



Indikace znečištění životního prostředí přístrojem na principu biosenzoru

s finanční podporou



Indikace znečištění životního prostředí přístrojem na principu biosenzoru

M E T O D I K A

uplatnění výsledků výzkumu

2015

Výstup řešení projektu: Integrovaný systém sledování kontaminace životního prostředí dopravou

Identifikační kód CEZ: TA02030179

Zpracovatel: Centrum dopravního výzkumu, v. v. i. (CDV)
BVT Technologies a.s. (BVT)

Odpovědný řešitel: Mgr. Roman Ličbinský (roman.licbinsky@cdv.cz)

Spoluřešitelé: Mgr. Martina Bucková, RNDr. Jiří Huzlík (CDV)
RNDr. Jan Krejčí Ph.D., Blanka Šebestová, Ing. Robert Plička,
Bc. Iva Ventrubová, Ing. Jana Pospíchalová (BVT)

Metodika schválena: č. j. 3/2016-710-VV/1

ISBN 978-80-88074-29-8

Recenzenti: doc. Ing. Vladimír Kočí, Ph.D. – Děkan Fakulty technologie ochrany prostředí
VŠCHT Praha
Ing. Vítězslav Březina, CSc. – odborný pracovník Laboratoře buněčných kultur
Masarykovi univerzity
Ing. Karel Bláha, CSc. – ředitel odboru environmentálních rizik a ekologických
škod Ministerstvo životního prostředí

Vydání: první, 2015

Počet stran: 80

Jazyková korektura: nebyla provedena.

Vytištěno vlastním nákladem.

© Centrum dopravního výzkumu, v.v.i., Líšeňská 33a, 636 00 Brno

© BVT Technologies a.s., Hudcova 533/78c, 621 00 Brno

ISBN 978-80-88074-29-8

Anotace

Certifikovaná metodika

Autoři:

Mgr. Martina Bucková, RNDr. Jiří Huzlík, RNDr. Jan Krejčí Ph.D., Mgr. Roman Ličbinský, Ing. Robert Plička, Ing. Jana Pospíchalová, Blanka Šebestová, Bc. Iva Ventrubová

Název:

Indikace znečištění životního prostředí přístrojem na principu biosenzoru

Abstrakt:

Znečišťování životního prostředí dosahuje v současné době takové úrovně, že systematická selektivní kontrola znečišťujících látek je téměř nemožná. Na druhé straně je nutné v souladu s udržitelným rozvojem zajistit dostatečně kvalitní životní prostředí pro budoucí generace. To je spojeno s pravidelnou kontrolou environmentálních složek, která je v současné době realizována klasickými analytickými metodami a testy toxicity. Posouzení, zda životní prostředí na určitém místě, může představovat riziko pro živé organismy, klasickými metodami je časově a finančně náročné. Nezbytnost rychlé a levné kontroly vede k vývoji biologických testů, které jsou schopné detekovat i neznámé látky, jejichž společným rysem je měření toxického působení na organismy. Řešením může být aplikace biosenzorů, které mohou výrazně zjednodušit měření. Hlavní výhoda spočívá v předvýběru vzorků, které budou poslány na drahé a časově náročné certifikované analýzy. To významně redukuje náklady a čas nutný pro získání informací stejné kvality jako klasická měření.

Proto byl v rámci řešení projektu TA02030179 „Integrovaný systém sledování kontaminace životního prostředí dopravou“ vyvinut přístroj na principu biosenzoru AlgaTox indikujícího zátěž životního prostředí škodlivinami, který může podstatně zjednodušit postup hodnocení vlivu na živé organismy. Jeho výhodou je rychlá odezva na měřené veličiny (několik hodin) při zachování stejné vypovídající schopnosti jako klasické laboratorní postupy. Běžně používaný test hodnotící inhibici růstu sladkovodních zelených řas definovaný normou ČSN EN ISO 8692 totiž trvá 72 hodin (v metodice popisovaný postup v řádu několika hodin) a neexistuje k němu žádné specializované přístrojové vybavení.

Metodika je koncipována jako detailní popis aplikace přístroje AlgaTox vyvinutého v rámci výše zmíněného projektu a obsahuje úvod do problematiky hodnocení znečištění životního prostředí s využitím přístrojů na základě biosenzoru vč. srovnání novosti postupu s dosud publikovanými informacemi, popis přístroje, princip měření, postup měření a podstatná část je věnována vyhodnocení výsledků.

Klíčová slova:

toxická, biosenzor, zelená řasa, životní prostředí, znečištění

Certifikační orgán:

ČR, Ministerstvo dopravy, Odbor kosmických aktivit a ITS – osvědčení o uznání uplatněné certifikované metodiky č. j. 3/2016-710-VV/1.

Annotation

Certified Method

Authors:

Mgr. Martina Bucková, RNDr. Jiří Huzlík, RNDr. Jan Krejčí Ph.D., Mgr. Roman Ličbinský, Ing. Robert Plička, Ing. Jana Pospíchalová, Blanka Šebestová, Bc. Iva Ventrubová,

Title:

Environmental pollution indication by using biosensor based device

Abstract:

Environmental pollution currently reaches up such level that systematic selective control of polluting compounds is almost not possible. On the contrary, it is necessary to ensure sufficient quality of the environment for future generations in accordance with sustainable development. This is associated with regular control of environmental components currently implemented by using classical analytical methods and toxicity tests. Assessment of possible risks of the environment on some locality for living organisms is so time consuming and costly. Necessity of cheap and quick control in these conditions leads to the development of biological tests that are able to detect compounds with toxic effects on organisms including unknown compounds that are toxic for organisms. Biosensors applications can significantly simplify this assessment. The main advantage is the preselection of samples that will be passed on the time consuming and expensive certified analyses. This significantly reduces costs and time necessary to achieve information with the same quality as classical tests.

Therefore, the device based on the biosensor principle AlgaTox for indication of environmental pollution was developed under support of project no. TA02030179 “Integrated system for traffic related pollution monitoring”. AlgaTox can significantly simplify assessment of risks for living organisms. Its main advantage is quick response to measured quantity (several hours) while maintaining the same explanatory power as conventional laboratory procedures. Commonly used test assesses fresh water algal growth inhibition is defined in EN ISO 8692 indeed lasts 72 hours (procedure described in this methodology takes several hours) and no specific device is available for this test.

Method is conceived as the detailed description of AlgaTox application developed within the mentioned project. It contains the introduction to the issue of environmental pollution assessment using biosensor based devices including comparison of innovativeness of the procedure compared with previously published information, device description, principle of measurement, measurement procedure description and significant part is dedicated to results evaluation.

Keywords:

toxicity, biosensor, green algae, environment, pollution

Certification Authority:

The Czech Republic, Ministry of Transport, Space Technologies and Satellite Systems Department – certificate document: reference number 3/2016-710-VV/1.

Předmluva

Znečišťování životního prostředí dosahuje v současné době takové úrovně, že systematická selektivní kontrola znečišťujících látek je téměř nemožná. Na druhé straně je nutné v souladu s udržitelným rozvojem zajistit dostatečně kvalitní životní prostředí pro budoucí generace. To je spojeno s pravidelnou kontrolou environmentálních složek, která je v současné době realizována klasickými analytickými metodami a testy toxicity v laboratorních podmínkách. Posouzení, zda životní prostředí na určitém místě, může představovat riziko pro živé organismy, klasickými metodami je časově a finančně náročné.

Nezbytnost rychlé a levné kontroly vede k vývoji biologických testů, které jsou schopné detekovat i neznámé látky a jejichž společným rysem je měření toxického působení na organismy. Řešením může být aplikace biosenzorů, které mohou výrazně zjednodušit měření. Hlavní výhoda spočívá v předvýběru vzorků, které budou poslány na drahé a časově náročné certifikované analýzy. To významně redukuje náklady a čas nutný pro získání informací stejné kvality jako klasická měření. Právě za tímto účelem vznikla tato metodika umožňující rychlé a levné stanovení toxicity na základě interakce vzorku s řasami. Metodika byla zpracována v rámci řešení projektu TA02030179 podporovaného Technologickou agenturou České republiky.

Obsah

1	Cíl metodiky	10
2	Úvod	11
3	Metodická část	12
3.1	Biosenzor a jeho funkce	12
3.2	Princip měření a popis přístroje	12
3.2.1	Princip měření přístroje	13
3.2.2	Přehled základních pojmů	13
3.2.3	Popis přístroje	17
3.2.3.1	Mechanická konstrukce	17
3.2.3.2	Elektrická konstrukce	19
3.2.3.3	Napájení	19
3.2.3.4	Zdroj světla pro měření.	19
3.2.3.5	Technické parametry	20
3.2.3.6	Popis příslušenství	20
3.2.4	Dvoukompartimentový model funkce přístroje	25
3.2.5	Odvození Henryho zákona a principu vyhodnocení signálu analytického AlgaTox	30
3.3	Postup měření – základní návod	35
3.4	Postup měření - pokročilý uživatel	44
3.5	Vyhodnocení výsledků	58
3.5.1	Obecné vlastnosti	58
3.5.2	Postup vyhodnocení	59
3.5.2.1	Vložení dat	59
3.5.2.2	Kontrola naměřených údajů	60
3.5.2.3	List Výchozí data	60
3.5.2.1	List Graf - data	61
3.5.2.2	List Parametry vyhodnocení	61
3.5.2.3	List Synchronizace	62
3.5.2.4	List Kalibrace	65
3.5.2.5	List Vyhodnocení	67
3.5.2.6	List Produkce O ₂ celková a list Produkce O ₂ na buňku	68
3.5.2.7	List Shrnutí výsledku	69
4	Srovnání novosti postupů	72
5	Popis uplatnění certifikované metodiky	75

6	Ekonomické aspekty	76
7	Použitá literatura.....	77

1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je zjednodušení a zrychlení procesu hodnocení kvality životního prostředí, včetně ekonomického zefektivnění celého procesu. Aplikace přístroje pro měření toxicity pomocí řas (Algae Toxicity meter – AlgaTox) ve smyslu této předkládané metodiky umožní rychlejší indikaci zátěže životního prostředí v podobě předvýběru potenciálně nebezpečných vzorků, kterým je nutné následně věnovat zvýšenou pozornost v podobě realizace standardních ekotoxikologických testů a chemických analýz. Nespornou výhodou biosenzoru je hodnocení celkového vlivu sledovaného vzorku na živý organismus. Aplikace přístroje a této metodiky není vázána pouze na sledování vlivů dopravy na životní prostředí, ale v podstatě lze hodnotit vzorky potenciálně ovlivněné různými zdroji znečištění, jejichž společným rysem je toxické působení na živý organismus.

2 Úvod

Doprava ovlivňuje většinu ekosystémů a složek životního prostředí. Hodnocení zátěže životního prostředí vlivem dopravy vyžaduje komplexní klasickou chemickou analýzu, která je časově velmi náročná, nákladná a z tohoto pohledu neefektivní. V ČR je v současnosti využíváno přibližně 56 tisíc kilometrů silnic a dálnic a je plánováno další rozšíření v následujících letech (ŘSD, 2013), což s sebou jednoznačně přinese další zátěž různých složek životního prostředí zejména v okolí těchto komunikací. V souladu s udržitelným rozvojem je však nutné zabezpečit dostatečnou kvalitu životního prostředí i pro budoucí generace. Komplexní hodnocení znečištění životního prostředí a vlivu tohoto znečištění na živé organismy je realizováno zejména akreditovanými, autorizovanými nebo jiným způsobem certifikovanými metodami. Jak chemické analýzy, tak testy ekotoxicity prováděné v laboratořích jsou, v případě zabezpečení pravidelného sledování, velmi náročné a to také v důsledku nutnosti vlastnit speciální přístrojové vybavení a s tím spojenou kvalitní odbornou obsluhu. Výše uvedené je tak příčinou velké časové i finanční náročnosti pro zhodnocení, zda určité prostředí na příslušné lokalitě může představovat riziko pro živé organismy či nikoliv.

Metody a zařízení, které by mohly nahradit výše zmíněné postupy při zachování přijatelných vypovídajících schopností, však dosud nebyly vyvinuty. Z odborné literatury je známo využívání různých typů senzorů pro stanovení kontaminace životního prostředí různými typy látek. Většinou jsou to zařízení vyvinutá v rámci různých výzkumných aktivit, komerčně nevyužívaná a většinou specializovaná na specifické typy látek. Biosenzory využívající k indikaci znečištění životního prostředí měření veličin spojených s životní aktivitou organismů jsou používány výhradně při experimentech v laboratořích. Popsány byly např. optický biosenzor pro měření herbicidů ve vodách, vč. odpadních, řasový biosenzor pro hodnocení toxicity vlivem znečištění přírodních vod, biosenzory ke stanovení přítomnosti par metanu v plynné fázi, perchlorethylenu (tetrachlorethylenu) ve formě aerosolů a další.

Přítom právě aplikace biosenzorů může velmi zjednodušit a významně snížit náklady potřebné na proces hodnocení kvality životního prostředí resp. jeho znečištění při získání stejně kvalitních informací. Výhoda biologických testů spočívá v tom, že umožňují celkovou detekci působení chemických látek na životní prostředí a dokonce jsou schopny měřit i ty škodlivé látky, jejichž klasická analýza není metodicky zvládnuta, ale jejichž společným rysem je toxické působení na citlivý organismus.

Proto byl v rámci řešení projektu TA02030179 „Integrovaný systém sledování kontaminace životního prostředí dopravou“ vyvinut přístroj na principu biosenzoru indikujícího zátěž životního prostředí škodlivinami, který může podstatně zjednodušit postup hodnocení vlivu na živé organismy. Jeho výhodou je rychlá odezva na měřené veličiny při zachování stejné vypovídající schopnosti jako klasické laboratorní postupy. Běžně používaný test hodnotící inhibici růstu sladkovodních zelených řas definovaný normou ČSN EN ISO 8692 (ČSN EN ISO 8692, 2012) totiž trvá 72 hodin.

3 Metodická část

Metodika byla pojata jako dokument seznamující uživatele se správnou aplikací a manipulací s přístrojem AlgaTox, včetně popisu základních principů jeho funkce.

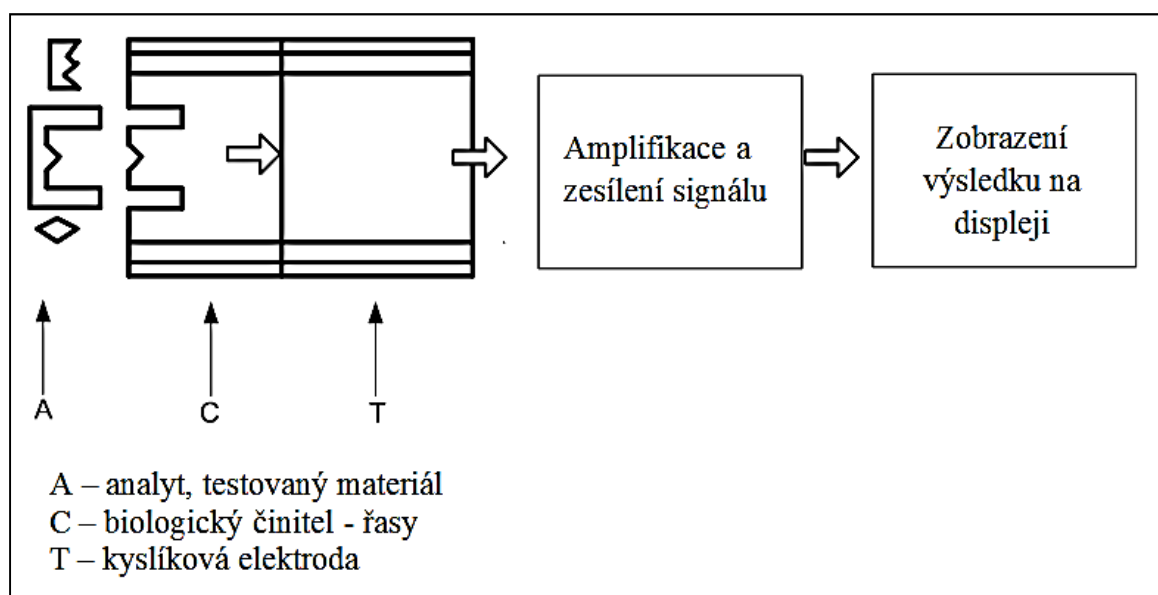
3.1 Biosenzor a jeho funkce

V mnoha oblastech jako jsou medicína, ekologie a průmysl, je nutné získat chemické informace, dále je zpracovávat a případně v souladu s nimi řídit i další procesy. Chemická informace zde neznamená jen znalost koncentrace určité látky ve vzorku, ale i celkovou toxicitu měřeného vzorku, aktivitu biochemických látek ve vzorku nebo vitalitu bakterií.

Intuitivně se nabízí myšlenka využít přírodní, dlouhou evolucí optimalizované systémy vyhodnocení chemické informace a spojit je s převodníkem, který je zobrazí na obrazovce počítače.

Biosenzor je obvykle definován jako analytický nástroj, který používá biochemicky citlivý materiál pro získávání chemické informace, aniž by bylo nutné úplné zpracování vzorku, ve spojení s vhodným převodníkem, který převádí výstupní signál z biosenzoru na vhodný výstup kvantitativně měřitelného signálu. Proud nebo napětí, jsou nejčastějšími výstupní signály.

Obecné schéma biosenzoru je na obr. 3.1.



Obr. 3.1: Obecné schéma biosenzoru – modifikace s řasami

3.2 Princip měření a popis přístroje

AlgaTox využívá k indikaci znečištění životního prostředí měření poklesu produkce kyslíku sladkovodními řasami. Výhoda testu spočívá v tom, že umožňuje detekci působení chemických látek na životní prostředí, včetně těch, jejichž klasická analýza není metodicky zvládnuta, ale jejichž společným rysem je toxické působení na citlivý organismus. Test stanovuje skutečnou aktivitu toxických látek, které mohou působit na řasy.

3.2.1 Princip měření přístroje

Detekční prvek biosenzoru tvoří zelené sladkovodní řasy. Jsou velmi citlivé na znečištění životního prostředí, mají vhodnou velikost a velmi dobře známý životní cyklus. Jsou používány rovněž ve standardním testu popsaném normou ČSN EN ISO 8692 (ČSN EN ISO 8692, 2012). Norma umožňuje používání několika typů řas. Metodika je zpracována pro řasu *Scenedesmus quadricauda*. Biosenzor nepracuje s imobilizovanými řasami (imobilizace mění jejich vlastnosti a není dlouhodobě stabilní). Bioaktivním prvkem je suspenze řas v malém bioreaktoru (2 – 5 ml). Řasy jsou osvětlovány světlem o vlnové délce 680 nm (maximum absorpce záření chlorofylem). Periodicky je střídáno osvětlení a tma. Produkce kyslíku je signál biorekogniční složky biosenzoru a je detekován kyslíkovou elektrodou, sloužící jako převodník. Pokles produkce kyslíku je indikátorem (chemickou informací) přítomnosti toxických látek. Kyslíková elektroda je optimalizována tak, že její dlouhodobá stabilita (24 hod) při konstantním atmosferickém tlaku a konstantní teplotě, je lepší než 0,1 % rovnovážné koncentrace kyslíku. Rozlišovací schopnost měření kyslíku je lepší než 0,05 % rovnovážné koncentrace kyslíku. Tyto parametry zařízení umožňují přesně stanovit velmi malé změny životního cyklu řas. Tím je dána citlivost stanovení toxicity.

3.2.2 Přehled základních pojmů

Roztok – homogenní soustava, která se skládá z alespoň dvou chemicky čistých látek.

Rozpouštědlo – jedna ze složek roztoku, zpravidla ta, která je zastoupena v největším množství.

Látkové množství (n) – množství elementárních jednotek, které je stejné jako množství elementárních jednotek v určité hmotnosti referenční látky.

Mol – látkové množství obsahující $6,022045 \pm 0,000031 \cdot 10^{23}$ elementárních jednotek.

Pozn. Elementární jednotkou může být atom, molekula, ion, foton, chemická vazba. (MOORE, 1979)

Molární koncentrace i- té složky (molarita) roztoku (c_i) – podíl látkového množství i-té složky n_i a objemu roztoku V .

$$c_i = \frac{n_i}{V}$$

Molální koncentrace i-té složky (molalita) roztoku (m_i) – podíl látkového množství i-té složky n_i a hmotnosti m_r rozpouštědla.

$$m_i = \frac{n_i}{m_r}$$

Pozn. Molarita závisí na teplotě naopak molalita na teplotě závislá není.

Molární zlomek i-té složky (x_i) – podíl látkového množství i-té složky n_i a látkového množství všech složek.

$$x_i = \frac{n_i}{\sum_{j=1}^N n_j}$$

Objemová koncentrace i-té složky (c_i) – podíl hmotnosti rozpuštěné i-té složky m_i a objemu roztoku V .

$$c_i = \frac{m_i}{V}$$

Hmotnostní koncentrace i-té složky (w_i) – podíl hmotnosti rozpuštěné i-té složky m_i a hmotnosti roztoku.

$$w_i = \frac{m_i}{\sum_{j=1}^N m_j}$$

Parciální tlak i-té složky (p_i) – podíl na celkovém tlaku směsi plynů (p), který vyvozuje jeho i-tá složka.

Pozn.

1. $p_i = x_i \cdot p$
2. Jestliže $\sum p_i = p$ potom je směs plynů ideální (Daltonův zákon aditivity parciálních tlaků)

Henryho zákon – parciální tlak p_i i-té složky směsi plynu nad kapalinou je úměrný jejímu molárnímu zlomku x_i v kapalině.

$$p_i = k_H x_i$$

Pozn.

Henryho zákon se uvádí i ve tvarech:

$$x_i = k_{\text{H}}^{\text{I}} p_i$$

$$c_i = k_{\text{H}}^{\text{II}} p_i$$

$$m_i = k_{\text{H}}^{\text{III}} p_i$$

Tab. 3.1: Při teplotě 20°C a tlaku 1,01325 · 10⁵ Pa jsou hodnoty $k_{\text{H}}^{\text{III}}$

	$k_{\text{H}}^{\text{III}}$ [mol · l ⁻¹ · Pa ⁻¹]
N ₂	5,377 · 10 ⁻⁹
O ₂	1,073 · 10 ⁻⁸
CO ₂	3,162 · 10 ⁻⁷

Ostwaldův součinitel rozpustnosti i-té složky (rozpustnost) (α_i) – podíl parciálního objemu V_i plynu rozpuštěného v objemové jednotce kapaliny V_0 při dané teplotě.

$$\alpha_i = \frac{V_i}{V_0}$$

Pozn.

1. Pro ideální plyny Ostwaldův součinitel rozpustnosti nezávisí na tlaku.
2. Pojmová nejednoznačnost. Rozpustnost udává také největší možnou koncentraci, kterou může daná látka ve zvoleném rozpouštědle dosáhnout za stanovených fyzikálních podmínek. Jednotkou je libovolná veličina charakteru koncentrace. Vztah

s Ostwaldovým součinitelem rozpustnosti lze určit pro ideální plyny a roztoky pomocí stavové rovnice.

3. V některých literárních pramenech je Ostwaldův součinitel označen jako Bunsenův koeficient. Bunsenův koeficient je definován jako objem plynu rozpuštěného v jednotkovém objemu vody při teplotě a tlaku trojného bodu. ($p=1,01325 \cdot 10^5$ Pa, $T=273,15$ K)

Rozpustnost O₂ ve vodě

Tab. 3.2: Rozpustnost O₂ za normálního tlaku ($1,01325 \cdot 10^5$ Pa)

Rozpustnost O ₂ za normálního tlaku ($1,01325 \cdot 10^5$ Pa)											
T	c		T	c		T	c		T	c	
[°C]	[mg/l]	[μM]	[°C]	[mg/l]	[μM]	[°C]	[mg/l]	[μM]	[°C]	[mg/l]	[μM]
0	14,6	456,3	11	11,0	343,8	21	8,9	278,1	31	7,4	231,3
1	14,2	443,8	12	10,8	337,5	22	8,7	271,9	32	7,3	228,1
2	13,8	431,3	13	10,5	328,1	23	8,6	268,8	33	7,2	225,0
3	13,4	418,8	14	10,3	321,9	24	8,4	262,5	34	7,0	218,8
4	13,1	409,4	15	10,1	315,6	25	8,2	256,3	35	6,9	215,6
5	12,7	396,9	16	9,8	306,3	26	8,1	253,1	36	6,8	212,5
6	12,4	387,5	17	9,6	300,0	27	7,9	246,9	37	6,7	209,4
7	12,1	378,1	18	9,4	293,8	28	7,8	243,8	38	6,6	206,3
8	11,8	368,8	19	9,3	290,6	29	7,7	240,6	39	6,5	203,1
9	11,5	359,4	20	9,1	284,4	30	7,5	234,4	40	6,4	200,0
10	11,3	353,1									

Pozn.

1. Ustalování při změně teploty nebo tlaku je pomalý proces. Plné rovnováhy s okolní atmosférou za daného tlaku a teploty je dosaženo za 1-12 hodin.
2. Kalibrace kyslíkové elektrody nebo měření může být zkresleno přesycením roztoku kyslíkem nebo roztokem v nerovnovážném stavu.
3. V podrobnějších tabulkách jsou uvedeny postupy oprav na salinitu roztoků.
4. Pokud je použita metoda vnitřního standardu, výše uvedené poznámky neovlivňují významně měření.

