



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

## POSOUZENÍ ÚČINNOSTI ÚPRAVNY PITNÉ VODY PROSTŘEDNICTVÍM EKOTOXIKOLOGICKÝCH TESTŮ A SCREENINGOVÉ ANALÝZY

ASSESSMENT OF THE DRINKING WATER TREATMENT PLANT EFFECTIVENESS VIA  
ECOTOXICOLOGICAL TESTS AND SCREENING ANALYSES

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Linartová

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

BRNO 2017

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1027/2016  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studentka: **Bc. Barbora Linartová**  
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Posouzení účinnosti úpravy pitné vody prostřednictvím ekotoxikologických testů a screeningové analýzy

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracování literární rešerše zaměřené na výskyt látek typu hormonů v povrchových a pitných vodách
2. Odběr vzorků z jednotlivých stupňů úpravy pitné vody, jejich analýza na obsah hormonálních látek a současně stanovení ekotoxicity pomocí vybraných testů
3. Posouzení účinnosti jednotlivých stupňů úpravy vod na základě výsledků ekotoxikologických testů a chemických analýz

### Termín odevzdání diplomové práce: 15.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Barbora Linartová  
student(ka)

-----  
MVDr. Helena Zlámalová Gargošová,  
Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

S neustálým nárůstem znečištění životního prostředí se zhoršuje kvalita povrchové vody, která je technologickými procesy upravována na vodu pitnou, a je proto nutné klást zvýšené nároky na účinnost těchto technologických procesů a jejich případnou inovaci. Vzhledem k tomu, že surová voda je kontaminována různými druhy polutantů, je pro zajištění kvality nezbytné průběžně kontrolovat pitnou vodu dodávanou do veřejné distribuční sítě. Úpravní pitné vody stále nejsou schopny surovou vodu upravit dokonale, ale pouze eliminovat její znečištění na normami akceptovatelnou míru. Zejména z tohoto důvodu je nezbytné, aby byla kvalita pitné vody pravidelně kontrolována a zároveň posuzována účinnost jednotlivých technologických procesů úpravy pitné vody. K tomu mohou sloužit screeningová analýza nebo popř. ekotoxikologické testy.

Diplomová práce se zaměřuje na problematiku účinnosti technologických procesů úpravy pitné vody. V rámci experimentální části byly v úpravě vody v České republice odebrány vzorky surové vody a vzorky vod po všech separačních stupních, které byly podrobeny ekotoxikologickým testům a screeningové analýze. Na základě provedených ekotoxikologických testů na organismech *Thamnocephalus platyurus*, *Lemna minor* a *Vibrio fischeri* můžeme předpokládat tvorbu škodlivých chlorovaných vedlejších produktů, což se projevilo téměř 100% mortalitou organismů *T. platyurus*. Z výsledků screeningové analýzy realizované po extrakci vzorků metodou SPE pomocí přístroje HPLC/MS vyplývá, že nejúčinnější metodou pro odstranění hormonálních látek je ozonizace.

## ABSTRACT

The quality of raw water is deteriorating with the continuous increase in environmental pollution. Raw water is being modified to drinking water by technological processes, and it is therefore necessary to put increased demands on the efficiency of these technological processes and their possible innovation. Due to the fact that raw water is contaminated with different types of pollutants, it is necessary to continuously control the drinking water supplied to the public distribution network in order to ensure its quality. Drinking water treatment is still unable to treat the raw water perfectly, its pollution is only reduced to acceptable standards. For this reason, it is indispensable that the quality of drinking water is being checked regularly and at the same time the efficiency of individual technological processes of drinking water treatment is assessed. This includes screening analysis or eventually ecotoxicological tests.

The thesis focuses on the efficiency of technological processes of drinking water treatment. Within the experimental part, samples of raw water and samples of water after each separation stage have been collected at the drinking water treatment plant in the Czech Republic. These samples have been subjected to ecotoxicological tests and screening analysis. Based on the ecotoxicological tests carried out on *Thamnocephalus platyurus*, *Lemna minor* and *Vibrio fischeri*, we can assume the emergence of harmful chlorinated by-products, resulting to nearly 100% mortality in *T. platyurus*. The results of the screening analysis carried out indicate, after the extraction of specimens by the SPE method using HPLC/MS, that the most effective method for the removal of hormonal substances is ozonization.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Pitná voda, písková filtrace, ozon, filtrace GAU, UV záření, chlorace, hormony, ekotoxikologie, HPLC/MS

## KEYWORDS

Drinking water, sand filtration, ozone, GAU filtration, UV radiation, chlorination, hormones, ecotoxicology, HPLC/MS

LINARTOVÁ, B. *Posouzení účinnosti úpravny pitné vody prostřednictvím ekotoxikologických testů a screeningové analýzy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 78 s. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. a svému konzultantovi diplomové práce prof. Ing. Josefu Čáslavskému, CSc. za jejich cenné připomínky, konzultace a čas, který mi věnovali při vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jiřímu Benešovi, řediteli divize úpravy vody ze společnosti DISA s.r.o. za zprostředkování spolupráce s úpravnou vody v České republice, za jeho čas a přínosné konzultace. Poděkování patří i vedoucím zaměstnancům úpravny pitné vody v České republice za poskytnutí vzorků a veškerý jejich čas. V poslední řadě bych chtěla poděkovat za podporu svým blízkým.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Problematika pitných vod</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2</b>	<b>Vodní zdroje</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Technologické procesy úpravy pitné vody a jejich účinnost.....	11
2.2.1.1	Písková filtrace .....	12
2.2.1.2	Ozonizace .....	14
2.2.1.3	Filtrace přes granulované aktivní uhlí .....	15
2.2.1.4	UV záření .....	16
2.2.1.5	Chlorace.....	17
2.2.1.6	Desinfekce oxidem chloričitým.....	18
<b>2.3</b>	<b>Hormonální látky v pitných a povrchových vodách</b> .....	<b>19</b>
2.3.1	Hormony.....	20
2.3.2	Steroidní hormony .....	21
2.3.3	Estrogenní sloučeniny .....	21
<b>2.4</b>	<b>Ekotoxicita povrchových a pitných vod</b> .....	<b>23</b>
2.4.1	Vybrané metodiky testů.....	24
2.4.1.1	Akutní test toxicity na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> .....	24
2.4.1.2	Test inhibice růstu okřehku menšího – <i>Lemna minor</i> .....	25
2.4.1.3	Test inhibice luminiscence organismu <i>Vibrio fischeri</i> .....	26
<b>2.5</b>	<b>Metody izolace analytů z kapalných vzorků</b> .....	<b>27</b>
2.5.1	Extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction).....	28
<b>2.6</b>	<b>Stanovení steroidních hormonů pomocí HPLC/MS</b> .....	<b>30</b>
2.6.1	Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii .....	32
2.6.2	Analyzátoary používané v hmotnostní spektrometrii.....	34
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakteristika vzorků a jejich odběr</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>Ekotoxikologické posouzení</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Laboratorní vybavení a přístroje .....	38
3.2.2	Testování pitné vody ekotoxikologickými testy.....	38
3.2.2.1	Test inhibice růstu na akvatické rostlině <i>Lemna minor</i> .....	38
3.2.2.2	Test akutní toxicity na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> .....	40
3.2.2.3	Test bioluminiscence na bakterii <i>Vibrio fischeri</i> .....	41
<b>3.3</b>	<b>Výsledky ekotoxikologického posouzení</b> .....	<b>44</b>
3.3.1	Výsledky inhibice růstu okřehku ( <i>Lemna minor</i> ).....	44
3.3.2	Výsledky testu na organismu <i>Thamnocephalus platyurus</i> .....	45

3.3.3	Výsledky bakteriálních testů inhibice bioluminiscence .....	47
<b>3.4</b>	<b>Diskuze výsledků ekotoxikologického posouzení.....</b>	<b>50</b>
<b>3.5</b>	<b>Analýza hormonů .....</b>	<b>53</b>
3.5.1	Chemikálie a přístroje .....	53
3.5.2	Sledované analyty v pitné vodě.....	53
3.5.3	Příprava standardů, modelového vzorku a izolace analytů .....	55
3.5.4	Analýza a její podmínky.....	56
<b>3.6</b>	<b>Výsledky analytické části.....</b>	<b>58</b>
3.6.1	Optimalizace podmínek screeningové analýzy .....	58
3.6.2	Výtěžnost metody extrakce SPE .....	58
3.6.3	Kalibrační závislosti sledovaných analytů .....	58
3.6.4	Stanovení sledovaných analytů v reálných vzorcích.....	59
<b>3.7</b>	<b>Diskuze výsledků analytické části.....</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>74</b>

# 1 ÚVOD

Jednou ze základních součástí Země, nutnou pro existenci jakéhokoli života, je voda. Zásoby vody na Zemi jsou však rozděleny zcela v neprospěch sladké vody, když převážnou část zásob vody tvoří oceány a moře. Zásoby sladké vody můžeme nalézt například v pevninských ledovcích, v podzemních vodách, v jezerech a řekách. K zabezpečení lidských potřeb je nezbytné vodu prostřednictvím technologických procesů upravit na vodu pitnou.

Zabezpečení kvality pitné vody pro obyvatelstvo je nutné nejen s ohledem na dodržení určitého životního standardu, ale také zejména k ochraně veřejného zdraví.

V přirozených podmínkách voda podléhá mnoha přírodním vlivům, a proto je v dnešní době velice problematické najít přírodní zdroj vody, který by splňoval limity stanovené pro pitnou vodu. Zejména z důvodu, že surová voda obsahuje značné množství nečistot a nežádoucích organismů, které mohou být pro zdraví lidí škodlivé, je potřeba vodu před její konzumací nejprve upravit na vodu pitnou, která je zdravotně nezávadná. Mezi běžné polutanty pitné vody patří zejména arsen, trihalomethany, léčiva a hormony.

Existuje více možností úpravy pitné vody, které se liší jak svou účinností, tak ekonomickou náročností. Mezi nejznámější a nejpoužívanější metody úpravy pitné vody patří číření, flotace, písková filtrace, ozonizace, filtrace přes granulované aktivní uhlí, UV záření a hygienické zabezpečení.

Kontrolu jakosti pitné vody musí provádět jak dodavatelé pitné vody, tak státní orgány v akreditovaných laboratořích. Hodnotí se mikrobiologické, biologické, fyzikální a chemické ukazatele. Metody hodnocení a limitní hodnoty jsou stanoveny vyhláškou č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody.

Cílem této diplomové práce je posouzení účinnosti technologické linky úpravy vody v České republice, která v letech 2012 – 2014 prošla rozsáhlou rekonstrukcí. Účinnost je posuzována prostřednictvím ekotoxikologických testů a screeningové analýzy. Podstatou ekotoxikologických testů je zjištění možného toxického vlivu testovaných látek v definovaných podmínkách na živé organismy. Screeningová analýza, která do jisté míry navazuje na diplomovou práci zpracovanou v roce 2013 Martinou Remerovou vedenou prof. Ing. Josefem Čáslavským, CSc. pod názvem „Využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách“, hodnotí výskyt hormonů v upravené vodě, a to s ohledem na skutečnost, že úpravna v České republice prošla již zmíněnou podstatnou rekonstrukcí.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Problematika pitných vod

Pitná voda je zdravotně nezávadná voda, která musí splňovat takové fyzikálně-chemické podmínky, aby nepředstavovaly ohrožení veřejného zdraví. Nesmí obsahovat mikroorganismy, parazity a látky jakéhokoliv druhu v takovém množství nebo koncentraci, které by mohly ohrozit veřejné zdraví. Tedy veškerá voda, ať už v původním stavu nebo po úpravě, určená k pití, vaření, k péči o tělo a k čištění předmětů, které přicházejí do styku s potravinami nebo s lidským tělem. Legislativně je výroba a distribuce pitné vody v ČR rozdělena mezi tři ministerstva. Ministerstvo životního prostředí (MŽP) má v kompetenci ochranu vodních zdrojů a tuto oblast upravuje zákon č. 254/2001 Sb., o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) a jeho prováděcí vyhlášky. Vodní zákon např. stanovuje pro všechny zdroje pitné vody s průměrným odběrem více než 10 000 m<sup>3</sup> za rok povinnost vymezit ochranná pásma, a to za účelem ochrany jejich vydatnosti, jakosti a bezpečnosti. V pravomoci ministerstva zemědělství (MZe) je využití vodních zdrojů, výroba a doprava pitné vody ke spotřebiteli. Právní strážce této oblasti se věnuje zákon č. 274/2001 Sb., o vodovodech a kanalizacích pro veřejnou potřebu spolu s jeho prováděcími předpisy. V kompetenci ministerstva zdravotnictví (MZ) je zajištění kvality pitné vody u spotřebitele, což zahrnuje všechny způsoby dodávky pitné vody pro veřejnost. Tuto oblast upravuje zákon č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví. Ukazatele jakosti pitné vody a jejich hygienické limity jsou uvedeny v prováděcí vyhlášce č. 252/2004 Sb. Tato vyhláška mimo jiné uvádí i četnost a rozsah kontrol (rozběrů) pitné vody [1; 2].

Celosvětovým problémem je nedostatek pitné vody v důsledku znečišťování životního prostředí. Jen malá část povrchové vody představuje vodu sladkou, která může být technologickými procesy upravena na vodu pitnou. Pitná voda odcházející z úpraven musí být hygienicky zabezpečena a obsah desinfekčních činidel nesmí klesnout pod určitou hranici. Výběr vhodných technologií pro úpravu na pitnou vodu je závislý především na typu vodního zdroje [3].

Významným problémem je výskyt chemických kontaminantů, které mohou být příčinou nemoci z pitné vody. Z hygienického hlediska k nejvíce obávaným anorganickým polutantům pitné vody v současné době patří arsen. V některých oblastech se dostává do vody ve větším množství vymýváním z hornin nebo z odpadních vod. Vzhledem k jeho karcinogenitě a toxickým účinkům byl zpřísněn jeho povolený obsah v pitné vodě na nejvyšší mezní hodnotu 10 µg/l. Anorganický arsen je toxičtější v trojmocné formě As<sup>III</sup> než v pětímocné formě As<sup>V</sup>. Oxidace As<sup>III</sup> na As<sup>V</sup> je v přítomnosti chloraminů pomalejší a obsah rozpuštěného arsenu při vyšším pH může vzrůstat. Proto je vhodné, pomocí oxidace převést arsen na formu As<sup>V</sup>.

Dalším značným problémem jsou vedlejší produkty vzniklé při desinfekci. Nejrozšířenějším typem desinfekce je chlorace, následkem čehož jsou vedlejší produkty chlorování prozkoumány nejvíce. Mezi nejznámější kontaminanty patří trihalomethany. Expozice těmito polutanty bývá spojována s výskytem některých druhů rakoviny. To má souvislost s přítomností některých druhů nádorových onemocnění nebo vlivem na rozmnožovací funkce člověka. Patří sem i další produkty, jako jsou např. nehalogenované aldehydy, karboxylové kyseliny a halogenované acetáty, aldehydy, acetonitrily, furanony či chlorpikrin [4; 1].

V současnosti se nejenom ve světě, ale také v České republice sleduje ve vodě výskyt celé řady polutantů zejména léčiv, hormonů a látek s hormonálními účinky. I když jejich množství ve vodě je velmi malé, řádově se pohybuje v jednotkách až desítkách ng, přesto mohou mít při dlouhodobém účinku negativní vliv na životní prostředí, organismy a v neposlední řadě také na člověka. Mezi cizorodé hormonálně aktivní látky, tzv. endokrinní disruptory, patří spousta látek, jako např. některé pesticidy, látky z kosmetického průmyslu, léky, hormonální antikoncepce nebo látky obsažené v čisticích prostředcích a plastech. Spotřeba léčiv je vysoká a do vody se dostávají dvěma způsoby. Buď přímo splachováním nepoužitých léčiv do toalety nebo častěji vylučováním z léčiv či jejich metabolitů. Těmito



způsoby se dostávají farmaceutické látky do odpadních vod, netěsnostmi do podzemních či povrchových vod i dále do řeky. Látkou, která byla v pitné vodě v rámci výzkumů nejčastěji detekována je ibuprofen, ze skupiny nesteroidních antiflogistik. Významnou skupinou hormonů, které byly v pitné vodě rovněž zjištěny, jsou ženské hormony – estrogény. Mohou se vyskytovat ve formě přírodní nebo syntetické, a to jako důsledek užívání hormonální antikoncepce [5; 6].

Tabulka 1: Hlavní typy mikropolutantů ve sladkovodních vodách [7]

	Hlavní využití	Často detekované látky
<b>Průmyslové látky</b>		
Bromované zpomalovače hoření (BRF)	aditiva do řady materiálů – plastů, textilií, stavebních materiálů	polybromované difenyletery (PBDE) polybromované bifenyly (PBB)
Ftaláty	změkčovače plastů	di(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP)
Triazoly	inhibitory koroze	benzotriazol, tolyltriazol
Fenoly	surfaktanty, čisticí prostředky	bisfenoly, nonylfenol, oktyfenol
Perfluorované látky (PFC)	ochranné a voděodolné nátěry, průmyslová aditiva	kyselina perfluorooktansulfonová (PFOA), perfluorooktansulfonát (PFOS)
Nanočástice (NP)	řada průmyslových využití	NP kovů, uhlíkové NP
<b>Pesticidy</b>		
Triaziny	herbicidy	atrazin, simazin, hexazinon, terbutylazin, terbutryn
Chloracetanilidy	herbicidy	acetochlor, metolachlor, alachlor, metazachlor
Organofosfáty	insekticidy herbicidy	diazinon, chlorpyrifos, malathion glyfosát a jeho metabolit AMPA
Kvarterní amoniové soli	herbicidy	chlormequat, paraquat, diquat
Deriváty kyseliny chlorofenoxyoctové	herbicidy	MPCA, bentazon, 2,4-D
Karbamáty	fungicidy	benomyl, karbaryl
Pyrethroidy	insekticidy	cypermethryn, esfenvalerat
<b>PPCP (produkty osobní péče – z angl. pharmaceuticals and personal care products)</b>		
Farmaka	analgetika, antiepileptika antihyperlipidemika, protizánětlivé látky	acetaminofen, kyselina acetylsalicylová, diklofenak, ibuprofen, karbamazepin, kyselina klofibrová
Antimikrobiální látky	antibiotika	erytromycin, sulfonamidy, triclosan
Hormony a jejich metabolity	hormony	estron, estriol, 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\beta$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol
Polycyklické mošusové látky (musky)	vonné látky parfémů, čisticích a hygienických přípravků	galaxolid, tonalid
Další mikropolutanty	látky z repelentů stimulant umělá sladidla	N,N-diethyl-metatoluamid (DEET) kofein acesulfam, sacharin, cyklamát

Zdravotní riziko může pitná voda představovat v podobě akutního (okamžitého) nebo chronického (dlouhodobého) účinku. Standardně platí, že mikroorganismy způsobují v pitné vodě akutní účinek a chronické onemocnění bývá vyvoláváno působením chemických látek. Samozřejmě se mohou vyskytovat i výjimky, kdy člověk je vystavován působení určité bakterie po dlouhou dobu a k projevu onemocnění dojde až za několik let, když je oslabena jeho imunita. Naopak může dojít k adaptaci na

závadnou vodu, a tím k vytvoření specifické imunity. Proto je potřeba spolehlivě sledovat jakost pitné vody a dodržovat hygienické limity pro obsah mikroorganismů a chemických látek v pitné vodě [1].

## 2.2 Vodní zdroje

Zdrojem, z hlediska úpravy na vodu pitnou, jsou vody přírodní. Dle výskytu se přírodní vody dělí na povrchové, podzemní a srážkové. Pro zásobování pitnou vodou se nejčastěji využívají vody povrchové nebo podzemní.

Povrchová voda je voda pramenitá, vyvěrající na povrch. Je to směs vod srážkových a podzemních, která se dělí na vody stojaté a tekoucí. Chemické složení povrchových vod je závislé na velkém množství činitelů. Vodu může ovlivňovat geologická skladba a podloží, srážkové vody, antropogenní činnost a příron podzemních vod. Zdroje znečištění můžou být trojího druhu: bodové, plošné a difúzní. Každý zdroj znečištění má významný vliv na kvalitu a vlastnosti povrchových vod.

Rozhodující ukazatele pro životní prostředí vodních organismů jsou teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Teplota je závislá na klimatických podmínkách, tudíž je velmi proměnlivá. Rozpustnost kyslíku se zvyšuje se snížením teploty a naopak. Teplotní limit v základních ukazatelích dle nařízení vlády č. 401/2015 Sb. je 29 °C. Zmíněné nařízení udává i další ukazatele a hodnoty přípustného znečištění pro zdroje povrchových vod, které jsou využívány nebo u kterých se předpokládá jejich využití jako zdroje pitné vody [8; 9].

Povrchové vody oproti podzemním vodám obsahují větší koncentrace organických látek. Je to ovlivněno organismy a koloběhem látek, pro které je voda životním prostředím. Z organických látek jsou to především látky huminové, které jsou biologicky poměrně obtížně rozložitelné. Zbytek jsou biologicky rozložitelné látky, které se do povrchových vod dostávají jako produkty životních procesů a jsou rozkládány mikrobiálními procesy. Zvláštní význam ve vodě mají dusík a fosfor, jelikož podmiňují proces tzv. eutrofizace. K tomuto jevu dochází zejména za příznivých teplotních a světelných podmínek. Tímto dochází k rozvoji řas a sinic, jejichž produkty metabolismu a rozklad biomasy značně znehodnotí kvalitu povrchové vody. Mimo jiné, nadměrná eutrofizace, eroze půdy nebo přívalové deště jsou důsledkem zvýšené koncentrace nerozpuštěných látek v povrchové vodě [8].

Podzemní vody se vyskytují v různé hloubce pod zemským povrchem a teplota vody stoupá se zvyšující se hloubkou. Ve střední Evropě mají podzemní vody hloubku 10 m a teplotu okolo 10 °C. Podzemní vody obsahují především anorganické látky, kterými se voda obohacuje při průchodu horninovým prostředím. Tyto vody jsou bezkyslíkaté a znečištění organickými látkami je minimální, jelikož látky jsou při kontaktu s geologickým podložím mineralizovány. Naopak se podzemní vody liší vyšší koncentrací volného oxidu uhličitého, jež může být příčinou agresivity vody na kovy a stavebniny. Z výše uvedeného plyne, že chemické složení podzemních vod je výsledkem působení půdního a horninového prostředí, a mimo jiné i působení srážkových a povrchových vod. Proto vody klasifikujeme podle převládajících iontů nebo podle charakteristických kombinací iontů. V České republice dominují svým výskytem podzemní vody typu hydrogenuhličitano-sírano-vápenatého ( $\text{HCO}_3\text{-SO}_4\text{-Ca}$ ). U podzemních vod je zapotřebí věnovat pozornost radioaktivním látkám, především radonu, jelikož jeho koncentrace v některých lokalitách může být poněkud vyšší, než je zákonem povoleno. Antropogenní činnost může ovlivnit podzemní vody z pramenů a mělkých vrtů, rovněž voda pocházející z hlubokých vrtů může být tomuto znečištění do určité míry exponována.

Srážkové vody jsou vody z atmosférických srážek, které dosud neobsahují látky z povrchu. Tuto definici uvádí norma ČSN EN 1085. Zdrojem látek je ovzduší, kterým prochází. Pravidelnou součástí srážkové vody je oxid uhličitý, oxid sírový z tepelných elektráren, kde probíhá spalování uhlí se zvýšeným obsahem síry a oxidy dusíku, jejichž zdrojem jsou výfukové plyny spalovacích motorů. Díky této skutečnosti je pro srážkové vody charakteristická jejich značná kyselost, což má za důsledek úhyn

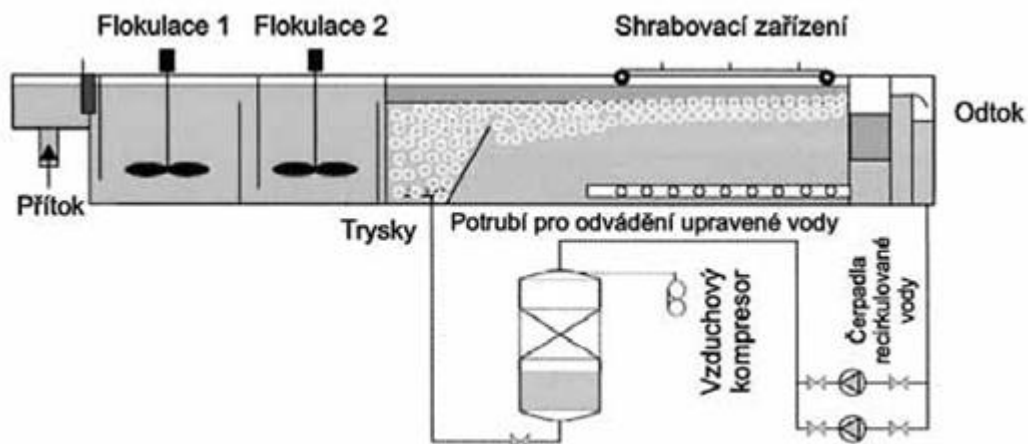
lesních porostů. Na druhou stranu mineralizace vody je velice nízká. Složení povrchových i podzemních vod v mělkých zdrojích je nepřímo ovlivňováno srážkovými vodami [8; 10].

### 2.2.1 Technologické procesy úpravy pitné vody a jejich účinnost

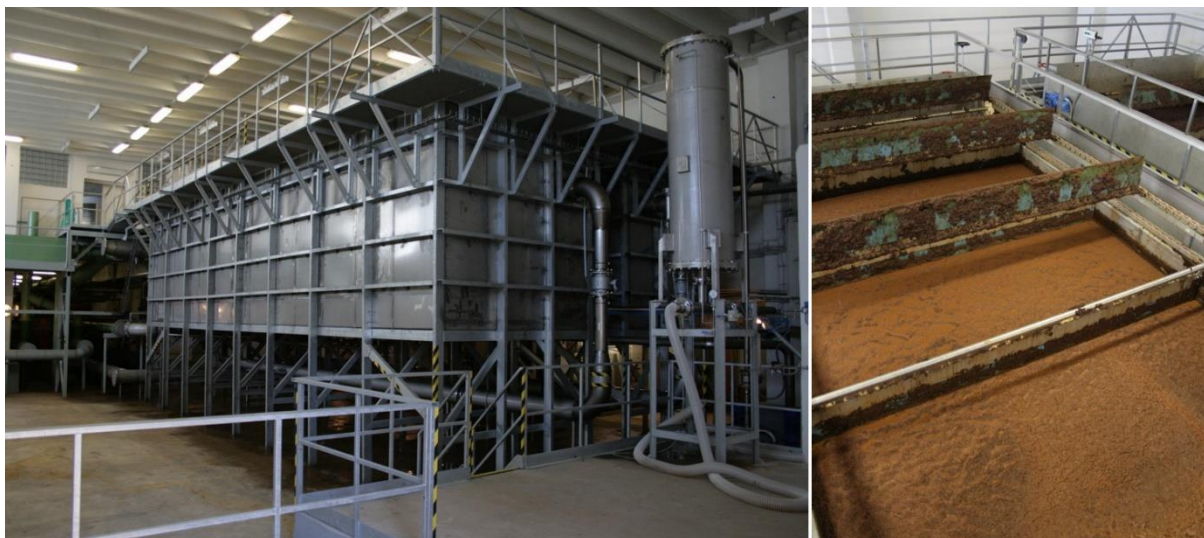
Technologické procesy jsou nezbytné pro úpravu vody na vodu pitnou. Dochází při nich k eliminaci nežádoucích látek pomocí několika různých technologií a k zajištění kvality požadované pro pitné vody.

Obvyklou technologií pro úpravu povrchové vody na vodu pitnou je čiření. Při tomto procesu dochází k převedení koloidních a jemně suspendovaných látek na separovatelné suspenze, které jsou dále separovány filtračními nebo sedimentačními způsoby. Podstatou čiření je koagulace, při níž dochází k destabilizaci koloidních částic vody přidáním koagulantu (hlinité nebo železité soli). Následujícím krokem je flokulace, tedy shlukování destabilizovaných koloidních částic do větších agregátů. Posledním krokem je separace vzniklých agregátů od vyčištěné vody. Separací metody pro oddělení tuhé fáze z vody se používají různé – filtrace, sedimentace, separace vznášeným ložem, flotace nebo membránové procesy.

Jako první separační stupeň v rámci dvoustupňové úpravy vody lze použít i flotaci. První vodárenská flotace v České republice byla uvedena do provozu na Úpravně vody Mostiště, která je provozována VODÁRENSKOU AKCIOVOU SPOLEČNOSTÍ, a. s., divize Žďár nad Sázavou. Principem flotace je separace tuhých nebo kapalných částic z kapalné fáze. K tomu dochází zavedením jemných bublin plynu do kapaliny, čímž dojde k vytvoření aglomerátů bublina – částice s hustotou nižší než kapalina. Vzniklé aglomeráty důsledkem působení vztlakové síly stoupají vzhůru k hladině kapaliny. Z hladiny se pak částice odstraňují jako plovoucí kal pomocí sběrného zařízení [8; 11].



Obrázek 1: Schéma klasického uspořádání zařízení flotace [12]



Obrázek 2: ÚV Mostiště - proces flotace [13]

Pro odstranění některých látek z vody je mnohdy nutné použít procesy koagulace, odželezování, odmanganování a někdy i odkyselování. Při těchto procesech pak vznikají suspence, které je potřeba odfiltrovat. Existuje mnoho druhů filtračních materiálů, aby účinnost filtrace byla vzhledem k odstranění požadovaných látek co nejúčinnější.

Pitnou vodu je potřeba zabezpečit i z hlediska sensorických vlastností (pach a chuť) a hygienických požadavků. Ve vodě mohou být obsaženy i ve stopovém množství karcinogenní nebo mutagenní látky, které by mohly ohrozit lidské zdraví. Desinfekce vody má za cíl zneškodnit choroboplodné zárodky a oxidaci anorganických i organických látek přítomných ve vodě. Účinek procesu je závislý na fyzikálních, chemických i mikrobiologických vlastnostech vody, na druhu a množství použitého oxidačního činidla a na zařazení procesu do technologické linky. Je třeba věnovat pozornost možnému vzniku vedlejších produktů desinfekce. Při úpravě vody chlorem se musí dbát na správné použití, jelikož může docházet k tvorbě chlorfenolů nebo trihalogenmethanů. Z tohoto důvodu se velmi rozšířilo použití ozonu nebo kombinace ozonu s ultrafialovým zářením, která rozkládá resistantní molekuly chlorovaných aromatických sloučenin [8].

