

# **Sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethyl- hexylsalicylanu v povrchových vodách**

Alena Proislová

---

Bakalářská práce  
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Alena Proislová**  
Osobní číslo: **T15657**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu v povrchových vodách**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte odběr vzorků povrchové vody a stanovte v ní počet psychrofilních bakterií kultivační metodou.
2. V odebraných vzorcích proveďte testy biodegradace 2-ethylhexylsalicylanu.
3. Pokuste se získat bakteriální kultury zodpovědné za případný rozklad.
4. Získané výsledky zpracujte přehlednou formou a práci odevzdejte v řádném termínu v tištěné i elektronické podobě.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Literatura zaměřená na vlastnosti 2-ethylhexylsalicylanu a jeho použití. Předcházející Bc. práce vypracované na ÚIOŽP v letech 2012 až 2015.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

**2. února 2016**

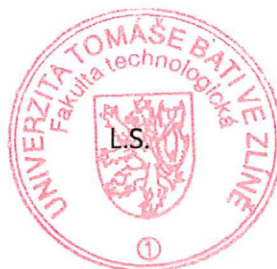
Termín odevzdání bakalářské práce:

**20. května 2016**

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....PROISLOVÁ ALENA.....

Obor: .....IOŽP.....

## 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 .....19.5.2016.....

.....Proislová.....

<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 nevýdělečně 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.

*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.*

*(1) 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 vzdělávacího zařízení (školní díla).*

<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 díla:

*(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-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**

Tato práce se zabývala mikrobiálním rozkladem 2-ethylhexylsalicylanu (EHS) bakteriemi vyskytujícími se přirozeně v říční vodě. EHS je látka antropogenního původu, životnímu prostředí nepřírozená, jejíž chování v životním prostředí není blíže prozkoumané. Práce navazovala na výsledky výzkumu, kterých bylo nedávno dosaženo na ÚIOŽP, ze kterých vyplývá, že bakterie z aktivovaného kalu čistíčky odpadních vod tuto sloučeninu rozkládají, ale využívají pouze salicylovou část molekuly. Experimenty rozkladu EHS v říční vodě v této práci ukázaly, že přítomné mikroorganismy jsou schopny využít EHS pro svůj růst a produkovat CO<sub>2</sub>. Bakterie podílející se na rozkladu byly následně získány v podobě čistých kultur a bylo také zjištěno, že některé rozkládají jen salicylovou část molekuly EHS, zatímco jen jediná byla schopna růst při využití 2-ethylhexanolu.

Klíčová slova: 2-Ethylhexylsalicylan, mikrobiální degradace, povrchové vody

## **ABSTRACT**

Subject of this thesis was the microbial decomposition of 2-ethylhexylsalicylate (EHS) by bacteria occurring naturally in river water. EHS is xenobiotic substance, whose behavior in the environment is not further explored. This work continued recent research performed by Department of Environmental Protection Engineering, where it appears that bacteria from activated sludge of wastewater treatment plant decomposed the compound. Nevertheless, these bacteria were able to use only the salicylate part of the molecule. Experiments with degradation of EHS in this work have shown that microorganisms occurring naturally in river water are able to use this substance for their growth and produce CO<sub>2</sub>. The bacteria involved in the degradation process were subsequently obtained in a form of pure cultures. It was also found that some of the cultures were able to decompose only the salicylate part of molecule and the only one of them was able to grow using 2-ethylhexanol as its substrate.

Keywords: 2-Ethylhexyl salicylate, microbial decomposition, river water

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Janovi Růžičkovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, cenné rady a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala Ing. Markétě Julinové, Ph.D., za pomoc při vyhodnocování výsledků. Rovněž děkuji mé rodině a blízkým přátelům za veškerou podporu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 2-ETHYLHEXYLSALICYLAN.....</b>	<b>11</b>
1.1 VLASTNOSTI .....	11
1.1.1 Fyzikální vlastnosti.....	11
1.1.2 Chemické vlastnosti.....	11
1.1.3 Použití.....	11
1.1.4 Toxikologie .....	12
Studie na zvířatech.....	12
Humánní studie.....	12
1.2 VÝSKYT V PŘÍRODĚ.....	12
1.2.1 Výskyt na rekreačních plážích u moře.....	13
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>14</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>15</b>
<b>3 METODIKA POKUSŮ.....</b>	<b>16</b>
3.1 SLEDOVÁNÍ MIKROBIÁLNÍHO ROZKLADU EHS V ŘÍČNÍ VODĚ .....	16
3.1.1 Použitá říční voda.....	16
3.1.2 Voda odtoku ČOV Zlín – Malenovice.....	16
3.1.3 Použité chemikálie.....	16
3.1.4 Použité významné laboratorní přístroje .....	16
3.1.5 Příprava a složení roztoků.....	17
3.1.6 Kultivační stanovení celkových počtů heterotrofních psychrofilních bakterií ve sledovaných vzorcích říční vody.....	18
3.1.7 Sledování mikrobiálního rozkladu EHS ve vzorku vody mikroskopicky a kultivačně .....	18
3.1.8 Izolace mikroorganismů podílejících se na rozkladu EHS .....	19
3.1.9 Růst kultur s využitím salicylanu sodného (SALNa) a 2-ethylhexanolu (EHOL) jako substrátů.....	19
3.1.10 Postup sledování rozkladu EHS v říční vodě respirometricky.....	20
3.1.11 Respirometr Oxymax.....	21
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>23</b>
4.1 VÝBĚR ŽIVNÉHO AGARU PRO KULTIVACI PSYCHROFILNÍCH VODNÍCH BAKTERIÍ.....	23
4.2 PRVNÍ POKUS SLEDOVÁNÍ ROZKLADU EHS V ŘÍČNÍ VODĚ .....	23
4.3 ZÍSKÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KULTUR ZE VZORKŮ ŘÍČNÍ VODY .....	27
4.4 ZKOUŠKY RŮSTU ZÍSKANÝCH KULTUR NA SALNA A EHOL .....	28
4.5 PODROBNĚJŠÍ POKUS ROZKLADU EHS V ŘÍČNÍ VODĚ .....	30
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>32</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>33</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>35</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>36</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>37</b>



## ÚVOD

Již v předchozích letech probíhal na Ústavu životního prostředí Fakulty technologické UTB výzkum biodegradace různých polutantů. 2-Ethylhexylsalicylan, jakožto složka obsažená v mnoha výrobcích s UV filtrem především v kosmetickém průmyslu, se do přírody lidskou činností dostává. EHS se po chemické stránce skládá z části obsahující kyselinu salicylovou a části obsahující 2-ethylhexanol. Doposud nebylo příliš zkoumáno, jaký má 2-ethylhexylsalicylan na životní prostředí dopad.

Tato práce se zabývá tím, je-li právě tento polutant v přírodě nějak rozkládán, a také jestli jsou biodegradovány jeho části, tedy kyselina salicylová a 2-ethylhexanol. Byly při tom využívány bakterie vyskytující se v říční vodě. Tímto se navazuje na dřívější výzkum na ÚIOŽP, který se zabýval rozkladem podobných polutantů pomocí bakterií vyskytujících se v aktivovaném kalu z ČOV.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 2-ETHYLHEXYLSALICYLAN

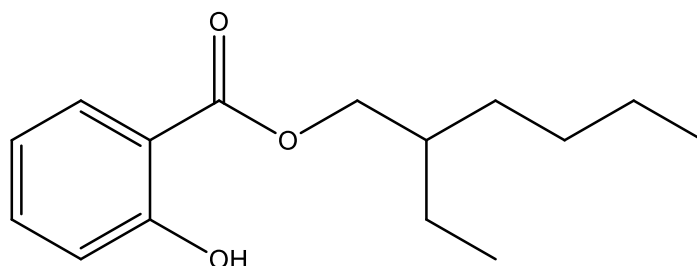
Jedná se o nažloutlou kapalinu mírného zápachu. Posledních několik desítek let je hojně využíván jako přísada do opalovacích krémů, vlasové kosmetiky, skel, atd.