Rozpustnost O₂, CO₂ a N₂ ve vodě při $1,01325 \cdot 10^5$ Pa v závislosti na teplotě. (regresní křivky – viz tabulka 3.3)

Hodnoty jsou převzaty z International Union of Pure and Applied Chemistry „Solubility Data Series“. Rozpustnost je vyjádřena jako molární zlomek rozpuštěného plynu x_i .

Data jsou aproximována rovnicí:

$$\ln(x_i) = A + B \cdot T^* + C \cdot \ln(T^*) \quad \text{kde } T^* = \frac{T}{100K}$$

Teplota je vyjádřena v [K]. K plynu je udána přesnost aproximace a rozsah teplot, v němž je možno aproximaci použít.

Tab. 3.3: Vyjádření rozpustnosti N₂, O₂ a CO₂ pomocí regresních funkcí

xi [-]			
T [K]	Dusík (N ₂) (Mr = 28)	Kyslík (O ₂) (Mr = 32)	Oxid uhličitý (CO ₂) (Mr = 44)
288,15	1,386.10 ⁻⁵	2,756.10 ⁻⁵	8,21.10 ⁻⁴
293,15	1,274.10 ⁻⁵	2,501.10 ⁻⁵	7,07.10 ⁻⁴
298,15	1,183.10 ⁻⁵	2,293.10 ⁻⁵	6,15.10 ⁻⁴
303,15	1,108.10 ⁻⁵	2,122.10 ⁻⁵	5,41.10 ⁻⁴
308,15	1,047.10 ⁻⁵	1,982.10 ⁻⁵	4,80.10 ⁻⁴
A	-67,3877	-66,7354	
B	86,3213	87,4755	Platí Henryho zákon
C	24,7981	87,4755	
SD	± 0,72 %	± 0,36 %	± 1,1 %
Rozsah teplot	273,15 až 348,15	273,15 - 348,15	273,15 - 353,15

Tab. 3.4: Rozpustnost plynů jako Ostwaldův koeficient α za normálního tlaku (1,01325 · 10⁵ Pa) v závislosti na T.

T [°C]	Plyn			
	O ₂	N ₂	CO ₂	Vzduch
0	0,049	0,0239	1,713	0,0288
10	0,038	0,0196	1,194	0,0226
20	0,031	0,0164	0,878	0,0187
30	0,026	0,0138	0,665	0,0156
40	0,023	0,0118	0,53	-
50	0,021	0,0106	0,436	-
60	0,019	0,01	0,359	-

Oprava na skutečný atmosférický tlak

Ve většině aplikací je postačující použití lineární opravy

$$X_p = \frac{p}{p_n} X_{p_n}$$

kde p_n je normální tlak $1,01325 \cdot 10^5$ Pa, p je aktuální tlak při měření. X_p je koncentrace rozpuštěného plynu c nebo molární zlomek rozpuštěného plynu x_i .

3.2.3 Popis přístroje

Popis přístroje je proveden včetně všech podpůrných přístrojů. V případě plného vybavení je možno přístroj používat nejen pro rutinní stanovení toxicity, ale i jako přístroj pro výzkum v algologii, vývoj nových metodik stanovení toxicit a aktivit látek, a pro měření biologické aktivity. Příslušenství, které není nutné pro základní měření je označeno *.

3.2.3.1 Mechanická konstrukce

Přístroj tvoří malá kompaktní jednotka, která obsahuje termostat (-10 60 °C), řízení osvětlení, řízení otáček míchadla a příslušenství.

Základní příslušenství tvoří:

- 1) Rozebíratelná reakční nádobka
- 2) Míchadlo s přesným řízením otáček
- 3) Výměnné míchací kužely
- 4) Náhradní skleněné nádobky
- 5) Zátky k uzavření reakční nádobky
- 6) Kyslíková elektroda
- 7) Vzduchovací strojek
- 8) Vsuvka pro udržování standardní atmosféry nad hladinou měření včetně filtru
- 9) Výměnné zdroje světla
- 10) Síťový adaptér
- 11) Potenciostat

Speciální příslušenství tvoří (*):

- 1) Fotometr pro měření úrovně světla uvnitř reakční nádobky
- 2) Externí teploměr Pt 1000 nebo Ni 5000 pro měření teploty uvnitř reakční nádoby
- 3) Promývačka pro sycení standardní atmosféry vlhkostí
- 4) Konektor pro měření s biosenzorem s imobilizovanými enzymy
- 5) Nástavec na třepačku pro sekvenční měření.

Další vybavení (standardní vybavení laboratoře) (*):

- 1) Mikroskop (zvětšení až 1000x)
- 2) Bürkerova komůrka
- 3) Pipety a špičky

- 4) Kultivační box s osvětlením
- 5) Třepačka
- 6) Luxmetr
- 7) Teploměr
- 8) Centrifuga



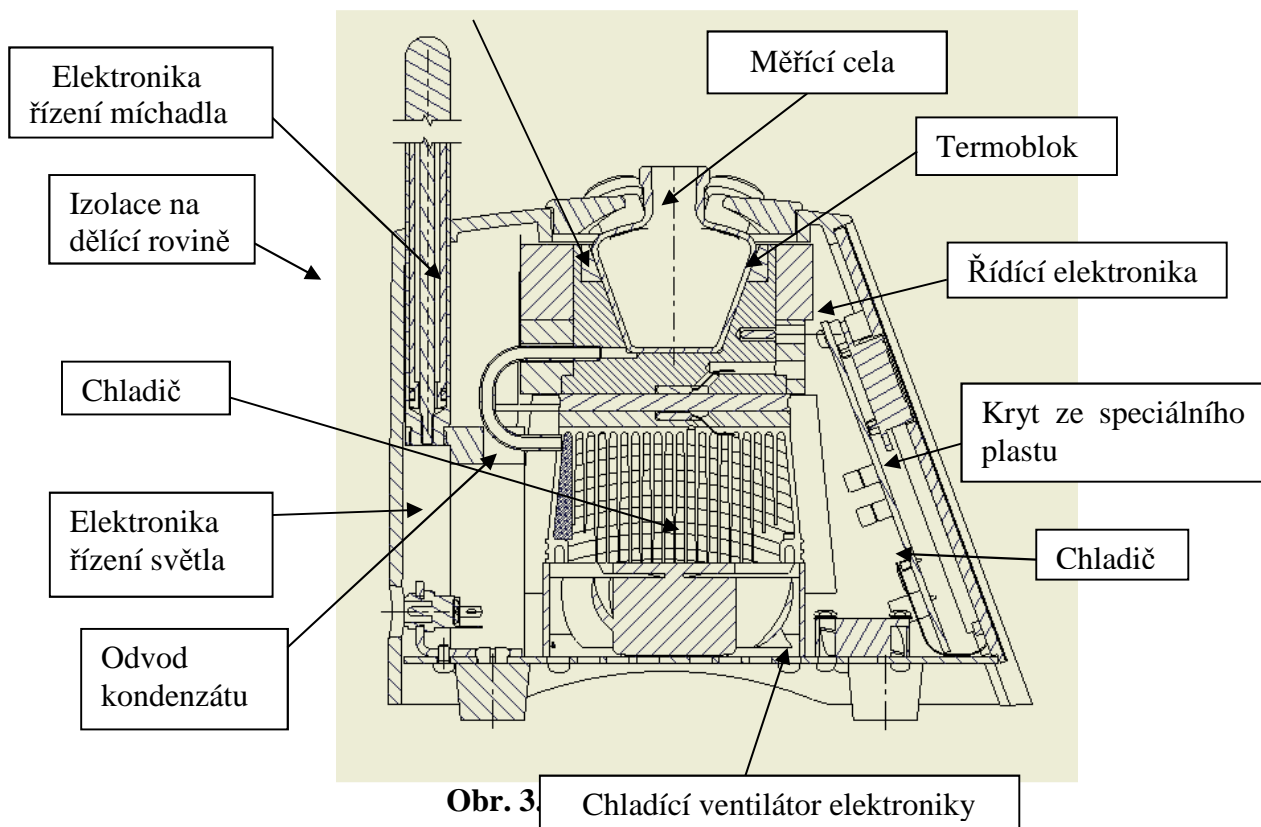
Obr. 3.2: Přístroj AlgaTox

Detekční částí přístroje je reakční nádobka s kyslíkovou elektrodou a míchadlem. Středový otvor s normovaným kuželovým zábrusem NZ 13 je kompatibilní se skleněnými chemickými díly ukončenými NZ 13. Středový otvor je určen pro míchadlo. Čtyři menší otvory jsou opatřeny normovaným zábrusem NZ 10. Jsou určeny pro nástřik vzorku a umístění dalšího příslušenství (O_2 senzor, biosenzory, fotometr, zdroj světla, zátky). Reakční nádobka je hermeticky uzavřena zátkami a standartní atmosféra je zajištěna promýváním filtrovaným vzduchem.

Při měření je reakční nádobka umístěna v měděném termobloku přístroje. Teplota termobloku je řízena v rozmezí $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ termostatem s Peltierovým článkem. Teplota v reakční nádobce se ustaluje v čase $< 10\text{ min}$.

Čelní panel je tvořen membránovou klávesnicí a displejem. Display zobrazuje aktuální teplotu termobloku a nastavenou teplotu nebo informace o nastavení termostatu. Tlačítka membránové klávesnice umožňují nastavit parametry termostatu.

Do přístroje je integrován držák, který umožňuje umístění víka reakční nádobky, případně její omytí tak, aby nebylo změněno geometrické uspořádání kyslíkového čidla a míchadla. V zadní části horního krytu přístroje jsou umístěny konektory napájení zdroje světla a napájení míchadla. Na zadním panelu přístroje je konektor jeho napájení a USB konektor pro komunikaci s blokem řízení míchadla a blokem řízení světla.



3.2.3.2 Elektrická konstrukce

Elektrická konstrukce je rozdělena do dvou částí. Přístroje a potenciostatu. Přístroj zahrnuje bloky elektroniky:

- Řízení termostatu
- Řízení míchadla
- Řízení světla

Každé ze tří zařízení má vlastní mikroprocesor. Řízení míchadla a světla komunikuje s PC prostřednictvím jednoho USB portu. Zmíněné tři bloky mají společné napájení 12 V odebírané ze standardního adaptéru.

Přístroj obsahuje výkonové prvky. Potenciostat je samostatný oddělený blok. Tím je sníženo rušení výkonnými prvky přístroje. Zařízení je univerzální. Je možno použít i potenciostaty (případně oxymetry) jiných firem.

3.2.3.3 Napájení

Přístroj je napájen síťovým adaptérem, který je s ním dodáván, a který poskytuje výstupní výkon 100 W (Peltiérův článek 75 W, elektronika 10 W, ventilátor 10 W = 95 W, 5 W rezerva na LED a míchadlo). Adaptér se připojuje prostřednictvím konektoru na zadní stěně přístroje

3.2.3.4 Zdroj světla pro měření.

Jako zdroj světla slouží LED dioda s červeným světlem, která vyzařuje světlo o vlnové délce 680 nm, které je optimální pro růst řas, resp. odpovídá maximální absorpci záření

chlorofylem. Zdroj světla je opatřen kuželem NZ 10 pro jeho pevné a těsné vložení do otvoru reakční nádoby. Zářením je přiváděno nad hladinu vzorku světlovodem.

3.2.3.5 *Technické parametry*

Referenční bod termostatu	programovatelný: termoblok, horní strana PTE (Peltier Termo Element), dolní strana PTE, pracovní prostor nádoby – externí teploměr,
Pracovní teplota	programovatelná tlačítka v rozsahu regulovaných teplot
Rozsah regulovaných teplot	-9.9 °C - +59.9 °C při refer. bodu v termobloku
Teplotní čidla	čtyři odporová, RTD (Resistive Temperature Detector) typu Ni5000 nebo Pt1000. Měří teplotu termobloku, horní a dolní strany PTE a externí teplotu v pracovním prostoru. Automatické rozpoznání typu čidla
Rozlišení nastavitelné a měřené teploty	0.1 °C
Použitý PTE	CP 85438 V-INFINITY, 8.5 A/75 W
Ovládání	sedmi tlačítka na čelním panelu přístroje
Zobrazovací jednotka	dvouřádkový LCD po šestnácti znacích
Regulační algoritmus	adaptabilní PI regulátor
Typ akční veličiny	dvanáctibitová PWM (Pulse Width Modulation)
Kmitočet PWM	cca 85 kHz
Rozsah střidy PWM	10 – 90 %
Dosažitelný rozdíl teplot pólů PTE	50 °C
Napájení	síťový AC-DC adaptér 230 Vac/12 Vdc, 100 W

3.2.3.6 *Popis příslušenství*

Rozebíratelná reakční nádoba, náhradní skleněné nádoby, zátky jsou na obr. 3.4.

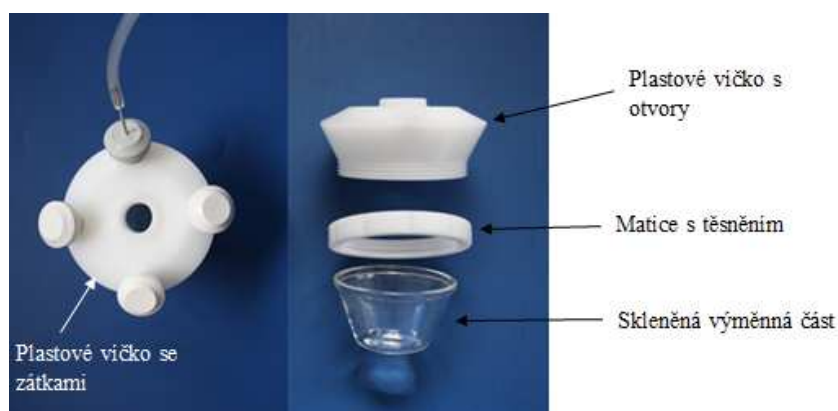


Obr. 3.4: Rozebíratelná reakční nádoba bez příslušenství.

Reakční nádobka o celkovém objemu 25 ± 2 ml je určena pro umístění vzorku a měření průběhu analyzovaných reakcí. Nádobka má jeden centrální vstup opatřený normovaným zábrusem NZ 13 (normální zábrus 13), který je kompatibilní se sklářskými výrobky se stejným zábrusem. Centrální vstup slouží pro vložení míchadla. Do dalších čtyř otvorů s normovaným zábrusem NZ 10 se vkládá zdroj světla, fotodetektor, vzduchovací přípravek a uzavírací zátky. Vstup s uzavírací zátkou slouží rovněž pro přidávek vzorku do skleněné nádobky.



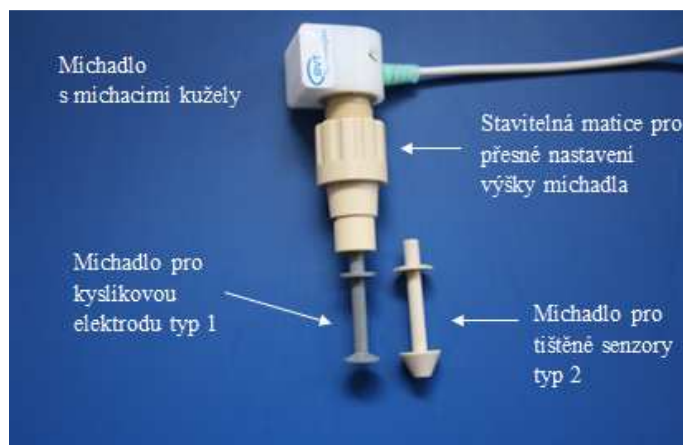
Obr. 3.5: Rozložená reakční nádobka, včetně příslušenství.



Obr. 3.6: Plastové víčko se zátkami a rozebraná nádobka, kterou tvoří skleněná výměnná část, matice s těsněním a plastové víčko s otvory.

Obr. 3.6 ukazuje jednotlivé díly a postup sestavení reakční nádobky. Míchadlo a míchací kužely jsou na obr. 3.7.

Míchadlo umístěné do středového otvoru je opatřeno normovaným kuželovým zábrusem NZ 13. Kužel je umístěn na matici, jejímž otáčením lze nastavit požadovanou výšku míchadla nad dnem nádoby a vzdálenost mezi míchadlem a aktivním povrchem senzoru. V případě měření pomocí kyslíkové elektrody se používá míchadlo typu 1. V případě měření za využití tištěných senzorů se použije míchadlo typu 2. Kyslíková elektroda je na obr. 3.8.



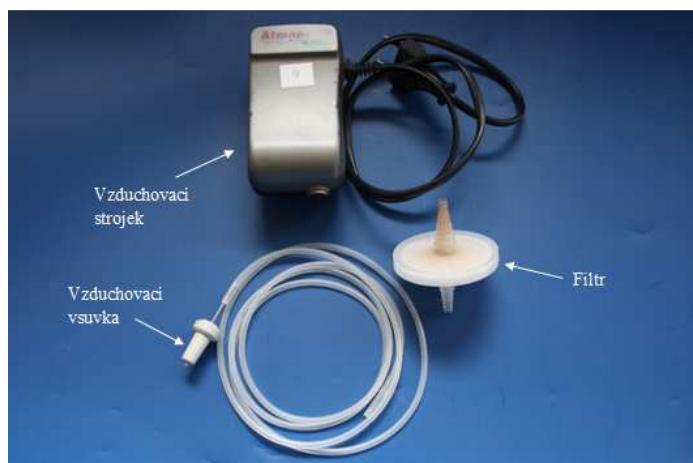
Obr. 3.7: Míchadlo s míchacími kužely a stavitelnou maticí pro přesné nastavení výšky míchadla, které poskytuje přesné řízení otáček.



Obr. 3.8: Kyslíková elektroda složená z těla elektrody, referenční Ag elektrody, pracovní Pt elektrody, krytu pracovní Pt elektrody s membránou. Elektroda je v krytu ponořena do elektrolytu KCl.

Kyslíková elektroda je Clarkova typu. Skládá se z těla elektrody, v němž je upevněno skleněné tělo katody, která je z platiny (Pt). Na skleněném těle je umístěna referenční elektroda ze stříbra (Ag). Aktivní část senzoru je zakomponována v krytu pracovní elektrody. V místě aktivní plochy pracovní elektrody je umístěna teflonová membrána umožňující přestup pouze kyslíku a některých dalších plynů (N₂). Kryt se šroubuje na tělo elektrody a je naplněn elektrolytem 1 M KCl. Vzduchovací strojek, filtr a vzduchovací vsuvka jsou na obr. 3.9.

Vzduchovací strojek, filtr a koncovka pro promývání plynem jsou určeny pro udržování standardní atmosféry nad analyzovaným vzorkem. Vzduchovací strojek se hadičkou propojí s filtrem a koncovka opatřená kuželem NZ 10 se umístí do jednoho z otvorů reakční nádoby (viz obr 3.6). Výměnné zdroje světla jsou na obr. 3.10.



Obr. 3.9: Vzduchovací strojek spolu s filtrem a vzduchovací vsuvkou zajišťují promývání vzorku filtrovaným vzduchem.



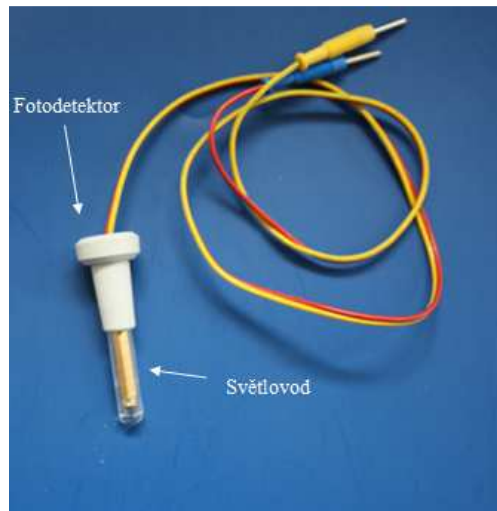
Obr. 3.10: Výměnný zdroj světla, který se skládá z LED diody s chladičem.

Zdroj světla tvoří vysoce svítivá LED dioda (680 nm) produkující záření, které je přiváděné těsně nad analyzovaný roztok. Externí teploměr, fotometr a konektor pro měření s biosenzorem jsou na obr. 3.11, 3.12 a 3.13.



Obr. 3.11: Externí teplotní čidlo sloužící ke sledování teploty vzorku během měření.

Externí teplotní čidlo je odporové čidlo Ni 5000, které je uloženo v nerezovém plášti. Plášť je umístěn v zátce s kuželem NZ 10. Čidlo je možné použít pro řízení teploty termostatem na základě skutečné teploty vzorku. Ve stejném uspořádání lze použít i čidlo Pt 1000. Obě teplotní čidla rozezná termostat přístroje AlgaTox automaticky.



Obr. 3.12: Fotometr, který se skládá z fotodetektoru a světlovodu.

Speciálním příslušenstvím fotobioreaktoru je fotodetektor. Citlivá fotodiody je umístěna ve špičce tubusu vyrobeného z plexiskla. Čelní plocha je vyleštěna do tvaru čočky, která soustřeďuje záření na aktivní prvek fotodiody. Výstupní signál je vedený stíněným pláštěm tak, aby fotodiody měřila světlo odražené od hladiny vzorku. Fotodiody je umístěna v držáku s normovaným zábrusem NZ10.



Obr. 3.13: Konektor pro měření s biosenzory patří do speciálního příslušenství fotobioreaktoru.



Obr. 3.14: Promývačka

Konektor umožňuje využití tištěných elektrod ve stejném uspořádání v jakém se používá kyslíková elektroda.

K sycení měřeného roztoku se používá promývačka, která je na obr. 3.14.

Pro míchání více roztoků najednou je možné využít nástavec na třepačku (obr. 3.15).

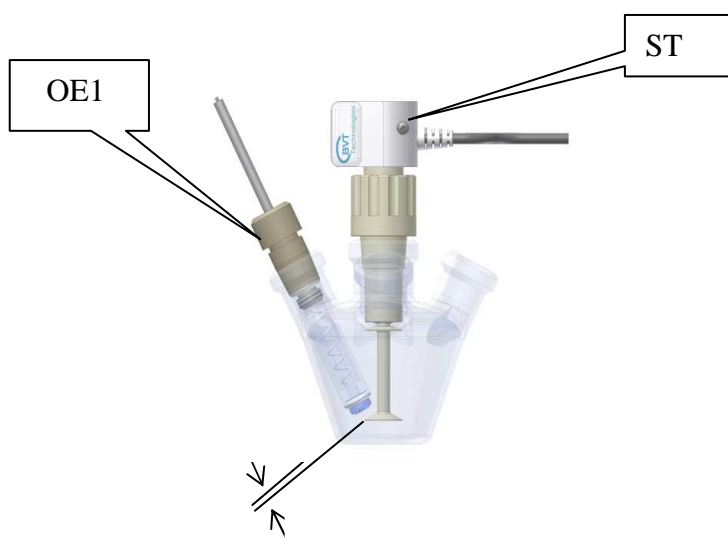


Obr. 3.15: Nástavec na třepačku pro sekvenční měření.

3.2.4 Dvoukompartimentový model funkce přístroje

Analytický fotobioreaktor umožňuje velmi přesné provádění biochemických experimentů s cílem jejich využití pro detekci toxických látek. Umožňuje detailní sledování průběhu reakcí v biokogniční vrstvě pokud pracuje jako biosenzor.

Teorie fotobioreaktoru je složitá, zejména díky komplexnosti a nelinearitě rovnic, které popisují chemické děje, které probíhají při reakci řas na osvit zářením. Uspořádání reakční nádoby fotobioreaktoru je schematicky zobrazeno na obr. 3.16.



Obr. 3.16: Schematické znázornění reakční nádoby analytického fotobioreaktoru, (OE – kyslíková elektroda, ST-míchadlo s přesným řízením otáček)

Objem kapaliny ve fotobioreaktoru je V_S a objem atmosféry nad kapalinou je V_A . Typicky je $V_S = 5$ ml a $V_A = 15$ ml. Celkový objem, s uvažováním elektrod a míchadla, je 25ml. Nejjednodušším modelem je dvoukompartimentový model.

Kompartiment atmosféry nad vzorkem (Kom1)

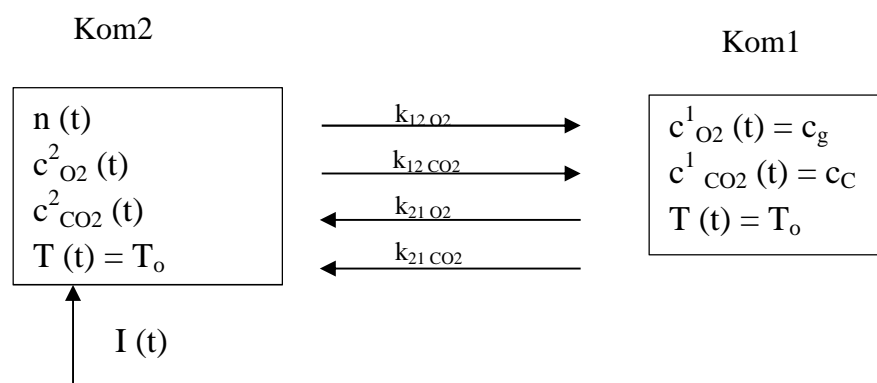
Kompartiment roztoku, který je v dynamické rovnováze s Kom1 (Kom2)

Kompartiment Kom1 může být promýván plynem o známém složení. Tím je zajištěno, že slouží pro Kom2 jako chemostat.

Jedno z účinných a častých zjednodušení je analýza počátečních reakčních rychlostí. Při této analýze nejsou děje ovlivněny přítomností produktů reakcí, přesněji, jsou zanedbatelně ovlivněny přítomností produktů reakcí.