Účinnost procesu úpravy pitných vod podléhá hydraulickým, mikrobiologickým i biologickým faktorům, a také zařízení, ve kterém tyto procesy probíhají. Úpravárenský proces na vodu pitnou musí splňovat tři kritéria. Voda musí mít přijatelnou jakost, musí být dodávána v dostatečném množství a souhrnné výrobní náklady by měly být minimální. Jakost upravené pitné vody musí odpovídat vyhlášce č. 252/2004 Sb. [2; 10].

### 2.2.1.1 Písková filtrace

Písková filtrace je obvyklou metodou pro separaci velmi malých mechanických nečistot z vody. Podstatou je objemová filtrace (filtrace vrstvou zrnitého materiálu), kdy dochází k zachycování nečistot v mezerách mezi zrny filtračního materiálu v celém objemu, čímž dochází k odstraňování částic nerozpuštěných látek z vody. V kombinaci s koagulací může filtrace odstraňovat i rozpuštěné látky. Objemové pískové filtry mohou být otevřené s kontinuálním nebo periodickým provozem nebo jako filtry tlakové s periodickým provozem. Existují varianty vícevrstevných filtrů a nově vyvinutá umělá média, které rozšiřují možnosti jejich použití a zlepšují vlastnosti filtrů [14; 15].

Další členění filtrů se zakládá na typu procesu odstraňování nečistot z vody, s kterým souvisí i rychlost filtrace. Biologický proces odbourávání nečistot vyjadřuje pomalou filtraci, naopak fyzikální proces vyjadřuje rychlou filtraci. Z tohoto důvodu bývá filtrace označována jako pomalá biologická

filtrace nebo rychlofiltrace. Pomalá filtrace patří mezi nejstarší způsoby filtrace. Technologie pomalé filtrace má uplatnění především pro menší kapacity a tam, kde nejsou limitováni plochou. Tento proces je analogií čistících procesů povrchových vod v přírodě. Používá se k odstranění zákalu, snižuje počet bakterií a virů ve vodě a mimo jiné na povrchu náplně dochází k rozkladu organických látek mikroorganismy, čímž se na povrchu náplně vytvoří biologická membrána. Mikrobiální horní vrstva písku, která sahá až do hloubky 40 cm, je technologicky nejúčinnější i nejhodnotnější. Podmínkou pro správné působení biologické filtrace je přítomnost kyslíku v upravovaných vodách. Průměrná filtrační rychlost se pohybuje okolo 0,2 m.h<sup>-1</sup>. Vyhovující filtrační materiál pro proces pomalé filtrace je křemičitý písek o různé velikosti zrn vzhledem k druhu náplně. Celková výška filtrační náplně se pohybuje v rozmezí 150 – 200 cm a výška vody nad náplní má být nejméně 0,5 m. Pokud dojde k dosažení maximální hodnoty odporu filtru, je nutné provést regeneraci filtrační náplně, tedy vrchní nejvíce zanesenou vrstvu seříznout. V malých provozech se seříznutý písek nečistí a používá se po dvou až třech letech mineralizace jako doplňující náplň. Ve velkých provozech jsou nezbytné mechanické prostředky pro manipulaci s pískem a tyto stroje se řeší většinou individuálně. Při regeneraci praní je filtr mimo provoz a to nejdéle 24 hodin, neboť je to maximální doba přerušení dodávky kyslíku, kterou mikroorganismy biologické vrstvy snesou [10; 14].

Rychlofiltrace je nejpoužívanější technologií ve vodárenství. Od pomalé filtrace se liší zejména v menším zastavěném prostoru, větší hrubosti filtrační náplně a tím i větší rychlostí. Rychlé filtry se z hlediska různých aspektů dělí podle:

Tabulka 2: Systematické rozdělení rychlých filtrů [10]

režimu proudění	konstrukce	směru proudění	způsobu provozu	počtu vrstev
otevřený (gravitační) tlakový	evropské americké	shora dolů zdola nahoru obousměrné	s cyklickým praním s kontinuálním praním	jednovrstvé vícevrstvé

Množství nerozpuštěných látek ve filtrátu má z počátku v závislosti na čase klesající tendenci až k minimu a poté následuje plynulý vzestup. Čím je koncentrace těchto látek v přítoku na filtr vyšší, tím rychleji se náplň filtru zanáší. Výsledná koncentrace nerozpuštěných látek ve filtrátu se porovnává s předepsanou hodnotou, čímž lze posoudit funkci filtru. V průběhu filtrace vzniká tlaková ztráta filtrační vrstvy, která je shodná s hydraulickým odporem vrstvy. Pokud tlaková ztráta vzroste na hodnotu tlakového spádu nebo dojde k překročení stanovené hodnoty nerozpuštěných látek, je nutné ukončit filtrační cyklus a náplň vyprat. Pokud se dosáhne obou kritérií současně, je provoz filtru optimální [14].

Regenerace pískové vrstvy má výhodu v jednoduchosti a nízkých pořizovacích nákladech i v případě její výměny. Nezbytnost praní je stejně důležitá jako vlastní filtrace, jelikož nedostatečné praní zkracuje filtrační fázi a zdražuje provoz filtru. Typ praní se stanovuje vzhledem ke konstrukci filtru. Filtrační náplň se pere buď vodou, nebo vzduchem a vodou. Filtrační vrstva se může prát i postupně všemi způsoby, nejdříve vzduchem, pak společně s vodou a v poslední fázi pouze vodou, až je odtékající voda čistá [14; 15].

Mezi nejpoužívanější rychlofiltry se řadí otevřený rychlofiltr s prouděním shora dolů. Přítok suspenze je umístěn pod hladinou vody, dále protéká filtrační vrstvou a postupuje přes filtrační hlavice do prostoru pod mezidnem. Odtud přefiltrovaná voda odtéká dále. Přívod prací vody a pracího vzduchu je umístěn v prostoru pod mezidnem [16].

Tlakové pískové filtry jsou navrženy pro úpravu nebo filtraci vody v provozech, ve kterých je nezbytné udržet přetlak vody. Podle konstrukce rozeznáváme dva typy tlakových filtrů, tj. vertikální a horizontální. Z hlediska menšího nároku na plochu jsou více využívány filtry vertikální. Filtry mohou být jednovrstvé i vícevrstvé. Obecně jsou tlakové filtry zhotoveny z kovových materiálů, z nerezové

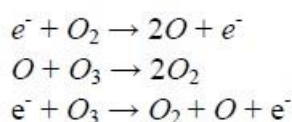
oceli a sklolaminátu. Výhoda tlakových filtrů v porovnání s otevřenými je snížené riziko druhotné kontaminace upravované vody, naopak jejich nevýhoda spočívá v ztížené kontrole vnitřku filtru a funkčnosti náplně [10].

### 2.2.1.2 Ozonizace

Důvody pro rostoucí míru znečištění můžeme nalézt v procesu industrializace, intenzivního zemědělství, stejně jako ve všech možných zdravotnických prostředcích. Jakmile mikro znečišťující látky vstoupí do lidského potravinového řetězce prostřednictvím pitné vody, představují dlouhodobé riziko pro zdraví člověka i zvířete. Tradiční metody úprav již nestačí k zajištění úplného odstranění těchto nečistot [17].

Ozon se běžně používá pro úpravu vody v městských i průmyslových aplikacích. Vyrábí se na místě použití a tím snižuje požadavky na manipulaci s chemikáliemi. Je silně reaktivní a nestabilní, proto se vyrábí přímo na místě použití v generátorech ozonu z plynů obsahujících kyslík pomocí tichého elektrického výboje. Mezi dvě elektrody, které jsou vzájemně od sebe odděleny dielektrikem a dvěma vybíjecími komorami, se přivádí vysoké napětí. Ozon je generován velkým množstvím mikrovýbojů, které trvají jen několik nanosekund a účinnost generátoru je závislá na množství faktorů. V závislosti na vstupním plynu se mění časový interval tvorby ozonu. Použití čistého kyslíku jako vstupního plynu může až 2,5 krát zkrátit dobu tvorby ozonu. Účinnost je také závislá na chlazení dodávaného plynu, na síle elektrického pole a na konstrukci generátoru. Používá se suchý plyn, proto se jedná o suchý proces. Koncentrace ozonu 20 – 60 g/m<sup>3</sup> lze vyrobit ze suchého vzduchu při spotřebě energie 12 – 18 kW/kg ozonu. Tento proces je opět závislý na koncentraci a teplotě chladicí vody [18; 19].

Výhoda ozonu je v šetrnosti k životnímu prostředí. Škodlivé látky, barvy, zápach i mikroorganismy jsou zničeny přímo oxidací, bez vytváření škodlivých chlorovaných vedlejších produktů. Reakce se zahájí v momentu, kdy jsou molekuly kyslíku štěpeny elektrony z korónového výboje. Poté atomární kyslík i elektrony mohou reagovat s ozonem. Ozon se rozpadá za vzniku atomárního kyslíku, který se buď slučuje na molekulární kyslík, nebo reaguje s přítomnými organickým nebo anorganickými látkami. Použití ozonu je jednou z nejúčinnějších technologií pro poskytnutí vysoce kvalitní pitné vody. Díky ekologickému způsobu, jakým funguje, se ideálně hodí pro trvale udržitelnou úpravu pitné vody.



Obrázek 3: Reakce ozonu [18]

Ozon lze aplikovat do pitné vody pomocí několika metod, které mohou být použity buď v jednom stupni, nebo ve více stupňovém zpracování. Ozon může být provozován s různými koncentracemi přiváděného plynu v rozmezí od 10 do 15 % hm. Ozon, který nebyl rozpuštěn během kontaktování, musí být převeden před vypuštěním do atmosféry zpět na kyslík nebo ozonizací opětovně použit [20].

I u ozonizace hrozí riziko vzniku vedlejších produktů. Ozonizace přírodních vod produkuje polární organické sloučeniny, zejména aldehydy a karboxylové sloučeniny. Vznik těchto látek lze pravděpodobně přisoudit oxidačnímu rozpadu přírodních organických sloučenin s vysokou molární hmotností, čímž jsou míněny obzvláště huminové a fulvinové kyseliny. Předpoklad tvorby těchto vedlejších produktů spočívá v připojení ozonu na nenasycenou boční část postranních řetězců nebo aromatickou funkční skupinu přírodní organické látky s rozmanitou strukturou. Obavy z polárních vedlejších produktů ozonizace jsou spojeny s jejich vysokou biologickou rozložitelností, neboť vysoká hladina těchto látek v distribuční síti podporuje obnovu mikrobiálního růstu, což může způsobovat provozní problémy, ale také spotřebitele může vystavit nepříjemnému onemocnění zažívacího ústrojí. Pro zmínku jsou v tabulce č. 5 uvedeny i další varianty možných vedlejších produktů ozonizace [21].

Tabulka 3: Účinnost odstranění kontaminantů [17]

Aplikace	Kontaminanty	Ozon	UV
Průmyslové chemikálie	1,4-Dioxan	0	0
	MTBE	0	0
	NDMA	0	+
Pesticidy	Atrazin	+	0
	Bromacil	++	0
Farmaceutika	Diklofenak	++	+
	Carbamazepin	++	0
	Ibuprofen	+	0
	Kyselina amidotrizoová	+	+
	Johexol	+	+
	Hormony	++	0
Chuť & Zápach	Geosmin	++	0
	MIB	++	0
Odbarvování		++	0
Desinfekce		+	++

\* ++ = Odstranění 81 – 100 %, + = Odstranění 81 – 50 %, 0 = Odstranění méně než 50 %

### 2.2.1.3 Filtrace přes granulované aktivní uhlí

Na počátku sedmdesátých let, bylo oznámeno, že bakterie, které proliferyjí ve filtrech granulovaného aktivního uhlí (GAU nebo GAC, z angl. Granular Activated Carbon) můžou být zodpovědné za zlomek odstranění organických látek z filtru. Na základě tohoto objevu bylo zjištěno, že pre-ozonizace významně zvýší biologickou aktivitu granulovaného aktivního uhlí. Kombinace ozonizace a GAC se běžně označuje jako proces biologického aktivního uhlí (BAC, z angl. Biological Activated Carbon). Biologická písková filtrace po ozonizaci má potenciál k dalšímu odstranění některých organických látek přítomných ve stopových koncentracích a má schopnost snižovat nescifickou toxicitu. Aktivní uhlí je běžně používaným médiem pro podporu biologické aktivity a je účinnější než písek. Filtrace přes biologické aktivní uhlí (BAC) se používá již mnoho let při úpravě pitné vody, obvykle po ozonizaci. Bylo prokázáno, že filtrace přes BAC, je schopna významně odstranit přírodní organické znečištění, ozonizační transformační produkty, prekuzory dezinfekce vedlejších produktů, snižuje současně i obsahy těžkých kovů a stejně tak může zlepšovat chuť a pach vyrobené vody [22].

Sorpce na granulovaném aktivním uhlí zajišťuje značné snížení koncentrací mikropolutantů v upravené vodě. Granulované aktivní uhlí je sorpční materiál, který svou pórovitou strukturou a velkým vnitřním povrchem adsorbuje široké spektrum látek. GAU existuje buď tvarované (protlačováním/lisováním) nebo nepravidelného tvaru. Označení nepravidelný tvar se obvykle používá pro zrněné aktivní uhlí, které se ve vodárenství používá častěji. V rámci experimentu prováděném na úpravě vody Plzeň z roku 2007 bylo zjištěno, že koncentrace zbytkových léčiv po ozonizaci je výrazně snižována a po průchodu kolonami s aktivním uhlím nebyla již ve vzorcích téměř žádná léčiva nalezena [23].

Granulované aktivní uhlí se využívá pro kontinuální úpravu vody. Při filtraci dochází po průtoku určitého množství vody k nasycení adsorpčních center adsorbentu a k průniku adsorbátu do upravené vody. Při konstantním povrchovém zatížení lze zaznamenat závislost koncentrace látky, která je adsorbována v odtoku z adsorpční kolony, na čase. Zbytková koncentrace se zpočátku jen pozvolna zvyšuje, pak následuje rychlý vzestup a před dosažením tolerované zbytkové koncentrace je potřeba filtr reaktivovat. Granulované uhlí po vyčerpání sorpčních vlastností můžeme nechat reaktivovat. Reaktivace se zpravidla provádí v reaktivačním závodě, kde tato úprava se realizuje mnohdy termickým způsobem, případně i kombinací s chemickou úpravou. Vlastní reaktivace zahrnuje sušení, desorpci těkavých



organických látek při teplotách do 250 °C, pyrolýzu a karbonizaci netěkavých organických látek při teplotách do 750 °C, aktivaci při 800 °C a tím vytvoření velkého vnitřního povrchu [8].

Základní kvalitativní kritéria, která je potřeba zohlednit při výběru GAU, jsou následující:

- Adsorpční vlastnosti
- Hydrodynamické vlastnosti
- Mechanická odolnost
- Čistota
- Vhodnost reaktivace
- Vhodnost jako nosič biomasy.

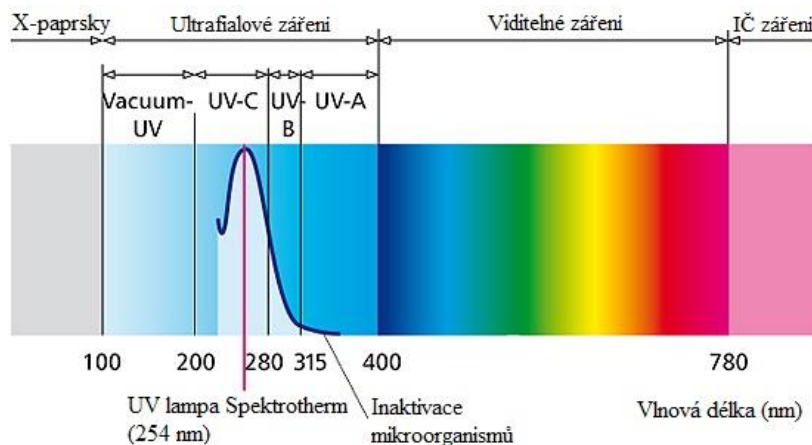
Aktivní uhlí typicky obsahuje uhlík a to ve více než 90 % hmotnosti. Zbytek chemického složení, tedy do 10 % hmotnosti, tvoří popel, který se skládá z SiO<sub>2</sub>, CaO, MgO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a zbytků fosforu z aktivace [24].

Při zvažování výměny GAU nebo jeho reaktivace musí být posuzováno několik faktorů. Nejkritičtější je zbývající adsorpční kapacita uhlíku. Tato kapacita má zajistit mimo jiné odstranění látek patřících do skupiny DOC (z angl. dissolved Organic Carbon), případně DBP (z angl. disinfection by products). Za těchto podmínek se životnost GAU pohybuje v rozmezí od šesti do 12 měsíců. Adsorpční kapacita může být také nezbytná pro kontrolu chuti a zápachu. Pro tento účel, lze očekávat životnost od dvou do pěti let. Adsorpční kapacita je důležitá i v případě, že voda obsahuje kontinuální nebo ojedinělou přítomnost mikropolutantů jako jsou syntetické organické chemikálie, pesticidy, atd. V těchto podmínkách je životnost uhlí běžně jeden až dva roky [25].

#### 2.2.1.4 UV záření

Použití chloru, oxidu chloričitého, chlornanu sodného a dalších chemických látek používaných k dezinfekci vody může vést k účinkům, které jsou škodlivé pro zdraví člověka i životní prostředí. UV technika je tedy lepší alternativou. S UV technologií je možné zničit více než 99,99 % všech patogenů během několika vteřin, bez přidání chemických látek, bez škodlivých vedlejších účinků, levně, vysoce efektivně a naprosto spolehlivě. Navíc v současnosti při této technologii není nutné použití kapalné rtuti uvnitř lampy [26].

UV záření je fyzikální metoda desinfekce pitné vody. Účinek UV záření spočívá v působení na disperzní systém protoplazmy mikroorganismů neboli na strukturu DNA, v nichž způsobí změnu struktury a tím dojde k inaktivaci, popř. k usmrcení organismu. Ultrafialové záření je složkou elektromagnetického spektra o vlnové délce 100 – 400 nm. Silný baktericidní účinek UV záření se pohybuje okolo hodnoty vlnové délky 254 nm (to je spjato s ozářením dávkou 400 J/m), kde se objevuje maximum absorpce DNA. Tímto dochází k inaktivaci mikroorganismů bez vzniku vedlejších produktů.

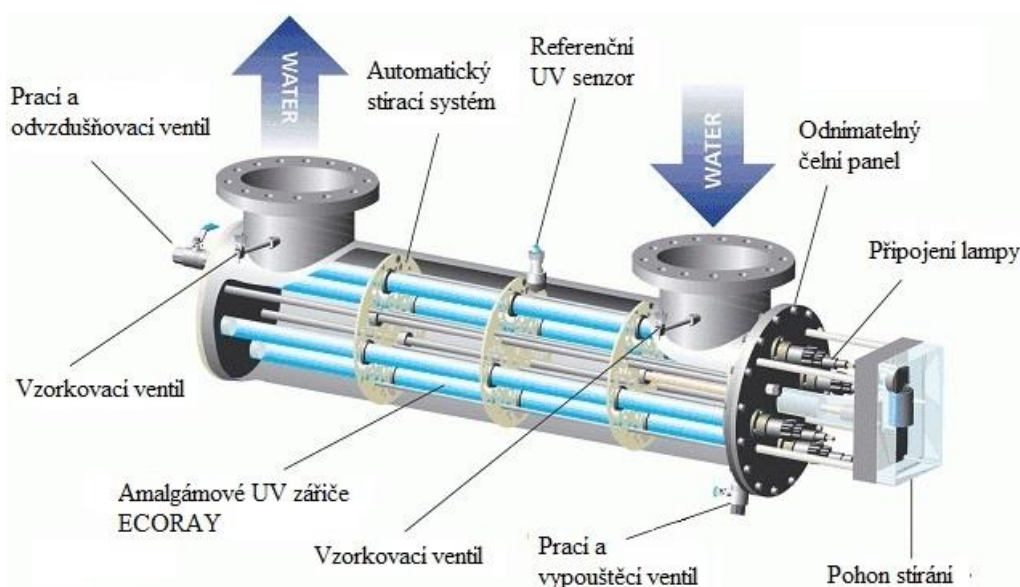


Obrázek 4: Znázornění UV oblasti a účinnosti desinfekce v závislosti na vlnové délce [27]



Zdrojem UV záření jsou nízkotlaké, středotlaké nebo vysokotlaké UV výbojky. Obvyklé provedení zařízení na ošetření vody pomocí UV sestává z reaktoru, ve kterém je zabudovaná trubice z křemenného skla. Do trubice se vkládá zdroj UV záření neboli zářič. Voda cirkuluje v tenké vrstvě kolem lamp a je ozářena určitou dávkou záření, která odpovídá intenzitě záření a době osvětlení. Bývá přítomen i UV senzor, který nepřetržitě hlídá a měří hodnotu ozáření v reaktoru, jejíž minimální hodnota je stanovena výrobcem nebo určena certifikátem. Senzor sleduje i stárnutí lamp, zanášení křemenných trubic nebo kvalitu vody [8].

Pro desinfekční účinek je rozhodující dávka radiace  $D$ . Je to násobek intenzity radiace  $I$ , vztažený na plochu ozáření, a časového intervalu působení radiace. Časový účinek záření vyjadřuje rychlost úbytku bakterií, což vystihuje vztah  $dN/dt = -k \cdot N$ .  $N$  v rovnici vyjadřuje počet mikroorganismů, které přežily v čase  $t$  a  $k$  je konstanta. Avšak rezistence proti záření je různá dle druhu organismu.



Obrázek 5: Schéma standardního UV reaktoru [28]

### 2.2.1.5 Chlorace

Chlor je zatím nejběžnějším desinfekčním i oxidačním prostředkem při chemické úpravě vody. Chlor je žlutozelený plyn těžší než vzduch a ve vodě dobře rozpustný. Hydrolýza molekulárního chloru probíhá podle reakce:



Za normálních podmínek je rovnovážný stav posunut doprava, proto nezhydrolyzované množství chloru je zanedbatelné. Při nízkém pH a velké koncentraci chloridových iontů ve vodě je nutno počítat s neúplnou hydrolýzou. Obecně je chlor přítomný ve vodě ve třech formách, tj. nezhydrolyzovaný chlor, chlornanový ion a kyselina chlorná. Následující tabulka popisuje závislost obsahu nezhydrolyzovaného chloru v % na pH.

Tabulka 4: Závislost množství nezhydrolyzovaného  $\text{Cl}_2$  na pH

pH	Obsah $\text{Cl}_2$ (%)
0	77
1	25
2	3,2
3	0,3
4	0,03

Složitější situace nastává v přítomnosti amonných iontů, které se obvykle dávkují ve formě roztoku síranu amonného. Tento způsob desinfekce se používá pro zabezpečení dlouhých řádů, jelikož vzniklé chloraminy po určité době opět hydrolyzují, takže se přebytek chloru udrží po delší dobu [10].

Chlor se do vody dávkuje pomocí tzv. chlorátorů (dávkočáče plynů) a způsob chlorace může být přímý nebo nepřímý. Přímý způsob se zakládá na expanzi chloru, který se čistí, měří a nakonec se rozptýluje do vody ve formě drobných bublin. Při nepřímé chloraci po redukcí tlaku chloru dochází k odměření množství a připraví se 2 – 5% roztok, který se následně přidává k upravované vodě. Některé povrchové vody mohou vyžadovat i vysoké dávky chloru, přebytek chloru se pak odstraňuje přidávkem thiosíranu nebo siřičitanu sodného [14].

Vzhledem k zabezpečení nezávadnosti pitné vody je nutná znalost vzniku vedlejších produktů desinfekce chlorem a možnosti jejich snížení. Vedlejší produkty při jejich pravidelném nebo dlouhodobém požívání představují riziko a mohou mít negativní vliv na zdraví člověka. Mezi nejvýznamnější vedlejší produkty chlorace vody patří trihalomethany (THM). Další nezanedbatelné produkty jsou halogenoctové kyseliny (HAA), halogenacetonitrily (HAN), furanony (MX), chlorfenoly nebo chlorpikrin. Pokud je ve vodě přítomen i brom, mohou se tvořit i bromované vedlejší produkty. Nejčastější vyskytující trihalomethan je chloroform. V přítomnosti bromu se pak mohou vytvářet i bromdichlormethan, dibromchlormethan nebo tribrommethan. Byly prokázány mutagenní a karcinogenní vlastnosti THM, mohou způsobovat rakovinu jater, ledvin, močového měchýře, tlustého střeva, konečníku a mají i negativní dopady na reprodukční funkce. Vzhledem k jejich těkavé povaze je nebezpečný i jejich dermální nebo inhalační příjem. Tyto nežádoucí látky jsou spojeny s výskytem prekurzorů (látky schopné reagovat s chlorem za vzniku organohalogenů) v upravované vodě. Jedná se především o makromolekulární organické látky, což jsou zejména huminové látky, řasy, sinice a jiné mikroorganismy [21].

### **2.2.1.6 Desinfekce oxidem chloričitým**

Desinfekce oxidem chloričitým, také označována jako desinfekce chlordioxidem, v současnosti stále častěji nahrazuje chlor v mnoha aplikacích. Oxid chloričitý je značně nestabilní plyn, nemůže být ve stlačené formě skladován ani transportován. Má silné oxidační účinky a za běžných podmínek jde o oranžový, ve vodě rozpustný plyn. Existují dva nejběžnější způsoby generování oxidu chloričitého, každý z nich má své specifické výhody.  $\text{ClO}_2$  lze připravit reakcí chloritanu sodného s chlorem nebo s kyselinou chlorovodíkovou. Reakce s chlorem vyžaduje asi 40 % přebytek chloru, mírně kyselé prostředí a tato příprava je diskontinuální. Ve srovnání s druhou metodou má nevýhodu ve vyšších investičních nákladech, zatímco výhoda spočívá v zachování dávkování chloru jako rezervního dezinfekčního činidla. Reakce s kyselinou chlorovodíkovou využívá počáteční chemikálie o nízkých koncentracích a sama dodávaná kyselina chlorovodíková s koncentrací 30 – 38 % se ředí na 9 %. Z důvodu bezpečnosti a spolehlivosti provozu nesmí mít vzniklý oxid chloričitý v reaktoru koncentraci vyšší než 2 %. Oxid chloričitý lze však připravit i pouhým smícháním chemikálií, jedná se o použití v menším množství [29].

Přes veškeré výhody použití oxidu chloričitého pro desinfekci pitné vody představuje i tento způsob zabezpečení vody potenciální riziko pro lidské zdraví. Oxidací přirozených organických látek oxidem chloričitým se mohou vytvářet nežádoucí látky v podobě anorganických vedlejších produktů chloritanů ( $\text{ClO}_2^-$ ) a chlorečnanů ( $\text{ClO}_3^-$ ). Množství chloritanů vznikajících při desinfekci vody dosahuje kolem 60 % a obsah chlorečnanů se pohybuje okolo 7 – 8 % dávky  $\text{ClO}_2$ . Z dlouhodobého hlediska mohou chloritany způsobovat poruchy hemolytického systému, nízké dávky hemolytickou anemii či poškození buněčných membrán červených krvinek, naopak vyšší dávky mohou přispět k methemoglobinemii [21].

Tabulka 5: Přehled vedlejších produktů dezinfekce [21]

způsob dezinfekce	vedlejší produkty		
	prekurzory	hlavní vedlejší produkty	
Plynný chlor	makromolekulární organické látky	trihalomethany	trichlormethan
	makromolekulární organické látky a bromidy		bromdichlormethan dibromchlormethan tribrommethan
	makromolekulární organické látky	halogenoctové kyseliny	kyselina chloroctová kyselina dichloroctová kyselina trichloroctová
	makromolekulární organické látky a bromidy		kyselina bromoctová kyselina dibromoctová
	fenolické sloučeniny	chlorfenoly	
	amonné ionty	chloraminy	
oxid chloričitý	předávkování ClO <sub>2</sub>	chloritany chlореčnany	
ozon	makromolekulární organické látky	aldehydy	karboxylové sloučeniny butanal pentanal heptanal formaldehyd acetaldehyd dialdehyd glyoxal ketoaldehyd methylglyoxal
	meziprodukt		peroxydy a epoxidy
	bromidy	bromičnany	
	bromidy a přírodní organické látky	bromované vedlejší produkty	bromoform kyselina bromová bromoacetonitril

### 2.3 Hormonální látky v pitných a povrchových vodách

Hormonální a jim podobné látky se do povrchových vod dostávají zvláště prostřednictvím splaškových odpadních vod, které se po průchodu čistícím procesem vypouštějí do vod přírodních. Jedná se o rozsáhlou skupinu látek antropogenního nebo přírodního původu. Do splaškových odpadních vod se hormony dostávají především lidskou činností. Nejčastějším zdrojem je lidská moč, která obsahuje různé množství a druhy hormonů v závislosti na pohlaví a věku jedince a na množství přípravků, které užívá. Dalším zdrojem hormonů může být spláchnutí přípravku s prošlou dobou spotřeby do toalety nebo přímo vyhození do odpadu. Mezi významné skupiny hormonálních polutantů se řadí estrogeny, které jsou součástí hormonální antikoncepce, kterou v současnosti užívá téměř 50 % žen. Povrchové vody jsou většinou nejvíce exponované části životního prostředí, obzvláště v blízkosti velkých aglomerací a ČOV (čistírny odpadních vod). Výskyt xenobiotik v těchto oblastech je závislý na stavu vodního ekosystému a na účinnosti čistírenského procesu.

Kontaminovaná povrchová voda je zdrojem vody pro úpravu na vodu pitnou. Je nezbytné předpokládat, že k odstranění hormonálních látek během standardních procesů úpravy pitné vody nedochází. Mnohem účinnější je užití absorpce látek na aktivní uhlí a ozonizace. Pro některé látky i tyto

technologie mohou být nedostačující, proto je více než nutné, aby výrobce pitné vody reagoval doplněním vhodného typu technologie, pokud není k dispozici jiný zdroj surové vody. V České republice byla v roce 2009 provedena studie na výskyt estrogenů v okolí Prahy. Značná část Prahy je zásobena pitnou vodou z úpravny Želivka a z vodárny v Káraném. Výsledkem studie bylo zjištění koncentrace estrogenů  $2,3 \text{ ng.l}^{-1}$  po vyčištění vody v úpravně Želivka a ve vodě z Káraného žádný estrogen zjištěn nebyl [30].

Mnohé výzkumy dokazují, jak hormony působí na živočichy a v poslední řadě také na člověka. Vlivem zvýšené koncentrace estrogenických látek ve vodách dochází k feminizaci samců ryb a u samic se pak nevytvářejí vajíčka. Následkem dlouhodobého působení nedochází k rozmnožování a celé populace pak vymírají [31].