### 1.1 Vlastnosti

#### 1.1.1 Fyzikální vlastnosti

Nažloutlá kapalina mírného zápachu. Schopná absorbovat záření o vlnové délce 100-250 nm, tedy oblast ultrafialového záření. [1]

#### 1.1.2 Chemické vlastnosti



Obrázek 1 – Struktura 2-Ethylhexylsalicylanu

2-Ethylhexyl-2-hydroxybenzoát neboli 2-ethylhexylsalicylan (EHS) je kapalina nerozpustná ve vodě, avšak dobře rozpustná v alkoholech a jiných organických rozpouštědlech, především pak v tucích. Relativní molekulová hmotnost je 250,33 g/mol. Sumární vzorec: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>. Hustota 2-ethylhexylsalicylanu je 1,014 g/cm<sup>3</sup>, teplota varu: 189 °C. [2] Logaritmus K<sub>ow</sub> je 6,02. Tento rozdělovací koeficient říká, že EHS je významně bioakumulativní. [3]

#### 1.1.3 Použití

EHS je používán jako přísada mnoha vonných výrobků, například dekorativní kosmetiky, toaletních mýdel, šampónů a jiných. Jeho další uplatnění může být v nekosmetických produktech, například v domácích čistících prostředcích a detergentech. Podle vědeckých studií z roku 2007 byla jeho celosvětová spotřeba 0,1 – 1 tuny. [3]

### 1.1.4 Toxikologie

#### *Studie na zvířatech*

Orální studie: Při studiu akutní toxicity EHS přesahovala LD<sub>50</sub> hodnotu 5 g/kg. Testovaná zvířata dostala EHS jednorázově orálně v dávce 5 g/kg. Úmrtnost a/nebo klinické příznaky byly pozorovány po 14 dnech, jeden testovaný subjekt (z 10) uhynul 6. den studia, kromě toho nebyly pozorovány žádné klinické reakce. [4]

Kožní testy: Čistý EHS byl aplikován na čistou či odřenou kůži po dobu 24 hodin pod okluzí. Zvířata byla pozorována ohledně úmrtnosti a/nebo klinických příznaků po dobu 14 dní. Dermální LD<sub>50</sub> u laboratorních králíků byla vyšší než 5.0 g/kg, protože u žádného z testovaných zvířat nedošlo k úmrtí. Také nebyly pozorovány významné klinické příznaky, jen mírné zarudnutí kůže po dobu 24 hodin. [4]

Intraperitoneální injekční podávání: Skupině dospělých laboratorních myší vážících mezi 20-25 g byl injekčně vpraven EHS v propylenglykolu pod kůži. Zvířata byla pozorována po dobu 7 dní. Přibližná hodnota LD<sub>50</sub> byla zjištěna v rozmezí 0,2-0,3 g/kg. Žádné další detaily však v práci nebyly uvedeny. [5]

#### *Humánní studie*

Byly provedeny kožní testy na lidech. Test byl prováděn se 4 % EHS v petroleji, na zádech 23 mužských dobrovolníků. Nedošlo k žádnému podráždění. [4]

Při jiné studii byl 5 % EHS ve vodném roztoku laurethsulfátu sodném nanášen do podpaží a na jiná citlivá místa také 23 mužským dobrovolníkům po dobu 48 hodin. Rovněž nebylo zjištěno žádné podráždění kůže ani jiné klinické příznaky. [4]

## 1.2 Výskyt v přírodě

Díky obavám o zdraví způsobené UV zářením dochází ve vyspělých zemích k větší spotřebě ochranných krémů. V Evropské Unii bylo povoleno 26 organických sloučenin, používaných jako ochranné filtry v opalovacích přípravcích, s omezením jejich maximální individuální koncentrace do 10 %. [6, 7]

Mimo jiné mohou být tyto nebo jim strukturou podobné sloučeniny obsaženy také ve složení mnoha jiných přípravků osobní potřeby, jako jsou například šampony, rtěnky nebo různé obalové materiály, pro zlepšení jejich stálosti na světle. [6, 8]

Přímé uvolňování opalovacích krémů z kůže v oblastech koupání a nepřímé vstupy přes domácí odpadní vody je příčinou lokálního a dalšího šíření UV filtrů ve vodném prostředí. Přítomnost fenolické skupiny u EHS činí tuto látku potenciálně mobilní ve vodném prostředí. EHS byl nedávno detekován ve vzorcích povrchové vody. Experimentem zkoumajícím výskyt různých UV filtrů ve vodách bylo zjištěno, že EHS byl zaznamenán ve vzorcích všech zkoumaných řek i čističek odpadních vod. Autoři rovněž uvádějí, že vzhledem k tomu, že EHS je výrazně lipofilní sloučeninou, je proto také schopen interakcí s některými rozpuštěnými organickými sloučeninami, přítomnými v nevyčištěné odpadní vodě. V říční vodě byl EHS detekován, nikoli však kvantifikován. [6, 9]

### 1.2.1 Výskyt na rekreačních plážích u moře

Pracovníci z Japonské univerzity Kumamoto prováděli měření výskytu látek užívaných ve výrobcích s UV filtrem na plážích a v mořské vodě v oblíbených japonských letoviscích. Výskyt 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamátu (EHMC) značně kolísal v průběhu měnicí se turistické sezóny a také v průběhu jednotlivých fází dne. Díky snížené mobilitě EHMC ve vodě byly koncentrace vyšší těsně na hranici pláže a moře. V rámci dalšího zkoumání se přišlo na to, že i koncentrace EHS vykazovala značné kolísání. Bylo zjištěno, že EHS je značně fotolabilní a tak nestálý v prostředí mořské vody. Nejvyšší koncentrace tohoto polutantu byla zaznamenána v odpoledních hodinách při vrcholu turistické sezóny. Rovněž bylo zjištěno, že koncentrace kolísá s množstvím koupajících se lidí. V laboratorních podmínkách bylo následně pozorováno, že rozpad EHS v mořské vodě (koncentrace 1 mg/l), nastává při ozáření UV světlem s vlnovou délkou 340 nm během 150 minut, kdy bylo při těchto podmínkách degradováno více než 90 % EHS. Tento poznatek může doplňovat výzkum biodegradability EHS v mořské vodě, neboť je to velice krátká doba na bakteriální odbourání tohoto polutantu. [10]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 2 CÍLE PRÁCE

Provést odběr vzorků povrchové vody a stanovit v ní počet psychrofilních bakterií kultivační metodou. V odebraných vzorcích provést testy biodegradace 2-ethylhexylsalicylanu. Pokusit se získat bakteriální kultury, zodpovědné za případný rozklad. Provést experimenty na získaných bakteriálních kulturách a zjistit, zda dokáží využít jednotlivé strukturní části molekuly EHS.

