapitoly z biotechnologií pro studující učitelství biologie a ekologické výchovy*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 145 s. ISBN 80-7184-731-3.
- [3] HARZEVILI FARSHAD, Darvishi a Chen HONGZHANG. *Microbial Biotechnology: Progress and Trends*. CRC Press, 2014. ISBN ISBN-13: 978-1482245202.
- [4] FOLTA, Jaroslav. *Vývoj biotechnologie a průmyslové chemie*. Praha: Společnost pro dějiny věd a techniky, 2006, 144 s. ISBN 80-7037-156-0.
- [5] PATNAIK, Bhabendra Kumar [et]. 2012. *Textbook of biotechnology* [online]. New Delhi: Tata McGraw Hill Education [cit. 2015-05-17]. ISBN 978-007-1070-072.
- [6] RŮŽIČKA, Jan. *Mikrobiologie pro technology životního prostředí*. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 1999, 124 s. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-214-1374-3.
- [7] ŠUTA, Miroslav. *Biotechnologie, životní prostředí a udržitelný rozvoj*. Praha: Společnost pro trvale udržitelný život, 2007, 27 s. ISBN 978-80-902635-1-2.
- [8] ŠTULÍK, Václav. *Biotechnologie v praxi*. 1.vyd. Praha: Ústředí vědeckých, technických a ekonomických informací, 1991, 190 s. ISBN 80-212-0045-6.
- [9] *Monitoring temporal trends of air pollution in an urban area using mosses and lichens as biomonitors* [online]. 2014 [cit. 2015-05-18]. Dostupné z: [http://ac.els-cdn.com/S0045653514002392/1-s2.0-S0045653514002392-main.pdf?\\_tid=2c28562e-fd07-11e4-b408-00000aab0f6c&acdnat=1431916977\\_f32f355bba072d98c464f974d1ea030e](http://ac.els-cdn.com/S0045653514002392/1-s2.0-S0045653514002392-main.pdf?_tid=2c28562e-fd07-11e4-b408-00000aab0f6c&acdnat=1431916977_f32f355bba072d98c464f974d1ea030e).
- [10] HORÁK, Petr. *Mechanismy biodegradací kontaminantů a bioasanační techniky*. Vyd. 1. Ústí nad Labem: Fakulta životního prostředí UJEP, 2006, 201 s. ISBN 80-7044-814-8.
- [11] NOVOTNÝ, Čeněk. *Biodegradace a biotechnologie*. Vyd. 1. Ostrava: Ostravská univerzita, 2005, 96 s. ISBN 80-7368-096-3.

- [12] SAINI, Dr. B.L. *Introduction to Biotechnology* [online]. Laxmi Publications, 2010. 186s. ISBN 978-93-80386-82-9.
- [13] VÍTĚZ, Tomáš a Bořivoj GRODA. *Čištění a čistírny odpadních vod*. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2008, 126 s. ISBN 978-80-7375-180-7.
- [14] GREY, N.F. *Water Technology: An Introduction for Environmental Scientists and Engineers* [online]. Elsevier Ltd, 2010, s. 403-424 [cit. 2015-05-17].
- [15] MALÝ, Josef a Jitka MALÁ. *Chemie a technologie vody*. 2., dopl. vyd. Brno: ARDEC, c2006, xii, 331 s. ISBN 80-86020-50-9.
- [16] KUPEC, Jan. *Zpracování odpadních vod a čistírenských kalů*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2002, 123 s. ISBN 80-7318-058-8.
- [17] Dohányos M., Koller J., Strnadová N.: *Čištění odpadních vod*. VŠCHT Praha 1998.
- [18] MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ. [online]. 2014 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3405](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3405).
- [19] *Odpadní vody (původ, zpracování a analýza)* [online]. Pardubice, 2012 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/47590/2/BartosovaL\\_Odpadni%20vody\\_KV\\_2012.pdf](http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/47590/2/BartosovaL_Odpadni%20vody_KV_2012.pdf). Bakalářská práce.
- [20] MALÝ, Josef. 1996. *Chemie a technologie vody*. 1. vyd. Brno: Noel 2000, 197 s. ISBN 80-860-2013-4.
- [21] BINDZAR, Jan. 2009. *Základy úpravy a čištění vod* [online]. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 251 s. [cit. 2015-05-17]. ISBN 978-80-7080-729-3. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid\\_isbn-978-80-7080-729-3/](http://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/uid_isbn-978-80-7080-729-3/).
- [22] GRAY, N. *Water technology: an introduction for environmental scientists and engineers* [online]. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2010 [cit. 2015-05-17]. ISBN 978-1-85617-705-4.
- [23] SÁKRA, Tomáš a Vojtěch DIRNER. *Ochrana vod* [online]. Technická Univerzita Ostrava [cit. 2015-05-17].
- [24] *Typy znečištění vod* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/uchop/velebudice/voda/COV/ochranavod.pdf>