### 2.3.1 Hormony

Slovo hormon vzniklo poprvé v roce 1905, kdy ho definoval britský fyziolog Ernest Henry Starling při popisu sekretinu. Vznikl z řeckého slova *hormaein* a jeho význam je excitovat, povzbudit, pohnat [32].

Hormony se tvoří ve žlázách s vnitřní sekrecí (hypofýza, štítná žláza, nadledviny, aj.) nebo v difuzně rozestých endokrinních buňkách (v centrální nervové soustavě, v srdečních síních, atd.). K cílovým buňkám jsou roznášeny krevním oběhem. Hormony mohou působit parakrinně, tj. na sousední buňky nebo naopak endokrinní účinky mohou mít i některé signální látky imunitního systému. Hormony jsou vysoce účinné chemické látky, které v mnohobuněčném organismu působí jako nosiče informací. Zajišťují vzájemnou komunikaci mezi buňkami a tkáněmi a jsou významné svou řídicí funkcí. Hormonální soustava reguluje přímo nebo nepřímo veškeré fyziologické procesy organismu, tj. růst, rozmnožování, celkový metabolismus, hospodaření s vodou a jednotlivými ionty a udržuje stálost vnitřního prostředí (tzv. homeostázu) [33; 34].

Specifita cílových buněk je dána přítomností receptorů, na které se hormony vážou. Vzniká tak komplex hormon – receptor, který spouští biologickou odpověď charakteristickou pro danou cílovou buňku (např. tvorba specifických proteinů). Vytvořený komplex hormon – receptor spouští kaskádu enzymatických reakcí, které zvyšují počet signálních molekul, jež odpovídají za dosažení vysokého biologického účinku. Molekuly polutantu mohou svou podobností originálnímu hormonu aktivovat odpovídající receptory buněk. Ke spuštění procesu stačí jen velmi malé množství hormonálně aktivní látky. Každá látka působí jinak, na jiné receptory, v jiných koncentracích a lišit se může i v síle vazby. Studovány jsou zejména pohlavní hormony, protože důsledky jejich působení mohou mít významný vliv na populaci a postupem času i na ekosystém [5; 32].

Hormony lze rozdělit do skupin dle několika kritérií:

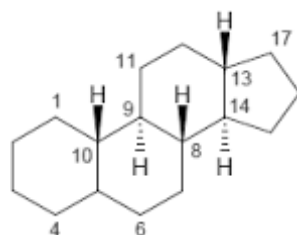
- Podle chemické struktury se hormony rozlišují na peptidové, steroidní a na hormony odvozené od aminokyselin.
- Podle způsobu účinku se dělí na hormony regulační, které ovlivňují činnost jiných endokrinních žláz a na hormony s přímým účinkem na tkáň.
- Podle rozpustnosti se hormony rozdělují na hormony rozpustné v tucích, což jsou hormony štítné žlázy a steroidní hormony a na hormony rozpustné ve vodě, kam patří všechny ostatní.
- Podle převažujícího účinku rozlišujeme hormony s výraznými metabolickými účinky, hormony řídicí minerální hospodářství a hormony angažující se v reprodukčních funkcích [35].

Všichni lidé, stejně jako zvířata, mohou vylučovat steroidní hormony ze svých těl, které pak skončí v životním prostředí prostřednictvím vypouštění odpadních vod a využitím nebo likvidací živočišných exkrementů. Mohou narušovat normální fungování endokrinních systémů, a tím ovlivňovat reprodukci

a vývoj volně žijících živočichů. Potenciální obavy jsou především z estrogenů, tudíž steroidních hormonů a antikoncepčních přípravků [36].

### 2.3.2 Steroidní hormony

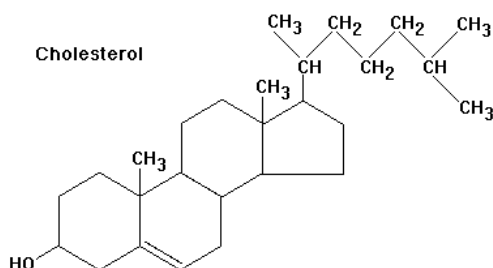
Steroidní hormony jsou skupinou biologicky aktivních látek, které jsou syntetizovány z cholesterolu. Ve struktuře cholesterolu je obsažen tetracyklický skelet gonan, z něhož se odvozuje struktura většiny steroidních látek. Přírodní steroidy jsou vylučovány v kůře nadledvin, varlat, vaječnicků a placenty u člověka a zvířat, a zahrnují mimo jiné progestiny, glukokortikoidy, mineralkortikoidy, androgeny a estrogenery.



Obrázek 6: Gonan

Steroidní hormony se obecně dělí na kortikoidy a pohlavní hormony. Kortikoidy jsou produkovány kůrou nadledvin. Mezi pohlavní hormony se řadí androgeny, tedy mužské pohlavní hormony produkovány varlaty, dále estrogenery a gestageny, což jsou ženské pohlavní hormony produkovány zejména folikuly vaječnicků.

Estrogenery, což jsou např. estradiol, estron a estriol, jsou důležité pro zachování zdravých reprodukčních tkání, prsou, kůže a mozku. Progestiny jsou skupina hormonů, kam patří progesteron a ten si lze představit jako hormon vyvažující hladinu estrogenů. Mezi androgeny řadíme testosteron, dehydroepiandrosteron a androstendion. Tyto hormony hrají důležitou roli při regeneraci tkáně, zejména kůže, kostí a svalů. Glukokortikoidy a jejich nejvýznamnější hormon kortizol je produkován v nadledvinkách v reakci na stresory, jako jsou emocionální otřes, cvičení, nemoc nebo hladovění. Kromě toho se některé syntetické steroidy, jako je ethinylestradiol a mestranol, používají jako hormonální antikoncepce [36].



Obrázek 7: Struktura cholesterolu [37]

### 2.3.3 Estrogenní sloučeniny

Látky estrogenního charakteru se běžně vyskytují v povrchových i odpadních vodách. Mohou mít přírodní i antropogenní původ a jejich přítomnost ve složkách životního prostředí i v stopových koncentracích může mít dopad na živé organismy. Současný výzkum stále sleduje vztah mezi expozicí člověka endokrinními disruptory a výskytem některých onemocnění, poruch reprodukčního systému a vývojových vad plodu.

Estrogenery lze rozdělit do dvou skupin: endogenní a exogenní (též environmentální). Environmentální estrogenery pak můžeme dále dělit podle původu na fytoestrogeny (původ z rostlin), mykoestrogeny

(produkt některých plísní) a xenoestrogeny (antropogenní původ). Fytoestrogeny jsou obsaženy v různých druzích rostlin, jako jsou obilniny, luštěniny, listová zelenina, traviny a některé ovoce. Mezi nejběžnější patří isoflavonoidy, lignany, laktony, steroly, naringeniny. Příkladem mykoestrogenů je zearalenon, což je toxin produkovaný plísněmi, který napadá některé druhy obilnin. Xenoestrogeny vznikají průmyslovou výrobou různých chemických látek, popř. jsou to jejich metabolity, řadí se sem pesticidy, ftaláty, alkylfenoly, nízkochlorované polychlorované bifenyly, některé acidobazické indikátory, polychlorované dibenzo-p-dioxiny a furany. Významným zdrojem jsou již několikrát zmíněné farmaceutické přípravky a tudíž hormonální antikoncepce.

Strukturní rys estrogenních sloučenin spočívá v přítomnosti fenolu nebo jeho funkčního ekvivalentu, s volnou polohou ortho a s poměrně objemnými hydrofobními skupinami v polohách meta nebo para. Tyto rysy nejsou nutnou podmínkou estrogenního působení. Obecně estrogenní sloučeniny vykazují lipofilní charakter, odolnost vůči rozkladu a schopnost bioakumulace v tukové tkáni a biomembránách [38].

Ženy produkují estrogeny především ve vaječnících, ale také tukovými buňkami a v nadledvinách. Estrogeny hrají roli ve vývoji sekundárních pohlavních znaků v pubertě, jako jsou prsa a ochlupení těla. Regulují menstruační cyklus a růst děložní sliznice během první části menstruačního cyklu. Pokud ženské vajíčko není oplodněno, hladina estrogenu rychle klesá a začíná menstruace. Pokud je vajíčko oplodněné, estrogen spolupracuje s progesteronem v průběhu těhotenství na zastavení ovulace. Během těhotenství produkuje estrogen (konkrétně hormon estriol) placenta. Estrogen řídí laktaci a další změny v prsní tkáni během těhotenství. Estrogen má zásadní význam pro tvorbu kostí. Ve středním věku hladiny estrogenu v těle začnou klesat a proces přestavby kostí se zpomaluje. To je důvod, proč ženy po menopauze mají čtyřikrát větší pravděpodobnost, že mohou trpět osteoporózou než muži. Estrogen hraje roli v krevní srážlivosti, zachování pevnosti a tloušťky vaginální stěny a v celé řadě dalších tělesných funkcí. Ovlivňuje kůži, vlasy, sliznice a svaly pánevního dna a také ovlivňuje mozek. Muži produkují estrogen v menším množství než ženy a je vylučován v nadledvinách a varlatech. Může mít vliv na počet spermií [39].

Analytické metody pro stanovení estrogenních sloučenin ve vodách jsou založeny na separaci látek ze vzorku, nejčastěji pomocí extrakce, a následné identifikaci nebo kvantifikaci látek vhodnou chromatografickou metodou [38].

## 2.4 Ekotoxicita povrchových a pitných vod

Ekotoxicita je jednou ze základních charakteristik chemických látek, přípravků a odpadů. Vodní prostředí je ekologický systém mimořádně ohrožovaný působením a kumulací řady cizorodých látek. Přírodní jevy jako jsou sopky, přemnožení řas a sinic, bouře nebo zemětřesení, zemědělská činnost, což je zejména splavování průmyslových hnojiv srážkami a eroze půdy a především antropogenní kontaminace, způsobují velké změny v kvalitě povrchové vody i v jejím ekologickém stavu. Takto znečištěná voda pak může ohrozit zdroje pitné vody [7].

Ekotoxikologie zkoumá působení látek antropogenního nebo přírodního původu na živé organismy, populace a společenstva. Sleduje účinky zmíněných látek na různých organizačních úrovních ekosystému a monitoruje uvedené látky v životním prostředí. Tato disciplína vyvíjí postupy umožňující sledovat a předvídat nepříznivé vlivy látek na živé organismy a ekosystémy. Rovnováha ekosystému může být narušena na různých místech. Ekotoxikologické metody se využívají při naplňování legislativních předpisů majících vztah k životnímu prostředí, mj. hodnocení vlivů na životní prostředí – EIA [40].

Ekotoxikologické testy se provádějí pro zjištění účinků chemických látek a směsí v různých oblastech životního prostředí podle chemického zákona č. 350/2011 Sb. a pro účely Evropského nařízení č. 1907/2006 (REACH). Požadavky na proveditelnost ekotoxikologických testů spočívají především v jednoduchosti, reprodukovatelnosti výsledků a nízkých pořizovacích nákladech. Avšak tyto požadavky mohou být odlišné pro různé metodiky hodnocení účinku a tedy splnění některých z nich může být někdy velmi náročné. Laboratorní testy tyto požadavky většinou splňují, ale pokud potřebujeme testy realizovat v přírodních podmínkách, narážíme na podstatné problémy.

Ekotoxikologické testy se používají především pro:

- stanovení toxického rizika znečištění pitných, podzemních, povrchových a odpadních vod
- stanovení akutní toxicity chemických látek a chemických směsí z hlediska škodlivosti pro životní prostředí (Chemický zákon č. 350/2011 Sb., Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006)
- získání prvotních informací a poznatků při haváriích spojených s únikem toxických látek do vodních toků a nádrží
- testování výrobků přicházejících do styku s pitnou vodou, které mohou mít možný vliv na její kontaminaci a také obalových materiálů, přicházejících do přímého styku s potravinami
- speciální reprodukční testy toxicity pro pitné a povrchové vody - pro posouzení dlouhodobého působení chemických látek ve stopových koncentracích na reprodukci vodních organismů (*Daphnia magna*) [41].

Nejčastěji používané parametry ve vztahu organismus – toxikant:

- NOEC = nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které nejsou pozorovány účinky na testovací organismus
- LOEC = nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky na testovací organismus
- $LC_x$   $LD_x$  = letální koncentrace nebo dávka pro X % jedinců, při které uhynie X % testovacích jedinců
- $EC_x$   $ED_x$  = efektivní koncentrace nebo dávka pro X% účinek, při které se projeví X% účinek v porovnání s kontrolou
- $IC_x$   $ID_x$  = inhibiční koncentrace nebo dávka pro X% účinek, při které se projeví X% inhibiční účinek v porovnání s kontrolou

- PEC = předpovídaná environmentální koncentrace toxikantu, která byla na základě matematických modelů pohybu látky odhadnuta pro hodnocení složky prostředí
- PNEC = předpovídaná koncentrace, při které nedojde k negativním účinkům
- NPK = nejvyšší přípustná koncentrace, stanovená legislativou, která nesmí být překročena [7].

## 2.4.1 Vybrané metodiky testů

### 2.4.1.1 Akutní test toxicity na organismu *Thamnocephalus platyurus*

Organismus *Thamnocephalus platyurus* je sladkovodní korýš, který patří do řádu žábřonožek a často se využívá při stanovení akutní toxicity v akvatických ekosystémech. Mezi nejrozšířenější akvatické organismy v testech toxicity na korýších patří i druh perlooček *Daphnia magna*. *T. platyurus* je oproti organismu *D. magna* dle některých autorů citlivější na určité anorganické ionty a mimo jiné jde o menší organismus, tudíž se na zkoušku spotřebuje menší množství roztoků. Korýši obecně jsou primárními konzumenty a hlavní složkou zooplanktonu ve vodních ekosystémech.

Pro testování se využívají cysty získané z laboratorních chovů, které je možné dlouhodobě uchovávat a poté použít jako startovací kulturu. Komerčně prodávané balení těchto organismů se nazývá Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>. Inkubace organismů nasazených v testu probíhá v mikrodestičkách (6 x 4 komůrky) za tmy při teplotě 25 °C po dobu 24 hodin a následně se hodnotí mortalita [7].



Obrázek 8: Thamnotoxkit F [42]

Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> obsahuje 5 vialek s roztoky solí ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  a  $\text{KCl}$ ), pro přípravu jednoho litru ředící vody, která slouží k přípravě koncentrační řady testované chemické látky, popř. vody. Tato se připraví převedením obsahu zásobních roztoků solí do 1 l odměrné baňky a doplněním po rysku destilovanou nebo deionizovanou vodou. Před použitím ředící vody se tato musí nechat 15 minut probublávat. Probouzení cyst se provádí 20 – 22 hodin před začátkem testování. Připraví se zředěná ředící voda – 2,5 ml ředící vody se smíchá s 17,5 ml destilované vody. Takto zředěná ředící voda se v množství 1 ml přidá k vialkám s cystami. Vialky se následně uzavřou a 30 minut se protřepávají. Po hydrataci se cysty přenesou do Petriho misky a přidá se k nim ještě 10 ml naředěné ředící vody. Organismy se vloží do inkubátoru, kde se kontinuálně svítí 3 000 – 4 000 LUX při 25 °C po dobu 20 – 22 hodin. Testování probíhá ve zmíněných mikrodestičkách, do kterých se nasadí vždy 10 organismů do 1 ml testovaného média ve třech opakováních. Na závěr se mikrodestička zakryje parafilmem a víčkem a dá se na 24 hodin do inkubátoru. Na závěr na základě počtu mrtvých jedinců se vypočte hodnota 24hLC50 [43].

Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> striktně dodržuje normu ČSN ISO 14380 Kvalita vod – Stanovení akutní toxicity pro *Thamnocephalus platyurus*. Testy byly vyvinuty pod vedením profesora Persoona na Universitě v Ghentu v Belgii (Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution (LABRAP) [7].



### 2.4.1.2 Test inhibice růstu okřehku menšího – *Lemna minor*

Pro hodnocení toxických účinků látek se ze zástupců producentů akvatického ekosystému často využívá *L. minor* neboli okřehek menší. Jedná se o velmi hojně se vyskytující rostlinu lidově nazývanou žabinec, kterou řadíme mezi vyšší vodní rostliny. Jde o drobnou zelenou rostlinku o velikosti 1,5 až 2 mm ve tvaru elipsy s jednotlivými, někdy až pěti lístky. Okřehek volně plave po vodní hladině. Může být používán k odstranění nadbytečných živin a toxických kovů z vodních ploch (tzv. fyto-remediace), protože se jedná o účinný bio-akumulátor a je z vody snadno odstranitelný. Vyskytuje se převážně v jezerech a rybnících [44].



Obrázek 9: *Lemna minor* (okřehek menší) [44]

Test se provádí expozicí stélek okřehku po dobu 168 hodin (7 dní) v testovaném médiu za standardní teploty a osvětlení. Na konci testu se hodnotí stav rostlin a počet lístků oproti kontrole. Kontrola se stanovuje v tzv. Steinbergově médiu po 168 hodinách kultivace. Výsledky testu se považují za platné, pokud počet lístků v kontrole vzroste za standardní dobu testu na osminásobek. Na základě počtu a stavu lístků na konci testu se stanovuje růstová rychlost, inhibice nebo stimulace růstu, chloróza nebo nekróza [7].

Testování na okřehku menším upravuje norma ČSN EN ISO 20079 Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehku [7].

K provedení testu je potřeba připravit modifikované Steinbergovo médium. Nejprve se připraví zásobní roztoky makrosložek a mikrosložek dle tabulky 6. Makrosložky představují zásobní roztoky 1, 2 a 3, mikrosložky roztoky 4, 5, 6, 7 a 8. Modifikované Steinbergovo médium se poté připraví přidáním 20 ml každého ze zásobních roztoků 1, 2 a 3, a 1 ml každého zásobního roztoku 4, 5, 6, 7 a 8 do 1 l odměrné baňky. Po přidání všech složek ze zásobních roztoků se odměrná baňka doplní destilovanou vodou po rysku. Pokud se použije vhodná voda, není nutná sterilizace. Připravené médium je živné médium pro nasazení kontrolních testů a pro přípravu koncentračních řad testovaných látek. Pro testování se musí použít minimálně tři opakování na každé koncentrační úrovni. Každá zkušební kádinka musí obsahovat 9 – 12 stélek a v každé kádince musí být počet totožný. Cílem zkoušky je kvantifikovat účinky látek na vegetační růst [45].

Tabulka 6: Příprava zásobních roztoků pro modifikované Steinbergovo médium [45]

Zásobní roztok	Makrosložky	Koncentrace (g/l)	Zásobní roztok	Mikrosložky	Koncentrace (mg/l)
1	KNO <sub>3</sub>	17,5	4	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	120
1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,5	5	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	180
1	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63	6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44
2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5	7	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180
3	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	14,75	8	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	760
			8	EDTA, disodná sůl, dihydrát	1500

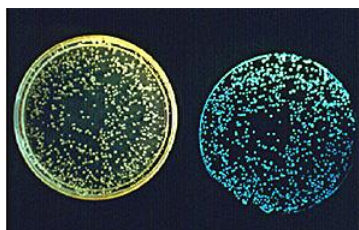
### 2.4.1.3 Test inhibice luminiscence organismu *Vibrio fischeri*

I na skupině destruentů lze provádět ekotoxikologické testy, konkrétně na mořské, gramnegativní bakterii *Vibrio fischeri* nyní zvané *Aliivibrio fischeri*. *V. fischeri* má schopnost bioluminiscence. V přítomnosti toxických látek je emise světla – bioluminiscence snížena. Škodlivé účinky látek, které ovlivňují bioluminiscenci, mohou být měřeny pomocí přístroje zvaného luminometr. Tyto světélkující bakterie se k testování využívají čerstvě připravené, sušené nebo lyofilizované. Test patří mezi nejrychlejší metody stanovení akutní toxicity. Samotné testování trvá 15 nebo 30 minut, podle délky expozice od přidání toxikantu [7].

Na základě objektivity výsledků, která je daná přesným elektronickým odečtem světelné intenzity bioluminiscence, lze rychle dosáhnout kvalitních výsledků v dostatečném množství. Těsně před testováním je nutné organismy *V. fischeri* rehydratovat. V luminometru se změří bioluminiscence přítomných organismů bez přidání cizorodých látek. Následně se testovaná látka přidává v několika koncentracích v množství 0,5 ml roztoku k 0,5 ml bakteriální kultury. V praxi se reálné vzorky poměřují jen v jedné koncentraci testované látky a toxicita se pak vyjadřuje k účinku referenčního vzorku. Směs se nějakou dobu inkubuje v rozmezí od 5 do 30 minut a poté se změří výsledná bioluminiscence. Jako referenční vzorek se k bakteriální kultuře přidává netoxický 2% roztok NaCl. Enzymový proces, který při této zkoušce probíhá, je závislý na teplotě, proto inkubace i měření probíhá v temperovaném prostředí, zpravidla při normou stanovené teplotě 15 °C. Z naměřených hodnot lze sestavit dávkovou křivku, z níž můžeme vypočítat efektivní koncentraci toxikantu, např. EC50 [46].

Příslušná norma, která je podkladem k testování, je ČSN EN ISO 11348 Jakost vod – Stanovení inhibičních účinků vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) [7].

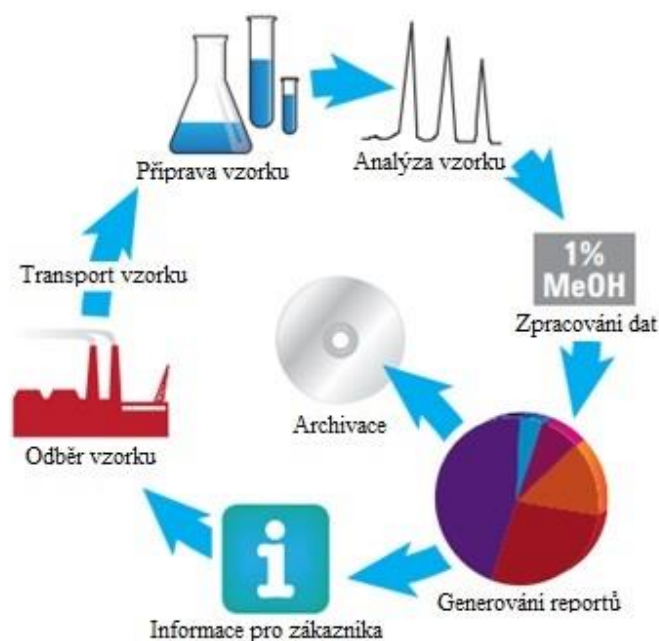
Při teroristických útocích mohou být vystaveny vodní zdroje, rozvody pitné vody, půda, potraviny i běžné předměty nebezpečným chemickým nebo biologickým látkám a směsím. Při těchto situacích je k toxikologickému posouzení rozhodující rychlost měření. V oblasti ochrany zdraví se tato metoda využívá pro včasnou a spolehlivou diagnostiku pitné vody a ovzduší [46].



Obrázek 10: *Vibrio fischeri* – luminiscence [46]

## 2.5 Metody izolace analytů z kapalných vzorků

Vhodný výběr analytické techniky je jen jeden z kroků pro úspěšnou aplikaci. Všechny kroky, které vedou k výsledku analýzy, jsou stejně důležité. Odběr vzorků a jeho úprava pro další analytické zpracování je významným krokem analýzy. Vzorkování může ovlivnit kvalitu navazujících požadovaných analytických výsledků. S ohledem na hmotnost a velikost odebraných vzorků je dále nutné brát do úvahy způsob jejich transportu a skladování. U reprezentativního vzorku by neměly být ovlivněny jeho relevantní vlastnosti. Vzorek se metodikou přípravy kvantitativně převede do formy vhodné k analýze, přičemž nyní se již může jednat o malý zlomek původního odebraného množství vzorku. Všechny tyto preanalytické kroky mohou mít větší vliv na celkovou přesnost a spolehlivost výsledků, než samotná analýza. Hlavní fáze analytického procesu jsou znázorněny na obrázku 11.



Obrázek 11: Diagram postupu analýzy vzorku [47]

Příprava vzorků může být potřebnou součástí chromatografické a spektroskopické analýzy. Tento proces je určen k poskytnutí reprezentativního, reprodukovatelného a homogenního roztoku, který je vhodný pro injekci do kolony pro chromatografickou či jinou analýzu. Někdy, v závislosti na citlivosti analýzy, je nutné zakoncentrování vzorku před jeho dávkováním do přístroje [47; 48].

Tabulka 7: Metody příprav kapalných vzorků [47]

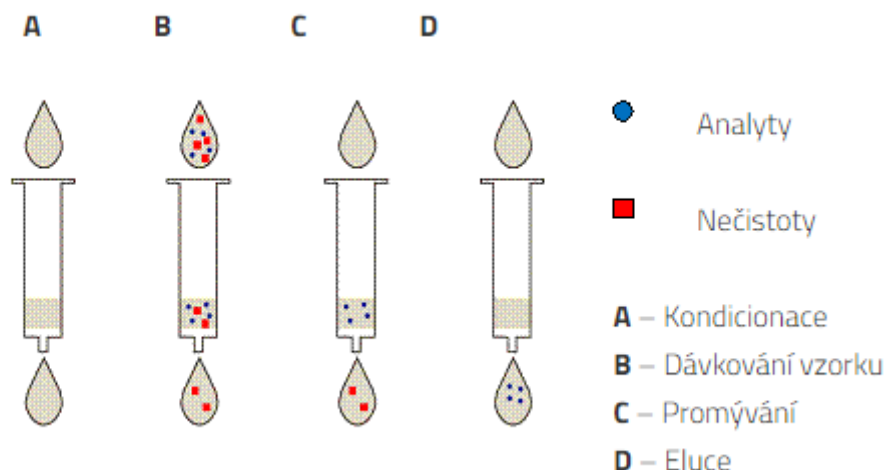
Metody přípravy vzorku	Principy techniky	Komentáře
<b>Extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE)</b>	Podobné jako HPLC, vzorek protéká přes kolonku se sorbentem. Ten selektivně zachycuje vybrané analyty. Ty mohou být následně eluovány rozpouštědlem s odpovídající eluční silou.	K dispozici je široký výběr stacionárních fází pro selektivní zachycení požadovaných anorganických a organických analytů. Speciální fáze existují pro léčiva, sacharidy, katecholaminy, kovové ionty a mnohé jiné sloučeniny.
<b>Extrakce kapalina – kapalina (Liquid-Liquid Extraction, LLE)</b>	Vzorek se rozdělí mezi dvě nemísitelné fáze, které jsou zvoleny podle rozdílů	Pozor na tvorbu emulzí.

	v rozpustnosti. Analyty jsou pak získány z jedné z těchto dvou fází.	
<b>Filtrace</b>	Kapalina se vede přes papírový nebo membránový filtr za účelem odstranění suspendovaných částic.	Doporučuje se, aby nedocházelo k problémům (např. ucpání kolony) s přístroji.
<b>Centrifugace</b>	Vzorek se uloží do odstředivkové zkumavky a centrifuguje se při vysoké odstředivé síle (tisíc až sto tisíc g). Supernatant se dekantuje.	Odstředění se používá k odstranění částic jako alternativa k filtraci.
<b>Sedimentace</b>	Vzorek se nechá usadit, přičemž neporušeně klesá do sedimentační zkumavky. Rychlost usazování závisí hlavně na velikosti sedimentujících částic.	Velmi pomalý proces.
<b>Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction, SPME)</b>	Křemenné vlákno potažené polymerní stacionární fází. Sledované analyty se sorbují na stacionární fází a po umístění do nástřikového prostoru dochází teplem u plynové nebo mobilní fází u kapalinové chromatografie k desorpci analytů.	SPME metoda může být použita pro kapalné, plynné i pevné látky. K dispozici jsou různé polymerní vlákna (polydimethylsiloxan (PDMS), polyakrylát, Carbowax-divinylbenzen, Carboxen-PDMS)
<b>Stir Bar Sorbent Extraction (SBSE)</b>	Analogická metoda k SPME s výjimkou, že množství sběrné fáze je mnohem větší. Dochází k extrakci kapalných analytů na magnetické míchadlo s vrstvou stacionární fáze. Analyty jsou následně tepelně nebo mobilní fází desorbovány.	Kapacita i citlivost této techniky může přesáhnout techniku SPME o několik řádů. Tuto techniku je obtížnější automatizovat než SPME.

### 2.5.1 Extrakce tuhou fází (SPE, Solid Phase Extraction)

Extrakce tuhou fází (SPE) je modernější alternativa k extrakci kapalina-kapalina. Metoda je založena na principu zadržování zájmových složek na speciálním sorbentu obsaženém v jednorázové minikoloně. Je to účinná obohacovací technika, vhodná i pro čištění extraktů. Principem zakoncentrování je sorpce zájmových složek analytu na pevném sorbentu a naopak co nejmenší zachycení ostatních složek vzorku. Analyty jsou ze sorbentu uvolněny elucí vhodným rozpouštědlem [49].

Celkově lze říci, že principy separace, výběr fáze, a vývoj metody pro SPE jsou podobné těm pro HPLC. Jedním z hlavních rozdílů mezi SPE a HPLC je, že kolony SPE jsou obvykle na jedno použití, protože mohou být vystaveny potenciálním interferencím složek ze vzorku a ty mohou znehodnotit náplň kolony. HPLC kolony se používají opakovaně.



Obrázek 12: Technika SPE - proces zakoncentrování [49]

V nejjednodušší formě se SPE používá jako plastová kolonka v podobě polypropylenové nebo skleněné injekční stříkačky a obsahuje 0,1 – 10 g sorbentu. Používané SPE sorbenty mohou být v systému normálních nebo obrácených fází, popř. ionexy (anex, katex). Vhodný typ sorbentu a velikost kolonky závisí na zjištěných informacích o vzorku, zejména je nutné zvážit vlastnosti matrice a analytu. Pro nejlepší retenci analytů ze vzorku je vhodné, aby polarita analytu byla podobná polaritě fáze [47].