Významnou roli hrají reakce, které lze stimulovat světlem. Lze je spustit téměř okamžitě. Změny koncentrací způsobené difuzí jsou podstatně pomalejší, a proto je možno průběh reakcí po stimulaci světlem považovat za reakci vycházející z ustáleného stavu. Stimulace světlem může být krátká a následuje po ní fáze bez stimulace, kdy se systém navrátí do rovnováhy. Opakováním těchto sekvencí je možno obdržet signál, který odpovídá probíhající chemickým reakcím s vysokým potlačením šumu.

Struktura systému z hlediska kompartmentového modelu je na obr. 3.17 (JACQUES, 1985).



Obr. 3.17: Kompartimentový model funkce analytického bioreaktoru

Význam parametrů popisujících kompartmentový model:

$n(t)$	počet jedinců řas, které jsou sledovány
n_0	počet jedinců řas na začátku experimentu
$c^1_{O_2}(t)$	koncentrace kyslíku v kompartmentu 1
$c^1_{CO_2}(t)$	koncentrace CO_2 v kompartmentu 1
$c^2_{O_2}(t)$	koncentrace kyslíku v kompartmentu 2
$c^2_{CO_2}(t)$	koncentrace CO_2 v kompartmentu 2

T	teplota
T ₀	teplota, na kterou jsou termostatovány kompartmenty
I (t)	intenzita světla stimulující produkci kyslíku řasami

Oba kompartmenty jsou intenzivně míchány, takže koncentrace v jejich objemu je stejná jako u hranice, přes kterou dochází k přenosu látky (CO₂ a O₂) mezi Kom1 a Kom2. Interakce mezi kompartmenty je dána pouze toky látek mezi Kom1 a Kom2.

Toky jsou charakterizovány kinetickými konstantami k_{12O₂}, k_{12CO₂}, k_{21O₂}, k_{21CO₂}. Jejich význam vyplývá z rovnic

$$J_{12O_2} = k_{12O_2} \cdot c_{O_2}^2(t) - k_{12O_2} \cdot c_{O_2}^1(t)$$

$$J_{12CO_2} = k_{12CO_2} \cdot c_{CO_2}^1(t) - k_{21CO_2} \cdot c_{CO_2}^2(t)$$

$$J_{21O_2} = k_{21O_2} \cdot c_{O_2}^2(t) - k_{21O_2} \cdot c_{O_2}^1(t)$$

$$J_{21CO_2} = k_{21CO_2} \cdot c_{CO_2}^2(t) - k_{21CO_2} \cdot c_{CO_2}^1(t)$$

kde

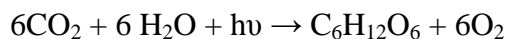
J_{12O₂} tok kyslíku z Kom2 do Kom1

J_{12CO₂} tok oxidu uhličitého z Kom2 do Kom1

J_{21O₂} tok kyslíku z Kom1 do Kom2

J_{21CO₂} tok oxidu uhličitého z Kom1 do Kom2

V kompartmentu Kom2 probíhá chemická reakce přibližně popsaná rovnicí (BRAYNER a kol, 2011).



V nejjednodušším modelu lze předpokládat, že rovnováha mezi Kom1 a Kom2 se ustavuje dostatečně rychle a reakce řas jsou tak pomalé, že systém lze považovat v každém okamžiku měření za rovnovážný. Potom platí:

$$\frac{k_{21O_2}}{k_{12O_2}} = K_{O_2} \quad \begin{aligned} c_{O_2}^2(t) &= X(t) \\ c_{CO_2}^2(t) &= Y(t) \end{aligned}$$

$$\frac{k_{21CO_2}}{k_{12CO_2}} = K_{CO_2} \quad \begin{aligned} c_{O_2}^2(0) &= X_0 \\ c_{CO_2}^2(0) &= Y_0 \end{aligned}$$

Kde c_{O₂}²(0) a c_{CO₂}²(0) jsou počáteční koncentrace O₂ a CO₂.

Kompartiment 1 je tvořen plynem. Jeho složení lépe vystihuje parciální tlak O_2 a CO_2 (p_{O_2} a p_{CO_2}). Vztah mezi parciálním tlakem plynu a jeho molárním zlomkem rozpuštěným v roztoku (Kom2) vyjadřuje Henryho zákon. (MOORE, 1979).

Rovnovážná konstanta O_2 a CO_2 v Kom2 je dána vzorci:

$$c_{O_2}^2(\infty) = \frac{p_{O_2}}{K_{O_2}} = c_O$$

$$c_{CO_2}^2(\infty) = \frac{p_{CO_2}}{K_{CO_2}} = c_C$$

Kde p_{O_2} a p_{CO_2} jsou parciální tlaky kyslíku a oxidu uhličitého nad roztokem.

Rovnovážné konstanty K_{O_2} a K_{CO_2} mají význam Henryho konstant ve formulaci Henryho zákona pro molární koncentrace a parciální tlak. ($K_{O_2} = k_{H}^{II}(O_2)$, $K_{CO_2} = k_{H}^{II}(CO_2)$)

Kompartiment Kom2 je periodicky stimulován světlem s obdélníkovým průběhem.

$$I(t) = \begin{cases} I_0 & \text{pro } < t_{01} + t_S > U < t_{01} + \tau \dots t_{01} + \tau + t_S > U \dots \\ 0 & \text{pro } < 0, t_{01} > U < t_{01} + \tau + t_S \dots t_{01} + 2\tau > U \dots \end{cases}$$

Na začátku experimentu se musí systém (Kom1 a Kom2) stabilizovat. Tento proces popisují rovnice:

$$\dot{X}(t) = K_{O_2} (c_O - X(t))$$

$$\dot{Y}(t) = K_{CO_2} (c_C - Y(t)) \quad (1)$$

S počátečními podmínkami

$$X(0) = X_0$$

$$Y(0) = Y_0 \quad (2)$$

řešení je

$$X(t) = (X_0 - c_O)e^{K_{O_2}t} + c_O$$

$$Y(t) = (Y_0 - c_C)e^{K_{CO_2}t} + c_C \quad (3)$$

V čase t_{01} je zapnuta stimulace světlem a řasy začnou produkovat kyslík. Proces je popsán soustavou rovnic:

$$\dot{X}(t) = K_{O_2} (C_O - X(t)) + \frac{K_{1v} \cdot I_0 \cdot K_{1CO_2} \cdot Y(t)}{(K_{2v} + I_0) \cdot K_{2CO_2} + Y(t)} \cdot Z$$

$$\dot{Y}(t) = K_{CO_2} (C_C - Y(t)) + \frac{K1v \cdot I_0 \cdot K1_{CO_2} \cdot Y(t)}{(K2v + I_0) \cdot K2_{CO_2} + Y(t)} \cdot Z \quad (4)$$

Děje spojené s produkcí kyslíku mají charakter velmi podobný enzymovým reakcím. Proto má tvar členu popisujícího produkci kyslíku tvar součinu příspěvků tvaru $\frac{K1S}{K2+S}$, kde K1 je rychlostní konstanta pro příslušnou reakci a K2 je zobecněná Michaelisova konstanta pro danou látku.

Významy symbolů v (4) jsou:

- K1_v reakční rychlost produkce kyslíku způsobená osvětlením řas intenzitou I₀
- K2_v zobecněná Michaelisova konstanta popisující saturaci produkce kyslíku v závislosti na světle
- K1_{CO₂} závislost produkce kyslíku na koncentraci CO₂
- K2_{CO₂} zobecněná Michaelisova konstanta popisující saturaci produkce kyslíku v závislosti na koncentraci CO₂
- Z součin členů tvaru $\frac{K1z Z_i}{K2z + Z_i}$, kde Z_i je koncentrace dalších nutrientů (i-tého nutrientu) nutných pro produkci kyslíku, které musí být obsaženy v suspenzi řas.

Řešení rovnic (4) je možné numericky. Pokud je cílem nalezení takového modelu, který je dostatečně jednoduchý a současně dostatečně přesný, aby umožňoval jednoduchou identifikaci parametrů K1 a K2 v nichž se projeví vliv přítomnosti inhibitoru, je nutno optimálně nastavit experimentální podmínky. Pokud je správně navržen živný roztok (Z je konstantní), koncentrace CO₂ je dostatečně nízká K2_{CO₂} >> Y(t) a intenzita světla je dostatečně nízká, aby K2_v >> I₀ a současně je I₀ dostatečně vysoká hodnota, aby poskytla vhodný poměr signál/šum (při měření O₂), lze rovnice (4) linearizovat.

$$\dot{X}(t) = K_{O_2} (C_O - X(t)) + a Y(t) \quad (5)$$

$$\dot{Y}(t) = K_{CO_2} (C_C - Y(t)) - a Y(t)$$

Informace o přítomnosti inhibitorů je obsažena nelineárním způsobem v konstantě a, která zahrnuje všechny vlivy, které jsou konstantní a jejichž konstantnost je zajištěna vhodným návrhem experimentu. Formálně platí

$$a = \frac{K1v}{K2v} \cdot \frac{K1_{CO_2}}{K2_{CO_2}} \cdot Z \cdot I_0 \quad (6)$$

kde všechny parametry mohou záviset na koncentraci inhibitorů nebo toxických látek.

Předchozí analýza vyjadřuje podmínky, za nichž měření bude citlivě reagovat na přítomnost inhibitoru.

- Produkce kyslíku nesmí být limitována nedostatkem nutrientů;
- koncentrace CO_2 musí být výrazně nižší než zobecněná Michaelisova konstanta K_{CO_2} a současně dostatečně vysoká, aby produkce kyslíku nebyla limitována nedostatkem CO_2 . Rovnováha se vzdušnou koncentrací CO_2 se ukazuje postačující;
- intenzita osvětlení musí být výrazně nižší než zobecněná Michaelisova konstanta K_2 a současně dostatečně vysoká, aby byl dosažen dostatečně nízký poměr šum/signál. Hodnota vhodného osvětlení je nastavena pevně a byla optimalizována při návrhu zdroje světla.

Rovnice (1) a (5) umožňují sestavit celkový model funkce analytického bioreaktoru při konstantních parametrech Kom1. Další zjednodušení lze provést, pokud bude v přebytku CO_2 .

Klasická aproximace používaná v enzymologii je předpoklad, že zásoba CO_2 ve fotobioreaktoru je dostatečná, CO_2 se rychle doplňuje z kompartmentu Kom1. Za těchto předpokladů se velmi rychle ustaví nová rovnováha a lze položit $\dot{Y}(t) = 0$ (viz. údaje o rozpustnosti CO_2). Potom platí:

$$Y(t) \approx C_C \quad (7)$$

Dosazením do (7) obdržíme nejjednodušší model funkcí analytického fotobioreaktoru, který je popsán jedinou diferenciální rovnicí.

$$\dot{X}(t) = K_{\text{O}_2} (C_0 - X(t)) + a C_C \quad \text{pro světlo}$$

$$\dot{X}(t) = K_{\text{O}_2} (C_0 - X(t)) \quad \text{pro tmou} \quad (8)$$

V nejjednodušším modelu kinetická konstanta K_{O_2} popisuje dynamiku přenosu kyslíku mezi Kom1 a Kom2 a působení inhibitoru je nelineárním způsobem obsaženo v parametru a . Parametr a je extensivní a závisí na počtu buněk řas. Rovnice (8) ukazují, že v nejjednodušším případě stačí studovat pouze produkci kyslíku za předpokladu dostatečného přebytku oxidu uhličitého. Ten je zajištěn tím, že rozpustnost CO_2 ve vodě je téměř o dva řády vyšší než rozpustnost O_2 .

V dalším textu bude odvozen Henryho zákon (je to důležité z hlediska pochopení probíhajících dějů) a odvozena metoda vyhodnocení pro nejjednodušší analýzu dat.

3.2.5 Odvození Henryho zákona a principu vyhodnocení signálu analytického AlgaTox

V dvoukompartimentovém modelu, kde kompartment 1 slouží jako chemostat, je kompartment Kom1 charakterizován složením plynu a jeho tlakem. Složení plynu je vyjádřeno molárním zlomkem $x[i]$ a tlak plynu je p . Měření se provádí za tlaku, který se podstatně neliší od atmosférického tlaku. Za těchto podmínek lze předpokládat, že je splněn Daltonův zákon a všechny plynné složky lze považovat za ideální. Potom je parciální tlak jednotlivých složek $p[i]$ dán vztahem (9)

$$p_i = px_i \quad (9)$$

Pravděpodobnost, že molekula látky opustí své okolí jak v plynu, tak v kapalině je úměrná její koncentraci v tomto okolí. V nejjednodušším případě kyslíku, který je obsažený v Kom1 je pravděpodobnost, že molekula O_2 vstoupí do kapaliny, tj. opustí Kom1 úměrná k_{21O_2} . Zcela analogicky je pravděpodobnost, že molekula O_2 vystoupí z Kom2, tj. zkoumaného kapalného vzorku, a vstoupí do Kom1 je úměrná k_{12O_2} . Koncentrace v obou kompartmentech se mohou měnit v závislosti na čase. Označme $x_{O_2}^1(t)$ molární zlomek kyslíku v plynu v Kom1 a $x_{O_2}^2(t)$ molární zlomek kyslíku ve vzorku - Kom2. Potom platí rovnice (10) a (11) pro koncentrace kyslíku v plynu a kapalném vzorku.

$$\frac{d}{dt}x_{O_2}^1(t) = k_{12O_2}x_{O_2}^2(t) - k_{21O_2}x_{O_2}^1(t) \quad (10)$$

$$\frac{d}{dt}x_{O_2}^2(t) = -k_{12O_2}x_{O_2}^2(t) + k_{21O_2}x_{O_2}^1(t) \quad (11)$$

Rovnice (10) a (11) popisují látkovou bilanci dějů při ustalování rovnováhy kyslíku v Kom1 a Kom2. V rovnováze jsou derivace nulové. Řešením dostaneme

$$x_{2O_2}(\infty) = \frac{k_{21O_2}x_{O_2}^1(\infty)}{k_{12O_2}} \quad (12)$$

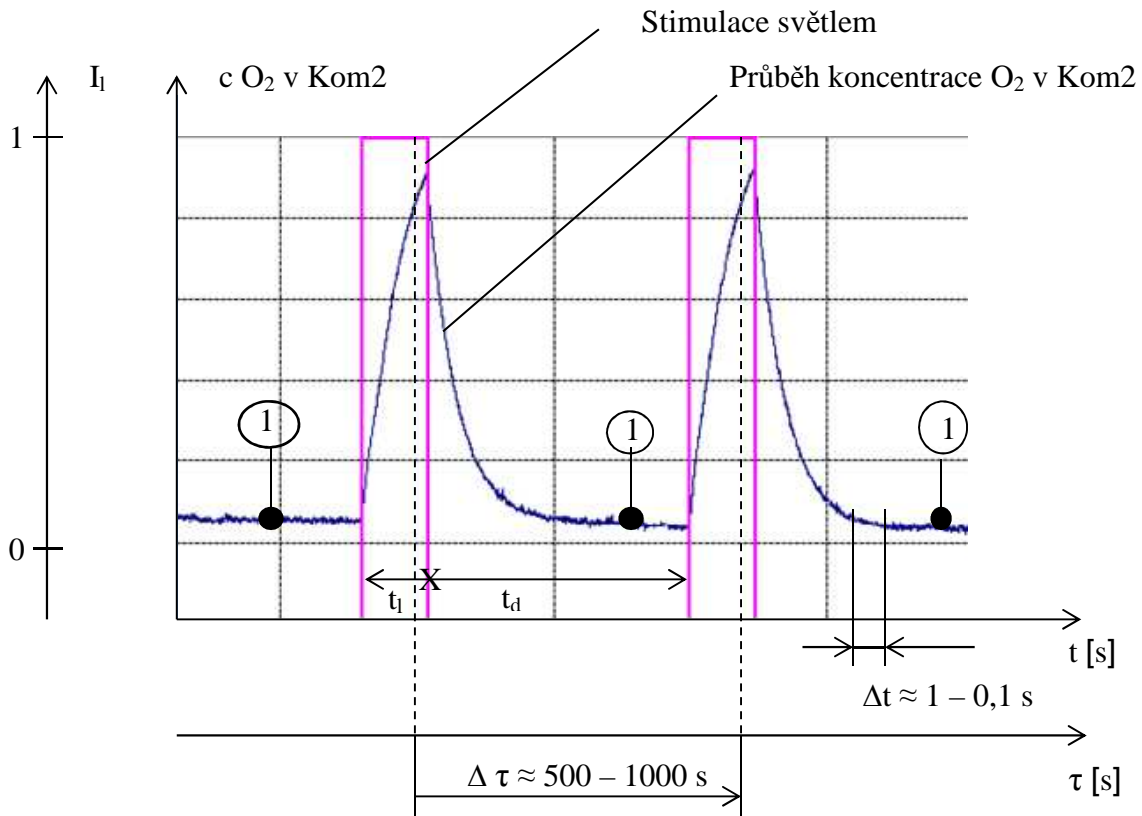
Vyjádříme-li molární zlomek kyslíku v Kom1 pomocí jeho parciálního tlaku z (9) a dosadíme do (12) dostaneme Henryho zákon. Z posledního vztahu vychází, že v rovnováze platí

$$x_{O_2}^2(t) = k_H p_{O_2}^1 \quad (13)$$

kde

$$k_H = \frac{k_{21O_2}}{pk_{12O_2}} \quad (14)$$

Poslední rovnice je ale Henryho zákon.



Vysvětlení indexů:

$$I_1 = I_{\text{light}} \quad t_l = \text{time}_{\text{light}} \quad t_d = \text{time}_{\text{dark}}$$

Obr. 3.18: Schematické znázornění průběhu experimentu. Rovnovážný stav popsán Henryho zákonem.

Obrázek 3.18 ukazuje typický průběh experimentu a současně vystihuje i podmínky, kdy výsledky měření budou poskytovat spolehlivé údaje o toxicitě.

1. Měření vychází z ustáleného stavu popsáno Henryho zákonem.
2. Po stimulaci světlem se Kom2 navrací do rovnovážného stavu. Další stimulace opět vychází z rovnovážného stavu.
3. Toxické působení působí malé změny v odezvě na stimulaci. Časové měřítko v čase τ je schopno zachytit kinetiku inhibičních procesů.
4. Produkce kyslíku je dostatečně nízká, takže lze předpokládat, že koncentrace v Kom1 je konstantní a odpovídá rovnováze při daném tlaku a teplotě.

Za platnosti předchozích podmínek není důležité znát detailní průběh odezvy systému na stimulaci, ale postačuje znalost pouze průměrné produkce kyslíku v Kom2.

$$\frac{1}{t_l} \int_t^{t+t_l} P(\tau, t) dt \quad (15)$$

Rovnice (10) se změní

$$\frac{d}{dt} c_{O_2}^2(t) = -k_{12O_2} c_{O_2}^2(t) + k_{21O_2} c_{O_2}^1(t). \quad (16)$$

Protože produkce kyslíku řasami změní rovnováhu, je postačující sledovat pouze změny rovnovážného stavu.

$$\Delta c_{O_2}^2(t) = c_{O_2}^2(t) - c_{O_2}^2(\infty) \quad (17)$$

$c_{O_2}^2(\infty)$ lze vyjádřit z Henryho zákona v jeho tvaru pro koncentrace

$$c_{O_2}^2(\infty) = \frac{c_{O_2}^1}{k_H} \quad (18)$$

po dosazení

$$\frac{d}{dt} \Delta c_{O_2}^2(t) = -k_{12O_2} \Delta c_{O_2}^2(t) \quad (19)$$

Pro zjednodušení provedeme označení

$$\Delta c_{O_2}^2(t) = X(t) \quad (20a)$$

$$k_{12O_2} = k \quad (20b)$$

$$\frac{d}{dt} X(t) = -k X(t) \quad (21)$$

Měření probíhá následujícím způsobem. Po dobu t_1 je Kom2 stimulován světlem. Potom se navrací do rovnováhy. Experiment je tedy popsán dvěma rovnicemi, jejichž řešení je spojitě.

$$\frac{d}{dt} X(t) = -kX(t) + P(\tau, t) \quad (22)$$

řešení (22) je

$$X(t) = \left(\int_0^t P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi \right) e^{-kt} \quad (23)$$

Po ukončení osvitů v čase $t + t_1$ bude

$$X(t) = \left(\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi \right) e^{-kt} \quad (24)$$

Řešení lze vyjádřit jako po částech spojitou funkci

$$X(t) = \begin{cases} X = \left(\int_0^t P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi \right) e^{-kt} & t < t_1 \\ X = \left(\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi \right) e^{-kt} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (25)$$

Plocha P_1 pod křivkou v čase od 0 .. t_1 je

$$P_1 = - \frac{k_{t_1} \left(\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi \right) - \left(\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) d\xi \right)}{k} \quad (26)$$

Odezvy v průběhu ustalování (bez osvitu).

Plocha pod křivkou v čase $t_1 \cdot \beta \cdot t_1$ je

$$P_2 = \frac{\left(\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) e^{k\xi} d\xi\right) (e^{\beta t_1 k} - e^{k t_1}) e^{-k t_1 (1+\beta)}}{k} \quad (27)$$

Ze vztahů (26) a (27) lze určit průměrnou produkci kyslíku řasami v čase $0..t_e$

$$\frac{\int_0^{t_1} P(\tau, \xi) d\xi}{t_1} = \frac{k}{t_e} \left(P_1 + \frac{P_2}{1 - e^{-(1-\beta)k t_e}} \right) \quad (28)$$

Poslední vzorec je obecný. Zvolíme $\beta = 2$

$$P(\tau) = \frac{k \left(P_1 + \frac{P_2}{1 - e^{-k t_1}} \right)}{t_1} \quad (29)$$

Popsaný postup je exaktní a stanovuje přesně definovanou produkci kyslíku řasami po jejich stimulaci světlem jako

$$P(\tau) = \frac{1}{T} \int_0^T P(\tau, t) dt \quad (30)$$

Volbou T lze zjemnit časové měřítko sledování pomalých dějů, které probíhají při interakci řas a vzorku.

V případě, že se systém vrací do rovnováhy je $\beta \gg 1$. Potom lze průměrnou produkci kyslíku $P(\tau)$ stanovit velmi elegantně jako celkovou plochu pod odezvou na stimulaci světlem $(P_1 + P_2)$.

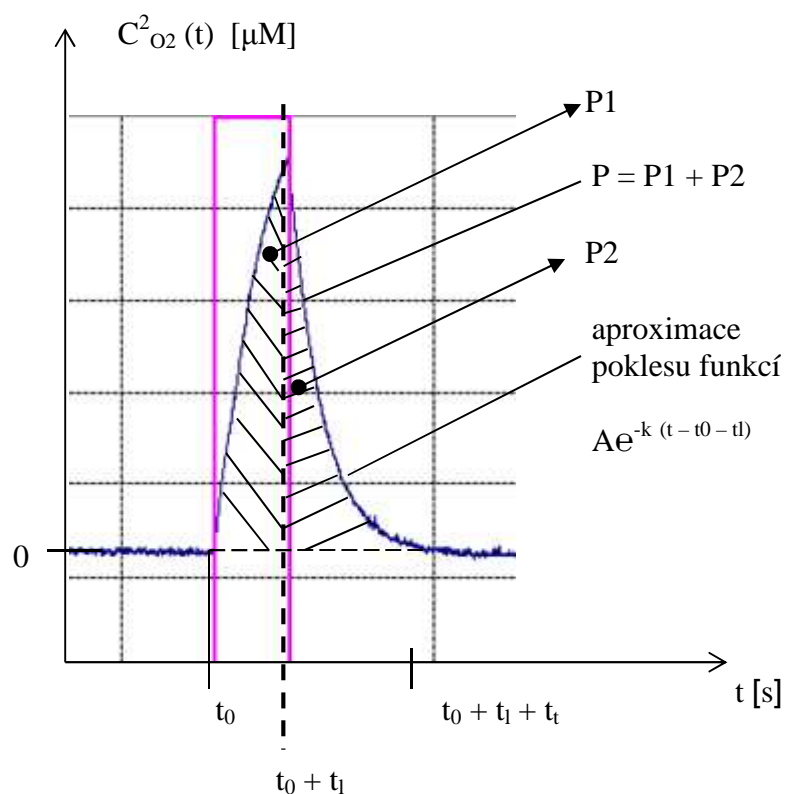
Podobně lze velmi elegantně stanovit parametr k . Je to časová konstanta procesu, kterou se systém vrací po ukončení stimulace do rovnovážného stavu. Nejjednodušší stanovení produkce kyslíku je na obr. 3.19.

Produkce kyslíku je

$$P(\tau) = \frac{P \cdot k}{t_1}$$

V případě, že je znám počet jedinců řas n je možno přepočítat produkci na jednoho jedince dle vzorce:

$$P(\tau) = \frac{P \cdot k}{t_1 n}$$



Obr. 3.19: Stanovení produkce kyslíku.

3.3 Postup měření – základní návod

Pro práci s přístrojem je vybrána a používána čtyřbuněčná řasa *Desmodesmus quadricauda*, kmen GREIFSWALD/15 z CCALA Třeboň. Tři dny před začátkem měření je zahájena předkultivace za stálého třepání řasy v 1/2 Simmer – Šetlík médiu při teplotě $24 \pm 1^\circ\text{C}$ a osvětlení 6000 – 7000 lux. Optimální buněčná hustota řasy pro měření je 700 000 - 1 300 000 buněk/ml.