- [25] HORÁKOVÁ, Dana. *Bioremediace*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2000, 71 s. ISBN 80-7080-416-5.
- [26] SAHA, Nabanita. 2006. *Biodegradation of organic polymeric material: Biodegradation of organic polymers : habilitation thesis summary* [online]. In Zlín: Tomas Bata University, 36 s. [cit. 2015-05-17]. ISBN 80-731-8435-4.
- [27] POLZEROVÁ, Eva. *Analytika povrchově aktivních látek používaných v kosmetice* [online]. Zlín, 2012 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/23308/polzerov%C3%A1\\_2012\\_bp.pdf?sequence=1%20str.12](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/23308/polzerov%C3%A1_2012_bp.pdf?sequence=1%20str.12). Bakalářská práce.
- [28] Phenoxyethanol. In: *Epitesty.cz* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/pasports/P%20025.pdf>
- [29] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. 2009. In: *Úřední věstník Evropské Unie*.
- [30] *YMDB* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01591>
- [31] 2-phenoxyethanol. In: *ChemSynthesis* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: *YMDB* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.ymdb.ca/compounds/YMDB01591>.
- [32] A New Concept to Boost the Preservative Efficacy of Phenoxyethanol. 2005. *International Journal for Applied Science* [online]. (11) [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://microsites.schuelke.com/preservative-booster/documents/ANewConcepttoBoostthePreservativeEfficacyofPhenoxyethanol-SFW-2005.pdf>
- [33] HOWARD, Philip H. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals* [online]. CRC Press, 1993 [cit. 2015-05-17]. ISBN 087371413X. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=HdhohbQrg8IC&dq=handbook+of+environmental+fate+and+exposure+data+for+organic+chemicals+phenoxyethanol&hl=cs&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.cz/books?id=HdhohbQrg8IC&dq=handbook+of+environmental+fate+and+exposure+data+for+organic+chemicals+phenoxyethanol&hl=cs&source=gbs_navlinks_s)

- [34] Phenoxyethanol-induced urticaria. 2001. In: *Allergy* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1398-9995.2001.00218.x/full>
- [35] *Toxicology Data Network* [online]. [cit. 2015-05-1]. Dostupné z: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+5595>.
- [36] Contact allergy from phenoxyethanol in Fitostimoline gauzes. 2005. *Contact Dermatitis* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16191031>
- [37] ALLERGEAZE. NA50: *Methyldibromo glutaronitrile/phenoxyethanol*. Dostupné také z: <http://www.allergeaze.com/PDFs/NA/NA50.PDF>.
- [38] MACHOVCOVÁ, MUDR. Alena. *SKRYTÉ A NEOČEKÁVANÉ ALERGENY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH* [online]. 2007, : 9 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/be2becadf089a8abd6bf3e2ddc3692d5.pdf>
- [39] Opinion on Methyldibromoglutaronitrile. 2006. *SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS* [online]. (8) [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/health/archive/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_060.pdf](http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_060.pdf)
- [40] *Methyldibromo glutaronitrile (MDBGN)* [online]. 2009. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://www.nicnas.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/4934/Methyldibromo\\_Glutaronitrile\\_PDF.pdf](http://www.nicnas.gov.au/__data/assets/pdf_file/0020/4934/Methyldibromo_Glutaronitrile_PDF.pdf)
- [41] Viacheminc [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.viacheminc.com/wp-content/uploads/Tech-Data-Sheets-Protectol-PE-PE-S.pdf>
- [42] *Ethylene Glycol Phenyl Ether*. 2007. The Dow Chemical Company. Dostupné také z: [http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh\\_00d2/0901b803800d29f2.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00323.pdf](http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_00d2/0901b803800d29f2.pdf?filepath=productsafety/pdfs/noreg/233-00323.pdf)
- [43] MYERS, D. *Surfactant science and technology*. 3. vydání. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006. ISBN 13978-0-471-68024-6.