### **3 METODIKA POKUSŮ**

#### **3.1 Sledování mikrobiálního rozkladu EHS v říční vodě**

##### **3.1.1 Použitá říční voda**

Voda pocházela z řeky Dřevnice, odběr byl proveden v den pokusu cca 200 m před výpustí ČOV. Vzorek vody byl charakterizován počtem heterotrofních psychrofilních bakterií a hodnotou rozpuštěného organického uhlíku (DOC), měřenou pomocí automatického analyzátoru uhlíku Shimadzu 5000A.

##### **3.1.2 Voda odtoku ČOV Zlín – Malenovice**

Voda pocházela přímo z výpustě ČOV Zlín – Malenovice, odběr byl proveden v den pokusu, před vtokem vyčištěné vody do řeky Dřevnice.

##### **3.1.3 Použité chemikálie**

2-Ethylhexylsalicylan (EHS) a 2-ethylhexanol (EHOL) byly získány od firmy Sigma-Aldrich, ostatní chemikálie od běžných dodavatelů základních laboratorních potřeb.

##### **3.1.4 Použité významné laboratorní přístroje**

- Respirometr Oxymax (Columbus Inc., USA)
- Laboratorní autokláv SanoClav
- Laminární box Bio-II-A (TELSTAR, Španělsko)
- Centrifuga Mr23i (JOUAN, Francie)
- Analyzátor uhlíku 5000A (Shimadzu, Japonsko)
- Termostaty, třepačky ÚIOŽP



### 3.1.5 Příprava a složení roztoků

Všechny živné roztoky použité v práci byly připraveny předem a sterilizovány v autoklávu nebo filtrací (viz níže).

#### Roztok minerálních solí (příprava na 100 ml)

2 ml	Roztok A (9,07 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1000 ml)
8 ml	Roztok B (23,90 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ /1000 ml)
85 ml	Destilovaná voda
0,2 ml	Roztok stopových prvků
1 ml	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g.l <sup>-1</sup> )
1 ml	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (3 g.l <sup>-1</sup> )
1 ml	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 g.l <sup>-1</sup> )
1 ml	$\text{NH}_4\text{Cl}$ (30 g.l <sup>-1</sup> )
1 ml	$\text{NaCl}$ (50 g.l <sup>-1</sup> )

Jednotlivé složky byly postupně rozpuštěny v cca 80 ml destilované vody a poté byl objem roztoku doplněn po rysku 100 ml. Roztok byl sterilizován v autoklávu.

#### Roztok stopových prvků (1000 ml):

$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,057g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,03 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,040g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,043g

Jednotlivé složky byly postupně rozpuštěny v cca 800 ml destilované vody a poté byl objem roztoku doplněn po rysku 1000 ml.

#### Roztok salicylanu sodného

Zásobní 10% roztok salicylanu sodného (SALNa): 1 g SALNa byl navážen do odměrky o objemu 10 ml, rozpuštěn v cca 8 ml destilované vody, doplněn po rysku, dokonale promíchán a sterilizován filtrací přes sterilní ultrafiltr MILLEX GS s velikostí pórů 0,22  $\mu\text{m}$  do sterilní zkumavky.

### **Roztok vitamínů**

V práci byl použit sterilní zásobní roztok MEM vitamins 100x firmy Biosera (dodavatel Biotech a.s., ČR).

### **3.1.6 Kultivační stanovení celkových počtů heterotrofních psychrofilních bakterií ve sledovaných vzorcích říční vody**

Bylo naváženo požadované množství R2A agaru (případně i TYA agaru) a suspendováno v destilované vodě. Agary byly sterilizovány v autoklávu a po dostatečném ochlazení byly rozlity do sterilních polystyrenových Petriho misek.

Vzorek odebrané říční vody (0,5 ml) byl nejprve asepticky naředěn sterilním 4,5 ml fyziologickým roztokem desetinným ředěním a v ředěních  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  napipetován na povrch živných agarů, vždy na dvě paralelní misky. Po naočkování byla inokula rozetřena po celém povrchu sterilní tyčinkou. Všechny misky byly kultivovány psychrofilně, tj. při 23 °C, ve tmě. Odečet počtu kolonií proběhl po 7 a následně po 30 dnech.

Obdobně bylo provedeno stanovení bakterií i v dalších vzorcích v průběhu práce, při předpokládaném vyšším obsahu bakterií však bylo použito vyšší ředění vzorků (až do stupně  $10^{-5}$  nebo  $10^{-6}$ ).

### **3.1.7 Sledování mikrobiálního rozkladu EHS ve vzorku vody mikroskopicky a kultivačně**

Do 3 sterilních láhví bylo sterilním válečkem nadávkováno po 50 ml vzorku říční vody, do všech láhví byl přidán sterilní zásobní roztok minerálních solí (0,5 ml do každé láhve) a do všech láhví byl automatickou pipetou přidán EHS v množství 25 mg (vznikla tedy koncentrace 500 mg/l) a vše bylo dokonale promícháno.

Všechny láhve byly kultivovány ve tmě při 25 °C na laboratorní vratné třepačce, při 100 cyklech za minutu, a byl sledován vznik zákalu či tvorba vloček, indikující množení bakterií. V průběhu kultivace byly prováděny aseptické odběry vzorků a jejich mikroskopická kontrola, za použití pozorovací komůrky CYRUS II a Mikroskopu OLYMPUS CX41 s fázovým kontrastem, při zvětšeních 200x a 400x. Fotografie vzorků byly pořízeny fotoaparátem CANON EOS 1100D, s využitím softwaru Quick PHOTO MICRO 3.1.

U odebraných vzorků byly kromě mikroskopické kontroly i kultivačně stanovovány počty psychrofilních heterotrofních bakterií, a to stejnou metodou jako při vstupním rozboru říční vody při zahájení pokusu; suspenze vzorků však byly před ředěním důkladně třepány po dobu 10 minut.

Kromě uvedených tří pokusných lahví byly v pokusu ještě připraveny 3 inkubační láhve, do kterých však nebyl dávkován žádný EHS; ty sloužily jako porovnávací a v průběhu kultivace byly i z těchto lahví odebírány vzorky, mikroskopovány a stanovovány v nich počty psychrofilních bakterií.

### **3.1.8 Izolace mikroorganismů podílejících se na rozkladu EHS**

Mikrobiální suspenze říční vody po proběhlé degradaci EHS (vzorky z pokusu Sledování mikrobiálního rozkladu EHS ve vzorku vody mikroskopicky a kultivačně) byla jemně protřepána se sterilními skleněnými kuličkami a pak byla inokulována do tří sterilních skleněných vialek (objem 40 ml) s 5 ml roztoku minerálních solí, v množstvích 0,5 ml, 0,1 ml a 10 µl inokula a do každé vialky bylo přidáno 2,5 µl EHS. Kultivace vialek probíhala při 25 °C 1 týden ve tmě, na rotační laboratorní třepače. Poté bylo z vialky, zaočkované 10 µl inokula, provedeno rozočkování na pevné živné agary (R2A, TYA) formou křížového roztěru, a po jejich další kultivaci 1 týden při 25 °C bylo provedeno následné přeočkování různých typů kolonií na čerstvá živná média. Po získání čistých kultur byly tyto zakonzervovány při -80 °C v glycerolu.

### **3.1.9 Růst kultur s využitím salicylanu sodného (SALNa) a 2-ethylhexanolu (EHOL) jako substrátů**

Nejprve bylo připraveno 500 ml roztoku minerálních solí a za častého míchání rozděleno po 15 ml do 32 ks kultivačních lahví o objemu 100 ml a ty byly poté sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 25 minut.

Během sterilizace byly připraveny suspence zkoumaných kultur ve sterilním fyziologickém roztoku, hustota suspence: 2. stupeň McFarlandovy stupnice. Kultury byly předinkubovány 3 dny na R2A agarech.