Na začátku měření je spočítána buněčná hustota řas pod mikroskopem za použití Bürkerovy komůrky. Pro měření je použito 5 ml předkultivovaných řas, které se napipetují do reakční nádoby. Jako standard se doporučuje použít například AgNO_3 o koncentraci 1 mg/l.

Parametry pro měření suspenze řas přístrojem AlgaTox

- Světelný cyklus – 300 s světlo, 300 s tma
- Počet cyklů – 5 cyklů kontrola
 - 10 cyklů vzorek
 - 5 cyklů standard
- Rychlost míchadla – 450 rpm

- d) Teplota – 33 °C
- e) Potenciostat - -650 mV, vzorkování 1 s
- f) Mezera mezi míchadlem a kyslíkovou elektrodou cca 0,5 – 1 mm

Přístroj jako celek se skládá z několika jednotek.

- Bioanalyzér – může být využit oxymetr, potenciostat (Palmsense) a nebo bioanalyzér
- Jednotka AlgaTox, která řídí světlo, otáčky míchadla a termostatuje reakční nádobku
- Vzduchování

Spuštění přístroje:

- 1) Připojení přístroje AlgaTox ke zdroji napětí 12V/10A a jeho zapnutí stisknutím tlačítka $\frac{\text{ON}}{\text{OFF}}$.
- 2) Kontrola zapojení do sítě a propojení všech částí.
- 3) Spuštění PC.
- 4) Start programu Světlo.
- 5) Kontrola časování (1.000 ms), nahrání světelného cyklu.
- 6) Spuštění míchadla.
- 7) Nastavení otáček.
- 8) Spuštění Bioanalyzérů.
- 9) Kontrola parametrů (vzorkování a polarizační napětí).

Reakční nádobka

Před měřením se sestaví reakční nádobka, včetně příslušenství (zátky, vzduchování, kyslíková elektroda, míchadlo a světlo). U kyslíkové elektrody se zkontroluje množství elektrolytu KCl (případně se doplní). Nastaví se mezera (0,5 – 1 mm) mezi míchadlem a elektrodou. Membrána umístěná v kyslíkové elektrodě by neměla vyschnout, proto je důležité, aby byla kyslíková elektroda po skončení měření uchovávána ponořená v destilované vodě. Do reakční nádoby pipetujeme 3 – 5 ml vzorku řas. Reakční nádobka by měla být čistá a, po případném vypláchnutí destilovanou vodou, vysušená. Mezi jednotlivými měřeními je vhodné nejen vypláchnout skleněnou reakční nádobku, ale opláchnout a opatrně osušit také míchadlo a kyslíkovou elektrodu. Po napipetování vzorku řas do reakční nádoby je důležité odstranit vzduchové bubliny, jejichž přítomnost negativně ovlivňuje výsledky měření. Pro jejich odstranění je vhodná injekční jehla. Před měřením je dobré zkusit nanečisto funkci míchadla. Měřený signál udává aktuální koncentraci O₂ v reakčním roztoku. Z průběhu koncentrace O₂ během osvětlení je vypočtena průměrná produkce kyslíku. Řasová suspenze se nechá cca 15 min. před měřením temperovat na požadovanou teplotu za stálého míchání.

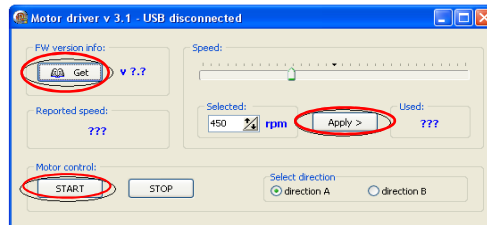
Nastavení teploty - AlgaTox

Řasovou suspenzi je možno temperovat v rozmezí -10 až +60 °C termostatem, který je integrován v přístroji. Měření se provádí při teplotě 33 °C. Temperace se spouští tlačítkem $\frac{\text{START}}{\text{STOP}}$. Teplota reakční nádoby se stabilizuje za 10 – 20 min. Ostatní rovnováhy se ustaví za 20 min. Start měření se provede po 20 minutách, tj. po ustavení chemických rovnováh.

Míchadlo – program DRIVER

Produkce kyslíku řasami je měřena za stálého míchání. Lineární míchadlo je řízeno programem Driver.

Na počítači se otevře složka Driver a rozklikne se ikona MDrive.exe. Objeví se okno Motor driver, kde se klikne na Get a poté na Apply. Ikonou START se míchání spustí a ikonou STOP zastaví (obr. 3.21).

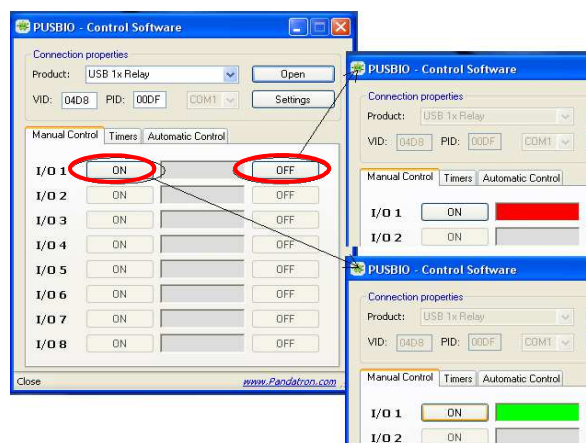


Obr. 3.21: Hlavní okno programu Driver.

LED dioda – program Světlo

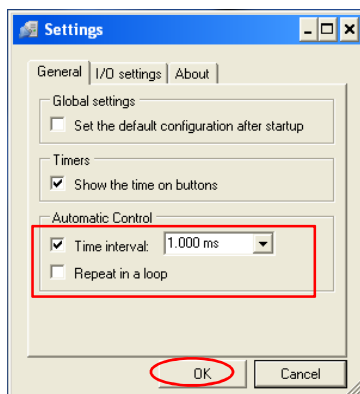
Řasová suspenze je osvětlována a potom nechána ve tmě v několika opakujících se cyklech. To umožnilo zrychlit životní cyklus řas. K ovládání LED osvětlení slouží program Světlo.

Na PC se spustí program Světlo. Otevře se port řízení diody tlačítkem OPEN. Je vhodné manuálně zkusit funkčnost světelné diody přes záložku Manual control. LED dioda se zapne ikonou ON (zelená – světlo svítí) a vypne ikonou OFF (červená – světlo nesvítí). Před spuštěním světelného cyklu musí být v Manual control OFF (obr. 3.22).

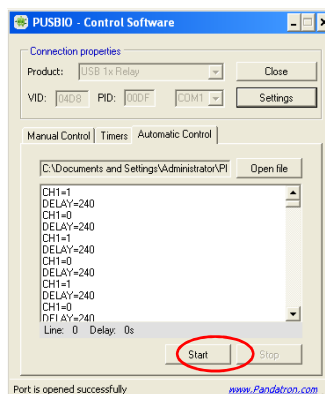


Obr. 3.22: Zapnutí LED diody.

V ikoně Settings se nastaví parametry světelného cyklu, kde se musí zvolit odpočet zvolené délky trvání tmy/světla (optimální je odpočítávání po 1.000 ms). Aby se na konci světelný cyklus vypnul a nepokračoval znovu od začátku, je nutné vypnout opakování Repeat in a loop (obr. 3.23). Světelný cyklus je předem nadefinovaný. Po ustálení koncentrace O₂ (cca 1000 – 2000 s) se světelný cyklus spustí ikonou Start (obr. 3.24).



Obr. 3.23: Nastavení parametrů.



Obr. 3.24: Spuštění světelného cyklu.

Nastavení měření – Bioanalyzer

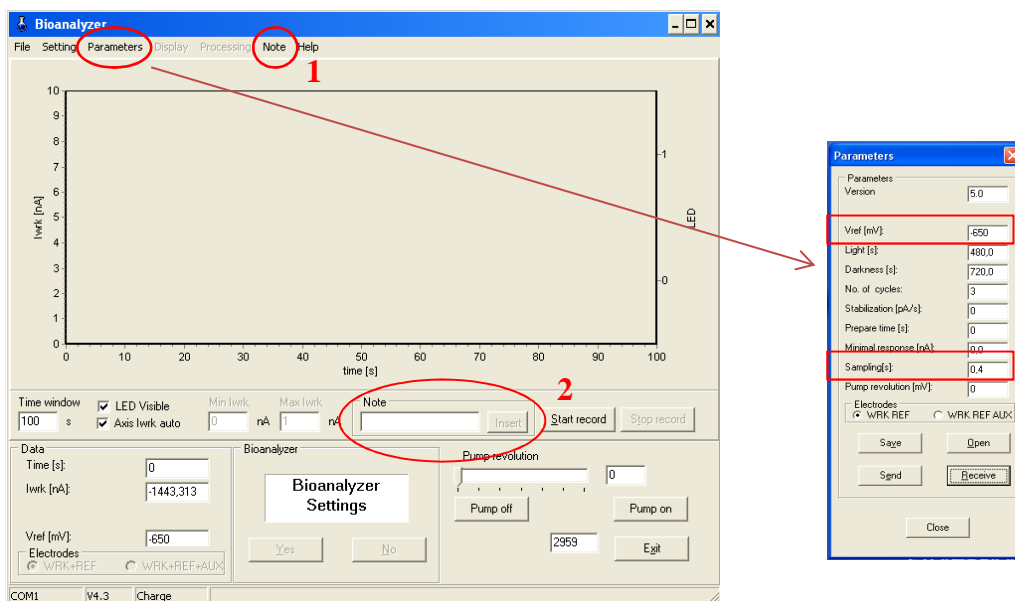
Pro zaznamenávání dat během měření se používá program Bioanalyzer.

Spustí se program Bioanalyzer, kterým se ovládá vyhodnocovací jednotka. V záložce Parameters – edit se nastaví parametry měření.

- Vref [mV] – -650 mV (= napětí referenční elektrody)
- Sampling [s] – 1 s (= vzorkování, v jakém časovém intervalu má bioanalyzer zaznamenávat získaná data měření)
- Electrodes - WRK REF – dvouelektrodové měření

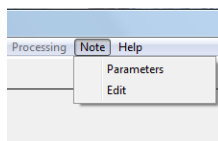
Nastavení parametrů se potvrdí kliknutím na ikonu Send (objeví se chybové hlášení, které se zavře kliknutím na Cancel a Close).

Program Bioanalyzer má také funkci vkládání poznámek (Note) k průběhu měření. Poznámky jsou dvojího typu (obr. 3.25).



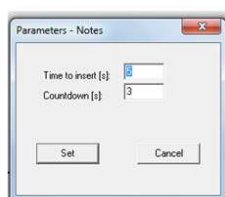
Obr. 3.25: Nastavení parametrů a typy poznámek v programu Bioanalyzer.

- 1) Záložka - Note na hlavní liště slouží ke vkládání jednoduchých poznámek v průběhu měření přímo do grafu (pohyb s přístrojem, přidavek analytu + koncentrace, změna teploty, apod.) a také umožňuje změnu parametrů týkajících se poznámky – Note 2 (obr. 3.26).



Obr. 3.26: Note na hlavní liště.

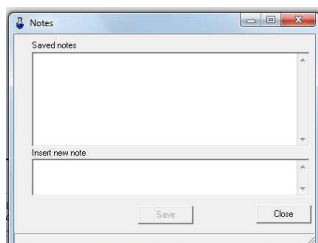
Parameters slouží k nastavení parametrů pro vkládání časované poznámky, kde Time to insert, je čas ke vložení poznámky v sekundách a Countdown je odpočítávání v sekundách (obr. 3.27).



Obr. 3.27: Nastavení parametrů pro vkládání časované poznámky.

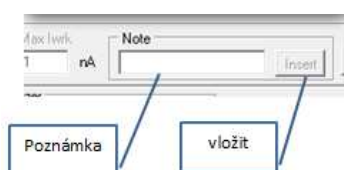
Edit – slouží ke vložení obsáhlejších poznámek k měření. Mohou to být doplňující informace k průběhu měření nebo doplňující informace k časované poznámce (obr. 3.28). V poli saved notes se zobrazí již uložené poznámky.

Insert new note je pole pro vložení poznámky k měření (nastavení, změny v průběhu měření, apod.).



Obr. 3.28: Vložení obsáhlejších poznámek.

- 2) Note 2 ve spodní části programu Bioanalyzer slouží k uložení poznámky přímo v čase provedení, kdy se takto vložená poznámka uloží do naměřených dat a přímo do grafu (obr. 3.29).



Obr. 3.29: Vložení časované poznámky.

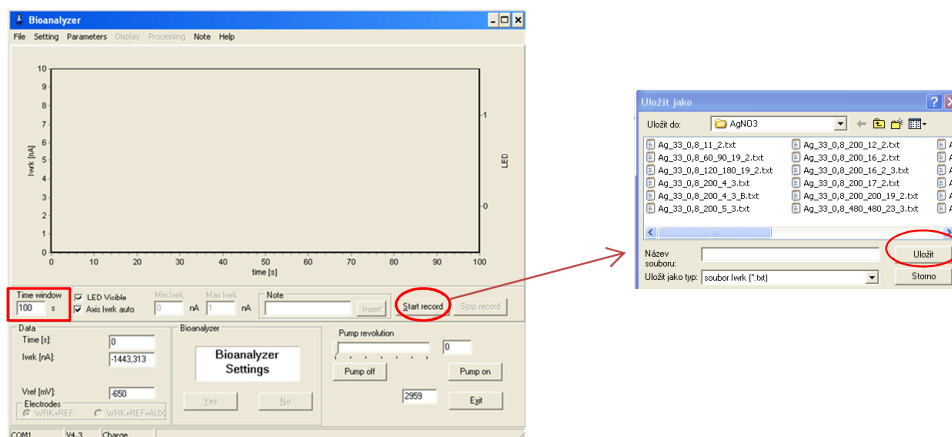
Po napsání textu do okna a kliknutí na ikonu Insert se spustí 5 sekundový odpočet pro provedení úkonu, který chceme v rámci měření přesně časově zaznamenat. Po skončení odpočtu provedeme úkon. Tento způsob vkládání poznámky může sloužit pro přesné zaznamenání spuštění světelného cyklu nebo pro napipetování vzorku k řasové suspenzi.

Vzduchovací soustava

Pro udržení konstantního složení atmosféry nad měřeným roztokem slouží akvarijní vzduchový strojek.

Start měření

Měření v programu Bioanalyzer se spustí kliknutím na Start record, objeví se okno, které nabízí místo uložení naměřených dat. Zvolí se složka pro uložení dat a kliknutím na Uložit se spustí měření. Pokud chceme na obrazovce vidět celý záznam, je vhodné si před spuštěním záznamu zvýšit hodnotu Time window např. na 10000s (obr. 3.30).



Obr. 3.30: Start měření

Jakmile dojde k ustálení koncentrace kyslíku (signál se drží na určité stálé hodnotě, cca po 1000 – 2000 s), tak se přes v programu Světlo spustí předdefinovaný světelný cyklus v záložce Automatic control pomocí Start. Tím se spustí záznam se střídáním intervalů světla a tmy.

Pro přesné zaznamenání startu světelného cyklu se v Bioanalyzeru do kolonky NOTE napíše START (= start světelného cyklu) a spustí se ikonkou INSERT. Pak následuje časový odpočet pro spuštění světelného cyklu, který se spustí v programu Světlo ikonou Start. Spuštění světelného cyklu bude zaznamenáno, jako poznámka, do naměřených dat. Například, aby start světelného cyklu začal při 1000 s měření, vložíme poznámku v 994 sekundě měření.

Následuje 5 sérií světelného cyklu pro měření kontroly (= čisté suspenze řas).

Přidání vzorku

Po uplynutí 5 cyklů pro kontrolu se konkrétním otvorem napipetuje vzorek. Opět je vhodné použít funkci Note s odpočtem pro přesné zaznamenání přidavku vzorku. Po přidání měříme 10 serií světelného cyklu produkci kyslíku.

Přidání standardu

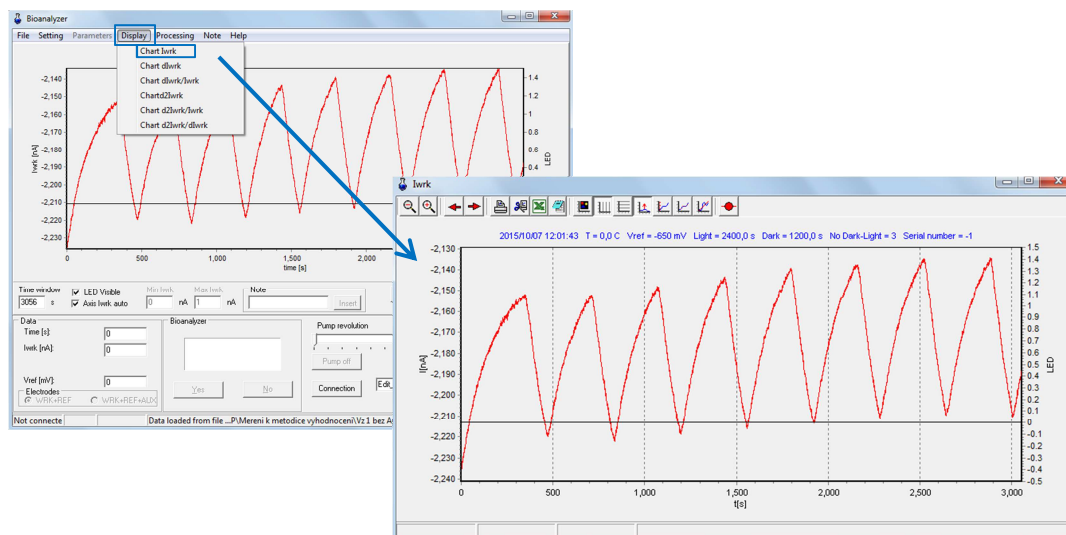
Po uplynutí 10 cyklů pro vzorek se konkrétním otvorem napipetuje standard (např. AgNO_3). Opět je vhodné použít funkci Note s odpočtem pro přesné zaznamenání přidavku standardu. Po přidání měříme 5 serií světelného cyklu produkci kyslíku.

Ukončení měření

Po uplynutí předdefinovaného světelného cyklu se Světlo automaticky ukončí díky $\text{CH1}=0$ na konci, ale ukončení měření v Bioanalyzeru je nutné ukončit manuálně ikonou Stop record.

Pokud není u předdefinovaného cyklu $\text{CH1}=0$ na konci, je nutné zastavit střídání světla a tmy v záložce Automatic control pomocí Stop. V záložce Manual control se zkontroluje, zda je LED vypnutá (OFF – červená barva pole).

Míchání řasové suspenze se ukončí v programu Motor driver kliknutím na ikonu Stop. Skleněná nádobka reakční cely se umyje a naplní destilovanou vodou, aby membrána elektrody nevysychala. Měření se vyhodnotí v programu **Makro Excel**, jehož funkce jsou popsány v následující kapitole.



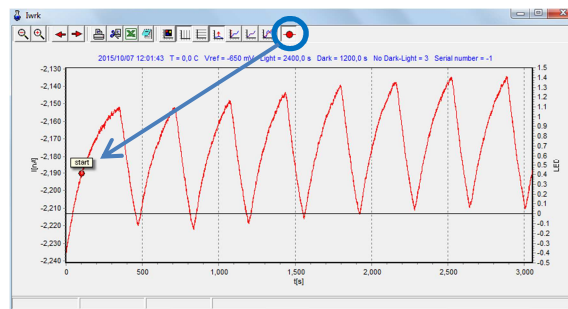
Obr. 3.31: Vizualizace celkového průběhu měření.

Výsledný graf měření

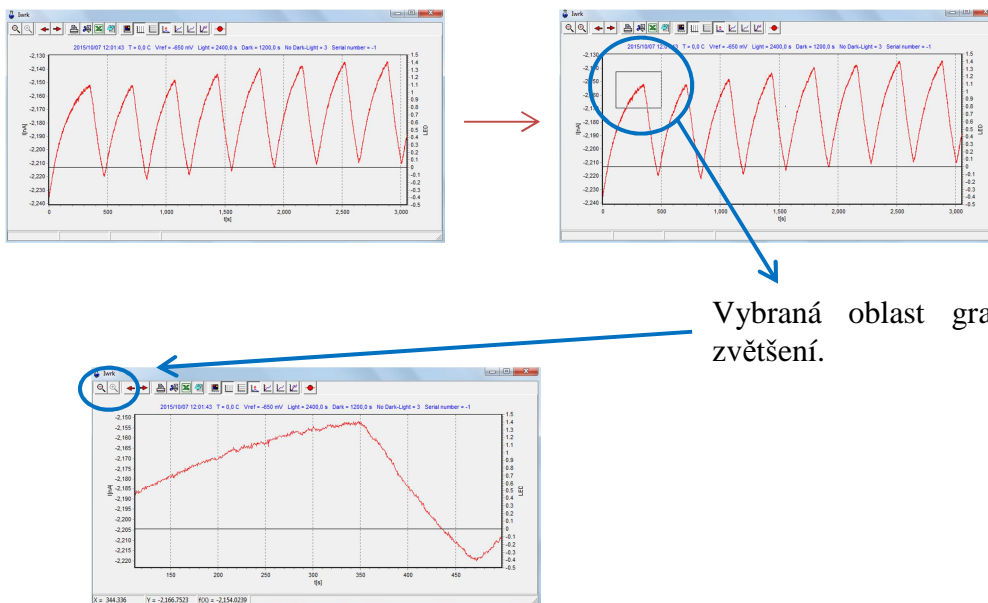
Po ukončení měření je možné vizuálně zhodnotit průběh měření, tzn. otevřít graf, který zobrazuje produkci kyslíku řasami.

Pro otevření finálního grafu se použije ikona v horní, hlavní nabídce - Display, a dále se rozklikne první nabízená funkce Chart Iwrk. Potom se zobrazí výsledný průběh měření (obr. 3.31).

Do zobrazeného výsledného grafu lze vložit poznámky, které byly v průběhu měření vytvořeny pomocí funkce Note. Pro jejich zobrazení stačí kliknout na ikonu s červenou tečkou (obr. 3.32). Nebo je možné si určitou oblast měření zvětšit/zmenšit pomocí funkce Zoom (obr. 3.33), kdy se přímo v grafu označí oblast křivky, která má být zvětšena/zmenšena a poté se klikne na ikony s lupou. Pomocí dalších ikon, lze výsledný graf okamžitě vytisknout, uložit nebo přeformátovat získaná data do programu Excel.



Obr. 3.32: Zobrazení vložené poznámky.



Vybraná oblast grafu pro zvětšení.

Obr. 3.33: Zvětšení/zmenšení oblasti grafu.

Postup měření

V případě vzorků životního prostředí, kdy se předpokládá, že toxicita nebude příliš vysoká, je nutné použít následující postup. Řasy se zcentrifugují (3000 ot/min, 5min – záleží na typu centrifugy) a supernatant se slije. Do reakční nádoby se dá 5ml ½ SŠ média a přidá se takové množství zakoncentrovaných řas, aby buněčná hustota v nádobce byla v rozsahu 700 000 b/ml – 1500000 b/ml. Suspenze se nechá cca 15 min. promíchávat a temperovat na nastavenou teplotu a poté se spustí měření stejným způsobem, jako byl popsán výše. V době nástřiku (tj. po uplynutí 5 cyklů) se obsah nádoby vylije a opláchne destilovanou vodou. Do prázdné nádoby se napipetuje 5ml vzorku spolu s řasami a nechá se běžet 2 cykly, aby se vzorek vytemperoval na nastavenou teplotu. Po ukončení měření se postupuje stejným způsobem, jako je popsáno výše.

Postup měření vzorků životního prostředí:

- napipetování suspenze řas do reakční nádoby (3 – 5 ml);
- uzavření nádoby;
- kontrola bublin a zapnutí míchadla;
- vložení reakční nádoby ze stojanu do minitermostatu;
- 15 min - míchání a temperace řasové suspenze na požadovanou teplotu
- **start měření** bioanalyzerem, oxymetrem nebo potenciostatem;
- po ustálení koncentrace O₂ (cca 1000 - 2000 s) spuštění světelného cyklu;
- měření čisté suspenze řas – 5 světelných cyklů
- vyjmutí reakční nádoby z minitermostatu a její vložení do stojanu;
- oddělení plastové části od skleněné reakční nádoby;
- vylití kontroly, vypláchnutí a vysušení reakční nádoby;
- opláchnutí míchadla a kyslíkové elektrody + vysušení;
- našroubování reakční skleněné nádoby zpět;
- napipetování vzorku (3 – 5 ml);
- kontrola bublin, zapnutí míchadla;
- vložení do minitermostatu;
- 15 min - míchání a temperace řasové suspenze na požadovanou teplotu;
- pokračování od bodu **start měření**, kdy vzorek se měří po dobu 10 cyklů a standard 5 cyklů;
- konec měření (automatické vypnutí Světla, zastavení měření bioanalyzeru);

Postup měření chemických látek:

- napipetování suspenze řas do reakční nádoby (3 – 5 ml);
- uzavření nádoby;
- kontrola bublin a zapnutí míchadla;
- vložení reakční nádoby ze stojanu do minitermostatu;
- 15 min míchání a temperace řasové suspenze na požadovanou teplotu
- **start měření** bioanalyzerem, oxymetrem nebo potenciostatem;
- po ustálení koncentrace O₂ (cca 1000 - 2000 s) spuštění světelného cyklu;
- měření - 5 cyklů bez chemické látky, 10 cyklů měření s přidanou chemickou látkou, dalších 5 cyklů měření se standardem;
- konec měření (automatické vypnutí Světla, zastavení měření bioanalyzeru);

- vyjmutí reakční nádoby z minitermostatu a její vložení do stojanu;
- uvolnění skleněné reakční nádoby;
- vylití vzorku, vypláchnutí a vysušení reakční nádoby;
- opláchnutí míchadla a kyslíkové elektrody + vysušení;
- našroubování reakční skleněné nádoby zpět;
- zalití kyslíkové elektrody destilovanou vodou.