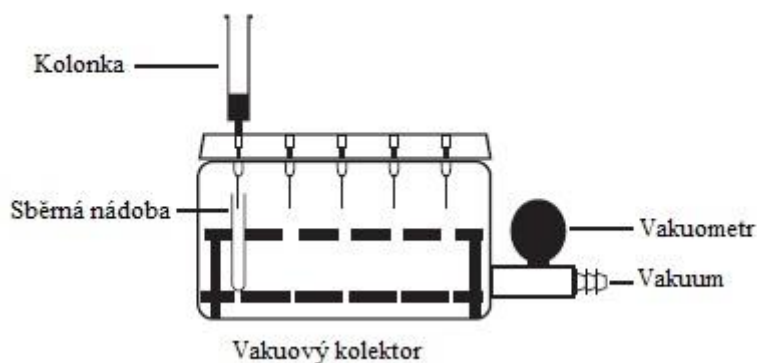
Tabulka 8: Sorbenty dle typu fází [50]

Normální fáze	Reverzní fáze	Ionexy
polárně modif. silikagel	<b>nepolárně modif. silikagel</b>	<b>Anex</b> - Silikagel s chemicky vázaným kladně nabitým modifikátorem (kvarterní amin, sekundární amin)
silikagel	C18 (oktadecyl)	<b>Katex</b> - Silikagel s chemicky vázaným záporně nabitým modifikátorem (benzen nebo propylsulfonová kys.)
oxid hlinitý	C8 (oktyl)	
florisil (křemičitan hořečnatý)	C4 (butyl)	
	CH (cyklohexyl)	
	Ph (fenyl)	
	CN (kyanopropyl)	

Zařízení potřebné k provedení SPE experimentu může být velmi jednoduché. Jako hnací sílu lze použít gravitaci, což je ale pro všeobecné použití velmi pomalé a nepraktické. Proto většina základních systémů určených pro využití v terénu využívá ručního protlačování rozpouštědla nebo vzorku pístem přes náplň. V laboratoři se využívá prosávání vzorku vakuem, což lze využívat i pro zpracování několika vzorků současně. Jsou k dispozici systémy, které pojmu až 24 kolonek se vzorky. Takovéto systémy jsou vyráběny z chemicky odolného a průhledného skla, což umožňuje sledování celého procesu zpracování vzorků. Bez ohledu na použití metody průtoku vzorku přes patronu by průtok kolonou neměl být příliš rychlý. V takovém případě by totiž mohlo dojít k nedostatečné interakci vzorku se stacionární fází. Pro typické aplikace SPE se doporučuje průtoková rychlost 10 ml/min. Ke ztrátám analytů může dojít i v důsledku pomalé sorpční kinetiky.

Proces SPE extrakce se skládá ze 4 kroků. Každý z těchto kroků musí být optimalizován během procesu vývoje metody. Prvním krokem je **kondicionace kolonky**. Kondicionace se provádí před přidáním vzorku promytím kolonky rozpouštědly, typicky methanolem nebo acetonitrilem. Účelem tohoto kroku je odstranit všechny nečistoty, které mohou být náhodně shromážděny v náplni kolonky, a provést solvataci sorbentu. Solvatace je důležitá a nesmí dojít k vyschnutí kolonky. Po kondicionaci je žádoucí, aby přebytek rozpouštědla byl odstraněn promytím vodou. Druhým krokem je **aplikace vzorku**, kdy se vzorek nanese do kolonky a nechá se protékat. Vzorek by měl protékat kontinuálně bez

toho, aby došlo k vyschnutí kolonky. Při SPE extrakci není průtok řízen přesně, jako např. při HPLC, ale přijatelný průtok vzorku kolonkou je 2 – 4 ml/min. Třetím krokem je **promytí sorbentu** za účelem odstranění slaběji vázaných interferujících složek. Tímto způsobem nesmí dojít k eluci analytu a nejčastěji se pro promývání používá voda nebo pufr. Je nutné zvolit vhodný typ rozpouštědla o vhodném objemu a vhodné eluční síle, aby byla eluce analytu co nejvíce minimalizována. Pro velmi čisté vzorky, jako je pitná voda, můžeme promývací krok vynechat a jít rovnou na sušení před očekávanou elucí. V případě, že vzorek obsahuje mnoho nežádoucích složek matrice, je promytí sorbentu nezbytné, a tento krok by měl být optimalizován. Pokud chceme použít malý objem elučního rozpouštědla, nebo v případě, že eluční rozpouštědlo je nemísitelné s promývacím rozpouštědlem, je žádoucí promývací rozpouštědlo odstranit. To lze provést jednoduše průchodem vzduchu pod vakuem, tzv. sušením. Posledním krokem je **eluce analytu(ů)**. Jedná se o závěrečný stupeň extrakce a tedy sběr frakce analytu. Cílem je získání analytu(ů) v co nejmenším objemu, čehož může být dosaženo použitím rozpouštědla s velkou eluční silou. Lze použít i větší objem rozpouštědla se střední eluční silou, ale poté je potřeba rozpouštědlo odpařit do sucha a následně odparek rozpustit v malém množství vhodného rozpouštědla. V takovém případě je vhodné volit relativně těkavé eluční rozpouštědlo, aby odpaření bylo co nejrychlejší. Eluát je jímán do vhodné nádoby [47].



Obrázek 13: Nákres SPE aparatury [47]

## 2.6 Stanovení steroidních hormonů pomocí HPLC/MS

Při výběru metody je nutné posuzovat několik parametrů, jako jsou selektivita, citlivost, reprodukovatelnost, rychlost a náklady. Pro rozvoj kvalitativní nebo kvantitativní metody vybíráme optimální kombinaci několika technik. Kapalinová chromatografie je technika, která se používá pro separaci polárních i nepolárních, nabitých nebo neutrálních, těkavých a netěkavých sloučenin. Kapalinová chromatografie je vhodnou metodou zejména pro analýzu léčiv a jejich metabolitů nebo původních sloučenin a jejich degradačních produktů. Využívá se při analýze steroidních hormonů i v několika jiných oblastech klinické biochemie [51].

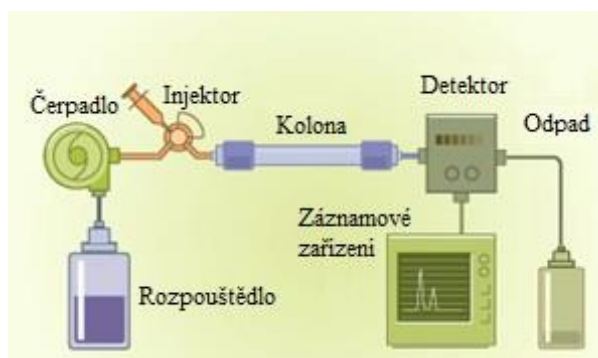
Hlavními částmi kapalinového chromatografu jsou zásobníky složek mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení. Vzhledem k vysoké separační účinnosti tato technika užívá název vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High Performance Liquid Chromatography – HPLC).

Jako složky mobilní fáze se v HPLC používá voda, organická rozpouštědla o různé polaritě nebo elektrolyty. Je nutné dbát na to, aby mobilní a stacionární fáze byly vzájemně nemísitelné a současně, aby analyt byl rozpustný v mobilní fázi. Separační systémy lze rozdělit na systémy s normálními nebo obrácenými fázemi. V případě systému s obrácenými fázemi se jako stacionární fáze používá modifikovaný silikagel (např. n-C<sub>18</sub>) a jako mobilní fáze směs voda – acetonitril. Často se využívá i



technika gradientové eluce, při níž se v průběhu separace mění eluční síla mobilní fáze v závislosti na čase. V HPLC se používají pístová čerpadla. Jejich cílem je zachovávat konstantní a bezpulsní průtok mobilní fáze i při relativně nízkých průtocích a poměrně vysokých tlacích. Průtoky mobilní fáze se pohybují od 0,1 – 10 ml/min. Před čerpadla se zapojují odplyňovače mobilní fáze pro odstranění vzduchových mikrobublin a rozpuštěných plynů, které by na výstupu z kolony znemožňovaly funkci detektoru. Dalším mechanismem je v současnosti již automatické dávkovací zařízení, při němž dochází k dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. Vlastní separace vzorku probíhá v koloně. Kolony se vyrábí z kovového materiálu odolného vůči vysokým tlakům a koroznímu působení mobilní fáze. Analytické kolony jsou trubice o délce 5 – 30 cm a vnitřním průměru 1 – 4,6 mm plněné vhodným sorbentem. Náplně chromatografických kolon se rozlišují podle mechanismu separace. Nejčastěji využívaným sorbentem je modifikovaný silikagel. Pro detekci separovaných sloučenin se používá několik typů detektorů, např. spektrofotometrický detektor, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor nebo detektor rozptylu světla. Kolona i detektor musí být uloženy v termostatu [52].

Spektrofotometrický detektor je nejčastěji používaný detektor v kapalinové chromatografii. Pracuje v ultrafialové, případně i ve viditelné oblasti elektromagnetického záření (od 190 do 800 nm). Principem detektoru je pokles intenzity zářivého toku v přítomnosti látky, která absorbuje při vlnové délce detekce. Logaritmus poměru intenzity dopadajícího a prošlého záření je absorbance. U levnějších přístrojů je zdrojem záření nízkotlaká rtuťová výbojka a vlnovou délku detekce vymezuje interferenční filtr. Kvalitnější přístroje jsou vybaveny deuteriovou výbojkou jako zdrojem spojitého záření v UV oblasti, žárovkou jako zdrojem pro viditelnou oblast a monochromátorem, což umožňuje zvolit libovolnou vlnovou délku detekce v rozsahu vlnových délek zdroje záření. Jedná se o selektivní typ detektoru, který umožňuje snímat UV spektra látek v měrné kyvetě při zastaveném průtoku i bez přerušného toku mobilní fáze. Spektrofotometrické detektory s fotodiodovým polem umožňují detekci chromatogramů při velkém počtu předem zvolených délek [53; 54].



Obrázek 14: Schéma uspořádání HPLC [51]

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí je analytická laboratorní technika pro identifikaci a kvantifikaci neznámých látek ve směsích. V prvním kroku při separaci kapalinovou chromatografií se směs látek rozdělí a ve druhém kroku při použití hmotnostní spektrometrie získáme strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. Spojení těchto dvou technik bylo v minulosti podrobeno intenzivnímu výzkumu. Technicky náročné spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií bylo zapříčiněno separovanými netěkavými a termolabilními látkami, které opouštějí chromatografickou kolonu v kapalně mobilní fázi. Na výstupu z kapalinového chromatografu je atmosférický tlak, kdežto v hmotnostním spektrometru je vysoké vakuum (řádově  $10^{-3}$  až  $10^{-5}$  Pa). Převedení separovaných sloučenin z kapalně mobilní fáze do plynného skupenství a zároveň odstranění nadbytečné mobilní fáze, bylo vyřešeno využitím technik ionizace za atmosférického tlaku a především elektrospreje [55; 56].

Hmotnostní spektrometr lze použít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu všech látek. Limity detekce, které můžeme získat, jsou ng/ml až pg/ml. Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor. Nejpoužívanější typy analyzátorů používané

v dnešní době v hmotnostní spektrometrii jsou kvadrupól, sférická a lineární iontová past a průletový analyzátor. Detektory využívané v hmotnostních spektrometrech zaznamenávají ionty, které byly vybrány analyzátozem a převádějí signály do digitálního formátu [51; 57].

### 2.6.1 Ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii

V iontovém zdroji dochází k vytváření iontů z neutrálních molekul nebo atomů. Podle dodané energie při ionizaci rozlišujeme měkké a tvrdé ionizační techniky. Předností tvrdých ionizačních technik je vznik bohatých fragmentačních spekter, která umožňují identifikaci analyzované sloučeniny porovnáním s knihovnou spekter [57].

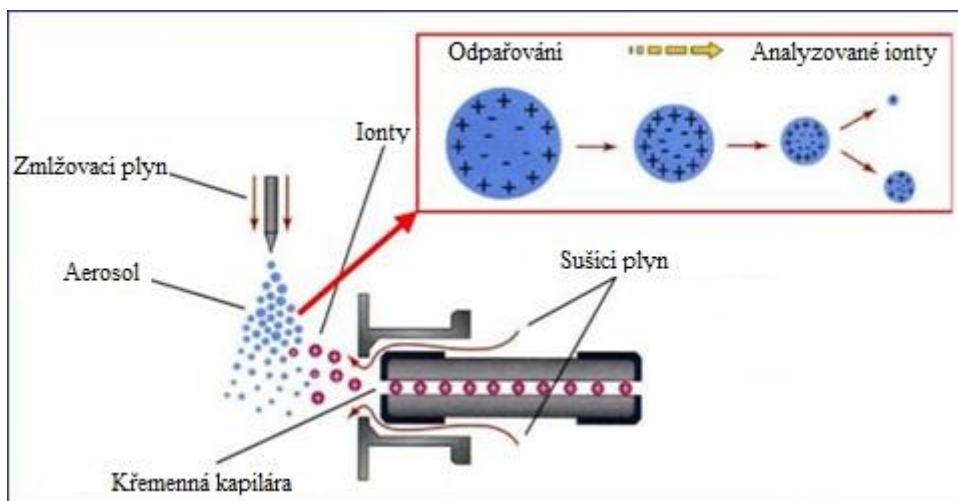
**Elektronová ionizace** je typickým zástupcem tvrdé ionizační techniky. Tato technika je založena na principu předání energie letících elektronů molekulám analytu. Elektrony použité pro ionizaci jsou emitovány ze žhaveného wolframového vlákna, což je vlastně žhavená katoda. Velikostí proudu se řídí počet elektronů emitovaných vláknem. Elektrické pole urychluje tyto elektrony a dodává jim energii 70 eV. Pokud analyt interaguje s elektronem, dojde k vyrazení valenčního elektronu za vzniku radikalkationtu, označovaného jako molekulární ion. Nadbytek energie předaný při interakci elektronu s molekulou pak způsobí jeho fragmentaci za vzniku nabitých fragmentů a neutrálních ztrát nesoucích lichý elektron. Elektrony jsou po průchodu iontovým zdrojem zachyceny na anodě [58].

**Elektrosprej** je v současné době široce používaná technika ionizace analytů pro spojení HPLC/MS. Elektrosprej (ESI, z angl. Electrospray Ionization) se používá pro ionizaci disociovaných nebo disociovatelných molekul a iontů. Princip ionizace spočívá v aplikaci silného elektrického pole mezi elektrody za atmosférického tlaku. Mezi kapiláru, kterou prochází mobilní fáze s analyty, a vstup do hmotnostního spektrometru, je vloženo vysoké napětí 2 – 5 kV. Vlivem tohoto působení vznikají na výstupu z kapiláry malé kapičky (aerosol), které mají kladný nebo záporný náboj. Tento náboj je určen polaritou vloženého napětí. Tvorba kapiček je podpořena proudícím zmlžovacím plynem, nejčastěji se využívá dusík. Kapénky aerosolu přicházejí do kontaktu se zahřátým sušícím plynem, takže dochází k rychlému odpaření rozpouštědla, což vede ke zmenšení velikosti kapiček a tím ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Vzniklé elektrostatické odpuzování v jistou chvíli překonává povrchové napětí a nastává tzv. Coulombická exploze, vedoucí ke vzniku menších kapének. V určitém momentu už nedochází k rozpadu kapek na menší, což má za následek odpuzování stejně nabitých iontů, ale dochází k uvolnění iontů z jejich povrchu do plynné fáze. Nakonec se tedy uvolňuje protonovaný molekulární ion  $[M+H]^+$  při snímání kladných iontů, nebo deprotonovaný molekulární ion  $[M-H]^-$  při snímání záporných iontů [55; 57].

Elektrosprej lze využít i při vyšších průtocích mobilní fáze, zhruba do 1 ml/min. Negativním jevem může být suprese ionizace – potlačení tvorby iontů analytu, pokud ve stejnou dobu vznikají konkurenční ionty z látek, které jsou přítomny ve vysokých koncentracích. To lze eliminovat vhodnou volbou podmínek [57].

Do elektrospreje může být vzorek přímo dávkován bez chromatografické separace, což se využívá zpravidla ve spojení s tandemovou nebo vícecestupňovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS nebo MS<sup>n</sup>). Ionizace ESI se hodí zvláště pro analýzu peptidů, proteinů nebo jiných biomolekul [55].



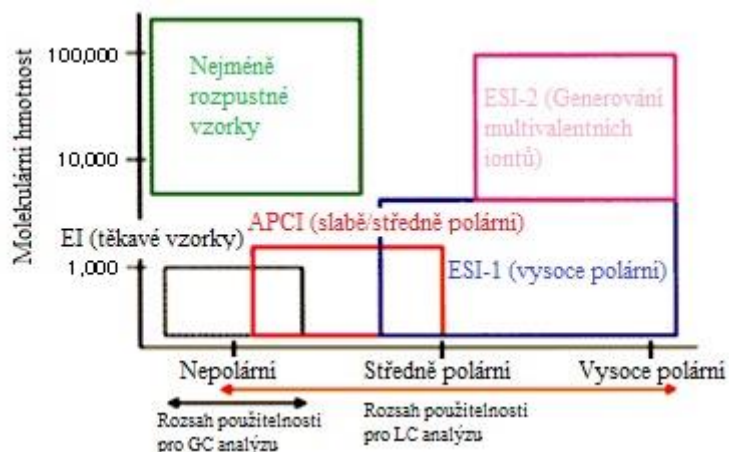


Obrázek 15: Schéma elektrospreje [59]

**Chemická ionizace za atmosférického tlaku** (APCI, z angl. Atmospheric Pressure Chemical Ionization) je další měkkou ionizační technikou, při které vznikají ionty za atmosférického tlaku. Techniku lze využít i pro analýzu méně polárních a nepolárních látek. Uspořádání iontového zdroje je obdobné uspořádání elektrospreje, změna spočívá v tom, že napětí se nekládá mezi sprejovací kapilárou a vstup do hmotnostního spektrometru, ale mezi koronovou jehlou a vstup do hmotnostního spektrometru. Na konci sprejovací kapiláry dochází k tvorbě aerosolu pomocí pneumatického zmlžovače, jako zmlžovací plyn se nejčastěji používá dusík. Vzniklý aerosol je v krátké zóně vyhříván až na 600 °C rychle odpařen. Na koronové jehle dochází v důsledku vloženého napětí ke vzniku koronového výboje, který ionizuje molekuly mobilní fáze, přítomné v plynné fázi ve výrazném nadbytku. Tím se vytváří reakční plyn, který následně ionizuje molekuly analytu. Přitom se již předává méně energie a nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci jako u elektronové ionizace. Ve spektru pak nejčastěji sledujeme ionty  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$  [55; 57].

APCI se dosti využívá pro analýzu různých látek v tělních tekutinách v oblasti klinické chemie. Meze detekce takovýchto stanovení se pohybují okolo ng až pg/ml.

Při ionizaci ESI i APCI v kladném modu pozorujeme protonované molekulární ionty, při ESI pak i adukty molekuly se sodným nebo draselným iontem, v záporném modu pak deprotonovaný molekulární ion. Někdy můžeme pozorovat i adukty molekuly s rozpouštědlem z mobilní fáze. Interpretaci fragmentačních spekter získaných pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie získáme strukturní informace o dané látce nebo alespoň potvrdíme přítomnost hledané látky [55].



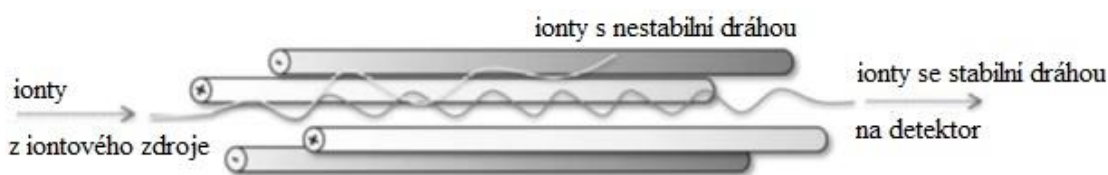
Obrázek 16: Ionizační metody a použitelné sloučeniny [60]

## 2.6.2 Analyzátory používané v hmotnostní spektrometrii

Zásadní částí každého hmotnostního spektrometru je analyzátor. Analyzátor slouží k separaci iontů v plynné fázi za vakua na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Analyzátor se umísťuje za iontový zdroj, tudíž molekuly už máme převedeny na ionty, a zároveň před detektor, kde dochází k detekci iontů, které byly rozděleny v analyzátoru podle poměru  $m/z$ . Dělení iontů lze dosáhnout různými fyzikálními principy, které využívají statické nebo dynamické elektrické nebo magnetické pole, eventuálně jejich kombinace. Analyzátory rozdělujeme do několika skupin podle způsobu dělení iontů na skenující, iontové pasti a průletové analyzátory. Skenující analyzátory postupně mění skenovanou veličinu a kontinuálně v čase separují ionty o určité hodnotě  $m/z$ . Typickým zástupcem je kvadrupólový analyzátor a sektorový magnetický a elektrický analyzátor. Iontové pasti zachycují ionty pomocí napětí na elektrodách a pak následně dochází k jejich analýze (iontová past, orbitrap, FT-ICR). Průletové analyzátory separují všechny ionty současně na základě rozdílné doby lety k detektoru. Charakteristickým příkladem je průletový analyzátor TOF, z angl. Time of Flight, který měří čas iontů pro překonání určité vzdálenosti [57; 61].

Základními parametry hmotnostních analyzátorů jsou zejména rozlišovací schopnost, míra schopnosti určit správnou hodnotu  $m/z$ , hmotnostní rozsah, dynamický rozsah a rychlost záznamu spekter. Rozlišovací schopnost je schopnost analyzátoru poskytnout rozlišené signály pro ionty s obdobnou hodnotou  $m/z$ . Univerzální definice rozlišovací schopnosti je založená na šířce jednoho píku nebo lze využít definice založené na překryvu dvou piků. Hmotnostní rozsah znamená rozmezí hodnot  $m/z$ , přes které může analyzátor zaznamenat spektra. Dynamický rozsah je rozmezí koncentrací, v nichž je odezva úměrná koncentraci. Vhodný typ analyzátoru zásadně ovlivňuje kvalitu získaných spekter, avšak to se pak odráží i v ceně analyzátoru [61].

**Kvadrupól** patří v současnosti k nejvíce rozšířeným hmotnostním analyzátorům. Je často využíváný pro spojení hmotnostních spektrometrů se separačními technikami GC/MS a LC/MS. Jeho výhodou je nízká pořizovací cena v porovnání s ostatními typy analyzátorů. Skládá se ze čtyř kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu o délce 20 - 30 cm, na které se přivádí kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Vždy dvě protilehlé tyče jsou vodivě spojeny a je na ně vloženo stejnosměrné napětí, ke kterému se současně přidává vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion vstoupí do kvadrupólu mezi čtyři tyče a začíná oscilovat. Princip oscilace spočívá v plynulé změně velikosti stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí při zachování jejich poměru. Ion s postupně se zvětšujícím  $m/z$  jsou propouštěny na detektor. V daném okamžiku se ionty s určitou hodnotou  $m/z$  pohybují po stabilní dráze kvadrupólem a dostanou se na detektor. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, na detektor nedopadnou [57; 61].

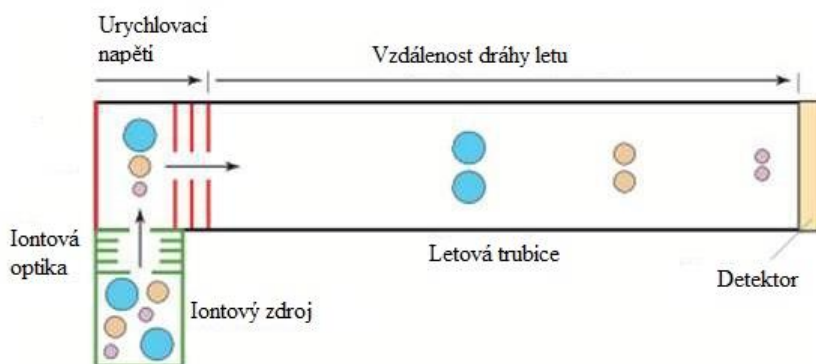


Obrázek 17: Kvadrupólový analyzátor [57]

Kvadrupól může pracovat ve dvou režimech. První režim je skenovací, kdy se kontinuálně mění elektrické pole a proměřují se všechny hodnoty  $m/z$  v krátkém časovém úseku. Při druhém režimu, který se zkráceně nazývá SIM, z angl. Single Ion Monitoring nebo také Selected Ion Monitoring, se nastaví elektrické pole tak, aby procházely pouze ionty o určitém poměru  $m/z$ . Při režimu skenování je výhodné sledování všech iontů vzniklých v ionizátoru na úkor citlivosti měření. Snížením skenovaného hmotnostního rozsahu můžeme zvýšit citlivost detekce. V režimu SIM právě spočívá výhoda citlivé kvantifikace předem zvolených látek [57; 61].

**Trojité kvadrupólový analyzátor** (z angl. Triple Quadrupole, zkráceně QqQ) je systém tří kvadrupólů spojených za sebou. První kvadrupólový analyzátor Q1 skenováním vybírá prekurzory. Druhý kvadrupól (q2) plní funkci kolizní cely, kde aplikací kolizního plynu (Ar, N<sub>2</sub> nebo He) dochází ke kolizní excitaci vybraných iontů a jejich následné fragmentaci. Třetí Q3 je využíván pro analýzu vzniklých produktových iontů. Uvedený typ analyzátoru nelze použít při práci v režimu vyšším než MS<sup>2</sup>. Pro kvalitativní analýzu lze použít jednoduchý kvadrupól, a naopak pro kvantitativní analýzu lze použít i trojitý kvadrupól [62; 63].

**Průletový analyzátor**, někdy také nazývaný jako analyzátor doby letu, zkráceně TOF, je hmotnostní analyzátor s teoreticky neomezeným hmotnostním rozsahem. Principem průletového analyzátoru je měření doby letu iontů, která je nutná pro překonání určité dráhy. Ionty jsou v napěťových pulzech urychlovány elektrickým polem do vakuované letové trubice, kde letí různou rychlostí v závislosti na jejich poměru m/z a dopadají v různém čase na detektor. Při urychlení následujícím po ionizaci ionty získají přibližně stejnou kinetickou energii. Ionty s menším poměrem m/z letí rychleji, a tudíž se na detektor dostanou dříve. Hodnotu m/z pak lze vypočítat z doby letu mezi zdrojem a detektorem. Záznam spekter je velmi rychlý.



Obrázek 18: Průletový analyzátor [61]

Rozlišovací schopnost TOF analyzátoru není příliš vysoká, ale použitím reflektoru nebo prodloužením letové trubice ji lze výrazně zvýšit. Obecně průletové analyzátoru mají lepší rozlišovací schopnost než kvadrupóly. Reflektor je iontové zrcadlo, které slouží ke kompenzaci různých kinetických energií pro ionty se stejnou hodnotou m/z. Reflektory otáčí směr letu takřka o 180°, přičemž dojde k prodloužení dráhy i doby letu. Při použití reflektoru ionty s větší kinetickou energií pronikají před odrazem hlouběji do odrazového elektrického pole reflektoru, a tím dochází k jejich opoždění vůči iontům s nižší kinetickou energií. Tímto se vyrovnávají rozdíly v době letu iontů téhož m/z s mírně odlišnými kinetickými energiemi [57; 61].

**Sférická iontová past** (zkráceně 3D-IT, z angl. Three-Dimensional Ion Trap) je analyzátor, který se skládá z 3 elektrod. Dvě krycí elektrody jsou v základním režimu uzemněné a prostřední je napojena na zdroj vysokofrekvenčního napětí s proměnnou amplitudou. Prostřední elektroda se nazývá prstencová. Ionty jsou krátkým napěťovým pulzem přivedeny do pasti vstupním otvorem krycí elektrody a vhodnými poměry vloženého napětí mezi elektrody jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Ionty se v prostoru pasti pohybují po drahách tvaru protáhlé osmičky. Postupným zvyšováním napětí jsou ionty podle jejich poměru m/z vypuzovány z analyzátoru výstupním otvorem na detektor. Účinnost záchytu je zhruba 5 % [52; 61].

Výhodou sférické iontové pasti je možnost práce v režimu tandemové nebo víceetapové hmotnostní spektrometrie. Tento analyzátor umožňuje v jednom místě izolaci prekurzorů, jejich fragmentaci i registraci produktových spekter. Do pasti se jako tlumící plyn zavádí helium, které tlumí oscilaci a zlepšuje záchyt iontů. Množství iontů dávkovaných do pasti je nutno optimalizovat, jinak by mohlo dojít

k vzniku prostorového náboje a tím k poklesu rozlišení a posunu. To lze realizovat velmi krátkým předsknem, při kterém dojde k spočítání množství iontů a podle toho se upraví doba dávkování iontů neboli otevření vstupní elektrody.

Sférická iontová past je levný hmotnostní analyzátor vhodný pro hmotnostní rozsah do 3 000. Zvláštním typem iontové pasti je lineární iontová past, což je v podstatě kvadrupól, na jehož koncích jsou umístěny elektrody s vloženým potenciálem pro zachycení iontů. Vyznačuje se mnohem vyšší kapacitou i účinností než sférická iontová past [61].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem diplomové práce je hodnocení účinnosti úpravný pitné vody a jejích technologických procesů s využitím testů ekotoxicity, a výskytu hormonálních látek prostřednictvím screeningové analýzy.

Pro tento záměr byla zvolena úpravna pitné vody v České republice, která v letech 2012 – 2014 prošla rozsáhlou rekonstrukcí technologické linky. Tato linka je koncipována jako dvoustupňová separace. Prvním separačním stupněm je flotace, která je tvořena 4 flotačními jednotkami s předřazenými komorami pomalého míchání. Druhým separačním stupněm je dvouvrstvá písková filtrace, tvořená 6 otevřenými pískovými rychlofiltry, jejichž náplň je tvořena 80 cm vrstvou filtračního písku a 60 cm vrstvou antracitu. Z pískové filtrace je voda dopravována do reakční nádrže ozonizace a pak dále na 4 otevřené filtry s granulovaným aktivním uhlím. Do odtokového potrubí z filtrace s granulovaným uhlím je zařazena jednotka UV záření, která má za úkol desinfikovat upravenou vodu. Takto upravenou vodu je ještě potřeba stabilizovat dávkami oxidu uhličitého a vápenného hydrátu. Na závěr se pro hygienické zabezpečení vody při její dopravě a distribuci dává chlor, oxid chloričitý a chlorid amonný.

Na úpravně byly odebrány vzorky přítoku, každý stupeň úpravy i odtoku. Na vzorkách byly následně realizované vybrané ekotoxikologické testy a pomocí přístroje HPLC/MS byly vhodně upravené vzorky podrobeny screeningové analýze.

#### 3.1 Charakteristika vzorků a jejich odběr

Vzorky pitné vody byly odebrány vždy před aktuálním testováním, tedy srpen a prosinec 2016, únor a březen 2017. Bodový odběr vzorků byl realizován do 0,5-litrových a 2,5-litrových tmavých skleněných lahví. Před odběrem byly řádně vymyté láhve a víčka několikrát propláchnuty odebíraným vzorkem vody. Vzorkovnice byly naplněny až po okraj, uzavřeny a čitelně a řádně označeny druhem odebraného vzorku. Takto odebrané vzorky byly ihned uloženy do přenosných lednic a v nich i převezeny do laboratoře FCH VUT Brno, kde byly poté uschovány do lednice. Všechny ekotoxikologické testy byly nasazené nejpozději do 24 hodin po odběru. Zpracování odebraných vzorků ke screeningové analýze probíhalo ihned po převezení vzorků do laboratoře.