#### **SALNa**

Do 16 sterilních lahviček bylo přidáno 15 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 45 µl 10 % sterilního roztoku SALNa, do koncentrace 300 mg/l. Každá ze 7 bakteriálních kultur byla očkovaná (20 µl suspenze) do 2 lahviček se SALNa a 2 lahvičky se SALNa byly ponechány bez očkování jako slepý vzorek. Kultivace lahviček probíhala ve tmě při 25 °C. Byl sledován růst kultur sledováním zákalu, případně tvorby vloček v roztoku. U kultur, kde bylo zpozorováno zvýšení zákalu, byl proveden po 1 a 2 týdnech odběr vzorků

po 5 ml. Tyto vzorky byly centrifugovány (10 000 g, 4 °C, 12 minut), supernatant byl naředěn destilovanou vodou poměrem 1:1 pro stanovení DOC. Výsledky byly porovnány se slepými vzorky. Na konci pokusu bylo provedeno spektrofotometrické změření zákalu při 600 nm, po napipetování 200 µl vzorků do jamek mikrotitrační destičky (včetně kontrol).

### EHOL

Do 16 sterilních lahviček bylo opět přidáno 15 µl sterilního roztoku MEM vitamínů a 10 µl sterilního EHOL, do koncentrace 550 mg/l. Každá ze 7 bakteriálních kultur byla opět očkována (20 µl suspenze) do 2 lahviček. Další 2 lahvičky byly ponechány bez očkování jako slepé vzorky. Lahvičky byly dobře uzavřeny a kultivovány ve tmě při 25 °C.

U rostoucích kultur byl po týdnu a dvou proveden odběr vzorků a změřen spektrofotometricky zákal při 600 nm, po napipetování 200 µl vzorků do jamek mikrotitrační destičky. Výsledky pak byly porovnány se slepými vzorky (kontrolami).

#### 3.1.10 Postup sledování rozkladu EHS v říční vodě respirometricky

Všechny pracovní kultivační lahve pro použití v respirometru Oxymax (objem 100 ml) a uzávěry lahví byly sterilizovány; lahve v autoklávu a uzávěry dvojitým osvětlením UV zářivkou po dobu 45 minut ve dvou dnech. Do jednotlivých lahví pak byly nadávkovány následující komponenty, uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Složení vzorků pro pokus v respirometru Oxymax

Číslo lahve	Roztok minerálních solí [ml]	Říční voda [ml]	Sterilizovaná říční voda [ml]	EHS [mg]
1	0,5	50	–	–
2	0,5	50	–	–
3	0,5	50	–	–
4	0,5	50	–	10,7
5	0,5	50	–	9
6	0,5	50	–	10,4
7	0,5	–	50	15,9
8	0,5	–	50	13,4
9	0,5	–	50	12,7

Do lahví 1 – 3 nebyl přidán EHS a byla v nich tak sledována tzv. endogenní respirace, do lahví 7 – 9 byla přidána sterilní říční voda; jednalo se tedy o kontrolní, slepé pokusy. Všechny lahve byly následně umístěny do přístroje Oxymax a při teplotě 25 °C byla sledována produkce CO<sub>2</sub> a spotřeba O<sub>2</sub> po dobu 30 dnů. Po ukončení měření byly provedeny výpočty za cílem zjištění stupně mikrobiálního rozkladu EHS mikroorganismy říční vody.

Podle následujících rovnic bylo vypočteno procento biologického rozkladu testovaných vzorků, z hlediska bilance CO<sub>2</sub> v čase:

$$D_{CO_2} = \frac{(n_{CO_2vz} - n_{CO_2sl})}{Th_{CO_2}} \cdot 100$$

$n_{CO_2vz}$  – naměřené množství CO<sub>2</sub>, pocházející z rozkládajícího se vzorku [mol]

$n_{CO_2sl}$  – naměřené množství CO<sub>2</sub> připadající na endogenní respiraci [mol]

$Th_{CO_2}$  – teoreticky vyprodukované množství CO<sub>2</sub> [mol]

$$Th_{CO_2} = \frac{m_{vz} \cdot \frac{TOC}{100}}{Mh_C}$$

$m_{vz}$  – hmotnost vzorku [g]

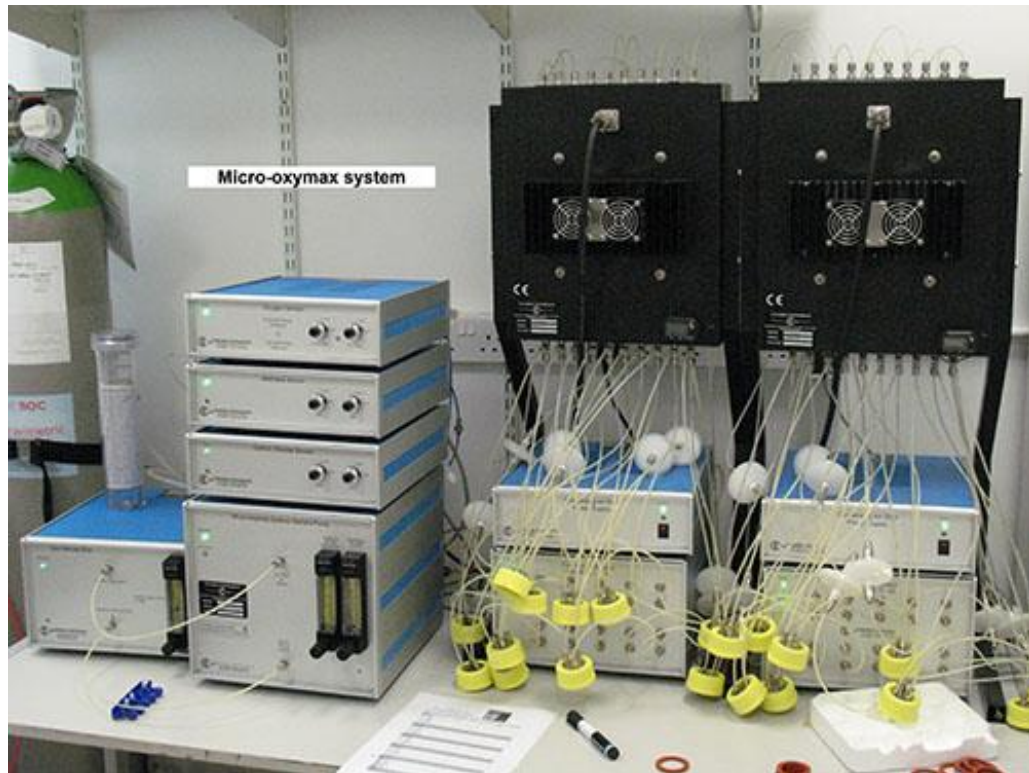
$TOC$  – organicky vázaný uhlík ve vzorku [%]

$Mh_C$  – molární hmotnost uhlíku [g · mol<sup>-1</sup>]