Po ukončení měření se skleněná reakční nádoba, míchadlo a kyslíková elektroda opláchnou a vysuší. Pro ochranu membrány před vyschnutím, se kyslíková elektroda nechá ponořená v destilované vodě.

3.4 Postup měření - pokročilý uživatel

Pokročilý uživatel může zařízení využívat v širších aplikacích, než je dáno v základním nastavení. V další části je popsáno nastavení jednotlivých bloků přístroje.

Reakční nádoba a příprava měření

Nastavení teploty – AlgaTox

Po zapnutí přístroje AlgaTox tlačítkem $\frac{ON}{OFF}$ se na displeji objeví:

Ready, $T_w = T_b$ a $T_r = \pm 33,0$, kde:

- T_w – pracovní teplota
- T_b – teplota bloku
- T_r – regulační teplota

Zkušený uživatel může využít dalších možností termostatu přístroje AlgaTox. Tlačítkem Sel (Select) může zvolit místo jehož teplota bude vzata jako pracovní T_w a vzhledem k níž budou pracovat regulační algoritmy.

Stiskem Sel se kurzor posune za T_b . Tlačítkem T_t lze volit z následujících možností:

- T_b – teplota bloku (Temperature of block)
- T_u – teplota horní strany Peltiéřova článku (Temperature upper)
- T_l – teplota spodní strany Peltiéřova článku (Temperature lower)
- T_e – teplota měřená externím teploměrem (Temperature external)
- T_r – regulační teplota (Temperature control)

V základním nastavení ($T_w = T_b$) je regulována teplota bloku na zadanou hodnotu. Při nastavení ($T_w = T_u$) je teplota regulována vzhledem k teplotě horní strany Peltierova článku. Při nastavení ($T_w = T_l$) je teplota regulována vzhledem ke spodní straně Peltierova článku. Při nastavení ($T_w = T_e$) je teplota regulována vzhledem k externímu teploměru, který je umístěn v temperovaném roztoku. Jako externí teploměr lze použít teploměr Ni 5000 (nominální odpor 5 k Ω) nebo Pt 1000 (nominální odpor 1 k Ω). Přístroj AlgaTox teploměry rozeznává automaticky.

Při nastavování místa regulace teploty je tlačítko T- neaktivní.

Dalším stisknutím tlačítka Sel se kurzor přesouvá do polohy nastavení požadované teploty. Na první polohu nastavení znaménka teploty. Znaménko lze měnit stiskem tlačítka T+. Tlačítko T- přesouvá cyklicky kurzor na další pozici. V každé pozici se nastaví číselná hodnota tlačítkem T+. Dalším stiskem tlačítka Sel je ukončen výběr místa regulace teploty na níž se má regulovat.

Tlačítkem Set se nastavení hodnoty přeneso do mikroprocesoru.

Tlačítkem Disp se ovládá zobrazování teplot. Standardně se zobrazuje ve vypnutém stavu (obr. 3.34)

Ready $T_w = T_b$ $T_r = +33.0$

Obr. 3.34: Vypnutý stav.

Stav přístroje (ready) místo regulace ($T_w = T_b$) a požadovaná teplota ($T_r = +27\text{ °C}$). Tlačítko Disp je neaktivní.

Temperace se spouští tlačítkem $\frac{START}{STOP}$. Po stisknutí tlačítka $\frac{START}{STOP}$ se objeví na display zpráva,

Control $T_r = +27.0$
$T_w = +27.1$

kde funkci termostatu indikuje Control a je zobrazována aktuální hodnota teploty v pracovním bodě $T_w = 27.1$ a požadovaná teplota $T_r = 27.0$. Tlačítkem Disp je možno zobrazit teploty v ostatních měřených bodech (obr. 3.35),

B: 27,9 E: 92,7
U: 53,8 L: 14,4

Obr. 3.35: Teploty v ostatních měřených bodech.

kde B je teplota chlazeného bloku, U je teplota horní strany Peltierova článku, L je teplota dolní strany Peltierova článku a E je teplota měřená externím teploměrem. Pokud není externí teploměr připojen je zobrazená teplota 90 – 100. Ostatní tlačítka jsou neaktivní.

Kontrola teploty je ukončena stiskem tlačítka $\frac{START}{STOP}$.

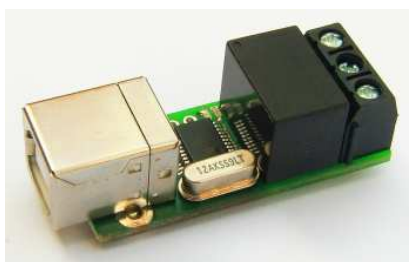
Přístroj AlgaTox je vypnut tlačítkem $\frac{ON}{OFF}$.

Míhadlo – program DRIVER

Na počítači se otevře složka DRIVER 3.0 a klikne se na ikonu MDrive.exe. Objeví se okno Motor driver, kde se klikne na Get a poté na Apply. V ikoně Selected se nastaví požadované otáčky – optimální 450 rpm. Kliknutí na Apply se potvrdí. Ikonou START se míchání spustí. Pro změnu otáček se míchání ikonou STOP zastaví, změní se otáčky a ikonou START se míchání zase spustí.

Řízení světla – program Světlo

Řízení osvětlení suspenze řas je prováděno vysoce svítivou LED s maximálním výkonem při vlnové délce 680 nm. Napájení LED je spuštěno multifunkčním relé s USB rozhraním PUSBIO1R (obr. 3.36).



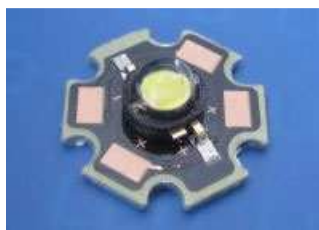
Obr. 3.36: Modul PUSBIO1R

Technické parametry LED H2W5-680 (obr. 3.38)

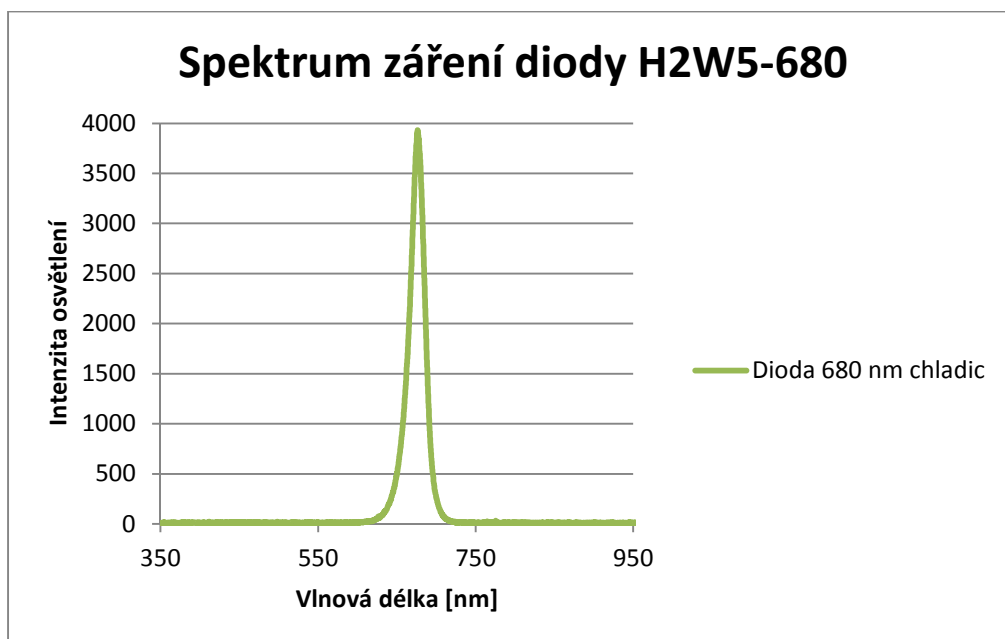
- optical power: 550 mW at 2 A
- beam angle: +/-75°, lambertian high dome lens
- compatible with many collimating optics
- chip size 2 x 2mm
- 20mm diameter aluminium groundplate

Tab. 3.5: Elektrické a optické charakteristiky LED (t=25°C).

<i>Parameter</i>	<i>Symbol</i>	<i>Conditions</i>	<i>Min</i>	<i>Typ</i>	<i>Max</i>	<i>Unit</i>
Forward voltage	V_F	$I_F = 100 \text{ mA}$		1,75	2,10	V
Reverse current	I_R	$V_R = 3 \text{ V}$			100	μA
Radiant intensity	I_e	$I_F = 100 \text{ mA}$		3,0		mW/sr
Special bandwidth at 50%	$\Delta\lambda_{0,5}$	$I_F = 100 \text{ mA}$		22		nm
Switching time	t_r, t_f	$I_F = 100 \text{ mA}$		35		ns
Peak wavelength	λ_p	$I_F = 100 \text{ mA}$		680		nm



Obr. 3.37: LED dioda.



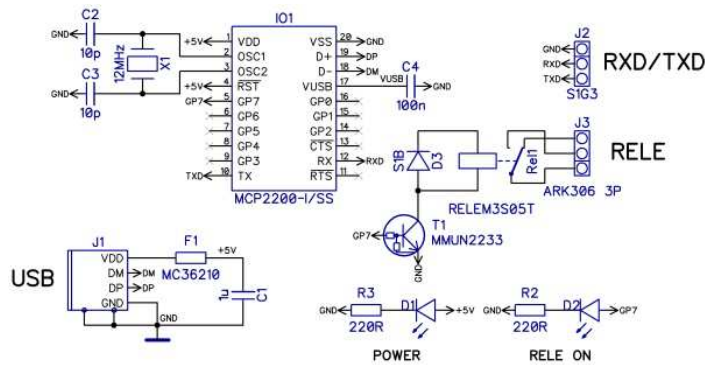
Obr. 3.38: Graf znázorňující spektrum záření diody H2W5-680.

Technická specifikace PUSBIO1R

Relé s přepínacím kontaktem 3A/125V. Izolační pevnost vstupů do 3.000 VRMS s CMR 10kV/ μ s (typ). Vstup podporuje, jak logické úrovně, analogové napětí i mechanický/elektrický kontakt (vyvedeno napájecí napětí +5V). Řízení a monitorování z USB portu s konektorem typu USB B. Možnost automatická reakce výstupu na změnu stavu vstupu. Podpora počítání změn na vstupu. Rozsah pracovních teplot od -20 do +70 °C. Napájení přímo z USB portu PC. Ovládaní programem PUSBIO Control Software pro Windows.

Modul PUSBIO1R

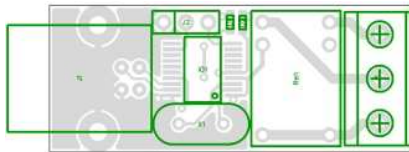
Modul PUSBIO1R obsahuje jedno výkonové relé s přepínacím kontaktem. Na desce je vyveden integrovaný sériový port – UART (TxD, RxD a GND), modul může být tedy použit rovněž jako převodník z USB na sériový port.



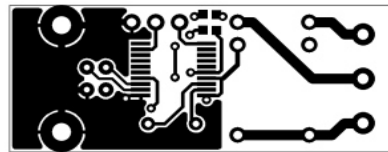
Obr. 3.39: Schéma zapojení modulu PUSBIO1R.

Základem modulu je obvod MCP2200. Obvod je řízen krystalem Qi 12 MHz, ze kterého si uvnitř svého pouzdra vytváří 48 MHz pro řízení USB (1.1, 2.0, 3.0 komp.) portu. Výstup (pin GP7) je přes digitální tranzistor T1 veden na výkonové relé Rel1 s přepínacím kontaktem. Indikační diody LED D1 a D2 zajišťují informaci o provozu modulu a stavu (sepnutí) relé. Vratná pojistka F1 (300 mA) zajišťuje ochranu USB portu před případným zkratem či přetížením.

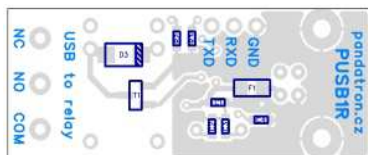
Schéma a rozmístění součástek je na obr. 3.40 – 3.43.



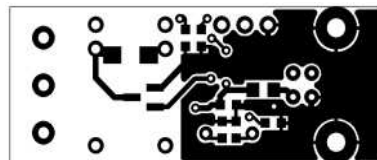
Obr. 3.40: Rozmístění součástek (TOP)



Obr. 3.41: Motiv desky s plošnými spoji (TOP)



Obr. 3.42: Rozmístění součástek (BOT)



Obr. 3.43: Motiv desky s plošnými spoji (BOT)

Kromě konektorů, krystalu a výkonového relé jsou všechny součástky v provedení SMD ve standardní velikosti 0603.

PUSBIO – Control Software

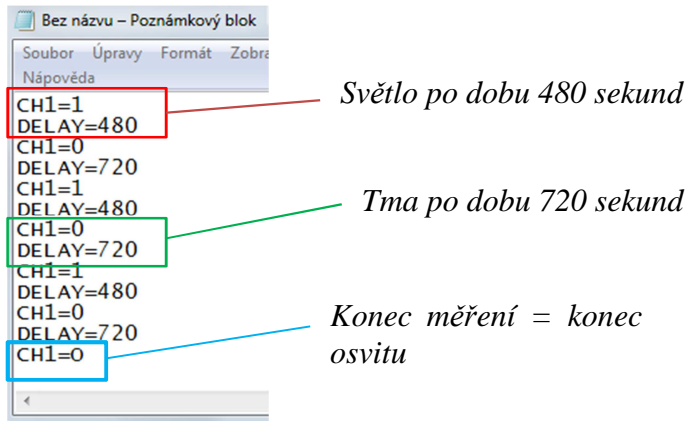
PUSBIO – Control Software (dále jen Control Software) je speciálně navrženým programem pro ovládání modulu řady PUSBIO1R.

Tento panel je využit pro programovatelné řízení LED. Program je načítán z externího textového souboru, umožňujícího snadnou modifikaci. Program se edituje v textovém editoru wordpad.

Vytvoření jednoho světelného cyklu se skládá z pokynů pro světlo/tmu spolu s délkou trvání.

$CHI = 1$ (světlo)
 $DELAY = \dots [bod]$ (námi zvolená délka trvání světla)
 $CHI = 0$ (tma)
 $DELAY = \dots [bod]$ (námi zvolená délka trvání tmy)

Jeden bod je roven jedné sekundě. Pokyny pro světlo a tmu se v tomto pořadí opakují podle požadované délky cyklu. Aby se celý světelný cyklus bez problému ukončil, je důležité vložit na konec světelného cyklu pokyn $CHI = 0$ (bez $DELAY$). Pokud není u předdefinovaného cyklu $CHI=0$ na konci, je nutné zastavit střídání světla a tmy v záložce Automatic control pomocí Stop. Zvolený světelný cyklus může vypadat následovně (vytvořený v textovém programu Poznámkový blok):

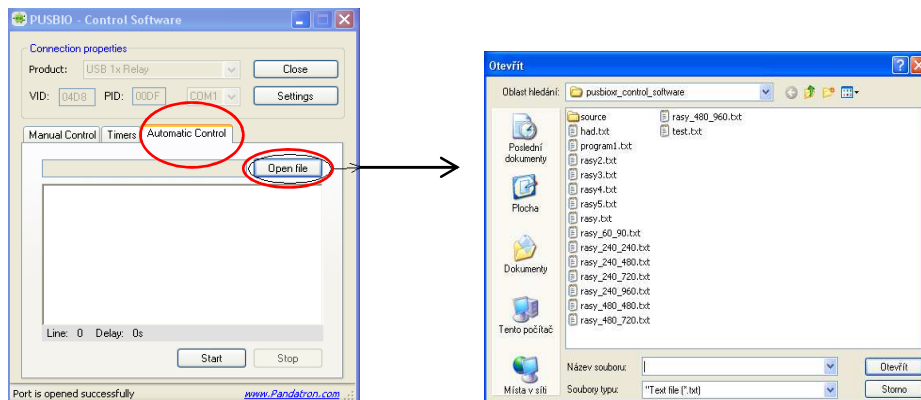


$CHI=1$
 $DELAY=480$
 $CHI=0$
 $DELAY=720$

} jeden cyklus

Délka jednoho cyklu = $480 + 720 = 1200$ bodů = 1200 s = 20 minut

Zvolena 3 opakování = 3 cykly.....délka měření = 60 minut

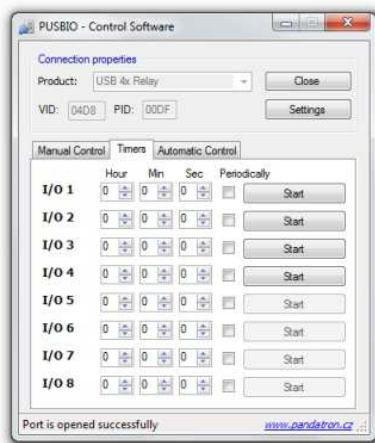


Obr. 3.44: Načtení vytvořeného světelného cyklu.

Nově vytvořený, uložený světelný cyklus se načte do programu Světlo přes záložku Automatic Control a ikonu Open file, ve které se otevře nově nadefinovaný světelný cyklus (obr. 3.44).

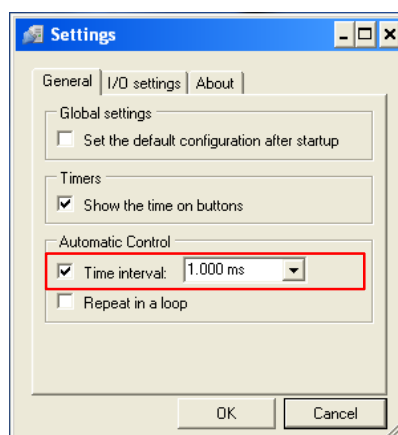
Řízení funkce pomocí interních časovačů

Panel – Timers slouží k časovému řízení výstupního relé. Pro relé je možné nastavit interval sepnutí/rozepnutí v rozsahu od 1s až 99s. je možné nastavit periodické spínání. Tímto způsobem lze nastavit rychle bez programování periodické osvětlování se stejnou délkou světla a tmy, bez potřeby vytvoření programu (obr. 3.45).



Obr. 3.45: Panel Timers aplikace Control Software.

Při programování a použití modulu je nutno kontrolovat základní jednotku časování. V aplikaci přístroje AlgaTox je 1000 ms (v případě 100 ms všechny děje budou probíhat 10 x rychleji) (obr. 3.46).

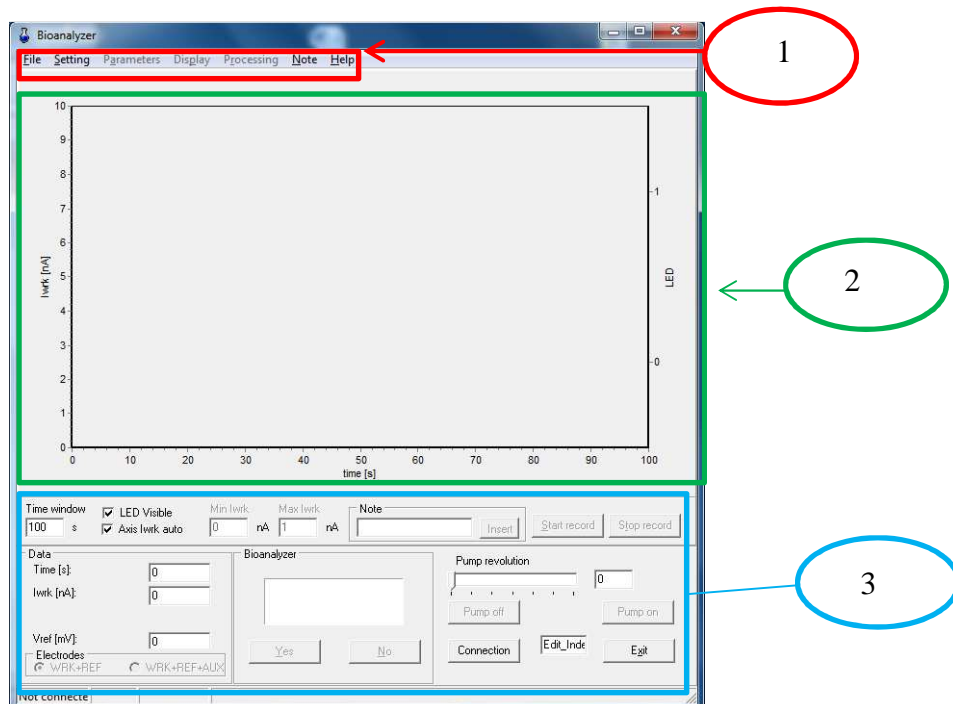


Obr. 3.46: Nastavení jednotky časování.

Nastavení měření – Bioanalyzér

Koncentrace kyslíku je měřena amperometricky Clarkovým čidlem. K měření slouží potenciostat Bioanalyzer nebo jiný vhodný potenciostat. Program potenciostatu je univerzální a umožňuje měření nejen se senzorem kyslíku, ale i s dalšími elektrochemickými senzory. Funkce nutné pro měření jinými senzory nebudou v této části popsány. Popis se soustředí pouze na funkce nutné pro měření s přístrojem ALgatox.

Po spuštění programu se objeví jeho základní menu (obr. 3.47).



Obr. 3.47: Základní menu potenciostatu Bioanalyzer.

Obsahuje lištu základních funkcí (1), oblast v níž se zobrazují naměřené hodnoty (2) a oblast pro nastavení parametrů měření (3).

Lišta základních funkcí

- **File** - rozbalovací menu umožňuje otevřít a nahrát soubory s naměřenými hodnotami.
- **Settings** - není využíváno pro ALgaTox.
- **Parameters** - rozbalovací menu Parametry obsahuje parametry měření.
- **Display** – umožňuje různé možnosti zobrazení výsledků.
- **Processing** - speciální metody pro elektrochemická měření se senzory. Nejsou potřeba pro měření kyslíku s přístrojem ALgaTox.
- **Note** - vložení poznámky do záznamu experimentálních dat nebo do zobrazení naměřených dat.
- **Help** - není implementován

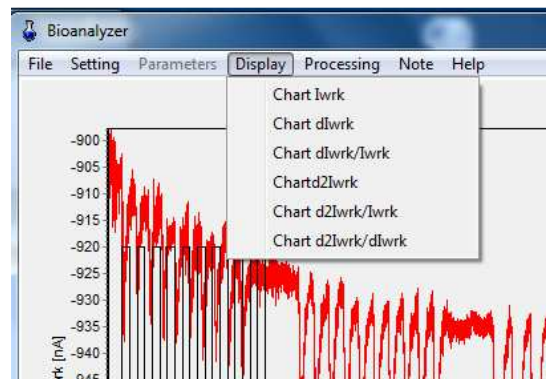
Detailní popis použitých funkcí pro přístroj ALgaTox

Parameters

Parameters rozbalovací menu umožňuje nastavit vzorkovací frekvenci a polarizační napětí elektrody. Pro měření kyslíku se nastavuje polarizační napětí = 650 mV. Základní vzorkovací frekvence je jeden měřený vzorek za 1 s.

Display

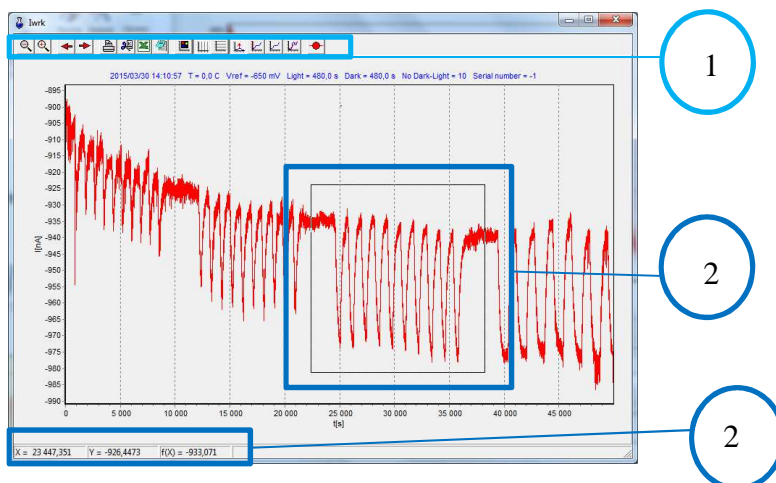
Rozbalovací menu Display má 6 funkcí (obr. 3.48). Pro měření s přístrojem AlgaTox mají význam první 2 metody zobrazení. První je naměřený proud a druhá položka je derivace proudu podle času.



Obr. 3.48: Základní menu potenciostatu Bioanalyzer.

Základní zobrazení výsledků Iwrk je na obr. 3.49. Struktura okna a význam všech ikon jsou stejné i pro další okna.