Odebrané vzorky mají pro zkrácení jejich označení pořadová čísla a jejich popis uvádí tabulka níže.

Tabulka 9: Označení odebraných vzorků

Pořadové číslo	Označení odebraných vzorků
1	za pískovou filtrací (před O <sub>3</sub> )
2	za O <sub>3</sub> (před GAU)
3	za GAU (před UV)
4	za UV
5	Po nadávkování chemikálií (CO <sub>2</sub> , Ca(OH) <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Cl <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub> ) - před akumulací
6	Po nadávkování chemikálií (CO <sub>2</sub> , Ca(OH) <sub>2</sub> , (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Cl <sub>2</sub> , ClO <sub>2</sub> ) - za akumulací
7	surová voda

## 3.2 Ekotoxikologické posouzení

### 3.2.1 Laboratorní vybavení a přístroje

Pro účely diplomové práce bylo používáno běžné laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, skleněné pipety, automatické pipety, odměrné baňky různých velikostí, testovací destičky...).

#### *Přístroje pro ekotoxikologické testování*

Inkubátor Nüve Cooled Incubator ES 110 – inkubace bez osvětlení

Přístroj LUMISTox 300 s termoblokem LUMIStherm

### 3.2.2 Testování pitné vody ekotoxikologickými testy

Prostřednictvím testů ekotoxicity byly testovány vzorky vody odebrané za jednotlivými stupni úpravy vody, jak je uvedeno v kapitole 3.1. Jejich specifikací a označení uvádí tabulka 9. Byla zvolena baterie testů, která zahrnovala organismy ze všech trofických úrovní (producenti, konzumenti, destruenti). Představitelem producentů pro vodní prostředí je organismus *L. minor*, zástupcem konzumentů je korýš *T. platyurus* a reprezentantem destruentů je luminiscenční bakterie *V. fischeri*.

#### 3.2.2.1 Test inhibice růstu na akvatické rostlině *Lemna minor*

##### *Příprava ředící vody*

Zásobní roztoky na přípravu ředící vody neboli modifikovaného Steinbergova média pro akvatickou rostlinu *L. minor* jsou skladovány v lednici, jejich specifikace je uvedena v tabulce č. 6. Pro přípravu 1 l ředící vody se dávkuje do 1 l odměrné baňky ze zásobních roztoků makrosložek 20 ml a po 1 ml ze zásobních roztoků mikrosložek. Odměrná baňka je poté doplněna po rysku destilovanou vodou.

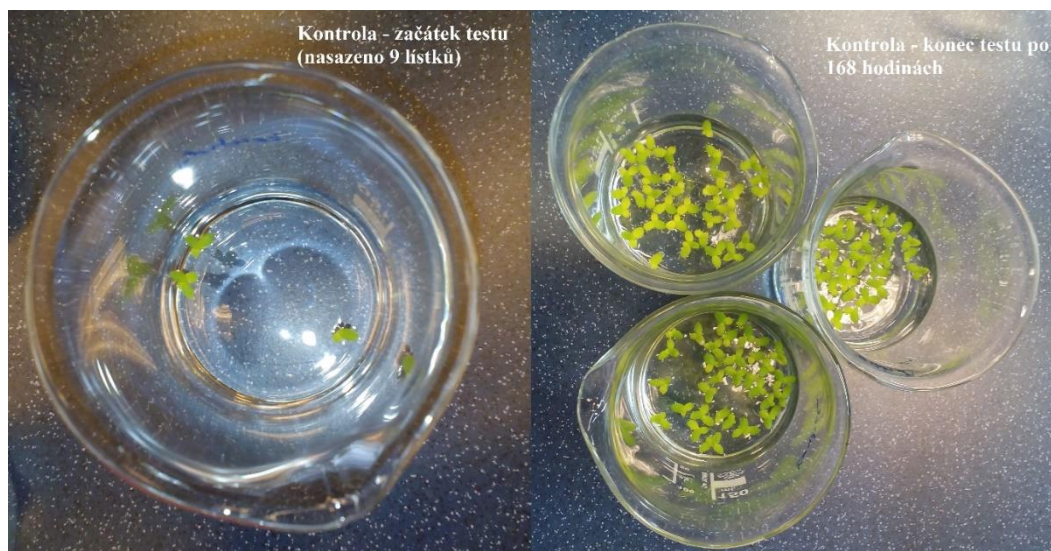
##### *Provedení testu a jeho podmínky*

Test byl proveden v souladu s metodikou ISO 20079, viz kapitola 2.4.1.2. Kontrolní testy byly realizovány ve třech paralelních stanoveních. Kontrolní test obsahoval 50 ml živného média neboli ředící vody ve 150 ml kádince, kam bylo přeneseno 9 lístků okřehku. Objem jednotlivých vzorků testované vody byl rovněž 50 ml, počet lístků okřehku byl ve všech kádinkách shodný s kontrolou. Pro posouzení, zda efekty na testovacích organismech nejsou ovlivněny nedostatkem živin v testované vodě, byl nasazen i další test. V tomto případě byly vzorky vody obohaceny roztoky makro a mikrosložek ve stejném množství, jak je vyžadováno pro přípravu živného média. Všechny kádinky s nasazenými vzorky byly přikryty plastovými Petriho miskami, aby nedocházelo k odpařování vzorku. Nasazené testy byly umístěny do akvária pod světelný zdroj, který zajišťoval kontinuální osvětlení s intenzitou 6 500 – 10 000 Lux. Test byl vyhodnocen po 168 hodinách. Podmínky testu uvádí následující tabulka.

Tabulka 10: Podmínky testu inhibice růstu na akvatické rostlině

Testovací organismus	<i>L. minor</i>
Sledovaná odezva	Inhibice růstu, chloróza, nekróza
Podmínky testu	Inkubace za světla při 6500 - 10000 Lux
Teplota	23 ± 2 °C
Objem testovaného roztoku	50 ml
Doba expozice	168 hod
Paralelní stanovení	2 (kontrola 3)
Počet lístků na testovaný objem	9





Obrázek 19: *L. minor* - průběh testování

### Platnost testu

Výsledky lze považovat za platné, pokud průměrný počet lístků v kontrole vzrostl po 168 hodinovém testování na sedminásobek nasazených lístků na začátku testu. Zároveň se výsledky považují za platné, pokud nedošlo ke změně pH v kontrolním vzorku o více než 1,5 jednotky. V laboratoři byly ve stejném čase prováděny testy na standardu dichromanu draselném, které splňovaly podmínky validity testů.

### Vztahy pro výpočet růstové rychlosti

Vztah pro výpočet růstové rychlosti neboli vyhodnocení testu podle počtu lístků:

$$r = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t}, \quad (1)$$

kde  $r$  je růstová rychlost za den,  
 $x_1$  je počet lístků na začátku testu,  
 $x_2$  je počet lístků na konci testu,  
 $t$  je doba trvání testu.

Pro každou zkoušenou koncentraci se vypočte inhibice, popř. stimulace růstové rychlosti v procentech podle rovnice:

$$I_r = \frac{r_c - r_t}{r_c} \cdot 100, \quad (2)$$

kde  $I_r$  je inhibice průměrných specifických růstových rychlostí v procentech (%), je-li  $I_r < 0$ , jedná se o stimulaci růstu,

$r_c$  je průměrná specifická růstová rychlost kontroly,  
 $r_t$  je průměrná specifická růstová rychlost vzorků nebo jejich ředění.

Na vyhodnocení testu a určení orientační hodnoty IC50 se vynese do grafu závislost inhibice růstu v procentech na logaritmu koncentrace vzorku. Z rovnice regresní přímky je možno zmíněnou hodnotu vypočítat. V našem případě, kdy u neředěných vzorků nebylo dosahováno ani 50% inhibice růstu vůči kontrole, bylo porovnání efektů jednotlivých vzorků provedeno prostřednictvím vypočtené hodnoty inhibice v %.

### 3.2.2.2 Test akutní toxicity na organismu *Thamnocephalus platyurus*

#### Příprava ředící vody

Součástí balení Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> jsou i zásobní roztoky solí (NaHCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> a KCl) pro přípravu 1 l ředící vody. Do 1 l odměrné baňky se nalije cca 800 ml destilované vody. Zásobní roztoky se kvantitativně převedou do odměrné baňky a doplní se po rysku destilovanou vodou. Před použitím ředící vody je nutné ji asi 15 min provzdušňovat.

#### Provedení testu a jeho podmínky

Test byl proveden v souladu s metodikou ISO 14380, viz kapitola 2.4.1.1 a podle standardního operačního postupu testu Thamnotoxkit F<sup>TM</sup>. 24 hodin před nasazením testu bylo nutné vylíhnutí testovacích organismů z cyst. Do ampulky s cystami byl přidán 1 ml zředěné ředící vody, která byla připravena smícháním 2,5 ml ředící vody s 17,5 ml destilovanou vodou. Následně musela být ampulka 30 minut protřepávána. Organismy byly přeneseny na Petriho misku, v níž byl nalitý zbytek zředěné ředící vody, a miska byla umístěna na 24 hodin při teplotě 25 °C do akvária s osvětlením 4000 Lux. Na vykonání testu byla použita testovací destička. Všechny testy byly realizovány ve třech paralelních stanoveních. Nejprve byly vždy organismy přeneseny do „rozplavovací“ komůrky a odtud teprve do testovacích komůrek. Kontrolní test byl realizován přidáním 1 ml ředící vody do testovací komůrky a přenesením 10 živých organismů *T. platyurus*. Stejným způsobem byly nasazeny i testované vzorky (1 ml vzorku + 10 živých organismů). Po nasazení testu byla testovací destička překryta parafilmem a víčkem, a nakonec byla umístěna do inkubátoru bez osvětlení o teplotě 25 °C po dobu 24 hodin. Po uplynulé době byl odečtený počet mrtvých organismů.

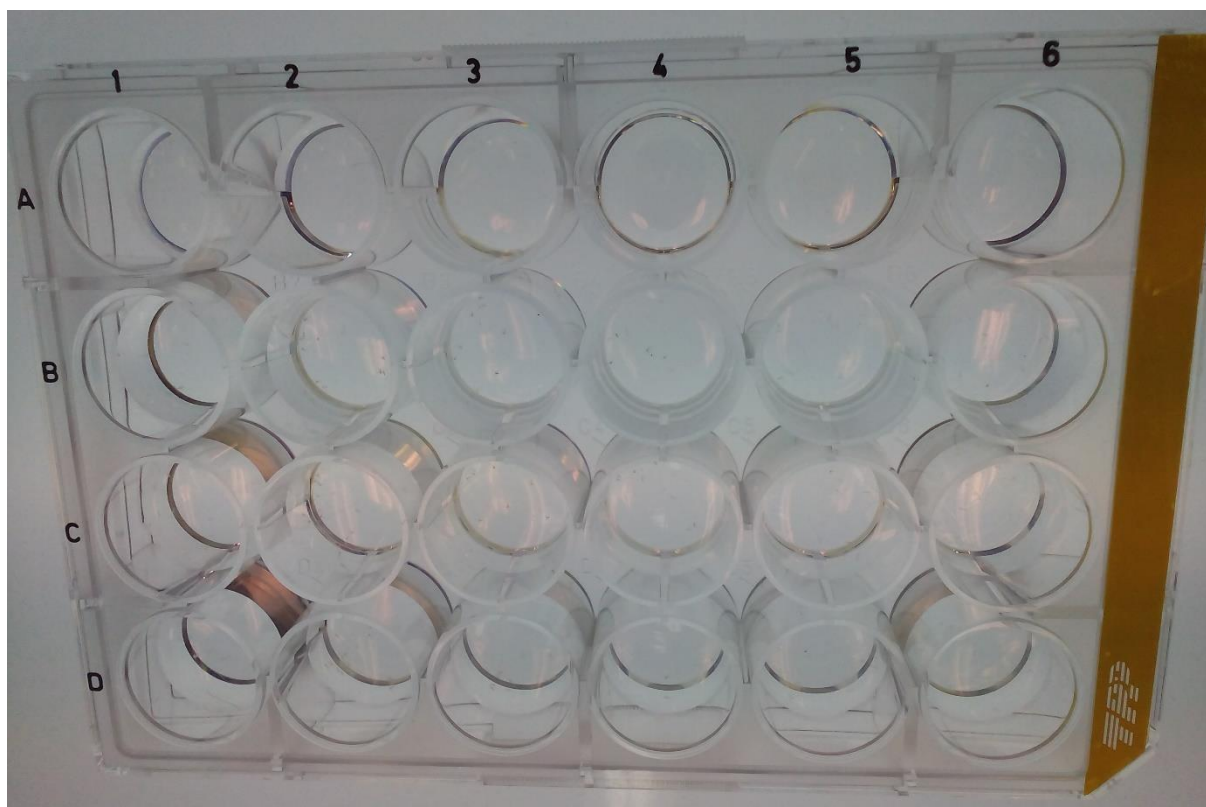
Tabulka 11: Podmínky testu na korýši *T. platyurus*

Testovací organismus	<i>T. platyurus</i>
Sledovaná odezva	Mortalita
Podmínky testu	Inkubace ve tmě
Teplota	25 °C
Objem testovaného roztoku	1 ml
Doba expozice	24 hod
Paralelní stanovení	3
Počet jedinců na testovaný objem	10

#### Platnost testu

Test na organismu *T. platyurus* se považuje za platný, pokud je splněna podmínka, že mortalita kontrolního vzorku nepřesahuje 10 %. V laboratoři byly ve stejném čase prováděny testy s referenční látkou dichromanem draselným, které splňovaly podmínky validity testů. Podmínky stanovuje norma ČSN ISO 14380, dle které se hodnota 24hLC<sub>50</sub> musí pohybovat v rozmezí od 0,052 do 0,148 mg·l<sup>-1</sup>.





Obrázek 20: Testovací destička s nasazenými organismy *T. platyurus*

#### **Vztahy pro výpočet mortality a hodnoty LC50**

Počet mrtvých a imobilizovaných jedinců se vypočítá pro každou koncentraci a vyjádří se v procentuálních hodnotách podle vztahu:

$$M = \frac{x}{y} \cdot 100, \quad (3)$$

kde  $M$  je mortalita jedinců vyjádřená v procentech (%),  
 $x$  je průměrná úmrtnost všech jedinců v testovaném vzorku,  
 $y$  je 100 % úmrtnost (10 jedinců).

Na vyhodnocení testu a určení hodnoty LC50 jsou získané hodnoty mortality převedeny na probitové hodnoty. Následně je do grafu vynesena závislost probitových hodnot na logaritmu koncentrace vzorku. Z rovnice regresní přímky se vypočítá hodnota LC50. V případě, kdy nebyla hodnota LC50 počítána, bylo porovnání efektů vzorků provedeno prostřednictvím vypočtených procentuálních mortalit u neřaděných vzorků.

#### **3.2.2.3 Test bioluminiscence na bakterii *Vibrio fischeri***

##### ***Provedení testu a jeho podmínky***

Test byl proveden v souladu s metodikou ISO 11348, viz kapitola 2.4.1.3. K měření intenzity bioluminiscence bakterií se využívá přístroj zvaný luminometr. Po přidání testované látky dochází ke změně intenzity světla, ze které lze vypočítat toxický účinek testovaného vzorku. K měření byly použity skleněné kyvety, do kterých byly přidány testované vzorky temperované na teplotu  $15 \pm 1$  °C. Testované vzorky byly inkubovány 15 a 30 minut. Jako blank a zároveň ředící voda sloužil 2% roztok chloridu sodného. Testované vzorky byly rovněž obohaceny chloridem sodným, tak aby koncentrace NaCl byla 2%. Hodnotu pH nebylo nutné upravovat, jelikož se pohybovala v daném rozmezí od 6 do 8,5.

Po vyjmutí ampulky s luminiscenčními bakteriemi z mrazáku, byla ampulka ponořena do vodní lázně na cca 2 minuty a následně k nim bylo napipetováno 0,5 ml rozmrazeného vytemperovaného reaktivačního roztoku. Takto připravená ampulka byla na 15 minut umístěna do termobloku, kde se po tuto dobu nechala temperovat. Obsah ampulky s luminiscenčními bakteriemi byl přelit ke zbytku reaktivačního roztoku a vzniklou suspenzi bylo nutné jemným třepáním homogenizovat. Do všech kyvet bylo napipetováno 0,5 ml zásobní suspenze bakterií a došlo k postupnému změření počáteční intenzity luminescence bakterií. Neprodleně po měření bylo k této suspenzi napipetováno 0,5 ml vzorku. Měření intenzity bioluminescence v kyvetách bylo provedeno v intervalech 20 sekund. Po uplynutí inkubačního času (15 a 30 minut) bylo nezbytné opět změřit intenzitu bioluminescence všech vzorků. Nakonec byly na displeji přístroje odečteny hodnoty inhibice po 15 a 30 minutách.

Tabulka 12: Podmínky testu toxicity na bakteriích *V. fischeri*

Testovací organismus	<i>V. fischeri</i>
Sledovaná odezva	Pokles bioluminescence
Podmínky testu	
Teplota	$15 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$
Objem testovaného roztoku	1 ml (0,5 ml zásobní suspenze + 0,5 ml vzorku)
Doba expozice	15 a 30 min
Paralelní stanovení	2

#### Platnost testu

Kritérií, která je nutné splnit, aby byl test na bakterii *V. fischeri* považovaný za platný, je více. Prvním z nich je, že hodnota korekčního faktoru  $f_k$  je pro 15 i 30 minutovou expozici v rozsahu hodnot 0,6 až 1,8. Dalšími kritérii jsou paralelní stanovení pro kontroly, která se od svých průměrů nesmí odchylovat o více jak 3 % a zároveň paralelní stanovení vzorků, pro která platí, že odchylky od jejich průměru v procentuálních bodech jsou maximálně 3 % body. Podle dodané šarže bakterií vyvolávají uvedené referenční látky, zkoušené paralelně s každou ampulkou připravené bakteriální suspenze, po 30 min expozici inhibici v rozsahu 20 – 80 %:

- $3,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  3,5-dichlórfenol
- $2,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Zn}^{\text{II}}$  – ekvivalentní  $9,67 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ ZnSO}_4\cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$
- $18,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{Cr}^{\text{VI}}$  – ekvivalentní  $52,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Jako standard lze použít 7,5% roztok NaCl, který má vyvolávat po 30 minutové expozici inhibici v rozsahu 40 – 60 % [64].

#### Vztahy pro výpočet

Podle uvedené normy je zapotřebí vypočítat hodnoty:

- korekčního faktoru  $f_{kt}$ ,
- korigované hodnoty intenzity luminescence  $I_{ct}$ ,
- inhibičního účinku  $H_t$ ,
- podílu ztraceného záření k množství zbytkového záření  $\Gamma_t$ .

Rovněž je nutné určit hodnotu  $LID_{lb}$  definovanou jako nejvyšší neúčinné ředění (z angl. lowest ineffective dilution). Touto hodnotou je míněno ředění nejkonzentrovějšího testovaného roztoku vzorku, při kterém inhibiční účinek nepřesahuje 20 %. Ředění je vyjádřeno jako reciproká hodnota objemového podílu vzorku vody v testovaném roztoku.

Vztah pro výpočet korekčního faktoru:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}, \quad (4)$$

kde  $f_{kt}$  je korekční faktor při expozici 5, 15 nebo 30 min,

$I_{kt}$  je intenzita luminiscence kontrolního vzorku po expozici 5, 15 nebo 30 min v relativních jednotkách luminiscence,

$I_0$  je intenzita luminiscence kontrolní zkušební suspenze bezprostředně před přidáním ředící vody, v relativních jednotkách luminiscence.

Vztah pro výpočet korigované hodnoty intenzity luminiscence  $I_{ct}$ :

$$I_{ct} = I_0 \cdot \overline{f_{kt}}, \quad (5)$$

kde  $I_{ct}$  je korigovaná hodnota  $I_0$  pro kyvety s testovaným vzorkem bezprostředně před přidáním testovaného vzorku,

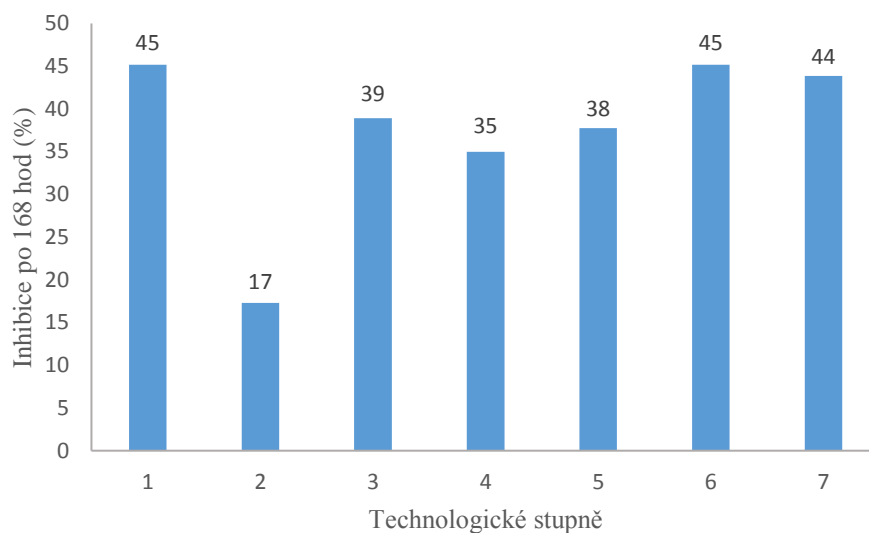
$I_0$  je intenzita luminiscence suspenze testovaného vzorku bezprostředně před přidáním vzorku, v relativních jednotkách luminiscence,

$\overline{f_{kt}}$  je průměr hodnot  $f_{kt}$ .

### 3.3 Výsledky ekotoxikologického posouzení

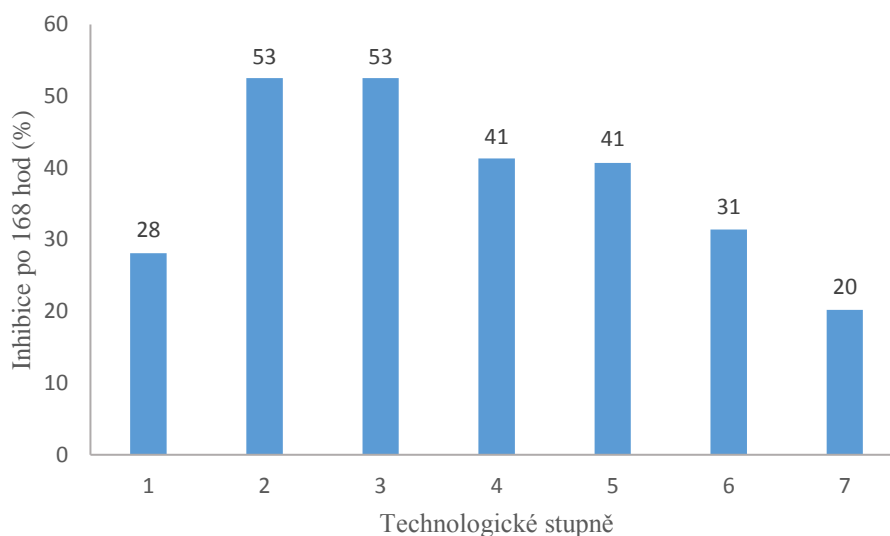
#### 3.3.1 Výsledky inhibice růstu okřehku (*Lemna minor*)

Vzorky povrchové vody a rovněž i vody po úpravě na všech technologických stupních vykazují toxické účinky na testovací organismus. Označení a popis technologických stupňů uvádí tabulka č. 9. Nejmenší inhibice růstu 17 % byla pozorována u druhého technologického stupně, tj. za ozonizací. Ostatní stupně úpravy včetně vzorku povrchové vody vykazují vyšší inhibici, a to od 35 do 45 %. U technologických stupňů 3, 4, 5 a 6 se objevila nekróza lístků okřehku.



Graf 1: Výsledky testu inhibice růstu na rostlině *L. minor* všech odebraných vzorků bez přídavku živin

Kvůli ověření, jakou úlohu v negativním působení na *L. minor* hraje případný nedostatek živin u testovaných vzorků, byly ke všem vzorkům přidány živiny dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2.1. Nejmenší inhibice byla v tomto případě pozorována zejména u povrchové vody (7) a to 20 %, dále ještě u vzorku vody po pískové filtraci (1). Nízká inhibice byla i u šestého stupně, tj. po nadávkování chemikálií za akumulací, kde dochází k delšímu zdržení chemikálií v potrubí (asi 2 hodiny), po němž vytéká už pitná voda přímo z kohoutku. U ostatních stupňů byla inhibice okolo 41 – 53 % oproti kontrole. Výše uvedené skutečnosti demonstruje graf č. 2. U vzorků číslo 1, 3, 5 a 6, včetně vzorku povrchové vody (7) po přidání živin se objevila chloróza lístků okřehku.



Graf 2: Výsledky testu inhibice růstu na rostlině *L. minor* všech odebraných vzorků po přidání živin

Pro vzorky přítoku (7) a odtoku (6) bylo aplikováno testování 100% a 50% koncentrace odebrané vody, a to vody jako takové, a navíc po přidání živin k testovaným vzorkům. Růstová rychlost se téměř u všech vzorků při 50% koncentraci blížila růstové rychlosti v kontrole. U vzorků přítoku povrchové vody s přidávanými živinami dokonce docházelo ke stimulaci růstu. U všech vzorků po přidání živin se však objevovala chloróza. Výsledky uvádí tabulka 13.

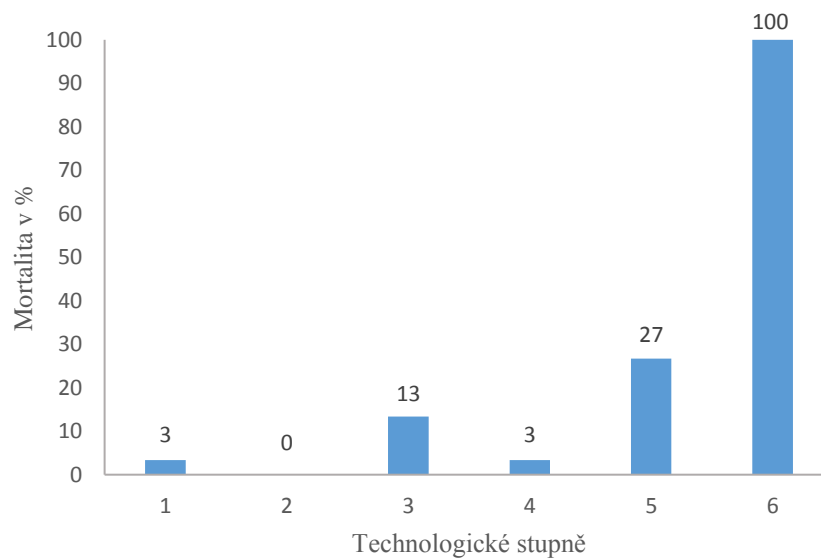
Tabulka 13: Výsledky testu vody na přítoku a odtoku z úpravny pitné vody na rostlině *L. minor*

Vzorek	Koncentrace pitné vody (%)	Průměrný počet lístků na konci testu	Růstová rychlost $r$	Inhibice růstové rychlosti $I_r$ (%)
Kontrola	-	93,5	0,0139	-
6. - bez živin	100	35,0	0,0081	42,13
	50	72,5	0,0123	11,41
6. - s živinami	100	47,0	0,0097	30,37
	50	62,0	0,0115	17,55
7. - bez živin	100	52,0	0,0104	25,35
	50	81,5	0,0131	5,96
7. - s živinami	100	71,0	0,0123	11,86
	50	95,0	0,0140	-0,63

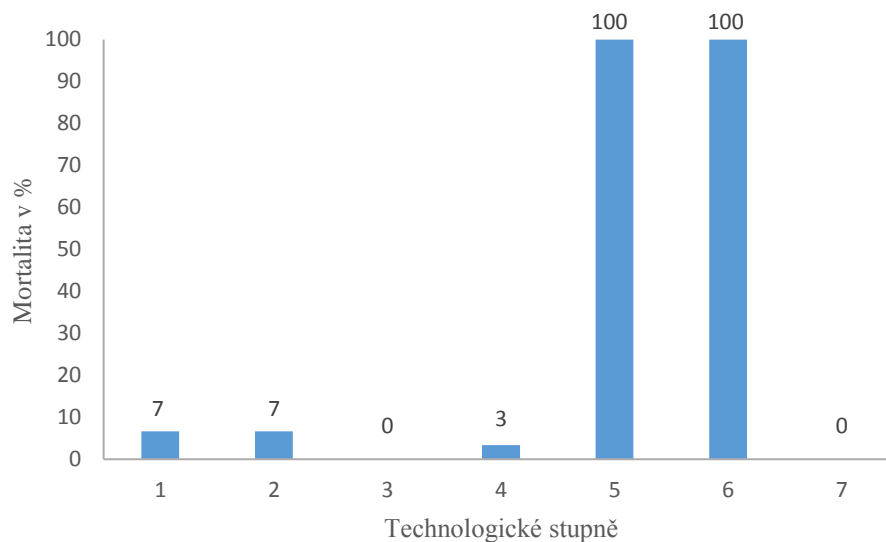
Pozn.: Uvedené záporné hodnoty znamenají stimulaci růstu

### 3.3.2 Výsledky testu na organismu *Thamnocephalus platyurus*

Testy na organismu *T. platyurus* vykazovaly významnou toxicitu vzorků zejména u technologických stupňů 5 a 6, kde dochází k dávkování chemikálií, viz graf 3 a 4. Ostatní stupně při testování 1. a 2. série vzorků toxicitu nevykazovaly, objevila se mortalita jen u vody po filtraci přes granulované aktivní uhlí (3), graf 3. Při pilotním testování (1. série) byly odebrány jen vzorky z technologických stupňů úpravy bez vzorku vstupní povrchové vody, pro první orientační posouzení výsledků.