- [44] ŠMIDRKAL, Jan. *TENZIDY A DETERGENTY DNES* [online]. 1999, : 421-427 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_07\\_421-427.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_07_421-427.pdf)
- [45] Netíková, Jaroslava. Studium chování lauroyl sarkosinátu sodného v roztocích [online]. Zlín, 2014 [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/28925/net%C3%ADkov%C3%A1\\_2014\\_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y%20str.%2015](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/28925/net%C3%ADkov%C3%A1_2014_dp.pdf?sequence=1&isAllowed=y%20str.%2015). Diplomová práce.
- [46] Kemi sweden [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://apps.kemi.se/flodessok/floden/kemamne\\_eng/kokosamidopropylbetain\\_eng.htm](http://apps.kemi.se/flodessok/floden/kemamne_eng/kokosamidopropylbetain_eng.htm)
- [47] *1-Dodecanaminium, N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-N,N-dimethyl-, inner salt (INCI: Lauryl hydroxysultaine)*. 2011. NATIONAL INDUSTRIAL CHEMICALS NOTIFICATION AND ASSESSMENT SCHEME.
- [48] *HODNOCENÍ OBSAHU TENZIDU VE VODÁCH* [online]. 2009. Brno [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=17162](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=17162). Bakalářská práce.
- [49] *Draft Final Amended Report on Cocamidopropyl Betaine and Related Amidopropyl Betaines*. 2010. Dostupné také z: [http://www.cir-safety.org/sites/default/files/117\\_final\\_capb.pdf](http://www.cir-safety.org/sites/default/files/117_final_capb.pdf)
- [50] Surfactants and Surfactant Systems for Natural and Organic Cosmetics. 2012. *COSMETICS NATURAL COSMETICS* [online]. (1/2) [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://personal-care.basf.com/docs/press\\_center/sowf\\_tensidsys\\_e?sfvrsn=0](http://personal-care.basf.com/docs/press_center/sowf_tensidsys_e?sfvrsn=0)
- [51] *Studium chování lauroyl sarkosinátu sodného v roztocích* [online]. 2014. Zlín [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/28925/net%C3%ADkov%C3%A1\\_2014\\_dp.pdf?sequence=1](https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/28925/net%C3%ADkov%C3%A1_2014_dp.pdf?sequence=1).
- [52] *Organic Pollutants in the Water Cycle: Properties, Occurrence, Analysis and Environmental Relevance of Polar Compounds* [online]. 2006. [cit. 2015-05-17]. ISBN 9783527608638. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=WElqapDkOEAC>.

- [53] *JEESCREEN OS USP*. 2014. USA. Dostupné také z: <http://www.jeen.com/technical/SPEC30-OCSA.pdf>.
- [54] 2-ethylhexyl salicylate. *ALSEnviromental* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: [http://www.caslab.com/2-ethylhexyl\\_salicylate\\_CAS\\_118-60-5/](http://www.caslab.com/2-ethylhexyl_salicylate_CAS_118-60-5/).
- [55] ETHYLHEXYL SALICYLATE. *Epitesty* [online]. [cit. 2015-05-18]. Dostupné z: <http://www.epitesty.cz/pasports/O%20007%20A.pdf>.
- [56] *Environmental Risk Assessment Report: Octamethylcyclotetrasiloxane* [online]. 2009. [cit. 2015-05-17].
- [57] DOW CORNING. *Octamethylcyclotetrasiloxane*. Dostupné také z: [https://www.dowcorning.com.cn/zh\\_CN/content/about/aboutehs/EHSPortalFiles/GPS\\_Safety\\_Report\\_556-67-2\\_D4.pdf](https://www.dowcorning.com.cn/zh_CN/content/about/aboutehs/EHSPortalFiles/GPS_Safety_Report_556-67-2_D4.pdf)
- [58] SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS. 2005. *Octamethylcyclotetrasiloxane (D4)*.
- [59] MEMORANDUM [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <http://www.arb.ca.gov/toxics/dryclean/oehhad5review.pdf>
- [60] Octamethylcyclotetrasiloxane. *Enviroment Canada* [online]. [cit. 2015-05-17]. Dostupné z: <https://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang=En>
- [61] Columbus Instruments: Respirometer: Micro-Oxymax [online]. [cit. 2008-01-13]. Dostupný z WWW: <http://www.colinst.com/brief.php?id=45>
- [62] DŘÍMAL, P. a J. HOFFMAN. 2008. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy*. (102): 139-147.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MO	Mikroorganismus
OV	Odpadní voda
EU	Evropská Unie
ČR	Česká republika
INCI	Mezinárodní nomenklatura kosmetických přísad
INN	International Nonproprietary Name
CNS	Centrální nervová soustava
MDBGN	Methyldibromoglutaronitril
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
CAPB	Cocamidopropyl betaine
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EHS	Ethylhexyl salicylate
UV	Ultrafialové záření
D4	Cyclotetrasiloxane
D5	Decamethylcyclopentasiloxane
D6	Decamethylcyclohexasiloxane
BS	Benzoan sodný
ZRS	Zásobní roztok solí
FP	Fosfátový pufr o pH 7,2
RSP	Roztok stopových prvků
BM	Biomédium
ZRBS	Zásobní roztok benzoanu sodného
ZRPHE + BM	Zásobní roztok phenoxyethanolu v biomédium
ZRCAPB + BM	Zásobní roztok cocamidopropyl betainu v biomédium