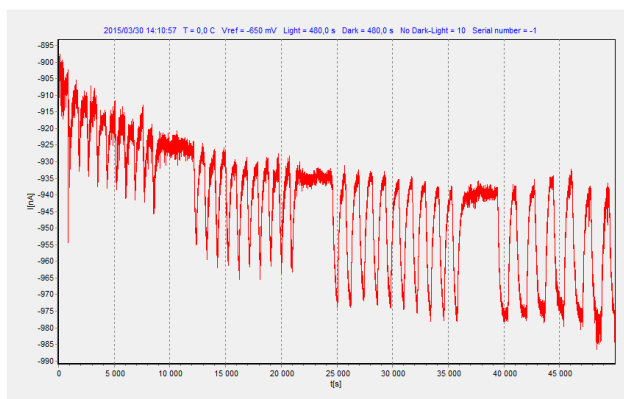
- 1) Ikony funkcí pomocí, kterých lze ovládat zobrazování a provádět úpravy naměřených hodnot.
 - 2) Myší lze vybrat část zobrazených dat, která lze zvětšit nebo zmenšit.
 - 3) Ve stavovém řádku je možno kontrolovat polohu kurzoru a naměřenou hodnotu.
- V případě výpočtu zde jsou zobrazeny výsledky.



Obr. 3.49: Základní menu potenciostatu Bioanalyzer.

Ikony v oblasti 1 mají následující význam (popis z leva doprava):

- Návrat o jednu úroveň zvětšování (zoom) zpět
- Oblast grafu vybraná myší se zobrazí na celou obrazovku
- Zobrazená oblast se posune o rozsah osy x doleva. (pokud je to možné)
- Zobrazená oblast se posune o rozsah osy x doprava. (pokud je to možné)
- Aktuální naměřená data se vytisknou
- Aktuální naměřená data se vloží do schránky a je možno je vložit do textového souboru viz příklad obr. 3.50.



Obr. 3.50: Vložení dat z aktuálního okna vyhodnocení (viz obr. 3.49) do textového souboru.

- Aktuálně zobrazená data se vloží do Excelu (obr. 3.51). V prvním řádku je popis měření, z něhož byla data exportována. V druhém řádku je definice jednotlivých sloupců exportovaných dat. Od třetího řádku jsou postupně zapsány naměřené hodnoty. Poznámka uložená v grafu je uložena ve sloupci D (obr. 3.52).

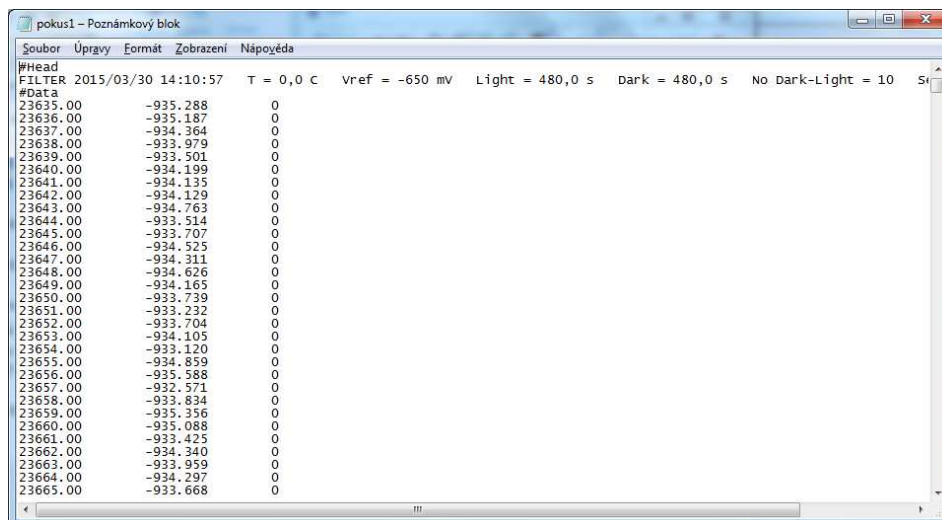
time[s]	Iwrk[nA]	Light	Note
0	-901,784	0	
1	-901,715	0	
2	-902,895	0	
3	-903,641	0	
4	-902,547	0	
5	-902,207	0	
6	-903,782	0	
7	-901,093	0	
8	-900,849	0	
9	-898,805	0	
10	-900,368	0	
11	-901,607	0	
12	-902,01	0	
13	-898,68	0	
14	-898,419	0	
15	-900,132	0	
16	-900,336	0	
17	-899,894	0	
18	-902,864	0	
19	-900,031	0	

Obr. 3.51: Vložení dat z aktuálního okna vyhodnocení (viz obr. 3.49) do textového souboru.

7604	7601	-920,37	0						
7605	7602	-919,795	0						
7606	7603	-921,227	1	start svetlo					
7607	7604	-920,973	1						
7608	7605	-920,125	1						

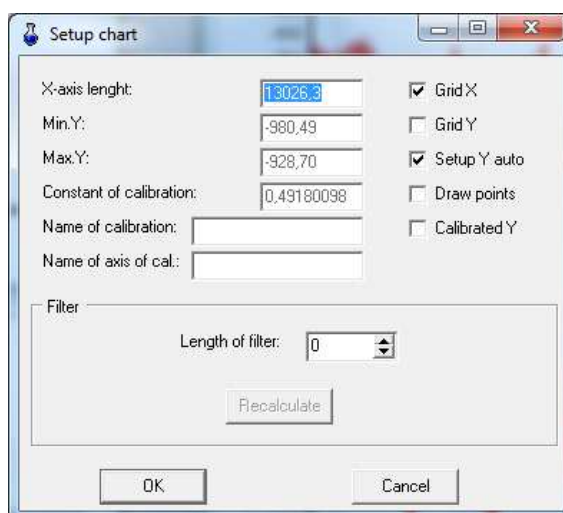
Obr. 3.52: Vložení poznámky.

- Aktuální zobrazená data se vloží do textového souboru. Tvar dat v textovém souboru je v obrázku 3.53.



Obr. 3.53: Struktura aktuálních dat vložených do Excelu.

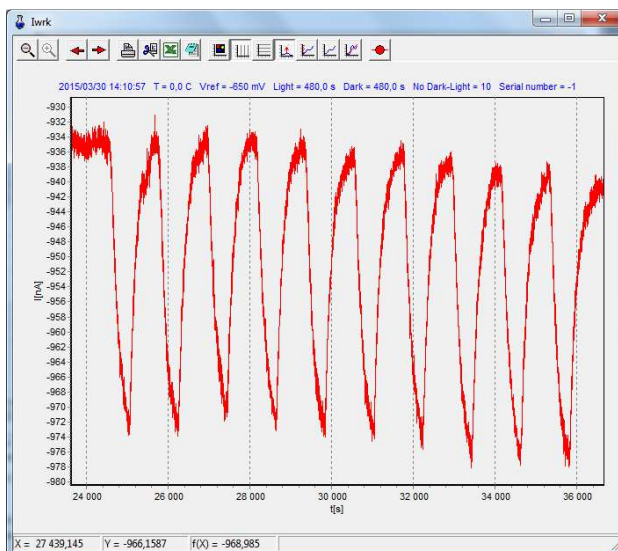
- Další položka je nastavení grafu a možnosti filtrace signálu. Po stisku ikony se objeví okno nastavení grafu (obr. 3.54). Je možno nastavit automatické nebo pevné nastavení os, nastavit na osách mřížky, definovat popisy os a provést kalibraci osy y. Dále je možno signál filtrovat. Je implementován lineární filtr s počtem 1 – 100 bodů.



Obr. 3.54: Okno nastavení grafu.

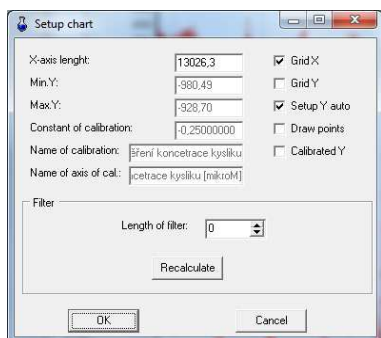
Příklady:

Měření proudu (v hlavičce je popis měření).

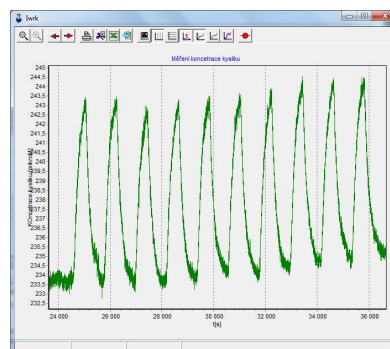


Obr. 3.55: Zobrazení výseku naměřených hodnot.

Jsou-li zadány parametry kalibrace dle obr. 3.56, změní se záznam na výsledek na obr. 3.57. Osa je kalibrována.



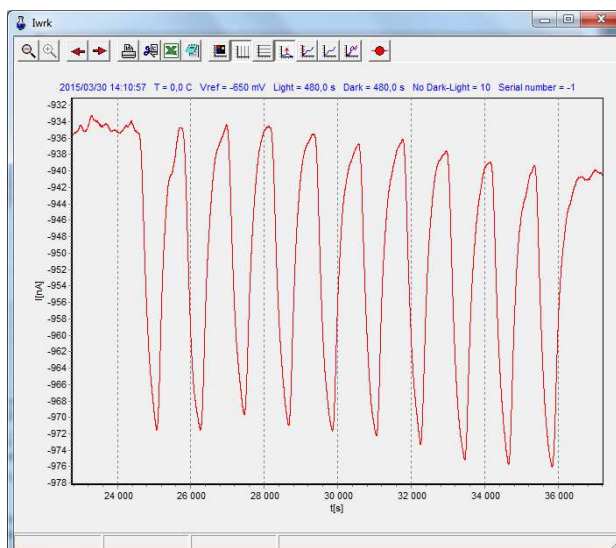
Obr. 3.56: Parametry kalibrace



Obr. 3.57: Výsledek měření po jeho kalibraci

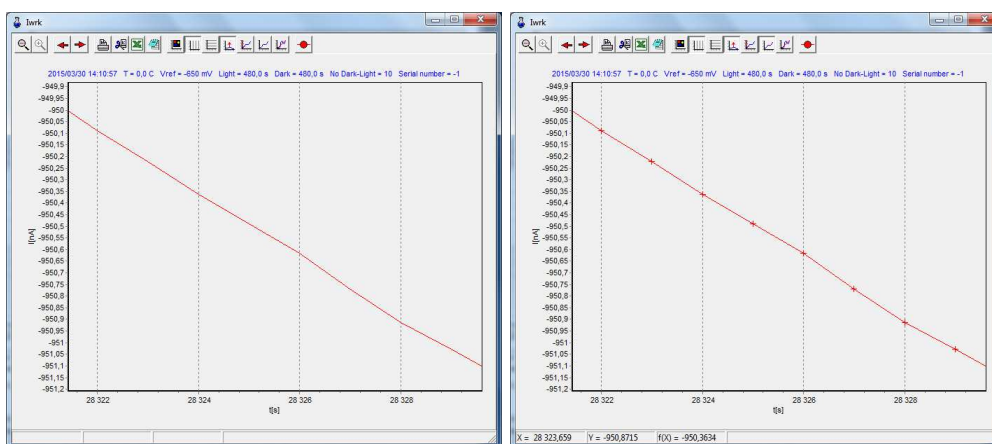
- **Filtrace**

Naměřená data jsou na obr. 3.55. Pokud se nastaví filtr o šířce 50 bodů, odstraní se šum. Filtrované měření je na obr. 3.58.



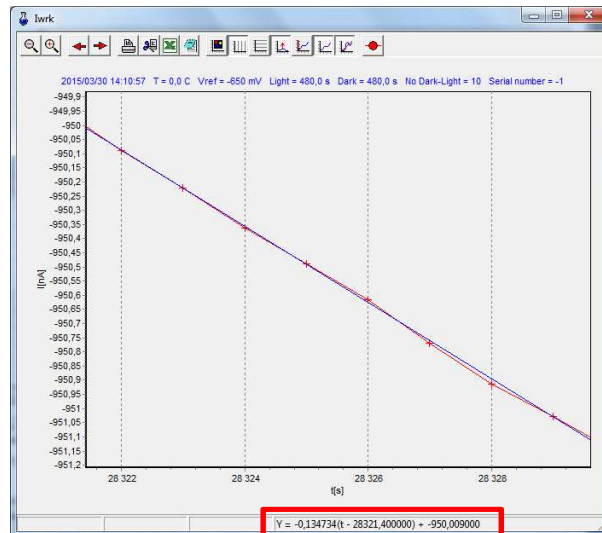
Obr. 3.58: Výsledek měření po jeho filtraci – lineární filtr – 50 bodů.

- Přepínání zobrazení vertikální mřížky.
- Přepínání horizontální mřížky.
- Aktivace automatického rozsahu na ose Y.
- Přepínání mezi měřením proudu a kalibrovaným signálem.
- Aktivace zobrazení jednotlivých měřených bodů.



Obr. 3.59: Naměřená data bez zobrazení naměřených bodů (vlevo) a se zobrazením naměřených bodů (vpravo).

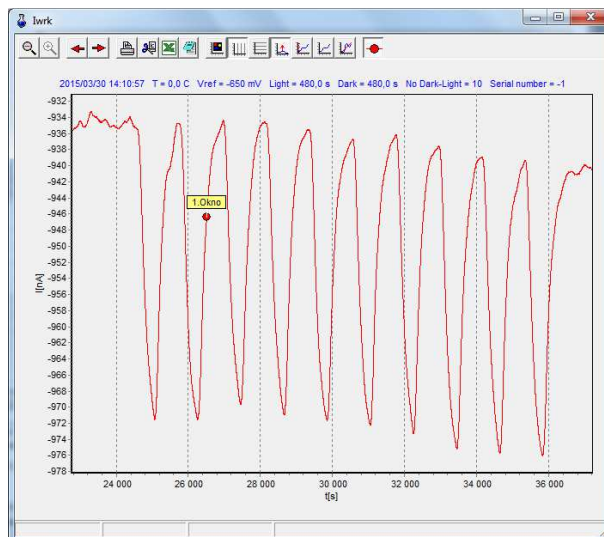
- **Proložení naměřených hodnot přímkou**
Proložení naměřených hodnot v aktuálním okně lineární závislosti metodou nejmenších čtverců (numerické vyjádření výsledků je ve stavovém řádku) (obr. 3.60).



Obr. 3.60: Proložení naměřených dat přímkou.

- **Zobrazení poznámek**

Význam funkce zobrazení poznámek je na obr. 3.61.

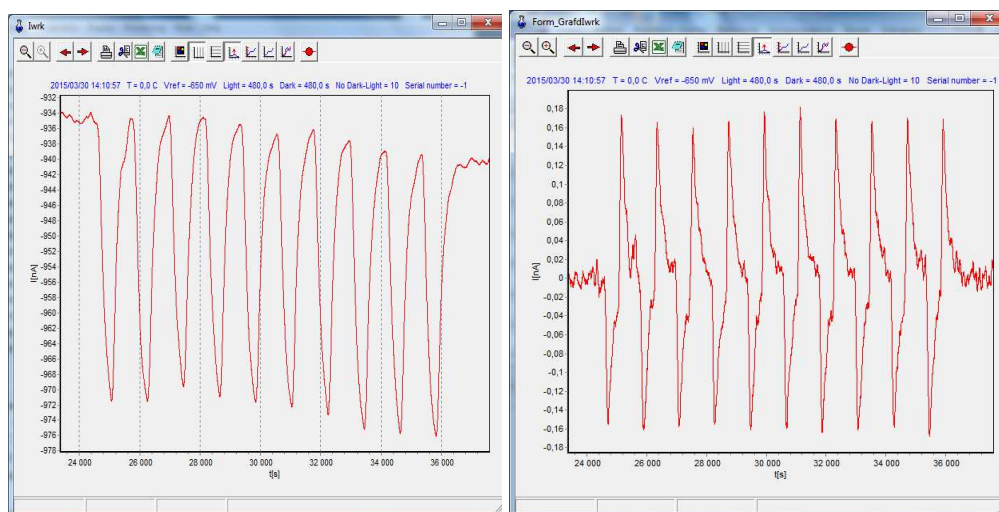


Obr. 3.61: Funkce ikony zobrazení poznámek.

V okně **dIwrk** je zobrazena derivace. Okna jsou propojena a proto se zobrazuje stejné měřítko (obr. 3.62).

Vzduchovací soustava

Při dlouhodobém měření, například přes noc, je vhodné upravit provzdušňování řasové suspenze. Upravení se provede tak, že se pomocí kohoutu sníží průtok plynu do reakční nádoby.



Obr. 3.62: Obrázek vlevo - naměřený signál, obrázek vpravo derivace naměřeného signálu.

Výměna membrány a kalibrace kyslíkové elektrody

Kyslíkovou elektrodu tvoří platinová elektroda, která je zatavená ve skle a stříbrná referenční elektroda. Elektroda je vložena v nádobce s membránou, naplněné do 2/3 roztokem 1M KCl. Pro správnou funkci elektrody je nutné, aby membrána přiléhala k elektrodě. Při výměně membrány se nádobka naplněná 1M KCl našroubuje na elektrodu. Šroubuje se, dokud se neustálí signál. To se sleduje spuštěním záznamu v programu Bioanalyzátor. Musí se dát pozor, aby nedošlo k protržení membrány.

Zařízení lze kalibrovat vzhledem k rovnovážné koncentraci O_2 v destilované vodě s kontrolou zbytkového proudu oxidací siřičitanu. Tato kalibrace závisí na atmosférickém tlaku a teplotě. Pro přesná měření lze systém kalibrovat rozkladem H_2O_2 peroxidázou nebo přidávkem O_2 vytvořeným chemickou reakcí.

Na kalibraci se připraví roztok siřičitanu sodného rozpuštěním 1g této chemikálie v 5ml destilované vody. Do skleněné reakční nádoby přístroje se napipetuje 5 ml destilované vody. Spustí se míchání a v programu Bioanalyzátor se spustí měření. Po ustálení se do nádoby přidá 200 μ l připraveného roztoku siřičitanu sodného. Po 30 – 60 s se přidá druhý přídavek 200 μ l siřičitanu sodného a po dalších 30 – 60 s třetí přídavek. Signál by se měl ustálit na hodnotě okolo 0 nA.

3.5 Vyhodnocení výsledků

Vyhodnocení naměřených hodnot je zpracováno v programu Excel. Program je vytvořen jako šablona, do níž se naměřená data vloží. Program pracuje s velkými objemy dat. Proto vyžaduje vhodnou konfiguraci PC.

3.5.1 Obecné vlastnosti

a) Pořadí listů určuje postup vyhodnocení. Celý proces vyhodnocení je rozdělen do 12 listů.

List	Charakteristika
Výchozí data	Vložení výchozích naměřených dat.
Graf - data	Automaticky vytvořený graf z výchozích dat.
Parametry vyhodnocení	Zadání parametrů a časování experimentu do editovatelných tabulek, tabulka se synchronizovaným časováním experimentu.
Synchronizace	Synchronizace naměřených dat s osvitem pro kontrolu.
Synchronizace 1	Synchronizace naměřených dat s osvitem pro vzorek.
Synchronizace 2	Synchronizace naměřených dat s osvitem pro standard.
Kalibrace	Kalibrace proudu na koncentraci kyslíku.
Vyhodnocení	Vyhodnocení produkce kyslíku pro kontrolu.
Vyhodnocení 1	Vyhodnocení produkce kyslíku pro vzorek.
Vyhodnocení 2	Vyhodnocení produkce kyslíku pro standard.
Produkce O₂ celková	Výsledný graf celkové produkce kyslíku.
Produkce O₂ na buňku	Výsledný graf produkce kyslíku přepočítané na jednu buňku.

b) Barevné rozlišení buněk.

Zelené buňky – editovatelné.

Žluté buňky – výsledky a mezivýsledky.

Červené buňky – editovatelné buňky, které se po správném vyplnění změní na zelené.

c) Grafy. Grafy mají předdefinované osy. Může se stát, že graf nic nezobrazuje → nutno změnit formát osy.

d) Uživatelská úprava programu. Pokud se nastaví parametry měření a rozsahy grafů pro dané měření, které se bude opakovat, je možno nastavení uložit jako šablonu. Vyhodnocení potom proběhne automaticky.

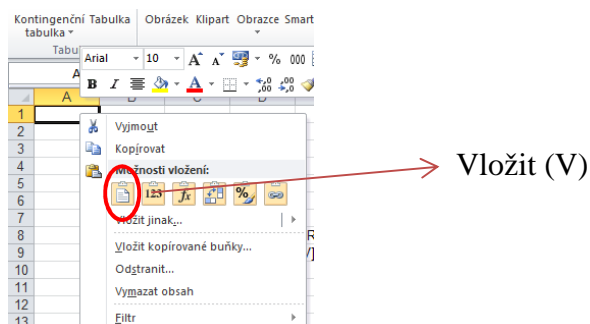
e) Jednotlivé fáze měření. Program pracuje se třemi skupinami dat - kontrola, vzorek a standard. Každá skupina je nezávisle vyhodnocena. V případě, že není použit standard, nebere se jemu odpovídající list v úvahu. Kontrole, tj. čistým řasám odpovídají listy **Synchronizace** a **Vyhodnocení**. Vzorku, tj. neznámé látce přidané k čistým řasám odpovídají listy **Synchronizace 1** a **Vyhodnocení 1**. Standardu, tj. látce o známém účinku na řasy náleží listy **Synchronizace 2** a **Vyhodnocení 2**.

3.5.2 Postup vyhodnocení

3.5.2.1 Vložení dat

- Vymazat předešlá data v listu **Výchozí data**.
- Výchozí data otevřít z textového souboru v novém souboru Excel.

- Zobrazení Průvodce importem textu – 2 x Další, poté Upřesnit a změnit Oddělovač desetinných míst z čárky na tečku, nakonec Dokončit.
- Nakopírovat (Ctrl + c) výchozí data a vložit (Ctrl + v) do buňky A1 v šabloně přes funkci Vložit (V) (obr. 3.63)



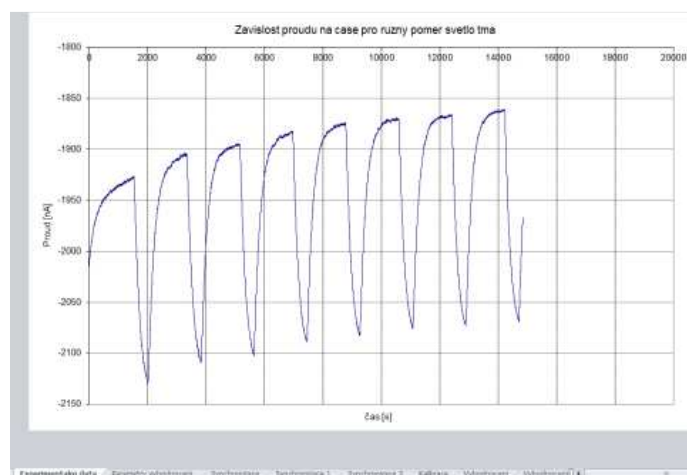
Obr. 3.63: Použitá funkce pro vložení naměřených hodnot.

3.5.2.2 Kontrola naměřených údajů

Po vložení výchozích dat je v listu **Graf – data** možná kontrola průběhu měření podle automaticky upraveného grafu, který graficky znázorňuje nově vložená data.

3.5.2.3 List Výchozí data

List **Výchozí data** obsahuje data získaná z měření, která budou vyhodnocena. Před vložení nových dat se nejprve musí vymazat data předešlá (viz 3.5.2.1 Vložení dat). Pro správnou funkci automatických přepočtů je důležité, aby na konci výchozích dat byla smazána buňka RESULT spolu s dalšími poznámkami. Jestliže tam zůstane text, osa x u Graf – data nebude v čase [s], ale v čase [bodech], a to by potom způsobilo chyby v dalších výpočtech.



Obr. 3.64: Graf – data.

3.5.2.1 List Graf - data

List **Graf - data** obsahuje graf naměřených hodnot, který se automaticky aktualizuje v závislosti na vložených výchozích datech (obr. 3.64). Podle potřeby se upraví měřítko osy x a y tak, aby byl graf dobře rozvržen. Po kontrole zaktualizovaného grafu se přejde na následující list **Parametry vyhodnocení**.

3.5.2.2 List Parametry vyhodnocení

V listu **Parametry vyhodnocení** se nachází 5 tabulek, kde u tabulek A a B se upraví parametry měření podle jeho aktuálního provedení (obr. 3.65). List umožňuje zadání parametrů, při nichž bylo měření provedeno.