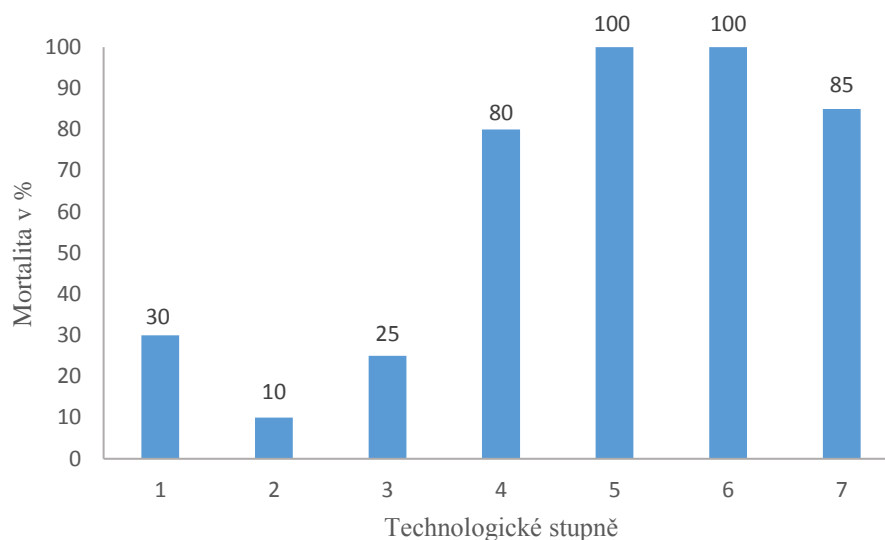


Graf 3: První série – procentuální mortalita organismů *T. platyurus* v jednotlivých technologických stupních



Graf 4: Druhá série - procentuální mortalita organismů *T. platyurus* v jednotlivých technologických stupních

Třetí série testování vykazovala částečně odlišný trend v projevu mortality při určitých technologických stupních. Z uvedeného je možné usuzovat, že na vstupu byla zhoršená kvalita vody, což se projevuje dále i v celém technologickém procesu.



Graf 5: Třetí série – procentuální mortalita organismů *T. platyurus* v jednotlivých technologických stupních

Paralelně při druhé a třetí sérii testování bylo uskutečněno testování naředěné odtékající pitné vody (6). Tato voda – neředěná, vykazovala 100% mortalitu, proto byla následně testována prostřednictvím koncentrační řady (100; 50; 25; 12,5; 6,25), za účelem výpočtu ekotoxikologické hodnoty LC. Hodnota 24 h LC50 vody na odtoku (6) při druhé sérii byla stanovena na 99,8 % a hodnota 24 h LC20 na 39 %. U třetí série jsou stanovené hodnoty na odtoku při stupni 6 vyšší. Hodnota LC50 byla určena na 99,6 % a hodnota LC20 na 71 %. Z těchto výsledků lze předpokládat již dříve zmíněnou zhoršenou kvalitu vody u realizovaných odběrů.

Tabulka 14: Výsledky druhé série stanovení mortality na odtoku (6) na organismu *T. platyurus*

Koncentrace $c$ (%)	$\log c$	Mortalita (%)	Probity
100,00	2,00	100,00	7,878
50,00	1,70	100,00	7,878
25,00	1,40	63,33	5,332
12,50	1,10	3,33	3,188
6,25	0,80	3,33	3,188

Tabulka 15: Výsledky třetí série stanovení mortality na odtoku (6) na organismu *T. platyurus*

Koncentrace $c$ (%)	$\log c$	Mortalita (%)	Probity
100,00	2,00	100	7,878
50,00	1,70	100	7,878
25,00	1,40	86,67	6,126
12,50	1,10	13,33	3,874
6,25	0,80	3,33	3,188

### 3.3.3 Výsledky bakteriálních testů inhibice bioluminiscence

Bakteriální bioluminiscenční testy toxicity provedené na organismu *V. fischeri* nelze považovat za platné vzhledem k nesplnění kritérií pro jejich platnost. Vypočítané korekční faktory splňují podmínku hodnot v rozsahu 0,6 až 1,8 pro 15 a 30 minutovou expozici. Avšak inhibice vyvolaná standardní látkou nebyla ve stanoveném rozsahu hodnot. Výsledky je možno považovat pouze za orientační.

Tabulka 16: Korekční faktory 1. testování na organismu *V. fischeri*

kontrola č.	$I_0$	$I_{15}$	$I_{30}$	$f_{kt15}$	$\overline{f_{kt15}}$	$f_{kt30}$	$\overline{f_{kt30}}$
1	261,9	191,5	207,7	0,73		0,79	
2	219,1	137,3	204,2	0,63	0,68	0,93	0,86

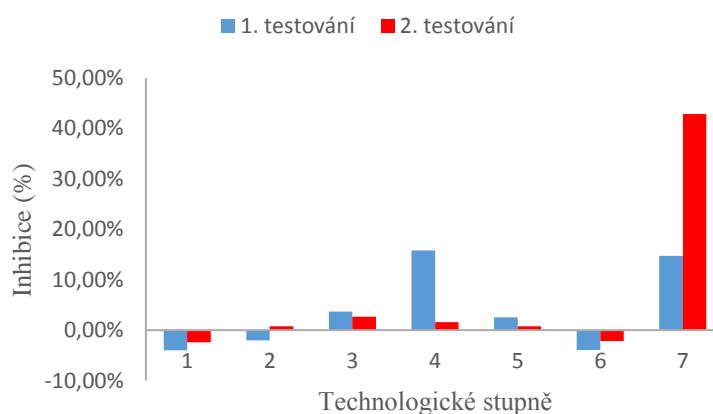
Tabulka 17: Korekční faktory 2. testování na organismu *V. fischeri*

kontrola č.	$I_0$	$I_{15}$	$I_{30}$	$f_{kt15}$	$\overline{f_{kt15}}$	$f_{kt30}$	$\overline{f_{kt30}}$
1	621,3	625,8	638,2	1,01		1,03	
2	604,4	694,1	613,1	1,15	1,08	1,01	1,02

Největší inhibiční účinek se projevil u surové vody. Vyšší toxicita se projevila i u čtvrtého technologického stupně (za granulovaným aktivním uhlím). U ostatních separačních stupňů byla inhibice bakterií nevýznamná. Po nadávkování chemikálií se objevila dokonce stimulace bakteriální suspenze.

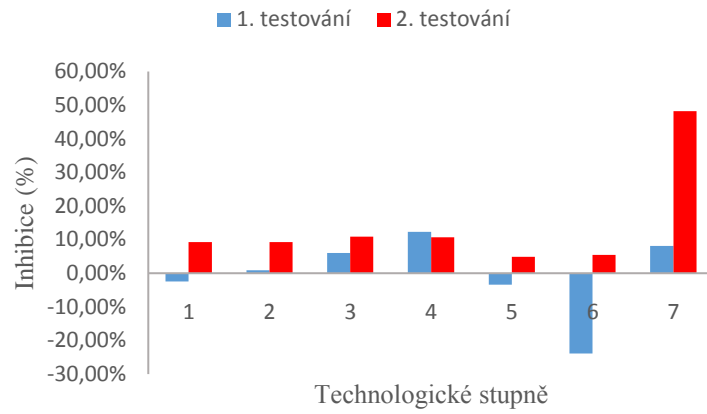
Tabulka 18: Výsledky testů na bakteriích *V. fischeri*

vzorek č.	1. test $I_{15}$	1. test $I_{30}$	2. test $I_{15}$	2. test $I_{30}$
<b>7,5% NaCl</b>	3,92%	15,74%	-6,23%	3,73%
<b>1</b>	-4,03%	-2,47%	-2,42%	9,27%
<b>2</b>	-2,06%	0,84%	0,78%	9,22%
<b>3</b>	3,69%	6,04%	2,66%	10,91%
<b>4</b>	15,83%	12,27%	1,58%	10,71%
<b>5</b>	2,53%	-3,37%	0,76%	4,87%
<b>6</b>	-3,94%	-23,88%	-2,14%	5,47%
<b>7</b>	14,73%	8,12%	42,83%	48,17%



Graf 6: Inhibice po 15 minutové expozici bakterií *V. fischeri* v jednotlivých technologických stupněch



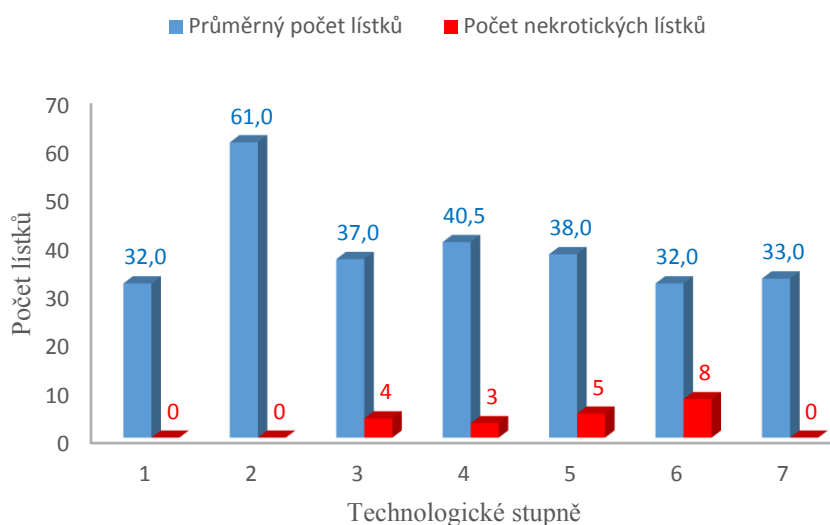


*Graf 7: Inhibice po 30 minutové expozici bakterií V. fischeri v jednotlivých technologických stupních*

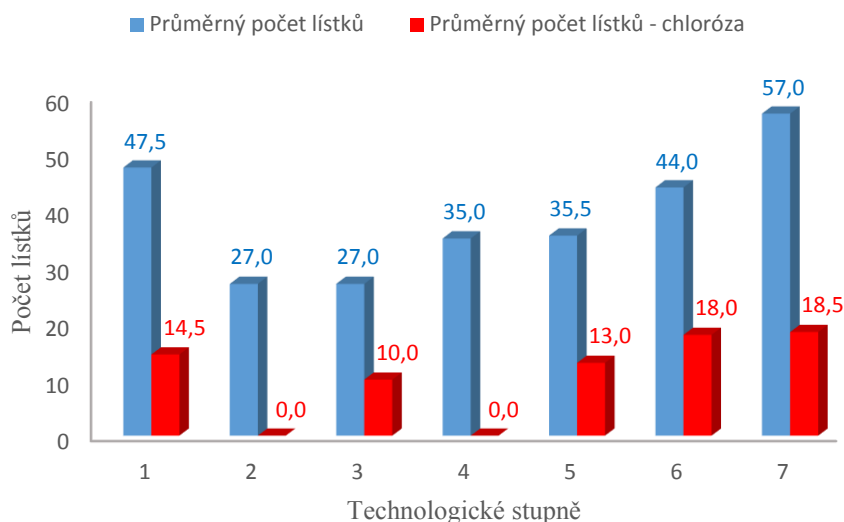
### 3.4 Diskuze výsledků ekotoxikologického posouzení

Pro ekotoxikologickou část byly využity akvatické testy na třech různých testovacích organismech, každý z jiné trofické úrovně. Testy byly provedené na vzorcích surové vody a na vzorcích vod odebraných po každém technologickém stupni. V rámci technologické linky úpravy pitné vody byly posuzovány tyto metody: písková filtrace (1), ozonizace (2), filtrace přes granulované aktivní uhlí (3), UV záření (4) a chlorování (5 a 6). Porovnání efektů jednotlivých vzorků bylo provedeno prostřednictvím vypočtené hodnoty inhibice (růstu, luminiscence) nebo mortality v %. Vzorky vod, u kterých docházelo k výraznější mortalitě či inhibici, byly následně podrobeny naředění na nižší koncentrace. Výsledky těchto testování na organismu *T. platyurus* uvádí tabulka 19 prostřednictvím vyjádřených hodnot LC50 a LC20. Bioluminiscenční testy na bakteriích *V. fischeri* byly vyhodnoceny sloupcovými grafy, avšak vzhledem k nesplnění podmínek pro platnost testu, lze tyto hodnoty považovat pouze za orientační.

Na základě získaných výsledků lze říci, že toxický účinek pitných vod na organismus *T. platyurus* byl výraznější než účinek na rostlinu *L. minor*. Voda na přítoku s přidavkem živin vykazovala u vodní rostliny oproti kontrole nejnižší inhibici (graf 9). Při testech vzorků bez přidání živin se nejnižší inhibice růstu objevila u vody odebrané po ozonizaci (graf 8). Při testování 50% surové vody s přidavkem živin se dokonce objevila stimulace růstu, jak bylo uvedeno v tabulce 13. U většiny vzorků se po přidání živin objevovala chloróza lístků okřehku, zatímco u vzorků bez přidání živin se objevovala nekróza lístků okřehku. Z výsledků lze usuzovat, že ekotoxicita pitné vody v jednotlivých stupních úpravy je pro vodní rostlinu příliš vysoká a jejímu růstu nejvíce prospívá voda na přítoku s přidavkem živin, jak je patrné z grafu 9.



Graf 8: Znárodnění počtu nekrotických lístků oproti průměrnému počtu lístků ve vzorku bez přidání živin v jednotlivých technologických stupních



Graf 9: Znáznornění počtu lístků zasažených chlorózou oproti průměrnému počtu lístků ve vzorku po přidání živin v jednotlivých technologických stupních

U organismu *T. platyurus* byla při vyhodnocování výsledků využita probitová analýza. Metoda spočívá v převedení úmrtnosti na probitové hodnoty v závislosti na logaritmech koncentrací. Výsledky pak vykazují větší linearitu a více kopírují úmrtnostní křivku. Získané výsledky potvrzují předpokládanou úmrtnost organismů po nadávkování chemikálií, viz grafy uvedené ve výsledcích v kapitole 3.3.2. Pro hygienické zabezpečení pitné vody je chlorování (5 a 6) nejčastějším způsobem úpravy. Vedlejší produkty chlorování a vznik škodlivých produktů desinfekce jsou prozkoumány nejvíce. Z výsledků lze usuzovat vznik škodlivých chlorovaných vedlejších produktů a jejich vliv na mortalitu organismu *T. platyurus*. Škodlivé vedlejší produkty desinfekce jsou blíže popsány v kapitolách věnujících se jednotlivým technologickým procesům a shrnuty v tabulce 5. Chlorace je ekonomicky vhodným řešením desinfekce pitné vody, které je nezbytné k zabránění náhodné sekundární kontaminace. Důvodem dodatečného přidávání chloru je jeho spotřeba v průběhu distribuce vody, kdy chlor reaguje se stěnami potrubí, dalšími látkami i nežádoucími mikroorganismy. U třetí série stanovení mortality organismů *T. platyurus* (graf 5) lze z výsledků předpokládat zhoršenou kvalitu vstupní surové vody a tím ovlivnění mortality v rámci celé technologické linky. Úmrtnost se při této sérii významně zvýšila a surová voda (7) vykazovala až 85% inhibici. Nejnižší inhibice se projevila u vzorků vody odebrané po ozonizaci (2). Zhoršenou kvalitu pitné vody dokazují i vypočítané hodnoty 24hLC<sub>20</sub> na odtoku z úpravny pitné vody, které uvádí tabulka č. 19, kde se tato hodnota zvýšila o 32 %. Vzhledem k tomu, že zhoršenou kvalitu surové vody nešlo předpokládat předem, hodnocení toxicity při nižších koncentracích bylo provedeno pouze u odebraných vzorků na odtoku. Získané výsledky všech provedených testů na organismu *T. platyurus* vykazují velmi podobný trend, když spolu se zhoršující se kvalitou vstupní surové vody mortalita jedinců v rámci celé technologické linky vzrůstá.

Tabulka 19: Výsledky stanovených hodnot LC<sub>50</sub> a LC<sub>20</sub> u organismu *T. platyurus*

<i>Thamnocephalus platyurus</i>	LC <sub>50</sub> (%)	LC <sub>20</sub> (%)
odtok (2. série)	99,80	39,00
odtok (3. série)	99,60	71,00

Výsledky provedených testů na bakteriích *V. fischeri* nelze považovat za platné vzhledem k nesplnění podmínek jejich validity. U zmíněných výsledků přesto lze vypořadovat určitý trend, a to že nejvyšší toxicitu vykazovala surová voda. U některých technologických stupňů je viditelná i stimulace bakterií. Pro objektivitu a korektnost výsledků je nutné testy na bakteriích v budoucnu zopakovat, získané výsledky lze považovat pouze za předběžné.

Porovnání výsledků s odbornou literaturou je problematické, s ohledem na skutečnost, že v současné době není k dispozici dostatečné množství výzkumů, které by se věnovaly ekotoxikologickému posuzování pitných vod z hlediska jednotlivých stupňů jejich úpravy.

Lze zmínit studii, která se zabývala detekcí hormonů v povrchové a pitné vodě v Brazílii a ekotoxikologickým posouzením organismem *Daphnia magna*. Korýš *D. magna* je méně citlivý organismus ve srovnání s *T. platyurus*. Výsledky studie potvrdily přítomnost hormonů v povrchových vodách ve vysokých koncentracích. Avšak testy ekotoxikologie žádnou akutní toxicitu ve zkoumaných koncentracích neprokázaly. Výsledky však neznamenají, že sloučeniny nepředstavují nebezpečí pro životní prostředí [65].

Nicméně studie provedená výzkumným centrem v Kanadě posuzovala sedm různých vzorků pitných vod. Vzorky byly testovány na organismech *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* a *Lactuca sativa*. Čtyři z nich vykazovaly toxicitu alespoň v jednom z použitých testů ekotoxicity, čímž došli k závěrům, že ne ve všech případech jsou technologické procesy schopné odstranit toxické kontaminující látky [66].

## 3.5 Analýza hormonů

### 3.5.1 Chemikálie a přístroje

Pro účely diplomové práce bylo používáno běžné laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, skleněné pipety, automatické pipety, odměrné baňky různých velikostí, vialky ...).

#### *Používané chemikálie pro screeningovou analýzu*

Deionizovaná voda (Milli-Q)

Acetonitril – CAS: 75-05-8, čistota 99 % (Sigma-Aldrich, Francie)

Methanol – CAS: 67-56-1, čistota  $\geq 99,9$  % (Sigma-Aldrich, Izrael)

Ethylacetát – CAS: 141-78-6, čistota  $\geq 99,7$  % (Sigma-Aldrich, Izrael)

n-Hexan – CAS: 110-54-3, čistota  $\geq 97$  % (Sigma-Aldrich, Španělsko)

#### *Standardy*

Estron – CAS: 53-16-7, čistota 99,3 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Estriol – CAS: 50-27-1, čistota 99,3 % (Sigma-Aldrich, Německo)

$\beta$ -Estradiol – CAS: 50-28-2, čistota  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich, Německo)

17 $\alpha$ -Ethinylestradiol – CAS: 57-63-6, čistota 99,4 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Diethylstilbestrol – CAS: 56-53-1, čistota 99,9 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Progesteron – CAS: 57-83-0, čistota 99,8 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Mestranol – CAS: 72-33-3, čistota 99,2 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Norethindron – CAS: 68-22-4, čistota 99,6 % (Sigma-Aldrich, Německo)

#### *Zařízení pro přípravu a extrakci vzorků*

Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko

SPE kolony Supelco, Supelclean ENVI-18, 500 mg, 6 ml, USA

Přístroj EVATERM pro sušení pod dusíkem, LABICOM s.r.o., ČR

Filtry PTFE 13 mm; 0,45  $\mu$ m; pk/100, LABICOM s.r.o., ČR

Filtry Nylon 4 mm; 0,2  $\mu$ m; pk/100, SMI-LabHut Ltd., UK

#### *Přístroje pro screeningovou analýzu*

Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

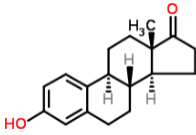
Hmotnostní spektrometr Agilent 6320 Series Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, USA)

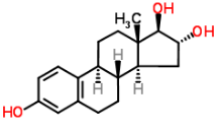
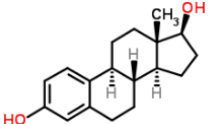
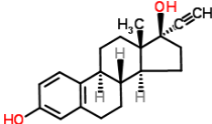
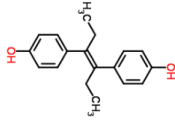
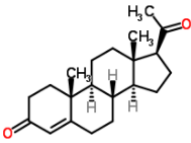
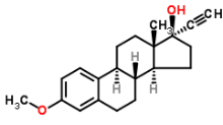
Kolona Ascentis Express C18, délka 150 mm, průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu$ m + předkolona (Supelco)

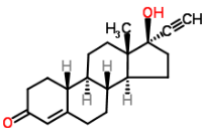
### 3.5.2 Sledované analyty v pitné vodě

Sledované analyty ve vzorcích pitné vody byly shodné se sledovanými analyty v diplomové práci Ing. Martiny Remerové. Níže vyjmenované analyty patří mezi časté polutanty vyskytující se v pitných vodách. Tabulka č. 20 popisuje základní identifikaci těchto látek, jejich název, CAS číslo (registrační číslo, pod nímž jsou chemické látky registrovány a popsány v databázi Chemical Abstract Service), sumární a strukturní vzorec, molekulovou hmotnost a jejich vlastnosti.

Tabulka 20: Základní informace o sledovaných analytech a jejich vlastnosti [67]

Název	<b>Estron</b>	
CAS	53-16-7	
Sumární a strukturní vzorec	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	
Molekulová hmotnost	270,366	
Vlastnosti	Estron je estrogenní hormon produkovaný vaječníky a podkožním tukovým vazivem, špatně rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v organických rozpouštědlech.	

Název	<b>Estriol</b>	
CAS	50-27-1	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{18}H_{24}O_3$	
Molekulová hmotnost	288,381	
Vlastnosti	Estriol se tvoří v placentě, ve vodě je téměř nerozpustný, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.	
Název	<b><math>\beta</math>-Estradiol</b>	
CAS	50-28-2	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{18}H_{24}O_2$	
Molekulová hmotnost	272,382	
Vlastnosti	$\beta$ -Estradiol je estrogenní hormon, který je produkován ve vaječnících, placentě, varlatech a případně v kůře nadledvin, ve vodě špatně rozpustný, rozpustný v organických rozpouštědlech.	
Název	<b>17<math>\alpha</math>-Ethinylestradiol</b>	
CAS	57-63-6	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{20}H_{24}O_2$	
Molekulová hmotnost	296,403	
Vlastnosti	17 $\alpha$ -Ethinylestradiol je hormon, který se používá především k výrobě hormonální antikoncepce, ve vodě špatně rozpustný, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech.	
Název	<b>Diethylstilbestrol</b>	
CAS	56-53-1	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{18}H_{20}O_2$	
Molekulová hmotnost	268,350	
Vlastnosti	Diethylstilbestrol je syntetický nesteroidní estrogen, nerozpustný ve vodě, rozpustný v alkoholu, etheru, chloroformu nebo v oleji.	
Název	<b>Progesteron</b>	
CAS	57-83-0	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{21}H_{30}O_2$	
Molekulová hmotnost	314,462	
Vlastnosti	Progesteron je steroidní hormon zapojený do ženského menstruačního cyklu, těhotenství a embryogeneze, nerozpustný ve vodě, rozpustný např. v ethanolu.	
Název	<b>Mestranol</b>	
CAS	72-33-3	
Sumární a strukturální vzorec	$C_{21}H_{26}O_2$	
Molekulová hmotnost	310,430	
Vlastnosti	Mestranol je syntetický hormon, jako jeden z prvních používán v antikoncepci, ve vodě prakticky nerozpustný, rozpustný v ethanolu, etheru, chloroformu, acetonu.	

Název	<b>Norethindron</b>	
CAS	68-22-4	
Sumární a strukturální vzorec	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	
Molekulová hmotnost	298,419	
Vlastnosti	Norethindron se používá jako náhrada progesteronu, mírně rozpustný ve vodě a v alkoholu, rozpustný v chloroformu a dioxanu.	

### 3.5.3 Příprava standardů, modelového vzorku a izolace analytů

Před přípravou standardů bylo nutné si ještě připravit zásobní roztok acetonitrilu s vodou v poměru 6:4. Do 100 ml odměrné baňky bylo napipetováno 60 ml acetonitrilu a baňka byla doplněna po rysku destilovanou (Milli Q) vodou. Následně mohly být připraveny zásobní roztoky hormonů o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup>. Na analytických vahách bylo naváženo 10 mg standardu a ten byl následně kvantitativně převeden do 10 ml odměrné baňky, která byla doplněna zásobním roztokem acetonitrilu s vodou po rysku. Posléze byl připraven pracovní roztok všech standardů o koncentraci 3 μg·ml<sup>-1</sup>. Do 10 ml odměrné baňky bylo přidáno 30 μl každého z osmi zásobních roztoků hormonů a baňka byla doplněná směsí acetonitrilu s vodou po rysku. Následným ředěním byla připravena koncentrační řada pro kalibraci, která je uvedena v tabulce č. 21.

Tabulka 21: Koncentrační řada pro kalibraci

Roztok č.	Koncentrace v μg·ml <sup>-1</sup>
1	3,000
2	1,200
3	0,300
4	0,030
5	0,009

Modelový vzorek byl připraven smícháním 1 ml pracovního roztoku všech standardů o koncentraci 3 μg·ml<sup>-1</sup> s 200 ml destilované (Milli Q) vody. Takto připravená modelová směs a dále i všechny odebrané vzorky byly pro izolaci analytů podrobeny SPE extrakci. Metoda SPE byla provedena v následujících krocích, které uvádí tabulka č. 22.

Tabulka 22: Podmínky SPE extrakce

Kroky	Množství chemikálie
Kondicionace kolonky	5 ml n-hexan
	5 ml ethylacetát
	5 ml methanol
	10 ml Milli Q vody
Aplikace vzorku	1000 ml pitná voda
Sušení	20 min vzduch
Eluce analytu	6 ml směs ethylacetát - methanolu (5:1)
Rozpuštění analytů	0,2 ml methanol

K extrakci metodou SPE byly využity kolonky Supelclean ENVI-18, 500 mg, 6 ml (Supelco). Kolonka byla promyta postupně všemi rozpouštědly bez toho, aby došlo k vyschnutí kolonky. Přebytek rozpouštědla byl vyprázdněn promytím destilovanou vodou. Dalším krokem byla aplikace vzorku o objemu 1000 ml a následovalo 20-minutové sušení kolonky proudem vzduchu. Zásadním krokem byla eluce analytů směsí rozpouštědel o objemu 6 ml a vzniklý eluát byl jímán do vialky. Eluát byl odpařen pod dusíkem a potom rozpuštěn v 0,2 ml methanolu. Všechny připravené vzorky bylo nutné ještě před

samotnou analýzou zfiltrovat, nejprve přes filtry PTFE 13 mm; 0,45 µm a nakonec přes filtry Nylon 4 mm; 0,2 µm.



Obrázek 21: Realizace metody SPE

### 3.5.4 Analýza a její podmínky

Analýza modelové směsi i všech připravených reálných vzorků byla provedena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jako iontový zdroj v hmotnostním spektrometru sloužil elektrosprej a jako analyzátor sférická iontová past.

Pro kvantifikaci analytů byla využita metoda externí kalibrace. Pro každý analyt byly naměřené pětibodové kalibrační křivky. Byly sledovány tyto kvazimolekulární ionty:

Tabulka 23: Sledované ionty

Hormony	Sledovaný ion	Retenční čas	Polarita
Estron	269,2	7,6	-
Estriol	287,1	1,9	-
β-Estradiol	271,1	5,5	-
17α-Ethinylestradiol	295,2	7,0	-
Diethylstilbestrol	267,1	8,7	-
Progesteron	315,0	12,0	+
Mestranol	333,0	-	+
Norethindron	299	6,6	+

Analyty v reálných vzorcích byly identifikovány porovnáváním hmotnostních spekter standardů z kalibrační křivky s hmotnostními spektry analytů ve vzorcích. Pro stanovení byla vybrána kolona Ascentis Express C18 (délka 150 mm, průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7 µm). Podmínky pro analýzu jsou uvedeny v následující tabulce.





Obrázek 22: Kapalinový chromatograf (Agilent 1100 Series) s hmotnostním spektrometrem (Agilent 6320 Series), Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, USA)

Tabulka 24: Podmínky analýzy

Mobilní fáze	Milli Q voda:Acetonitril
Průtok mobilní fáze	0,250 ml·min <sup>-1</sup>
Gradient mobilní fáze	0 min (60:40 voda:Acetonitril) 20 min (10:90 voda:Acetonitril)
Nástřik	10 μl
Teplota kolony	25 °C
Detekční mód	Pozitivní i negativní
Doba analýzy	30 min (20 min analýza, 10 min ustálení tlaku)
Skenovací rozsah (m/z)	50 – 600 u

## 3.6 Výsledky analytické části

### 3.6.1 Optimalizace podmínek screeningové analýzy

Chromatografické podmínky analýzy byly převzaty z diplomové práce Martiny Remerové. Kolona použitá pro analýzu byla Ascentis Express C18, délka 150 mm, průměr 2,1 mm, velikost částic 2,7  $\mu\text{m}$ . Podmínky analýzy jsou uvedeny v tabulce č. 24.

### 3.6.2 Výtěžnost metody extrakce SPE

Metoda SPE a její podmínky byly přebrány z diplomové práce Martiny Remerové. Jejich správnost byla ověřena pomocí modelového vzorku, který byl připraven kontaminací Milli Q vody hormony o známé koncentraci. Pro práci byly použity SPE kolony Supelclean ENVI-18, 500 mg, 6 ml (Supelco). Výtěžnost metody byla uspokojivá, pohybovala se v rozmezí od 59 do 102 %.

V rámci optimalizace podmínek analýzy a většího zakoncentrování sledovaných analytů bylo zvýšené množství prolévaného vzorku ze 400 ml na 1 000 ml, a snížené množství rozpouštědla k rozpuštění odpařeného eluátu z 1 ml na 200  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 25: Vyhodnocení výtěžnosti s modelovým vzorkem

Sledované analyty	Výtěžnost (%)
Estron	102,21
Estriol	62,99
$\beta$ -Estradiol	94,00
17 $\alpha$ -Ethinylestradiol	75,92
Diethylstilbestrol	59,27
Progesteron	78,19
Norethindron	84,74

### 3.6.3 Kalibrační závislosti sledovaných analytů

Kalibrační závislosti sledovaných hormonů byly vytvořeny pomocí programu Microsoft Excel 2013. Grafy kalibračních závislostí jednotlivých hormonů jsou uvedeny v příloze diplomové práce.