### 3.1.11 Respirometr Oxymax

Respirometr Micro-Oxymax je analyzátor sestavený tak, aby se přizpůsobil různým požadovaným typům prostředí (kompost, půda, voda) a také koncentraci vznikajících plynů v plynné fázi. Je schopen sledovat rozklad látek za pomoci dvou typů detektorů. Systém dokáže automaticky kompenzovat změny teplot a tlaku. Elektrodou na principu měření paramagnetické rezonance je stanovována spotřeba kyslíku, kdežto pro měření koncentrace oxidu uhličitého se používá IR spektrometrie. Stanovované plyny odebírá přístroj z lahví se vzorky a po detekci je vrací zpět; tím je zajištěno minimální ovlivnění vzorků. Data z detektorů jsou porovnávána a přepočítávána na standardizované podmínky (101 325 kPa, 0 °C). Data jsou následně udávána jako spotřeba nebo produkce monitorovaného plynu, jako kumulativní spotřeba nebo produkce nebo jako objemová koncentrace monitorova-

ných plynů v plynné fázi každé lahvičky se vzorkem. Výsledky lze rovněž převést na mg nebo  $\mu\text{g}$  za zvolenou časovou jednotku. [11]



Obrázek 2 – Ilustrační fotografie uspořádání respirometru Micro-oxymax

(bez vodních lázní, ve kterých probíhá inkubace vzorků)

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Výběr živného agaru pro kultivaci psychrofilních vodních bakterií

Cílem tohoto úvodního pokusu bylo zvolit vhodný agar pro uvedené testování, a to buď R2A agar nebo TYA agar. Pro toto posouzení byly odebrány vzorky jak říční vody, tak i vody odtoku ČOV. Oba vzorky byly po naředění naočkovány na oba typy živných agarů a po 10-denní kultivaci byly spočítány počty kolonií a přepočteny na počet CFU / ml. Většinou bylo pro počítání kolonií použito ředění  $10^{-3}$ . Výsledky jsou uvedeny v Tabulce číslo 2.

Tabulka 2 – Počty kultivovaných bakterií na R2A a TYA agaru

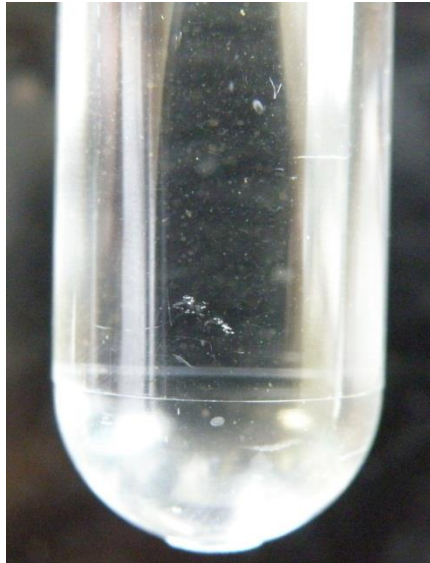
Zdroj kultur	Agar	Počet bakteriálních jednotek [CFU/ml]	
		7 dnů	10 dnů
DŘEVNICE	TYA	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$
	R2A	$4,6 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^5$
ČOV	TYA	$2,2 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$
	R2A	$8,4 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^4$

Jak je patrné z údajů, R2A agar prokázal vyšší záchyt bakterií u obou vzorků vod; počet nalezených bakterií na R2A agaru několikanásobně převyšoval počty zjištěné na TYA agaru. Proto byl v dalších pokusech používán R2A agar.

### 4.2 První pokus sledování rozkladu EHS v říční vodě

Dle postupu uvedeného v metodické části byla odebrána říční voda a v ní byl stanoven počet heterotrofních psychrofilních bakterií. Tato voda pak byla nadávkována do kultivačních lahví a po přidavku minerálů a EHS byla kultivována, spolu s kontrolními vzorky bez EHS. Růst bakterií byl v průběhu pokusu vyhodnocován několikerým stanovením heterotrofních psychrofilních bakterií, v kultivačních lahvích s EHS i bez něj, a výsledky těchto stanovení jsou uvedeny v Tabulce 3 a graficky vyjádřeny v Grafu číslo 1. Na níže uvedených fotografiích zkumavek s vodou s EHS a bez EHS lze pozorovat rozdíly, jež

jsou hlavně v nárůstu zákalu a tvorbě vločkovitých útvarů ve zkumavce s vodou z řeky Dřevnice a s EHS.

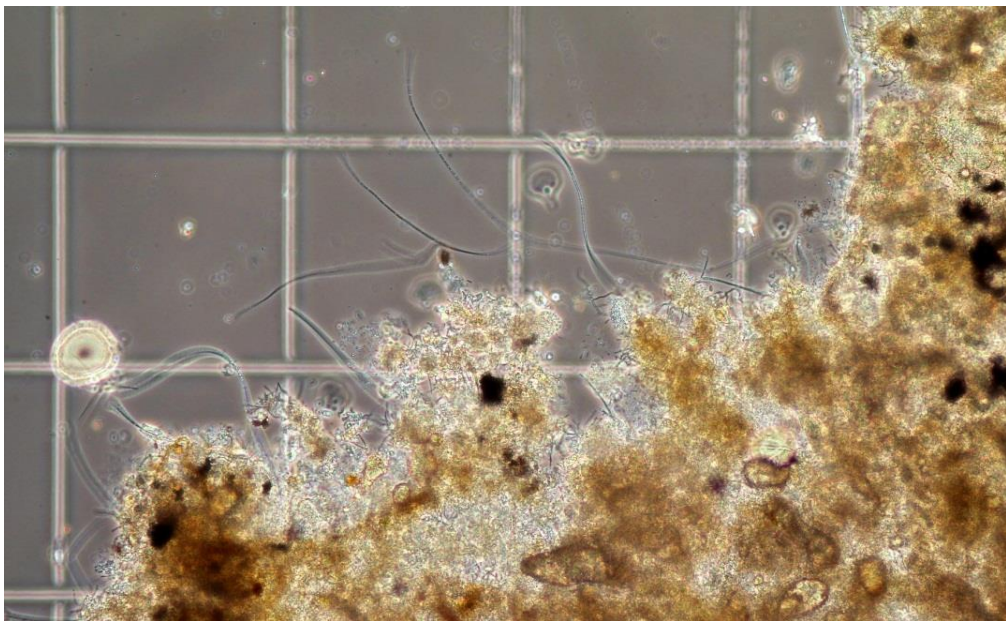


Obrázek 3 – Vzorek říční vody bez EHS po 20 denní kultivaci



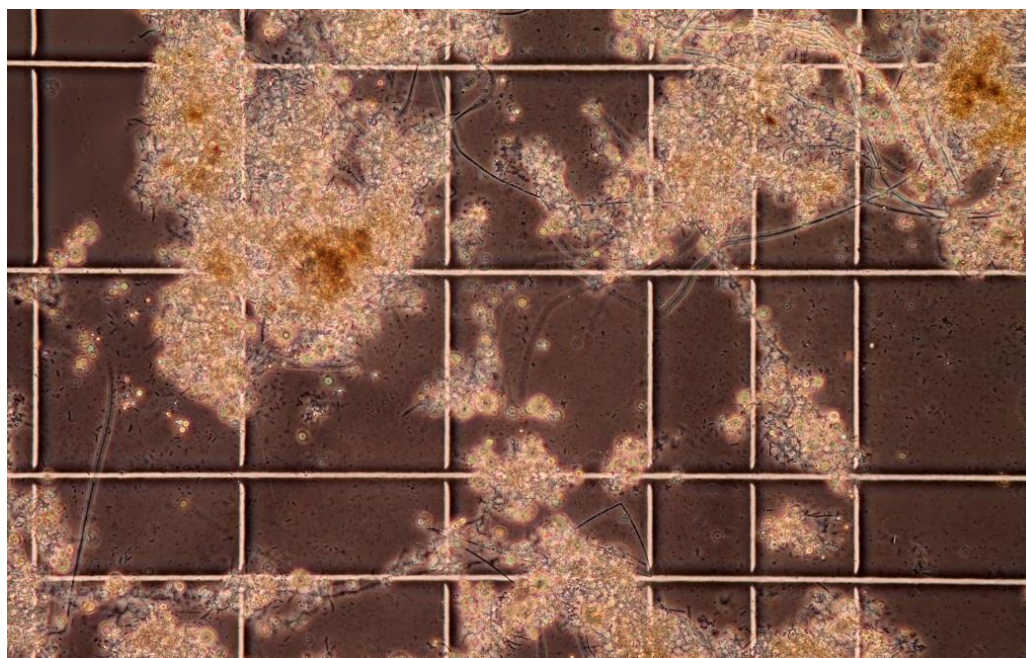
Obrázek 4 – Vzorek říční vody s EHS po 20 denní kultivaci

Na fotografiích z mikroskopu lze ve vzorku říční vody s EHS vidět bohaté spektrum mikroorganismů, včetně různých vláknitých bakterií, vyrůstajících z povrchu vytvořených vloček (viz. Obr. 5, 6).