Základní parametry měření	
Vzorkování	s
Počet jedinců řas	58333
Teplota	33 °C
Tlak	101325 Pa
Koncentrace kyslíku	228 μmol/l
Objem vzorku	ml

Zadané časování experimentu				
	Syn	Syn 1	Syn 2	s
Trvání osvitů	300	300	300	s
Trvání temné fáze	300	300	300	s
Trvání periody	600	600	600	s
Start osvitů	1200	6000		s
Počet sérií	5	10		

Synchronizované časování experimentu				
	Syn	Syn 1	Syn 2	s
Trvání osvitů	300	300	300	s
Trvání temné fáze	300	300	300	s
Trvání periody	600	600	600	s
Start osvitů	1195	5975		s
Počet sérií	5	10		

C				
				s
Počátek hledání maxim	-20			s
Zkrácení intervalu	0.7		0.3	s
				s
Aprox. exponenciál	0.1	0.1	0.02	
Aprox. exponenciál	0.6	0.6	0.19	

E				
				s
				s
Začátek exp abs	30			s
Začátek exp abs	180			s

Obr. 3.65: Tabulky v listu Parametry vyhodnocení

Podle provedeného měření se doplní parametry:

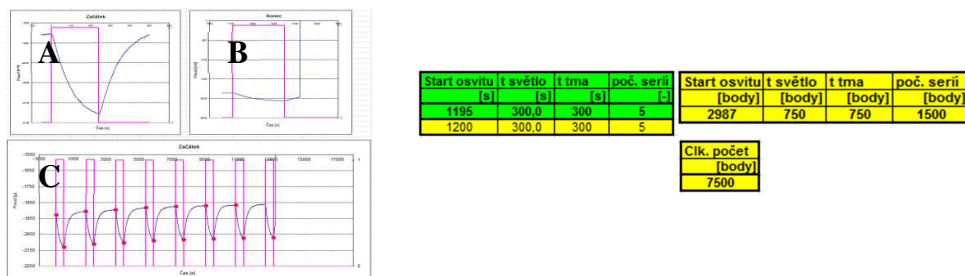
- vzorkování;
- počet jedinců řas;
- teplota;
- tlak;
- koncentrace kyslíku;
- objem vzorku;
- trvání osvitů;
- trvání temné fáze;
- začátek osvitů;
- počet sérií.

Vzorkování musí být zvolené tak, aby získaný počet dat nepřesáhnul 30 000. Trvání periody je automatický součet trvání osvitů a trvání tmy. Koncentrace kyslíku [μmol/l] za normálního parciálního tlaku 101325 Pa, se odečte z příložené tabulky 3.2. Rozpustnost O₂ za normálního tlaku ($1,01325 \cdot 10^5$ Pa), podle teploty, při které bylo měření provedeno. Počet sérií se zadává podle nastavení experimentu nebo je lze určit z listu experimentální data.

Začátek osvitů se zadává podle protokolu měření. Lze jej zjistit také z grafu v listu **Graf - data**. Je to hodnota získaná z maxima prvního píku. Šipkou myši se najede na vrchol píku a poté se samovolně objeví ukazatel, kde „číslo“ je hodnota začátku osvitů (obr. 3.66).

- Trvání tmy [s]

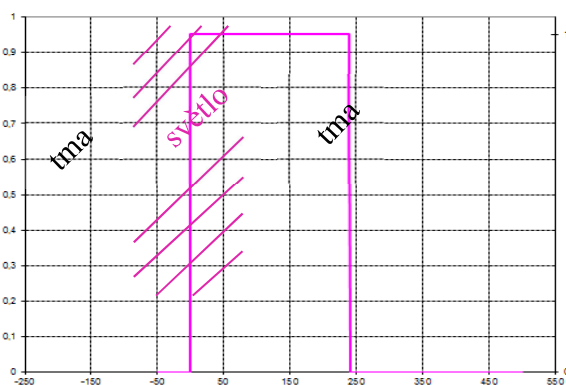
Jejich nastavením se synchronizuje měření a osvit.



Obr. 3.68: Grafy a tabulky v listu Synchronizace

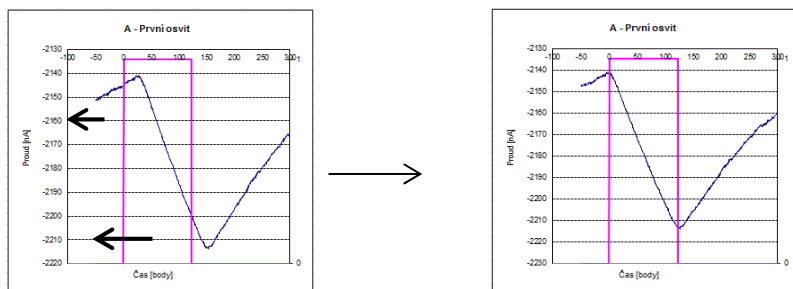
Ve druhé tabulce jsou výsledné hodnoty, které jsou uvedeny ve změřených časových bodech (počet bodů = čas / vzorkování).

Růžová osa definuje trvání osvitů (obr. 3.69). Její rozpětí určuje délka světla a délka tmy. Zadááním nových výchozích dat, dojde k vychýlení pík z růžové osy, která protíná pík v maximální a minimální hodnotě koncentrace kyslíku během osvitů. Světlo se musí vždy synchronizovat se správnou odezvou signálu. Pokud se prohodí světlo a tma, lze synchronizaci provést, ale výsledky budou zcela chybné.



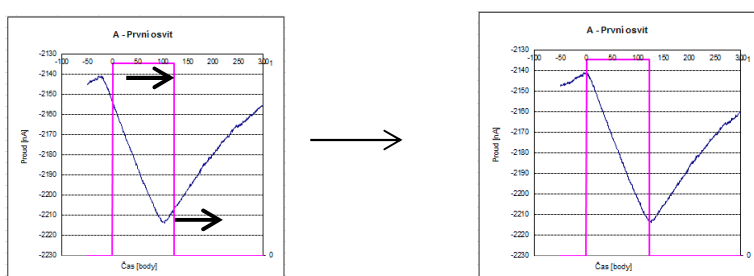
Obr. 3.69: Grafické rozlišení osvitů a tmy v grafech

V grafu A (první osvit) je důležité synchronizovat pík úpravou hodnoty parametru **start osvitů** (první tabulka, start osvitů) do rozmezí růžové osy. Jestliže je pík vychýlen doprava od růžové osy, potom se musí hodnota startu osvitů zvýšit (např. z hodnoty 740 na 767). Hodnota start osvitů se zvyšuje do té doby, než je minimum a maximum pík v rozmezí růžové osy (obr. 3.70).



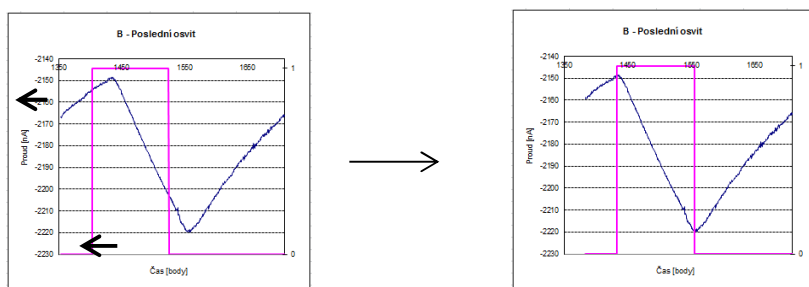
Obr. 3.70: Synchronizace startu osvitu.

Jestliže, je pík vychýlen doleva, je nutné hodnotu parametru start osvitu snížit tak, aby minimum a maximum píku protínalo růžovou osu (obr. 3.71).



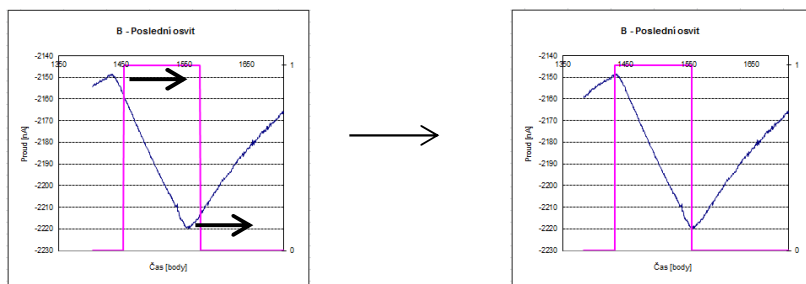
Obr. 3.71: Synchronizace startu osvitu.

Po upravení grafu A (první osvit) se upraví podobně i graf B (poslední osvitu), aby maximum a minimum píku protínalo růžovou osu. Pro upravení polohy píku se mění hodnota parametru **trvání tmy**. Jestliže je pík vychýlen doprava od růžové osy, hodnota trvání tmy se bude navyšovat (např. z hodnoty 660 na 666) (obr. 3.72).



Obr. 3.72: Synchronizace posledního osvitu.

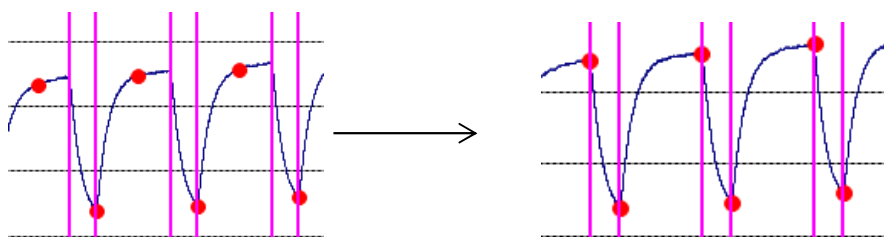
Jestliže je pík vychýlen doleva od růžové osy, hodnota trvání tmy se naopak bude podle potřeby snižovat (obr. 3.73).



Obr. 3.73: Synchronizace posledního osvitu.

Jakmile upravíme grafy A a B, měl by se automaticky upravit graf C, znázorňující celý průběh měření.

Pro každý osvit se v grafu C automaticky stanoví maximální a minimální koncentrace kyslíku, která je znázorněná červenými body. Může se stát, že dojde k jejich vychýlení (obr. 3.74). Úprava maxima a minima je možná v listu **Parametry vyhodnocení** změnou hodnoty **zkrácení intervalu** (podle potřeby zvýšit nebo snížit). Hodnota zkrácení intervalu definuje, v jakém rozpětí píku má program hledat maximum a minimum koncentrace kyslíku.



Obr. 3.74: Úprava maxima a minima.

Postup synchronizace naměřených dat pro vzorek (**Synchronizace 1**) a standard (**Synchronizace 2**) se provádí stejně jako pro kontrolu (**Synchronizace**).

3.5.2.4 List Kalibrace

Kalibrace je proces, při kterém dojde ke kalibraci proudu na koncentraci kyslíku. V první tabulce **Data před 1. osvitem** je automaticky stanoven interval, v němž se provádí kalibrace. Interval začíná 800 naměřených bodů před zahájením osvitu a končí 200 naměřených bodů po prvním osvitu. Editovatelná data umožňují zadat parametry kalibrace a zobrazit její postup (obr. 3.75).

Data před 1. osvitem		Data pro kalibraci			
Začátek	konec	z. zobrazení	z. kalibrace	k. kalibrace	k. zobrazení
[s]	[s]	[s]	[s]	[s]	[s]
875	1195,0	900	1050	1150	1200

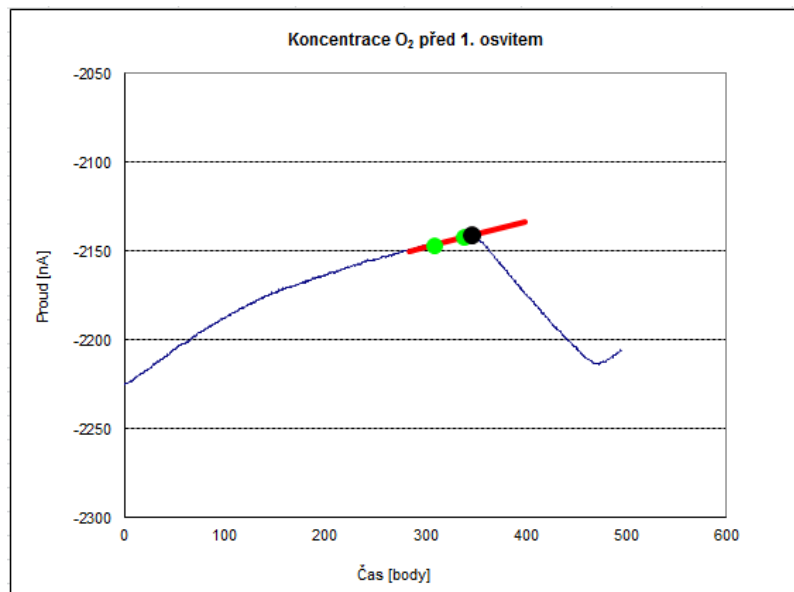
Obr. 3.75: Tabulka v listu Kalibrace.

- **Z. zobrazení** – udává začátek zobrazení proložené přímkou. Ležící v intervalu (začátek ... konec) (např. 367 ... 767 s).

- **Z. kalibrace** – začátek intervalu ve kterém se prokládá odezva přímkou. Leží v intervalu (začátek ... konec) (např. 367 ... 767 s).
- **K. kalibrace** – konec intervalu, ve kterém se prokládá odezva přímkou. Leží v intervalu (začátek ... konec) (např. 367 ... 767 s).
- **K. zobrazení** – konec intervalu, ve kterém se přímka zobrazí.

Například rozpětí pro dosažení hodnot pro kalibraci jsou 367 – 767 (Data před 1. osvitem). Jestliže je známo rozpětí, dosadí se libovolné hodnoty do buněk z. zobrazení, z. kalibrace a k. kalibrace v části Data pro kalibraci. Vždy se dosazují takové hodnoty, aby byla kalibrace provedena v ustálené fázi měření. Poslední hodnotu parametru k. zobrazení dosazujeme většinou vyšší než je určené rozpětí, aby bylo možno vidět, jak se projeví osvit řas.

Po dosažení hodnot se na grafu zobrazí červená přímka, která znázorňuje úsek kalibrace a dva zelené body, které určují počítané rozpětí kalibrace. Černý bod je místo, ve kterém dojde ke kalibraci, a pro který se vypočítá proud. Výsledná kalibrační konstanta je podíl koncentrace kyslíku opravené na aktuální atmosférický tlak a proudu v okamžiku zahájení osvit (obr. 3.76). Proud je do kalibračního bodu extrapolován. Výpočtem kalibrační konstanty je kalibrace dokončena.



Obr. 3.76: Graf kalibrace.

Druhá, needitovatelná tabulka vyhodnocuje závislost proudu na čase (obr. 3.78). Závislost proudu na čase je aproximována metodou nejmenších čtverců mezi body z. kalibrace (659) a k. kalibrace (677). Potom je proud extrapolován do bodu 0, v němž je zahájen osvit (693). Extrapolovaný proud (proud pro kalibraci), - 2141,5 nA je použit pro výpočet kalibrační konstanty. Kalibrační konstanta je určena jako podíl rovnovážné koncentrace kyslíku a jí odpovídajícímu proudu.

Popis vyhodnocované oblasti v měřených bodech					
Data před 1. osvitem			Data pro kalibraci		
Začátek	konec	z. zobrazení	z. kalibrace	k. kalibrace	k. zobrazení
[body]	[body]	[body]	[body]	[body]	[body]
2188	799	63	437	687	962
Regrese					
0,0046482 -1244,52266					
Proud pro kalibraci [µA]					
-1238,974509					
Kalibrační konstanta [µM / µA]					
-4,181681799					

Obr. 3.78: Needitovatelná tabulka.

3.5.2.5 List Vyhodnocení

Po úspěšném dokončení kalibrace je možno pracovat s listy **Vyhodnocení**, podobně jako u listů Synchronizace, Synchronizace 1 a Synchronizace 2. List **Vyhodnocení** vyhodnocuje data, která popisují průběh měření vzorku bez přidání toxické látky (fotosyntéza řas v normálních podmínkách), nebo také část měření, kdy dochází k ustálení řas před experimentem. Následující list **Vyhodnocení 1** se vztahuje k části měření, kdy byla ke vzorku řas přidána sledovaná neznámá toxická látka (ovlivnění řas neznámou látkou). List **Vyhodnocení 2** zpracovává měření, kdy ke sledovanému vzorku byla přidána standartní toxická látka (ovlivnění řas známou látkou), u které je známo působení na řasy (např. úhyn řas ve vzorku). Listy **Vyhodnocení 1** a **Vyhodnocení 2** jsou v úpravě hodnot a grafů stejné jako list **Vyhodnocení**.

Na listu **Vyhodnocení** se nachází tři tabulky a tři grafy. Po úspěšné synchronizaci dat se vyhodnocení vytvoří automaticky. Průběh vyhodnocení se může ovlivnit parametrem **průměr**, kdy změnou hodnoty se může měnit ustálená koncentrace kyslíku (obr. 3.79).

start osvit	t svetlo	t tma	poc. serií	průměr
[s]	[s]	[s]	[j]	[µM]
347	122,0	240	4	233

Obr. 3.79: Tabulka s možností úpravy průměru.

První graf znázorňuje průběh koncentrace kyslíku. Pro vyhodnocení je však důležitá změna koncentrace kyslíku jeho produkcí řasami.

V listu **Parametry měření** jsou uvedeny parametry **aproximace exponenciály**, které jsou v grafu znázorněny zelenými body. Parametry aproximace exponenciály určují 2 body, určené jako podíl délky trvání intervalu bez osvit (0,1 x 666 0,4 x 666), v nichž je návrat koncentrace kyslíku do rovnovážného stavu popsán exponenciálou.

Při měření produkují řasy během osvit kyslík. Jakmile produkce kyslíku vzroste nad ustálenou hodnotu, je nárůst koncentrace kyslíku oslabován tím, že plyn nad vzorkem jej odčerpává. Když přestane osvit, tak se znázorní proces odčerpání a díky aproximaci exponenciálou se zjistí časová konstanta poklesu kyslíku a pak se může opravit produkce kyslíku řasami a zjistí se reálná produkce kyslíku řasami (odečítá se tok kyslíku z kapaliny do okolí).

Druhý graf znázorňuje odečtenou koncentraci kyslíku po provedení aproximace exponenciály a znázorňuje tak ustálenou hodnotu koncentrace kyslíku. Zelené body znázorňují aproximace exponenciály, určující interval, ve kterém se provádí aproximace jako podíl délky intervalu temné fáze. Pro správné vyhodnocení je důležité, aby hodnoty aproximace (zelené body) byly v kladných hodnotách, protože záporné hodnoty by způsobily

vypočtena průměrná produkce kyslíku řasami na základě celého měření odezvy na jeden světelný pulz. K měření je potřeba, aby se po světelném pulzu systém vrátil do původního rovnovážného stavu. To však znamená, že fáze bez osvětlení musí být dostatečně dlouhá. To prodlužuje měření a činí ho méně efektivním. Další tři křivky ukazují produkci kyslíku, kdy je jeho koncentrace korigována na rovnovážnou koncentraci kyslíku bez řas extrapolací exponenciální funkcí. Vzhledem k tomu, že rovnovážná koncentrace je extrapolována, není nutno čekat na ustálení signálu a měření je rychlejší a stabilnější. (korigované křivky)

V listu **Produkce O₂ na buňku** je výsledná produkce kyslíku přepočítaná na jednoho jedince řasy. Tím je signál normalizovaný a měření je možno srovnávat. Počet jedinců řas se zadává v listu Parametry vyhodnocení.

3.5.2.7 List Shrnutí výsledku

Celý vyhodnocovací program umožňuje zkušenému uživateli kontrolovat jednotlivé kroky vyhodnocení. Pro rutinní využití je však takový postup nepraktický. Proto je vyhodnocení ukončeno listem **Shrnutí vyhodnocení**. Standardní praktické vyhodnocení potom spočívá pouze ve vložení naměřených dat do listu 1 a zhodnocení shrnutí výsledků. Při standardním postupu všechny listy zůstávají stejné a není potřeba měnit parametry vyhodnocení ani analyzovat mezivýsledky zobrazené na dílčích listech. Výsledku jsou přepočteny na jednu buňku.

Výsledky jsou zobrazeny ve třech tabulkách pro kontrolu, vzorek a standard (obr. 3.83). V každém poli je provedena analýza trendu vývoje produkce kyslíku lineární regresí. (Pole Regrese) a průměrná produkce kyslíku pro kontrolu, vzorek a standard.

Vyhodnocené výsledky jsou použity pro výpočet inhibice vzorkem a standardem. Inhibice se počítá podle vzorce

$$I = \frac{(e_c - e_i) \cdot 100}{e_c} [\%]$$

Kde e_c je střední hodnota odpovědi v kontrole, e_i je střední hodnota odpovědi v testované koncentraci toxikantu. Maximální inhibice je 100%. V případě stimulace jsou hodnoty inhibice záporné.

Druhým parametrem charakterizující výsledek je relativní inhibice kontroly, vzorku a standardu. Relativní inhibice je stanovena jako směrnice poklesu produkce kyslíku extrapolovaná k času přidání vzorku (kontroly, standardu) vztažená k produkci kyslíku extrapolované k času přidání vzorku (kontroly, standardu).

Vyhodnocení na základě inhibice

Jestliže je procento inhibice vzorku vyšší než procento inhibice standardu, je celkové toxické působení na jedince řasy vyšší než působení standardu.

Jestliže je procento inhibice vzorku nižší než procento inhibice standardu, je celkové toxické působení na jedince řasy nižší než působení standardu.

Volbou standardu je možno semikvantitativně posoudit toxicitu. Měření je ve svém principu založeno na srovnání působení známé toxické látky na kolonii řas a působení neznámého vzorku působícího na kolonii řas ve stejných podmínkách.

Shrnutí výsledků								
Kontrola			Vzorek			Standard		
regrese $p = a \cdot t + b$			regrese $p = a \cdot t + b$			regrese $p = a \cdot t + b$		
a	b		a	b		a	b	
[$\mu\text{mol/s}^2$]	[$\mu\text{mol/s}$]		[$\mu\text{mol/s}^2$]	[$\mu\text{mol/s}$]		[$\mu\text{mol/s}^2$]	[$\mu\text{mol/s}$]	
4,98E-14	1,69E-10		1,10E-14	4,07E-10		7,40E-15	4,10E-10	
průměr a SD			průměr a SD			průměr a SD		
průměr	SD	%	průměr	SD	%	průměr	SD	%
[$\mu\text{mol/s}$]	[$\mu\text{mol/s}$]		[$\mu\text{mol/s}$]	[$\mu\text{mol/s}$]		[$\mu\text{mol/s}$]	[$\mu\text{mol/s}$]	
2,38E-10	4,48E-11	18,8	4,38E-10	2,07E-11	4,7	4,51E-10	2,59E-11	5,8
inhibice Vzorek / Kontrola [%]			inhibice Vzorek / Kontrola [%]			inhibice Standard/ Kontrola [%]		
			-83,7			-89,2		
rel.inhibice	[1/s]	2,94E-04	rel.inhibice	[1/s]	2,69E-05	rel.inhibice	[1/s]	1,80E-05

Obr. 3.83: Tabulky obsahující výsledky měření.

Vyhodnocení na základě relativní inhibice

Výsledkem jsou tři relativní inhibice:

- r_K - relativní inhibice kontroly
- r_V - relativní inhibice vzorku
- r_S - relativní inhibice standardu

Možné výsledky jsou uvedeny v tab. 3.6. Relativní inhibice umožňuje podrobnější a přesnější identifikaci toxicity. Je možné také identifikovat možné chyby stanovení.

Tab. 3.6: Možné výsledky měření produkce kyslíku.

r_K	r_V	r_S	$r_V \cdot r_S$	Popis	Toxicita	Chyba
>0	>0	>0	-	Kontrola detekuje růst řas. Vzorek a standard stimulují růst řas.	-	Chybné ředění standardu.
>0	>0	<0	-	Vzorek stimuluje růst řas. Kontrola detekuje růst řas.	Vzorek stimuluje řasy.	-
>0	<0	>0	-	Vzorek inhibuje produkci kyslíku. Standard stimuluje růst řas. Kontrola detekuje růst řas.	Podezření na toxicitu.	Chybné ředění standardu.
>0	<0	<0	$r_V < r_S$	Vzorek inhibuje řasy více než standard. Lze kvalitativně odhadnout toxicitu. Kontrola detekuje růst řas.	Toxický vzorek.	-
>0	<0	<0	$r_V > r_S$	Vzorek inhibuje řasy méně než standard. Kontrola detekuje růst řas. Podezření na toxicitu, nižší než toxicita standardu.	Podezření na toxicitu.	-
<0	>0	>0		Vzorek a standard stimulují růst řas, vysoká koncentrace řas. Kontrola je inhibována.	-	Chybné ředění standardu. Vysoká koncentrace řas.
<0	>0	>0	$r_K >$	Vzorek a standard stimulují růst	Vzorek	-

r_K	r_v	r_s	$r_v \cdot r_s$	Popis	Toxicita	Chyba
			-1E-5	řas, vysoká koncentrace řas. Kontrola je inhibována.	není toxický	
<0	>0	<0		Vzorek stimuluje růst řas. Kontrola inhibuje.	-	Kontaminace reakční nádoby.
<0	>0	<0	$r_K >$ - 1E-5	Vzorek stimuluje růst řas. Kontrola inhibuje.	Vzorek stimuluje řasy.	Vysoká koncentrace řas. Kontaminace reakční nádoby.
<0	<0	>0		Vzorek inhibuje produkci kyslíku. Standard stimuluje růst řas. Kontrola je inhibována.	-	Chybné ředění standardu. Kontaminace reakční nádoby.
<0	<0	>0	$r_K >$ - 1E-5	Vzorek inhibuje produkci kyslíku. Standard stimuluje růst řas. Kontrola je inhibována.	Toxický vzorek.	Chybné ředění standardu.
<0	<0	<0	$r_v <$ r_s $r_k >$ r_s	Vzorek inhibuje řasy více než standard. Lze kvalitativně odhadnout toxicitu. Kontrola inhibuje řasy.	-	Kontaminace reakční nádoby.
<0	<0	<0	$r_v <$ r_s $r_k >$ r_s $r_K >$ - 1E-5	Vzorek inhibuje řasy více než standard. Lze kvalitativně odhadnout toxicitu. Kontrola inhibuje řasy.	Toxický vzorek.	-
<0	<0	<0	$r_v <$ r_s $r_k <$ r_v	Kontrola – inhibice řas.	-	Kontaminace reakční nádoby.
<0	<0	<0	$r_v >$ r_s $r_k >$ r_v	Vzorek inhibuje řasy méně než standard. Kontrola detekuje inhibici. Podezření na toxicitu, nižší než toxicita standardu.		Kontaminace reakční nádoby.
<0	<0	<0	$r_v >$ r_s $r_k <$ r_s	Kontrola detekuje inhibici.	-	Kontaminace reakční nádoby.