---

MA	Minerální agar
ZRPHE + MA	Zásobní roztok phenoxyethanolu přidávaný k minerálnímu agaru
ZRCAPB + MA	Zásobní roztok cocamidopropyl betainu I. přidávaný k miner. agaru
ZRCAPB	Zásobní roztok cocamidopropyl betainu II.
ZRSALNa	10% zásobní roztok salicylanu sodného
FR	Fyziologický roztok
MA + PHE	Minerální agar s henoxxyethanolem
MA + CAPB	Minerální agar s cocamidopropyl betainem
MA + EHS	Minerální agar s ethylhexyl salicylate
MM	Minerální médium
MM + PHE	Minerální médium s phenoxyethanolem
TYA	Tryptone yeast agar
R2A	R2A agar



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.	<i>Základní obory v biotechnologii a jejich propojení [4, s. 4]</i> .....	14
Obr. 2.	<i>Průměrná roční produkce OV [18]</i> .....	18
Obr. 3.	<i>Znázornění trojstupňové čistírny odpadních vod [24]</i> .....	21
Obr. 4.	<i>Chemická struktura 2-phenoxyethanolu [31]</i> .....	26
Obr. 5.	<i>Chemická struktura Cocamidopropyl Betainu [44].</i> ....	29
Obr. 6.	<i>Chemická struktura Ethylhexyl Salicylate [55].</i> .....	31
Obr. 7.	<i>Chemická struktura Cyclotetrasiloxanu [56]</i> .....	32
Obr. 8.	<i>Ilustrační fotografie uspořádání respirometru Micro-Oxymax sestávající z detektoru O<sub>2</sub>, detektoru CO<sub>2</sub>, čerpací řídicí jednotky (vlevo shora) a dvouventilových řídicích jednotek s možností připojení 20 měřících pozic (vpravo)</i> .....	46
Obr. 9.	<i>Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti substrátové biochemické spotřeby kyslíku na době měření.</i> .....	57
Obr. 10.	<i>Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti procenta biologického rozkladu substrátu na době měření z naměřených hodnot spotřeby kyslíku.</i> .....	57
Obr. 11.	<i>Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti substrátové biochemické produkce oxidu uhličitého na době měření</i> .....	60
Obr. 12.	<i>Průběh biologického rozkladu substrátů za přítomnosti aktivovaného kalu z pohledu závislosti procenta biologického rozkladu substrátu na době měření získaného z naměřených hodnot produkce oxidu uhličitého.</i> .....	60
Obr. 13.	<i>Závislost koncentrace DOC na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami FIV a FIM</i> .....	65
Obr. 14.	<i>Závislost OD na době trvání pokusu degradace CAPB kulturami FIV a FIM</i> .....	65
Obr. 15.	<i>Kultura FIV</i> .....	66
Obr. 16.	<i>Kultura FIM</i> .....	66
Obr. 17.	<i>Fotografie prokazující viditelný rozdíl mezi nárůstem kolonií na MA a PHE. Zatím bez přítomnosti 4 kolonie EHS, která vyrostla o 4 dny později.</i> .....	67
Obr. 18.	<i>Závislost OD na době trvání pokusu degradace SALNa a EH kulturami EHS</i> .....	69

---

Obr. 19. <i>Kultura EHS1</i> .....	70
Obr. 20. <i>Kultura EHS2</i> .....	70
Obr. 21. <i>Kultura EHS3</i> .....	70
Obr. 22. <i>Kultura EHS4</i> .....	70

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. <i>Veškeré naměřené hodnoty pH, obsahu sušiny kalu, rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a odstranitelnosti (<math>D_{DOC}</math>) u všech testovaných látek. ....</i>	55
Tab. 2. <i>Data získaná z obou sérií měření vztahená na spotřebu kyslíku získanou analýzou biodegradability látek systémem Micro-Oxymax. ....</i>	56
Tab. 3. <i>Data získaná z obou sérií měření vztahená na produkci oxidu uhličitého získanou analýzou biodegradability látek systémem Micro-Oxymax. ....</i>	59
Tab. 4. <i>Hodnoty DOC naměřené před a po provedení pokusu degradace PACB izolovanými kulturami. ....</i>	63
Tab. 5. <i>Hodnoty rozpuštěného organického uhlíku v průběhu pokusu degradace testované látky CAPB kulturami FIV a FIM. ....</i>	64
Tab. 6. <i>Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace testované látky CAPB kulturami FIV a FIM. ....</i>	65
Tab. 7. <i>Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace SALNa kulturami degradujícími EHS. ....</i>	68
Tab. 8. <i>Hodnoty optické density v průběhu pokusu degradace EH kulturami degradujícími EHS. ....</i>	69