Lineární rovnice regrese kalibrační závislosti estronu je  $23,668 \cdot 10^6 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9998. Pomocí programu Microsoft Excel 2013 byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti u nejnižší koncentrace dle výšky píku analytu a šumu. Mez detekce estronu byla stanovena na  $16,50 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $55,00 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti estriolu je  $-60,515 \cdot 10^4 x^2 + 20,787 \cdot 10^6 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9999. Mez detekce estriolu byla stanovena na  $2,70 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $9,00 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti  $\beta$ -estradiolu je  $49,154 \cdot 10^4 x^2 + 47,647 \cdot 10^5 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9999. Mez detekce  $\beta$ -estradiolu byla stanovena na  $20,77 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $69,23 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu je  $42,552 \cdot 10^4 x^2 + 63,623 \cdot 10^5 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9999. Mez detekce 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu byla stanovena na  $28,03 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $93,43 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti diethylstilbestrolu je  $-10,925 \cdot 10^6 x^2 + 14,310 \cdot 10^7 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9996. Mez detekce diethylstilbestrolu byla stanovena na  $1,17 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $3,9 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti progesteronu je  $-47,497 \cdot 10^6 x^2 + 34,743 \cdot 10^7 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9991. Mez detekce progesteronu byla stanovena na  $38,57 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $128,57 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Kvadratická rovnice regrese kalibrační závislosti norethindronu je  $-44,952 \cdot 10^6 x^2 + 37,966 \cdot 10^7 x$ . Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  je 0,9952. Mez detekce norethindronu byla stanovena na  $54,78 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  a mez stanovitelnosti na  $182,60 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Tabulka 26: Stanovené hodnoty LOD a LOQ u sledovaných analytů

Sledované analyty	LOD ( $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ )
Estron	16,50	55,00
Estriol	2,70	9,00
$\beta$ -Estradiol	20,77	69,23
$17\alpha$ -Ethinylestradiol	28,03	93,43
Diethylstilbestrol	1,17	3,90
Progesteron	38,57	128,57
Norethindron	54,78	182,60

### 3.6.4 Stanovení sledovaných analytů v reálných vzorcích

Odebrané bodové vzorky surové vody a vzorky vod po všech technologických stupních byly zpracovány metodou SPE a následně podrobeny analýze pomocí přístroje HPLC/MS. Získané výsledky byly vyhodnoceny s použitím programu Microsoft Excel 2013.

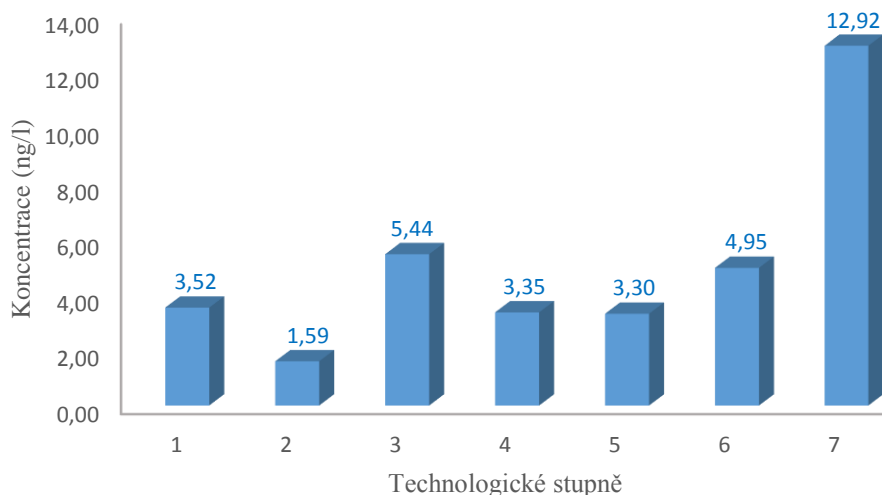
Tabulka 27: Výsledky screeningové analýzy hormonů v surové vodě a po všech technolog. stupních v  $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$

Tech. stupeň	Progesteron	Norethindron	Diethylstilbestrol	Estron	$\beta$ -Estradiol	$17\alpha$ -Ethinylestradiol	Estriol
1	(1,63)	(1,13)	(0,49)	(1,53)	(3,52)	< LOD	74,75
2	(0,78)	(0,64)	< LOD	(0,47)	(1,59)	(19,63)	11,03
3	(1,64)	(0,95)	(0,55)	(1,19)	(5,44)	(3,46)	11,72
4	(1,98)	< LOD	(0,75)	< LOD	(3,35)	< LOD	3,11
5	(2,48)	(0,23)	(0,16)	(0,62)	(3,30)	< LOD	13,44
6	(0,88)	(2,81)	< LOD	(1,61)	(4,95)	67,78	5,80
7	< LOD	(3,19)	< LOD	< LOD	(12,92)	< LOD	5,54

Pozn.: Hodnoty v závorkách se nacházejí pod mezí detekce

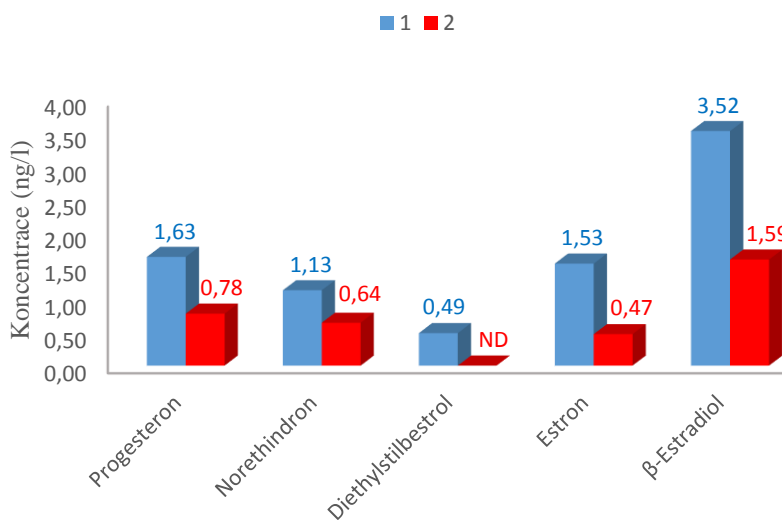
V surové vodě byly detekovány sledované analyty norethindron,  $\beta$ -estradiol a estriol. Hormony progesteron, diethylstilbestrol, estron a  $17\alpha$ -ethinylestradiol v surové vodě detekovány nebyly. Nejvyšší stanovená koncentrace hormonu v surové vodě byla u  $\beta$ -estradiolu a to  $12,92 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ . Předpokládat lze i vysokou koncentraci  $17\alpha$ -ethinylestradiolu, jelikož po druhém technologickém stupni, tj. po ozonizaci, byl obsažen v množství  $19,63 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Ve vodě po pískové filtraci byly detekovány vyjma  $17\alpha$ -ethinylestradiolu všechny sledované analyty. Hormon estriol byl obsažen v nejvyšší koncentraci, tj.  $74,75 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ . Naopak v nejmenším množství byl přítomen hormon diethylstilbestrol. Ostatní detekované hormony byly nalezeny v množství okolo jednotek  $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ . Po pískové filtraci lze vidět první pokles koncentrace sledovaných analytů oproti vzorku surové vody, avšak u estriolu se objevuje výrazné zvýšení koncentrace.



Graf 10: Stanovené koncentrace  $\beta$ -estradiolu v  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  v jednotlivých technologických stupních

U vody po ozonizaci byly detekovány kromě hormonu diethylstilbestrolu všechny sledované analyty. U tohoto technologického stupně je patrné výrazné snížení koncentrace všech sledovaných hormonů. Nejnižší stanovená koncentrace byla u estronu a to  $0,47 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Lze si všimnout i výrazného poklesu estriolu z množství  $74,75 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  po pískové filtraci na  $11,03 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  po ozonizaci.

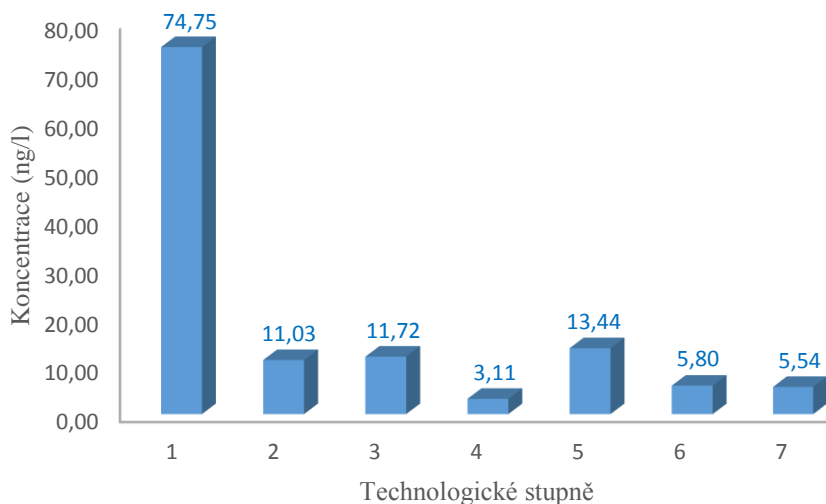


Graf 11: Stanovené koncentrace hormonů v  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  v prvních dvou technologických stupních (modrá – písková filtrace, červená – ozonizace)

Ve vodě po filtraci přes granulované aktivní uhlí byly detekovány všechny sledované analyty. Z tabulky č. 27 je patrné, že při tomto technologickém stupni dochází zpět k mírnému zvýšení koncentrací sledovaných hormonů. Výjimka nastala u hormonu  $17\alpha$ -Ethinylestradiol, kde dochází ke snížení koncentrace z  $19,63 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  po ozonizaci na  $3,46 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  po filtraci přes GAU.

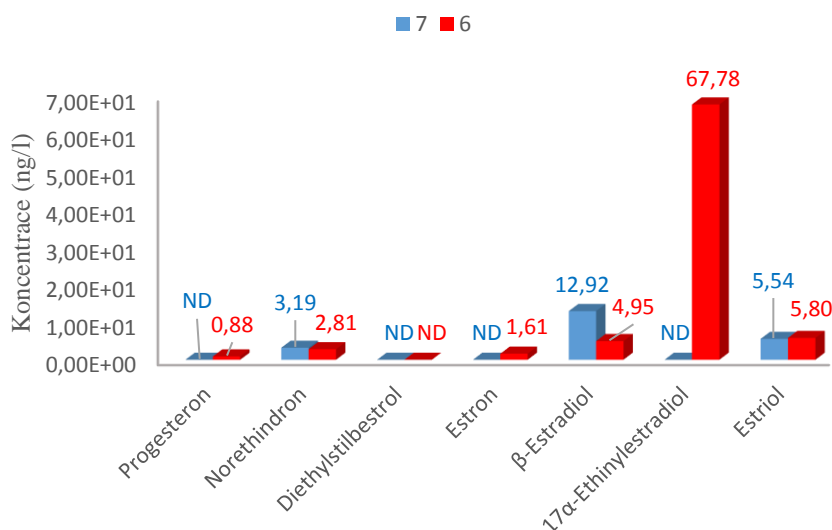
Ve vodě po aplikaci UV záření byly detekovány sledované analyty progesteron, diethylstilbestrol,  $\beta$ -estradiol a estriol. Hormony norethindron, estron a  $17\alpha$ -ethinylestradiol ve vodě po aplikaci UV záření detekovány nebyly. U hormonů progesteron a diethylstilbestrol je vidět mírné zvýšení koncentrace a naopak u hormonů  $\beta$ -estradiol a estriol snížení koncentrace.

Po nadávkování chemikálií pro hygienické zabezpečení vody byly detekovány vyjma 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu všechny sledované analyty. Mimo hormony progesteron a estriol došlo u tohoto technologického stupně ke snížení koncentrace. Ve vodě po nadávkování chemikálií byl obsažen v nejvyšší koncentraci hormon estriol a to v množství 13,44 ng·l<sup>-1</sup>.



Graf 12: Stanovené koncentrace estriolu v ng·l<sup>-1</sup> v jednotlivých technologických stupních

V pitné vodě z akumulární nádrže, odkud již odtéká kompletně upravená voda, která prošla celou technologickou linkou včetně hygienického zabezpečení, byly detekovány kromě hormonu diethylstilbestrolu všechny sledované analyty. Koncentrace hormonů norethindronu, estronu a  $\beta$ -estradiolu se zvýšily oproti předchozímu technologickému stupni, ale oproti surové vodě došlo ke snížení koncentrace. Hormony progesteron a estriol vykazovaly nižší koncentrace vzhledem k předchozímu technologickému stupni, ale estriol v surové vodě vykazoval o něco nižší koncentrace než v upravené pitné vodě. Nejvyšší stanovená koncentrace v pitné vodě byla u 17 $\alpha$ -ethinylestradiol v množství 67,78 ng·l<sup>-1</sup>.



Graf 13: Posouzení účinnosti celé technologické linky (6) v porovnání se vstupní surovou vodou (7) v ng·l<sup>-1</sup>

### 3.7 Diskuze výsledků analytické části

Analýza hormonů byla vykonána na vzorku surové vody a na vzorcích vod odebraných po každém technologickém stupni. Prostřednictvím screeningové analýzy byly posuzovány všechny separační stupně technologické linky. Pro analytickou část byla připravena koncentrační řada (0,009; 0,03; 0,3; 1,2; 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) z osmi zásobních roztoků hormonů. Kalibrační závislosti jsou uvedeny v příloze č. 2.

Koncentrace sledovaných analytů ve vzorcích byla vyhodnocena pomocí výše uvedených kalibračních závislostí. U surové vody na přítoku byl detekován pouze hormon estriol, ostatní analyty byly v koncentracích pod mezí detekce, popř. nebyly detekovány vůbec. Kompletní tabulku č. 27 stanovených koncentrací všech sledovaných hormonů v jednotlivých technologických stupních lze najít v kapitole 3.6.4.

Na základě poznatků z literatury vyplývá, že ozonizace je velice účinná metoda pro odstraňování škodlivých organických látek, barvy, zápachů i mikroorganismů. Ozónem pak mohou být oxidovány anorganické prvky, jako jsou železo nebo mangan, ale i uhlovodíky, prostředky na ochranu rostlin, pesticidy a další. Získané výsledky potvrzují zmíněné poznatky této technologie a jsou ilustrovány v grafu č. 11. U všech sledovaných analytů byl pozorován velký pokles koncentrací, u estriolu klesla koncentrace ze 74,75 na 11,03  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ostatní stanovené koncentrace se nacházejí pod mezí detekce, ale přesto trend poklesu koncentrací je zde pozorovatelný. Pro upřesnění získaných hodnot se dávka ozonu na úpravě pitné vody v České republice obvykle pohybovala od 0,6 do 1  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Pitná voda, která již prošla celou technologickou linkou včetně hygienického zabezpečení, při analýze potvrdila přítomnost některých hormonálních látek. Nejvyšší stanovené koncentrace analytů v pitné vodě byly 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 67,78  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , a estriol 5,80  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Ostatní koncentrace sledovaných analytů se pohybovaly pod mezí detekce, hormon diethylstilbestrol v pitné vodě nebyl detekován vůbec. Zvýšenou koncentrací 17 $\alpha$ -ethinylestradiolu lze přisoudit jeho využívání při výrobě perorálních hormonálních antikoncepčních přípravků, které se v současnosti důsledkem jejich používání stávají známými polutanty povrchových a odpadních vod.

V porovnání s výsledky diplomové práce Martiny Remerové, na niž tato práce z části navazuje, nejsou zjištěné výsledky i přes zavedení nových technologií zcela uspokojivé. V diplomové práci M. Remerové byl detekován u pitné vody na výstupu z akumulární nádrže pouze hormon estriol. Stanovená koncentrace v práci M. Remerové byla pod mezí stanovitelnosti a její hodnota byla 15,74  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  [68].

Výsledky účinnosti technologických procesů lze srovnat se studií, která probíhala ve Španělsku. Studie se věnovala výskytu a odstraňování léčiv a hormonů prostřednictvím úpravy pitné vody. Jejím cílem bylo zhodnotit přítomnost a chování 55 léčiv, hormonů a metabolitů. Koagulace, flokulace a písková filtrace obecně ukázaly špatnou efektivitu odstraňování těchto látek, zatímco chlorace a ozonizace vykazovaly vyšší účinnost. Oba oxidační procesy odstranily více než 20 z 35 sloučenin nalezených v surových vodách. GAU filtrace byla také účinná a to především pro odstranění sloučenin s vysokými hydrofobními vlastnostmi. Podobný trend odstraňování hormonů je znatelný i ze získaných výsledků této práce, kde mezi neúčinnější procesy se řadí ozonizace a chlorace [69].

Výzkum, který proběhl v jihovýchodním Španělsku, zkoumal vliv sezónních klimatických rozdílů na účinnost odstraňování polutantů z pitné vody. Sledovanými hormony byly estron, 17 $\beta$ -estradiol a 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. Výsledky výzkumu dokazují, že polutanty obecně jsou v surové vodě obsaženy ve vyšších koncentracích v chladnějších obdobích (podzim, zima). Důsledkem jejich biologické degradace, která je v létě podporována vysokými teplotami a slunečním zářením, se jejich množství snižuje. Výzkumem byl znovu potvrzen fakt významné účinnosti odstraňování polutantů chlorací, zejména léčiv a hormonů, u nichž se pohybovala účinnost odstranění okolo 90 %. Koncentrace sledovaných hormonů v surové vodě v lednu dosahovala hodnot kolem 90  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdežto v červenci pouze 10  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ . Na základě

těchto poznatků lze usuzovat, že výsledné množství stanovené v této práci může být ovlivněno také tím, že vzorky byly odebrány v období měsíců února až dubna, kdy venkovní teplota vzduchu zaostávala za svými dlouhodobými průměry. Pro účely analýzy vzorků diplomové práce M. Remerové byly vzorky odebrány ve stejném období [70].

Vzhledem k publikovaným hodnotám koncentrací, které se většinou pohybují pod mezí detekce, nelze s jistotou tvrdit, že sledované analyty jsou ve vodě zcela jistě přítomny. Potvrdit lze jen hormon estriol, který byl stanovený v pitné vodě i v práci M. Remerové.

## 4 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo hodnocení účinnosti úpravy pitné vody a jejich separačních stupňů prostřednictvím ekotoxikologických testů a screeningové analýzy.

V rámci teoretické části byla provedena literární rešerše zaměřená na problematiku úpravy povrchové vody na vodu pitnou. S ohledem na skutečnost, že v povrchové vodě se vyskytuje značné množství různých polutantů, jedná se mimo jiné o pesticidní látky a jejich metabolity, léčiva a hormony, je nutné tyto polutanty prostřednictvím technologických procesů eliminovat. Vzhledem k možné feminizaci živočichů, obzvláště ryb, vlivem zvýšené koncentrace estrogenních hormonálních látek ve vodách, je v současnosti téma „hormony v pitné vodě“ velmi rozšířené. V rešerši jsou podrobněji popsány veškeré technologické procesy, využívané na úpravě vody v České republice, jejichž účinnost byla posuzována v rámci této diplomové práce.

Testy byly provedeny na vzorcích surové vody a na vzorcích vod odebraných po každém technologickém stupni. V rámci technologické linky úpravy pitné vody byly posuzovány tyto metody: písková filtrace, ozonizace, filtrace přes granulované aktivní uhlí, UV záření a chlorování. Stupeň chlorování byl posuzován ihned po nadávkování chemikálií pro hygienické zabezpečení pitné vody, a poté za akumulaci nádrží, odkud již odtéká kompletně upravená pitná voda.

Pro ekotoxikologickou část byly využity akvatické testy na třech různých testovacích organismech, a to *Lemna minor*, *Thamnocephalus platyurus* a *Vibrio fischeri*, každý z jiné trofické úrovně. Toxický účinek pitných vod na organismus *T. platyurus* byl výraznější než účinek na rostlinu *L. minor*. Surová voda s přidavkem živin vykazovala u *L. minor* nejnižší inhibici růstu. Naproti tomu vzorek vody bez přidavku živin vykazoval nejnižší inhibici po aplikaci ozonizace. Nejvíce toxický efekt představovala voda po chloraci, při níž organismus *T. platyurus* vykazoval 100% mortalitu. Pro vodu na odtoku při 2. sérii testování byly stanoveny hodnoty LC50 99,8 % a LC20 39 %. Na základě horších výsledků v rámci celé technologické linky při 3. sérii testování organismu *T. platyurus*, lze předpokládat zhoršenou kvalitu vstupní vody. Při 3. sérii testování na *T. platyurus* byly vypočteny hodnoty LC50 na 99,6 % a LC20 na 71 %.

Analytická část diplomové práce se zaměřuje na screeningovou analýzu hormonů v jednotlivých technologických stupních. Vzorky byly zpracovány metodou SPE a následně podrobeny analýze pomocí přístroje HPLC/MS. Optimalizace metody byla přebrána z diplomové práce Martiny Remerové. Na přítoku surové vody byl detekován pouze hormon estriol, ostatní analyty byly v koncentracích pod mezí detekce nebo nebyly detekovány vůbec. Po prvním technologickém stupni, tj. pískové filtraci byla detekována již většina sledovaných hormonů, avšak kromě estriolu se všechny nacházely pod mezí detekce. U druhého sledovaného technologického stupně ozonizace byl pozorován velký pokles koncentrací, které byly pak následně dalšími stupni (GAU filtrace a UV záření) o něco málo navýšeny. U posledního stupně úpravy, po nadávkování chemikálií, byly na výstupu pitné vody detekovány hormony 17 $\alpha$ -ethinylestradiol v koncentraci 67,78 ng·l<sup>-1</sup> a estriol v koncentraci 5,80 ng·l<sup>-1</sup>. Ostatní sledované analyty se nacházely pod mezí detekce, hormon diethylstilbestrol v pitné vodě nebyl detekován vůbec.

Ze získaných výsledků vyplývá, že akutní toxicita se projevuje zejména u vzorků po nadávkování chemikálií, z čehož lze předpokládat tvorbu škodlivých chlorovaných vedlejších produktů a jejich vliv na mortalitu organismu *T. platyurus*. Výsledky rovněž dokazují škodlivé účinky vzorků vod z jednotlivých technologických stupňů na růst *L. minor*, jelikož na její růst měl nejmenší negativní vliv vzorek vody na přítoku s přidavkem živin. Dalším krokem v hodnocení pitných vod by mohlo být testování chronické toxicity, vzhledem k dlouhodobému výskytu kontaminantů, které mají negativní vliv na životní prostředí. Získanými výsledky byla dále potvrzena výrazná účinnost odstranění hormonálních látek z pitné vody ozonizací a chlorací. Na základě zjištěných poznatků vyplývá, že je



neustále nutné věnovat pozornost posuzování účinnosti a modernizaci technologických procesů pro úpravu pitných vod.

## 5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOŽÍŠEK, F., J. KOS a P. PUMANN. *Hygienické minimum pro pracovníky ve vodárenství: učební pomůcka pro získání znalostí nutných k ochraně veřejného zdraví z hlediska prevence nemocí způsobených vodou*. Praha: Sovak, 2006, 80 s.
- [2] Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a... *Portál eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství* [online]. Praha: Ministerstvo zemědělství, c2009-2016 [cit. 2016-10-13]. Dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/Legislativa-ostatni\\_uplna-zneni\\_vyhlaska-2004-252.html](http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/Legislativa-ostatni_uplna-zneni_vyhlaska-2004-252.html)
- [3] NOVOBILSKÁ, M.: *Kvalita pitných vod v Moravskoslezském kraji*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- [4] POMYKAČOVÁ I., F. Kožíšek, D. Gari Weyessa, V. Němcová, L. Nešpůrková: *Problematika arсенu v pitné vodě v České republice: Sborník konference Pitná voda 2010*. Č. Budějovice: W&ET Team, 2010, s. 145-150. ISBN 978-80-254-6854-8.
- [5] JÁNIŠOVÁ, M. *Hormonální látky ve vodách* [online]. 1. vyd. Brno: Lipka - školské zařízení pro environmentální vzdělávání, 2013 [cit. 2016-10-27]. Metodický materiál pro učitele. ISBN 978-80-87604-59-5. Dostupné z: <http://www.lipka.cz/soubory/hormony--f3501.pdf>
- [6] Výzkum: ve vodě z kohoutku jsou zbytky léků. *Vitalia.cz - chytře na život* [online]. Praha, c2009-2016 [cit. 2016-10-27]. Dostupné z: <http://www.vitalia.cz/clanky/ve-vode-jsou-zbytky-leku/>
- [7] KOPP, R., K. HILSCEROVÁ a E. POŠTULKOVÁ. *Základy vodní ekotoxikologie* [online]. Vydání: první. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015 [cit. 2017-02-09]. ISBN 978-80-7509-334-9.
- [8] MALÝ, J. a J. MALÁ. *Chemie a technologie vody*. 2., dopl. vyd. Brno: ARDEC, 2006. ISBN 80-860-2050-9.
- [9] 401/2015 Sb. - o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech. *Občan - Portál veřejné správy* [online]. Praha: Ministerstvo vnitra, 2016 [cit. 2016-11-01]. Dostupné z: <https://portal.gov.cz/app/zakony/zakonPar.jsp?idBiblio=85484&nr=401~2F2015&rp=15#local-content>
- [10] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J.: *Příručka provozovatele úpravy pitné vody*. Vyd. 1. Líbeznice: Medim, 2005. ISBN 80-239-4565-3.
- [11] Vodárenská flotace a její použití při úpravě pitné vody v ČR. *TZB-info - stavebnictví, úspory energií, technická zařízení budov* [online]. Praha: Topinfo, c2001-2015 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://voda.tzb-info.cz/vlastnosti-a-zdroje-vody/8900-vodarenska-flotace-a-jeji-pouziti-pri-uprave-pitne-vody-v-cr>

- [12] Tradiční a nové technologie úpravy vody: ASIO, spol. s r.o. *Čistírny odpadních vod (ČOV), úprava vody a čištění vzduchu*, ASIO.cz [online]. Brno: ASIO, c2011-2016 [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://www.asio.cz/cz/173.tradicni-a-nove-technologie-upravy-vody>
- [13] Flotace pro pitné a procesní vody (DAF) - ENVI-PUR. *Čistírny odpadních vod - ENVI-PUR* [online]. Praha: ENVI-PUR, b.r. [cit. 2016-11-07]. Dostupné z: <http://www.envi-pur.cz/cz/flotace-rozpustenym-vzduchem/>
- [14] GRÜNWARD, A. *Vodárenství*. 1. vyd. Praha: Český svaz stavebních inženýrů, 1998. Technická knižnice autorizovaného inženýra a technika. ISBN 80-902-4607-9.
- [15] Písková filtrace (inkos.cz). *Úvodní stránka (inkos.cz)* [online]. Brno: INKOS CZ, a.s., b.r. [cit. 2016-11-30]. Dostupné z: [http://www.inkos.cz/lang/cz/tech\\_piskova\\_filtrace.htm](http://www.inkos.cz/lang/cz/tech_piskova_filtrace.htm)
- [16] NOVOTNÁ, A. *Filtrační materiály pro vodárenskou filtraci*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební, Ústav vodního hospodářství obcí. Vedoucí práce Ing. Tomáš Kučera, Ph.D.
- [17] *Inclusive Wedeco's new AOP solution PROMIX*. Herford, Germany: Xylem Water Solutions Herford GmbH, 2012.
- [18] HÁSOVÁ, E. *Využití ozonu při čištění odpadních vod*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Ján Derco, CSc.
- [19] Technologie ozonizace - Disa. *DISA s.r.o.* [online]. Brno: DISA, c2010-2016 [cit. 2016-11-14]. Dostupné z: <http://www.disa.cz/technologie-ozonizace>
- [20] *Ozone Oxidation in Drinking Water Applications*. Herford, Germany: Xylem Water Solutions Herford GmbH, 2012.
- [21] KUČERA, T. Možná rizika plynoucí z dezinfekce pitné vody - TZB-info. In: *TZB-info - stavebnictví, úspory energií, technická zařízení budov* [online]. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta stavební, Ústav vodního hospodářství obcí, 2012 [cit. 2016-12-13]. Dostupné z: <http://voda.tzb-info.cz/vlastnosti-a-zdroje-vody/8568-mozna-rizika-plynouci-z-dezinfekce-pitne-vody>
- [22] REUNGOAT J., B.I. ESCHER, M. MACOVA, F.X. ARGAUD, W. GERNJAK a J. KELLER. Ozonation and biological activated carbon filtration of wastewater treatment plant effluents. *Water Research* [online]. 2012, 46(3), 863-872 [cit. 2016-11-25]. ISSN 0043-1354. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.064>.
- [23] DOLEJŠ, P. a P. DOBIÁŠ. Koncentrace léčiv podél technologické linky úpravny s ozonizací a filtrací aktivním uhlím: *Sborník konference Pitná voda 2008*. České Budějovice: W&ET Team, 2008, 95-100 s. ISBN 978-80-254-2034-8.
- [24] BOERE, J., J. VAN DEN DIKKENBERG a G. JOON. Granulované aktívne uhlie a jeho biologická aktivita: *Sborník konference Pitná voda 2008*. Č. Budějovice: W&ET Team, 2008, s. 123-128. ISBN 978-80-254-2034-8.