4 Srovnání novosti postupů

Znečišťování životního prostředí dosahuje v současné době takového stupně, že soustavná a selektivní kontrola látek kontaminujících ovzduší, vodu a půdu se stává téměř nemožnou. Významným faktorem negativně ovlivňujícím kvalitu životního prostředí se stala doprava, zejména v důsledku nárůstu přepravních výkonů po vstupu ČR do EU (Adamec et al., 2008). V současné době se v této souvislosti hovoří nejčastěji ve spojitosti se znečištěním ovzduší prostřednictvím emisí, kdy do životního prostředí vstupuje nejenom celá řada plynných škodlivin (Yli-Tuomi et al., 2005; Hueglin et al., 2006; Ho et al., 2007), ale zvyšují se také obsahy pevných částic (PM) a na ně vázaných, často velmi nebezpečných škodlivin, jako jsou polyaromatické uhlovodíky (Harrison et al., 2003) nebo rizikové prvky (Lough et al., 2005; Valius et al., 2005) a těžké kovy (Gómez et al., 2001). Nezanedbatelný je však také podíl na znečištění dalších složek životního prostředí jako jsou např. podzemní (Legret et al., 2005; Ličbinský et al., 2007) a povrchové vody (Shinya et al., 2000; Smit et al., 2000), půda, biota (Tuháčková et al., 2001). Zatímco výše uvedené důsledky jsou spojovány spíše s dlouhodobějšími negativními vlivy, se vzrůstající mobilitou stoupá i počet akutních náhodných znečištění v podobě havárií. Tyto, zejména při přepravě nebezpečných věcí, mohou mít pro životní prostředí dalekosáhlé následky (Kvarčák et al., 2000).

Znečištění životního prostředí dopravou je sledováno standardními analytickými postupy a toxikologickými testy v laboratořích, což je v případě zabezpečování pravidelného sledování velmi náročné zejména z pohledu velké časové náročnosti a nutnosti vlastnit speciální přístrojové vybavení a disponovat s tímto spojenou kvalitní odbornou obsluhou. Východiskem může být aplikace biologických testů pro sledování znečištění životního prostředí. Výhoda biologických testů spočívá v tom, že umožňují celkovou detekci působení chemických látek na životní prostředí a dokonce jsou schopny měřit i ty škodlivé látky, jejichž klasická analýza není metodicky zvládnuta, ale jejichž společným rysem je toxické působení na citlivý organismus. Navíc tím, že doprava ovlivňuje většinu ekosystémů, vzniká velmi široká škála potenciálně možných interakcí mezi chemickými látkami a různými matricemi v rozmanitých ekosystémech. Pokud zvažujeme ještě fakt, že neustále roste počet chemických látek, které rovněž prostřednictvím dopravy ovlivňují negativně životní prostředí a navíc je neustále rozšiřována i dopravní infrastruktura, stala se komplexní klasická chemická analýza metodou časově velmi náročnou, nákladnou a z tohoto pohledu neefektivní. Stejně tak toxikologické testy indikující vliv znečištěného prostředí na živé organismy prováděné v laboratořích jsou, stejně jako chemické analýzy, v případě zabezpečení pravidelného sledování velmi náročné a to také v důsledku nutnosti vlastnit speciální přístrojové vybavení a s tím spojenou kvalitní odbornou obsluhu. Metody a zařízení, které by mohly nahradit výše zmíněné postupy při zachování přijatelných vypovídajících schopností, však dosud nebyly vyvinuty.

Z odborné literatury je známo využívání různých typů senzorů pro stanovení kontaminace životního prostředí různými typy látek. Většinou jsou to zařízení vyvinutá v rámci různých výzkumných aktivit, komerčně nevyužívaná a specializovaná na určitý typ látky, případně více látek. Např. v Japonsku vyvinuli inovativní senzor na stanovení kontaminace par n-hexanem, chloroformem, fenolem, benzenem (Tsubokawa et al., 2001, Iwata et al., 2006). Byl popsán odolný optický senzor pro sledování obsahu bílkovin v ovzduší (Starodub et al., 2000), inovativní senzory pro stanovení těkavých organických látek (toluen, ethylbenzen, p-xylen, o-xylen) ve výfukových plynech spalovacího diesellového motoru (Capone et al., 2008) i ve volném ovzduší v podobě přenosného zařízení, které je možné využít i ke sledování koncentrací dalších organických škodlivin jako jsou ketony, chlorované uhlovodíky, aromáty, parafíny a alkoholy (Fang et al., 1999). Další slouží ke stanovení koncentrací běžných škodlivin (CO, O₃, NO_x) (Baraton et al., 2004) nebo NH₃ a SO₂ (Kim et al., 2008) ve vnějším

ovzduší. Jsou popsány rovněž senzory na stanovení vybraných látek v dalších environmentálních maticích, jako např. senzory sledující kontaminaci pitné vody ve vodovodu pesticidy, alkaloidy, bakteriemi a chloridem rtuťným. (Yang et al., 2009) či systémy na bázi potenciometrů pro kontinuální měření obsahů amoniaku a dusičnanů v podzemních vodách (Sander et al., 1993). Existují senzory na stanovení vlastností půd jako je drsnost povrchu a nespojitost v barvě povrchu, které odráží obsah organické hmoty v půdě (Elliott et al., 1996) i multisensorové systémy primárně určené pro monitoring znečištění přírodních vod (Rudnitskaya et al., 2001). Výše popsané typy senzorů pracují na principech elektrochemie.

Biosenzory využívající k indikaci znečištění životního prostředí měření určité veličiny spojené s životní aktivitou organismů jsou využívány výhradně při experimentech v laboratořích. Příkladem může být optický biosenzor pro měření herbicidů ve vodách (Védrine, 2003) včetně odpadních (Frense et al., 1998), řasový biosenzor pro hodnocení toxicity vlivem znečištění přírodních vod (Campanella et al., 2001). Jsou známy rovněž biosenzory využitelné ke stanovení přítomnosti par metanu v plynné fázi (Naessens a Tran-Minh, 1998), perchloretylenu (tetrachlorethylenu) ve formě aerosolů (Naessens a Tran-Minh, 1998) nebo k hodnocení toxicity chemikálií (antrazin, DCMU) měřením kyslíku produkovaného fotosyntézou řas (Shitanda et al., 2009). Popsány byly také biosenzory ke stanovení přítomnosti anorganických látek jako např. Cu^{2+} (Alpat et al., 2007, Alpat et al., 2008) nebo těžkých kovů (Durrieu, 2002).

Během posledního desetiletí byla vyvinuta řada biosenzorů, které sloužily k detekci herbicidů, těžkých kovů, volatilních organických látek a dokonce i bojových látek. Jejich hlavní výhodou je, že umožňují rychlé a opakované měření bez náročné přípravy vzorku. Všechna tato zařízení mají biomateriál (např. buňky řas, sinic, mikroorganismů) imobilizován v matici, která zabraňuje jeho vyluhování bez redukce stability a aktivity buněk. Imobilizace je limitujícím krokem, protože materiály pro imobilizaci musí být netoxické pro živé buňky a dostatečně stabilní (Lagarde a Jaffrezic-Renault, 2011). Přehled použití různých celobuněčných organismů a metod imobilizace při konstrukci biosenzorů shrnují články Eltzova a Markse, 2011, Lagarde a Jaffrezic-Renault, 2011a Brayner et al., 2011. Durrieu et al., 2015 představuje novou techniku imobilizace buněk řas enkapsulací buněk v translucidním anorganickém hydrogelu, což umožňuje zlepšit výkon těchto biosenzorů. Navržený biosenzor byl testován na detekci chemických látek v městských dešťových vodách.

Většina imobilizačních technik je ireverzibilní. Poslední vývoj směřuje k používání nanočástic při imobilizaci, což umožňuje zlepšit citlivost a stabilitu biosenzorů. Jsou popsány biosenzory vytvořené kombinací mikrobiálních buněk s různými nanomateriály (Ševčovičová a Tkac, 2014). Nanomateriály je možné využít při konstrukci biosenzorů pro monitoring životního prostředí (Durrieu et al., 2012). Je popsána imobilizace řasy *Chlorella pyrenoidosa* pomocí magnetických nanočástic umožňující efektivní a reverzibilní imobilizaci bez vlivu na buněčný metabolismus (Zamaleeva et al., 2011, Fakhrullin et al., 2010).

Vyvíjené biosenzory jsou většinou zaměřené na detekci určité skupiny škodlivých látek. Byl vyvinut přenosný mikrořasový biosenzor založený na pulzní amplitudové modulaci (PAM), sloužící ke sledování koncentrace Cu v nádržích (Vázquez et al., 2010). Pro detekci těžkých kovů (Cu, Pb, Cd) a pesticidů (kyselina dichlorfenoxycetová (2,4 – D) a chlorpyrifos) byl využit fluorescenční biosenzor vytvořený imobilizací sinice *Anabaena torulosa* na membráně celulózy a nanesení poly (2-hydroxyethylmethakrylátu) (Shing et al., 2013). Stanovení rtuti v přítomnosti iontů stříbra umožnil biosenzor, který využívá imobilizace buněk zelené řasy *Chlorella* přes skelnou uhlíkovou elektrodu (Singh a Mittal, 2012). Ampérometrický biosenzor sloužící k detekci biologicky dostupných iontů těžkých kovů, jako je zinek, měď,

kadmium, kobalt a nikl, byl vyroben za použití řasy *Chlorella* sp. zachycené v polymerní membráně přímo připojené k povrchu platinové elektrody (Singh a Mittal, 2012). Zheng et al., 2012 vyvinuli mikrofluidní čip pro stanovení toxicity těžkých kovů, založený na bázi měření mobility mořských řas. Byly vyvinuty také řasové biosenzory pro detekci pesticidů, které využívají jako biosnímací prvek imobilizované řasy (Ferro et al., 2012, Durrieu et al., 2011, Husua et al. 2013, Rashkova et al., 2012).

V současné době jsou známá pouze 2 zařízení nabízená na trhu resp. běžně dostupné využívající princip biosenzoru. Prvním je přístroj *Algae Toximeter II* firmy *bbe Moldaenke GmbH* (*bbe* = biological biophysical engineering, Německo), detektor toxicity využívající řasy, který zaznamenává aktivitu buněk řas vystavených působení protékajícího měřeného vzorku. Metoda je založena na měření fluorescence chlorofylu. Druhým je přístroj *SpeedyBreedy*, respirometr detekující a monitorující mikrobiální aktivitu stanovenou na základě tlakových změn spojených s výměnou plynů, která je výsledkem mikrobiální respirace.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika byla pojata jako dokument seznamující uživatele se správnou aplikací a manipulací s nově vyvinutým přístrojem pro rychlou indikaci znečištění různých složek životního prostředí při prováděných měřeních v praxi. Metodika tak nalezne široké uplatnění jak na praktickém, tak i vědeckém poli působnosti.

Speciální a přitom poměrně jednoduchý přístroj indikující vliv škodlivin na živé organismy dosud není komerčně používán, a proto je velmi dobrý předpoklad k jeho využívání firmami působící v oblasti ochrany životního prostředí, a to nejenom v souvislosti s vlivy dopravy na životní prostředí, ale i v jiných oblastech např. ve spojitosti s hodnocením kvality vodních zdrojů či s vlivem průmyslových podniků. Přístroj společně s metodikou mohou využít také orgány státní správy a samosprávy činnými v oblasti ochrany životního prostředí k namátkové či pravidelné kontrole stavu znečištění složek životního prostředí.

Přístroj společně s touto metodikou bude rovněž možné využít v rámci výzkumných projektů některých vysokých škol nebo výzkumných pracovišť, vzhledem k unikátní citlivosti a rychlosti měření.

Vyvinuté zařízení vč. předložené metodiky má významně širší uplatnění než detekce toxických látek ve vzorcích životního prostředí. Přístroj lze použít např. při výrobě chemických látek resp. při jejich hodnocení v souladu s legislativou REACH, kdy si může výrobce sám otestovat vliv vyráběné chemikálie na živé organismy. Zařízení lze použít nejenom pro hodnocení vlivu na řasy, ale i pro přesné měření biochemické spotřeby kyslíku, pro přesné měření chemické spotřeby kyslíku, pro testy růstu buněk tkání, malých živočichů spotřebovávajících nebo produkujících kyslík (respirometrie), pro testy sterility na základě sledování růstu mikroorganismů nebo pro měření pomalých reakčních rychlostí, v nichž se mění koncentrace kyslíku (např. Enzymové aktivity oxidáz).

6 Ekonomické aspekty

Metodika se zabývá aplikací a manipulací s nově vyvinutým přístrojem pro rychlou indikaci znečištění různých složek životního prostředí resp. možných dopadů na živé organismy. V současné době se k hodnocení možných dopadů znečištění na živé organismy používají klasické laboratorní techniky resp. ekotoxikologické testy. Nicméně, klasický test využívající aktivity řas, jehož obdobou je i vyvíjený přístroj, realizovaný v laboratorních podmínkách stojí cca. 3 až 5 tis. Kč, bez nákladů na odběr a transport vzorku do laboratoře a navíc trvá 72 hodin. Zejména v případě dlouhodobého monitoringu s četností testů 12krát ročně, což je běžný interval např. při sledování kvality povrchových vod, je tak sledování zátěže velmi významnou finanční položkou v rozpočtu organizací, které tyto aktivity zabezpečují. A nezanedbatelná je také velká časová náročnost výše uvedeného laboratorního postupu.

Předložená metodika přináší novou metodu umožňující měření integrálního vlivu znečištění na životní prostředí resp. dopadů na živé organismy, která je obdobou ČSN EN ISO 8692 :Je však rychlejší (cca. několik hodin vs. 72 hodin) a přesnější vzhledem k její algoritmizaci a integraci do vyvinutého přístroje. To ji předurčuje k využití ve větším rozsahu firmami působícími v oblasti ochrany životního prostředí a zejména také v případě, kdy je nutné rychle, ale objektivně zhodnotit možné dopady na živé organismy nějaké nenadálé události jako např. nehody s únikem nebezpečných látek do životního prostředí pro přijetí příslušných opatření. V případě realizace dlouhodobého monitoringu znečištění předpokládáme návratnost financí vynaložených na nákup přístroje i při zahrnutí nákladů na jeho údržbu nejpozději do 2 let při zachování stejného intervalu testování, a to při uvažování monitoringu pouze na jedné lokalitě. Navíc speciální a přitom poměrně jednoduchý přístroj indikující vliv škodlivin na živé organismy dosud není komerčně používán.

7 Použitá literatura

- Adamec, V., Dostál, I., Dufek, J. a kol. 2008. *Doprava, zdraví a životní prostředí*. Praha: Grada, 176 s. ISBN 987-80-247-2156-9.
- Alpat, K.S., Alpat, S., Kutlu, B. et al. 2007. Development of biosorption-based algal biosensor for Cu(II) using *Tetraselmis chuii*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 128, No. 1, p. 273-278.
- Alpat, S., Alpat, K.S., Çadırcı, B.H., et al. 2008. A novel microbial biosensor based on *Circinella* sp. modified carbon paste electrode and its voltammetric application. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 134, No. 1, p. 175-181.
- Baraton, M., Merhari L. 2004. Nanoparticles-based chemical gas sensors for outdoor air quality monitoring microstations. *Materials Science and Engineering B*, Vol. 112, No. 2-3, p. 206-213.
- Brayner, Roberta, Alain Couté, Jacques Livage, Catherine Perrette a Clémence Sicard. Microalgal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **401**(2): 581-597 [cit. 2015-09-29].
- Campanella L., Cubadda F., Sammartino M. P. et al. 2001. An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Research*, Vol. 35, No.1, p. 69-76.
- Capone, S., Zuppa, M., Presicce, D.S. 2008. Metal oxide gas sensor array for the detection of diesel fuel in engine oil. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 131, No. 1, p. 125-133.
- ČSN EN ISO 8692. 2012 *Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Evropský výbor pro normalizaci.
- Durrieu, C., Tran-Minh, C. 2002. Optical Algal Biosensor using Alkaline Phosphatase for Determination of Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 51, No. 3, p. 206-209.
- Durrieu, C., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., 2012, Nanotechnology Assets in Biosensors Design for Environmental Monitoring. In. *Nanomaterials: A Danger or a Promise?* p. 189-229.
- Durrieu, C.; Guedri, H.; Fremion, F., et al. 2011. Unicellular algae used as biosensors for chemical detection in Mediterranean lagoon and coastal waters. *Research in microbiology*, Vol. 162, Issue 9, Special Issue SI, p. 908-914.
- Durrieu, C., Ferro, Y, Perullini, M., et al. 2015. Feasibility of using a translucent inorganic hydrogel to build a biosensor using immobilized algal cells. *Environmental Science and Pollution Research*. p. 1-5
- Elliott, P.W., Haghghi, K., Krutz, G.W. 1996. Effects of surface conditions on organic matter measurements of a soil sensor. *Computers and Electronics in Agriculture*, Vol. 16, No. 1, p. 21-38.
- Eltzov, E., Marks, R.S. 2011. Whole-cell aquatic biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 400, Issue 4, p. 895-913.
- Fakhrullin, R. F.; Shlykova, L.V.; Zamaleeva, A.I.; et al. 2010, Interfacing Living Unicellular Algae Cells with Biocompatible Polyelectrolyte-Stabilised Magnetic Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 10, Issue 10, p. 1257-1264. Fang, M.,

- Vetelino, K., Rothery, M. et al. 1999. Detection of organic chemicals by SAW sensor array, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 56, No. 1-2, p. 155-157.
- Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., et al. 2012. Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels. *SENSORS*, Vol. 12, Issue 12, p. 16879-16891.
- Frense, D., Müller, A., Beckmann, D. 1998. Detection of environmental pollutants using optical biosensor with immobilized algae cells. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 51, No. 1-3, p. 256-260.
- Gómez, B., Gómez, M., Sanchez, J.L. et al. 2001. Platinum and rhodium distribution in airborne particulate matter and roaddust. *Science of the Total Environment*, Vol. 269, p. 131 – 144.
- Harrison, R.M., Tilling R., CallénRomero, M.C. et al. 2003. Study of Trace Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Roadside Environment. *Atmospheric Environment* Vol. 37, p. 2391-2402.
- Ho K.F., Sai Hang Ho S., Cheng Y., et al. 2007. Real-world emission factors of fifteen carbonyl compounds measured in a Hong Kong tunnel. *Atmospheric Environment* Vol. 41, No. 8, pp. 1747–1758
- Hueglin C., Buchmann B., Weber R.O. 2006. Long-term observation of real-world road traffic emission factors on a motorway in Switzerland. *Atmospheric Environment* Vol. 40, No. 20, pp. 3696–3709
- Husua, I., Rodioa, G., Touloupakisb, E., et al. 2013. Insights into photo-electrochemical sensing of herbicides driven by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Sensors and Actuators B*, Vol. 185, p. 321– 330.
- Iwata, H., Nakanoya, T., Morohashi, H., 2006. Novel gas and contamination sensor materials from polyamide-block-poly(ethylene oxide)-grafted carbon black. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 113, No. 2, p. 875-882.
- Jacquez, John A. *Compartmental analysis in biology and medicine*. 2nd ed. Ann Arbor: University of Michigan Press, c1985, x, 560 p.
- Kim, P., Albarella J.D., Carey J.R. et al. 2008. Towards the development of a portable device for the monitoring of gaseous toxic industrial chemicals based on a chemical sensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 134, No. 1, p. 307-312.
- Kvarčák, M., Vavrečková, J., Žemlička, Z. 2000. *Likvidace ropných havárií*. Ostrava: SPBI Spektrum, 106 s. ISBN 80-86111-61-X.
- Lagarde F., Jaffrezic-Renault, N. 2011. Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 400, Issue 4, p. 947 – 964.
- Legret, M., Odieb, L., Demarea, D. et. al. Leaching of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons from reclaimed asphalt pavement. *Water Research*, 2005, Vol. 39, No. 15, p. 3675–3685.
- Ličbinský, R., Schwarzová M., Provalilová I. 2007. *Kontaminace vod polutanty obsaženými v konstrukčních vrstvách vozovek (Závěrečná zpráva o realizaci projektu 1P050C003)*. Brno: Centrum dopravního výzkumu, v.v.i., 5 s.

- Lough, G.C., Schauer, J.J., Park, J.S. 2005. Emissions of metals associated with motor vehicle roadways. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 39, p. 826-836.
- Moore, Walter John. *Fyzikální chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1979, 974 s.
- Naessens, M., Tran-Minh, C. 1998. Whole-cell biosensor for direct determination of solvent vapours. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 13, No. 3-4, p. 341-346.
- Naessens, M., Tran-Minh, C. 1998. Whole-cell biosensor for determination of volatile organic compounds in the form of aerosols. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 364, No. 1-3, p. 153-158.
- Peña-Vázquez, E., Pérez-Conde, C., Costas, E., et al. 2010. Development of a microalgal PAM test method for Cu(II) in waters: comparison of using spectrofluorometry. *Ecotoxicology*, Vol. 19, Issue 6, p. 1059-1065.
- Rudnitskaya, A., Ehlert, A., Legin, A. et al. 2001. Multisensor system on the basis of an array of non-specific chemical sensors and artificial neural networks for determination of inorganic pollutants in a model groundwater. *Talanta*, Vol. 55, No. 2, p. 425-431.
- Ředitelství silnic a dálnic ČR 2013, *Silnice a dálnice v ČR*. 11 s. dostupné z: <http://www.rsd.cz/doc/Silnicni-a-dalnicni-sit/silnice-a-dalnice-v-ceske-republice-2013>.
- Sander, J., Zuther, F., Cammann K. 1993. Groundwater control system based on chemical sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 15, No. 1-3, p. 188-191.
- Shinya, M., Tsuchinaga, T., Kitano, M. et al. 2000. Characterization of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban highway runoff. *Water Science and Technology*, Vol. 42, No. 7-8, p. 201 - 208.
- Shing, W.L.; Heng, L.Y.; Surif S. 2013. Performance of a Cyanobacteria Whole Cell-Based Fluorescence Biosensor for Heavy Metal and Pesticide Detection. *SENSORS*, Vol. 13, Issue 5, p. 6394-6404.
- Shitanda, I., Takamatsu, S., Watanabe, K. et al. 2009. Amperometric screen-printed algal biosensor with flow injection analysis system for detection of environmental toxic compounds. *Electrochimica Acta*, Vol. 54, No. 21, p. 4933-4936.
- Singh, J., Mittal, S.K. 2012. Chlorella sp. based biosensor for selective determination of mercury in presence of silver ions. *Sensors and Actuators B.*, Vol. 165, p. 48-52.
- Singh, J., Mittal, S.K. 2012. Whole cell based amperometric sensor with relative selectivity for zinc ions. *Analytical methods*, Vol. 4, Issue 5, p. 1326-1331.
- Smith, J.A., Sievers, M., Huang, S., Yu, S.L. et al. 2000. Occurrence and phase distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm-water runoff. *Water Science and Technology*, Vol. 42, No. 3-4, p. 383 - 388.
- Starodub, V.M., Fedorenko, L.L., Starodub, N.F. 2000. Optical immunosensors for the monitoring of protein substances in the air. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 68, No. 1-3, p. 40-47.
- Šefčovičová, J., Tkáč, J. 2014. Application of nanomaterials in microbial-cell biosensor constructions. *Chemical Papers*. p. 1-12.
- Tsubokawa, N., Tsuchida, M., Chen, J. et al. 2001. A novel contamination sensor in solution: the response of the electric resistance of a composite based on crystalline polymer-grafted carbon black. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 79, No. 2-3, p. 92-97.

- Tuháčková, J., Cajthalm, T., Novák, L. et al. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. *Environmental Pollution*, 2001, Vol. 113, No. 3, p. 255 – 262.
- Vallius, M., Janssen, N.H.N., Heinrich, J. et al. 2005. Sources and elemental composition of ambient PM_{2.5} in three European cities. *Science of the Total Environment*. Vol. 337, p. 147 – 162.
- Védrine, Ch., Leclerc, J.-C., Durrieu, C. et al. 2003. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 18, No. 4, p. 457-463.
- Yang, Y.J., Haught, R.C., Goodrich, J.A. 2009. Real-time contaminant detection and classification in a drinking water pipe using conventional waterquality sensors: Techniques and experimental results. *Journal of Environmental Management*, Vol. 90, No. 8, p. 2494-2506.
- Yli-Tuomi, T., Aarnio, P., Pirjola, L. et al. 2005. Emissions of fine particles, NO_x, and CO from on-road vehicles in Finland. *Atmospheric Environment*, Vol. 39, No. 35, p. 6696–6706.
- Zamaleeva, A.I., Sharipova, I.R., Shamagsumova, R. V., et al. 2011, A whole-cell amperometric herbicide biosensor based on magnetically functionalised microalgae and screen-printed electrodes. *Analytical Methods*, Vol. 3, Issue 3, p. 509-513.
- Zheng, G., Wang, Y., Qin, J. 2012. Microalgal motility measurement microfluidic chip for toxicity assessment of heavy metals. *Analytical and bioanalytical chemistry*, Vol. 404, Issue 10, p. 3061-3069.