Obrázek 5 – Mikroskopické sledování nárůstu MO po 10 dnech, zvětšení 200x.

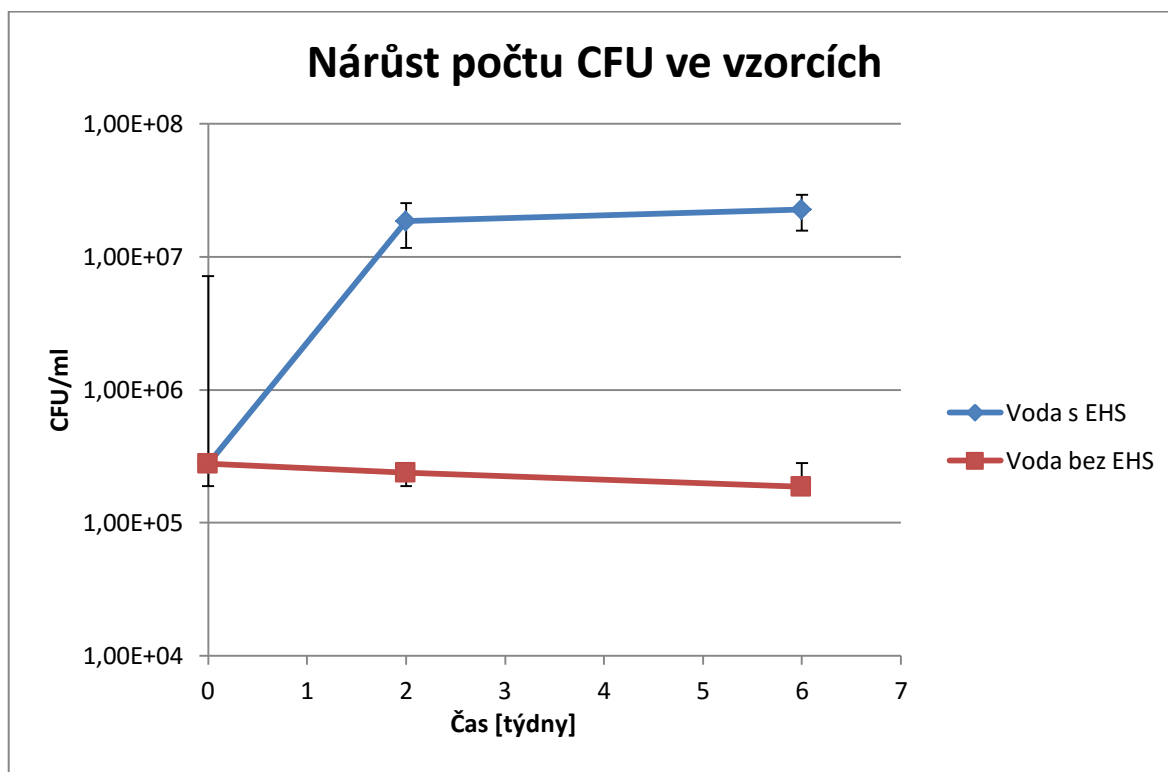




Obrázek 6 – Mikroskopické sledování nárůstu MO po 20 dnech, zvětšení 200x

Tabulka 3 – Počty CFU ve vzorcích říční vody v průběhu kultivace (průměr ze dvou paralelních stanovení)

Čas [týdny]	Vzorek s EHS [CFU/ml]	Vzorek bez EHS [CFU/ml]
0	$2,8 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
2	$1,8 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^5$
6	$2,2 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^5$



Graf 1 – Nárůst CFU ve vzorcích říční vody během kultivace

Na začátku tohoto pokusu byla také změřena koncentrace DOC použité říční vody, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 – DOC ve vodě z Dřevnice

Označení lahve	DOC [mg/l]
1	7,51
2	5,43
3	5,94

V prvním pokusu tak bylo zjištěno, že mikroorganismy EHS jako substrát využívají. V grafu 1 lze pozorovat značný nárůst počtu mikroorganismů ve vzorcích, které obsahovaly EHS. Nárůst bakterií v průběhu kultivace byl až o dva řády vyšší v porovnání se slepými vzorky vody bez EHS. Na začátku pokusu bylo rovněž změřeno množství DOC v říční vodě, a jak lze v tabulce číslo 4 pozorovat, množství tohoto uhlíku bylo nepatrné, což ukázalo na to, že mikroorganismy neměly k dispozici potřebný substrát. Ve 4. týdnu bylo kultivační stanovení počtu psychrofilních bakterií vzorků s EHS i bez EHS rovněž provedeno, ale vzhledem ke kontaminaci fyziologického roztoku (použitého k ředění vzorků)

nebyly získané výsledky použitelné a nejsou tak zaznamenány ani v tabulce, ani grafickou formou.

Pokus také ukázal, že rozklad EHS v říční vodě bude nutné dokumentovat i jinou formou, než kultivačním vyhodnocením počtu bakterií. Nerozpustnost EHS ve vodě a tvorba vloček znemožnily použít ke sledování rozkladu hodnot DOC a zákalů; bylo proto rozhodnuto provést později podrobnější pokus, umožňující sledování produkce CO<sub>2</sub>.

### 4.3 Získání bakteriálních kultur ze vzorků říční vody

Z mikrobiální suspenze, získané postupem uvedeným v metodické části této práce, bylo získáno 7 samostatně rostoucích kultur, které se od sebe navzájem lišily různou charakteristikou. V následující tabulce 4 jsou blíže popsány jednotlivé bakteriální kultury:

Tabulka 5 – Popis získaných kultur

Označení kultury	Popis vzorku izolovaných bakterií
AP11	Malá, světlá, téměř průhledná kolonie, světlejší než ostatní
AP12	Malá, bílá kolonie
AP13	Malá bílá kolonie, průsvitná
AP14a	Větší, mléčná, slizovitá expandující kolonie
AP14b	Nejmenší, narůžovělá kolonie
AP15	Malá žlutá kolonie
AP16	Světlá, v poměru k ostatním velká, plochá kolonie

Kultura AP 14 byla po prvotní izolaci dále čištěna dalším křížovým roztěrem, a tudíž naočkována na samostatné misky, kde po další kultivaci byly získány obě kolonie schopné samostatného růstu. Tyto kultury byly proto označeny jako AP14a a AP14b. Ostatní bakteriální kultury se od sebe lišily poměrně viditelně, proto s jejich izolováním nebyl větší problém.