- [25] The Biological Activated Carbon Process for Water Purification. *Water & Wastes Digest, The Solutions Source of the Water & Wastewater Industry* [online]. Water Wastes Digest's, 2000 [cit. 2016-11-29]. Dostupné z: [www.wwdmag.com/desalination/biological-activated-carbon-process-water-purification](http://www.wwdmag.com/desalination/biological-activated-carbon-process-water-purification)
- [26] *Water Solutions*. Herford, Germany: Xylem Water Solutions Herford GmbH, 2012.
- [27] Dezinfekce vody pomocí UV záření - Disa. *DISA s.r.o.* [online]. Brno: DISA, c2010-2016 [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: <http://www.disa.cz/dezinfekce-vody-pomoci-uv-zareni-18>
- [28] WEDECO UV (Ultraviyole) TEKNOLOJISÍ - Anadolu Flygt Xylem - Blog. *Anadolu Flygt Xylem - Blog* [online]. Çayırova/Kocaeli, Turecko: Anadolu Flygt Pompa Paz.ve Tic., b.r. [cit. 2016-11-22]. Dostupné z: <http://www.anadoluflygtxylem.com/2014/10/wedeco-uv-ultraviyole-teknolojisi.html>
- [29] MERGL, V., T. KARÁSEK a L. MAZEL. Využití oxidu chloričitého při dezinfekci pitné vody skupinového vodovodu. In: *Sborník příspěvků z mezinárodní konference VODA ZLÍN 2003*. VaK Zlín, 2003, s. 117-120.
- [30] PAČES, T. *Ženské hormony v povrchových vodách, čističkách a pitné vodě v Praze*. Dostupné také z: <http://www.kontroly-vody.cz/clanky/%C5%BDensk%C3%A9%20hormony%20v%20povrchov%C3%BDch%20vod%C3%A1ch,%20C4%8Disti%C4%8Dk%C3%A1ch%20a%20pitn%C3%A9%20vod%C4%9B%20v%20Praze.pdf>
- [31] SOVOVÁ, L. Chemické látky ve vodě: Ekologický institut Veronica. In: *Ekologický institut Veronica* [online]. Brno, b.r. [cit. 2016-12-13]. Dostupné z: <http://www.veronica.cz/?id=561>
- [32] LANGMEIER, M. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2526-0.
- [33] SILBERNAGL, S. a A. DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vyd., zcela přeprac. a rozš., Vyd. 3. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0630-X.
- [34] Biochemie - vzdělávací portál, Přírodní látky - Hormony. *Biochemie - vzdělávací portál, Úvodní stránka* [online]. Praha, 2013 [cit. 2016-12-15]. Dostupné z: [http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni\\_latky\\_hormony.html#1](http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_hormony.html#1)
- [35] MERKUNOVÁ, A. a M. OREL. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. Vyd. 1. Praha: Grada, 2008. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-1521-6.
- [36] YING, G., R. KOOKANA a Y. RU. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* [online]. 2002, 28(6), 545-551 [cit. 2016-12-15]. DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00075-2. ISSN 01604120. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412002000752>
- [37] The Cholesterol Primer. *Raw Milk Facts...The Raw Milk Information Guide You Can Trust!* [online]. 2012 [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: [http://www.raw-milk-facts.com/cholesterol\\_primer\\_T3.html](http://www.raw-milk-facts.com/cholesterol_primer_T3.html)

- [38] KUJALOVÁ, H., V. SÝKORA a P. PITTER. Látky s estrogenním účinkem ve vodách. *Chemické listy* [online]. 2007, 2007(101), 706712 [cit. 2017-02-03]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_09\\_706-712.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_09_706-712.pdf)
- [39] BRADFORD, A. What is Estrogen?. In: *Live Science: The Most Interesting Articles, Mysteries and Discoveries* [online]. 2017 [cit. 2017-02-03]. Dostupné z: <http://www.livescience.com/38324-what-is-estrogen.html>
- [40] KOČÍ, V. a K. MOCOVIÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.
- [41] Ekotoxikologie / Empla AG spol. s r. o. *Empla AG spol. s r. o.* [online]. Hradec Králové: Acceler, 1991 [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <http://empla.cz/ekotoxikologie>
- [42] Thamnotoxkit. In: *Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny - sinice.cz* [online]. Brno: Šnábl, b.r. [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.sinice.cz/index.php?pg=aktuality--vybaveni-laboratori--ekotoxikologicke-biotesty>
- [43] Thamnotoxkit F – Test procedure slide show. In: *MicroBioTests Inc. - Welcome* [online]. Belgium: MicroBioTests, 2015 [cit. 2017-02-21]. Dostupné z: <http://www.microbiotests.be/toxkits/Thamnotoxkit%20F%20slide%20show.pdf>
- [44] Lemna minor (common duckweed): Go Botany. *Go Botany: New England Wild Flower Society* [online]. Framingham: New England Wild Flower Society, c2011-2017 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <https://gobotany.newenglandwild.org/species/lemna/minor/>
- [45] ČSN EN ISO 20079. *Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek (Lemna minor) – Zkouška inhibice růstu okřešku*. 1. Brusel: HYDROPROJEKT CZ a.s., 2007.
- [46] Bakteriální bioluminiscenční test toxicity (BBTT) – LUMISTox - toxicita cz. *Biotesty, Kontinuální měření toxicity - toxicita cz* [online]. Praha, 1997 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://www.toxicita.cz/biotesty/bakterialni-bioluminiscenci-test-toxicity-lumistox/#bbtt-princip>
- [47] *SAMPLE PREPARATION FUNDAMENTALS FOR CHROMATOGRAPHY* [online]. Canada: Agilent Technologies, Inc., 2013 [cit. 2017-03-02]. 5991-3326EN. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf)
- [48] PLŠKO, E. *Všeobecná analytická chemia*. 1. vyd. Český Těšín: 2 Theta, 2011. ISBN 978-80-86380-61-2.
- [49] SPE kolonky - Labicom. *Hlavní stránka - Labicom* [online]. Olomouc: LABICOM s.r.o., 2017 [cit. 2017-03-02]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spe-solid-phase-extraction/spe-kolonky>
- [50] BORKOVCOVÁ, I. a R. KOSTRHOUNOVÁ. *Extrakční metody pro stanovení hydrofilních látek* [online]. Brno, 2014, , 5 [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a->

navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivity/ls-2013-2014/h3cp2/index/h3cp2-studijni-material---stanoveni-hydrofilnich-latek-ls-13-14.pdf

- [51] How to select a technique - How to select a technique - Chromedia. *Home - Chromedia* [online]. Amsterdam: CHROMEDIA, b.r. [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=yoovpDsHonOvmOIIecCI&subNav=yarwnEsHonOvmOIIecCIBB>
- [52] PRAUS, P. a J. VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. 1. vydání. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [53] JANDERA, P. Pokroky v technice vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro analýzu organických látek. In: *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 2. Český Těšín: 2 Theta, 2005, s. 209-236. ISBN 80-86380-29-7.
- [54] ČÁSLAVSKÝ, J. a J. ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy": modul K02-2014*. 1. vyd. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analytical standards and equipment. ISBN 978-80-260-7085-6.
- [55] HOLČAPEK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* [online]. 1998, (92), 278-286 [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf)
- [56] ČÁSLAVSKÝ, J. Pokroky v chromatografii a jejich využití při analýze vod. In: *Sborník konference Pitná voda 2010: 10. pokračování konferencí Pitná voda z údolních nádrží: 17.5 - 20.5.2010 v Táboře*. České Budějovice: W and ET Team, 2010, s. 205-210.
- [57] FRIEDECKÝ, B. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2012, (3), 152–157. ISSN 1210-7921.
- [58] Electron Ionization. *Widener University, College of Arts and Sciences* [online]. Chester, c2012-2017 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: [http://science.widener.edu/svb/massspec/intro\\_to\\_ms/ei.html](http://science.widener.edu/svb/massspec/intro_to_ms/ei.html)
- [59] VÁVROVÁ, J. Ionizace elektrosprejem (ESI). In: *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi 2012* [online]. 2015 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/C/JVAXG.htm>
- [60] Introduction to LC-MS: SHIMADZU (Shimadzu Corporation). In: *SHIMADZU CORPORATION* [online]. Kyoto, 2017 [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/47/47intro.html>
- [61] HOLČAPEK, M. Hmotnostní analyzátoři: *Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice*. Pardubice, 2017. Dostupné také z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_MS\\_analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf)
- [62] LEE, M., ed. *Mass spectrometry handbook*. Hoboken: Wiley, 2012. Wiley series on pharmaceutical science and biotechnology: practices, applications and methods. ISBN 978-047-0536-735.

- [63] ČÁSLAVSKÝ, J. Úvod do hmotnostní spektrometrie. In: *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 2. Český Těšín: 2Theta, 2005, s. 273-281. ISBN 80-86380-29- 7.
- [64] *Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi Vibrio fischeri (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi*. Praha: HYDROPROJEKT CZ, a.s., 2009.
- [65] TORRES, N., M. AGUIAR, L. FERREIRA, J. AMÉRICO, Â. MACHADO, E. CAVALCANTI a V. TORNISIELO. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. 2015, 187(6), - [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1007/s10661-015-4626-z. ISSN 0167-6369. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10661-015-4626-z>
- [66] DIAZ-BAEZ, M.C., W.A. SÁNCHEZ, B.J. DUTKA et al. Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program: Part 2, ecotoxicological evaluation of drinking water supplies. *Environmental Toxicology* [online]. 2002, 17(3), 241-249 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1002/tox.10052. ISSN 15204081. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.10052>
- [67] *ChemSpider: Search and share chemistry* [online]. Londýn: Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/>
- [68] REMEROVÁ, M. *Využití pasivního vzorkování při analýze hormonů v pitných vodách*. Brno, 2013, 83 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
- [69] HUERTA-FONTELA, M., M. GALCERAN a F. VENTURA. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* [online]. 2011, 45(3), 1432-1442 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.watres.2010.10.036. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135410007451>
- [70] AZZOUZ, A. a E. BALLESTEROS. Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a drinking water treatment plant. *Chemosphere* [online]. 2013, 93(9), 2046-2054 [cit. 2017-05-03]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.037. ISSN 00456535. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653513010217>

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3D-IT	Three-Dimensional Ion Trap; Sférická iontová past
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization; Chemická ionizace za atmosférického tlaku
BAC	Biological Activated Carbon; biologické aktivní uhlí
CAS	Chemical Abstract Service; registrační číslo chemické látky
ČOV	čistírny odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
DBP	Disinfection by products; vedlejší produkty dezinfekce
DOC	Dissolved Organic Carbon; rozpuštěný organický uhlík
EC <sub>x</sub>	Effect Concentration; efektivní koncentrace pro X% účinek, při které se projeví X% účinek v porovnání s kontrolou
ED <sub>x</sub>	Effect Dose; efektivní dávka pro X% účinek, při které se projeví X% účinek v porovnání s kontrolou
EIA	Environmental Impact Assessment; Vyhodnocení vlivů na životní prostředí
ESI	Electrospray Ionization; Elektrosprej (iontový zdroj)
GAC	Granular Activated Carbon; granulované aktivní uhlí
GAU	granulované aktivní uhlí
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
HAA	halogenoctové kyseliny
HAN	halogenacetonitrily
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC <sub>x</sub>	Inhibitory Concentration; inhibiční koncentrace pro X% účinek, při které se projeví X% inhibiční účinek v porovnání s kontrolou
ID <sub>x</sub>	Inhibitory Dose; inhibiční dávka pro X% účinek, při které se projeví X% inhibiční účinek v porovnání s kontrolou
LC <sub>x</sub>	Lethal Concentration; koncentrace pro X % jedinců, při které uhynie X % testovacích jedinců
LD <sub>x</sub>	Lethal Dose; letální dávka pro X % jedinců, při které uhynie X % testovacích jedinců
LOEC	Lowest observed effect concentration; nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky na testovací organismus
LC/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
MX	3-chloro-4-dichloromethyl-5-hydroxy-2(5H)-furanon
MZ	Ministerstvo zdravotnictví
NOEC	No observed effect concentration; nejvyšší koncentrace testovaného vzorku, při které nejsou pozorovány účinky na testovací organismus
NPK	nejvyšší přípustná koncentrace



PEC	predicted environmental concentration; předpovídaná environmentální koncentrace toxikantu, která byla na základě matematických modelů pohybu látky odhadnuta pro hodnocení složky prostředí
PNEC	predicted no effect concentration; předpovídaná koncentrace, při které nedojde k negativním účinkům
PPCP	pharmaceuticals and personal care products; produkty osobní péče
PTFE	Polytetrafluoroethylen
QqQ	Triple Quadrupole; Trojitý kvadrupólový analyzátor
REACH	Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals; Evropské nařízení o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek
SIM	Single Ion Monitoring/Selected Ion Monitoring; sledování vybraných iontů
SPE	Solid Phase Extraction; extrakce tuhou fází
THM	trihalomethany
TOF	Time of Flight; Průletový analyzátor/analyzátor doby letu

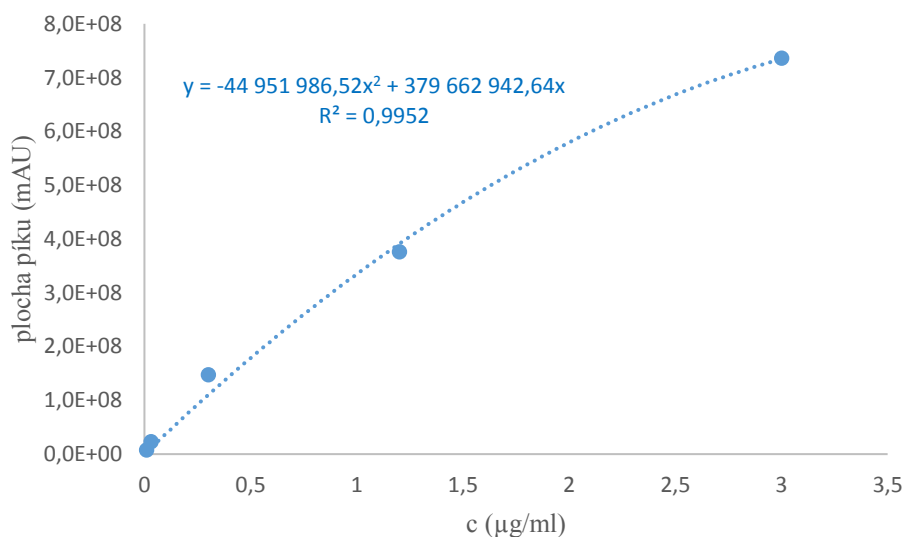
## 7 PŘÍLOHY

**Příloha č. 1:** Převodní tabulka procentuálních hodnot mortality na probitové hodnoty

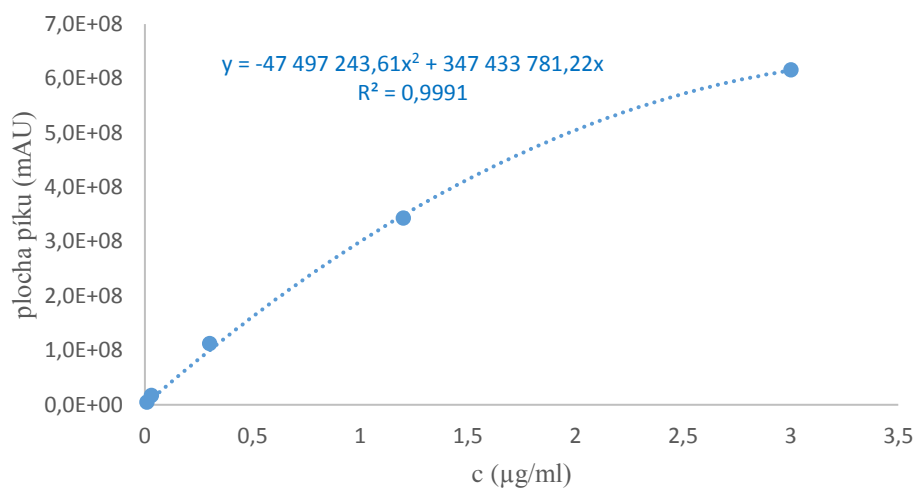
%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10	3,718	30	4,476	50	5,000	70	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11	3,773	31	4,504	51	5,025	71	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12	3,825	32	4,532	52	5,05	72	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13	3,874	33	4,560	53	5,075	73	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14	3,92	34	4,588	54	5,100	74	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15	3,964	35	4,615	55	5,126	75	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16	4,006	36	4,642	56	5,151	76	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17	4,046	37	4,668	57	5,176	77	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18	4,085	38	4,695	58	5,202	78	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19	4,122	39	4,722	59	5,228	79	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20	4,158	40	4,747	60	5,253	80	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21	4,194	41	4,772	61	5,278	81	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22	4,228	42	4,798	62	5,305	82	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23	4,261	43	4,824	63	5,332	83	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24	4,294	44	4,849	64	5,358	84	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25	4,326	45	4,874	65	5,385	85	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26	4,357	46	4,900	66	5,412	86	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27	4,387	47	4,925	67	5,440	87	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28	4,417	48	4,950	68	5,468	88	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29	4,447	49	4,975	69	5,496	89	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

Obrázek 23: Převod procentuálních hodnot mortality na probitové hodnoty [7]

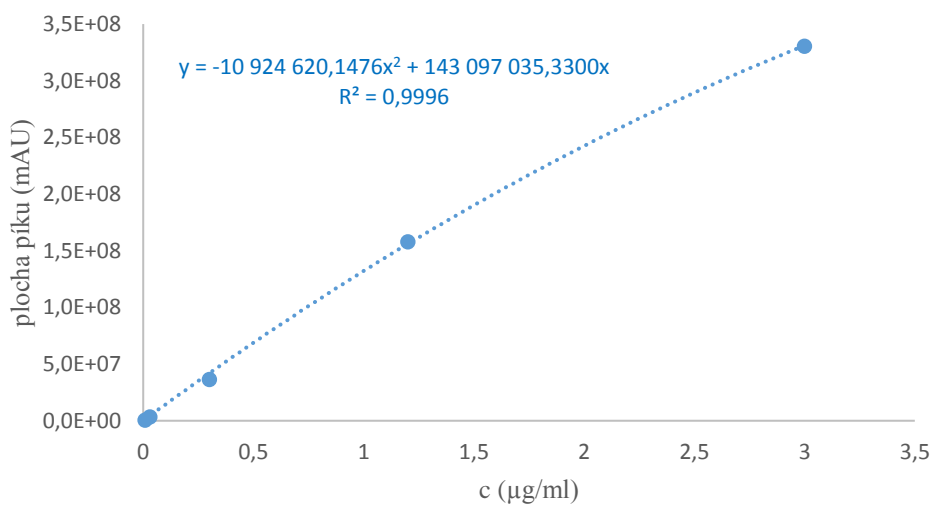
**Příloha č. 2:** Kalibrační závislosti sledovaných analytů



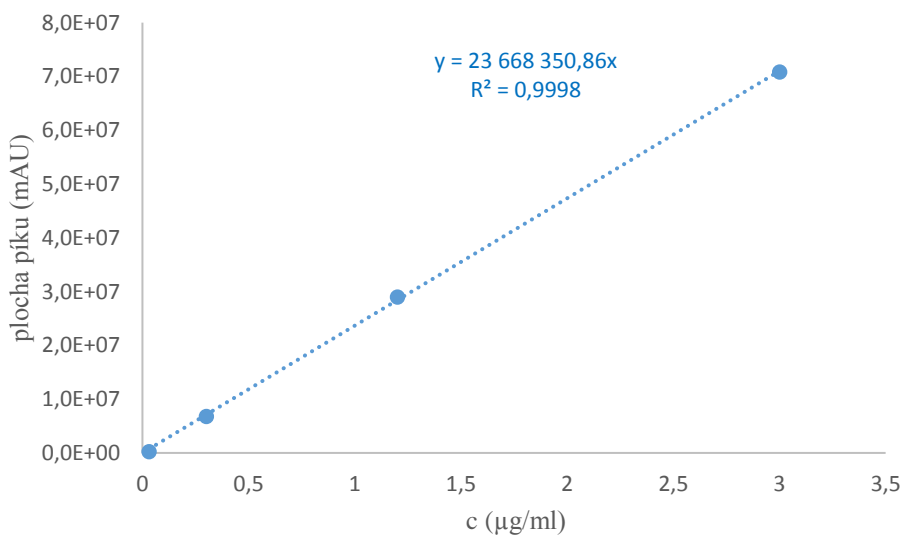
Graf 14: Kalibrační křivka - norethindron



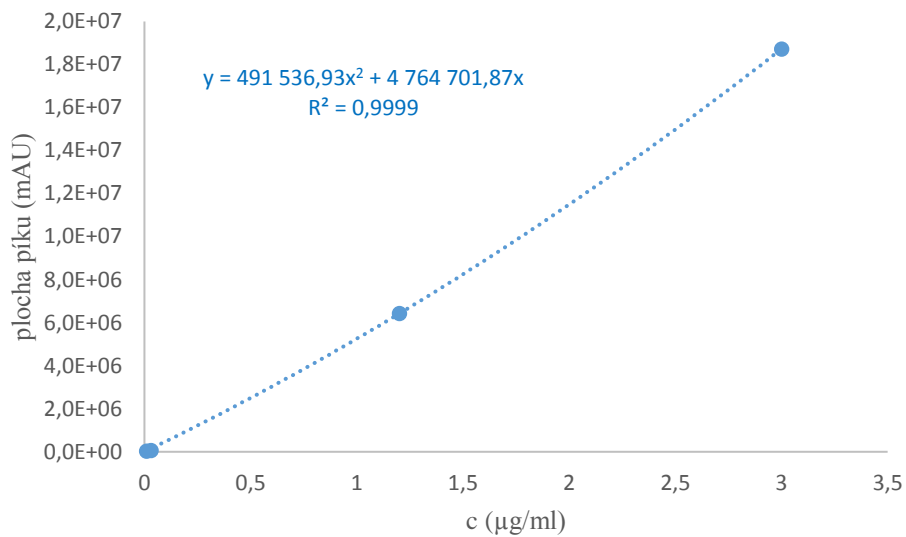
Graf 15: Kalibrační křivka - progesteron



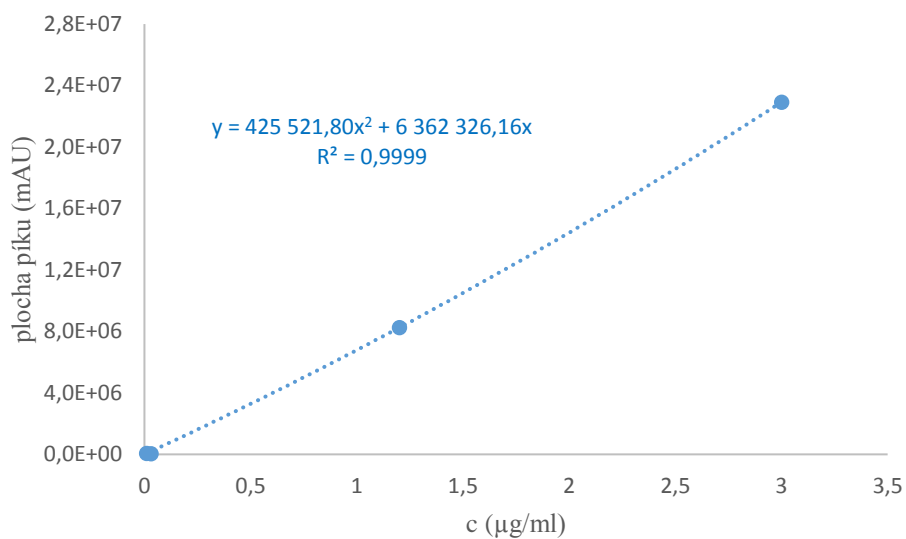
Graf 16: Kalibrační křivka - diethylstilbestrol



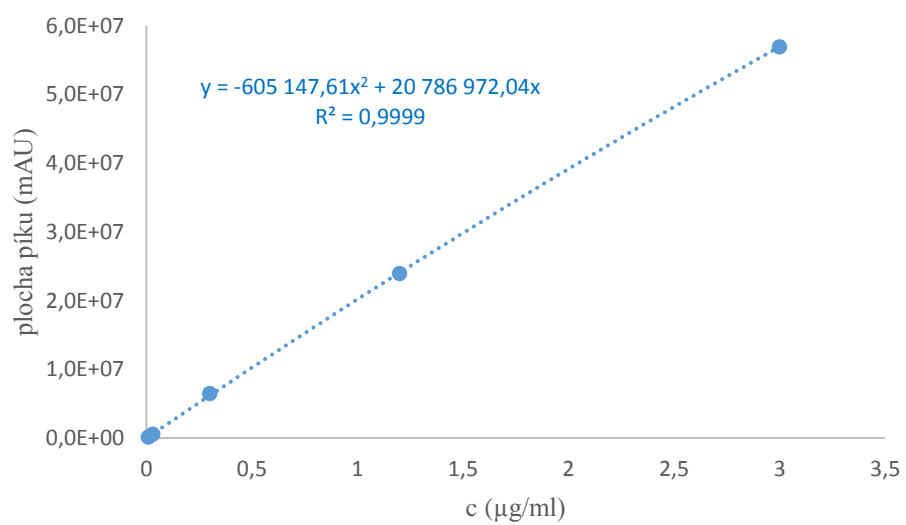
Graf 17: Kalibrační křivka - estron



Graf 18: Kalibrační křivka - 17β-estradiol

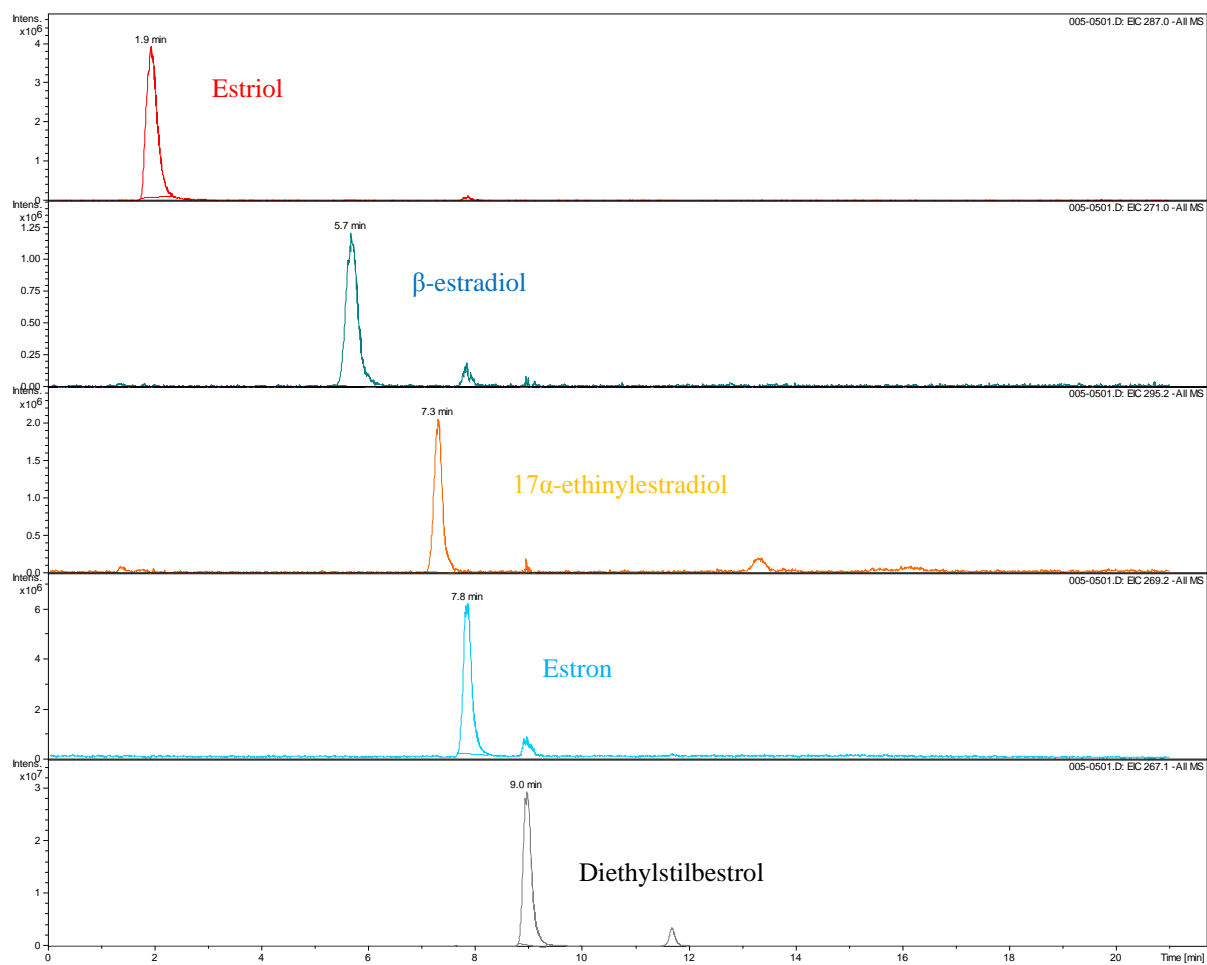


Graf 19: Kalibrační křivka - 17α-ethinylestradiol

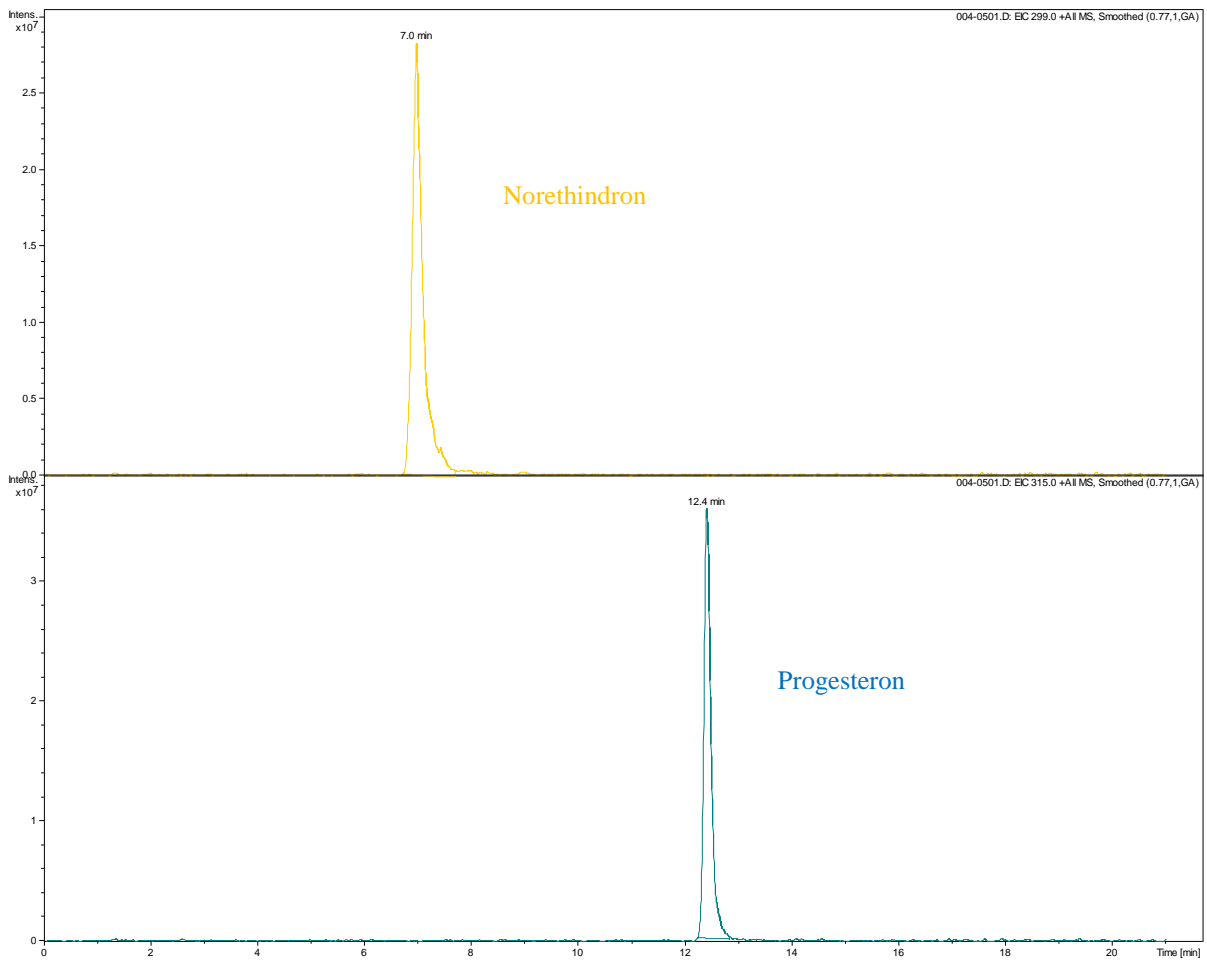


Graf 20: Kalibrační křivka - estriol

### Příloha č. 3: Chromatogramy kalibračních směsí



Obrázek 24: Chromatogram kalibrační směsi v negativním módu



Obrázek 25: Chromatogram kalibrační směsi v pozitivním módu