#### 4.4 Zkoušky růstu získaných kultur na SALNa a EHOL

Byly připraveny 2 série lahvíček po 16-ti, v každé sérii byly zkoušeny schopnosti izolovaných bakterií rozkládat buď salicylan sodný či 2-ethylhexanol, tedy salicylovou či ethylhexanolovou část molekuly EHS, jak je popsáno výše v metodice.

##### Pokusy se SALNa

Před započítáním samotného pokusu degradace SALNa byla změřena vstupní hodnota DOC. Tyto hodnoty DOC u kontrolních vzorků K1 a K2 jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 – Vstupní hodnoty DOC v kontrolních vzorcích

Označení vzorku	DOC [mg/l]
K1	170,64
K2	169,24

Dále byly změřeny hodnoty DOC u všech vzorků, včetně těch kontrolních, na konci pokusu po 14 dnech kultivace. Tyto naměřené hodnoty jsou uvedené v tabulce 7.

Tabulka 7 – Naměřené hodnoty DOC ve vzorcích po ukončení pokusu

Označení vzorku	DOC [mg/l]
K1	169,9
K2	168,6
AP 11	167,9
	162,5
AP 12	21,5
	13,8
AP 13	164,1
	159,6
AP 14a	19,2
	13,6
AP 14b	19,2
	13,9
AP 15	26,5
	23
AP 16	170,2
	155

Na základě spotřeby rozpuštěného organického uhlíku a porovnání hodnot jednotlivých kultur s hodnotami DOC kontrolních vzorků bylo posouzeno, že bakteriální kultury AP12, AP14a, AP14b a AP15 jsou schopny využít SALNa jako substrát pro svůj růst.

### Pokusy s EHOL

U rostoucích kultur byl na začátku a po týdnu a dvou kultivace proveden odběr vzorků, u nichž byla spektrofotometricky změřena absorbance při 600 nm. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 – Naměřené hodnoty absorbancí ve vzorcích v průběhu pokusu degradace EHOL

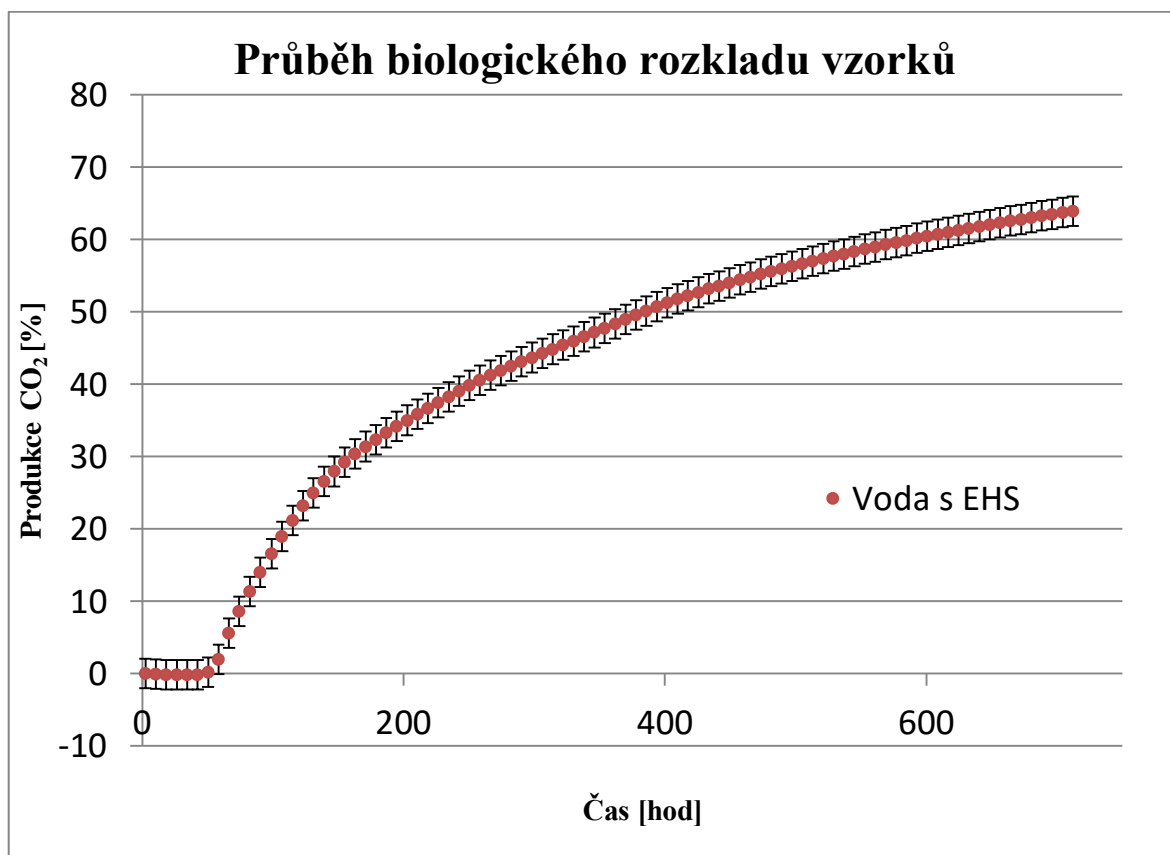
Označení vzorku	Absorbance při 600 nm		
	Na začátku	Po 1 týdnu	Po 2 týdnech
K	0,04	0,05	0,04
	0,05	0,05	0,05
AP 11	0,05	0,04	0,04
	0,04	0,04	0,05
AP 12	0,05	0,08	0,05
	0,04	0,05	0,05
AP 13	0,05	0,05	0,04
	0,05	0,04	0,04
AP 14a	0,04	0,05	0,04
	0,05	0,05	0,05
AP 14b	0,05	<b>0,40</b>	<b>0,31</b>
	0,05	0,04	0,04
AP 15	0,04	0,05	0,05
	0,04	0,07	0,05
AP 16	0,04	0,07	0,05
	0,05	0,05	0,05

Již po týdenní kultivaci, a tedy po druhém spektrofotometrickém proměření vzorků, bylo zřejmé, že kultura 14b je schopná růst a tedy substrát do jisté míry využít. Zakalení bylo patrné již na první pohled, pouze však u jedné ze dvou paralelních lahví. Z tohoto

důvody byl pokus s kulturou 14b zopakován ještě dvakrát, i v těchto případech však docházelo ke zvýšení zákalu pouze v jedné ze dvou paralelních lahví. Příčiny tohoto jevu jsou dosud nezjištěné, a pravděpodobně budou poměrně komplikované. Ostatní kultury nevykázaly žádný náznak růstu. Je tedy zřejmé, že 2-ethylhexanol není většinou získaných kultur využitelný.

#### 4.5 Podrobnější pokus rozkladu EHS v říční vodě

V posledním pokusu bylo cílem podrobněji analyzovat degradaci EHS měřením produkce  $\text{CO}_2$  a zjistit tak procento biologické degradace EHS v říční vodě. K dispozici byly 3 série lahví po 3, z toho 1 série s vodou a EHS, 2. série s vodou bez EHS a 3. série se sterilní vodou a EHS. V grafu 2 je znázorněn stupeň biologického rozkladu EHS v říční vodě v průběhu kultivace, vyhodnocení formou produkce  $\text{CO}_2$ , po odečtu slepých vzorků říční vody bez EHS.



Graf 2 – Průběh biologického rozkladu EHS v říční vodě

Výsledky tohoto pokusu jednoznačně ukázaly, že v říční vodě došlo prakticky ke kompletní degradaci EHS, protože produkce oxidu uhličitého dosáhla více než 60 % teoretického množství, jak je patrné z grafu číslo 2. Série lahví se sterilní vodou neprokázala žádnou degradaci substrátu, hodnoty produkce CO<sub>2</sub> se pohybovaly v průběhu celé kultivace kolem nuly, s odchylkou  $\pm 0,1$  %; bylo tak zřejmé, že nedochází k abiotické mineralizaci EHS.

## ZÁVĚR

Práce byla věnována sledování mikrobiálního rozkladu 2-ethylhexylsalicylanu mikroorganismy přirozeně se vyskytujícími v říční vodě, jejich izolací a prokázáním jeho úplné biodegradability.

Nejprve byl proveden výběr vhodné živné půdy pro sledování počtu psychrofilních heterotrofních bakterií ve vzorcích vod. Bylo zjištěno, že R2A agar vykazuje vyšší záchyt bakterií u vzorků vody z řeky Dřevnice i z odtoku ČOV. Počet nalezených bakterií na R2A agaru převyšoval počty zjištěné na TYA agaru několikanásobně, a proto bylo dále pracováno s ním.

Prvním pokusem rozkladu EHS bylo dokázáno, že mikroorganismy říční vody jsou schopné využívat tuto látku pro svůj růst, jelikož ve vzorcích říční vody s EHS byl nárůst bakterií až o dva řády vyšší v porovnání se slepým vzorkem vody bez EHS; konkrétně v říční vodě bez EHS bylo v rámci 6-týdenního pokusu zjištěno  $1,9 \cdot 10^5$  CFU/ml, zatímco v říční vodě s EHS bylo zjištěno  $2,2 \cdot 10^7$  CFU/ml.

Na konci prvního pokusu byla dále provedena izolace bakterií ze vzorků říční vody s EHS, čímž bylo získáno 7 bakteriálních kultur, které byly dále podrobeny experimentům se salicylanem sodným (SALNa) a 2-ethylhexanolem (EHOL), ze kterých vyplynulo, že 4 kultury jsou schopné využívat pro svůj růst SALNa a jen jediná kultura je schopná pro svůj růst využít EHOL.

Výsledky podrobného pokusu rozkladu EHS v říční vodě, s využitím přístroje Micro-oxymax, ukázaly, že v sériích lahví s říční vodou a EHS došlo během 30 dnů k produkci oxidu uhličitého z více než 60 %, což prokázalo prakticky úplnou biodegradaci substrátu.

Celá práce ukázala, že EHS je biologicky rozložitelný mikroorganismy, přirozeně se vyskytujícími v říční vodě, v průběhu několika týdnů.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SIGMA-ALDRICH, *2-Ethylhexyl salicylate*, CAS číslo 118-60-5, katalogové číslo 52184, [online]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/52184?lang=en&region=CZ>
- [2] SIGMA-ALDRICH, *2-Ethylhexyl salicylate*, bezpečnostní list, 2011, verze 5.0, [online]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDS.Pge.do?country=CZ&language=cs&productNumber=52184&brand=SIAL&PageToGToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fproduct%2Fsial%2F52184%3Flang%3Den>
- [3] LAPCZYNSKI, A., MCGINTY, D., JONES, L., LETIZIA, C. S., API, A. M.: *Fragrance material review on ethyl hexyl salicylate*. Food and Chemical Toxicology [online]. 2007, **45**(1), S393-S396. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.041. ISSN 02786915.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507003791>
- [4] BELSITO, D., BICKERS, M. BRUZE, et al.: *A toxicologic and dermatologic assessment of related esters and alcohols of cinnamic acid and cinnamyl alcohol when used as fragrance ingredients*. Food and Chemical Toxicology [online]. 2007, **45**(1), S1-S23. DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.087. ISSN 02786915.  
Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691507004267>
- [5] DOULL, J., PLZAK, V., BROIS, S. J.: *A Survey of Compounds for Radiation Protection*. Armed Services Technical Information Agency, pp. 1 – 124. 1962
- [6] NEGREIRA, N., RODRÍGUEZ, M. RAMIL, E. RUBÍ, CELA, R.: *Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta [online]. 2009, **638**(1), 36-44. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.015. ISSN 00032670. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267009002578>
- [7] GIOKAS, D. L., SALVADOR, A., CHISVERT, A.: *UV filters: From sunscreens to human body and the environment*. Trends in Analytical Chemistry [online]. 2007, **26**(5), 360-374. DOI: 10.1016/j.trac.2007.02.012. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993607000726>

- [8] ZENKER, A., SCHMUTZ H., FENT, K.: Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1202**(1), 64-74 [cit. 2016-05-06]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.06.041. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308010996>
- [9] CUDERMAN, P., HEATH, E.: *Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007-2-6, **387**(4), 1343-1350. DOI: 10.1007/s00216-006-0927-y. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-006-0927-y>
- [10] SANKODA, K., MURATA, K., TANIHATA, M.: *Seasonal and Diurnal Variation of Organic Ultraviolet Filters from Personal Care Products Used Along the Japanese Coast*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 2015, **68**(2), 217-224. DOI: 10.1007/s00244-014-0106-7. ISSN 0090-4341. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00244-014-0106-7>
- [11] COLUMBUS INSTRUMENTS: *Respirometer: Micro-Oxymax* [online]. Dostupné z WWW: <http://www.colinst.com/brief.php?id=45>  
Obrázek: <https://www.bangor.ac.uk/senrgy/research/facilities/images/Microoxymaxsystem.jpg>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AP	Laboratorní označení kultur
CFU	Jednotky tvořící kolonie (Colony forming units)
ČOV	Čistička odpadních vod
D <sub>CO<sub>2</sub></sub>	Procenta produkce CO <sub>2</sub>
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
EHMC	2-Ethylhexyl-4-methoxycinnamát
EHOL	2-Ethylhexanol
EHS	2-Ethylhexylsalicylan
K	Kontrolní vzorky
LD <sub>50</sub>	Dávka působící úhyn 50 % pokusných subjektů
Log K <sub>ow</sub>	Rozdělovací koeficient v referenčním systému oktanol-voda.
PDMS-DVB	Polydimethylsiloxan/Divinylbenzen
SALNa	Salicylan sodný
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – Struktura 2-Ethylhexylsalicylanu .....	11
Obrázek 2 – Ilustrační fotografie uspořádání respirometru Micro-oxymax .....	22
Obrázek 3 – Vzorek říční vody bez EHS po 20 denní kultivaci .....	24
Obrázek 4 – Vzorek říční vody s EHS po 20 denní kultivaci .....	24
Obrázek 5 – Mikroskopické sledování nárůstu MO po 10 dnech, zvětšení 200x .....	24
Obrázek 6 – Mikroskopické sledování nárůstu MO po 20 dnech, zvětšení 200x .....	25

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Složení vzorků pro pokus v respirometru Oxymax .....	20
Tabulka 2 – Počty kultivovaných bakterií na R2A a TYA agaru .....	23
Tabulka 3 – Počty CFU ve vzorcích říční vody v průběhu kultivace (průměr ze dvou paralelních stanovení).....	25
Tabulka 4 – DOC ve vodě z Dřevnice .....	26
Tabulka 5 – Popis získaných kultur .....	27
Tabulka 6 – Vstupní hodnoty DOC v kontrolních vzorcích.....	28
Tabulka 7 – Naměřené hodnoty DOC ve vzorcích po ukončení pokusu .....	28
Tabulka 8 – Naměřené hodnoty absorbancí ve vzorcích v průběhu pokusu degradace EHOL .....	29